

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-531224

(P2004-531224A)

(43) 公表日 平成16年10月14日(2004.10.14)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027	4 B O 2 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 4
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 25/28	4 B O 6 5
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C O 8 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 184 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2002-559452 (P2002-559452)	(71) 出願人	503241331
(86) (22) 出願日	平成14年1月2日 (2002.1.2)		ザ・ユニバーシティ・コート・オブ・ザ・
(85) 翻訳文提出日	平成15年7月3日 (2003.7.3)		ユニバーシティ・オブ・アバディーン
(86) 国際出願番号	PCT/GB2002/000005		THE UNIVERSITY COUR
(87) 国際公開番号	W02002/059150		T OF THE UNIVERSITY
(87) 国際公開日	平成14年8月1日 (2002.8.1)		OF ABERDEEN
(31) 優先権主張番号	0100119.7		イギリス国、グランビアン エービー24
(32) 優先日	平成13年1月3日 (2001.1.3)		3エフエックス、アバディーン、リージ
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		ェント・ウォーク
		(74) 代理人	100078662
			弁理士 津国 肇
		(74) 代理人	100075225
			弁理士 篠田 文雄
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 神経変性疾患におけるタンパク質凝集に関する材料および方法

(57) 【要約】

立体配座の重合相互作用の誘導により、凝集性疾患タンパク質 (A D P、例えばタウタンパク質) が病的に凝集する病態 (例えばアルツハイマー病) に伴う凝集性疾患タンパク質 (A D P、例えばタウタンパク質) の病的状態を誘導するかまたはモデル化する方法であって、(i) A D P に由来するか、または A D P の病的凝集を開始するタンパク質に由来する凝集タンパク質と、(i i) 異種性膜局在可能なタンパク質とを含む膜局在融合タンパク質とを提供する工程を特徴とする方法を開示する。A D P 基盤の融合タンパク質膜局在は、系に対して元来のものであるかまたは異種性でよい別の A D P の凝集が促進されるように A D P タンパク質の高親和性捕捉部位の暴露を引き起こすと考えられている。方法をインビトロ、または細胞および動物モデルにおいて実施でき、そしてこれを用いて凝集をモニター観察することにより、例えば凝集の結果である A D P 関連変性生成物の生成をモニター観察することにより凝集過程のモジュレーターをスクリーニングできる。方法にてまたは方法に伴う材料、過程も提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

誘導された立体配座の重合相互作用によって、凝集性疾患タンパク質（ADP）が、病的に凝集する病態に伴う凝集性疾患タンパク質（ADP）の病的状態を誘導するか、またはモデル化する方法であって、（i）ADPに由来するか、またはADPの病的凝集を開始するタンパク質に由来する凝集部分と、（ii）異種性膜局在部分とを含む膜局在可能な融合タンパク質を提供する工程を特徴とする方法。

【請求項 2】

融合タンパク質の凝集部分が、ADPに由来し、融合タンパク質の膜局在が、ADPタンパク質の高親和性捕捉部位を別のADPの凝集を促進するように暴露させるようにする、請求項 2 記載の方法。 10

【請求項 3】

（a）融合タンパク質を提供することと；
（b）それを膜に導入することと；
の工程を含む、請求項 1 または請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

病態におけるADPの凝集が、神経変性および/または臨床的痴呆に伴う、請求項 1 ~ 請求項 3 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5】

病態におけるADPの病的凝集が、コアドメインフラグメントへのADPのタンパク質分解性プロセッシングをもたらす、請求項 1 ~ 請求項 4 のいずれか一項記載の方法。 20

【請求項 6】

凝集部分が、少なくともADPのコアフラグメントを含む、請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

凝集部分が、本質的にコアフラグメントからなる、請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

膜局在部分が、膜アンカー配列および/または輸送停止配列を含む、請求項 1 ~ 請求項 7 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 9】

膜局在部分が、哺乳動物シグナル配列を含む、請求項 8 記載の方法。 30

【請求項 10】

哺乳動物シグナル配列が、ラットアルブミンシグナル配列である、請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】

疾患が、ピック病、進行性核上性麻痺、アルツハイマー病から選択される、請求項 1 ~ 請求項 10 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 12】

ADPが、タウタンパク質である、請求項 1 ~ 請求項 11 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 13】

融合タンパク質の凝集部分が、タウのコアフラグメントを含む、請求項 12 記載の方法。

【請求項 14】

融合タンパク質の凝集部分が、図 5 に示す全長タウタンパク質のアミノ酸 186 ~ 296 から 390 ~ 441 にわたるタウのフラグメントを含む、請求項 13 記載の方法。 40

【請求項 15】

融合タンパク質の凝集部分が、全長タンパク質のアミノ酸残基 296 ~ 390、190 ~ 441 または 190 ~ 390 からなる、請求項 14 記載の方法。

【請求項 16】

（a）膜局在形態の融合タンパク質を提供することと；
（b）融合タンパク質を一つ以上の可能性のある結合パートナーと接触させることと；
（c）可能性のある結合パートナーが、融合タンパク質に結合するかどうかを決定することと；

の工程を含む、A D P 高親和性捕捉部位の特異的結合パートナーに関してスクリーニングするための、請求項 2 ~ 請求項 15 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 17】

接触工程が、細胞内であり、結合パートナーが、細胞内に存在する、請求項 16 記載の方法。

【請求項 18】

更に細胞から結合パートナーを回収する工程を含む、請求項 17 記載の方法。

【請求項 19】

(a) 膜局在形態の融合タンパク質を提供することと；
 (b) 融合タンパク質および A D P またはその誘導体である別の A D P 分子間の立体配座の重合相互作用の誘導を引き起こすか、または可能にすることと；
 (c) 場合によっては別の A D P 分子の凝集の程度をモニター観察することと；
 の工程を含む A D P 分子の凝集を誘導するための、請求項 1 ~ 請求項 15 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 20】

膜が、細胞膜であり、そして凝集が、細胞内で生じる、請求項 19 記載の方法。

【請求項 21】

工程 (a) が、細胞内に融合タンパク質を導入して、それが細胞内の膜で局在するようにすることからなる、請求項 20 記載の方法。

【請求項 22】

工程 (a) が、融合タンパク質をコードする核酸を細胞またはその祖先内に導入して、融合タンパク質を細胞において発現させ、そして細胞内の膜で膜局在化するようにすることからなる、請求項 20 記載の方法。

【請求項 23】

別の A D P 分子が、細胞生来のものである、請求項 20 ~ 請求項 22 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 24】

別の A D P 分子が、生来の全長の可溶性 A D P である、請求項 23 記載の方法。

【請求項 25】

別の A D P 分子が、細胞に対して異種性である、請求項 20 ~ 請求項 22 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 26】

別の A D P 分子をコードする核酸を、細胞またはその祖先内に導入し、別の A D P 分子が細胞において発現される工程を含む、請求項 25 記載の方法。

【請求項 27】

融合タンパク質が、構成プロモーターの転写制御下で発現され、そして別の A D P 分子が、適当な誘導物質の存在下、誘導プロモーターの転写制御下で発現される、請求項 26 記載の方法。

【請求項 28】

別の A D P 分子が、(i) A D P のフラグメント (i i) A D P の突然変異体である A D P の誘導体である、請求項 25 ~ 請求項 27 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 29】

別の A D P 分子が、病態に伴うことが解っているか、または推測されるものに対応する A D P に突然変異を組み込む、請求項 25 ~ 請求項 27 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 30】

別の A D P 分子が、全長の可溶性 A D P である、請求項 25 ~ 請求項 27 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 31】

以下の種類：(i) 非凝集融合タンパク質および / または別の A D P 分子；(i i) 融合タンパク質および / または別の A D P 分子の凝集物；(i i i) その凝集の結果である融

合タンパク質および/または別のADP分子のタンパク質分解性フラグメント;のいずれか一つ以上の濃度またはレベルをモニタリングすることにより凝集をモニターする、請求項19~請求項30のいずれか一項記載の方法。

【請求項32】

別のADP分子のタンパク質分解性プロセシングの程度をモニターする、請求項31記載の方法。

【請求項33】

ADPが、タウであり、そしてタウのおよそ25kDのフラグメントのレベルの増加に基づいて凝集をモニターする、請求項31または請求項32記載の方法。

【請求項34】

ADPが、タウであり、そしてタウのおよそ18kDのフラグメントのレベルの増加に基づいて凝集をモニターする、請求項31または請求項32記載の方法。

【請求項35】

モニタリングの工程が、(i)融合タンパク質;(ii)別のADP分子;(iii)その凝集の結果である融合タンパク質および/または別のADP分子のタンパク質分解性フラグメントのいずれかに特異的な抗体の使用を含む、請求項31~請求項34のいずれか一項記載の方法。

【請求項36】

融合タンパク質が、別のADP分子と免疫学的に区別される、請求項31~請求項34のいずれか一項記載の方法。

【請求項37】

ADPが、タウであり、そして(i)タウのGly-16およびGln-26の間の領域に位置するヒト特異的エピトープに特異的であるか、(ii)Glu-391でランゲートされたコアタウフラグメントに特異的であるか、(iii)反復ドメインにおける一般的なタウエピトープに特異的であるか、または(iv)Ser-208およびSer-238の間に位置する種類特異的でない一般的なタウエピトープに特異的であるモノクローナル抗体から抗体が選択される、請求項36記載の方法。

【請求項38】

(a)凝集を変調できることが予測される作用物質の存在下で、請求項19~請求項37のいずれか一項記載の方法を実施すること;
(b)凝集の程度をモニタリングすること;および場合によっては、
(c)凝集の程度を作用物質の変調活性と相関させること;
を含む、立体配座の重合相互作用の誘導によって凝集性疾患タンパク質(ADP)が病的に凝集する病態に伴う凝集性疾患タンパク質(ADP)の凝集モジュレーターを同定する方法。

【請求項39】

作用物質の存在下で得られた結果を作用物質の不在下で得られた結果と比較する工程を更に含む、請求項38記載の方法。

【請求項40】

ADPが病的に凝集する病態において治療、予後または診断用物質として使用するためのモジュレーターをスクリーニングするための、請求項38または請求項39記載の方法。

【請求項41】

細胞内で実施される、請求項38~請求項40のいずれか一項記載の方法。

【請求項42】

作用物質が細胞内に入るのに十分な時間、細胞を作用物質と共にインキュベートする、請求項41記載の方法。

【請求項43】

細胞が、ニューロン細胞系または繊維芽細胞系に由来する、請求項41または請求項42記載の方法。

【請求項44】

10

20

30

40

50

A D P の非病的機能に影響する作用物質の能力を評価する工程を更に含む、請求項 4 1 ~ 請求項 4 3 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 4 5】

細胞の生存性を評価する、請求項 4 4 記載の方法。

【請求項 4 6】

細胞が、トランスジェニック動物内に含まれる、請求項 4 1 記載の方法。

【請求項 4 7】

作用物質を動物に投与する、請求項 4 6 記載の方法。

【請求項 4 8】

(i) 立体配座の重合相互作用の誘導によって、凝集性疾患タンパク質 (A D P) が、病的に凝集する病態に伴う凝集性疾患タンパク質 (A D P) に由来する凝集部分と ; (i i) 異種性膜局在部分とを有する膜局在融合タンパク質をコードするキメラヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

10

【請求項 4 9】

膜局在タンパク質が、シグナル配列および、場合によっては膜アンカードメインまたは輸送停止配列をコードする配列を含む、請求項 4 8 記載の核酸。

【請求項 5 0】

キメラヌクレオチド配列が、外来性 3 非翻訳領域配列を含む、請求項 4 8 または請求項 4 9 記載の核酸。

【請求項 5 1】

凝集部分ヌクレオチド配列が、タウ、またはタウのコアフラグメントをコードする、請求項 4 8 ~ 請求項 5 0 のいずれか一項記載の核酸。

20

【請求項 5 2】

凝集部分ヌクレオチド配列が、全長タンパク質のアミノ酸 1 8 6 ~ 2 9 6 から 3 9 0 ~ 4 4 1 の間から伸びるタウのランケートされたフラグメントをコードする、請求項 5 1 記載の核酸。

【請求項 5 3】

凝集部分ヌクレオチド配列が、アミノ酸 2 9 6 ~ 3 9 0、1 9 0 ~ 4 4 1 または 1 9 0 ~ 3 9 0 をコードする、請求項 5 2 記載の核酸。

【請求項 5 4】

請求項 4 8 ~ 請求項 5 3 のいずれか一項記載のキメラヌクレオチド配列の相補体であるヌクレオチド配列を含む単離された核酸。

30

【請求項 5 5】

正プライマー : 5 - t c t g g t g a a c c g g t a a a a t a c g g g g - 3

逆プライマー : 5 - c c c c g t a t t t a c c g g a a c a c c a g a - 3

正プライマー : 5 - c t t g t a c t c g a g c t a c g c c c c g t g g - 3

逆プライマー : 5 - c g g g g c g t a g g a t a a g t a c a a g t c g - 3

正プライマー : 5 - g g c t c a c c g g t t a a t a t c a a a c - 3

逆プライマー : 5 - g t t t g a t a t t a a c c g g t g a g c c - 3

T h y 1 F 2 : g C A g g A g g T g C T C A g g g A C A g c

T a u t x R : C A C T g C C g C C T C C C g g g A C g T g

から選択される核酸プライマー。

40

【請求項 5 6】

凝集部分をコードする核酸を異種性膜局在部分をコードする核酸にライゲートする工程を含む、請求項 4 8 ~ 請求項 5 3 のいずれか一項記載の核酸を製造する方法。

【請求項 5 7】

異種性膜局在部分をコードする核酸が、凝集部分をコードする核酸が挿入される組換えベクターの一部である、請求項 5 6 記載の方法。

【請求項 5 8】

請求項 4 8 ~ 請求項 5 3 のいずれか一項記載の核酸を含む、組換えベクター。

50

【請求項 59】

核酸が、宿主細胞の転写に関するプロモーターに作動可能に連結されており、ここでプロモーターが場合によっては誘導プロモーターである、請求項 58 記載のベクター。

【請求項 60】

プロモーターが、組織特異的プロモーターである、請求項 59 記載のベクター。

【請求項 61】

プロモーターが、プリオン特異的プロモーターまたは神経特異的エノラーゼプロモーターである、請求項 59 記載のベクター。

【請求項 62】

請求項 58 ~ 請求項 61 のいずれか一項記載のベクターを宿主細胞内に導入する工程を含む方法。 10

【請求項 63】

請求項 58 ~ 請求項 61 のいずれか一項記載の異種性ベクターを含有するか、またはこれで形質転換された宿主細胞。

【請求項 64】

繊維芽細胞系のメンバーである、請求項 63 記載の宿主細胞。

【請求項 65】

動物の細胞において請求項 48 ~ 請求項 53 のいずれか一項記載の核酸の発現を引き起こすこと、または可能にすることを含む、凝集性疾患タンパク質 (ADP) が、病的に凝集する病態をヒト以外のトランスジェニック動物において変調する方法。 20

【請求項 66】

動物の受精卵に請求項 58 ~ 請求項 61 のいずれか一項記載のベクターを導入する工程を含む、凝集性疾患タンパク質 (ADP) が、病的に凝集する病態に関して増強された、または加速された病理を伴うヒト以外のトランスジェニック動物モデルを調製する方法。

【請求項 67】

動物が、哺乳動物であり、方法が、卵を偽妊娠の雌に移植すること、および得られた胚を期間まで成長させることの工程を更に含む、請求項 66 記載の方法。

【請求項 68】

請求項 66 または請求項 67 の方法で得られた創始動物を融合タンパク質に関してトランスジェニックでない動物と交配させることと、および融合タンパク質をコードする核酸を担持するものに関して子孫をスクリーニングすることとを含む、凝集性疾患タンパク質 (ADP) が病的に凝集する病態に関して増強された、または加速された病理を伴うヒト以外のトランスジェニック動物モデルの F₁ 世代を作製する方法。 30

【請求項 69】

請求項 68 の方法により得られた 2 匹の F₁ 動物を交配させることと、および融合タンパク質をコードする核酸に関してヘテロまたはホモ接合体であるものに関して子孫をスクリーニングすることとを含む、凝集性疾患タンパク質 (ADP) が病的に凝集する病態に関して増強された、または加速された病理を伴うヒト以外のトランスジェニック動物モデルの F₂ 世代を作製する方法。

【請求項 70】

(i) 立体配座の重合相互作用の誘導によって凝集性疾患タンパク質 (ADP) が、病的に凝集する病態に伴う凝集性疾患タンパク質 (ADP) に由来する凝集部分と (ii) 異種性膜局在部分とを含む膜局在可能な融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターをその複数の細胞の内部に含む、ヒト以外のトランスジェニック動物。 40

【請求項 71】

膜局在可能な融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む、請求項 70 の動物の細胞または組織サンプル。

【請求項 72】

動物が、げっ歯類である、請求項 65 ~ 請求項 71 のいずれか一項記載の方法、動物また 50

はサンプル。

【請求項 7 3】

げっ歯類が、マウスである、請求項 7 2 記載の方法、動物またはサンプル。

【請求項 7 4】

請求項 4 8 ~ 請求項 5 3 のいずれか一項記載のキメラヌクレオチド配列によりコードされる単離された融合タンパク質。

【請求項 7 5】

適当な宿主細胞において、請求項 4 8 ~ 請求項 5 3 のいずれか一項の核酸からの発現を引き起こすか、または可能にする工程を含む、請求項 7 4 のタンパク質を作製する方法。

【請求項 7 6】

膜局在可能な融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列の発現を引き起こすか、または可能にすることを含む、凝集性疾患タンパク質 (ADP) が病的に凝集する病態を請求項 7 0 のヒト以外のトランスジェニック動物に誘導する方法。

【請求項 7 7】

凝集を変調できると推測される作用物質の存在下で請求項 7 6 記載の方法を実施することを含む、凝集性疾患タンパク質 (ADP) が、病的に凝集する病態において治療、予後または診断用物質として使用するための作用物質をスクリーニングする方法。

【請求項 7 8】

作用物質が、血液脳関門を通過することができる、請求項 4 7 または請求項 7 7 記載の方法。

【請求項 7 9】

作用物質をトランスジェニック動物ではない対照動物に投与する、請求項 4 7、請求項 7 7 または請求項 7 8 記載の方法。

【請求項 8 0】

動物の脳における ADP のタンパク質分解性プロセッシングの程度を測定する、請求項 4 7、または請求項 7 7 ~ 請求項 7 9 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8 1】

作用物質が動物の脳内で形成される ADP 凝集の量を低下させる能力を測定する、請求項 4 7、または請求項 7 7 ~ 請求項 8 0 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8 2】

作用物質が動物の脳内で既に形成されている ADP 凝集のレベルを排除または低減させる能力を測定する、請求項 4 7、または請求項 7 7 ~ 請求項 8 0 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8 3】

動物の脳内の ADP 凝集を組織学のおよび / または電子顕微鏡により可視化する、請求項 8 1 または請求項 8 2 記載の方法。

【請求項 8 4】

(i) 請求項 3 8 ~ 請求項 4 7 または請求項 7 7 ~ 請求項 8 3 のいずれか一項記載の方法を実施して作用物質を同定すること ;

(i i) 単離された形態の作用物質を提供すること ;

(i i i) 場合によっては病態の処置において使用するための組成物として作用物質を処方すること ;

を含む、ADP が病的に凝集する病態において治療、予後または診断用物質として使用するための作用物質を生成する方法。

【請求項 8 5】

(i) 請求項 6 4 記載の方法により作用物質を製造することと ;

(i i) 治療上有効量の該作用物質を同一物を必要とする患者に投与することと ;

を含む、ADP が、病的に凝集する病態を処置または予防する方法。

【請求項 8 6】

ADP がタウであり、そして病態が、アルツハイマー病に相当する、請求項 1 9 ~ 請求項

10

20

30

40

50

32、請求項38～請求項47、請求項76～請求項85のいずれか一項記載の方法または動物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、神経変性疾患に関連するタンパク質の凝集に関連するモデル、材料および方法に関する。

【0002】

痴呆、例えばアルツハイマー病（AD）の状態は、しばしば、罹患者の脳におけるタンパク質様構造、例えば - アミロイドプラークおよび神経原繊維濃縮体の細胞内および/または細胞外沈着の進行性蓄積を特徴とする。これらの病変の様相は、主に病的神経原繊維変性および脳萎縮症、ならびに認識障害と関連がある（Mukaetova-Ladinska, E. B. ら、Am. J. Pathol. 157(2): 623～636(2000)）。

10

【0003】

神経炎プラークおよび神経原繊維濃縮体の双方は、ペアードヘリカルフィラメント（PHF）を含有し、その主要な構成要素は、微小管関連タンパク質タウである（Wischikら、PNAS USA85; 4506(1988)）。プラークは、またアミロイド前駆体タンパク質のプロセッシング異常から誘導される細胞外 - アミロイド原繊維をも含有する（APP; Kangら、Nature 324: 733(1987)）。Wischikらの論文（「Neurobiology of Alzheimer's Disease」第2版（2000年）、Dawbarn, D. およびAllen, S. J. 編、分子および細胞神経生物学シリーズ、バイオス・サイエンティフィック・パブリッシャーズ、オックスフォード）では、神経変性痴呆の病因におけるタウタンパク質の推定される役割が詳細に論じられている。

20

【0004】

アルツハイマー病の研究によりタウの正常の形態の喪失（Mukaetova-Ladinskaら、Am. J. Pathol. 143: 565(1993); Wischikら、Neurobiol. Ageing, 16: 409(1995a)); Laiら、Neurobiol. Ageing, 16: 433(1995b)）、病的なPHFの蓄積（Mukaetova-Ladinskaら、前出（1993); Harringtonら、Dementia 5: 215(1994a); Harringtonら、Am. J. Pathol. 145: 1472(1994b); Wischikら、前出（1995a)）および中前頭皮質のシナプス喪失（Terryら、Ann. Neurol. 30: 572(1991)）が随伴認識障害と相関することが示されている。更に、シナプスの喪失（Terryら、前出）および錐体細胞の喪失（Bondareffら、Arch. Gen. Psychiatry 50: 350(1993)）の双方は、タウ反応性神経原繊維病理の形態測定と相関し、これは、分子レベルではアルツハイマー病におけるタウタンパク質プールの可溶性形態から重合形態（PHF）にほとんどすべてが再配分されることと平行している（Mukaetova-Ladinskaら、前出（1993); Laiら、前出（1995)）。

30

【0005】

タウは、選択的にスプライシングされたアイソフォームで存在し、これは、微小管結合ドメインに対応する反復配列の三つまたは四つのコピーを含有する（Gordert, M. ら、EMBO J. 8: 393～399(1989); Goedert, Mら、Neuron 3: 519～526(1989)）。PHF中のタウは、タンパク質分解性プロセッシングをされてコアドメインになり（Wischik, C. M. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 4884～4888(1988); Wischik, ら、PNAS USA 85: 4506～4510(1988); Novac, M. ら、EMBO J. 12: 365～370(1993)）、これは、反復ドメインの位相変化したもから構成され；三つの反復のみが安定したタウ-タウ相互作用に参与する（Jakes, R. ら、EMBO J. 10: 2725～2729(1991)）。PHF様タウ凝集物は、一度形成されると、さらなる捕捉の種として作用し、全長タウタンパク質のタンパク質分解性プロセッシングの鋳型を提供する。（Wischikら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 11213～11218(1996)）。

40

【0006】

ペアードヘリカルフィラメント（PHF）は、その形成および蓄積中に最初に細胞質内で集合し、おそらく、PHF集合の前または集合中にトランケートされるようになる初期の

50

タウオリゴマーから無定形凝集物を形成する (Mena, R. ら、Acta Neuropathol. 89: 50 ~ 56(1995); (Mena, R. ら、Acta Neuropathol. 91: 633 ~ 641(1996))。次いでこれらのフィラメントは、古典的な細胞内神経原繊維濃縮体を形成し続ける。この状態では、PHFは、トランケートされたタウのコア、および全長タウを含有する微毛性外被から成る。(Wischik, C. M. ら、Microtubule-associated proteins: modifications in disease、Avila, J., Brandt, R. およびKosik, K. S. 編 (ハーウッド・アカデミック・パブリッシャーズ、アムステルダム) 185 ~ 241頁)。集合プロセスは指数関数的であり、正常な機能のタウの細胞性プールを消費し、そして欠損を補うために新規タウの合成を誘導する。(Lai, R. Y. K. ら、Neurobiology of Ageing 16(3): 433 ~ 445(1995))。最終的には、ニューロンの機能的障害は、細胞外濃縮体を残して、細胞死の程度まで進行する。細胞死は、細胞外濃縮体の数と高度に相関する (Wischikら、前出 (2000))。濃縮体は、細胞外空間まで押し出されるので、PHFコアに関連するタウ免疫反応性の保存ではなくN-末端タウ免疫反応性の対応する損失を伴うニューロンの微毛性外被の進行性の損失であるが、(図4a; Bondareff, W. ら、J. Neuropath. Exper. Neurol. 53(2): 158 ~ 164(1994))。

10

【0007】

PHF内に組み込まれたタウの反復ドメインにおける位相変化は、反復ドメインがフィラメントへの組み込みの間に誘導される立体配座変化を被ることを示唆している。アルツハイマー病の発症の間に、この立体配座変化が病的基質、例えば損傷を受けるかまたは変異した膜タンパク質へのタウの結合により開始され得ることが認識されている。(図19a - またWischik, C. M. ら、Microtubule-associated proteins: modifications in disease、Avila, J., Brandt, R. およびKosik, K. S. 編 (ハーウッド・アカデミック・パブリッシャーズ、アムステルダム) 185 ~ 241頁) をも参照)。

20

【0008】

アルツハイマー病の場合、現在の薬学的治療法は、神経変性の結果であるコリン作動性伝達の喪失の症状の処置に焦点が置かれている (Mayeux, R. ら、New Eng. J. Med. 341: 1670 ~ 1679(1999))。しかしながら、利用可能な処置は、疾患の進行を6から8カ月遅らせるが、それを防御することはない。神経変性に至るタウの凝集を防御する薬物の発見により、凝集を開始する多様な上流の事象の即座な知識を必要としない、予防または疾患の進行の阻害のための更に効果的な計画が提供されるであろう (図19a)。

30

【0009】

タンパク質凝集アッセイ

前記した推定モデルに基づいて、WO96/30766は、固相基質に吸着されているコア反復ドメインに対応するタウフラグメントが可溶性全長タウを捕捉し、高親和性でタウと結合できる、タウ凝集に関するインビトロアッセイについて記載している。この結合は、凝集したタウ分子のタンパク質分解性消化に対する安定性を付与する。プロセスは、自己伝播性であり、典型的な医薬品により選択的に遮断され得る (Wischik, C. M. ら、前出 (1996))。

【0010】

WO96/30766に記載されたインビトロアッセイによりタウ-タウ結合のインヒビターまたはモジュレーターの同定が可能になるが、本発明はアルツハイマー病様タンパク質凝集の細胞基盤のモデルが有用であるとも認識している。かかる細胞性モデルを、タウ-タウ凝集のモジュレーター候補物質の1次スクリーニング、およびWO96/30766のインビトロアッセイにおいて既に同定された化合物の2次スクリーニングの双方において用いることができる。更に、細胞におけるタウ凝集の実証により、病的なタウ凝集の開始に関与する正常な細胞基質の同定も助けられ、その基質はそれ自体医薬的介入の標的になり得る。

40

【0011】

しかしながら、多くの文献により、組織培養モデルにおける種々のタウ構築物の発現は、凝集の実証に失敗したと報告されている (例えばBaum, L. ら、Mol. Brain Res. 34: 1 ~

50

17(1995))。

これらの問題は、これまでのところインビトロにおける可溶性タウの凝集は、非生理学的条件下および高濃度で達成されたもののみであると考えられると理解できる (Wischik、前出 (2000) に総説される)。

W O 9 6 / 3 0 7 6 6 は、また細胞環境におけるタウ凝集を研究するための二つの研究方法をも記載している。第1の研究法では、全長タウまたはタウのフラグメントが細胞において安定して発現された。第2の研究法では、リポフェクチンの使用により凝集したタウが一過的に細胞にトランスフェクションされた。

【 0 0 1 2 】

これらの研究法は、共にタウ - タウ凝集の研究に関して有用であるが、これらにはいくつかの限界がある。リポフェクションを用いる、凝集したタウの細胞へのトランスフェクションは、凝集したタウそのものの生成と同様に効率が変化しやすい。更に、タウ凝集のための最も有効な種であるコアタウフラグメントは、細胞において安定して発現される場合、毒性であり低発現レベルとなることを見出されている。このように、真核細胞における P H F コアのトランケートされたタウフラグメントの構成的発現を達成するのは困難である。一過性発現系によりタウ発現の最適化が可能になるが、フラグメントの固有の毒性によりこれらの系さえも信頼性のないものになっている。タウのより長いフラグメントは、毒性が低い、これらは、細胞において発現される場合に凝集が不確実である。

10

【 0 0 1 3 】

したがって、例えばタウ分子等との相互作用が安定した、そして制御可能な細胞系において生理学的条件下で調査され得る、そしてアルツハイマー病のごとき症状の可能性のある診断、予後または治療用物質に関するスクリーニングに用いることができる代替のモデル系が開発されるのが望ましい。

20

【 0 0 1 4 】

動物モデル

インビトロおよび細胞基盤のアッセイは、有用な手段であり得るが、アルツハイマー病および関連する症状の動物モデルにより脳における生化学的および病的変化ならびに記憶および行動の障害間の関係の理解に役立つ。更に、これにより疾患過程の病因がインビボで試験できるようになり、治療計画を試験できるモデルを提供することが可能になる。

【 0 0 1 5 】

具体的には、薬物動態という面では、例えば治療の可能性をタンパク質凝集に対する特定の生化学的活性に関してのみならず、毒性、作用部位での、例えば血液脳関門を通る分配および半減期についても評価できない細胞基盤の系に動物モデルを置く。

30

【 0 0 1 6 】

これにもかかわらず、既存のモデルは、A D に特徴的な濃縮体、プラークおよび認識障害の組み合わせを表すことができない。高齢のイヌおよびヒト以外の霊長類は アミロイドーシスを進行させるが、タウ病理は、これらの動物の特徴ではない (Walker、(1997))。同様に、アミロイドーシスをモデル化したトランスジェニックマウスが作られたが、これは、タウの異常沈着を示さない (Janus、Chishti および Westaway、(2000))。逆にタウ病理の動物モデルは、アミロイド病理を実証できない。アルミニウムで処置されたげっ歯類の脳に蓄積される濃縮体は、A D において見出されるものとはその超微細構造が異なる (前記を参照)。リン酸化異常のタウに関連する繊維状細胞骨格変化が、高齢のヒヒ、クマ、ヒツジおよびヤギにおいて観察されている (Braak、Braak および Strothjohann、(1994) ; Cork ら、(1988) ; Nelson、Greenberg および Saper、(1994) ; Nelson および Saper、(1995) ; Roertgen ら、(1996) ; Schultz ら、(2000))。

40

【 0 0 1 7 】

いくつかの実験により動物モデルにおけるタウおよびアミロイド間の連鎖が関係していると思なされた。タンパク質ホスファターゼ 2 A のインヒビターであるオカダ酸の長時間の心室内注入の後、高リン酸化タウが、ラット脳のニューロンの細胞体樹状突起区分に蓄積する (Arendt、Holzer、Fruth、Brijckner および Gartner、(1995))。更に、オカダ酸処

50

置によりまた A β の細胞外沈着の形成および記憶障害をも導かれる。二つの別の実験により動物モデルにおけるタウの蓄積に A β が関係しているが見なされた。高齢のアカゲザルの皮質における繊維性 A β のマイクロインジェクションにより細胞内リン酸化タウの限局性の蓄積を引き起こされた (Geulaら、(1998))。これは、年齢および種に依存し; ラットまたは幼若アカゲザルでは、同一の結果が観察されなかった。第 2 に、AD 随伴変異を担持する APP に関してトランスジェニックであるマウスにおいて、タウの限局性沈着が観察された (Sturchler-Pierratら、(1997))。

【0018】

タウ欠損マウスの脳は、免疫組織化学的に正常であり、培養されたニューロンでは、軸索の伸長は、影響を受けなかった (Haradaら、(1994))。しかしながら、微小管の安定性は低下し、その構成は、いくつかの小径軸索で変化した。更に、大径軸索におけるタウの機能的喪失を補償する微小管関連タンパク質 1A (マップ 1A) の増加が認められた。このように、タウは、特定の軸索の軸索微小管の安定性および構成において非常に重要であると思われる。それに続く研究によりタウ欠損マウスが、前頭側頭骨痴呆患者に特徴的な特定の症状に類似の徴候、すなわち人格変化 (脱抑制 / 攻撃性) ならびに記憶および実行機能を呈することが実証された。マウスは、筋衰弱および平衡制御の障害、新しい環境での活動過剰、および状況恐怖条件付けにおける障害 (Ikegami、Harada および Hirokawa、(2000)) を示した。しかしながら、マウスでは、空間学習作業は、FTDP-17 患者における記憶機能と同様に影響を受けなかった。

10

【0019】

神経原繊維濃縮体および表現型の変化は、3 - または 4 - 反復タウアイソフォームに関するトランスジェニック動物では報告されなかった (Brion、Treppe および Octave、(1999); Gotzら、(1995)) が、これらの知見は、低レベルのタンパク質発現に反映し得る。ヒトタウタンパク質を高レベル発現するマウスにおいて、タウパチーの存在下、または不在下で、運動機能障害が観察された (Ishiharaら、(1999); Spittaelsら、(1999))。これらの動物では、繊維状封入体が、AD P β H β F の超微細構造の特徴を呈しなかった。

20

【0020】

P301L 変異を有するヒトタウを発現する最近のトランスジェニックマウスモデルは、神経原繊維濃縮体、ニューロン喪失、運動機能不全を進行させる (Lewisら、(2000))。これらのマウスにおけるタウ封入体は、ヒト患者において見出されるものに類似する直線状のリボンフィラメントおよび捻れたリボンフィラメントの双方を示した。このモデルをアミロイドーシスと組み合わせる試みは、これらのマウスを APP に関してトランスジェニックであるマウスと交配させることにより進められる。その他のトランスジェニックマウスモデルは、米国特許第 5,912,410 号および第 5,898,094 号において論じられている。

30

【0021】

したがって、既存の動物モデルにより、導入遺伝子が、P β H β F ドメインを含むトランケートされたタウタンパク質の蓄積を導くといういずれかの病的証拠を実証できないことが示されている。P301L 変異を担持するタウにおいてフィラメントが観察されるが、これは FTDP-17 を引き起こし、AD を引き起こさないタウの形態に対応する。今日では、AD を引き起こすタウ遺伝子の変異は同定されておらず、そして、したがって純粋に変異されたタンパク質に基づく研究法は、効果に関して妥当性が限定され得る。

40

【0022】

より詳しくは、実際の AD P β H β F コアで見出されるものに対応するトランケートされたコアフラグメントへのタンパク質分解性プロセッシングにより明白であるように、これらの動物モデルにおいて変異されていないタウ凝集についての明白な開示はない。薬物動態という面で、かかるタンパク質分解性プロセッシングを生じる系は、このように技術分野に貢献するであろう。

【0023】

前記したように、化学的修飾よりもむしろタウの立体配座変化がタウ分子の凝集の進行お

50

よびそれに続く重合化に寄与し、PHFを形成する。

驚くべきことに、本発明者らはここで、目的のタンパク質、例えばタウ、またはコア凝集ドメインを含有するそのフラグメントの膜局在形態の合成を引き起こすことによりモデル系におけるこの立体配座の変化を再現することが可能であることを見出した。

例えばタウまたはタウフラグメントと細胞のまたはオルガネラの膜、例えば細胞の原形質膜または小胞体の膜との結合が、タウまたはタウフラグメントのさらなる分子の凝集を供給することもでき、したがって、幾分WO 96 / 30766の固相アッセイ系で観察されるものに類似の様式で、タウ-タウ凝集物の形成を広めることが、意外にも見いだされた。この技術は、タンパク質凝集型疾患に関係するタンパク質に広く適用できると思われる。

10

【0024】

いかなる特定のメカニズムにも限定したくはないが、その適当な基質への結合時に生じるタウの立体配座変化を物理学的に誘導することにより、タンパク質の膜局在化合成は、このタンパク質の高親和性捕捉部位を暴露させることが本発明者らにより示されている。この立体配座変化の効果により、タンパク質のさらなる凝集が促進されるその種まき立体配座で、十分に高い局所濃度のタウを作ることができる。これらの観察をタンパク質凝集が役割を果たすすべての疾患に関係付けることができる。

【0025】

種々の態様において、本発明は、適当なタンパク質またはそのコアフラグメントの疾患様細胞内凝集をモデル化する方法であって、かかる凝集を開始できるタンパク質の膜局在形態を合成する工程により特徴づけられている方法を提供する。かかる方法を用いて、例えば凝集のモジュレーターを同定することができる。

20

概して膜標的化タンパク質は実際に凝集を行うものであるが、しかしながら第2のタンパク質型の凝集を引き起こすものである場合もあり、いずれでもよい。

【0026】

したがって、本発明の態様では、(i)タンパク質が凝集するか、または立体配座重合相互作用の誘導を介してタンパク質凝集を開始する疾患に伴うタンパク質から誘導される凝集部分と、(ii)異種性膜局在部分とを含む融合ポリペプチドが提供される。

【0027】

このように、タンパク質、例えばタウもしくはタウのコアフラグメント、または以下で論じるような対応するタンパク質を膜局在タンパク質の形態で合成でき、それは、それが誘導された実際のタンパク質の凝集をモデル化するのに適当なレベルで細胞内凝集および融合のタンパク質分解過程の種として作用できる。これはまた別の分子(例えば全長タウ分子)との、または別の分子間での凝集の種をまくこともでき、したがってタンパク質凝集物の形成を伝播させることができる。

30

【0028】

かかる膜随伴タンパク質凝集物を発現する細胞を、例えばアルツハイマー様疾患の細胞にてインピボで観察されるような、疾患関連タンパク質凝集のモデルとして用いることができる。このモデル系をさらなる研究、例えば以下に詳細に記載するような、可能性のある治療、予後または診断用物質のスクリーニングアッセイに用いることができる。

40

【0029】

したがって、本発明の一つの態様は、タンパク質で立体配座相互作用が誘導される疾患に伴うタンパク質の凝集を誘導、モデル化または制御する方法であって、(a)(i)タンパク質で立体配座重合相互作用が誘導される疾患に伴う第1のタンパク質から誘導される凝集部分と、(ii)異種性膜局在部分とを含む融合ポリペプチドを膜に導入すること；(b)融合ポリペプチドおよび別のポリペプチド間の立体配座重合相互作用の誘導を引き起こすまたは可能にする、例えば該別のポリペプチドの凝集を引き起こす工程をと含む方法が開示される。場合によっては凝集の程度をモニター観察してもよい。

【0030】

このおよび別の態様では、別のポリペプチドは、例えば別の融合タンパク質でよいが、ま

50

たは例えば上記の第1タンパク質との立体配座重合相互作用が誘導される第2のタンパク質を生じる、融合ポリペプチドのタンパク質分解性分解の結果物でよい、または全く異なるポリペプチドでよい。

【0031】

したがって、本発明の別の好ましい態様では、タンパク質で立体配座相互作用が誘導される疾患に伴う(第2の)タンパク質の凝集を誘導、モデル化または制御する方法が開示され、方法は：

(a)(i)タンパク質で立体配座重合相互作用が誘導されるかまたは開始される疾患に伴う第1のタンパク質に由来する凝集部分と、(ii)異種性膜局在部分とを含む融合ポリペプチドを膜に導入することと；

(b)融合タンパク質を、上記第1のタンパク質との立体配座重合相互作用が誘導される第2のタンパク質と接触させ、それにより第2のタンパク質と膜局在融合タンパク質との相互作用が第2のタンパク質の凝集を引き起こすことと；

の工程を含む。場合によっては凝集の程度をモニター観察してもよい。

【0032】

好ましい第1および第2のタンパク質の実例を以下に開示し、これは疾患に伴う同一のまたは異なるタンパク質から誘導されてよい。とりわけ、第1のタンパク質は(立体配座変化の誘導の結果として)同一または異なる別のタンパク質の凝集を開始するおよび/またはそれに関与するものであり、第2のタンパク質は相当する疾患において実際に凝集するものである。

【0033】

好ましい態様では、タンパク質で立体配座相互作用が誘導される疾患に伴うタンパク質の細胞内凝集を誘導する細胞基盤の方法であって、例えば(a)(i)タンパク質で立体配座重合相互作用が誘導されるか、または開始される疾患に伴う第1のタンパク質から誘導される凝集部分と、(ii)異種性膜局在部分とを含む融合ポリペプチドを細胞の膜で局在化するように細胞に導入することと、(b)上記第1のタンパク質との立体配座重合相互作用が誘導される第2のタンパク質を細胞に導入することであって、それにより第2のタンパク質と局在融合タンパク質との相互作用が細胞内凝集、場合によってはいずれかのタンパク質分解過程を引き起こすことと；の工程を含む方法が開示される。

【0034】

再度、場合によっては凝集の程度および/または第2のタンパク質のタンパク質分解過程をモニター観察してもよい。これは凝集を調節(例えば阻害または逆行)できると思われる一つまたはそれ以上の作用物質の存在下でよい。

一般に、融合タンパク質および/または第2のタンパク質をコードする核酸を使用することにより方法は実施される。

いくつかの好ましい態様および本発明の具体例をここで更に詳細に記載する。

【0035】

疾患およびタンパク質

前記したように、本発明は、立体配座重合相互作用が誘導される疾患に伴ういずれかのタンパク質、すなわちタンパク質の立体配座変化が自己伝播の様式で別のタンパク質分子の結合および凝集の種をまくことができるものを用いることができる。一度核形成が開始されると、立体配座変化が、凝集物に、別のタンパク質分解に対するさらなる抵抗性を与え得る、別のタンパク質分子の立体配座重合の誘導に関与する凝集カスケードが続いて起こる。このように形成されたタンパク質凝集物は、神経変性、臨床痴呆およびこの群の疾患のその他の病的症状の最も近い原因であると考えられる。純粹に簡略化のために、この群の症状を本明細書では「アルツハイマー病様」状態と称する。

【0036】

本発明の好ましい具体例では、本発明はタウタンパク質に基づく。本明細書で用いる「タウタンパク質」なる用語は、一般にタウタンパク質ファミリーのいずれかのタンパク質を意味する。タウタンパク質は、集合および分解の反復サイクル中に微小管と同時精製され

10

20

30

40

50

多くのタンパク質ファミリーのなかの一つとして特徴付けられ (Shelanskiら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 765~768(1973))、微小管関連タンパク質 (MAP) として公知である。タウファミリーのメンバーは、特徴的なN-末端セグメント、脳において発達中に制御されるN-末端セグメントに挿入されたおよそ50個のアミノ酸の配列、31から32個のアミノ酸の3または4タンデム反復から成る特徴的なタンデム反復領域、およびC-末端テールを共有する。このように用語をアルツハイマー病の脳においてPHF (および最終的には神経原繊維濃縮体) を形成するタウ分子により例示するが、これに限定するものではない。実際に、PHFは細胞体樹状突起区分に蓄積し、ここで主要な微小管関連タンパク質はMAP2である (Matus, A., Microtubules (HyamsおよびLloyd編) 155~166頁、ジョン・ウィレイ・アンド・サンズ、ニューヨーク)。MAP2アイソフォームはタンデム反復領域ではタウタンパク質とほとんど同一であるが、N-末端ドメインの配列および範囲で双方は実質的に異なる (図7および8; KindlerおよびGarner, Mol. Brain Res. 26: 218~224(1994))。それにもかかわらず、タンデム反復領域における凝集は、特異的なタウコアアミノ酸配列に選択的ではない。したがって本明細書におけるタウ-タウ凝集に関連するいずれかの論考は、タウ-MAP2凝集およびMAP2-MAP2凝集にも関連すると考えるべきである。

10

【0037】

図20は、本発明で用いることができる種々のその他の疾患随伴凝集タンパク質を列挙する表を示す。各々の場合で、(複数の)タンパク質の凝集および/または変異の開始が役割を果たし得る疾患または複数の疾患もまた列挙される。疾患の活性の原因となるドメインまたは変異が列挙され、そして好ましくは、少なくともタンパク質のこの最小部分のすべてまたは部分が、本発明において膜標的化「捕捉」または「種まき」タンパク質として用いられるタンパク質に含まれる。

20

【0038】

表から見られるように、病的タンパク質凝集により特徴づけられる疾患の実例には、運動ニューロン疾患およびレビ小体疾患が含まれる。更に、ニューロン変性障害例えばピック病および進行性核上性麻痺の病因は、各々新皮質の歯状回および星状錐体細胞における病的にトランケートされたタウ凝集物の蓄積に相関するようである (Wischikら、前出 (2000))。

【0039】

特定の好ましい具体例では、発明は本明細書で論じられる型の疾患の最初の段階に関係し得るタンパク質を用いる。例えばWischik, C. M. ら、前出 (1997) では、ADにおけるタウ捕捉の開始に関係し得る前記種々の膜タンパク質およびアミロイドタンパク質前駆体について論じられている。これにはプレセニリンおよびミトコンドリアタンパク質、例えばbc₁酵素複合体のコアタンパク質2 (CP2)、ATPシンターゼサブユニット9 (ATP S-9) およびポリンなどがある。このように本発明の好ましい具体例は図21の表に示されるこれらの分子のこれらの領域を含む膜標的化タンパク質を利用できる。

30

【0040】

したがって、タウタンパク質またはタウ様タンパク質 (例えばMAP2) に関して本発明の具体例が記載される前記の論考を鑑みて (そしてそれ以外を要求する局面は除く)、記載は、前記で論じた別のタンパク質 (例えばアミロイド、シヌクレイン、プリオン、適当なミトコンドリアタンパク質等) または凝集の伝播に必須であるドメインにおける立体配座変化により類似の病的凝集が開始または行われ得る、またはこの形成された凝集物にタンパク質分解安定性を与えるその他のタンパク質に同等に適用されると考えるべきであると理解されよう (Wischikら、による文献 (「Neurobiology of Alzheimer's Disease」第2版 (2000)、Dawbarn, D. およびAllen, S. J. 編、分子および細胞神経生物学シリーズ、バイオス・サイエンティフィック・パブリッシャーズ、オックスフォード))。すべてのかかるタンパク質を本明細書では「凝集性疾患タンパク質」と称し得る。

40

【0041】

本明細書で「タウ-タウ凝集」等の記載を行ったのと同様に、これはまた別の「凝集タン

50

パク質凝集」、例えば アミロイド凝集、プリオン凝集およびシヌクレイン等にも適用できると考えられる。「タウタンパク質分解性分解」等も同様である。

【0042】

前記で記載した方法で使用するためのタンパク質は、適当な場合（例えばタウ-タウ結合の研究において）技術分野の当業者に公知の方法により、例えば各々の参照文献において記載されるように、脳組織から単離することができる。可溶性タウをヒト脳組織または動物脳組織のいずれかから死後24時間以内の遅れで単離することができる（Wischikら、前出（1988）、（1995a））。微小管タンパク質は、Shelanskiら（前出（1973））にしたがって温度依存的な集合・分解の3サイクルにより得ることができる。WO96/30766に記載される方法に類似してタンパク質のリポフェクションを実施することができる。更に好ましくは、例えばタウタンパク質およびそのフラグメントの生成は、以下に記載されるような慣用される組換えDNA技術により達成される。

10

【0043】

フラグメント、誘導体および対照

発明が全長タンパク質を用いるという要件はなく、実際にこれは、特定の局面では望ましくない。同様に、用いるタンパク質は、N-またはC-末端伸長を含み得る。

後記の実施例に示すように、融合体の凝集部分の特性は、別の分子の不在下でさえも適当なレベルの凝集（および可能なタンパク質分解性プロセッシング）が達成されることである。

または、または加えて、凝集に関与する別の分子（例えば全長疾患タンパク質分子）を提供できる。

20

【0044】

本発明の好ましい具体例では、細胞基盤の方法かまたは本明細書で記載されるインビトロの方法のいずれかで合成されるような融合ポリペプチドは、トランケートされたフラグメントを含むかまたは本質的にトランケートされたフラグメントからなる。かかるフラグメントは一般に「コアフラグメント」であり、この用語は別のタンパク質（これは同一または異なっていてよい）に結合して凝集を開始または伝播させることができるタンパク質のその部分を意味する。凝集する疾患タンパク質の場合、かかるコアフラグメントは、また凝集物のタンパク質分解の安定性に寄与する可能性がある。

【0045】

したがって、例えば「タウコアフラグメント」はタンデム反復領域（「コアタンデム反復領域」）に由来するトランケートされたタウタンパク質配列を含むタウフラグメントであり、これは適当な条件下で、別のタウタンパク質またはMAP2タンパク質のタンデム反復領域に高い親和性で結合できる。

30

【0046】

融合ポリペプチドが、タウから誘導される場合、好ましくはトランケートされたフラグメントが全長タンパク質の約186~296から約390~441に伸びるフラグメントを含み、更に好ましくは以下の部分のいずれかを含む：186から390または391または441；296から390または391または441（図5および10参照）。本明細書にて後記する実施例では、タウフラグメントのシグナル配列へのライゲーシオンによりアミノ酸186~189が破壊され、それにより出発アミノ酸が190に相当した。

40

【0047】

APP（アミロイド前駆体タンパク質）の場合、例えば融合タンパク質として1~40または1~42アミノ酸のAドメインを含むAPPのフラグメントの発現が好ましい。その他のコアフラグメントは例えば図20および21に関して論じられたドメインに基づいてよい。

融合ポリペプチドの全長は、アッセイおよび用いられている凝集性疾患タンパク質コアフラグメントに適しているいずれの長さでもよいが、一般に30、40、50、60、70、80、90、100、200または500個のアミノ酸の長さ以上である。

【0048】

50

指定したタンパク質（例えばコアフラグメント）または列挙した核酸配列について論じる本明細書の全例において、対応する参照タンパク質（または核酸）の誘導体またはその他の変種が参照配列の適当な特性を保持する場合、必要に応じてそれを用いてよい。かかる誘導体は、また参照配列と配列同一性を共有する。

【0049】

原則的に、誘導体は、技術分野で公知の手段により残基またはN BもしくはC - 末端基の側鎖として生じる官能基から調製され得る化学的誘導体でよい。これらの誘導体にはカルボキシル基の脂肪族エステル、アンモニアまたは1級もしくは2級アミンとの反応によるカルボキシル基のアミド、アシル部分で形成されたアミノ酸残基の遊離アミノ基のN - アシル誘導体（例えばアルカノイルまたは炭素環式アロイル基）またはアシル部分とで形成された遊離ヒドロキシル基のO - アシル誘導体（例えばセリル - またはセロニル残基のO - アシル誘導体）などが含まれ得る。

10

【0050】

更に一般的には、誘導体は、参照配列のアミノ酸挿入、欠失または付加の方法によるものである。例えば、タウタンパク質またはタウコアフラグメント、誘導体は少なくともタウタンパク質のタンデム反復領域に類似する部分アミノ酸配列を含むが、天然のタウもしくはそのフラグメントの一つもしくはそれ以上のアミノ酸が置換されているか、もしくは削除されているか、または別のアミノ酸が挿入されている。

【0051】

結合活性を増強するかまたは除去するために、かかる変化を作ることができる（後者の場合は対照実験に有用である）。対照は、配列またはドメインの欠失を含有し、これらが有する凝集に及ぼす影響を調べることができる。

20

好ましい誘導体は、病態に伴うことが解っているか、または推測されるものに対応する変異を組み込むものでよい。これらは、タウ配列内にP 3 0 1 Sに対応する変化を含有できる（図5参照）。別の変異には、G 2 7 2 V、G 3 8 9 R、P 3 0 1 L、N 2 7 9 K、S 3 0 5 N、V 3 3 7 M、G 2 7 2 V、K 2 8 0、R 4 0 6 W（Wis ch i kら、前記（2000）をも参照）などがある。

【0052】

別の好ましい誘導体には、前記で論じたコアフラグメントのタンデム反復、またはこれらのフラグメント内の結合ドメインなどがある。

30

更に別の誘導体は、配列が混合されているかまたは組み合わせられている複数の関連する疾患タンパク質に基づくキメラ生成物に基づくことができる。例えばタウの制限酵素フラグメントは、M A P 2のフラグメントまたは関連性のない遺伝子のフラグメントとでさえライゲートして組換え誘導体を作製することができる。コアフラグメントを修飾するための代替の試験計画は、Hoら、Gene 77: 51~59(1989)に記載されるようなP C R、またはD N Aシャフリング（Cramerら、Nature 391(1998)）を用いる。

【0053】

膜局在配列

融合の異種性膜局在または標的部分は、いずれかの適当なタンパク質からのいずれかの適当なシグナル配列、例えばラットアルブミンから誘導されるシグナル配列でよい。または、これは元来の局在部分から誘導される修飾された配列でよい。しかしながら、各々の場合、これは「天然には」凝集部分と共に生じない配列である。タンパク質におけるシグナル配列の存在は、新生ポリペプチド/リボソーム複合体をE R膜に志向させ、そこで複合体は、膜に挿入され得る。次いでE Rの膜を通り、そしてE R内腔への移動は、タンパク質の疎水性に依存して生じ得る。

40

【0054】

シグナル配列は、タンパク質の膜局在形態の発現のために選択された宿主細胞に依存して、原核細胞シグナル配列、例えばアルカリ性ホスファターゼ、ペニシリンナーゼ、l p p、または熱安定性エンテロトキシンI Eリーダーでよい。酵母発現のためには、シグナル配列は、例えば酵母インベルターゼリーダー、アルファ因子リーダー（サッカロミセス（Sa

50

ccharomyces) およびクルイペロミセス (Kluyveromyces) - 因子リーダーを含み、後者は、米国特許第 5, 010, 182 号に記載されている) または酸ホスファターゼリーダー、C. アルビカンス (C. albicans) グルコアミラーゼリーダー (EP 362, 179)、または WO 90/13646 に記載されるシグナルでよい。哺乳動物細胞発現では、哺乳動物シグナル配列、例えばラットアルブミンに由来するものを用いることができ、またはウイルスリーダー配列を用いることができる。

【0055】

この膜局在部分は、また膜アンカー配列および/または輸送停止配列をも含むことができる。一般にこれはタンパク質に好ましく、そうでなければ固有の(疎水性)特性により、シグナルペプチドに融合された場合にタンパク質が分泌または細胞外に配置される。膜アンカードメインを組み込んで、タンパク質全体が ER の内腔に移され、最終的に分泌されるのを防御することができる。概して、タンパク質は、随伴するいずれかのタンパク質が細胞質で外来性のタンパク質と相互作用できるように、サイトゾル表面に指向されなければならない。

10

【0056】

その他の結合パートナー

本発明の一つの態様では、タンパク質、例えばタウまたはタウのコアフラグメントの膜局在発現を用いてそのタンパク質またはフラグメントの特異的結合パートナー、例えばタウまたはそのフラグメントの膜局在化形態に結合できるタウまたはタウのコアフラグメント以外のタンパク質をスクリーニングできる。

20

【0057】

したがって、本発明は、またタンパク質の膜局在化発現を引き起こすかまたは可能にすることと、そのタンパク質を一つまたはそれ以上の可能性のある結合パートナーと接触させることと、および可能性のある結合パートナーが膜局在タンパク質に結合しているかどうかを決定することを含む、目的のタンパク質(例えばタウ)の特異的結合パートナーをスクリーニングする方法にも関する。

【0058】

目的のタンパク質および可能性のある結合パートナー間の結合の検出を、前記で詳細に記載したいずれかの適当な方法を用いて実施できる。

方法にはこのように同定された特異的結合パートナーを回収するさらなる工程を含めることができる。

30

このように、本発明によりタンパク質、例えばタウの特異的結合パートナーの同定が可能になり、これはアルツハイマー病様凝集におけるかかるタンパク質の別の病的結合パートナーを表すことができる。

【0059】

核酸構築物の使用

一つの好ましい態様では、前記の(工程(a)の)(結合)融合ポリペプチドは、構成プロモーターの転写制御下で細胞内に発現させることにより細胞に導入されるが、一方(工程(b)の)第2の(「遊離」)タンパク質は、適当な誘導物質の存在下、誘導プロモーターの転写制御下で細胞内に発現させることにより導入される。または、逆に、(a)および(b)タンパク質を各々誘導的におよび構成的に発現させることができる。

40

【0060】

この系を用いて細胞における凝集のレベルまたは時期を制御することができる。

とりわけ好ましいのは、細胞基盤のタウ-タウ結合アッセイのための以下の立体配座である: コア PHF のトランケートされたタウユニットに相当するタウフラグメントは、タンデム反復領域内の高親和性タウ-タウ結合部位に暴露されるように、宿主細胞において、そして細胞を殺さないレベルで、すなわち安定した細胞系にて膜局在形態で構成的に発現される。好ましくはタウフラグメントは、コア反復ドメインフラグメントよりも長く(適当には全長タウの 186 ~ 390 または 186 ~ 441 のアミノ酸残基)、これは凝集および毒性の間でバランスをとることができる。

50

【0061】

本発明の核酸、または本発明で使用するための核酸は、実質的に純粋もしくは均質な形態で、または元来の種の別の核酸を含まずに、もしくは実質的に含まずに、その天然の環境から単離および/または精製された形態で提供され得る。本明細書で用いる場合、「単離された」なる用語はこれらの可能性をすべて含む。

融合ポリペプチドをコードする核酸は、それが天然で一緒に見出されない（隣接して作動しない）が、人工的にライゲートされているかそうでなければ組み合わされている核酸配列を含むという点で、少なくとも部分的に合成性である。

【0062】

本発明による核酸は、cDNA、RNA、ゲノムDNAおよび修飾された核酸または核酸アナログの形態であるか、またはそこから誘導され得る。DNA配列が、例えば図を参照して指定されている場合、局面がそれ以外を要求するのでなければ、そこでTがUに置換されているRNA等価物は含まれる。

【0063】

とりわけ、核酸は、本明細書で開示されるいずれかの配列を含む、その配列から成る、または本質的にその配列から成ってよい（これは遺伝子、ゲノムクローン、またその他の配列、cDNA、またはこれらのいずれかのORFもしくはエクソン等よい）。本明細書で発明の核酸（ヌクレオチド配列）について言及する場合、その核酸（またはヌクレオチド配列）の相補体もまた本発明に包含される。各々の場合、「相補体」は、参照と同一の長さであるが、参照と100%相補的であり、それにより各々のヌクレオチドでその相手と、すなわちGはCと、AはTまたはUと塩基対形成する。

【0064】

したがって、本発明は、また別の態様で、シグナル配列、および、必要な場合、膜アンカードメインまたは輸送停止配列をコードする配列に連結され、それによりコード化されたポリペプチドがER膜に挿入されるようになる、前記で論じた融合タンパク質、例えば凝集性疾患タンパク質をコードするヌクレオチド配列またはそのタンデム反復ドメイン（すなわち神経変性障害、例えばアルツハイマー病に関係するタンパク質またはそのフラグメント）を含む核酸分子にも関する。

【0065】

シグナル配列に連結された目的のタンパク質をコードする核酸分子は、場合によって外来性3'非翻訳領域配列、例えばラットグロビリンから誘導される配列を含んでもよい。3'非翻訳領域の特性は、細胞のERへのタンパク質の標的化の効率に影響するようであり、そして3'非翻訳領域の配列は、そのために選択され得る（Partridge, K. A. ら、Cytotechnology 30: 37~47(1999)）。

【0066】

前記したように、核酸は、問題の参照配列と相同性を共有する誘導体またはその他の変種をコードできる。好ましくは、問題の核酸および/またはアミノ酸配列は、変種が基づく配列の約50%、または60%、または70%、または80%、最も好ましくは少なくとも約90%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を共有する。類似性または相同性は、技術分野で標準使用であるAltschulら、J. Mol. Biol. 215: 403~410(1990)のTBFASTNプログラム、または、そしてこれが好ましいのであるが、デフォルト・パラメーターを用いる標準的なプログラムBest Fit（ウィスコンシン・パッケージ、バージョン8、1994年9月（ジェネティクス・コンピューター・グループ、575サイエンス・ドライブ、マジソン、ウィスコンシン、米国、ウィスコンシン53711）の一部である）により定義および決定できる。特定の配列相同性の核酸分子間のハイブリダイゼーションを達成するのに必要なストリンジェンシー条件を算出するための一般式は： $T_m = 81.5 + 16.6 \log [Na^+] + 0.41 (\% G + C) - 0.63 (\% \text{ホルムアミド}) - 600 / \text{二重鎖の} \# bp$ 。

【0067】

本明細書に含まれる情報および参照ならびに技術分野で公知の技術（例えばSambrook、Fr

10

20

30

40

50

itschおよびManiatis、Molecular Cloning、A Laboratory Manual(1989)、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス、ならびにAusubelら、Short Protocols in Molecular Biology(1992)、ジョン・ウェレイ・アンド・サンズ、参照)を用いて技術者は、本発明にしたがってシグナル配列に連結されたポリペプチドまたはペプチドをコードする核酸配列を容易に調製できる。これらの技術には、(i) 適当な核酸、例えばゲノム供給源からのサンプルを増幅するためのポリメラーゼ連鎖反応の使用、(ii) 化学的合成、または(iii) cDNA配列の調製などがある。このように調製された核酸を次いで適当なシグナルペプチドをコードする配列に連結できるか、またはかかるシグナルペプチドコード化配列を含むベクター構築物に挿入することができる。組換え脊椎動物細胞培養における膜局在タンパク質の合成に適用するのに適した別の方法はGethingら、Nature 293: 620~695(1981); Manteiら、Nature 281: 40~46(1979); EP 1 1 7 , 0 6 0 ; およびEP 1 1 7 , 0 5 8 に記載されている。

【0068】

例えば、タウコアフラグメントをコードするDNAを作製でき、これを、コード化DNAを取ることで、発現される部分のいずれかの側の適当な制限酵素認識部位を同定すること、およびDNAから上記部分を切断することによることなどの、技術分野の当業者に公知のいずれかの適当な方法に用いることができる。タンパク質(例えばタウ)コード化配列への修飾を、例えば位置指定変異誘発を用いて作製することができる。

【0069】

構築物

本発明の細胞基盤のアッセイの態様では、シグナル配列および、必要とする場合、アンカーまたは輸送停止配列に連結された規定のタンパク質をコードする核酸を含み、そして場合によっては外来性3'非翻訳領域の配列を含んでもよい発現構築物またはベクターの細胞中での発現を誘導または可能にすることにより、目的のタンパク質、例えばタウまたはタウのフラグメントの膜局在形態の構築を達成できる。

【0070】

概して、新生タンパク質分子が連結されるシグナル配列をコードする核酸は、ベクターそのものの成分でよいが、またはベクターに挿入された外来性タンパク質コード化DNAの一部でよい。

構築物は、かかる系に一般に含まれるような、そして以下に記載されるような、いずれかその他の制御配列または構造エレメントを含むことができる。シグナル配列と同様に、ベクター成分には、通常、非限定例としては一つまたはそれ以上の複製起点、一つまたはそれ以上のマーカー遺伝子、一つまたはそれ以上のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、および転写終止配列などがある。一つまたはそれ以上のこれらの成分を含有する適当なベクターの構築には、技術者に公知の標準的なライゲーション技術を用いる。

【0071】

ベクターが一つまたはそれ以上の選択された宿主細胞において複製されることを可能にする核酸配列は、種々の細菌、酵母およびウイルスに関して公知である。例えば、種々のウイルス起源(SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、VSVまたはBPV)は、哺乳動物細胞におけるクローニングベクターとして有用である。

とりわけ好ましいのは、本明細書に記載する核酸を含む発現ベクターである。ベクターは、例えば細胞により取り込まれ得るプラスミド、コスミド、ウイルス粒子、ファージ、またはいずれかその他の適当なベクターもしくは構築物の形態でよく、そしてこれを用いて凝集性疾患タンパク質、例えばタウまたはタウコアフラグメントの膜局在形態を発現させる。

【0072】

発現ベクターは、mRNA合成を志向するように、通常目的のタンパク質コード化核酸配列に作動可能に連結されるプロモーターを含有する。種々の可能性のある宿主細胞により認識されるプロモーターは、公知である。「作動可能に連結された」とは、同一の核酸分

子の一部として結合され、適当に配置され、そして転写がプロモーターから開始されるように配向されていることを意味する。プロモーターに作動可能に連結されたDNAは、プロモーターの「転写制御下」にある。哺乳動物宿主細胞におけるベクターからの転写は、ウイルス例えばポリオマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス（例えばアデノウイルス2）、ウシ乳頭腫ウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルスおよびシミアンウイルス40（SV40）のゲノムから、異種性哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーターまたは免疫グロブリンプロモーターから、および熱ショックプロモーターから得られるプロモーターにより、かかるプロモーターが宿主細胞系に適合する場合に制御される。

【0073】

真核宿主細胞（酵母、菌類、昆虫、植物、動物、ヒト、またはその他の多細胞生物からの有核細胞）において用いられる発現ベクターは、転写の終止およびmRNAの安定化に必要な配列をも含有する。

10

【0074】

プロモーターは、技術分野の当業者によりよく理解されている、いわゆる「誘導可能」でよく、発現は、適用された刺激にตอบสนองして「スイッチ・オン」または増加する。刺激の特性は、プロモーター間で変化する。ある誘導プロモーターは、適当な刺激の不在下ではわずか、または検出不能なレベルの発現（または発現しない）しか引き起こさない。また別の誘導プロモーターは、刺激の不在下で検出可能な構成的発現を引き起こす。刺激の不在下での発現のレベルにかかわらず、いずれかの誘導プロモーターからの発現は、正確な刺激の存在下で増加する。以下の実験では、Lac誘導プロモーターを使用している。

20

【0075】

本発明の発現ベクターは、一つまたはそれ以上の選択遺伝子をも含有できる。典型的な選択遺伝子は、（a）抗生物質またはその他の毒素、例えばアンピシリン、ネオマイシン、メソトレキセート、またはテトラサイクリンに対する抵抗性を付与する、（b）栄養要求欠損を補足する、または（c）複合培地から利用できない必須栄養を供給するタンパク質をコードし、例えば杆菌のD-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子である。哺乳動物細胞に適した選択マーカーの実例は、規定の膜標的タンパク質コード化核酸を取り込む受容能力のある細胞の同定を可能にするもの、例えばDHF Rまたはチミジンキナーゼである。野生型DHF Rを用いる場合、適当な宿主細胞は、DHF R作用が欠如したCHO細胞系であり、Urlaubら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216(1980)に記載されるように調製および増殖される。酵母での使用に適した選択遺伝子は、酵母プラスミドRp7に存在するtrp1遺伝子である[Stinchcombら、Nature 282: 39(1979); Kingsmanら、Gene 7: 141(1979); Tschemperら、Gene 10: 157(1980)]。trp1遺伝子は、トリプトファン中で成長する能力を欠いた酵母の変異株のための選択マーカー、例えばATCC: 44076またはPEP4-1を提供する[Jones, Genetics 85: 12(1977)]。

30

【0076】

形質転換

したがって、前記で言及された方法は、更に核酸を宿主細胞に導入することを含む。一般に「形質転換」として限定されないで言及され得る（とりわけインビトロ導入に関する）導入は、いずれか利用可能な技術を用いることができる。真核細胞では、適当な技術には、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAEデキストラン、電気泳動、リボソーム媒介トランスフェクションおよびレトロウイルスもしくはその他のウイルス、例えばワクシニアまたは昆虫細胞に関してはバキュロウイルスを用いる形質導入などがある。

40

【0077】

Sambrookら、前記塩化カルシウムを用いるカルシウム処置、またはエレクトロポレーションは、一般に原核細胞または実質的な細胞壁を含有するその他の細胞に関して用いられる。アグロバクテリウム・ツメファシエンス（Agrobacterium tumefaciens）での感染は、Shawら、Gene 23: 315(1983)および1989年6月29日発行のWO 89/05859に記載されるように、特定の植物細胞の形質転換に関して用いられる。

50

【0078】

かかる細胞壁を有さない哺乳動物細胞に関しては、Grahamおよびvan der Eb、Virology 52: 456~457(1978)のリン酸カルシウム沈殿法を用いることができる。哺乳動物細胞宿主系形質転換の一般的な態様は、米国特許第4,399,216号に記載されている。酵母への形質転換は典型的にはVan Solingenら、J. Bact. 130: 946(1977)およびHsiaoら、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76: 3829(1979)の方法にしたがって実施する。しかしながら、細胞へのDNAの導入のためのその他の方法、例えば核マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、無傷細胞との細菌性プロトプラスト融合、またはポリカチオン、例えばポリブレン、ポリオルニチンによる方法をも用いることができる。哺乳動物細胞を形質転換するための種々技術に関しては、Keownら、Methods in Enzymology 185: 527(1990)およびMansourら、Nature 336: 348~352(1988)を参照されたい。

10

【0079】

宿主細胞

発明に用いるのに適当な宿主細胞には、細菌、真核細胞、例えば哺乳動物および酵母細胞、ならびにバキュロウイルス系などがある。

異種性ポリペプチドの発現のために技術分野で利用可能な哺乳動物細胞系には繊維芽細胞3T6細胞、HeLa細胞、ベビー・ハムスター腎臓細胞、COS細胞、SV40により形質転換されたサル腎臓CV1系(COS-7、ATCC CRL 1651)、チャイニーズハムスター卵巣細胞/ - DHFR (CHO、UrlaubおよびChasin、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216(1980))；マウスセルトリ細胞(TM4、Mather、Biol. Reprod. 23: 243~251(1980))；ヒト肺細胞(W138、ATCC CCL 75)；ヒト肝臓細胞(Hep G2、HB 8065)；マウス乳腺癌細胞(MMT 060562、ATCC CCL 51)；および多くのその他のものなどがある。好ましいものは、いずれかの範囲の公知の神経芽腫細胞系、例えばN2A、N1E、SY5Yである。

20

【0080】

適当な原核細胞宿主には、非限定例としては、真性細菌、例えばグラム陰性またはグラム陽性生物、例えばエンテロバクテリアーシー(Enterobacteriaceae)、例えば大腸菌(E. coli)などがある。種々の大腸菌株は公に入手可能であり、例えば大腸菌K12 MM294株(ATCC 31446)；大腸菌X1776(ATCC 31537)；大腸菌W3110(ATCC 27325)およびK5 772(ATCC 53635)である。真核性微生物、例えば糸状菌または酵母もまたベクターに適したクローニングまたは発現宿主である。サッカロミセス・セルビジエ(Saccharomyces cerevisiae)は一般に用いられる下等真核性宿主微生物である。適当な宿主細胞の選択は、技術分野の技術範囲内であると考えられる。

30

【0081】

別の態様では、本発明は、前記で記載された本発明の異種性核酸を含有する宿主細胞を提供する。本発明の核酸を宿主細胞のゲノム(例えば染色体)に組み込むことができる。標準的な技術にしたがってゲノムとの組換えを促進する配列を封入することにより組み込みを促進できる。または、核酸を細胞内の染色体外ベクター上にあるか、またはそうでなければ細胞に対して認識可能な異種性もしくは外来性であってよい。概して、細胞系は、タンパク質例えばタウまたはその誘導体の膜局在形態を発現でき、細胞系は、タンパク質またはその誘導体をコードする核酸で形質転換されている。好ましい細胞系は、繊維芽細胞系、例えば3T6に基づくものでよい。

40

【0082】

発現産物

膜局在タンパク質の生成に関して本明細書で記載された発現またはクローニングベクターでトランスフェクトまたは形質転換された宿主細胞を、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、または望ましい配列をコードする遺伝子を増幅するのに適当なように修飾された、慣用される栄養培地中で培養することができる。培養条件、例えば培地、温度、pH等は、過度な実験を行わないで技術者により選択され得る。概して、細胞培養の生産性

50

を最大にするための原理、プロトコル、および実施技術を「Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach」M. Butler編、J R L プレス(1991)および Sambrookら(前記)に見出すことができる。

【0083】

遺伝子発現を、例えばサザン・ブロットイング、mRNAの転写を定量化するための慣用されるノーザン・ブロットイング[Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 5201~5205(1980)]、ドットブロットイング(DNA分析)、またはインサイチュー・ハイブリダイゼーションにより、凝集性疾患タンパク質の配列に基づいて、適当に標識されたプローブを用いてサンプル中で直接確認することができる。または、DNA二重鎖、RNA二重鎖、およびDNA-RNAハイブリッド二重鎖またはDNA-タンパク質二重鎖などの特異的二重鎖を認識できる抗体を用いることができる。

10

【0084】

または、遺伝子発現を免疫学的方法、例えば細胞または組織切片の免疫組織学的染色により、および細胞培養のアッセイにより測定して、遺伝子生成物の発現を直接定量化することができる。サンプル液の免疫組織学的染色および/またはアッセイに有用な抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルのいずれかがよく、いずれかの哺乳動物において調製することができる。便利なことには、凝集疾患ポリペプチドの元来の配列に対する抗体を調製することができる。

【0085】

このように本発明の一つの態様は、遺伝子発現のための条件下で、コードされたポリペプチド(またはペプチド)が生成されるように、例えば宿主細胞(これは実際に形質転換された細胞を含むが、より可能性があるのは細胞が形質転換された細胞の子孫である)を培養することにより、本明細書で論じられた核酸からの発現を引き起こすかまたは可能にする必要がある。

20

本発明は、また前記の態様の膜局在ポリペプチドまたはペプチドを作製する方法をも包含し、方法は、前記した核酸からの発現を含む。ポリペプチドの発現を引き起こすかまたは可能にする適当な条件下で、かかるベクターを含有する宿主細胞を培養物中で成長させることの代替として、本明細書で前記したインピトロ系、例えば網状赤血球ライゼート系でポリペプチドおよびペプチドを発現させることができる。

【0086】

概して、発現による産生の後、コードされた融合ポリペプチドをそれが発現される環境下で、すなわち融合ポリペプチドをそれが局在している膜から単離しないで利用する。このように、前記で論じたように、驚くべきことにタンパク質の膜局在形態を用いてアルツハイマー様タンパク質凝集を擬似する様式で、別のタンパク質分子の凝集の種をまくことができることが本発明者らにより見出された。このように、膜局在アルツハイマー病様タンパク質凝集をその膜(例えばER膜)において展示する細胞を、別のスクリーニングアッセイ(その論考に関しては以下を参照)に用いることができる。

30

【0087】

それにもかかわらず、発明のポリペプチドを、場合に応じて、膜分画の形態、または膜自体から単離された形態のいずれかで、宿主細胞および/または培養培地から単離および/または精製することができる。公知の方法、例えば異なる速度での遠心により、硫酸アンモニウムでの沈殿により、透析(正常圧で、または減圧下で)により、分離用等電点電気泳動により、調製用ゲル電気泳動により、または種々のクロマトグラフィー法、例えばゲル濾過、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーおよび親和性クロマトグラフィー(例えばセファロース(商標)ブルーCL-6Bで、またはキャリア結合モノクローナル抗体で)によりタンパク質を実質的に均質になるまで精製できる。

40

【0088】

したがって、本発明は、別の態様では、前記の態様で提供されるような核酸によりコードされるポリペプチド、例えばシグナルペプチドおよび(必要な場合)アンカーおよび/ま

50

たは輸送停止配列に連結されたポリペプチドまたはそのフラグメントに関する（例えば、タウまたはタウのコアフラグメントに基づいて）。好ましい具体例では、ポリペプチドは凝集性疾患タンパク質、例えばタウタンパク質またはその誘導体を含む。更に好ましくは、タンパク質は前記したタウコアフラグメントを含む。

【0089】

インビトロモデル

前記した目的のタンパク質の膜局在形態をインビトロモデルで用いることができる。

例えば、相互参照により本明細書に組み込まれるW096/30766のアッセイにおいて用いられるタウフラグメントに類似してこれを用いることができる。前記したように、タウ凝集およびそのインヒビターに関するこのアッセイでは、コア反復ドメインに対応するタウのフラグメントを固相基質に吸収させる。これにより可溶性全長タウを捕捉し、高い親和性でタウを結合させることが可能になる。これらの二つの方法（膜局在化、インビトロ固相）の組み合わせが特定の局面では有利である。

10

【0090】

前記した細胞基盤の方法の別の代替として、目的のタンパク質の膜局在形態のインビトロタンパク質発現系において発現を引き起こすことによる、モデル化法を実施できる。例えば、ミクロソーム（小胞体のフラグメント化により容易に生成できる）、リボソーム、tRNA分子、ならびにシグナル配列およびタンパク質合成および転移に必要ないずれかその他の可溶性因子に連結された目的のタンパク質またはタンパク質フラグメントをコードするmRNAを含有するインビトロ培地を用いてタンパク質の膜結合形態を合成することができる。本明細書では、前記した細胞基盤の系に類似した方法で、リボソームはミクロソーム膜（これは細胞基盤の系のER膜に等しい）に付着し、コードされたポリペプチド分子の合成を引き起こすようになる。

20

【0091】

この後者の具体例では、凝集性疾患タンパク質をコードする構築物、シグナル配列ならびにアンカーおよび/または輸送停止配列（必要な場合）はすべてコードされたタンパク質分子の大部分が、ミクロソーム膜に挿入された場合に、内腔によりむしろ膜のサイトゾル表面から突き出るように設計されるのが好ましい。このように、タンパク質分子は別のタンパク質分子（それによりアルツハイマー病様凝集がミクロソームのサイトゾル表面で生じるのが可能になる）およびかかる凝集の可能性のあるインヒビターまたはモジュレーターをスクリーニングするためのスクリーニングアッセイにおける被検物質の双方と接近できるようにする。

30

【0092】

技術者は望ましいタンパク質トポロジーを達成するために適当な構築物の設計に精通している。更にこの点の論考については、以下で提示する。

したがって、本明細書で提供される細胞基盤およびインビトロモデル系を関連づける共通の特徴は、凝集性疾患タンパク質またはタンパク質フラグメントの膜局在形態の合成である。この共通の特徴により、例えば神経原繊維濃縮体の形成中のタウのごとき、タンパク質の病的凝集を擬似する方法で別のタンパク質分子の凝集を伝播させ得る種分子を作製する方法が生み出される。

40

【0093】

重合化相互作用の誘導の検出

種々の具体例では、以下の種のいずれか一つまたはそれ以上の濃度またはレベルをモニター観察することにより、凝集の進行（または凝集の変調）を直接または間接的に検出することができる：融合体および/または第2のタンパク質（例えば沈降係数に基づいて）の凝集、またはこれらのいずれかのタンパク質分解フラグメント（これは概して凝集で増加する）；非凝集融合ポリペプチドおよび/または第2のタンパク質に対応する種（低下し得る）。

【0094】

したがって、特定のタウ融合体およびタンパク質（40kDの190～441フラグメン

50

トおよびT40に基づく)で实例を示すように、融合および長いタンパク質の双方から誘導される25kD処理した種のレベル増加に基づいて凝集をモニター観察できる(図1参照)。

方法で用いられた第2の(「遊離の」)タンパク質は、タンパク質分子の凝集の程度を検出するのを補助するために、標識されているか、またはそうでなければ膜結合タンパク質から区別できる、例えば免疫学的に識別されるのが望ましい。

【0095】

例えば、凝集性疾患タンパク質の遊離形態をレポーター分子に連結できる。本明細書で用いられる「レポーター分子」なる用語は、その化学的特性により抗原結合抗体の検出を可能にする、分析的に検出可能なシグナルを提供する分子を意味することを意図する。好ましくは検出を定量化して、サンプル中の抗原の量を決定することを可能にできるべきであり；これは定数項で算出できるか、または正常レベルの公知の抗原を含有する標準(または一連の標準)と比較して実施することができる。实例は技術分野の当業者に公知であり、例えば酵素または蛍光体である。

10

【0096】

したがって、タンパク質の遊離形態は直接修飾される(例えば放射活性または酵素的に検出可能な標識でマークした)か、または分子のドメイン、例えば高親和性タウ-タウ結合部位に関与しないことが解っているN-末端セグメントで抱合され、それにより、それはタウ-タウ結合アッセイにおけるリガンドおよびレポーター分子の双方として機能するようになる。

20

【0097】

抗体またはそのフラグメントは、本発明の方法の態様において用いられる場合、慣用される技術により生成され得る。ポリクローナル抗体は、例えば対応するタウ抗原を動物、好ましくはウサギに注射し、そしてイムノアフィニティ精製により抗血清を回収することにより上昇され、ここでポリクローナル抗体は、抗原が結合するカラムに通され、次いで慣用される様式で溶出される。好ましくは、本発明は、タウエピトープに選択的であり、KohlerおよびMilsteinの方法により調製できるモノクローナル抗体を使用する。タウエピトープに対する適当なモノクローナル抗体を公知の方法により修飾してFabフラグメントまたは(Fab)₂フラグメント、キメラ、ヒト化または一本鎖抗体具体例を提供することができる。本発明による抗体を多くの方法で修飾することができる。実際に、「抗体」なる用語は、結合ドメインを有するいずれかの結合物質を必要な特異性で補っていると解釈すべきである。このように本発明は、抗体フラグメント、誘導體、機能的等価物および、その形状が抗原またはエピトープに結合するのを可能にする抗体の形状を擬似する合成分子および分子などの抗体の相同体に及ぶ。

30

【0098】

概して、抗体が検出に用いられる場合、抗体は、レポーター分子を担持できる。または、未標識のタウ特異的1次抗体に結合できる2次抗体の使用により結合の検出を実施できる。この場合、2次抗体はレポーター分子に連結されている。

【0099】

非限定例としてラジオイムノアッセイ、「サンドウィッチ」アッセイ、酵素結合イムノソルベントアッセイ(ELISA)；蛍光イムノアッセイ、プロテインAイムノアッセイ等の技術分野で公知のいずれかのイムノアッセイにおいて抗体を用いることができる。典型的には、免疫プロット法が使用される。好ましくは、イムノアッセイは、技術者に公知であるように、固相で実施される。例えば、抗体を例えばアッセイカラムに吸収させ、そして、次いで細胞の膜に存在する目的のタンパク質のいずれかの凝集、例えばタウ-タウ凝集の固相抗体への結合を可能にするのに適した条件下で、細胞サンプルをカラムを通して洗浄することができる。過剰の試薬を洗い流し、例えば前記および後記で实例を示すようにいずれか適当な手段により、凝集タンパク質のカラムへの結合を検出することができる。

40

【0100】

50

好ましいモノクローナル抗体は、以下のとおりである：

・トランケートされたタウ種および全長のタウ種間の結合の測定を可能にするタウエピトープのN-末端またはC-末端を認識するもの。とりわけ有用なものは、ヒト特異的エピトープを認識する抗体である。かかるモノクローナル抗体の一つ(27/499と称する)は、タウのG1y-16およびG1n-26間の領域に位置するヒト特異的エピトープを認識し、そしてヒト以外の供給源から誘導される場合、それにより全長のタウ種間の結合の測定が可能になる(「アルツハイマー病の神経原繊維病理の進行におけるタウタンパク質のリン酸化異常の役割」PhD Thesis、ケンブリッジ大学)。

【0101】

・G1u-391でトランケートされたコアタウフラグメントを認識するもの。实例は、mAb423(Novakら、前出(1993))。この抗体は、mAb423により認識されない、G1u-391で終止するトランケートされたコアタウフラグメントの、Ala-390で終止する類似のフラグメントへの結合の検出を可能にする。このトランケーションは、アルツハイマー病のPHF集合の過程で天然に生じる(Menaら、前出(1995)、(1996); Novakら、前出(1993); Menaら、前出(1991))。更に、タウが、インビトロで反復ドメインを介して結合する場合、プロテアーゼ(例えばプロナーゼ)での消化によりmAb423で検出可能なフラグメントを生じる(Wischikら、前出(1996))。図17は、本発明によるアッセイで生じ得る種々のタウ誘導種、および各々のおおよそのトランケーション点を示す。このようにmAb423を用いて、本明細書で提供される膜局在モデル系で生じるタウ-タウ結合相互作用の分子立体配座が、脳で病的に生じるものに対応する、そして、したがって本発明によるかかるモデル系がアルツハイマー病様タンパク質凝集の実行可能なモデルを提示することを示すことができる。

【0102】

・反復ドメインにおける一般的なタウエピトープを認識するもの。好ましい具体例は、抗体(例えばmAb7.51)を利用する。タウ-MAP2またはMAP2-MAP2凝集を検出すべき場合、一般的なMAP-2エピトープを検出する抗体を用いることができる。抗体7.51は終わりから3番目のタウの反復に位置する一般的なタウエピトープを認識し(Novakら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 5837~5841(1991))、これは、タウがPHF様免疫化学的立体配座で結合する場合に塞がれるが、ギ酸処理の後暴露され得る(Harringtonら、前出(1990)、(1991); Wischikら、前出(1995a))。正常な可溶性タウまたは微小管に結合したタウをギ酸処理を行わずにmAb7.51を用いて検出することができる(Harringtonら、前出(1991); Wischikら、前出(1995a))。タウ-タウ結合アッセイにおける全長タウの結合は、mAb7.51エピトープの部分的閉塞に関連する。

【0103】

抗体27/342は、タウ-タウ相互作用の過程で部分的に塞がれるSer-208およびSer-238間に位置する種非特異的一般的タウエピトープを認識する(Lai、前出)。

いくつかのモノクローナル抗体の結合部位を図4に示す。

【0104】

モジュレーターおよびインヒビターに関するスクリーニング
前記したように、発明は好ましくは、本明細書で提供されるような、アルツハイマー病様タンパク質凝集のモデル化の方法における核酸分子、ポリペプチドもしくはその誘導體、宿主細胞、またはインビトロタンパク質発現系に関する。本発明の方法は、細胞基盤またはマイクロソーム基盤の発現系において核酸分子の発現を引き起こす工程を含むことができ、そのようにしてコードされたポリペプチドが各々細胞の膜(例えばER膜)またはマイクロソーム膜で局在化されるようになる。

【0105】

好ましい態様では、本明細書で論じられた疾患の処置のための治療薬を同定する方法が開示され、その方法は、融合ポリペプチド(および、好ましくは前記で論じられた第2のタンパク質)を提供する、および膜局在タンパク質を疾患に伴うタンパク質凝集のインヒビ

ターまたはモジュレーターであることが推測される被検物質と接触させる工程を含む。とりわけ、前記で記載したモデル化法により生成されるような融合ポリペプチドを用いてアルツハイマー病様タンパク質凝集、例えば病的タウ - タウ会合の可能性のあるインヒビターまたはモジュレーターを研究し、スクリーニングすることができる。

【0106】

したがって、前記した種々の方法は、更に(c)融合ポリペプチドおよび/または第2のタンパク質を、凝集を変調または阻害する能力に関して評価するのが望ましい一つまたはそれ以上の作用物質と接触させることと；(d)凝集の程度をモニター観察し、そして場合によっては凝集と(複数の)作用物質の変調活性とを相関させてもよいことと；の工程を含むことができる。

10

【0107】

したがって、タンパク質で立体配座相互作用が誘導される疾患に伴うタンパク質の(好ましくは細胞内)凝集のモジュレーターを同定する方法は、凝集を変調(阻害または逆転)できることが推測される一つまたはそれ以上の作用物質の存在下で前記した凝集を誘導する方法を実施することを含むことができる。作用物質の存在下または不在下で凝集の程度(および場合によってはタンパク質分解性プロセッシング)を観察でき、相対値はモジュレーターとしてのその活性に相関した。

【0108】

好ましくは、スクリーニング法が目的のタンパク質、例えばタウの膜局在形態を発現する細胞を用いる場合、これらは例えば神経細胞系、例えば神経芽細胞腫細胞系からの細胞、または繊維芽細胞系からの細胞を含んでよい。好ましい態様では、細胞は繊維芽細胞3T6細胞系に由来する。

20

【0109】

一つの具体例では、本発明は、アルツハイマー病様タンパク質凝集、例えば病的タウ - タウ会合を変調または阻害できる作用物質をスクリーニングする方法に関し、方法は：

(1)凝集性疾患タンパク質(例えばタウまたはMAP2)、またはそのコアフラグメント(例えばタウまたはMAP2のコアタンデム反復ドメイン)の膜局在形態の合成を引き起こすかまたは可能にすること；

(2)上記ポリペプチドまたは誘導体を：

(A)凝集性疾患タンパク質分子の凝集を変調または阻害できると推測される一つまたはそれ以上の作用物質；および

30

(B)工程(1)の膜随伴タンパク質に結合できる、別の凝集性疾患タンパク質またはそのコアフラグメント；

と接触させること；ならびに

(3)存在する場合、工程(2)(b)のタンパク質の工程(1)の融合ポリペプチド結合との結合を検出すること；

を含む。

【0110】

前記の工程(2B)で用いられるタウ様タンパク質は、特定の具体例において、タンパク質の「遊離」形態でよく、この用語は本明細書において工程(1)の膜結合凝集性疾患タンパク質から区別するために用いられる。しかしながら、「遊離」は凝集性疾患タンパク質が別の分子または部分、例えば炭水化物部分またはその他のペプチドと複合体形成しているか、そうでなければそれに随伴されている可能性を排除することを意図するものではない。

40

【0111】

例えば被検物質を前記した細胞の系に添加し、そして結合を可能にし、そして結合の阻害を実証するのに十分な時間、細胞をインキュベートしてよい。次いで例えば適当に標識した抗体、例えばMAb7.51を全細胞抽出物のイムノプロットで用いることにより、またはいずれかその他の適当な検出方法を用いることにより結合タウ複合体を検出することができる。所望する場合、例えば膜結合タウタンパク質をアミノ酸390で終止させるこ

50

とにより、膜結合タウタンパク質を凝集した遊離のタウタンパク質から区別することができる。凝集した遊離のタウはアミノ酸 G l y 3 9 1 でタンパク質分解的に切断され、これはそのエピトープに特異的な抗体により検出できる（例えば M A b 4 2 3 ）。

【 0 1 1 2 】

スクリーニング法がこの目的で、すなわち、変調 / 阻害化合物の同定のために用いられる場合、非競合または競合アッセイを用いることができる。例えば、技術分野で公知の型の競合アッセイでは、アルツハイマー病様凝集に及ぼす公知のインヒビターまたはモジュレーターの影響を、別の被検物質または作用物質の存在下または不在下で比較して、被検物質が目的のタンパク質に対する結合に関して公知のインヒビター / モジュレーターと競合する能力を決定することができる。

10

【 0 1 1 3 】

被検化合物の選択

試験される化合物は、適切な活性に関して評価するのが望ましいいずれかのものでよい。方法を新規インヒビター / モジュレーターを同定するための 1 次スクリーニングとして、または公知のインヒビター / モジュレーターを更に詳細に研究するための 2 次スクリーニングとして提供することができる。

作用物質は、天然または合成化学化合物でよい。アルツハイマー病様タンパク質を認識する、および / またはアルツハイマー病様タンパク質凝集を変調する抗体は、凝集過程に関して、推定の阻害または変調化合物の一つのクラスを形成する。より通常的には、相対的に小型の、好ましくは血液脳関門通過できる化学化合物が試験される。

20

【 0 1 1 4 】

本発明のこの態様によるスクリーニングアッセイにおいて添加される被検物質または化合物の量が、用いる化合物の型に依存して通常試行錯誤により決定されることは、技術者には理解されよう。治療の局面において現実的に用いることができる、すなわち患者に対して非致死的であるレベルを選択できる。

【 0 1 1 5 】

阻害の特異性

本発明のこの態様によるスクリーニング法を用いて、病的なアルツハイマー病様タンパク質凝集（例えばタウ - タウまたはタウ - M A P 2 結合）の選択的競合阻害の特性を示す化合物に関して、例えば分子の同一の領域を介してタウまたは M A P 2 のチューブリンへの正常な結合と干渉することなく、スクリーニングすることができる（W O 9 6 / 3 0 7 6 6 参照）。

30

【 0 1 1 6 】

アルツハイマー病様タンパク質凝集の可能性のあるインヒビター / モジュレーターにより、タウ、M A P 2 またはその誘導体のチューブリンへの結合のいずれか可能な干渉を決定するための適当な方法は、脱重合化チューブリン / M A P 2 またはタクソール安定化微小管の調製物を、工程（ 2 ）（ b ）で前記したタンパク質またはその誘導体と一緒に、タウ - タウまたはタウ - M A P 2 会合を変調または阻害できると推測される作用物質と接触させ、続いてタウ - チューブリンまたは M A P 2 - チューブリン結合を検出することを含む。またタウ - チューブリン結合を、例えば W O 9 6 / 3 0 7 6 6 に記載されるように、例えば正常な細胞骨格分布により実証することもできる。

40

【 0 1 1 7 】

チューブリンタンパク質またはそのフラグメントの調製方法を、結合パートナーと組み合わせることが可能であり、これは技術分野で公知であり、そして例えば Slobada ら（Cell Mobility(1976)(R. Goldman、T. Pollard および J. Rosenbaum 編) コールド・スプリング・ラボラトリー、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク、1171 ~ 1212 頁) により記載されている。

【 0 1 1 8 】

細胞生存性

方法が細胞基盤の系を利用する場合、これは更に、例えば乳酸塩デヒドロゲナーゼアッセ

50

イキット（シグマ）を用いることによる、膜局在凝集性疾患タンパク質を発現する細胞の生存性を試験する工程を含むことができる。

タウ・タウ、タウ・MAP2またはMAP2・MAP2凝集が研究される場合（前記の「特異性」の項目を参照）、タウ・チューブリンまたはMAP2・チューブリン結合の阻害または干渉が、細胞が分割する能力の低下、そしてしたがって細胞生存性の低下とある程度相関するので、この工程は、タウまたはMAP2のチューブリンへの結合の、被検物質によるいずれかの干渉の指標をも提供できる。

【0119】

治療および投与様式

前記の種々の態様によるスクリーニングアッセイの実施の後に、疾患関連タンパク質凝集を干渉するかまたは変調する能力に関して陽性であると試験された化合物、物質または分子の単離および/または製造および/または使用を続けてよい。

このように同定された化合物をアルツハイマー病等（実際にはアルツハイマー病様タンパク質凝集を生じるいずれかの症状）の診断、予後または治療的処置において使用するための組成物に処方できる。したがって、本発明また、別の態様において、本明細書で提供されるスクリーニング法により入手できる一つまたはそれ以上の阻害または変調化合物を含む医薬用処方にも及ぶ。

【0120】

かかるタンパク質凝集を変調するかまたはそれに影響する物質の同定の後、物質または作用物質を更に研究することができる。別の阻害/変調候補化合物は、ポリペプチドまたはペプチドフラグメントの3次元構造のモデル化、ならびに特定の分子形状、大きさおよび電荷特性を有する、可能性のある阻害化合物を提供するための合理的な薬物設計の使用に基づいてよい。したがって本発明は、本明細書で提供されるスクリーニング法を用いて同定される、アルツハイマー病様タンパク質凝集を阻害または変調できる作用物質、またはその誘導体、活性部分、アナログ、変種または擬似物質の、アルツハイマー病様凝集の別のインヒビター/モジュレーターのスクリーニングまたは設計における使用をも提供する。

【0121】

前記したように同定された化合物を製造でき、そして/または調製物、すなわち、組成物、例えば医薬品、医薬用組成物または薬物の製造または処方において使用できる。

一般に、本発明によるインヒビターまたはモジュレーターは、単離および/または精製された形態、すなわち実質的に純粋な形態で提供される。これは、少なくとも90%、更に好ましくは少なくとも約95%、更に好ましくは少なくとも約98%の活性成分を示す組成物中に存在することを含んでよい。しかしながら、かかる組成物は、不活性担体またはその他の医薬的および生理学的に許容される賦形剤を含むことができる。以下で指摘されるように、本発明による組成物は開示される阻害/変調化合物に加えて、治療用途の一つまたはそれ以上の別の分子を含むことができる。

【0122】

このように、本発明による物質、例えばタウ・タウ凝集またはアルツハイマー病様タンパク質凝集のごとき別の凝集のインヒビターを、アルツハイマー病様タンパク質凝集を生じる症状のヒトまたは動物の肉体の処置の方法において使用するために提供できる。

したがって、本発明は、種々の態様において、前記した本発明の物質を含む医薬用組成物、医薬品、薬物またはその他の組成物、かかる組成物を患者に投与することを含む、例えばアルツハイマー病またはアルツハイマー病様症状の処置または予防のための方法、例えばアルツハイマー病の処置または類似の処置のために投与するための組成物の製造におけるかかる物質の使用、ならびにかかる物質を医薬上許容できる賦形剤等と混合することを含む医薬用組成物の作製方法にも及ぶ。

【0123】

とりわけ本発明は、細胞においてアルツハイマー病様タンパク質凝集を変調する方法であって、かかる凝集を阻害またはそうでなければ変調する作用物質を投与することを含み、

10

20

30

40

50

したがってアルツハイマー病またはアルツハイマー病様タンパク質凝集が関連しているその他の疾患もしくは障害の処置において有用である方法を提供する。本発明は、更にタンパク質のアルツハイマー病様凝集と干渉する、またはそうでなければ変調する作用物質を患者に投与することを含む、アルツハイマー病様症状を処置する方法を提供する。

【0124】

個体に投与されるのがポリペプチド、抗体、ペプチド、核酸分子、小型分子、擬似物質または本発明による医薬的に有用なその他の化合物であっても、投与は（場合によっては、予防は、治療であると考えられ得るが）「予防的に有効な量」または「治療的に有効な量」であるのが好ましく、これは、個体に利益を示すのに十分である。実際に投与された量ならびに投与の速度および時間的経過は、処置されるべきものの特性および重篤度に依存する。処置の処方箋、例えば投与量等の決定は、一般の開業医およびその他の医師の責任の範囲内である。

10

【0125】

組成物を単独で、またはその他の処置と組み合わせて、処置すべき症状に応じて同時にまたは連続的に投与することができる。

本発明による、および本発明により使用するための医薬用組成物は、活性成分に加えて、医薬上許容される賦形剤、担体、バッファー、安定化剤または技術分野の当業者に公知のその他の材料を含んでよい。かかる材料は、無毒性であり、そして活性成分の効果に干渉してはいけない。担体およびその他の材料の正確な特性は、投与経路に依存し、投与経路は、経口、または例えば皮膚、皮下または静脈内注射によるものでよい。

20

【0126】

経口投与のための医薬用組成物は、錠剤、カプセル、粉末または液体の形態でよい。錠剤は、個体担体、例えばゼラチンまたはアジュバントを含むことができる。液体医薬用組成物には、一般に液体担体、例えば水、石油、動物または植物油、鉱油または合成油などがある。生理学的食塩水、デキストロースまたはその他の糖類溶液またはグリコール、例えばエチレングリコール、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコールなどが含まれ得る。

【0127】

静脈内、皮膚もしくは皮下注射、または患部の注射用には、活性成分は、非経口的に許容される、パイロジェン不含で、そして適当なpH、等張性および安定性を有している水性溶液の形態である。適切な技術分野の当業者は、例えば等張賦形剤、例えば塩化ナトリウム注射液、リンガー注射液、乳酸塩リンガー注射液を用いて適当な溶液を十分調製できる。保存剤、安定剤、バッファー、抗酸化剤および/またはその他の添加剤を必要に応じて含むことができる。

30

前記した技術およびプロトコルの実例は、Remington's Pharmaceutical Sciences 第16版、Osol, A. (編)(1980)において見出すことができる。

【0128】

脳またはその他の望ましい部位に局在化様式で作用物質を投与することができるか、またはそれが脳またはその他の細胞を標的化するような様式で全身的に分配することができる。例えば、標的化治療を用いて、標的化系、例えば抗体または細胞特異的リガンドを使用することにより、活性物質をより特異的に特定の型の細胞に分配することができる。種々の理由で、例えば作用物質が許容し難い毒性である場合、またはそうでなければ非常に高量を必要とする場合、またはそうでなければ標的細胞に入ることができない場合、標的化が望ましい。

40

【0129】

これらの作用物質を直接投与する代わりに、処置すべき細胞中で生成されるか、またはその細胞に標的化される活性化物質により活性形態に変換するために、それらを前駆体の形態で投与することができる。

アルツハイマー病様タンパク質凝集で干渉できる作用物質を、例えばその内容物を外部環境から保護する適当な容器中で密封されたキットで提供することができる。かかるキット

50

には、使用のための指示書が含まれてよい。

【0130】

動物

前記の論考の多くは、細胞系またはインビトロ基盤のアッセイに関連しているが、本明細書で開示された本発明は、動物基盤のアッセイで特に有用である。

したがって、本発明による宿主細胞は、トランスジェニック動物に含まれることができ、そして本発明は、更に前記の態様による融合ポリペプチド、例えばタウコアフラグメントの膜局在形態を発現する細胞を含むトランスジェニック動物を提供する。米国特許第5,912,410号および第5,898,094号(その開示を相互参照により本明細書に組み込まれる)で論じられるものに類似の様式でかかる動物が準備される、および/または用いられる。

10

【0131】

本発明のトランスジェニック生物は、すべて多くのその細胞内に、タンパク質凝集の疾患の病因に関連すると考えられるクローン化された組換えまたは合成DNA配列を含む。より具体的には、トランスジェニック生物は、外来性遺伝物質、例えば組織特異的プロモーター配列および膜標的化タンパク質の生成をコードする配列を含む、前記で詳細に記載した配列を含有する。一つまたはそれ以上の前記の配列を利用する本発明のトランスジェニック生物を生成することができるので、一般的に外来性遺伝物質を参照することによりトランスジェニック生物の生成についての一般的な記載が得られる。当業者はこの一般的な記載を適用して、前記した特定のDNA配列を生物に組み込み、以下に記載される方法および材料を利用して、これらの配列の発現を得ることができる。トランスジェニック生物、とりわけトランスジェニックマウスの生成に関してより詳細には、1989年10月10日発行の米国特許第4,873,191号(トランスジェニックマウスを生成する方法を開示するために出展明示により本明細書に組み込まれる)およびそこで参照され、そして引用されている多くの科学文献を参照されたい。

20

【0132】

外来性遺伝物質を雄または雌のいずれかの接合子の前核に配置することができる。より好ましくは、それを精子が卵に侵入した後、できるだけ早くに雄性前核に配置する。換言すれば、前核の輪郭が明確化され、十分に分離される、雄前核の形成直後に、各々は、接合子膜の近くに存在している。マウス受精卵の雄前核は、本発明の外来性遺伝物質の添加に好ましい部位である。

30

卵核または接合子の雌前核によりプロセッシングされる前に、接合子の雄DNA相補体に外来性遺伝物質を添加するのが最も好ましい。卵核または雌性前核は、おそらく雄DNAのプロタミンをヒストンで置換することにより、雄DNA相補体に影響する分子を放出し、それにより雌および雄DNA相補体の組み合わせを促進して二倍体接合子を形成すると考えられている。

【0133】

したがって、雌性前核により影響される前に、外来性遺伝物質を雄のDNA相補体またはDNAのいずれか別の相補体に添加するのが好ましい。例えば、雄性および雌性前核が、十分に分離されていて、双方が、細胞膜に接近して位置している、雄性前核の形成後、できるだけ早くに外来性遺伝物質を初期雄性前核に添加する。または、精子の核を非凝集化されるように誘導した後、それに外来性遺伝物質を添加できる。外来性遺伝物質を含有する精子を次いで卵に添加できるか、または外来性遺伝物質を添加された卵に、その後できるだけ早くに非凝集化精子を添加できる。

40

【0134】

本発明の目的のために、完全生物に成長することができる二倍体細胞の形成に接合子は必須である。一般に、接合子は、天然にまたは人工的に、一つまたは複数の配偶子からの二個の一倍体核の融合により形成された核を含有する卵に含まれる。したがって、配偶子核は、自然に適合可能なもの、すなわち機能性生物に分化および成長できる生存可能な接合子に至るものでなければならない。一般に、正倍数体接合子が好ましい。異数性の接合子

50

が得られた場合には、染色体数は、いずれかの配偶子が起源する生物の正倍数体数について1以上変化すべきでない。

【0135】

類似の生物学的考察に加えて、物理学的な考察もまた接合子の核に、または接合子核の一部を形成する遺伝物質に加えることができる外来性遺伝物質の量の決定基準となる。遺伝物質が除去されない場合、次いで、添加できる外来性遺伝物質の量は、物理学的に分解されないで吸収される量に限定される。一般に、挿入される外来性遺伝物質の容量は、約10ピコリットルを超えない。添加の物理学的影響は余りに大きく、物理学的に接合子の生存性を破壊してはならない。外来性遺伝物質などの、得られた接合子の遺伝物質は、接合子の機能的生物への分化および成長を生物学的に開始し、かつ、維持することができなければならぬので、DNA配列の数および種類の生物学的限界は特定の接合子および外来性遺伝物質の機能に依存して変化し、当業者には容易に明らかになる。

10

【0136】

接合子に添加されるDNA配列のコピー数は、添加される外来性遺伝物質の全量に依存し、形質転換が生じるのを可能にする量である。理論的には、ただ一個のコピーが必要であるが；一般に一個のコピーが機能するのを確実にするために、多くのコピー、例えば1000~20000個の遺伝子のコピーを用いる。本発明に関しては、一般に、外来性DNA配列の表現型発現を増強するために、挿入された外来性DNA配列の各々の一個以上の機能的コピーを有しているのが有利である。

【0137】

外来性遺伝物質を核遺伝物質への添加を可能にするいずれかの技術を、それが細胞、核膜またはその他の存在する細胞性もしくは遺伝的構造に対して破壊的でない限り利用できる。外来性遺伝物質は、マイクロインジェクションにより核遺伝物質に優先的に挿入される。細胞および細胞性構造のマイクロインジェクションは、公知であり、技術分野で用いられている。

20

【0138】

したがって本発明は、適当な膜標的化配列をコードするクローン化された組み換えDNA配列を、受精した哺乳動物の卵（好ましくはマウスの卵）に注入できる方法を提供する。注入された卵を偽妊娠した雌に移植し、細胞が関連する疾患の病理学に関連するタンパク質を発現するトランスジェニックマウスを提供する期間まで成長させる。注入された配列は、トランスジェニック哺乳動物の特定の組織において（最も顕著には神経組織において）望ましいタンパク質を発現するように連結されたプロモーター配列を有して構築されている。例えば現在ヒト脳において生じることが解っているアルツハイマー病様凝集を生成するようにベクターをニューロン特異的発現に適合させるのが適している。事例にはLewisら(2000)のプリオン特異的プロモーターまたはThunckeら(2000)の神経特異的エノラーゼプロモーターなどがある。

30

【0139】

本発明のヒト以外の動物は融合ポリペプチドのためのホモ接合体またはヘテロ接合体でよい。哺乳動物には、ヒト以外の霊長類、げっ歯類、ウサギ、ヒツジ、ウシ、ヤギ、ブタなどが挙げられる。げっ歯類にはマウス、ラットおよびモルモットなどが挙げられる。具体的には：

40

・ 増強された、または加速された病理を伴う、タンパク質凝集の疾患に関するトランスジェニック動物モデルの調製方法、およびかかる方法により作製されたトランスジェニック動物；

・ いずれかの性別の創始動物（F₀世代）と、本明細書で論じたタンパク質に関してトランスジェニックでない動物であって、そして野生型であるのが好ましい動物との交配によりF₁世代を生成する方法。次いで子孫（F₁世代）をスクリーニングし、導入遺伝子を担持し、疾患の病理が増強されているものを選択する；

・ 適当な性別の2匹のF₁動物を交配させることによりF₂世代を作製する方法。次いで子孫（F₂世代）をスクリーニングし、適当な用量で導入遺伝子を担持し（すなわちヘテ

50

口またはホモ接合体)、疾患の病理が増強されているものを選択する;

・トランスジェニック動物モデルの疾患表現型の変調の方法、および前記するように変調された表現型を有するトランスジェニック生物が提供される。

【0140】

本発明のヒト以外のトランスジェニック哺乳動物を実験用の目的でアルツハイマー病様疾患の研究に、およびかかる症状の徴候または進行を緩和するように設計された治療の開発に用いることができる。「実験用の」とは、かかる実験が行われる研究施設に適用できる現行の法律の下で動物実験または試験目的で使用が許可されていることを意味する。

【0141】

アルツハイマー病様タンパク質凝集の可能性のある診断、治療または予後用物質をスクリーニングまたは試験するために動物を使用できる(さらなる論考のためには以下を参照)。したがって、本発明の以下の態様は、アルツハイマー病およびアルツハイマー病様症状の研究の助けとなり得る動物モデルを提供する。インビボモデル系では、細胞で合成される膜局在アルツハイマー病様タンパク質凝集を引き起こすかまたは可能にすることにより、動物においてアルツハイマー病様症状が誘導される。この動物モデル系を用いて、アルツハイマー病またはアルツハイマー病様症状に関連する治療効果を有することが推測される化合物を動物に投与でき、症状に及ぼすいずれかの効果(例えば徴候またはいずれかその他の指標の改善)を研究することができる。とりわけ、本発明のトランスジェニック哺乳動物は、動物の脳内で形成される凝集の量を低下させる能力に関して医薬用薬物の有効性を決定するのに有用である。ヒトのADの測定において用いられる生化学的および/または組織学的技術によりこれらの凝集を測定することができる(例えばMukaetova-Ladinska, E. B. ら、前出(2000))。 10 20

【0142】

最も好ましくは、凝集(またはその障害)は、例えば内因性の、全長タウをタンパク質分解性プロセシングの結果であるタウのトランケートされたフラグメントの生成(または障害、または廃止、または生成)により評価される。好ましい態様では、タウの凝集は、実際のAD PHFコアにおいて見出されるものに対応するトランケートされたコアフラグメントへのタンパク質分解性プロセシングにより示される。しかしながら、この方法の診断生成物または副産物である一つまたはそれ以上のその他のフラグメントのいずれかの生成物をも用いることができる。 30

したがって哺乳動物は、薬物動態の局面で、かかる薬物の有効性を試験するのに、形成を防御するかまたは形成された凝集の量を低減させるのに、および既に形成された凝集を排除するかまたは低減させるのに有用である

【0143】

概して、試験される薬物を対照動物、または本発明のトランスジェニック動物ではない動物の群に、および同時に本発明のトランスジェニック動物に投与する。動物の脳において凝集の形成に影響するのに通常十分な時間、薬物を連続的に投与するのが好ましい。十分な時間薬物を投与した後、(複数の)トランスジェニック動物と共に(複数の)対照動物を屠殺した。動物の脳の試験は、前記のとおり行った。

【0144】

かかる系では、例えばタウ、またはタウ様凝集、例えばWischikら(前出(1995))Laiら(前出(1995))またはMukaetova(前出(2000))の方法によりヒト脳組織で検出されるものの、形成の障害を観察するために、例えばイムノアッセイにより、タンパク質凝集の可能性のあるインヒビターまたはモジュレーターの影響を前記のとおり決定または検出でき、ここでタウタンパク質の凝集した形態の測定は、脳組織において行われる。

例えば細胞内での凝集の生成は、組織学的に、および電子顕微鏡により可視化することができ、そしてこれらの凝集の防御は同様に評価される。

【0145】

(複数の)対照動物内の凝集沈着物の量を本発明の(複数の)トランスジェニック哺乳動物内に沈着する量と比較することにより、薬物の有効性に関する測定を行うことができる 40 50

。当業者に公知の比較薬物試験プロトコルを、薬物を試験するために本発明のトランスジェニック哺乳動物と関連させて用いることができる。薬物の最終的な細胞内濃度を選択して、正確な疾患タンパク質および問題の薬物に対して適切にすることができるが、究極的に毒性、摂取等の点で臨床使用に相当である範囲にできる（例えば $1 \mu\text{M} \sim 1 \text{mM}$ 、より好ましくは $4 \sim 600 \mu\text{M}$ ）。

【0146】

本発明のインビボスクリーニングアッセイは、試験される化合物により引き起こされるアルツハイマー病様タンパク質凝集の阻害または変調の程度を直接測定する必要はない。病的状態そのものに及ぼす下流の影響の代わりに、例えばアルツハイマー病を測定することができる。例えば、動物における行動影響、例えば運動、活力または活動状態の欠損、反射異常、環境の合図に対する記憶または応答の欠損の証拠があることは予測される。

10

【0147】

本発明のトランスジェニック動物を用いて、疾患随伴タンパク質凝集の防御に関する薬物の有効性を試験することができるという点で、研究者が、疾患、例えばアルツハイマー病の処置におけるかかる薬物の有効性を試験することを可能にすることに関して、動物は貴重な研究手段である。症状自体に及ぼすいずれかの影響は、アルツハイマー病様タンパク質凝集の阻害の結果であり、そして単に一般毒性の影響ではないということを確認するために、好ましい場合、全例で、例えば本発明の前記の態様にしたがって、トランスジェニック動物アッセイをインビトロまたは細胞基盤アッセイと平行して、またはそれに続いて行うことができる。

20

【0148】

したがって、前記で詳細に記載するように、本発明は、とりわけ、すべて本明細書で提供される核酸分子、ポリペプチドもしくはその誘導体、宿主細胞、トランスジェニック動物またはインビトロ膜局在モデル系の、アルツハイマー病様タンパク質凝集に及ぼす阻害または変調効果を有する被検物質をスクリーニングする方法における使用に関する。別の態様では、本発明は、前述の態様のスクリーニング法を用いて得られる阻害または変調化合物に及ぶ。

本発明の種々の別の態様および具体例は、本開示に鑑みて当業者に明白であろう。本発明の特定の態様および具体例は以下の図および実施例を参照して実例によってのみここで説明される。

30

【実施例1】

【0149】

膜結合タンパク質の生成 導入

通常、遊離のリボソームで翻訳されるタンパク質の mRNA を分泌タンパク質のシグナル配列 (SS) の封入により膜結合リボソームに標的化できる；3 非翻訳領域の特性もまた標的化の効率に影響する (Partridge, K. A. ら、Cytotechnology 30: 37~47(1999))。したがって通常可溶性であるタンパク質を小胞体の膜内に挿入できる。本発明者らは、この研究法を用いて、凝集を促進するのに必要とされるタウの局所濃度を生み出すタウの膜随伴形態を構築した。

40

【0150】

タウのこれらの膜随伴形態を安定して発現する細胞系は、組織学の基準、細胞抽出物からのタウタンパク質の不溶性形態の沈殿、およびイムノプロットングによるタンパク質分解性生成物の分析により、タウ凝集およびタンパク質分解性プロセッシングの証拠を示す。

【0151】

発現系の概観

膜随伴タウフラグメントの生成のために用いられる発現系を図9にまとめる。系は、ラットアルブミンのシグナル配列が、cDNAの5'末端で挿入されている場合、ウサギグロブリン mRNA が、膜結合リボソームで翻訳されるという観察に基づいている (Partridge, K. A. ら、前出)。グロブリンの発現に関して前記されたベクター (図9a) を修飾し

50

て、シグナル配列の下流のタウ配列のフラグメントを組み込んだが、同時にグロブリンの 3 非翻訳領域は維持した (図 9 b)。

【0152】

タウの三つのトランケーション変異体 (アミノ酸 296 ~ 390、190 ~ 441 および 190 ~ 390) を各々 S S タウ 296 ~ 390、S S タウ 190 ~ 441 および S S タウ 190 ~ 390 と称し、この系を用いて発現された。三つの変異体の構造は、全長タウおよび対照として用いた同等の溶解性のタウフラグメントと一緒に図 5 および 10 にまとめている。IPTG 誘導プロモーターの制御下で全長タウ配列をも発現する 3 T 6 細胞でタンパク質を構成的に発現させた。

【0153】

S S タウ構築物の構築

図 9 a で示され、Partridge ら、前出 (1999) により記載された p c K S S G G。A g e I 部位をグロブリン出発コドンで導入し、p c K S S G G A g e I を作製するための p c K S S G G での P C R 基盤の変異誘発。

正プライマー：5 - g c c t t t t c a c c g g t g c a t c t g t c c a - 3

逆プライマー：5 - t g g a c a g a t g c a c c g g t g a a a a g g c - 3

h t a u 40 c D N A (Goedert ら、Neurone 3: 519 ~ 526 (1989) 参照)

【0154】

p c K S S タウ 190 ~ 441

h t a u 40 のヌクレオチド 1128 (アミノ酸 186) で A g e I 部位を導入するための P C R 基盤の変異誘発。E c o R I で切断し (停止コドンを越えてタウ配列を切断する)、平滑末端化し、次いで A g e I を用い、p s K S S G G A g e I にライゲートし、B a m H I で切断し、平滑末端化し、次いで A g e I で p c K S S タウ 190 ~ 441 を作製するためのフラグメント。ライゲーションは、アミノ酸 186 ~ 189 間でタウ配列を破壊し、それでアミノ酸 190 が、タウ配列の出発点である。

正プライマー：5 - t c t g g t g a a c c g g t a a a a t a c g g g g - 3

逆プライマー：5 - c c c c g t a t t t t a c c g g a a c a c c a g a - 3

【0155】

p c K S S タウ 190 ~ 390

ヌクレオチド 1740 で B a m H I 部位および停止コドンを導入するための p c K S S タウ 190 ~ 441 における P C R 基盤の変異誘発 (タウ配列をアミノ酸 390 で終わらせる)。A g e I および B a m H I で切断し、同一部位で p c K S S G G A g e I にライゲートし、p c K S S タウ 190 ~ 390 を作製するためのフラグメント。

正プライマー：5 - c t t g t a c t c g a g c t a c g c c c c g t g g - 3

逆プライマー：5 - c g g g g c g t a g g a t a a g t a c a a g t c g - 3

【0156】

p c K S S タウ 296 ~ 390

p c K S S タウ 190 ~ 390 のヌクレオチド 1450 (アミノ酸 293) で A g e I 部位を導入するための p c K S S タウ 190 ~ 390 における P C R 基盤の変異誘発。A g e I および B a m H I で切断し、同一部位で p c K S S G G A g e I にライゲートし、p c K S S タウ 296 ~ 390 を作製するためのフラグメント。

正プライマー：5 - g g c t c a c c g g t t a a t a t c a a a c - 3

逆プライマー：5 - g t t t g a t a t t a a c c g g t g a g c c - 3

これらの構築物は、発現ベクター p c D N A 3 . 1 中にあり、これは G 4 1 8 抵抗性マーカーを含有する。T 4 0 誘導細胞系にトランスフェクトするために、ゼオシン抵抗性マーカーを含有する p c D N A 3 . 1 z e o ベクターにすべてをサブクローン化した。

【0157】

T 4 0 誘導構築物の構築

これは、p 3 S S ベクター (l a c I 遺伝子を構成的に発現し、そしてヒグロマイシンを用いて選択される) を p O P R S V I C A T (これは、L a c オペロンからのオペレ

10

20

30

40

50

ーター配列と共に強力なRSVプロモーターを含み、そしてネオマイシンで選択される)と共に用いるストラタジーン系を基盤にした。簡単には、二つのベクターを細胞、例えば3T3または3T6繊維芽細胞に組み込む。lacIによるオペロンの抑制は、IPTGの添加により緩和される。T40構築物を調製するために、製造者の指示書にしたがって、タウタンパク質フラグメントをpOPRSVICATベクター(これはNotI部位を含有する)にクローン化した。

【0158】

結果

コア凝集ドメインに対して指向する抗体、mAb7.51を用いる免疫蛍光標識により細胞を分析した(Novak, M. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 5837~5841(1991))。対照として、可溶性タウフラグメント186~441を発現する、安定してトランスフェクトされた3T3細胞を二つの異なる固定条件:(a)パラホルムアルデヒドまたは(b)グルタルアルデヒドおよびトリトンX-100で固定し、タウの反復ドメインに対して指向するmAb7.51で標識した。パラホルムアルデヒド固定の後、タウに関する標識は、細胞質中に拡散し(Schliwaら、PNAS USA 78: 1037~1041(1981))により以前に報告された)、一方、グルタルアルデヒドおよびトリトンX-100で固定された細胞は、微小管に沿ったタウの標識を示す。この標識パターンは、タウの可溶性フラグメントに典型的であるが;しかしながらタウ凝集の証拠は観察されていない。

【0159】

安定してトランスフェクトされ、膜標的化最小凝集ドメイン、SSタウ296~390を発現する3T6細胞を酪酸ナトリウム5mMと共に20時間インキュベートし、タンパク質発現を増加させ、パラホルムアルデヒドで固定した。これらは、細胞質の至る所で小胞体との会合に合致する網様のパターンでmAb7.51により標識される(データは示していない)。しかしながら、このタンパク質は、細胞の小部分で検出可能なレベルまで発現されるだけであり、そしてタンパク質の凝集はめったに見られない。

対照的に、SSタウ190~441またはSSタウ190~390で安定してトランスフェクトされ、それを発現する細胞の標識により大きな凝集が示され、そのいくつかは、直線状の外観を有する。これらの凝集は、しばしば核周囲の部分に密集し、そして時には繊維状の形態を有する(図11)。

【0160】

これらの凝集を発現する細胞の比率は、酪酸ナトリウムの添加により増加し、これは、タンパク質の発現レベルを増加させる(Gorman, C. M. ら、Nuc. Acids Res. 11: 7631~7648(1993); Kruh, J, Mol. Cell. Biochem. 42: 65~82(1982))が、凝集は、タンパク質を構成的に発現する細胞においても見出すことができる。

またSSタウ190~390で安定してトランスフェクトされ、それを発現する細胞をトリトンX-100 0.2%の存在下グルタルアルデヒドで固定した後、7.51で標識した。この固定プロトコルにより微小管結合タウタンパク質の可視化が可能になるが、タウの凝集もまた見られ、これは、それらがデタージェント抽出に安定である、すなわちその安定性自体が膜随伴に依存しないことを実証している(データは示していない)。

【0161】

これらの細胞系で発現されるタンパク質をmAb7.51を用いるイムノブロットティングにより分析し、そしてタウ誘導およびブチラート処置の影響を試験し、全長タウおよびタウの可溶性フラグメントを発現する細胞系と比較した。

mAb7.51を用いるイムノブロットティングにより分析したSSタウ190~441タンパク質は、~40Kの見かけのRMMを有し、~25Kで特徴的な分解生成物、および~30Kで余り優勢でない生成物を示す。タンパク質の発現レベルを酪酸ナトリウムでの処理により増加させることができ、これは、三つすべての生成物の量を増加させる(図16)。ブチラートは、~18および~14Kで二つの小さな生成物の出現をも時折誘導する(図17参照)。

【0162】

10

20

30

40

50

SS190~441の存在下での全長タウタンパク質の誘導は、30K、および25Kでの生成物の量を増加させるが、小さい生成物は、出現しない。

したがって、図16aを考慮して、ブチラートおよびIPTG誘導の影響を比較した場合、ブチラートは、構成的に発現された組み込まれた遺伝子生成物の生成を非特異的に増加させるように作用するようである(そのメカニズムは、十分には理解されていない)。これは、全長タウのみを特異的に誘導するIPTG誘導の対照として提供される。第1のパネルでは、ブチラートまたはIPTGでの処理の後の膜非標的化186~441フラグメントの発現に及ぼす影響を比較する。ブチラート(「B」)はより多くの186~441フラグメント、および非常に関連する推定トランケーション生成物を生成するが、IPTG(「I」)は生成しない。

10

【0163】

第3のパネルでは、前記したIPTG対照下誘導T40のみを単純に発現する細胞において同一条件を試験する。ここで、IPTG(「I」)のみがT40およびおよそ45kDの自然分解生成物のレベルを上昇させる。ブチラートは、効果を有さない。

【0164】

中央のパネルは、IPTG誘導プロモーターの下でSS190~441を構成的に、およびT40の双方を発現する細胞における双方の誘導法の影響を示す。誘導なしでは、低レベルのT40ならびにSS190~441に由来する特徴的な40kDおよび25kDのバンドが存在する。ブチラート(「B」)は、高レベルの40、30kDおよび25kDのバンドを誘導する。IPTG(「I」)によるT40の誘導は、40kDのバンドの構成的発現には影響せず、凝集依存性メカニズムにより40kDおよび25kD種双方を高レベルで生じる(図1参照)。したがって、低レベルのSS190~441が予め存在している場合、誘導されたT40は、40kD経路を介してプロセッシングされ、25kDのトランケーション生成物を生じる。

20

【0165】

図16bを考慮すると、mAb7.51でのイムノプロットングにより分析されたSS190~390タンパク質は見かけのRMMが30Kであり、そして~18Kで分解生成物を示し、これは、PHFの最小凝集ドメインの大きさにほぼ対応する。タンパク質の発現レベルおよびその特徴的な18kDの分解生成物は、実質的には酪酸ナトリウムでの処理により増加する。再度、同等の可溶性のタウフラグメントは、同一の方法で分解されず、そして18kDの分解生成物の生成を引き起こさない、すなわちSS190~390の存在下全長タウタンパク質の誘導により30Kタンパク質の量がわずかしか増加しないが、小さな生成物の出現は、増加しない(図16b)。

30

【0166】

双方の場合で、膜標的化タウフラグメントで認められる分解パターンは同等の可溶性タンパク質で認められるものとは異なっている。膜標的化タンパク質をPHFのコアドメインに等しい~12/14Kフラグメントに分解できる(図17(a)参照)。したがって膜随伴により誘導されるタウフラグメントの凝集により、PHFで見られるようにコアドメインに対するタンパク質分解安定性が付与される。

膜局在タウフラグメントの不在下で誘導される全長タウタンパク質は、いくらか~45Kのフラグメントへの分解を示すが、小さなフラグメントの生成は存在しない。全長タウがSS190~441と共に発現される場合に認められる、小さなタウフラグメントの生成の増強(図16a)は、SS190~441凝集との相互作用により誘導されるタウのプロセッシングを実証する。

40

【0167】

SS190~441を発現する細胞で生成された分解生成物を、凝集ドメインに対してNBおよびC-末端の双方であるエピトープに特異的な抗体を用いて分析した。この分析により、タンパク質ではN-およびC-末端の双方のトランケーションが起きることが示される(図17)。生成された最小のフラグメントは、PHFのコアドメインに対する抗体と反応するだけであり、類似の大きさである(~12~14K)。したがって、これらの

50

細胞におけるタウタンパク質は、コアフラグメントまでPHF様プロセッシングを行うようである。

【0168】

デタージェントトリトンX-100の存在下でさえ、SSタウタンパク質の双方をその分解生成物と共に細胞抽出物から沈殿でき、これは、タンパク質が膜に随伴されているというよりむしろタンパク質が凝集していることを示唆している(図18)。比較的遅い速度(12,000g)でのタンパク質沈殿の分画、および残留物は、少なくとも50SのS値を有する粒子として挙動するが、300Sでは沈殿せず、MW \sim 1-2 \times 10⁶の複合体への凝集と合致する。

【0169】

これらの結果は、事象の以下の経路を示している：最初に膜局在タンパク質により種まきされ、ERのサイトゾル表面で生じる凝集。タンパク質は、そのN-末端で切断され、シグナル配列が除去され、そして凝集を生じなかった場合、次いでこの形態がサイトゾル中の凝集物として、または微小管結合タンパク質として自由に現れる。本明細書で教示するタウ様タンパク質の膜標的化は、例えば誘導プロモーターの制御下で生成される全長タウの捕捉を促進する。次いで、全長タウの誘導の後の25kD単位の生成により示されるように、更に全長タウを同一のタンパク質分解性プロセッシング経路に導く(図1)。

【0170】

結論

膜局在タンパク質としてタウフラグメントを発現することにより、可溶性タンパク質を用いることが見出されている細胞における凝集に対するバリアが打破される。例えばSSタウ190~390フラグメントは12~14kフラグメントを含む短いフラグメントに効果的にプロセッシングされ、これはPHFのコアで見出されるものに類似している。

【0171】

したがって本発明者らは、シグナル配列を用いてタウの膜局在形態を作製することができ、このように膜局在タンパク質として発現されたタウフラグメントが凝集を形成し、そしてこれらのタウ凝集が、その大きさおよび7.51エピトープの存在の双方に関してPHFのものに匹敵するタンパク質分解安定性コアを有することを見出した。本発明者らは、またプロセッシングされたフラグメントの出現が全長タウタンパク質の誘導の後に増加することを確認し、可溶性タウが凝集に捕捉されることを解明した。

したがって、タウ凝集およびプロセッシングは、細胞において達成され、そして凝集を阻害または変調する化合物に関して試験するアッセイにおいて凝集を分析することができる。

【実施例2】

【0172】

インヒビターをスクリーニングする

IPTG制御下、SSタウ190~441フラグメントおよび誘導T40を発現する細胞を6ウェル皿にプレートした。プレートした1日後、試験薬物を指示された濃度で、そして9時間後に添加し、IPTGを5mMで添加した。IPTG添加の15時間後に細胞をPBSで洗浄し、次いでゲルバッファー中で可溶化した。SDS-PAGEによりサンプルを分離し、抗体7.51を用いてイムノプロットを行った。これらの細胞におけるT40誘導により分解生成物の増加が導かれる(図1および図16cに示す)。試験薬物のこの増加に及ぼす影響をイムノプロットの数量化により分析した。

【0173】

図2は、チオニン、クロロプロマジンおよびタクリンの阻害活性が膜標的化細胞モデルでどのように比較されたかを示している。活性および不活性化化合物間には明確な差異がある。標準的な阻害モデルを用いてデータをより詳細に数学的に分析した(図3)。

モデルが生じた値は、タウがリン酸化されたインビボ系で予測されたものに合致し、その結合親和性は、結果的に低下し、そしてタウ凝集インヒビターの見かけの阻害強度は、同時に増加した。

【0174】

10

20

30

40

50

これは、神経病的疾患において誘導された立体配座重合化を行うタンパク質の凝集現象のインヒビターに関するスクリーニングにおける本発明の有用性を実証している。とりわけ、凝集インヒビターにより凝集を修飾でき、そしてその活性を特徴的な分解生成物の生成によりモニター観察することができる。

【実施例 3】

【0175】

トランスジェニック動物の調製および使用

トランスジェニック動物を以下のように調製した。

動物：

多くの受精卵母細胞を得るために、4週齢のNMRIマウスをゴナドトロピンで処理して過剰排卵を誘導する。妊娠した雌ウマの血清(PMS)を卵胞刺激ホルモン(FSH)を擬似するために用い、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)を黄体形成ホルモン(LH)を擬似するために用いる。PMSを交配の2日前に腹腔内投与し、46時間後にhCGを投与する。hCGの投与の後、雌マウスを種付け用雄と交配させる。同じ日に10週齢のNMRIマウスを精管切除した雄と交配させ、注射された卵母細胞の再移植のための養母を得る。翌朝、膈栓を有するマウスから受精した卵母細胞を収集する。

10

【0176】

卵母細胞の収集：

頸部脱臼によりマウスを屠殺し、そして卵管を切開した。新たに排卵された卵母細胞が卵丘細胞により取り囲まれて、卵管の上部のパン(膨大部)で見出される。同時に一つの卵管をM2培地およびヒアルロニダーゼの入ったペトリ皿に移す。一对の時計修理用ピンセットを用いて卵母細胞を卵管から取り出す。ヒアルロニダーゼは、卵を卵丘細胞から分離する。次いで、二つの連続した清浄工程でM2培地により、卵母細胞をいずれかその他の細胞および材料から分離する。必要とされる時まで卵母細胞をCO₂ 5%インキュベーター内のM16培地中に37℃で保存する。

20

収集した卵母細胞が初期前核段階にある場合、そこで雄性および雌性前核を分離し、細胞質から区別できる。

【0177】

マイクロインジェクションのためのDNA構築物の調製(図6参照)：

構築物は、導入遺伝子の脳での発現を指示するThyIプロモーターの制御下の適当なcDNAを含有する。プラスミドを宿主細菌から抽出し、キアゲン・プラスミド・精製キット(キアゲン(ヒルデン、ドイツ)より販売)により精製した。適当なエンドヌクレアーゼ(NotI)により構築物を直線状にした。キアゲン(商標)ゲル抽出キット(キアゲン(ヒルデン、ドイツ)より販売)を用いて望ましいフラグメントをアガロースゲルから単離した。構築物をマイクロインジェクションバッファー中2μl/μlに希釈した。

30

【0178】

マイクロインジェクション：

倒立顕微鏡のステージの各々の側に一つのマイクロマニピュレーターをマウントし；一つのマイクロマニピュレーターは、ホールディング・ピペットを制御し、他方は、インジェクション・ピペットを制御する。卵をパラフィンオイルで被覆したM2培地を伴うデプレッション・スライド・インジェクション・チャンバーに配置する。一つの卵をホールディング・ピペットに置き、雄性前核をDNA溶液を含有するインジェクション・ピペットで注入する。注射後、卵母細胞を再度CO₂ 5%インキュベーター内でM16培地中37℃で再移入するまで培養する。

40

【0179】

再移入：

偽妊娠のマウスを麻酔し、無傷の注入された卵母細胞をマウスの卵管に再移入させる(10~15個の卵母細胞を一つの卵管に)。これらの養母は出産まで移植された胚を担持した。

トランスジェニックマウスの同定：

50

トランスジェニックマウスを同定するために二つの異なる研究方法を用いた。

【0180】

PCR:

導入遺伝子特異的プライマーを用いてPCRでトランスジェニックマウスを検出した。

Thy 1F2: g C A g g A g g T g C T C A g g g A C A g c

TautxR: C A C T g C C g C C T C C C g g g A C g T g

このプライマーの組み合わせによりThy I - s s t a u 2 9 6 ~ 3 9 0 導入遺伝子を担持するマウスにおいてのみ415bpのPCRフラグメント、およびThy I - s s t a u 1 8 6 ~ 4 4 1 導入遺伝子を担持するマウスにおいてのみ711bpのPCRフラグメントを生じる。

DNeasy (商標) 組織キット (キアゲン (ヒルデン、ドイツ)) を用いて0.5cmのマウスの尾からゲノムDNAを調製した。

【0181】

サザンプロット:

PCR陽性被験動物の10μgゲノムDNAをEcoRIで消化し、そしてアガロースゲル1%上で電気泳動に供した。サザンプロットを準備し、プロモーターからの2つの³²P標識フラグメントでハイブリダイズした。これは、XbaIおよびNcoIでの消化により得られた。内因性シグナルを導入遺伝子シグナルと比較してコピー数を推測できる。組み込みの様式を試験するためにゲノムDNAをXbaIで消化した。創始動物1およびF1動物は、単一の組み込みを示した。創始動物86およびF1動物は二重の組み込みを示し、そして二つの独立した系統に分けられた。

プロットを65で20時間ハイブリダイズし、65で2回、1時間洗浄した。

【0182】

RNA発現:

RNA発現を研究するために、ノーザンプロット分析を行った。Trizol (商標) (ギブコ BRL、ベイズレイ、スコットランド) を用いて脳全体からRNAを調製した。

RNA 20μgを電気泳動に供し、そしてプロッティングした。247bp PCRフラグメントに対してハイブリダイゼーションを実施した。プライマーは、導入遺伝子特異的であった: g l o b 5 7 8 ~ 5 9 7 (A A g A A C A A T C A A g g g T C C C C)、o l i g o 2 0 (A T T A g g C A A C A T C C A T C A T A A A C C)。プロットを65で20時間ハイブリダイズし、65で2回、1時間洗浄した。

【0183】

図12~15は、マウスモデルで得られた結果を示し、そして図1(E)で示すものに対応すると考えられる経路を介して内因性マウス脳タウの凝集依存的タンパク質分解性プロセッシングにより、どのように18kD種を生じるかを記載する。

【図面の簡単な説明】

【0184】

【図1a】図 図1は、実施例1(細胞基盤)および実施例3(動物モデル)に記載の本発明によるアッセイの概略図を示す。(A)(1:)膜標的化配列、この場合シグナル配列+トランケートされたタウ(SSタウ190~441)単独の構成発現に基づくアッセイ。膜随伴分子が組み合わさって25kDフラグメントの形成に至る。図17(a)で示すように、25kDフラグメントが反復ドメインおよびC末端に伴う免疫反応性を含有するが、208~238残基間に位置するエピトープは含有しない。フラグメントの長さは、~175残基であり、適当なN末端切断部位は、~266残基であり、位相変化したN末端の最初の反復は、PHFコアから単離されたタウタンパク質で見出される。(A)(2:)第2のタンパク質(T40-全長タウ)に基づくアッセイで、そのタンパク質分解性切断は、シグナル配列により小胞体に標的化されたSSタウ190~441の低いバックグラウンドレベルの存在により「種まき」される。IPTGにより誘導されたT40は、膜でまたはSSタウ190~441誘導凝集のサイトゾルへの放出後のいずれかで、S

10

20

30

40

50

S タウ 190 ~ 441 種に結合する。この捕捉された T 40 は、ここで更に最初にプロセシングされ、S S タウ 190 ~ 441 誘導種と同等のゲル移動度および免疫反応性を有する種のレベルまで上昇する。次いで更に同一経路でプロセシングされ、25 k D の分解生成物のレベル増加を生じる。タウ凝集インヒビターは、I P T G 存在下で 25 k D フラグメントの T 40 誘導による生成を遮断する。

【図 1 b】図 1 は、実施例 1 (細胞基盤) および実施例 3 (動物モデル) に記載の本発明によるアッセイの概略図を示す。(B) S S タウ 190 ~ 441 の第 2 の切断パターンに基づくアッセイ。この場合、膜随伴分子はわずかに異なる様式で反復領域を介して組み合わされ、ゲル移動度 30 k D (~ 200 残基)、18 k D (~ 125 残基) および 12 / 14 k D (~ 95 残基) を有する更にトランケートされた三つの生成物を生じる。

【図 1 c】図 1 は、実施例 1 (細胞基盤) および実施例 3 (動物モデル) に記載の本発明によるアッセイの概略図を示す。(C) S S タウ 190 ~ 390 の構成発現および凝集に基づくアッセイ。この場合、タンパク質分解性プロセシングにより 18 k D (~ 125 残基) のゲル移動度を有する単一の優勢な種を生じる。これは、反復ドメインを介する S S タウ 190 ~ 390 分子の凝集により生じ、反復ドメインからすべて誘導されるタンパク質分解的に保護されたフラグメントが得られる (すなわち ~ 266 - ~ 390)。図 17 (b) で説明される反復ドメイン結合パターンの変種では、わずかに異なる 18 k D 種が、T 40 の低いバックグラウンドレベルを有する S S タウ 190 - 390 の随伴により生じ、4 反復に等しい長さのフラグメントを得ることができるが、分子の C 末端テール内で 390 を越える 1 反復との等価物により伸長する (すなわち ~ 295 - ~ 422)。図 16 d で説明される異なるスキームでは、三個の反復のみから成る少量のフラグメント (すなわち ~ 95 残基) が、~ 19 / 22 k D に対応する非定型のゲル移動度を有する少数の二量体形態を形成できる。

【図 1 d】図 1 は、実施例 1 (細胞基盤) および実施例 3 (動物モデル) に記載の本発明によるアッセイの概略図を示す。(D) T 40 バックグラウンドの存在下での S S タウ 296 ~ 390 の構成的発現に基づくアッセイ。この場合、二つの優勢な種が形成され、一つは、S S タウ 296 ~ 390 フラグメントそのものに対応する 12 / 14 k D であり、別の種は、18 k D のゲル移動度を有する。後者は S S タウ 296 ~ 390 の分解生成物ではあり得ない。24 k D に相当する優勢なゲル移動度を有する二量体の主要な形態 (図 16 d 参照) である可能性もない。したがって、S S タウ 296 ~ 390 凝集により捕捉されている T 40 のトランケーションにより 18 k D を生じる可能性が最も高い。この種は、また 4 反復の等価物に対応し (すなわち ~ 125 残基)、示すように、T 40 および S S タウ 296 ~ 390 凝集間の可能な二つの結合相互作用により生じ得る。このモデルでは、T 40 からの 18 k D 種の形成の律速段階は、系内の凝集する、トランケートされたタウの量により決定され得る。

【図 1 e】図 1 は、実施例 1 (細胞基盤) および実施例 3 (動物モデル) に記載の本発明によるアッセイの概略図を示す。(E) トランスジェニックマウスの脳内の S S タウ 296 ~ 390 の構成発現に基づくアッセイ。(D) に記載の系でのように、優勢な生成物は、S S タウ 296 ~ 390 そのものではなく、より高分子量の 18 k D の種である。前記で論じた理由のために、動物に遺伝子組換えにより導入された S S タウ 296 ~ 390 の種の二量体または分解生成物である可能性はない。むしろ、捕捉および内因性のマウスのタウのタンパク質分解性プロセシングにより生じる可能性が最も高い。この場合、マウスの脳は、3 反復アイソフォームのみを発現することが解っている。この場合に生じた 18 k D フラグメントは、4 反復の長さに等しい種が得られる C 末端伸長を伴う形態である可能性が最も高い (~ 125 残基、または 3 反復アイソフォームの ~ 266 および ~ 422 残基の間のフラグメント)。しかしながら、わずかに異なる結合パターンもまた可能であり、ここで伸長は、N 末端においてである (すなわち 3 反復アイソフォームの ~ 235 および ~ 390 残基の間のフラグメント)。

【図 2】図 2。チオニン、クロルプロマジンおよびタクリンの阻害活性を膜標的化された細胞モデルで比較した (25 k D 種の生成)。活性および不活性化化合物間に明らかな区別

10

20

30

40

50

が存在する（実施例 2 参照）。

【図 3】図 3。図 2 からのデータを標準的な阻害モデルを用いて更に詳細に数学的に分析し、そして数値的処理（ガウス - ニュートン法）して K I を解いた。細胞内のタウ - タウ結合の K d 値を ~ 500 nM、および対応する K I 値を ~ 33 nM と仮定することにより、データは、非常に近似する。これらの値の有意性は、インビトロのタウ - タウ結合に及ぼすリン酸化の影響について公知であることと比較することにより理解できる（Wischnik, C. M. ら、前出(1997)参照）。

【図 4 a】図 4 (a) は、対化されたらせん状フィラメントの構造（上図）およびアルツハイマー病の進行中の神経原繊維濃縮体の免疫化学（下図）を示す。

【図 4 b】図 4 (b) は、種々モノクローナル抗体の結合部位の、異なる形態の N - および C - トランケートされたタウへの結合部位の概略図を示す。 10

【図 5 a】図 5 (a) は、ヌクレオチドおよびヒトタウタンパク質アイソフォームの予測されるアミノ酸配列を示す。配列は c D N A クローン h t a u 4 0 から誘導された。

【図 5 b】図 5 (b) は、本発明のいくつかの構築物の配列を示す。

【図 6 a】図 6 (a) は、トランスジェニックマウスを準備するためのマイクロインジェクションで使用した構築物を示す。(i) T h y 1 - s s タウ 2 9 6 ~ 3 9 0 および (i i) T h y 1 - s s タウ 1 8 6 ~ 4 4 1 がある。

【図 6 b】図 6 (b) は、より詳細な T h y 1 - s s タウ 2 9 6 ~ 3 9 0 構築物を示す。これは、T h y - 1 発現ベクターにクローン化され、次いで「マウス胚の操作」、a l a b o r a t o r y m a n u a l 第 2 版、コールド・スプリング・ハーバー・プレス、C S H、ニューヨーク、Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F., Lacy, E. 編(1994)からの方法を用いて、N M R I マウスの受精卵母細胞にマイクロインジェクションを行った。 20

【図 7】図 7 はタウ、M A P 2 (成熟型)、M A P 2 C (幼若型) および高分子量タウ (P N S および神経芽腫細胞系で見出される) の概略図を示す。これらのタンパク質は、類似の微小管結合ドメインを共有するが、実質的には、配列および N - 末端突出ドメインまでの伸びで異なっている。タウおよび M A P 2 の幼若型は、タンデム配列を三個だけ有している。4 反復型の M A P 2 も存在する。

【図 8】図 8 は、ヒトタウ (上列) およびヒト M A P 2 (下列) のタンデム反復領域における配列差異を示す。縦の矢印は、G l u - 3 9 1 で終わるトランケートされた P H F コアフラグメントの限界を示しており、チューブリン結合セグメントは、下線で示す。 30

【図 9】図 9 は、本発明の一つの具体例による構築物を示す。(a) は、ラットアルブミンのシグナル配列を、ウサギグロブリンをコードする c D N A の出発コドンの前に挿入してグロブリン m R N A の膜標的化を達成した。図 9 (b) は、アミノ酸 1 9 0 ~ 4 4 1 をコードするヒトタウ c D N A のフラグメントが挿入されてグロブリン配列の一部を置換し、N - 末端シグナル配列を有するタウフラグメントを発現したことを示す。グロブリン 5 および 3 非翻訳領域は、構築物中で保持された。

【図 1 0】図 1 0 は、宿主細胞において発現される本発明のタウフラグメントの概要を示す。タウの三つのフラグメントは、すべてコア凝集ドメインを含有し、N 末端シグナル配列を伴って発現された。比較のために、全長タウと同様に二つのフラグメントの可溶性形態をも発現させた。 40

【図 1 1】図 1 1 は、3 T 6 細胞の安定したトランスフェクションの後の S S タウ 1 9 0 ~ 3 9 0 の局在化を示す。N - 末端シグナル配列に連結されたヒトタウの最長のアイソフォームのアミノ酸 1 9 0 ~ 3 9 0 をコードする c D N A でトランスフェクトした後に安定したクローンとして単離された 3 T 6 細胞を、5 m M 酪酸ナトリウムと共に 2 0 時間インキュベートしてタンパク質発現を増加させ、パラホルムアルデヒドで固定し、タウの反復ドメインに対し m A b 7 . 5 1 で標識した。これらの細胞は、S S タウ 1 9 0 ~ 4 4 1 を発現する細胞に類似の形態学を示すが、S S タウ 1 9 0 ~ 3 9 0 での安定したトランスフェクションの後に単離された細胞は、一貫して、大きなタウ凝集を示す比率がより高い、タウフラグメントの高レベル発現を示した（実施例 1 参照）。

【図 1 2】図 1 2 は、野生型 (「W t」) およびトランスジェニックマウス 1 系列 (「1 50

」) RNAの特異的プローブを用いるノーザンブロット分析を示し、トランスジェニックマウス1系列でのトランスジェニックRNAの高レベル発現が示された。S26対照は、同一の負荷量を示す(実施例3参照)。

【図13】図13は、mAb7.51を用いる免疫沈降によるSSタウ290~391の精製を示す。マウス脳0.1gを溶解バッファー(150mM NaCl、0.01% SDS、0.1% NP40、50mM トリス、100µg/ml PMSF、1mM DTT、1µg/ml ロイペプチン)500µlを用いて均質化した。次いで懸濁液を氷上で1分間超音波処理し、ベンチトップ(エッペンドルフ)遠心で14000rpmで4分間遠心した。これにより「S1」上澄分画が導かれる。第1の免疫沈降をmAb342を用いて行い、内因性マウスタウの調製物を枯渇させた。S1分画を抗体342の1/10容量(1:10)と共にインキュベートし、振盪しながら4で2時間インキュベートし、次いでプロテインAセファロースビーズ(溶解バッファー中10容量/容量%)100µlを加え、4で1時間インキュベートし、ベンチトップ遠心で、14000rpmで1時間遠心した。mAb7.51を用いる別の免疫沈降のために上澄を採取した。1/10容量/容量% mAb7.51を加え、振盪しながら4で2時間インキュベートした。プロテインAセファロースビーズ40µlを加え、4で1時間インキュベートし、14000rpmで15秒間遠心し、前記した溶解バッファーで3回洗浄した。次いでラエムリサンプルバッファー30µlを加え、85で5分間加熱し、30秒間遠心した。次いで上澄を15% SDS-Pageゲルに負荷した。IP751レーンは、1系列からのトランスジェニック動物におけるSSタウ290~391タンパク質生成物の存在に対応する~12~14kDでの差異を示している。高分子量での暗い背景は、免疫ブロットの展開の過程で検出された内因性マウス免疫グロブリンの存在による(実施例3参照)。

【図14】図14は、免疫沈降を行わずに、前記で指示した溶解バッファー中に調製したS1分画を示す。mAb7.51を用いる免疫プロットングにより、導入遺伝子に対応する~12~14kDに加えて、~18kDのゲル移動度を有する新規なより優勢な種が示された。これは、1系列の全個体で15か月までの動物の年齢にしたがって異なった程度で認められた。各々5か月、4か月および4か月の月齢の三つを示している。エピトープマッピング(示していない)は、18kDの種が、mAb7.51(反復ドメインにおけるエピトープ)およびポリクローナル抗血清K9JA(「DAKO A/S」、またタウの反復ドメインに位置するエピトープをも認識する)により認識されることを実証した。18kD種は、208~238残基間に位置するエピトープを認識するC-末端ポリクローナル抗血清T46.1またはmAb342により認識されなかった。18kD種は、導入遺伝子生成の生成物の分解として生じることができず、SSタウ296~390の二量体としても生じることができない。したがって18kD種は、図1に示す内因性マウス脳タウの凝集依存的なタンパク質分解性プロセッシングにより生じる可能性がある。

【図15】図15は、2次元ゲル電気泳動(2DE)、銀染色および免疫プロットングを示す。マウス脳500mgを溶解バッファー(前記参照)2ml中で均質化し、氷上で超音波処理し、14000rpmで遠心した。S1分画を採取し、95で5分間沸騰し、14000rpmで5分間遠心し、上澄を取り、そしてセントリコン3000を用いて10倍に濃縮した。この20% タンパク質懸濁液を2-DEゲルに負荷した。第1の次元は、等電点電気泳動であり、第2の次元は、15% SDS-PAGEである。ゲルを銀染色し、平行してゲルを同一条件下で作動させ、そしてプロットングし、次いで7.51抗体(前記参照)と共にインキュベートした。黒色の矢印は、12~14kD遺伝子生成物を示し、そして二重線は、18kDの種に相当する。加えて、これもまた野生型からトランスジェニック動物を区別するゲル移動度の低い、未だ特性化されていないスメアが在る。このスメアは、これもまた内因性のマウスタウに由来するいくつかの高分子量タウ生成物を含有する可能性がある。用いた調製用プロトコルに依存して、その他の単離された高分子量タウ免疫反応性スポットもまた変動的に観察される(実施例3参照)。

【図16a】図16は、実施例1の種々細胞系で得られた結果を示す。図16(a)は

、免疫プロットニングによる、タウフラグメントを発現する細胞の分析を示す。タウフラグメントを安定して発現し、そしてIPTG誘導プロモーターの制御下全長タウをも発現する細胞を、5 mM IPTGまたは5 mM 酪酸ナトリウムと共に24時間インキュベートした後、15% SDSゲル上で分析し、続いてタウの反復ドメインのエピトープに結合するmAb7.51で免疫プロットニングした。SSタウ190~441タンパク質は、ゲル上で~40Kの見かけのRMMを有し、そしてそれは、~25Kのフラグメントに分解される。対照的に、可溶性タウ186~441フラグメントおよび可溶性T40は異なる分解プロファイルを示す。SSタウ190~441を発現する細胞における全長タウ(I)の誘導により40K、25Kタンパク質、および、ことによると少量の30Kフラグメントの出現の増加が引き起こされる。酪酸ナトリウムの添加によりトランスフェクトされたタンパク質の発現が、増加し、(B)は、また双方のフラグメントの量をも増加させ、そして30Kフラグメントの出現を誘導する。

10

【図16b】図16は、実施例1の種々細胞系で得られた結果を示す。図16(b)。SSタウ190~390タンパク質は、~30Kの見かけのRMMを有し、これは、~18Kで少量の分解生成物を伴う。全長タウの誘導により30Kタンパク質の量がわずかに上昇する。ブチラート処理により30Kフラグメントの量が大きく増加し、そして18kDaのフラグメントの量も増加する。この分解パターンは、可溶性186~391フラグメントまたは全長T40では認められない。

【図16c】図16は、実施例1の種々細胞系で得られた結果を示す。図16(c)は、イムノプロットニングによるタウフラグメントを発現する細胞の分析を示す。IPTG誘導プロモーターの制御下で安定してタウフラグメントSSタウ296~390を発現し、そして全長タウをも発現する細胞を5 mM IPTG(「I」)または5 mM 酪酸ナトリウム(「B」)と共に24時間インキュベートした後、15% SDSゲルで分析し、続いてタウの反復ドメインのエピトープに結合するmAb7.51でイムノプロットニングを行った。未標識レーンは、18kDに対応するゲル移動度を伴う小さなバンドのみを示す。「B」と称したレーンは、18kDに対応する移動度を有する優勢なゲルバンドおよび14kDに対応する小さなバンドを示す。「I」と称したレーンは、18kDに対応するゲル移動度を有する小さなバンドを示す。この細胞系における18kDバンドの誘導を図1(d)にて説明する。タウフラグメントSSタウ296~390は、~14kDのゲル移動度を有するので、18kD種は、導入されたタウフラグメントの分解生成物として現れることができず、例えば図16(d)で認められる24kD二量体の形成の証拠もない。

20

30

【図16d】図16は、実施例1の種々細胞系で得られた結果を示す。図16(d)は、インビトロ凝集で細菌により発現されたタウdGAEフラグメント(残基297~391)が、その主要な形態が、~24kDのゲル移動度を有している一連の高いオーダーのオリゴマーをどのように自発的に形成するのかを示す。~19/22kDのゲル移動度を有する、二量体が部分的に分解されている可能性が最も高い、少量の不定型オリゴマーが存在する。

【図16e】図16は、実施例1の種々細胞系で得られた結果を示す。図16(e)の左側のパネルは、(a)で示された効果の複写であり、ここでIPTGは、比較のために25K、30Kおよび40Kタンパク質のレベル増加を生じている。同一の実験を25Kタンパク質のチオニン遮断生成物の存在下で実施し、これもまた30Kタンパク質の生成を低減した。しかしながらチオニンは、ブチラートで認められる25Kおよび30Kバンドの検出レベルを低下させない。したがってチオニンは、25Kバンドを生じる全長タウの捕捉およびプロセッシングを遮断することが示される。

40

【図17a】図17(a)は、SSタウ190~441のタンパク質分解性プロセッシングを示す。SSタウ190~441を発現し、そしてIPTGでの処理により全長タウの発現が誘導される細胞(右側レーン)を、タウの長さに沿って位置するエピトープを認識する四つの抗体で分析した。ゲルは、タウの反復ドメインを認識するmAb7.51を用いた分析を示し、これによりコア凝集ドメインを含有するすべてのタウフラグメントが表さ

50

れる。残りのカラムは、mAb7.51陽性フラグメントとその他の三つの抗体との反応性の概要を示す。その結果もまた、全長タウおよびSSタウ190~441のプロセッシングにより生成されたフラグメントの概略図において示される。全長タウのみが、四つすべての抗体により認識される。SSタウ190~441よりもわずかに大きいフラグメントは、全長タウのN-末端トランシェーションにより生成される。SSタウ190~441よりも小さな二つのフラグメントは、N-末端またはC-末端プロセッシングのいずれかにより生成される。二つの最も小さなフラグメントは、コアドメインに対する抗体とのみ反応し、これは、このドメインのタンパク質分解安定性を実証している。

【図17b】図17(b)は、SSタウ190~390のタンパク質分解性プロセッシングを示す。SSタウ190~390を発現し、そして酪酸ナトリウムで処理された細胞(右側レーン)は、SSタウ190~390および~18kDaの単一のタンパク質分解性生成物を生成する、表および右側の図で示されるように、18kD種は、mAb7.51とのみ免疫反応性である。図1の記載で示す理由で、考えられるフラグメントの境界を右側に示す。

10

【図18】図18は、細胞抽出物からのタウ凝集物の沈殿を示す。(a)SSタウ190~441または(b)SSタウ190~390を発現し、そして全長タウを発現するように誘導された細胞を均質化し、そして720gで3分間遠心し、核後上澄(pns)を生成した。pnsを12,000gで2分間遠心し、膜および大きな凝集物を沈殿させ、そしてこの遠心からの上澄を200,000gで22分間遠心した。0.1%トリトンX-100で処理し、膜タンパク質を可溶化したpnsで同一の分析を実施した。デタージェントを伴わないまたは伴う12K上澄の比較(レーン3、7)は、デタージェント抽出後の上澄により多くのタンパク質が存在することを示している。双方の場合で、ペレットに有意な量のタンパク質も現れる(レーン4、8)。12K上澄の200Kgでの遠心により残りのタンパク質が沈殿する(レーン6、10)。

20

【図19a】図19(a)は、重要な核形成因子がタウ捕捉を開始し、次いで自己触媒性になる「種」を提供する概念図を示す。

【図19b】図19(b)は、アルツハイマー病の推定される病原モデルを示す。タウ凝集は、軸索輸送の失敗およびその結果であるニューロン死の前に、タウ凝集が最も近い過程である。タウ凝集カスケードは、タウ遺伝子の上流変化から、または1次変異から生じる種まき/核形成事象のいずれかにより誘発される。

30

【図20】図20は、タンパク質凝集の疾患において役割を果たすタンパク質を列挙する表を示す。疾患それ自体、関与すると考えられる凝集ドメインおよび/または変異、および推定(最大)フィブリルサブユニットの大きさをも列挙している。各タンパク質に関する一つまたはそれ以上の文献参照を提示する。

【図21】図21。酸可溶性PHF-タウの除去後のPHFコア調製物中のタンパク質の配列分析。Stahlら(Biochemistry 29: 8879~8884(1990))のスクラピー・フィブリルプロトコールにしたがって残留物を可溶化した。単一のADの脳からの典型的な調製物に関して収量を示す。見かけのゲル移動度のバンドにおけるPHFコアタウタンパク質と同時精製されると見なされるタンパク質フラグメントおよび対応する残基をkDで示す。SDS-または電気泳動抵抗性複合体の形態で同時精製されるタウ以外のタンパク質は:ユビキチン、ポリンおよびミトコンドリア複合体IIIのコアタンパク質-2(「core-2」)である。ATPシンターゼサブユニット9(「ATP-9」)はプラークのAプロテインと同時精製される形態で見出された。ポリン配列もまた34kD種のAsp-N*およびCNR**消化物から同定された。

40

【表1】

References

Arendt *et al.* (1995) *Neuroscience* 69, 691-698.

Braak *et al.* (1994) *Neuroscience letters* 171, 1-4.

Brion *et al.* (1999) *American Journal of Pathology* 154, 255-270.

10

Cork *et al.* (1988) *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 49, 629-641.

Duff *et al.* (2000) *Neurobiology of Disease* 7, 87-98.

Geula *et al.* (1998) *Nature Medicine* 4, 827-834.

Gotz *et al.* (1995) *EMBO Journal* 14, 1304-1313.

20

Harada *et al.* (1994) *Nature* 369, 488-491.

Ikegami *et al.* (2000) *Neuroscience letters* 279, 129-132.

Ishihara *et al.* (1999) *Neuron* 24, 751-762.

Janus *et al.* (2000) *Biochimica et Biophysica Acta* 1502, 63-75.

30

lewis *et al.* (2000) *Nature Genetics* 25, 402-405.

Nelson *et al.* (1995) *Neurobiology of Aging* 16, 315-323.

Roertgen *et al.* *Neurobiology of Aging* 17, 243-247.

Schultz *et al.* (2000) *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 59, 39-52.

40

Spittaels *et al.* (1999) *American Journal of Pathology* 155 2153-2165.

Sturchler-Pierrat et al. (1997) Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 93, 13287-13292.

Thuncke et al. (2000) unpublished.

Additional References

- Abrahamson, M., Jonsdottir, S., Olafsson, I. & Grubb, A. (1992) 10
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.
- 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 20
fibrillogenesis. *Nature* 385, 787-793.
- 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. 30
- Czech, C., Tremp, G. & Pradier, L. (2000) Presenilins and
Alzheimer's disease: 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.,
Lachawan, F., Krasnewich, D., Muenke, M., Lawrence, D.A., Yerby,
M.S., Shaw, C.-M., Gooptu, B., Elliott, P.R., Finch, J.T., Carrell, 40
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 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 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. 10

Glenner, G.G. & Wong, C.W. (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterisation of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 120, 885-890. 20

Goate, A., Chartier-Harlin, M.-C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L., 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 disease. *Nature* 349, 704-706. 30

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., Engström, U. & Westermark, P. (1991) Normal transthyretin and synthetic transthyretin fragments form amyloid-like fibrils in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 175, 1159-1164. 40

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 α 1-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, 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., 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 α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276, 2045-2047.

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.,

10

20

30

40

Hung, W.Y., Kato, T. & Asayama, K. (1996) Intense superoxide dismutase-1 immunoreactivity in intracytoplasmic hyaline inclusions of familial amyotrophic lateral sclerosis with posterior column involvement. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 55, 481-490.

Sletten, K., Westermark, P. & Natvig, J.B. (1976) Characterization of amyloid fibril proteins from medullary carcinoma of the thyroid. *Journal of Experimental Medicine* 143, 993-998. 10

Spillantini, M.G., Crowther, R.A., Jakes, R., Hasegawa, M. & Goedert, M. (1998) α -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 amyloidosis with a novel variant fibrinogen. *Journal of Clinical Investigation* 93, 731-736. 20

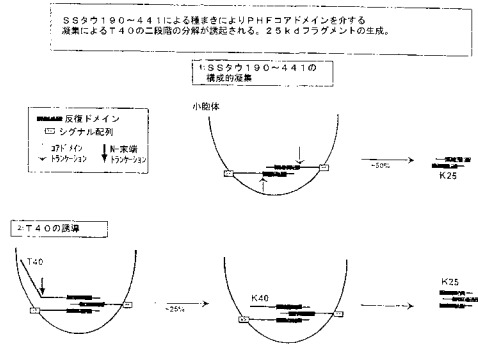
Westermark, P., Engstrom, U., Johnson, K.H., Westermark, G.T. & Betsholtz, C. (1990) Islet amyloid polypeptide: pinpointing amino acid residues linked to amyloid fibril formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 87, 5036-5040.

Westermark, P., Johnson, K.H., O'Brien, T.D. & Betsholtz, C. (1992) Islet amyloid polypeptide - a novel controversy in diabetes research. *Diabetologia* 35, 297-303. 30

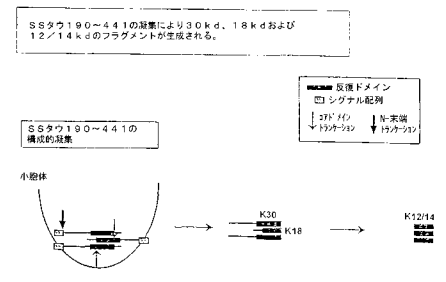
Westermark, P., Johnson, K.H. & Pitkanen, P. (1985) Systemic amyloidosis: A review with emphasis on pathogenesis. *Applied Physiology* 3, 55-68.

Wischik, C.M., Novak, M., Thøgersen, 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 disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 85, 4506-4510. 40

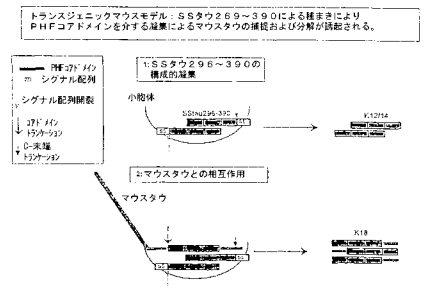
【 図 1 a 】



【 図 1 b 】

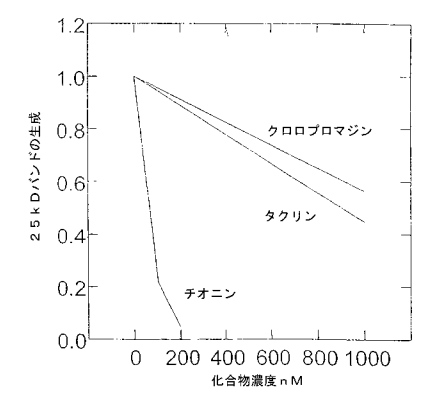


【 図 1 e 】

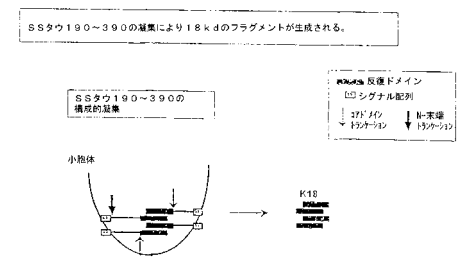


【 図 2 】

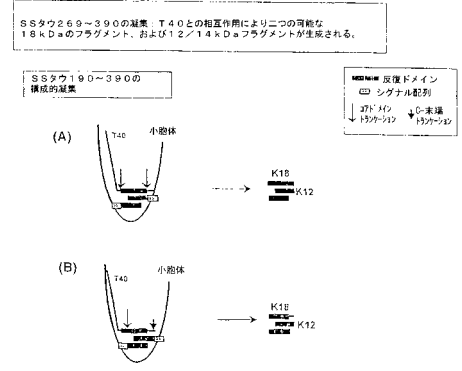
↑ T40 + 40 kD ⇒ ↑ 25 kD 細胞アッセイにおける化合物の活性。結果は25 kDバンドの相対的生成として示す。



【 図 1 c 】



【 図 1 d 】

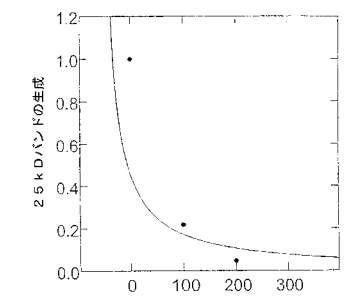


【 図 3 】

チオニン：膜-タウモデル
↑ T40 + 40 kD ⇒ ↑ 25 kD 細胞アッセイ

標準的な阻止モデルにより予測される細胞活性：

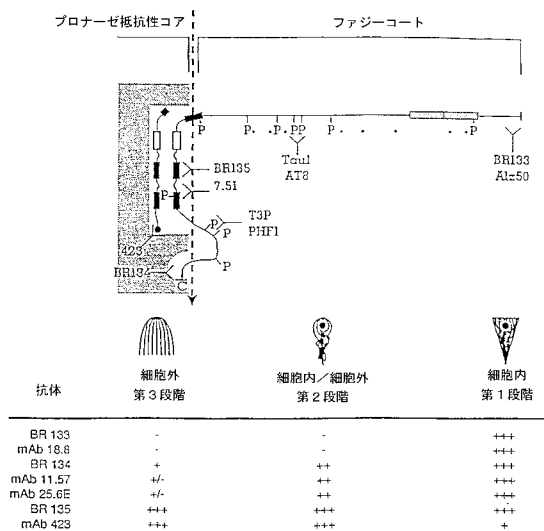
$$\text{活性} = \frac{[\text{タウ}]}{([\text{タウ}] + Kd * (1 + [\text{チオニン}] / K1))}$$



観察された活性対予測された活性 r = 0.999

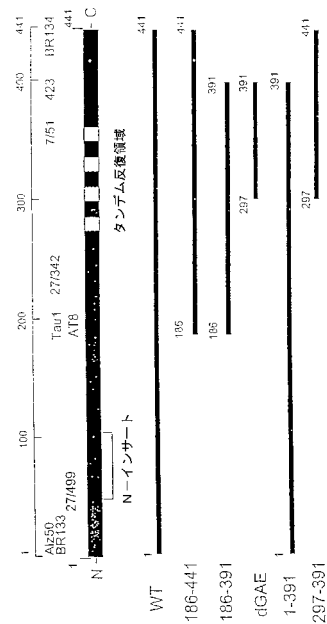
細胞内タウ濃度 415 nM
タウ-タウ結合親和性 500 nM
チオニン K₁ 33 nM

【 図 4 a 】



【 図 4 b 】

タウのN-およびC-末端トランジェクション



【 図 5 b 】

角括弧 シグナル配列を示す
 太字 チュープリン結合セグメントを示す

SSタウ186-441

[MKWVTFLLLLFISGSAFSPVJKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTFP
 TREPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVMPDLKNVSKIGSTENLKHQP
 GGGKQVHKKLDLSNVQSKCGSKDNKHPGGGSVQIVYKPVDLKSVTSK
 CGSLGNHHKPPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNITHVPPGGGNKKIE
 THKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVSGDTSRHLNVSSTGSIDMVDSP
 QLATLADEVSASLAKQGL

SSタウ186-390

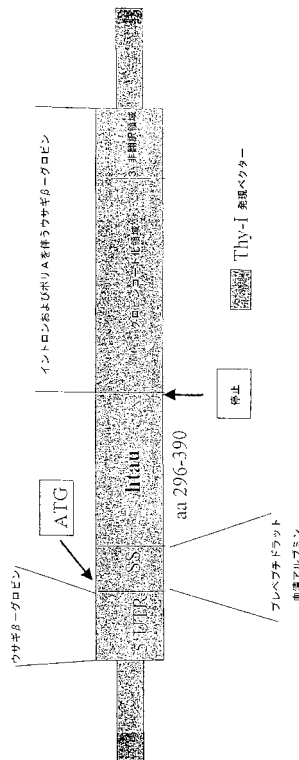
[MKWVTFLLLLFISGSAFSPVJKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTFP
 TREPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVMPDLKNVSKIGSTENLKHQP
 GGGKQVHKKLDLSNVQSKCGSKDNKHPGGGSVQIVYKPVDLKSVTSK
 CGSLGNHHKPPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNITHVPPGGGNKKIE
 THKLTFRENAKAKTDHGA

SSタウ286-390

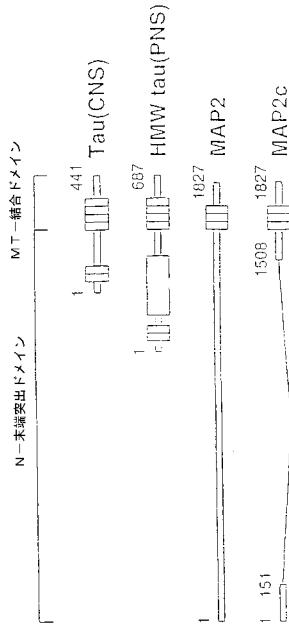
[MKWVTFLLLLFISGSAFSPVJNKHVPPGGGSVQIVYKPVDLKSVTSKCGSLG
 NHHKPPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNITHVPPGGGNKKIETHKLT
 RENAKAKTDHGA

【 図 6 b 】

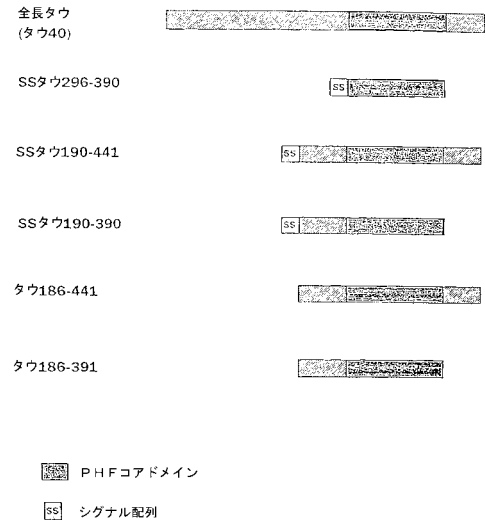
マウスの受精卵母細胞へのDNAマイクロインジェクションのために用いられるアミノ酸296~390を構築する



【 図 7 】

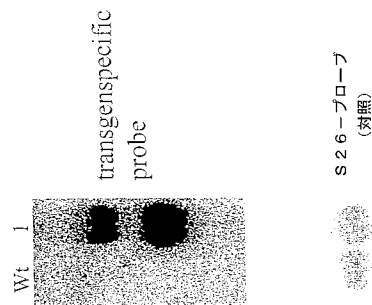


【 図 10 】



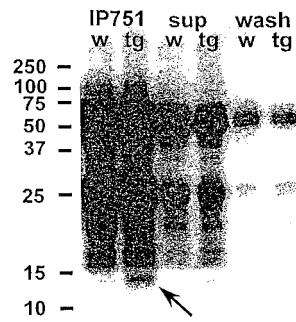
【 図 12 】

アミノ酸296~390 (ライン1) 構築物のノーザンブロット分析により
高レベル発現が示される導入遺伝子特異的プローブ



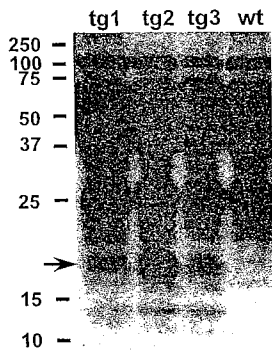
【 図 13 】

IP7. 51が後続するPre-IPにより
12kDでwtおよびtg間の顕著な差異が示される。



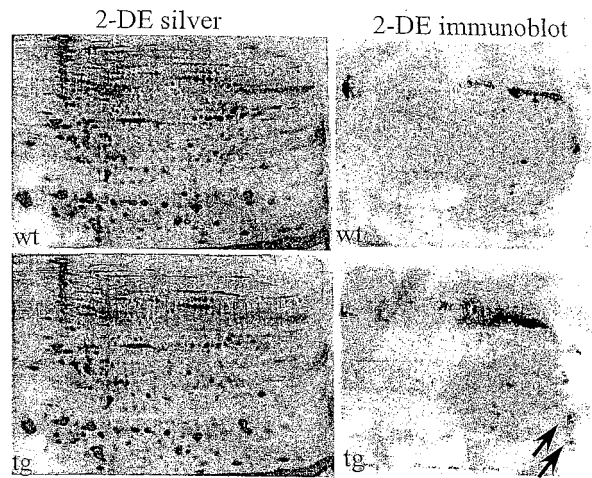
【 図 1 4 】

ライン1の三つの異なるマウスからの
S1分画が18kDを示す。



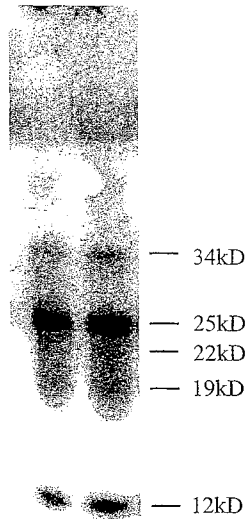
【 図 1 5 】

マウス脳 (6か月) ライン1 (アミノ酸296~390)
からの煮沸および濃縮S1の2-DE

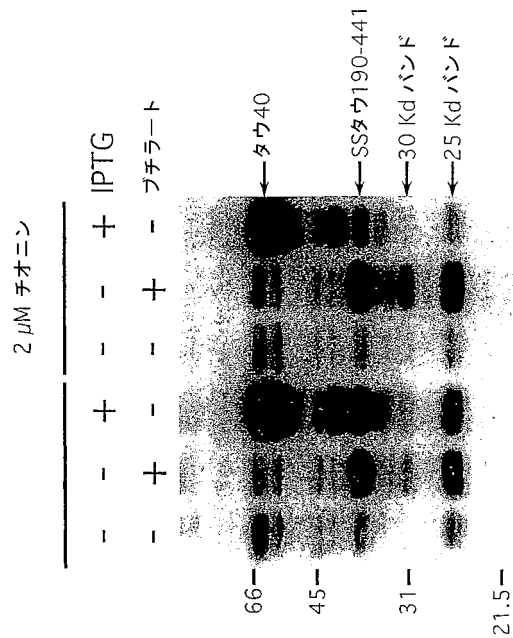


【 図 1 6 d 】

細菌により発現された
dGAEのインビトロ凝集



【 図 1 6 e 】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
1 August 2002 (01.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/059150 A2

(51) International Patent Classification: C07K 14/705

(21) International Application Number: PCT/GH02/00005

(22) International Filing Date: 2 January 2002 (02.01.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0100119.7 3 January 2001 (03.01.2001) GB

(71) Applicant (for all designated States except US): THE UNIVERSITY COURT OF THE UNIVERSITY OF ABERDEEN [GB/GB]; Regent Walk, Aberdeen, Grampian AB24 3TX (GB).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): WISCHIK, Claude, Michel [FR/GB]; Department of Mental Health, University of Aberdeen, University Medical Buildings, Foresterhill, Aberdeen, Aberdeenshire AB25 2ZD (GB). RICKARD, Janet, Elizabeth [GB/GB]; Department of Mental Health, University of Aberdeen, University Medical Buildings, Foresterhill, Aberdeen, Aberdeenshire AB25 2ZD (GB). HORSLEY, David [GB/GB]; Department of Mental Health, University of Aberdeen, University Medical Buildings, Foresterhill, Aberdeen, Aberdeenshire AB25 2ZD (GB). HARRINGTON, Charles, Robert [GB/GB]; Department of Mental Health, University of Aberdeen, University Medical Buildings, Foresterhill, Aberdeen, Aberdeenshire AB25 2ZD (GB). THEURING, Franz [DE/DE]; University Hospital Charite, Institute of Pharmacology and Toxicology, Dorotheenstr. 94, 10117 Berlin (DE).

(DE). STAMER, Karsten [DE/DE]; University Hospital Charite, Institute of Pharmacology and Toxicology, Dorotheenstr. 94, 10117 Berlin (DE). ZABKE, Claudia [DE/DE]; University Hospital Charite, Institute of Pharmacology and Toxicology, Dorotheenstr. 94, 10117 Berlin (DE).

(74) Agents: KREMER, Simon, M. et al.; Mewburn Ellis, York House, 23 Kingsway, London, Greater London WC2B 6HP (GB).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GM, HR, HU, IB, IL, IN, IS, JP, KH, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PI, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KL, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, UJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

Published:
without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/059150 A2

(54) Title: MATERIALS AND METHODS RELATING TO PROTHIN AGGREGATION IN NEURODEGENERATIVE DISEASE

(57) Abstract: Disclosed are methods of inducing or modelling the pathological state of an aggregating disease protein (ADP - e.g. tau protein) which is associated with a disease state in which the ADP aggregates pathologically (e.g. Alzheimer's disease) through an induced conformational polymerisation interaction, the method being characterised by the step of providing a membrane-localisable fusion protein comprising (i) an aggregating portion, which is derived from the ADP or from a protein which initiates pathological aggregation of the ADP, (ii) a heterologous membrane-localising portion. Membrane-localisation of the ADP-based fusion protein is believed to cause the high-affinity capture site of the ADP protein to become exposed such that aggregation of further ADP, which may be native or heterologous to the system, to be promoted. The method can be carried out in vitro, or in cell- and animal-models, and may be used to screen for modulators of the aggregation process by monitoring aggregation e.g. by monitoring the production of the ADP-related degradation products resulting from the aggregation. Also provided are materials, processes for use in or with the methods.

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-1-

MATERIALS AND METHODS RELATING TO PROTEIN AGGREGATION IN
NEURODEGENERATIVE DISEASE

Technical field

5

The present invention concerns models, materials and methods relating to the aggregation of proteins associated with neurodegenerative disease.

10 Background art

Conditions of dementia such as Alzheimer's disease (AD) are frequently characterised by a progressive accumulation of intracellular and/or extracellular deposits of proteinaceous
15 structures such as β -amyloid plaques and neurofibrillary tangles in the brains of affected patients. The appearance of these lesions largely correlates with pathological neurofibrillary degeneration and brain atrophy, as well as with cognitive impairment (Mukaetova-Ladinska, E.B. et al. (2000) Am. J. Pathol. Vol. 157, No. 2, 623-
20 636).

Both neuritic plaques and neurofibrillary tangles contain paired helical filaments (PHFs), of which a major constituent is the microtubule-associated protein tau (Wischik et al. (1988) FNAS USA
25 85, 4506). Plaques also contain extracellular β -amyloid fibrils derived from the abnormal processing of amyloid precursor protein (APP; Kang et al. (1987) Nature 325, 733). An 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
30 Neurobiology Series, Bios Scientific Publishers, Oxford) discusses in detail the putative role of tau protein in the pathogenesis of neurodegenerative dementias.

Studies of Alzheimer's disease indicate that the loss of the normal
35 form of tau (Mukaetova-Ladinska et al. (1993) Am. J. Pathol., 143, 565; Wischik et al. (1995a) Neurobiol. Ageing, 16: 409; Lai et al.

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-2-

(1995b) *Neurobiol. Ageing*, 16: 433), accumulation of pathological PHFs (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.*) and loss of synapses in the mid-frontal cortex (Terry et al. (1991) *Ann. Neurol.*, 30, 572) correlate with associated cognitive impairment. Furthermore, loss of synapses (Terry et al., *loc. cit.*) and loss of pyramidal cells (Bondareff et al. (1993) *Arch. Gen. Psychiatry*, 50: 350) both correlate with morphometric measures of tau-reactive neurofibrillary pathology, which parallels, at a molecular level, an almost total redistribution of the tau protein pool from a soluble to a polymerised form (PHFs) in Alzheimer's disease (Mukaetova-Ladinska et al. (1993), *loc. cit.*; Lai et al. (1995), *loc. cit.*).

15 Tau exists in alternatively-spliced isoforms, which contain three or four copies of a repeat sequence corresponding to the microtubule-binding domain (Goedert, M., et al. (1989) *EMBO J.* 8, 393-399; Goedert, M., et al. (1989) *Neuron* 3, 519-526). Tau in PHFs is proteolytically processed to a core domain (Wischik, C.M., et al. 20 (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) which is composed of a phase-shifted version of the repeat domain; only three repeats are involved in the stable tau-tau interaction (Jakes, R., et al. (1991) *EMBO J.* 10, 2725-2729). Once 25 formed, PHF-like tau aggregates act as seeds for the further capture and provide a template for proteolytic processing of full-length tau protein (Wischik et al. 1996 *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 11213-11218).

30 In the course of their formation and accumulation, paired helical filaments (PHFs) first assemble to form amorphous aggregates within the cytoplasm, probably from early tau oligomers which become truncated prior to, or in the course of, PHF assembly (Mena, R., et al. (1995) *Acta Neuropathol.* 89, 50-56; Mena, R., et al. (1996) *Acta 35 Neuropathol.* 91, 633-641). These filaments then go on to form classical intracellular neurofibrillary tangles. In this state, the

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-3-

PHFs consist of a core of truncated tau and a fuzzy outer coat containing full-length tau (Wischik, C.M., et al. (1996b) in "Microtubule-associated proteins: modifications in disease", eds. Avila, J., Brandt, R. and Kosik, K. S. (Harwood Academic Publishers, Amsterdam pp.185-241)). The assembly process is exponential, consuming the cellular pool of normal functional tau and inducing new tau synthesis to make up the deficit (Lai, R. Y. K., et al., (1995), *Neurobiology of Ageing*, Vol. 16, No. 3, 433-445). Eventually, functional impairment of the neurone progresses to the point of cell death, leaving behind an extracellular tangle. Cell death is highly correlated with the number of extracellular tangles (Wischik et al. 2000, loc.cit). As tangles are extruded into the extracellular space, there is progressive loss of the fuzzy outer coat of the neurone with corresponding loss of N-terminal tau immunoreactivity, but preservation of tau immunoreactivity associated with the PHF core (Figure 4a; also Bondareff, W. et al., (1994) *J. Neuropath. Exper. Neurol.*, Vol. 53, No. 2, 158-164).

The phase shift which is observed in the repeat domain of tau incorporated into PHFs suggests that the repeat domain undergoes an induced conformational change during incorporation into the filament. During the onset of Alzheimer's disease, it is envisaged that this conformational change could be initiated by the binding of tau to a pathological substrate, such as damaged or mutated membrane proteins (see Figure 19a - also 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).

In the case of Alzheimer's disease, current pharmaceutical therapies are focused on symptomatic treatment of the loss of cholinergic transmission which results from neurodegeneration (Mayeux, R., et al. (1999) *New Eng. J. Med.* 341, 1670-1679). However, although the available treatments delay progression of the disease for up to six to eight months, they do not prevent it. The discovery of drugs that could prevent the aggregation of tau which leads to

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-4-

neurodegeneration would provide a more effective strategy for prophylaxis or for inhibiting the progression of the disease, which would not require an immediate knowledge of the diverse upstream events that initiate the aggregation (Figure 19b).

5

Protein aggregation assays

Based on the putative model described above, WO 96/30766 describes an *in vitro* assay for tau aggregation in which a fragment of tau
10 corresponding to the core repeat domain, which has been adsorbed to a solid phase substrate, is able to capture soluble full-length tau and bind tau with high affinity. This association confers stability against proteolytic digestion of the aggregated tau molecules. The process is self-propagating, and can be blocked selectively by
15 prototype pharmaceutical agents (Wischik, C.M., et al. (1996), loc. cit).

Although the *in vitro* assay described in WO 96/30766 enables the identification of inhibitors or modulators of tau-tau association,
20 the present inventors have also recognized that cell-based models of Alzheimer's disease-like protein aggregation would be useful. Such cellular models could be used both in the primary screening of candidate modulators of tau-tau aggregation, and in the secondary screening of compounds already identified in the *in vitro* assay of
25 WO 96/30766. Furthermore, the demonstration of tau aggregation in cells could also aid in the identification of normal cellular substrates which are involved in the initiation of pathological tau aggregation, which substrates could themselves be targets for pharmaceutical intervention.

30

However, numerous papers reporting the expression of various tau constructs in tissue culture models have failed to demonstrate aggregation (see e.g. Baum, L. et al., (1995) Mol. Brain Res. 34:1-17).

35

These problems can be understood when it is considered that

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-5-

aggregation of soluble tau in vitro has so far only been achieved under non-physiological conditions and at high concentrations (reviewed in Wischik (2000), loc. cit).

5 WO 96/30766 also describes two approaches for studying tau aggregation in a cellular environment. In the first approach, full-length tau or fragments of tau were stably expressed in cells. In the second approach, aggregated tau was transiently transfected into cells by use of lipofectin.

10

Although both of these approaches are useful for the study of tau-tau aggregation, they have some limitations. Transfection of aggregated tau into cells using lipofection is of variable efficiency, as is the production of aggregated tau itself.

15 Moreover, the core tau fragment, which is the most efficient seed for tau aggregation, is found to be toxic when stably expressed in cells, leading to low expression levels. Thus, constitutive expression of the truncated tau fragment of the PHF core in eukaryotic cells is difficult to achieve. Transient expression systems permit the optimization of expression of tau, but the inherent toxicity of the fragments renders even these systems unreliable. Longer fragments of tau are less toxic, but these do not reliably aggregate when expressed in cells.

25 Thus it would be desirable for an alternative model system to be developed, in which the interaction between e.g. tau molecules and the like could be investigated under physiological conditions, in a stable and controllable cell line, and which could be used to screen for potential diagnostic, prognostic or therapeutic agents of conditions such as Alzheimer's disease.

30

Animal models

Although *in vitro* and cell-based assays can be useful tools, animal models of Alzheimer's disease and related conditions can help to understand the relationship between the biochemical and pathological

35

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-6-

changes in the brain and impairment of memory and behavior. Furthermore, they enable the pathogenesis of the disease process to be examined *in vivo* and provide a model in which therapeutic strategies can be tested.

5

Specifically, animal models put cell-based systems in a pharmacokinetic context where, for example, potential therapeutics can be assessed not just in terms of particular biochemical activities against protein aggregation, but also in terms of toxicity, delivery and half-life at the site of action e.g. through the blood brain barrier.

10

Notwithstanding this, existing models fail to display the combination of tangles, plaques and cognitive impairment

15

characteristic of AD. Aged dogs and non-human primates develop β -amyloidosis, but tau pathology is not a feature in these animals (Walker, 1997). Similarly, transgenic mice modeling amyloidosis have been created, but these fail to exhibit abnormal deposition of tau (Janus, Chishti, & Westaway, 2000). Conversely animal models of tau pathology fail to demonstrate amyloid pathology. The tangles that accumulate in the brains of rodents treated with aluminium differ in their ultrastructure from those found in AD (see above). Filamentous cytoskeletal changes associated with abnormally phosphorylated tau have been observed in aged baboons, bears, sheep and goats (Braak, Braak, & Strothjohann, 1994; Cork et al., 1988; Nelson, Greenberg, & Saper, 1994; Nelson & Saper, 1995; Roertgen et al., 1996; Schultz et al., 2000).

20

25

Some experiments have implicated links between tau and amyloid in animal models. Hyperphosphorylated tau accumulates in the somatodendritic compartment of neurons in rat brains following chronic intraventricular infusion of okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatase 2A (Arendt, Holzer, Fruth, Brijckner, & Gartner, 1995). Furthermore, the okadaic acid treatment also led to the formation of extracellular deposits of $A\beta$ and memory impairment. Two other studies have implicated $A\beta$ in the accumulation of tau in

30

35

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-7-

animal models. Microinjections of fibrillar A β in the cortex of aged rhesus monkeys caused the focal accumulations of intracellular phosphorylated tau (Geula et al., 1998). This was dependent upon both age and species; the same result was not observed for rats or
5 young rhesus monkeys. Secondly, focal deposits of tau have been observed in mice that were transgenic for APP carrying AD associated mutations (Sturchler-Pierrat et al., 1997).

The brains of tau-deficient mice appear immunohistochemically normal and axonal elongation was not affected in cultured neurons (Harada et al., 1994). However, microtubule stability was decreased and its organization altered in some small-calibre axons. Furthermore, an increase in microtubule-associated protein 1A (MAP 1A), which might compensate for a functional loss of tau in large-calibre axons, was
15 found. Thus, tau seems to be crucial in the stabilization and organization of axonal microtubules in certain axons. Subsequent studies have demonstrated that tau-deficient mice exhibit signs similar to certain symptoms characteristic of frontotemporal dementia patients, i.e. personality changes
20 (disinhibition/aggression) and deterioration of memory and executive function. The mice showed muscle weakness and impaired balance control, hyperactivity in a novel environment, and impairment in contextual fear conditioning (Ikegami, Harada, & Hirokawa, 2000). Spatial learning tasks, however, were unaffected in the mice as is
25 the memory function in FTDP-17 patients.

Although neurofibrillary tangles and phenotypic alterations were not reported in animals transgenic for 3- or 4-repeat tau isoforms (Brion, Tremp, & Octave, 1999; Gotz et al., 1995), these findings
30 may reflect low levels of protein expression.

Impaired motor function, in the presence or absence of tauopathy, has been observed in mice expressing higher levels of human tau protein (Ishihara et al., 1999; Spittaels et al., 1999). In these
35 animals the filamentous inclusions did not exhibit the ultrastructural features of AD PHFs.

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-8-

A recent transgenic mouse model expressing human tau with the P301L mutation develops neurofibrillary tangles, neuronal loss and motor dysfunction (Lewis et al., 2000). The tau inclusions in these mice show both straight and twisted ribbon filaments similar to those found in human patients. Attempts to combine this model with amyloidosis are underway by crossing these mice with those transgenic for APP. Other transgenic mouse models are discussed in US patents 5,912,410 and 5,898,094

Thus it can be seen that existing animal models fail to demonstrate any pathological evidence that the transgene leads to the accumulation of truncated tau protein encompassing the PHF domain. Although filaments are observed in tau carrying the P301L mutation, this corresponds to a form of tau that causes FTDP-17 and not AD. To date, no mutation in the tau gene has been identified which causes AD, and therefore approaches based purely on mutated protein for effect may be of limited relevance.

More particularly, there has been no clear disclosure of unmutated tau aggregating in these models, as evidenced by proteolytic processing to a truncated core fragment corresponding to that found in the actual AD PHF core. A system in which such proteolytic processing occurred in a pharmacokinetic context would thus provide a contribution to the art.

Disclosure of the invention

As discussed above, a conformational change of tau, rather than a chemical modification, is responsible for the progressive aggregation of tau molecules and their subsequent polymerization to form PHFs.

Surprisingly, the present inventors have now found that it is possible to reproduce this conformational change in a model system by causing the synthesis of a membrane-localised form of the protein

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-9-

of interest, e.g. tau, or fragments thereof containing the core aggregation domain.

It has been found, unexpectedly, that the association of e.g. tau or
5 tau fragments with a cellular or organellar membrane, e.g. the
plasma membrane of a cell or the membrane of the endoplasmic
reticulum, can also seed the aggregation of further molecules of tau
or tau fragments, thus propagating the formation of tau-tau
10 aggregates in a manner somewhat analogous to that observed in the
solid-phase assay system of WO 96/30766. This technique appears to
have wide applicability to proteins involved in protein-aggregation
type diseases.

Although not wishing to be limited by any particular mechanism, it
15 is proposed by the inventors that the membrane-localised synthesis
of the protein causes the high-affinity capture site of this protein
to become exposed, by physically inducing the conformational change
of tau that occurs upon its binding to a suitable substrate. The
effect of this conformational change may be to create a sufficiently
20 high local concentration of tau in its seeding conformation that
further aggregation of the protein is promoted. These observations
may have implications for all diseases in which protein aggregation
plays a role.

25 In various aspects, the present invention provides, methods of
modeling disease-like intracellular aggregation of an appropriate
protein, or a core fragment thereof, the method being characterised
by the step of synthesising a membrane-localised form of a protein
which can initiate such aggregation. Such methods can be used, for
30 instance, to identify modulators of the aggregation.

In general the membrane-targeted protein will either be one which
actually undergoes the aggregation, although in some cases it will
be one which triggers the aggregation of a second protein type.

35

Thus, in aspects of the invention there are provided fusion

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-10-

polypeptides comprising: (i) an aggregating portion, which is derived from a protein associated with a disease in which the protein aggregates or initiates aggregation of protein through an induced conformational polymerisation interaction, (ii) a heterologous membrane-localising portion.

In this way, a protein such as tau, or a core fragment of tau, or a corresponding protein as discussed below, can be synthesised in the form of a membrane-localized protein, where it can act as a seed for the intracellular aggregation and proteolytic processing of the fusion at an appropriate level for modeling aggregation of the actual protein from which it was derived. It may also seed aggregation with or between further molecules (e.g. full-length tau molecules), thus propagating the formation of protein aggregates.

Cells which express such membrane-associated protein aggregates can be used as models of disease-related protein aggregation, such as that observed in the cells of Alzheimer's-like diseases *in vivo*. This model system can be used in further studies, such as in screening assays for potential therapeutic, prognostic or diagnostic agents, as described in detail below.

Thus one aspect of the present invention there is disclosed a method of inducing, modeling or controlling aggregation of a protein associated with a disease in which the protein undergoes an induced conformational interaction, the method comprising the steps of: (a) introducing to a membrane, a fusion polypeptide comprising: (i) an aggregation portion, which is derived from a first protein associated with a disease in which the protein undergoes an induced conformational polymerisation interaction, (ii) a heterologous membrane-localising portion, (b) causing or permitting an induced conformational polymerisation interaction between the fusion polypeptide and a further polypeptide, such as to cause aggregation of the said further polypeptide. Optionally the extent of aggregation may be monitored.

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-11-

In this and other embodiments, the further polypeptide may, for example, be a further fusion protein, or may result from proteolytic degradation of the fusion polypeptide such as to yield a second protein capable of undergoing an induced conformational polymerisation interaction with said first protein, or may be a quite different polypeptide.

Thus in a further preferred aspect of the present invention there is disclosed a method of inducing, modeling or controlling aggregation of a (second) protein associated with a disease in which the protein undergoes an induced conformational interaction,

the method comprising the steps of:

(a) introducing to a membrane, a fusion polypeptide comprising: (i) an aggregation portion, which is derived from a first protein associated with a disease in which the protein undergoes or initiates an induced conformational polymerisation interaction, (ii) a heterologous membrane-localising portion,

(b) contacting the fusion polypeptide with a second protein capable of undergoing an induced conformational polymerisation interaction with said first protein, whereby interaction of the second protein with the membrane localized fusion protein causes aggregation of the second protein. Optionally the extent of aggregation may be monitored.

Examples are disclosed below of preferred first and second proteins, which may be derived from the same or different protein associated with a disease. In particular, the first protein will be one which (as a result of an induced conformational change) initiates and/or participates in the aggregation of further protein which is the same or different, and the second will be one which actually aggregates in the relevant disease.

In preferred embodiments there are disclosed cell-based method of inducing intracellular aggregation of a protein associated with a disease in which the protein undergoes an induced conformational interaction e.g. comprising the steps of: (a) introducing into a

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-12-

cell, such that it becomes localised at a membrane in the cell, a fusion polypeptide comprising: (i) an aggregation portion, which is derived from a first protein associated with a disease in which the protein undergoes or initiates an induced conformational polymerisation interaction, (ii) a heterologous membrane-localising portion, (b) introducing into the cell, a second protein capable of undergoing an induced conformational polymerisation interaction with said first protein, whereby interaction with of the second protein with the localized fusion protein causes intracellular aggregation and optionally proteolytic processing of either.

Again, optionally the extent of aggregation and/or proteolytic processing of the second protein may be monitored. This may be in the presence of one or more agents suspected of being capable of modulating (e.g. inhibiting or reversing) the aggregation.

Generally, speaking the method will be carried out by use of a nucleic acid encoding the fusion protein and/or the second protein.

Some preferred aspects and embodiments of the present invention will now be described in more detail.

Diseases and proteins

As stated above, the invention may employ any protein which is associated with a disease in which the protein undergoes an induced conformational polymerisation interaction i.e one in which a conformational change of the protein seeds the binding and aggregation of further protein molecules in a self-propagating manner. Once nucleation is initiated, an aggregation cascade may ensue which involves the induced conformational polymerisation of further protein molecules, which conformational change may render the aggregates more resistant to further proteolysis. The protein aggregates thus formed are thought to be a proximal cause of neurodegeneration, clinical dementia, and other pathological symptoms of this group of diseases. Purely for brevity, this group

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-13-

of conditions may be referred to herein as "Alzheimer's disease-like" conditions.

Preferred embodiments of the invention are based on tau protein.

5 Where used herein, the term "tau protein" refers generally to any protein of the tau protein family. Tau proteins are characterized as being one among a larger number of protein families which co-purify with microtubules during repeated cycles of assembly and disassembly (Shelanski et al. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 10 70., 765-768), and are known as microtubule-associated-proteins (MAPs). Members of the tau family share the common features of having a characteristic N-terminal segment, sequences of approximately 50 amino acids inserted in the N-terminal segment, which are developmentally regulated in the brain, a characteristic 15 tandem repeat region consisting of 3 or 4 tandem repeats of 31-32 amino acids, and a C-terminal tail. The term is thus exemplified by, but not limited to, tau molecules which form PHFs (and, ultimately, neurofibrillary tangles) in Alzheimer's disease brains. Indeed, PHFs accumulate in the somatodendritic compartment, where 20 the predominant microtubule-associated protein is MAP2 (Matus, A., in "Microtubules" [Hyams and Lloyd, eds.] pp 155-166, John Wiley and Sons, NY). MAP2 isoforms are almost identical to tau protein in the tandem repeat region, but differ substantially both in the sequence and extent of the N-terminal domain (Figures 7 and 8; Kindler and 25 Garner (1994) Mol. Brain Res. 26, 218-224). Nevertheless, aggregation in the tandem-repeat region is not selective for the specific tau core amino acid sequence. Thus it will be appreciated that any discussion herein in relation to tau-tau aggregation should be taken as relating also to tau-MAP2 aggregation and MAP2-MAP2 30 aggregation.

Figure 20 shows a Table listing various other disease-associated aggregating proteins which may be used in the present invention. In each case the disease or diseases in which the initiation of 35 aggregation and/or mutation of the protein(s) may play a role is also listed. The domain or mutation responsible for the disease

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-14-

activity is listed, and at least all or part of this minimal portion of the protein would preferably be encompassed by the protein used in the invention as the membrane-targeted 'capture' or 'seeding' protein.

5

As can be seen from the table, example diseases which are characterised by pathological protein aggregation include motor neurone disease and Lewy body disease. Furthermore, the pathogenesis of neurodegenerative disorders such as Pick's disease and Progressive Supranuclear Palsy appears to correlate with an accumulation of pathological truncated tau aggregates in the dentate gyrus and stellate pyramidal cells of the neocortex, respectively (Wischik *et al.* 2000, *loc. cit.*).

15 In certain preferred embodiments, the invention employs proteins which may be involved in the initiation stages of diseases of the type discussed herein. For example, in Wischik, C.M., *et al.* (1997) [supra] a variety of membrane proteins which may be involved in the initiation of tau capture and amyloid protein precursor in AD are
20 discussed. These include presenilins and mitochondrial proteins such as core protein 2 of the *bc₁* enzyme complex (CP2), ATP-synthase subunit 9 (ATP S-9) and porin. Thus preferred embodiments of the invention may utilize membrane-targeted proteins including those regions of these molecules shown in the Table in Figure 21.

25

Thus it will be appreciated, in the light of the above discussion, (and except where context requires otherwise) where the embodiments of the invention are described with respect to tau protein or tau-like proteins (e.g. MAP2) the description should be taken as
30 applying equally to the other proteins discussed above (e.g. β -amyloid, synuclein, prion, appropriate mitochondrial protein etc.) or other proteins which may initiate or undergo a similar pathological aggregation by virtue of conformational change in a domain critical for propagation of the aggregation, or which imparts
35 proteolytic stability to the aggregate this formed (article by Wischik *et al.* (in "Neurobiology of Alzheimer's Disease", 2nd

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-15-

Edition (2000) Eds. Dawbarn, D. and Allen, S.J., The Molecular and Cellular Neurobiology Series, Bios Scientific Publishers, Oxford). All such proteins may be referred to herein as "aggregating disease proteins."

5

Likewise, where mention is made herein of "tau-tau aggregation", or the like, this may also be taken to be applicable to other "aggregating-protein aggregation", such as β -amyloid aggregation, prion aggregation and synuclein aggregation etc. Likewise "tau
10 proteolytic degradation" and so on.

Proteins for use in the methods described above may, where appropriate (e.g. in the study of tau-tau binding) be isolated from brain tissues by methods known to those skilled in the art, for
15 instance as described in the respective references. Soluble tau can be isolated either from human brain tissues, or from animal brain tissues, with a postmortem delay of less than 24 hours (see Wischik et al. (1988); (1995a), loc. cit.). Microtubule proteins can be
20 obtained by three cycles of temperature-dependent assembly-disassembly according to Shelanski et al. (1973, loc. cit.). Lipofection of the proteins may be carried out analogously to the methods described in W096/30766. More preferably the production of
e.g. tau proteins and fragments thereof will be achieved by conventional recombinant DNA technology as described below.

25

Fragments, derivatives and controls

There is no requirement that the invention employ full-length protein; indeed this may be undesirable in certain contexts.
30 Equally, the protein used may include an extended N- or C-terminus.

As shown in the Examples hereinafter, the nature of the aggregating portion of the fusion may be such that appropriate levels of aggregation (and possible proteolytic processing) are achieved even
35 in the absence of further molecules.

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-16-

Alternatively or additionally, further molecules (e.g. full length disease protein molecules) may be provided which participate in the aggregation.

5 In preferred embodiments of the present invention, the fusion polypeptide, as synthesized in either the cell-based method or the *in vitro* method described herein, comprises or consists essentially of a truncated fragment. Such a fragment will generally be a "core fragment" which term refers to that part of the protein that is able
10 to bind to further protein (which may be same or different) to initiate or propagate aggregation. In the case of disease proteins which aggregate, such core fragments are also likely to be those which contribute to the proteolytic stability of the aggregate.

15 Thus, for example, a "tau core fragment" is a tau fragment comprising a truncated tau protein sequence derived from the tandem repeat region ("core tandem repeat domain") and, which, in the appropriate conditions, is capable of binding to the tandem repeat region of a further tau protein or a MAP2 protein with high
20 affinity.

Where the fusion polypeptide is derived from tau, the truncated fragment may preferably comprise a fragment from about 186-296 extending to about 390-441 of the full-length protein, more
25 preferably any of the following portions: 186 to 390 or 391 or 441; 296 to 390 or 391 or 441 (see Figures 5 and 10). In the Examples hereinafter, the ligation of the tau fragment to the signal sequence destroyed amino acids 186-189, so that the starting amino acid was equivalent to 190.

30

In the case of APP (amyloid precursor protein), for instance, expression of a fragment of the APP that encompasses the A β domain of 1-40 or 1-42 amino acids as a fusion protein, may be preferred.

35 Other core fragments may be based e.g. on the domains discussed with reference to Figures 20 and 21.

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-17-

The total length of the fusion polypeptide may be any which is appropriate to the assay and aggregation disease protein core fragment being used, but will generally be greater than 30, 40, 50,
5 60, 70, 80, 90, 100, 200, or 500 amino acids in length.

In all instances herein where a named protein (e.g. core fragment) or a recited nucleic acid sequence is discussed, a derivative or other variant of the corresponding reference protein (or nucleic
10 acid) may be used as appropriate, provided that it retains appropriate characteristics of the reference sequence. Such derivatives will also share sequence identity with the reference sequence.

15 In principle, a derivative may be a chemical derivative which may be prepared from the functional groups occurring as side chains on the residues or the NB or C-terminal groups, by means known in the art. These derivatives may include aliphatic esters of the carboxyl groups, amides of the carboxyl groups by reaction with ammonia or
20 with primary or secondary amines, N-acyl derivatives of free amino groups of the amino acid residues formed with acyl moieties (e.g. alkanoyl or carbocyclic aroyl groups) or O-acyl derivatives of free hydroxyl groups (for example that of seryl- or threonyl residues) formed with acyl moieties.

25 More commonly the derivative will be one by way of amino acid insertion, deletion, or addition of the reference sequence. For example, a tau protein, or tau core fragment, derivative will comprise at least a partial amino acid sequence resembling the
30 tandem repeat region of the tau proteins, but in which one or more of the amino acids of the natural tau or its fragments have been replaced or deleted, or into which other amino acids have been inserted.

35 Such changes may be made to enhance or ablate binding activity (the latter case being useful for control experiments). Controls may

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-18-

contain deletions of sequences or domains to see what effect on aggregation these may have.

5 Preferred derivatives may be those which incorporate mutations corresponding to those known or suspected to be associated with the disease state. These may include changes corresponding to P301S within the tau sequence (see Fig 5). Other mutations include G272V, G389R, P301L, N279K, S305N, V337M, G272V, K280A, R406W (see also Wischik et al, 2000, supra).

10

Other preferred derivatives may include tandem repeats of the core-fragments discussed above, or binding domains within those fragments.

15 Yet further derivatives may be based on chimeric products based on multiple, related, disease proteins in which their sequences are mixed or combined. For example restriction enzyme fragments of tau could be ligated together with fragments of MAF2 or even of an unrelated gene to generate recombinant derivatives. An alternative
20 strategy for modifying the core fragments would employ PCR as described by Ho et al., 1989, Gene 77, 51-59 or DNA shuffling (Cramer et al., 1998 Nature 391).

Membrane localizing sequence

25

The heterologous membrane-localising or targeting portion of the fusion may be any appropriate signal sequence from any suitable protein e.g. a signal sequence deriving from rat albumin. Alternatively it may be a modified sequence derived from a native
30 localizing portion. However, in each case it will be a sequence which does not occur 'naturally' with the aggregation portion. The presence of a signal sequence on a protein will direct the nascent polypeptide\ribosome complex to the ER membrane where it may be inserted into it. Translocation across the membrane of the ER, and
35 into the ER lumen, may then occur depending on the hydrophobicity of the protein.

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-19-

The signal sequence may, depending on the chosen host cell for expression of a membrane-localized form of the protein, be a prokaryotic signal sequence e.g. an alkaline phosphatase, penicillinase, lpp, or heat-stable enterotoxin II leader. For yeast expression the signal sequence may be, e.g., the yeast invertase leader, alpha factor leader (including *Saccharomyces* and *Kluyveromyces* α -factor leaders, the latter being described in U.S. Patent No. 5,010,182), or acid phosphatase leader, the *C. albicans* glucoamylase leader (EP 362,179), or the signal described in WO 90/13646. In mammalian cell expression, a mammalian signal sequence such as that from rat albumin may be used, or alternatively a viral leader sequence may be employed.

This membrane localising portion may also include a membrane anchor sequence and/or a stop-transfer sequence. Generally this may be preferred for proteins, the intrinsic (hydrophobic) properties of which, may otherwise lead them to be secreted or located extracellularly, when fused with a signal peptide. A membrane anchor domain can be incorporated to prevent the entire protein from being translocated into the lumen of the ER and ultimately secreted. In general the protein must be oriented on the cytosolic surface of any protein with which it is associated such that it can interact with exogenous protein in the cytoplasm.

25

Other binding partners

In one aspect of the invention, the membrane-localized expression of a protein such as tau or a core fragment of tau can be used to screen for specific binding partners of that protein or fragment, e.g. proteins other than tau or the core fragment of tau which can bind to the membrane-localised form of tau or a fragment thereof.

Thus, the present invention also relates to methods of screening for specific binding partners of the protein (e.g. tau) of interest, comprising causing or allowing the membrane-localized expression of

35

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-20-

the protein, contacting that protein with one or more potential binding partners, and determining whether or not the potential binding partner has bound to the membrane-localized protein.

5 The detection of binding between the protein of interest and a potential binding partner may be carried out using any suitable method, as described in detail above.

The method may include the further step of recovering the specific
10 binding partner thus identified.

In this way, the present invention enables the identification of specific binding partners of proteins such as tau, which may represent further pathological binding partners of such proteins in
15 Alzheimer's disease-like aggregates.

Use of nucleic acid constructs

In one preferred embodiment the (bound) fusion polypeptide (of step
20 (a)) above is introduced into the cell by expression therein under the transcriptional control of a constitutive promoter, while the second ('free') protein (of step (b)) is introduced by expression therein under the transcriptional control of an inducible promoter, in the presence of the appropriate inducing agent. Alternatively,
25 in the reverse, the (a) and (b) proteins may be expressed inducibly and constitutively respectively.

This system can be used to control the level or timing of
aggregation in the cell.

30 Particularly preferred is the following configuration for a cell-based tau-tau binding assay: A tau fragment corresponding to the truncated tau unit of the core PHF is constitutively expressed in a membrane-localised form in a host cell, so as to expose the high
35 affinity tau-tau binding site within the tandem repeat region, and at a level which does not kill the cells - i.e. in a stable cell

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-21-

line. The tau fragment is preferably longer than the core repeat domain fragment (suitably amino acid residues 186-390 or 186-441 of full-length tau), which is able to achieve a balance between aggregation and toxicity.

5

Nucleic acids of, or for use in, the present invention may be provided isolated and/or purified from their natural environment, in substantially pure or homogeneous form, or free or substantially free of other nucleic acids of the species of origin. Where used

10 herein, the term "isolated" encompasses all of these possibilities.

A nucleic acid encoding the fusion polypeptide will be at least partially synthetic in that it will comprise nucleic acid sequences which are not found together in nature (do not run contiguously) but

15 which have been ligated or otherwise combined artificially.

Nucleic acid according to the present invention may be in the form of, or derived from, cDNA, RNA, genomic DNA and modified nucleic acids or nucleic acid analogs. Where a DNA sequence is specified,

20 e.g. with reference to a figure, unless context requires otherwise the RNA equivalent, with U substituted for T where it occurs, is encompassed.

In particular, nucleic acids may comprise, consist or consist essentially of any of the sequences disclosed herein (which may be a gene, a genomic clone or other sequence, a cDNA, or an ORF or exon of any of these etc.) Where a nucleic acid (or nucleotide sequence) of the invention is referred to herein, the complement of that nucleic acid (or nucleotide sequence) will also be embraced by the

30 invention. The 'complement' in each case is the same length as the reference, but is 100% complementary thereto whereby by each nucleotide is base paired to its counterpart i.e. G to C, and A to T or U.

35 Thus the invention also relates, in a further aspect, to a nucleic acid molecule which comprises a nucleotide sequence encoding a

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-22-

fusion protein discussed above e.g. a aggregating disease protein or
its core tandem repeat domain (i.e. a protein or fragment thereof
that is implicated in a neurodegenerative disorder such as
Alzheimer's disease) linked to a signal sequence and, if necessary,
5 a sequence encoding a membrane anchor domain or a stop-transfer
sequence, whereby the encoded polypeptide will become inserted into
the ER membrane.

The nucleic acid molecule encoding the protein of interest linked to
10 the signal sequence may optionally also include an exogenous 3'UTR
sequence, e.g. a sequence derived from rat globin. The nature of
the 3'UTR appears to influence the efficiency of targeting of a
protein to the ER in cells, and the 3'UTR sequence can thus be
selected accordingly (Partridge, K.A., et al. (1999) *Cytotechnology*
15 30, 37-47).

As described above, the nucleic acids may encode derivatives or
other variants sharing homology with the reference sequences in
question. Preferably, the nucleic acid and/or amino acid sequence in
20 question would share about 50%, or 60%, or 70%, or 80% identity,
most preferably at least about 90%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% of the
sequence upon which the variant is based. Similarity or homology
may be as defined and determined by the TBLASTN program, of Altschul
et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-10, which is in standard use in
25 the art, or, and this may be preferred, the standard program
BestFit, which is part of the Wisconsin Package, Version 8,
September 1994, (Genetics Computer Group, 575 Science Drive,
Madison, Wisconsin, USA, Wisconsin 53711) using the default
parameters. One common formula for calculating the stringency
30 conditions required to achieve hybridization between nucleic acid
molecules of a specified sequence homology is: $T_m = 81.5^{\circ}\text{C} + 16.6\text{Log}$
 $[\text{Na}^+] + 0.41 (\% \text{G+C}) - 0.63 (\% \text{formamide}) - 600/\#\text{bp}$ in duplex.

Nucleic acid sequences which encode a polypeptide or peptide linked
35 to a signal sequence in accordance with the present invention can be
readily prepared by the skilled person using the information and

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-23-

references contained herein and techniques known in the art (for example, see Sambrook, Fritsch and Maniatis, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, and Ausubel *et al.*, Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, 1992). These techniques include (i) the use of the polymerase chain reaction (PCR) to amplify samples of the relevant nucleic acid, e.g. from genomic sources, (ii) chemical synthesis, or (iii) preparation of cDNA sequences. The nucleic acid thus prepared can then be linked to a sequence encoding a suitable signal peptide, or can be inserted into a vector construct which includes such a signal peptide-encoding sequence. Other methods suitable for adaptation to the synthesis of the membrane-localized protein in recombinant vertebrate cell culture are described in Gething *et al.*, *Nature*, 293:620-695 (1981); Mantei *et al.*, *Nature*, 281:40-46 (1979); EP 117,060; and EP 117,058.

DNA encoding e.g. tau core fragments may be generated and used in any suitable way known to those of skilled in the art, including by taking encoding DNA, identifying suitable restriction enzyme recognition sites either side of the portion to be expressed, and cutting out said portion from the DNA. Modifications to the protein (e.g. tau)-encoding sequences can be made, e.g. using site directed mutagenesis.

25 Constructs

In the cell-based assay embodiments of the present invention, the construction of a membrane-localized form of the protein of interest, e.g. tau or a fragment of tau, can be achieved by causing or allowing the expression in a cell of an expression construct or vector, which comprises nucleic acid encoding the given protein linked to a signal sequence and, where required, an anchor or stop-transfer sequence, and which optionally also includes an exogenous 3'UTR sequence.

35

In general, nucleic acid encoding the signal sequence to which the

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-24-

nascent protein molecule is linked may be a component of the vector itself, or it may be a part of the exogenous protein-encoding DNA that is inserted into the vector.

5 The construct may include any other regulatory sequences or structural elements as would commonly be included in such a system, and as is described below. As well as the signal sequence, the vector components will usually include, but are not limited to, one or more of an origin of replication, one or more marker genes, an
10 enhancer element, a promoter, and a transcription termination sequence. Construction of suitable vectors containing one or more of these components employs standard ligation techniques which are known to the skilled artisan.

15 Nucleic acid sequences which enable a vector to replicate in one or more selected host cells are well known for a variety of bacteria, yeast, and viruses. For Example, various viral origins (SV40, polyoma, adenovirus, VSV or BPV) are useful for cloning vectors in mammalian cells.

20

Particularly preferred is an expression vector comprising a nucleic acid as described herein. The vector may, for example, be in the form of a plasmid, cosmid, viral particle, phage, or any other suitable vector or construct which can be taken up by a cell and
25 used to express a membrane-localised form of the aggregating disease protein, e.g. tau or tau core fragment.

Expression vectors usually contain a promoter which is operably linked to the protein-encoding nucleic acid sequence of interest, so
30 as to direct mRNA synthesis. Promoters recognized by a variety of potential host cells are well known. "Operably linked" means joined as part of the same nucleic acid molecule, suitably positioned and oriented for transcription to be initiated from the promoter. DNA operably linked to a promoter is "under transcriptional control" of
35 the promoter. Transcription from vectors in mammalian host cells is controlled, for example, by promoters obtained from the genomes of

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-25-

viruses such as polyoma virus, fowlpox virus, adenovirus (such as Adenovirus 2), bovine papilloma virus, avian sarcoma virus, cytomegalovirus, a retrovirus, hepatitis-B virus and Simian Virus 40 (SV40), from heterologous mammalian promoters, e.g. the actin promoter or an immunoglobulin promoter, and from heat-shock promoters, provided such promoters are compatible with the host cell systems.

Expression vectors used in eukaryotic host cells (yeast, fungi, insect, plant, animal, human, or nucleated cells from other multicellular organisms) will also contain sequences necessary for the termination of transcription and for stabilizing the mRNA.

The promoter may be "inducible" - which is to say, as is well understood by those skilled in the art, expression is "switched on" or increased in response to an applied stimulus. The nature of the stimulus varies between promoters. Some inducible promoters cause little or undetectable levels of expression (or no expression) in the absence of the appropriate stimulus. Other inducible promoters cause detectable constitutive expression in the absence of the stimulus. Whatever the level of expression is in the absence of the stimulus, expression from any inducible promoter is increased in the presence of the correct stimulus. In experiments below, a Lac inducible promoter has been used.

Expression vectors of the invention may also contain one or more selection genes. Typical selection genes encode proteins that (a) confer resistance to antibiotics or other toxins e.g. ampicillin, neomycin, methotrexate, or tetracycline, (b) complement auxotrophic deficiencies, or (c) supply critical nutrients not available from complex media, e.g., the gene encoding D-alanine racemase for *Bacilli*. An example of suitable selectable markers for mammalian cells are those that enable the identification of cells competent to take up the given membrane-targeted protein-encoding nucleic acid, such as DHFR or thymidine kinase. An appropriate host cell, when wild-type DHFR is employed, is the CHO cell line deficient in DHFR

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-26-

activity, prepared and propagated as described by Urlaub et al.,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980). A suitable selection gene
for use in yeast is the *trp1* gene present in the yeast plasmid Rp7
{Stinchcomb et al., *Nature*, 282:39 (1979); Kingsman et al., *Gene*,
5 7:141 (1979); Tschemper et al., *Gene*, 10:157 (1980)}. The *trp1* gene
provides a selection marker for a mutant strain of yeast which lacks
the ability to grow in tryptophan, for example, ATCC: No. 44076 or
PEP4-1 [Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)].

10 *Transformation*

The method referred to above may therefore further include
introducing the nucleic acid into a host cell. The introduction,
which may (particularly for *in vitro* introduction) be generally
15 referred to without limitation as "transformation", may employ any
available technique. For eukaryotic cells, suitable techniques may
include calcium phosphate transfection, DEAE-Dextran,
electroporation, liposome-mediated transfection and transduction
using retrovirus or other virus, e.g. vaccinia or, for insect cells,
20 baculovirus.

The calcium treatment employing calcium chloride, as described in
Sambrook et al., *supra*, or electroporation is generally used for
prokaryotes or other cells that contain substantial cell-wall
25 barriers. Infection with *Agrobacterium tumefaciens* is used for
transformation of certain plant cells, as described by Shaw et al.,
Gene, 23:315 (1983) and WO 89/05859 published 29 June 1989.

For mammalian cells without such cell walls, the calcium phosphate
30 precipitation method of Graham and van der Eb, *Virology* 52:456-457
(1978) can be employed. General aspects of mammalian cell host
system transformations have been described in U.S. Patent No.
4,399,216. Transformations into yeast are typically carried out
according to the method of Van Solingen et al., *J. Bact.*, 130:946
35 (1977) and Hsiao et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76:3829
(1979). However, other methods for introducing DNA into cells, such

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-27-

as by nuclear microinjection, electroporation, bacterial protoplast fusion with intact cells, or polycations, e.g. polybrene, polyornithine, may also be used. For various techniques for transforming mammalian cells, see Keown et al., Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990) and Mansour et al., Nature 336:348-352 (1988).

Host cells

10 Suitable host cells for use in the invention may include bacteria, eukaryotic cells such as mammalian and yeast cells, and baculovirus systems.

Mammalian cell lines available in the art for expression of a heterologous polypeptide include fibroblast 3T6 cells, HeLa cells, baby hamster kidney cells, COS cells, monkey kidney CV1 line transformed by SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651), Chinese hamster ovary cells/-DHFR (CHO, Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); mouse sertoli cells (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); human lung cells (W138, ATCC CCL 75); human liver cells (Hep G2, HB 8065); mouse mammary tumour cells (MMT 060562, ATCC CCL51); and many others. Preferred may be any of the range of well known neuroblastomal cell lines e.g. N2A, N1E, SY5Y.

25 Suitable prokaryotic hosts include but are not limited to eubacteria, such as Gram-negative or Gram-positive organisms, for example, Enterobacteriaceae such as *E. coli*. Various *E. coli* strains are publicly available, such as *E. coli* K12 strain MM294 (ATCC 31,446); *E. coli* X1776 (ATCC 31,537); *E. coli* strain W3110 (ATCC 27,325) and K5 772 (ATCC 53,635). Eukaryotic microbes such as filamentous fungi or yeast are also suitable cloning or expression hosts for vectors. *Saccharomyces cerevisiae* is a commonly used lower eukaryotic host microorganism. The selection of the appropriate host cell is deemed to be within the skill in the art.

35

In a further aspect, the present invention provides a host cell

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-28-

containing heterologous nucleic acid of the invention as described above. The nucleic acid of the invention may be integrated into the genome (e.g. chromosome) of the host cell. Integration may be promoted by inclusion of sequences which promote recombination with the genome, in accordance with standard techniques. Alternatively, the nucleic acid may be on an extrachromosomal vector within the cell, or otherwise identifiably heterologous or foreign to the cell. Generally the cell line will be capable of expressing a membrane-localised form of a protein such as tau or derivative thereof, the cell line being transformed with nucleic acid encoding the protein or derivative thereof. Preferred cell-lines may be based on the fibroblast cell line, e.g. 3T6.

Expression products

Host cells transfected or transformed with expression or cloning vectors described herein for the production of the membrane-localized protein may be cultured in conventional nutrient media modified as appropriate for inducing promoters, selecting transformants, or amplifying the genes encoding the desired sequences. The culture conditions, such as media, temperature, pH and the like, can be selected by the skilled artisan without undue experimentation. In general, principles, protocols, and practical techniques for maximizing the productivity of cell cultures can be found in "Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach", M. Butler, ed. JRL Press, (1991) and Sambrook *et al*, *supra*.

Gene expression can be confirmed in a sample directly, for example, by conventional Southern blotting, Northern blotting to quantitate the transcription of mRNA [Thomas, Proc. Natl Acad Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)], dot blotting (DNA analysis), or *in situ* hybridization, using an appropriately labeled probe, based on the sequence of the aggregating disease protein. Alternatively, antibodies may be employed that can recognize specific duplexes, including DNA duplexes, RNA duplexes, and DNA-RNA hybrid duplexes or DNA-protein duplexes.

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-29-

Gene expression, alternatively, may be measured by immunological methods such as immunohistochemical staining of cells or tissue sections, and assay of cell culture, to quantitate directly the expression of gene product. Antibodies useful for immunohistochemical staining and/or assay of sample fluids may be either monoclonal or polyclonal, and may be prepared in any mammal. Conveniently, the antibodies may be prepared against a native sequence of the aggregating disease polypeptide.

10

Thus one aspect of the present invention entails causing or allowing expression from the nucleic acids discussed herein, e.g. by culturing host cells (which may include cells actually transformed, although more likely the cells will be descendants of the transformed cells) under conditions for expression of the gene, so that the encoded polypeptide (or peptide) is produced.

The present invention also encompasses a method of making a membrane-localized polypeptide or peptide of the preceding aspect, the method including expression from nucleic acid as described above. As an alternative to growing in a culture a host cell which contains such a vector, under appropriate conditions which cause or allow expression of the polypeptide, the polypeptides and peptides may be expressed in an *in vitro* system, such as a reticulocyte lysate system, as described herein.

Generally, following production by expression, the encoded fusion polypeptide will be utilised in the environment of the cells in which it is expressed, i.e. without isolating it from the membranes in which it is localised. In this way, as discussed above, it has surprisingly been found by the present inventors, the membrane-localized form of the protein can be used to seed the aggregation of further protein molecules in a manner which mimics Alzheimer's disease-like protein aggregation. Thus, cells displaying membrane-localised Alzheimer's disease-like protein aggregates in their membranes (e.g. ER membranes) can be used in further screening

35

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-30-

assays (for a discussion of which, see below).

Nevertheless, polypeptides of the invention may be isolated and/or purified from the host cell and/or culture medium, either in the
5 form of a membrane fraction, or isolated from the membranes themselves, as the case may be. Proteins may be purified to essential homogeneity by known methods such as, for example, by centrifugation at different velocities, by precipitation with ammonium sulphate, by dialysis (at normal pressure or at reduced
10 pressure), by preparative isoelectric focusing, by preparative gel electrophoresis or by various chromatographic methods such as gel filtration, high performance liquid chromatography (HPLC), ion exchange chromatography, reverse phase chromatography and affinity chromatography (e.g. on Sepharose(TM) Blue CL-6B or on carrier-bound
15 monoclonal antibodies).

Thus the invention relates, in a further aspect, to a polypeptide encoded by a nucleic acid as provided in a preceding aspect e.g. a
20 polypeptide or fragment thereof, (for instance based on tau or a core fragment of tau) linked to a signal peptide and (if necessary) an anchor and/or stop-transfer sequence. In a preferred embodiment, the polypeptide comprises aggregating disease protein e.g. tau protein, or a derivative thereof. More preferably, the protein
25 comprises a tau core fragment, as described above.

In vitro model

The membrane-localised form of the protein of interest described above may be used in *in vitro* models.

30 For example it could be used analogously to the tau fragment used in the assay of WO 96/30766 which is incorporated herein by cross reference. As described above, in this assay for tau aggregation and inhibitors thereof a fragment of tau corresponding to the core
35 repeat domain is adsorbed to a solid phase substrate. This is able to capture soluble full-length tau and bind tau with high affinity.

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-31-

The combination of these two strategies (membrane localisation, *in vitro* solid phase) may be advantageous in certain contexts.

As a further alternative to the cell-based methods described above,
5 the modeling method can be performed *in vitro*, by causing the
expression in an *in vitro* protein-expression system of a membrane-
localised form of the protein of interest. For instance, an *in*
vitro medium containing microsomes (which can be easily produced by
fragmentation of the endoplasmic reticulum), ribosomes, tRNA
10 molecules, and mRNA encoding the protein or protein fragment of
interest linked to a signal sequence, as well as any other soluble
factors required for protein synthesis and translocation, could be
used to synthesise a membrane-bound form of the protein. Here, in a
similar way to the cell-based system described above, ribosomes
15 would become attached to the microsomal membrane (which is
equivalent to the ER membrane of the cell-based system) and cause
the synthesis of the encoded polypeptide molecule.

In this latter embodiment, however, the construct which encodes the
20 aggregating disease protein, the signal sequence and the anchor
and/or stop transfer sequences (if required), are all preferably
designed in such a way that the majority of the encoded protein
molecule, when inserted into the microsomal membrane, projects from
the cytosolic surface of the membrane rather than into the lumen.
25 In this way, the protein molecule will be accessible both to further
protein molecules (so allowing Alzheimer's disease-like aggregation
to occur at the cytosolic surface of the microsome), and to test
agents in a screening assay to screen for potential inhibitors or
modulators of such aggregation.

30 The skilled person will be familiar with the design of suitable
constructs in order to achieve desired protein topologies. Further
discussion of this point will be given below.

35 Thus, the common feature linking the cell-based and *in vitro* model
systems provided herein is the synthesis of a membrane-localised

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-32-

form of the aggregating disease protein or protein fragment. This common feature gives rise to a method of generating a seed molecule, which can propagate the aggregation of further protein molecules in a manner which mimics the pathological aggregation of proteins such as tau during the formation of e.g. neurofibrillary tangles.

Detection of induced polymerization interaction

In various embodiments, the progress aggregation (or modulation of aggregation) may be detected directly or indirectly by monitoring the concentration or level any one or more of the following species: an aggregate of the fusion and/or second protein (e.g. based on sedimentation co-efficients), or a proteolytic fragment of either of these (which will generally increase with aggregation); a species corresponding to the non-aggregated fusion polypeptide and/or second protein (which may decrease).

Thus, as exemplified with particular tau fusions and proteins (based on 40kDa 190-441 fragment and T40), aggregation can be monitored on the basis of increasing levels of a 25 kDa processed species, derived from both the fusion and longer proteins (see Figure 1).

It may be desirable that the second ('free') protein used in method is labeled, or otherwise distinguishable from the membrane-bound protein, e.g. immunologically distinct, to assist in detecting the degree of aggregation of the protein molecules.

For instance, the free form of the aggregating disease protein may be linked to a reporter molecule. The term "reporter molecule", as used in the present specification, is intended to mean a molecule which, by its chemical nature, provides an analytically-detectable signal that allows the detection of antigen-bound antibody. Detection should preferably be quantifiable, to allow determination of the amount of antigen in the sample; this may be calculated in absolute terms, or may be performed in comparison with a standard (or series of standards) containing a known normal level of antigen.

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-33-

Examples are well known to those skilled in the art e.g. enzymes or fluorophores.

Thus the free form of the protein may be directly modified (e.g. marked with a radioactive or enzymatically-detectable label) or conjugated (e.g. to a fluorophore) in a domain of the molecule, for example the N-terminal segment, which is known not to be involved in the high affinity tau-tau binding site, so that it thereby functions both as the ligand in the tau-tau binding assay, and as the reporter molecule.

Where antibodies or fragments thereof are used in embodiments of the method of the present invention may be produced by conventional techniques. Polyclonal antibodies may raised e.g. by injecting the corresponding tau antigen into an animal, preferably a rabbit, and recovering the antiserum by immunoaffinity purification, in which the polyclonal antibody is passed over a column to which the antigen is bound and is then eluted in a conventional manner. Preferably the invention will use monoclonal antibodies which are selective to tau epitopes may be prepared by the method of Kohler and Milstein. Suitable monoclonal antibodies to tau epitopes can be modified by known methods to provide Fab fragments or (Fab')₂ fragments, chimeric, humanised or single chain antibody embodiments. Antibodies according to the present invention may be modified in a number of ways. Indeed the term "antibody" should be construed as covering any binding substance having a binding domain with the required specificity. Thus the invention covers antibody fragments, derivatives, functional equivalents and homologues of antibodies, including synthetic molecules and molecules whose shape mimics that of an antibody enabling it to bind an antigen or epitope.

Generally speaking, where antibodies are employed for detection, the antibody may carry a reporter molecule. Alternatively, detection of binding may be performed by use of a second antibody capable of binding to a first unlabelled, tau-specific antibody. In this case, the second antibody is linked to a reporter molecule.

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-34-

Antibodies may be used in any immunoassay system known in the art, including, but not limited to: radioimmunoassays, "sandwich" assays, enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA); fluorescent immuno-
5 assays, protein A immunoassays, etc. Typically, an immunoblot method is used. Preferably the immunoassay is performed in the solid phase, as would be well known to the skilled person. For instance, an antibody may be adsorbed to e.g. an assay column, and the cellular sample may then be washed through the column under
10 conditions suitable for enabling binding to the solid-phase antibody of any aggregate of the protein of interest, e.g. a tau-tau aggregate, which is present in the membrane of the cell. Excess reagent is washed away, and the binding of aggregated protein to the column can then be detected by any suitable means, e.g. as
15 exemplified above and below.

Preferred monoclonal antibodies are as follows:

- Those which recognise the N-terminal or C-terminal of the tau
20 epitope permit measuring of binding between truncated and full-length tau species. Especially useful are antibodies recognising human-specific epitopes. One such monoclonal antibody (designated 27/499) recognises a human-specific epitope located in the region between Gly-16 and Gln-26 of tau, and thereby permits measurement of
25 binding between full-length tau species, provided one is derived from a non-human source (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).

30
- Those which recognise the core tau fragment truncated at Glu-391. An example is mAb 423 (Novak et al. (1993), loc. cit.). This antibody enables detection of the binding of a truncated core tau fragment terminating at Glu-391 to a similar fragment terminating at
35 Ala-390, which is not recognised by mAb 423. This truncation occurs naturally in the course of PHF assembly in Alzheimer's disease (Mena

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-35-

et al. (1995), (1996), *loc. cit.*; Novak et al. (1993), *loc. cit.*; Mena et al. (1991), *loc. cit.*). Additionally, when tau is bound via the repeat domain *in vitro*, digestion with a protease (e.g. pronase) generates a fragment detectable by mAb 423 (see Wischik et al, 1996, 5 *loc cit*). Figure 17 shows various tau-derived species which may be generated in an assay according to the present invention, and the approximate truncation point in each. mAb 423 may thus be used to demonstrate that the molecular conformation of the tau-tau binding interaction generated in a membrane-localised model system as 10 provided herein corresponds to that which occurs pathologically in the brain, and hence that such model systems according to the present invention represent viable models of Alzheimer's disease-like protein aggregation.

15 - Those which recognise a generic tau epitope in the repeat domain. A preferred embodiment utilises an antibody (e.g. MAb 7.51). Where tau-MAP2 or MAP2-MAP2 aggregation is to be detected, an antibody which detects a generic MAP2 epitope could be used. Antibody 7.51 recognises a generic tau epitope located in the antepenultimate 20 repeat of tau (Novak et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 5837-5841), which is occluded when tau is bound in a PHF-like immunochemical configuration but can be exposed after formic acid treatment (Harrington et al. (1990), (1991), *loc. cit.*; Wischik et al. (1995a), *loc. cit.*). Normal soluble tau, or tau bound to 25 microtubules, can be detected using mAb 7.51 without formic acid treatment (Harrington et al. (1991), *loc. cit.*; Wischik et al. (1995a), *loc. cit.*). Binding of full-length tau in the tau-tau binding assay is associated with partial occlusion of the mAb 7.51 epitope.

30 Antibody 27/342 recognises a non-species specific generic tau epitope located between Ser-208 and Ser238 which is partially occluded in the course of the tau-tau interaction (Lai, *loc. cit.*).

35 The binding sites of some monoclonal antibodies are shown in Figure 4.

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-36-

Screening for Modulators and inhibitors

As described above, the invention is preferably concerned with use
5 of a nucleic acid molecule, polypeptide or derivative thereof, a
host cell, or an *in vitro* protein expression system, as provided
herein, in a method of modeling Alzheimer's disease-like protein
aggregation. Methods of the invention may include the steps of
causing the expression of the nucleic acid molecule in a cell-based
10 or microsome-based expression system, so that the encoded
polypeptide becomes localized in a membrane (e.g. the ER membrane)
of the cell, or in the microsomal membrane, respectively.

In a preferred aspect, there is disclosed a method of identifying a
15 therapeutic agent for treatment of a disease as discussed herein,
which method comprises the step of providing the fusion polypeptide
(and preferably, the second protein discussed above) and contacting
the membrane-localized protein with test substances which are
suspected of being inhibitors or modulators of the disease
20 associated protein aggregation. In particular, the fusion
polypeptides as produced by the modeling methods described above can
be used to investigate and screen for potential inhibitors or
modulators of Alzheimer's disease-like protein aggregation, such as
pathological tau-tau association.

25 Thus the various methods described above may comprise the further
steps of (c) contacting the fusion polypeptide and/or the second
protein with one or more agents which it is desired to assess for
ability to modulate or inhibit the aggregation; (d) monitoring the
30 extent of aggregation, and optionally correlating the extent of
aggregation with the modulatory activity of the agent(s).

Thus a method of identifying a modulator of (preferably
intracellular) aggregation of a protein associated with a disease in
35 which the protein undergoes an induced conformational interaction,
may comprise performing a method for inducing aggregation as

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-37-

described above in the presence of one or more agents suspected of being capable of modulating (e.g. inhibiting or reversing) the aggregation. The degree of aggregation (and optionally proteolytic processing) may be observed in the presence or absence of the agent, and the relative values correlated with its activity as a modulator.

Preferably, where the screening method employs cells which express a membrane-localised form of the protein of interest, such as tau, these may comprise, e.g., cells from a neuronal cell line, e.g. a neuroblastoma cell line, or cells from a fibroblast cell line. In a preferred embodiment, the cells are from a fibroblast 3T6 cell line.

In one embodiment, the present invention relates to a method of screening for agents which are capable of modulating or inhibiting Alzheimer's disease-like protein aggregation, e.g. pathological tau-tau association, the method comprising:

- (1) causing or allowing the synthesis of a membrane-localised form of the aggregating disease protein (e.g. tau or MAP2), or a core fragment thereof (e.g. the core tandem repeat domain of tau or MAP2);
- (2) contacting said fusion polypeptide or derivative with:
 - (A) one or more agents suspected of being capable of modulating or inhibiting aggregation of the aggregating disease protein molecules, and
 - (B) a further aggregating disease protein or core fragment thereof, which is capable of binding to the membrane-associated protein of step (1); and
- (3) detecting the binding, if any, of the protein of step (2)(b) with the fusion polypeptide of step (1).

The tau-like protein used in step (2B) above may, in certain embodiments, be a "free" form of the protein, which term is used herein to distinguish it from the membrane-bound aggregating disease protein of step (1). However, "free" is not intended to exclude the possibility that the aggregating disease protein is complexed with, or otherwise associated with, other molecules or moieties such as

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-38-

carbohydrate moieties or other peptides.

For example, a test substance may be added to a cellular system as described above, and the cells incubated for a period of time
5 sufficient to allow binding and to demonstrate inhibition of binding. The bound tau complex can then be detected, e.g. using a suitably-labeled antibody such as MAb 7.51 in an immunoblot of total cell extract, or any other suitable detection method. If desired, the membrane-bound tau protein can be distinguished from aggregated
10 free tau protein, for example by terminating the sequence of the membrane-bound tau protein at amino acid 390. The aggregated free tau will be proteolytically cleaved at amino acid Gly 391, which can be detected by an antibody specific to that epitope (e.g. MAb 423).

15 Where a screening method is employed for this purpose, i.e. for the identification of modulatory/inhibitory compounds, a non-competitive or competitive assay may be used. For instance, in a competitive assay of the type well known in the art, the effect of a known inhibitor or modulator on Alzheimer's disease-like aggregation can
20 be compared in the presence or absence of further test substances or agents, to determine the ability of the test substance to compete with the known inhibitor/modulator for binding to the protein of interest.

25 *Choice of test compound*

Compounds which are tested may be any which it is desired to assess for the relevant activity

30 The methods can serve either as primary screens, in order to identify new inhibitors/modulators, or as secondary screens in order to study known inhibitors/modulators in further detail.

Agents may be natural or synthetic chemical compounds. Antibodies
35 which recognise an Alzheimer's disease-like protein aggregate and/or which modulate Alzheimer's disease-like protein aggregation form one

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-39-

class of putative inhibitory or modulatory compounds with respect to the aggregation process. More usually, relatively small chemical compounds, preferably which are capable of crossing the blood-brain barrier, will be tested.

5

The skilled person will appreciate that the amount of test substance or compound which is added in a screening assay according to this aspect of the invention will normally be determined by trial and error depending upon the type of compound used. It may be selected to be a level which could realistically be used in therapeutic context i.e. would be non-lethal to a patient.

10

Specificity of inhibition

Screening methods according to this aspect of the present invention may be used to screen for compounds which demonstrate the properties of selective competitive inhibition of pathological Alzheimer's disease-like protein aggregation (e.g. tau-tau or tau-MAP2 binding), without interference with the normal binding of e.g. tau or MAP2 to tubulin via the same region of the molecule (see WO 96/30766).

15
20

A suitable method for determining any possible interference of the binding of tau, MAP2 or a derivative thereof to tubulin by potential inhibitors/modulators of Alzheimer's disease-like protein aggregation, comprises contacting a preparation of depolymerised tubulin/MAP2 or taxol-stabilised microtubules with an agent suspected of being capable of modulating or inhibiting tau-tau or tau-MAP2 association, along with a protein or derivative thereof as mentioned above in step (2) (b), followed by detection of the tau-tubulin or MAP2-tubulin binding. Tau-tubulin binding could also, for example, be demonstrated by a normal cytoskeletal distribution, as described in e.g. WO 96/30766.

25
30

Methods for the preparation of tubulin proteins or fragments thereof, possibly in combination with binding partners, are known in the art and are described e.g. by Slobada et al. (1976, in: Cell

35

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-40-

Mobility (R. Goldman, T. Pollard and J. Rosenbaum, eds.), Cold Spring Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, pp 1171-1212).

Cell viability

5

Where the method utilizes a cell-based system, it may further include the step of testing the viability of the cells expressing the membrane-localised aggregating disease protein, e.g. by use of a lactate dehydrogenase assay kit (Sigma).

10

In the case where tau-tau, tau-MAP2 or MAP2-MAP2 aggregation is being investigated (see above, under 'specificity'), this step may also provide an indication of any interference by the test agent of the binding of tau or MAP2 to tubulin, since inhibition or interference of tau-tubulin or MAP2-tubulin binding will correlate to some extent with a decreased ability of the cells to divide, and thus with decreased cell viability.

Therapeutics and modes of administration

20

Performance of a screening assay method according to the various aspects above may be followed by isolation and/or manufacture and/or use of a compound, substance or molecule which tests positive for ability to interfere with or modulate disease related protein aggregation.

25

The compounds thus identified may be formulated into compositions for use in the diagnosis, prognosis or therapeutic treatment of Alzheimer's disease or the like (indeed any condition in which Alzheimer's disease-like protein aggregation occurs). Thus, the present invention also extends, in further aspects, to pharmaceutical formulations comprising one or more inhibitory or modulatory compound as obtainable by a screening method as provided herein.

30

Following the identification of a substance or agent which modulates

35

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-41-

or affects such protein aggregation, the substance or agent may be investigated further. Other candidate inhibitory/modulatory compounds may be based on modelling the 3-dimensional structure of a polypeptide or peptide fragment and using rational drug design to provide potential inhibitor compounds with particular molecular shape, size and charge characteristics. Thus the present invention provides the use of an agent as identified using a screening method provided herein, or a derivative, active portion, analogue, variant or mimetic thereof which is able to inhibit or modulate Alzheimer's disease-like protein aggregation, in screening for, or designing, further inhibitors/modulators of Alzheimer's disease-like aggregation.

A compound which has been identified as described above, may be manufactured and/or may be used in the preparation, i.e. the manufacture or formulation, of a composition such as a medicament, pharmaceutical composition or drug. These may be administered to individuals.

Generally, an inhibitor or modulator according to the present invention is provided in an isolated and/or purified form, i.e. substantially pure. This may include being in a composition where it represents at least about 90% active ingredient, more preferably at least about 95%, more preferably at least about 98%. Such a composition may, however, include inert carrier materials or other pharmaceutically and physiologically-acceptable excipients. As noted below, a composition according to the present invention may include in addition to an inhibitory/modulatory compound as disclosed, one or more other molecules of therapeutic use.

In this way, a substance according to the present invention, such as an inhibitor of tau-tau aggregation or other such Alzheimer's disease-like protein aggregation, may be provided for use in a method of treatment of the human or animal body of a condition in which Alzheimer's disease-like protein aggregation occurs.

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-42-

The present invention thus extends, in various aspects, to a pharmaceutical composition, medicament, drug or other composition comprising a substance of the invention as described above, a method comprising administration of such a composition to a patient, e.g. for treatment or prophylaxis of Alzheimer's disease or an Alzheimer's disease-like condition, use of such a substance in the manufacture of a composition for administration, e.g. for treating Alzheimer's disease or similar treatment, and a method of making a pharmaceutical composition comprising admixing such a substance with a pharmaceutically acceptable excipient etc. as discussed below.

In particular the invention provides a method of modulating Alzheimer's disease-like protein aggregation in a cell, comprising administering an agent which inhibits or otherwise modulates such aggregation, the method therefore being useful in the treatment of Alzheimer's disease or other diseases or disorders in which Alzheimer's disease-like protein aggregation is implicated. The invention further provides a method of treating an Alzheimer's disease-like condition, which includes administering to a patient an agent which interferes with or otherwise modulates Alzheimer's disease-like aggregation of proteins.

Whether it is a polypeptide, antibody, peptide, nucleic acid molecule, small molecule, mimetic or other pharmaceutically-useful compound according to the present invention that is to be given to an individual, administration is preferably in a "prophylactically effective amount" or a "therapeutically effective amount" (as the case may be, although prophylaxis may be considered therapy), this being sufficient to show benefit to the individual. The actual amount administered, and rate and time-course of administration, will depend on the nature and severity of what is being treated. Prescription of treatment, e.g. decisions on dosage etc, is within the responsibility of general practitioners and other medical doctors.

A composition may be administered alone or in combination with other

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-43-

treatments, either simultaneously or sequentially dependent upon the condition to be treated.

Pharmaceutical compositions according to the present invention, and
5 for use in accordance with the present invention, may include, in addition to active ingredient, a pharmaceutically acceptable excipient, carrier, buffer, stabiliser or other materials well known to those skilled in the art. Such materials should be non-toxic and should not interfere with the efficacy of the active ingredient.
10 The precise nature of the carrier or other material will depend on the route of administration, which may be oral, or by injection, e.g. cutaneous, subcutaneous or intravenous.

Pharmaceutical compositions for oral administration may be in
15 tablet, capsule, powder or liquid form. A tablet may include a solid carrier such as gelatin or an adjuvant. Liquid pharmaceutical compositions generally include a liquid carrier such as water, petroleum, animal or vegetable oils, mineral oil or synthetic oil. Physiological saline solution, dextrose or other saccharide solution
20 or glycols such as ethylene glycol, propylene glycol or polyethylene glycol may be included.

For intravenous, cutaneous or subcutaneous injection, or injection
at the site of affliction, the active ingredient will be in the form
25 of a parenterally acceptable aqueous solution which is pyrogen-free and has suitable pH, isotonicity and stability. Those of relevant skill in the art are well able to prepare suitable solutions using, for example, isotonic vehicles such as Sodium Chloride Injection, Ringer's Injection, Lactated Ringer's Injection. Preservatives,
30 stabilisers, buffers, antioxidants and/or other additives may be included, as required.

Examples of techniques and protocols mentioned above can be found in
Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed),
35 1980.

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-44-

The agent may be administered in a localised manner to the brain or other desired site, or it may be delivered systemically in a manner such that it targets the brain or other cells. For instance, targeting therapies may be used to deliver the active agent more specifically to certain types of cell, by the use of targeting systems such as antibody or cell-specific ligands. Targeting may be desirable for a variety of reasons, for example if the agent is unacceptably toxic, or if it would otherwise require too high a dosage, or if it would not otherwise be able to enter the target cells.

Instead of administering these agents directly, they may be administered in a precursor form, for conversion to the active form by an activating agent produced in, or targeted to, the cells to be treated.

An agent which is able to interfere with Alzheimer's disease-like protein aggregation may be provided in a kit, e.g. sealed in a suitable container which protects its contents from the external environment. Such a kit may include instructions for use.

Animals

Although much of the foregoing discussion has been concerned with cell-line or *in vitro*-based assays, the invention disclosed herein has particular utility in animal-based assays.

Thus host cells according to the present invention may be comprised in a transgenic animal, and the present invention further provides a transgenic animal, comprising cells which express a fusion polypeptide according to a preceding aspect, such as a membrane-localised form of the tau core fragment. Such animals may be prepared and/or used in analogous manner to those discussed in US 5,912,410 and 5,898,094 which disclosures are incorporated herein by cross-reference.

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-45-

The transgenic organisms of the invention all include within a plurality of their cells a cloned recombinant or synthetic DNA sequence which is believed to relate to the pathogenesis of a disease of protein aggregation. More specifically, the transgenic organisms contain specific sequences of exogenous genetic material, such as the sequences described above in detail which are comprised of a tissue specific promoter sequence and a sequence which encodes for production of a membrane targeted protein. Since it is possible to produce transgenic organisms of the invention utilizing one or more of the above-described sequences, a general description will be given of the production of transgenic organisms by referring generally to exogenous genetic material. This general description can be adapted by those skilled in the art in order to incorporate the above-described specific DNA sequences into organisms and obtain expression of those sequences utilizing the methods and materials described below. For more details regarding the production of transgenic organisms, and specifically transgenic mice, refer to U.S. Pat. No. 4,873,191, issued Oct. 10, 1989 (incorporated herein by reference to disclose methods producing transgenic mice), and to the numerous scientific publications referred to and cited therein.

The exogenous genetic material may be placed in either the male or female pronucleus of the zygote. More preferably, it is placed in the male pronucleus as soon as possible after the sperm enters the egg. In other words, right after the formation of the male pronucleus when the pronuclei are clearly defined and are well separated, each being located near the zygote membrane. The male pronucleus of a fertilized mouse egg is the preferred site for addition of the exogenous genetic material of the present invention.

It is most preferred that the exogenous genetic material be added to the male DNA complement of the zygote prior to its being processed by the ovum nucleus or the zygote female pronucleus. It is thought that the ovum nucleus or female pronucleus release molecules which affect the male DNA complement, perhaps by replacing the protamines of the male DNA with histones, thereby facilitating the combination

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-46-

of the female and male DNA complements to form the diploid zygote.

Thus, it is preferred that the exogenous genetic material be added to the male complement of DNA or any other complement of DNA prior to its being affected by the female pronucleus. For example, the exogenous genetic material is added to the early male pronucleus, as soon as possible after the formation of the male pronucleus, which is when the male and female pronuclei are well separated and both are located close to the cell membrane. Alternatively, the exogenous genetic material could be added to the nucleus of the sperm after it has been induced to undergo decondensation. Sperm containing the exogenous genetic material could then be added to the ovum or the decondensed sperm could be added to the ovum with the exogenous genetic material being added as soon as possible thereafter.

For the purposes of this invention a zygote is essentially the formation of a diploid cell which is capable of developing into a complete organism. Generally, the zygote will be comprised of an egg containing a nucleus formed, either naturally or artificially, by the fusion of two haploid nuclei from a gamete or gametes. Thus, the gamete nuclei must be ones which are naturally compatible, i.e., ones which result in a viable zygote capable of undergoing differentiation and developing into a functioning organism. Generally, a euploid zygote is preferred. If an aneuploid zygote is obtained, then the number of chromosomes should not vary by more than one with respect to the euploid number of the organism from which either gamete originated.

In addition to similar biological considerations, physical ones also govern the amount of exogenous genetic material which can be added to the nucleus of the zygote or to the genetic material which forms a part of the zygote nucleus. If no genetic material is removed, then the amount of exogenous genetic material which can be added is limited by the amount which will be absorbed without being physically disruptive. Generally, the volume of exogenous genetic material inserted will not exceed about 10 picoliters. The physical

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-47-

effects of addition must not be so great as to physically destroy the viability of the zygote. The biological limit of the number and variety of DNA sequences will vary depending upon the particular zygote and functions of the exogenous genetic material and will be readily apparent to one skilled in the art, because the genetic material, including the exogenous genetic material, of the resulting zygote must be biologically capable of initiating and maintaining the differentiation and development of the zygote into a functional organism.

10

The number of copies of the DNA sequences which are added to the zygote is dependent upon the total amount of exogenous genetic material added and will be the amount which enables the genetic transformation to occur. Theoretically only one copy is required; however, generally, numerous copies are utilized, for example, 1,000-20,000 copies of a gene, in order to insure that one copy is functional. As regards the present invention, there is generally an advantage to having more than one functioning copy of each of the inserted exogenous DNA sequences to enhance the phenotypic expression of the exogenous DNA sequences.

20

Any technique which allows for the addition of the exogenous genetic material into nucleic genetic material can be utilized so long as it is not destructive to the cell, nuclear membrane or other existing cellular or genetic structures. The exogenous genetic material is preferentially inserted into the nucleic genetic material by microinjection. Microinjection of cells and cellular structures is known and is used in the art.

25

Thus the present invention provides methods in which cloned recombinant DNA sequences encoding appropriate membrane targeting sequences may be injected into fertilized mammalian eggs (preferably mouse eggs). The injected eggs are implanted in pseudo pregnant females and are grown to term to provide transgenic mice whose cells express proteins related to the pathology of the relevant disease. The injected sequences are constructed having promoter sequences

30

35

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-48-

connected so as to express the desired protein in specific tissues of the transgenic mammal (most notably in nerve tissue). Suitably, the vector is adapted for neurone-specific expression to produce Alzheimer's Disease-like aggregation such as is now known to occur in the human brain. Examples may include the prion specific promoter of Lewis et al (2000) or the neurospecific enolase promoter e.g. of Thuncke et al (2000).

Non-human animals of the invention may be homozygous or heterozygous for the fusion polypeptide. Mammalian animals include non-human primates, rodents, rabbits, sheep, cattle, goats, pigs. Rodents include mice, rats, and guinea pigs. Specifically provided are:

- Methods of preparing a transgenic animal model with enhanced or accelerated pathology for a disease of protein aggregation and the transgenic animal made by such methods.
- Methods of producing an F₁ generation by crossing a founder animal of either sex (F₀ generation) with an animal which is non-transgenic in respect of the proteins discussed herein, and is preferably wild-type). The offspring (F₁ generation) may then be screened and those which carry a transgene resulting in an enhanced pathology for the disease, are selected.
- Methods of producing an F₂ generation by crossing 2 F₁ animals of appropriate sex. The offspring (F₂ generation) may then be screened and those which carry a transgene in the appropriate dosage (i.e. hetero or homozygous) resulting in an enhanced pathology for the disease, are selected.
- A method of modulating the disease phenotype of a transgenic animal model, and the transgenic organism with the modulated phenotype, as described above.

Transgenic non-human mammals of the invention may thus be used for experimental purposes in studying Alzheimer's-like diseases, and in the development of therapies designed to alleviate the symptoms or progression of such conditions. By "experimental" it is meant permissible for use in animal experimentation or testing purposes

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-49-

under prevailing legislation applicable to the research facility where such experimentation occurs.

The animal may be used to screen for or test potential diagnostic, therapeutic or prognostic agents of Alzheimer's disease-like protein aggregation (see below for further discussion). This aspect of the invention thus provides an animal model which can aid in the investigation of Alzheimer's disease and Alzheimer's disease-like conditions. In the *in vivo* model system, the Alzheimer's disease-like condition is induced in the animal by causing or allowing a membrane-localised Alzheimer's disease-like protein aggregate to be synthesised in the cells. Using this model system, a compound suspected of having a therapeutic effect in relation to Alzheimer's disease or an Alzheimer's disease-like condition can be administered to the animal, and any effects on the condition (e.g. improvements in symptoms, or any other suitable indicator) can be studied. In particular, the transgenic mammals of the present invention are useful in determining the effectiveness of pharmaceutical drugs with respect to their ability to decrease the amount of aggregates which form within the brain of the animal. These aggregates may be measured by biochemical and/or histological techniques used in measurements of AD in humans (see e.g. Mukaetova-Ladinska, E.B. *et al.* (2000) *loc cit.*).

Most preferably the aggregation (or inhibition thereof) is assessed by the production (or inhibition, or abelition, of production) of truncated fragments of tau resulting from proteolytic processing e.g. of endogenous, full length, tau. In preferred embodiments the aggregation of tau is evidenced by proteolytic processing to a truncated core fragment corresponding to that found in the actual AD PHF core. However the production of any one or more other fragments which are diagnostic products or bi-products of this process may also be used.

The mammals are thus useful in testing the efficacy of such drugs, in a pharmacokinetic context, in preventing the formation or

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-50-

reducing the amount of aggregation formed as well as eliminating or reducing aggregation already formed.

Generally speaking, a drug to be tested is administered to a control
5 animal or group of animals which are not the transgenic animals of
the invention and simultaneously to transgenic animals of the
invention. The drug is preferably continuously administered over a
period of time which is normally sufficient to effect the formation
of aggregates in the brain of the animal. After administering the
10 drug for a sufficient period of time the control animal(s) along
with the transgenic animal(s) are sacrificed. Examination of the
brain of the animals is made as described above.

In such a system, the effect of a potential inhibitor or modulator
15 of protein aggregation can be determined or detected as described
above e.g. by immunoassay, for instance to observe the inhibition
of the formation of tau, or tau-like aggregates such as those
detected in human brain tissue by the methods of e.g. Wischik *et al.*
(1995; loc. cit.), Lai *et al.* (1995; loc. cit.), or Mukaetova (2000;
20 loc. cit.) in which measurement of aggregated forms of tau protein
is undertaken in brain tissues.

For instance, the production of aggregates within cells may be
visualized histologically and by electron microscopy, and the
25 prevention of these aggregates similarly assessed.

By comparing the amount of aggregate deposit within the control
animal(s) to the amount of deposit within the transgenic mammal(s)
of the invention a determination can be made with respect to the
30 effectiveness of the drug. Comparative drug testing protocols known
to those skilled in the art can be used in connection with the
transgenic mammals of the invention in order to test drugs. The
final intracellular concentration of the drug may be selected to be
appropriate to the precise disease protein and drug in question, but
35 may be in a range which will ultimately be appropriate for clinical
usage in terms of toxicity, uptake etc. (e.g. 1 μM - 1mM more

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-51-

preferably 4 - 600 μ M).

The *in vivo* screening assay of the invention need not directly measure the degree of inhibition of, or modulation of, Alzheimer's disease-like protein aggregation caused by the compound being tested. Instead the downstream effect on the pathological condition itself, e.g. Alzheimer's disease, may be measured. For instance, it would be anticipated that there would be behavioral effects in the animals, such as defects of movement, power or tone, abnormal reflexes, evidence of defective memory or response to environmental cues.

In that the transgenic animals of the invention can be used to test the efficacy of drugs with respect to preventing disease-associated protein aggregation, the animals are valuable research tools with respect to allowing researchers to test the efficacy of such drugs in treating diseases such as Alzheimer's disease. If preferred, in all cases, the transgenic animal assay may be run in parallel with, or subsequent to, an *in vitro* or cell-based assay, e.g. according to preceding aspects of the present invention, in order to confirm that any effect on the condition itself is as a result of the inhibition of Alzheimer's disease-like protein aggregation and not merely a general toxic effect.

Thus, as is described in detail above, the present invention relates *inter alia* to the use of a nucleic acid molecule, polypeptide or derivative thereof, a host cell, a transgenic animal or an *in vitro* membrane-localized model system, all as provided herein, in methods of screening for test substances having an inhibitory or modulatory effect on Alzheimer's disease-like protein aggregation. In further aspects, the present invention extends to inhibitory or modulatory compounds obtainable using a screening method of a preceding aspect.

Various further aspects and embodiments of the present invention will be apparent to those skilled in the art in view of the present disclosure. Certain aspects and embodiments of the invention will

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-52-

now be illustrated by way of example only, and with reference to the following Figures and Examples.

Figures

5

Figure 1 shows a diagrammatic illustration of an assay according to the invention as described in Example 1 (cell based) and Example 3 (animal model).

10 (A) (1:) Assay based on constitutive expression of membrane-targeted sequence alone, in this case a Signal Sequence plus truncated tau (SStau190-441). The membrane associated molecules combine leading to formation of a 25 kD fragment. As shown in Figure 17(a) the 25 kD fragment contains immunoreactivity associated with the repeat domain and the C-terminus, but not an epitope located between residues 208
15 - 238. The fragment length is ~ 175 residues and the likely N-terminal cleavage site is at residue ~266, the phase-shifted N-terminus of the first repeat found in tau protein isolated from the PHF-core.

20

(A) (2:) Assay based on second protein (T40 - full-length tau), the proteolytic cleavage of which is "seeded" by the presence of low background levels of SStau190-441 which is targeted to the endoplasmic reticulum by the signal sequence. T40 induced by IPTG is
25 bound to the SStau190-441 species either at the membrane or after release of the SStau190-441-derived aggregate into the cytosol. This captured T40 is now further processed first to give rise to increased levels of a species with gel mobility and immunoreactivity identical to that of the SStau190-441-derived species. It is then
30 further processed through the same pathway to generate increased levels of the 25 kD degradation product. Tau aggregation inhibitors block T40-derived production of the 25 kD fragment in the presence of IPTG.

35 (B) Assay based on second cleavage pattern of SStau190-441. In this case the membrane-associated molecules combine in a slightly

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-53-

different manner through the repeat region to give rise to three further truncation products (seen in Figure 17(a)) with gel mobilities 30 kD (~200 residues), 18 kD (~125 residues) and 12/14 kD (~95 residues).

5

(C) Assay based on constitutive expression and aggregation of SStau190-390. In this case, proteolytic processing gives rise to a single predominant species with gel mobility of 18 kD (~125 residues). This arises by aggregation of SStau190-390 molecules through the repeat domain, giving rise to a proteolytically protected fragment derived entirely from the repeat domain (ie ~266 - ~390). In a variant of the repeat domain binding pattern, illustrated in Figure 17(b)), a slightly different 18 kD species could arise by association of SStau190-390 with low background levels of T40, to give rise to a fragment equivalent to 4-repeats in length (ie ~125 residues), but extending by the equivalent of 1 repeat beyond 390 within the C-terminal tail of the molecule (ie ~295 - ~422). In a different scheme illustrated in Figure 16d, small quantities of a fragment consisting of only 3 repeats (ie ~95 residues) are able to form minority dimeric forms with atypical gel mobility corresponding to ~19/22 kD.

(D) Assay based on constitutive expression of SStau296-390 in the presence of background T40. In this case, two predominant species are formed, one of 12/14 kD corresponding to the SStau296-390 fragment itself, and a further species with gel mobility of 18 kD. The latter cannot be a degradation product of SStau296-390. It is also unlikely to be a major form of the dimer (see Figure 16d) which has a predominant gel mobility corresponding to 24 kD. Therefore, the 18 kD is most likely to arise by truncation of T40 which has been captured by an SStau296-390 aggregate. This species again corresponds to the equivalent of 4 repeats (ie ~125 residues), and could arise through two possible binding interactions between T40 and the SStau296-390 aggregate as shown. In this model the rate limiting step for the formation of the 18 kD species from T40 may be the determined by the amount of aggregating, truncated, tau in the

35

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-54-

system.

(E) Assay based on constitutive expression of SSttau296-390 within the transgenic mouse brain. As in the system described in (D), the predominant product is not the SStau296-390 itself, but a higher molecular weight species of 18 kD. For the reasons discussed above, this is unlikely to be a dimer or a degradation product of the SStau296-390 species introduced into the animal transgenically. Rather, it is most likely to arise by the capture and proteolytic processing of endogenous mouse tau. In this case, the mouse brain is known to express only the 3-repeat isoform. The 18 kD fragment generated in this case is most likely to be the form with the C-terminal extension giving rise to a species the equivalent of 4 repeats in length (~125 residues, or the fragment between residues ~266 and ~422 in the 3-repeat isoform). However, a slightly different binding pattern is also possible, in which the extension is into the N-terminus (ie the fragment between residues ~235 and ~390 in the 3-repeat isoform).

Figure 2. The inhibitory activities of thionine, chlorpromazine and tacrine were compared in the membrane-targeted cell model (production of 25 kD species). There is a clear distinction between active and inactive compounds (see Example 2).

Figure 3. The data from Figure 2 was analysed in greater detail mathematically using a standard inhibitory model, and a numerical procedure (Gauss-Newton method) to solve for KI. The data could be approximated very closely by assuming a Kd value for tau-tau binding within the cell of ~500 nM, and a corresponding KI value of ~33 nM. The significance of these values can be understood by comparing with what is known of the influence of phosphorylation on tau-tau binding in vitro (see Wischik, C.M., *et al.* (1997) *loc cit*).

Figure 4 (a) shows a schematic illustration of the structure of a paired helical filament (top) and the immunochemistry of neurofibrillary tangles during progression of Alzheimer's disease

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-55-

(bottom). Figure 4 (b) shows a schematic illustration of the binding sites of various monoclonal antibodies to different forms of N- and C-truncated tau.

5 Figure 5 (a) shows the nucleotide and predicted amino acid sequences of a human tau protein isoform. The sequence was deduced from cDNA clone httau40. Figure 5 (b) shows the sequences of some of the constructs of the present invention.

10 Figure 6 (a) shows constructs used for microinjection to prepare transgenic mice. These are (i) Thy1-sstau296-390, and (ii) Thy1-sstau186-441. Figure 6 (b) shows construct Thy1-SStau296-390 in more detail. This was cloned into the Thy-1 expression vector and was then microinjected into fertilized oocytes of NMRI mice using
15 methods from: "Manipulating the mouse embryo", a laboratory manual, second edition, Cold Spring Harbour Press, CSH, N.Y. Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F., Lacy, E., editors, 1994).

Figure 7 shows a schematic representation of tau, MAP2 (adult form),
20 MAP2C (juvenile form) and high molecular weight tau (found in the PNS and neuroblastoma cell lines). These proteins share similar microtubule-binding domains, but differ substantially in sequence and extent of the N-terminal projection domain. The juvenile forms of tau and MAP2 have only 3 of the tandem repeats. A 4-repeat form
25 of MAP2 also exists.

Figure 8 shows sequence differences in the tandem repeat region of human tau (upper line) and human MAP2 (lower line). Vertical arrows show the limits of the truncated PHF-core fragment terminating at
30 Glu-391, and the tubulin-binding segments are shown underlined.

Figure 9 shows a construct according to one embodiment of the present invention. (a) The signal sequence of rat albumin was inserted in front of the start codon of the cDNA encoding rabbit
35 globin to achieve membrane targeting of the globin mRNA. Figure 9(b) shows a fragment of the human tau cDNA encoding amino acids

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-56-

190-441 was inserted to replace part of the globin sequence, to effect expression of a tau fragment with an N-terminal signal sequence. The globin 5' and 3' UTRs were retained in the construct.

5 Figure 10 shows a summary of tau fragments of the present invention which were expressed in host cells. Three fragments of tau, all containing the core aggregation domain, were expressed with N-terminal signal sequences. For comparison, soluble forms of two of the fragments were also expressed, as well as full-length tau.

10

Figure 11 shows the localization of SStau190-390 after stable transfection of 3T6 cells. 3T6 cells isolated as stable clones after transfection with a cDNA encoding amino acids 190-390 of the longest isoform of human tau linked to an N-terminal signal sequence
15 were incubated with 5 mM sodium butyrate for 20 h to increase protein expression, fixed with paraformaldehyde and labeled with mAb 7.51 directed against the repeat domain of tau. These cells show similar tau morphology to cells expressing SStau190-441, but cells isolated after stable transfection with SStau190-390 consistently
20 showed higher levels of expression of the tau fragment, with a higher proportion showing large tau aggregates (see Example 1).

Figure 12 shows a Northern blot analysis of wild-type ("wt") and transgenic mouse line 1 ("1") RNA with a specific probe showing a
25 high expression level of transgenic RNA in transgenic mouse line 1. S26 control shows same loading amounts (see Example 3).

Figure 13 shows purification of the SStau290-391 by immunoprecipitation using mAb 7.51. 0.1g mouse brain was homogenized
30 using 500µl lysis buffer (150mM NaCl, 0.01%SDS, 0.1% NP40, 50mM Tris, 100µg/ml PMSF, 1mM DTT, 1µg/ml Leupeptin). The suspension was then sonicated on ice for 1min and spun down with a benchtop (Eppendorf) centrifuge at 14,000rpm for 4min. This leads to the "S1" supernatant fraction. The first immunoprecipitation was undertaken
35 using mAb 342 to deplete the preparation of endogenous mouse tau. The S1 fraction was incubated with 1/10 volume of antibody 342

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-57-

(1:10), incubated for 2h at 4°C with rocking, then 100µl of ProteinA sepharose beads (10% v/v in lysis buffer) were added, incubated for 1h at 4°C, centrifuged with a benchtop centrifuge at 14,000rpm for 30sec. Supernatant was taken for further immunoprecipitation using mAb 7.51. 1/10 v/v of 7.51 was added, incubated for 2h at 4°C with rocking. 40µl of ProteinA sepharose beads were added, incubated for 1h at 4°C, centrifuged for 15sec at 14000rpm, washed 3 times with the above mentioned lysis buffer. Then, 30µl of laemmli sample buffer was added, heated to 85°C for 5min, centrifuged for 30sec.

10 Supernatant was then loaded onto 15% SDS-Page gel. The IP751 lanes indicate a difference at ~12-14 kD corresponding to presence of the SStau290-391 protein product in a transgenic animal from line 1. The dark background at higher molecular weight is due to presence of endogenous mouse immunoglobulins detected in the course of

15 development of the immunoblot (see Example 3).

Figure 14 shows the S1 fraction prepared in lysis buffer as indicated above without immunoprecipitation. Immunoblotting using mAb 7.51 revealed in addition to the ~12-14 kD band corresponding to the transgene a new more prominent species with gel mobility ~18 kD. This was seen in all line 1 individuals to varying degrees according to the age of the animal up to 15 months. Three are shown of ages 5 months, 4 months and 4 months respectively. Epitope mapping (not shown) demonstrated that the 18 kD species was recognised recognised

20 by mAb 7.51 (epitope in the repeat domain) and a polyclonal antiserum K9JA ("DAKO A/S", also recognising epitopes located in the repeat domain of tau). The 18 kD species was not recognised by the C-terminal polyclonal antiserum T46.1 or mAb 342, which recognises an epitope located between residues 208 ~ 238. The 18 kD species

25 cannot arise as a degradation of product of the transgene product, nor can it arise as a dimer of SStau296-390. The 18 kD species is therefore likely to be generated by aggregation-dependent proteolytic processing of endogenous mouse brain tau as shown in Figure 1.

35 Figure 15 shows two dimensional gel electrophoresis (2DE), silver

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-58-

stain and immunoblotting. 500mg of mouse brain was homogenized in 2ml of lysis buffer (see above), sonicated on ice, centrifuged at 14000rpm. The S1 fraction was taken and boiled for 5min at 95°C, centrifuged at 14000rpm for 5min, supernatant was taken and concentrated 10-fold using a centricon3000. 20% of this protein suspension was loaded onto a 2-DE gel. 1st dimension isoelectric focusing, 2nd dimension 15% SDS-PAGE. Gels were silver stained and in parallel gels were run under same conditions and blotted, then incubated with 7.51 antibody (see above). The black arrows show the 12-14 kD gene product and a doublet corresponding to the 18 kD species. In addition there is an as yet uncharacterised smear of lower gel mobility which also distinguished the transgenic animal from the wild-type. This smear is likely to contain several higher molecular weight tau products also derived from endogenous mouse tau. Other isolated higher molecular weight tau-immunoreactive spots are also variably observed, depending preparative protocol used (see Example 3).

Figure 16 shows the results obtained with the various cell lines of Example 1.

Figure 16 (a) shows an analysis of cells expressing tau fragments by immunoblotting. Cells stably expressing tau fragments, and also expressing full-length tau under the control of an IPTG-inducible promoter, were incubated with 5 mM IPTG or 5 mM sodium butyrate for 24 h before analysis on 15% SDS gels followed by immunoblotting with the mAb 7.51, which binds to an epitope in the repeat domain of tau. The SStau190-441 protein has an apparent RMM of ~40K on gels, and is degraded to a fragment of ~25K. In contrast the soluble tau186-441 fragment and soluble T40 show different degradation profiles. Induction of full-length tau (I) in cells expressing SStau190-441 causes increased appearance the 40K, 25K proteins, and possibly a small amount of a 30K fragment. Increasing expression of the transfected protein by addition of sodium butyrate (B) also increases the amount of both fragments, and induces the appearance of the 30K fragment.

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-59-

In Figure 16(b) The SStau190-390 protein has an apparent RMM of ~30K, with a small amount of a degradation product at ~18K. Induction of full-length tau causes a slight increase in the amount of the 30K protein. Butyrate treatment causes a larger increase in the amount of the 30K fragment, and also increases the amount of the 18 kD fragment. This pattern of degradation is not seen for the soluble 186-391 fragment or the full length T40.

Figure 16 (c) shows an analysis of cells expressing tau fragments by immunoblotting. Cells stably expressing the tau fragment SStau296-390 and also expressing full-length tau under the control of an IPTG-inducible promoter, were incubated with 5 mM IPTG ("I") or 5 mM sodium butyrate ("B") for 24 h before analysis on 15% SDS gels followed by immunoblotting with mAb 7.51, which binds an epitope in the repeat domain of tau. The unlabelled lane shows only a minor band with gel mobility corresponding to 18 kD. The lane designated "B" shows a prominent gel band with mobility corresponding to 18 kD and a minor band corresponding to 14 kD. The lane designated "I" shows a minor band with gel mobility corresponding to 18 kD. The derivation of the 18 kD band in this cell system is explained in Figure 1(d). As the tau fragment SStau296-390 has gel mobility of ~14 kD, the 18 kD species cannot arise as a degradation of product of the introduced tau fragment, nor is there evidence of formation of the 24 kD dimer seen e.g. in Figure 16(d).

Figure 16 (d) shows how the tau dGAE fragment (residues 297 - 391) expressed bacterially in vitro aggregates spontaneously to form a series of higher order oligomers, of which the major form has gel mobility ~24 kD. There are minor atypical oligomers with gel mobility ~19/22 kD, which are most likely to be partially degraded forms of the dimer.

Figure 16(e) left hand panel replicates the effect shown in (a), wherein IPTG gives rise to increased levels of 25K, 30K and 40K proteins, for comparison. The same experiment conducted in the

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-60-

presence of thionine blocks production of the 25K protein, and also reduces production of the 30K protein. Thionine does not, however, reduce detected levels of the 25K and 30K bands seen with butyrate. Therefore thionine is shown to block the capture and processing of full length tau that gives rise to the 25K band.

Figure 17 (a) shows the proteolytic processing of SStau190-441. Cells expressing SStau190-441 and induced to express full-length tau by treatment with IPTG (right-hand lane) were analysed with four antibodies recognising epitopes located along the length of tau. The gel shows analysis using mAb 7.51, which recognises the repeat domain of tau, reveal all of the tau fragments which contain the core aggregation domain. The remaining columns show a summary of the reactivity of the mAb 7.51 positive fragments with three other antibodies. The results are also shown in a schematic representation of the fragments produced by processing of full-length tau and SStau190-441. Only full-length tau is recognised by all four antibodies. A fragment slightly larger than the SStau190-441 is produced by N-terminal truncation of full-length tau. Two fragments smaller than SStau190-441 are produced by either N-terminal or C-terminal processing. The two smallest fragments only react with the antibody to the core domain, demonstrating proteolytic stability of this domain. Figure 17 (b) shows the proteolytic processing of SStau190-390. Cells expressing SStau190-390 and treated with sodium butyrate (right-hand lane) produce SStau190-390 and a single proteolytic product of ~18 kD. As shown on the table and schematically at the right, the 18 kD species is immunoreactive only with mAb 7.51. The probable boundaries of the fragment are shown on the right, with reasons indicated described in Figure 1.

Figure 18 shows the sedimentation of tau aggregates from cell extracts. Cells expressing (a) SStau190-441 or (b) SStau 190-390, and induced to express full-length tau, were homogenised and spun at 720g for 3 min to produce a post-nuclear supernatant (pns). The pns was spun at 12,000g for 2 min to sediment membranes and large aggregates, and the supernatant from this spin was spun at 200,000g

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-61-

for 22 min. The same analysis was performed on pns that had been treated with 0.1% Triton X-100 to solubilise membrane proteins. Comparison of the 12K supernatants without and with detergent (lanes 3, 7) shows that more protein is present in the supernatant after detergent extraction. In both cases, a significant amount of protein also appears in the pellet (lanes 4,8). Centrifugation of the 12K supernatants at 200Kg sediments the remaining protein (lanes 6, 10).

10 Figure 19 (a) shows a conceptual scheme wherein critical nucleating factors provide a 'seed' which initiates tau capture, which then becomes autocatalytic. Figure 19 (b) shows a putative pathogenic model of Alzheimer's disease. Tau aggregation is a proximal process prior to failure of axonal transport and consequent neuronal death.

15 The tau aggregation cascade can be triggered either by a seeding/nucleation event arising from upstream changes or from primary mutations in the tau gene.

Figure 20 shows a table listing proteins which play a role in diseases of protein aggregation. Also listed are the diseases themselves, the aggregating domain and/or mutation believed to be involved, and the putative (maximum) fibril subunit size. One or more literature references for each protein is given.

25 Figure 21 Sequence analysis of proteins in the PHF-core preparation after removal of acid-soluble PHF-tau. The residue was solubilised according to the scrapie-fibril protocol of Stahl et al (1990, Biochemistry 29, 8879-8884). Yields are given for a typical preparation from a single AD brain. The protein fragments and

30 corresponding residues identified as copurifying with PHF-core tau protein in bands of apparent gel mobility are shown in kD. The non-tau proteins copurifying in the form of SDS- and electrophoresis-resistant complexes are: ubiquitin, porin and core-protein-2 of mitochondrial complex III ("core-2"). ATP-synthase subunit 9 ("ATP-9") was found in a form which Co-purified with the A β protein of plaques. Porin sequences were also identified from Asp-N' and CNBr**

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-62-

digests of the 34 kD species.

Examples

5 Example 1 - production of membrane bound protein

Introduction

10 An mRNA for a protein that is normally translated on free ribosomes
can be targeted to membrane-bound ribosomes by inclusion of a signal
sequence (SS) of a secreted protein; the nature of the 3'UTR also
influences the efficiency of the targeting (Partridge, K.A., et al.
(1999) *Cytotechnology* 30, 37-47). A protein that is normally
15 soluble can therefore become inserted into the membrane of the
endoplasmic reticulum. The present inventors have used this
approach to construct a membrane-associated form of tau that creates
the localised concentration of tau needed to promote aggregation.

20 Cell lines stably expressing these membrane-associated forms of tau
show evidence of tau aggregation and proteolytic processing by the
criteria of histology, sedimentation of insoluble forms of tau
protein from cell extracts and analysis of proteolytic products by
immunoblotting.

25 *Overview of expression system*

The expression system used for production of membrane associated tau
fragments is summarised in Figure 9. The system is based on the
observation that rabbit globin mRNA is translated on membrane-bound
30 ribosomes if the signal sequence of rat albumin is inserted at the
5' end of the cDNA (Partridge, K.A., et al., *loc. cit.*). The vector
previously described for expression of globin (Figure 9a) was
modified to incorporate fragments of the tau sequence downstream of
the signal sequence, while at the same time maintaining the globin
35 3'UTR (Figure 9b).

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-63-

Three truncation mutants of tau (amino acids 296-390, 190-441 and 190-390), referred to as SStau296-390, SStau190-441 and SStau190-390, respectively, were expressed using this system. The structures of these mutants, together with full-length tau and the equivalent soluble tau fragments used as controls, are summarized in Figures 5 and 10. The proteins were expressed constitutively in 3T6 cells that also express the full-length tau sequence under the control of an IPTG-inducible promoter.

10 Construction of SStau constructs.

pcKSSGG as shown in Figure 9a and described by Partridge et al (1999) *loc cit*.

15 PCR-based mutagenesis on pcKSSGG to introduce an AgeI site at the globin start codon to make pcKSSGGAgeI.

forward primer: 5'-gccttttcaccggtgcacatctgtcca-3'

20 reverse primer: 5'-tggacagatgcaccggtgaaaaggc-3'

htau40 cDNA (see Goedert et al, 1989 *Neurone* 3, 519-526).

pcKSStau190-441

25 PCR-based mutagenesis on httau40 to introduce an AgeI site at nucleotide 1128 of httau40 (amino acid 186). Fragment cut with EcoRI (cuts the tau sequence beyond the stop codon), blunted, then with AgeI, ligated into pcKSSGGAgeI cut with BamHI, blunted, then AgeI to
30 make pcKSStau190-441. The ligation destroys the tau sequence between amino acids 186-189, so amino acid 190 is the start of the tau sequence.

forward primer: 5'-tctggtgaaccggtataatacgggg-3'

35

reverse primer: 5'-ccccgtatttaccggaacaccaga-3'

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-64-

pcKSStau190-390

PCR-based mutagenesis on pcKSStau190-441 to introduce a BamHI site
5 and stop codon at nucleotide 1740 (terminates the tau sequence at
amino acid 390). Fragment cut with AgeI and BamHI and ligated into
pcKSSGGAgeI at the same sites to make pcKSStau190-390.

forward primer: 5'-cttgactcagctacgccccctgg-3'

10

reverse primer: 5'-cgggcgtaggataagtacaagtcg-3'

pcKSStau296-390

PCR-based mutagenesis on pcKSStau190-390 to introduce an AgeI site
15 at nucleotide 1450 (amino acid 293) of pcKSStau190-390. Fragment
cut with AgeI and BamHI and ligated into pcKSSGGAgeI at the same
sites to make pcKSStau290-390.

forward primer: 5'-ggctcaccggttaatatcaaac-3'

20

reverse primer: 5'-gtttgatattaaccggtgagcc-3'

These constructs are in the expression vector pcDNA3.1, which
contains the G418 resistance marker. All were subcloned in the
25 pcDNA3.1zeo vector, which contains the zeocin resistance marker, for
transfection into the T40 inducible cell line.

Construction of T40 inducible construct

30 This was based on the Stratagene system (Catalog No. 217450) in
which a p3'SS vector (constitutively expressing the *lac I* gene, and
selected for using hygromycin) is used in conjunction with
pOPRSVICAT (which includes the strong RSV promoter with operator
sequences from the *Lac* operon, and is selected for with neomycin).
35 Briefly, the two vectors are incorporated into cells, such as 3T3 or
3T6 fibroblasts. The repression of the operon by *lac I* is relieved

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-65-

by the addition of IPTG. To prepare the T40 construct, the tau protein fragment was cloned into the pOPRSVICAT vector (which contains a NotI site) according to the manufacturer's instructions.

5 Results

The cells were analyzed by immunofluorescence labeling using an antibody directed against the core aggregation domain, mAb 7.51 (Novak, M., et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 5837-5841).

10 By way of control, stably transfected 3T3 cells expressing the soluble tau fragment 186-441 were fixed with two different fixation conditions (a) paraformaldehyde or (b) glutaraldehyde and Triton X-100 and labeled with mAb 7.51 directed against the repeat domain of tau. After paraformaldehyde fixation, labeling for tau was diffuse
15 throughout the cytoplasm (s previously reported by Schliwa et al., 1981, *PNAS USA* 78:1037-1041), whereas cells fixed in glutaraldehyde and Triton X-100 show labeling of the tau along microtubules. This labeling pattern was typical for soluble fragments of tau; evidence of tau aggregation is, however, not observed.

20 3T6 Cells stably transfected and expressing the membrane-targeted minimum aggregation domain, SStau296-390, were incubated with 5 mM sodium butyrate for 20 h to increase protein expression and fixed in paraformaldehyde. These became labeled by mAb 7.51 throughout the
25 cytoplasm in a reticular pattern consistent with association with the endoplasmic reticulum (not shown). However, this protein was only expressed to detectable levels in a small proportion of the cells and aggregation of the protein was rarely seen.

30 In contrast, labeling of cells stably transfected with and expressing SStau190-441 or SStau190-390 reveals large aggregates, some of which have a linear appearance. These aggregates were often clustered in the perinuclear area, and sometimes have a filamentous form (Figure 11).

35 The proportion of cells expressing these aggregates is increased by

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-66-

addition of sodium butyrate, which increases the expression level of the protein (Gorman, C.M., *et al.* (1983) *Nuc. Acids Res.* 11, 7631-7648; Krub, J. (1982) *Mol. Cell. Biochem.* 42, 65-82), but aggregates can also be found in cells expressing the protein constitutively.

5

Cells stably transfected with and expressing SStau190-390 were also fixed in glutaraldehyde in the presence of 0.2% Triton X-100 before labeling with 7.51. This fixation protocol allows visualization of microtubule-bound tau protein, but aggregates of tau are also seen, demonstrating that they are stable to detergent extraction i.e. their stability *per se* is not dependent on membrane association (not shown).

Proteins expressed in these cell lines have been analyzed by immunoblotting with mAb 7.51, and the effect of tau induction and butyrate treatment examined, compared to cell lines expressing full-length tau and soluble fragments of tau.

The SStau190-441 protein analyzed by immunoblotting with the mAb 7.51 has an apparent RMM of ~40K and shows a characteristic degradation product at ~25K, and a less prominent product at ~30K. The expression level of the protein can be increased by treatment with sodium butyrate, which increases the amount of all three products (Figure 16). Butyrate also occasionally induces the appearance of two smaller products at ~18 and ~14K (see Figure 17).

Induction of full-length tau protein in the presence of SStau190-441 increases the amount of products at 30K, and 25K, but there is no appearance of smaller products (Figure 16a).

30

Thus, considering Figure 16a, when the effects of butyrate and IPTG induction are compared, butyrate is seen to act non-specifically to increase production of constitutively expressed incorporated gene products (by a mechanism which is not well understood). This serves as a control for IPTG induction, which specifically induces only full-length tau. In the first panel, the effects on expression of

35

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-67-

the non-membrane targeted 186-441 fragment after treatment with butyrate or IPTG are compared. Butyrate ("B") produces more of the 186-441 fragment, and a closely related presumed truncation product, but IPTG ("I") does not.

5

In the third panel, the same conditions are examined in cells simply expressing inducible T40 under IPTG control as described previously. Here, only IPTG ("I") produces increased levels of T40, and approx. 45 kD spontaneous degradation products. Butyrate has no effect.

10

The middle panel shows the effect of both induction methods in cells which express both SS 190-441 constitutively and T 40 under an IPTG-inducible promoter. Without induction, there are low levels of T40 and the characteristic 40 kD and 25 kD bands derived from SS190-441.

15

Butyrate ("B") induces a higher level of the 40, 30 kD and 25 kD bands. Induction of T40 by IPTG ("I"), which has no effect on constitutive expression of the 40 kD band, generates higher levels of both the 40 kD and 25 kD species through an aggregation dependent mechanism (see Figure 1). Therefore, induced T40 is being processed through the 40 kD pathway to give rise to the 25 kD truncation product, provided there are pre-existing low levels of SS 190-441.

20

Considering Figure 16b, the SStau190-390 protein analyzed by immunoblotting with the mAb 7.51 has an apparent RMM of 30K and shows a degradation product at ~18K, which approximately corresponds to the size of the minimum aggregation domain of PHFs. Expression level of the protein and its characteristic 18 kD degradation product is substantially increased by treatment with sodium butyrate. Once again, the equivalent soluble tau fragment is not degraded in the same way and does not cause production of the 18 kD degradation product i.e. induction of full-length tau protein in the presence of SStau190-390 slightly increases the amount of 30K protein, but there is no increased appearance of the smaller product (Figure 16b).

35

In both cases, the degradation pattern seen for the membrane-

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-68-

targeted tau fragments is different from that seen for the equivalent soluble protein. The membrane-targeted proteins can be degraded to a ~12 \ 14 K fragment equivalent to the core domain of PHFs (see e.g. Fig 17(a)). The aggregation of the tau fragments induced by membrane association is therefore conferring proteolytic stability to the core domain, as seen in PHFs.

Full-length tau protein which is induced in the absence of a membrane-localised tau fragment shows some degradation to a fragment of ~45K, but there is no production of smaller fragments. The enhanced production of smaller tau fragments seen when full-length tau is expressed with the SStau190-441 (Figure 16a) demonstrates processing of tau induced by interaction with the SStau190-441 aggregates.

The degradation products produced in cells expressing SStau190-441 have been analyzed using antibodies specific for epitopes which are both NB and C-terminal to the aggregation domain. This analysis shows that the protein undergoes both N- and C-terminal truncations (Figure 17). The smallest fragment produced only reacts with the antibody against the core domain of PHFs and is of a similar size (~12-14K). The tau protein in these cells, therefore, appears to be undergoing PHF-like processing to the core fragment.

Both of the SStau proteins, together with their degradation products, can be sedimented from cell extracts even in the presence of the detergent Triton X-100, suggesting that the protein is aggregated rather than being associated with membranes (Figure 18). A fraction of the protein sediments at relatively low speed (12,000g), and the remainder behaves as particles with an S value of at least 50S, but does not sediment at 300S, consistent with aggregation to a complex of MW ~1-2x10⁶.

These results indicate the following pathway of events: aggregation, which is initially seeded by the membrane-localised protein, occurs at the cytosolic surface of the ER. The protein is cleaved at its

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-69-

N-terminus to remove the signal sequence, and this form is then free to appear as aggregates in the cytosol or as a microtubule-bound protein if aggregation has not occurred. Membrane-targeting of the tau-like protein, as taught herein, facilitates the capture of full-length tau which is, for instance, produced under the control of an inducible promoter. Further full-length tau is then channeled into the same proteolytic processing pathway, as indicated by production of the 25kD unit after induction of full-length tau (Figure 1).

10 Conclusion

Expressing a fragment of tau as a membrane-localised protein has overcome the barrier to aggregation in cells which is found using soluble proteins. The S5190-390 fragment, for example, is efficiently processed to shorter fragments including the 12-14K fragment, which is similar to that found in the core of PHFs.

The inventors have thus discovered that a signal sequence can be used to create a membrane-localised form of tau, that tau fragments thus expressed as membrane-localised proteins will form aggregates and that these tau aggregates have a proteolytically-stable core which is comparable to that in PHFs, both in relation to its size and to the presence of the 7.51 epitope. The inventors have also identified that the appearance of processed fragments is increased after induction of full-length tau protein, proving that there is capture of soluble tau into aggregates.

Thus, tau aggregation and processing have been achieved in cells, and the aggregates can be analyzed in assays to test for compounds which inhibit or modulate the aggregation.

Example 2 - screening inhibitors

Cells expressing the S5190-441 fragment as well as inducible T40 under IPTG control were plated in 6 well dishes. One day after plating experimental drugs were added at indicated concentrations

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-70-

and 9 h later, IPTG was added at 5mM. 15h after IPTG addition, cells were washed with PBS then solubilised in gel buffer. Samples were separated by SDS-PAGE and immunoblotted using antibody 7.51. T40 induction in these cells leads to an increase in degradation products (as shown in Figure 1, and Figure 16c). The effect of the experimental drugs on this increase was analysed by quantification of the immunoblots.

Figure 2 shows how the inhibitory activities of thionine, chlorpromazine and tacrine were compared in the membrane-targeted cell model. There is a clear distinction between active and inactive compounds. The data was analysed in greater detail mathematically using a standard inhibitory model (Figure 3).

The values which the model yields are consistent with those which would be expected for an *in vivo* system in which the tau was phosphorylated, giving a resulting reduction in its binding affinity, and a concomitant increase in the apparent inhibitory potency of tau aggregation inhibitors.

This demonstrates the utility of the present invention in screening for inhibitors of the aggregation phenomena of proteins which undergo an induced conformation polymerisation in neuropathological disease. In particular the aggregation can be modified by aggregation inhibitors and their activity can be monitored by production of characteristic degradation products.

Example 3 - preparation and use of transgenic animal

Transgenic animals were prepared as follows.

Animals:

To obtain a great number of fertilized oocytes, 4 week old NMRI mice are treated with gonadotrophins to induce superovulation. Pregnant mare's serum (PMS) is used to mimic follicle-stimulating hormone

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-71-

(FSH) and human chorionic gonadotropin (hCG) is used to mimic luteinizing hormone (LH). PMS is administered intraperitoneally 2 days before mating and hCG is administered 46 hours later. After administration of hCG the female mice are mated with stud males. On 5 the same day 10 week old NMRI mice are mated with vasectomized males, to obtain foster mothers for the reimplantation of the injected oocytes. Fertilized oocytes are collected from mice with copulation plug the following morning.

10 Collection of oocytes:

The mice are sacrificed by cervical dislocation and the oviduct is dissected. Newly ovulated oocytes, surrounded by cumulus cells, are found in the upper part of the oviduct (ampulla). One oviduct at a 15 time is transferred into a petridish containing M2 medium and hyaluronidase. With a pair of watchmakers forceps the oocytes can be released from the oviduct. The hyaluronidase separates the eggs from the cumulus cells. The oocytes are then separated from any other cells and material in two successive cleaning steps through M2 20 medium. Until needed the oocytes are stored in M16 medium at 37°C in a 5% CO₂ incubator.

When collected the oocytes are in an early pronuclear stage wherein the male and female pronuclei are separated and distinguishable from 25 the cytoplasm.

Preparation of the DNA construct for microinjection (see Figure 6):

The constructs contain an appropriate cDNA under the regulation of 30 the ThyI-promoter which directs transgene expression to the brain. The plasmids were extracted from the host bacteria and purified by Qiagen Plasmid Purification Kit (sold by Qiagen, Hilden, Germany). The constructs were linearized with an appropriate endonuclease (NotI). The desired fragment was isolated from agarose gel by using 35 Qiaquick™ Gel Extraction Kit (sold by Qiagen, Hilden, Germany). The constructs were diluted to 2 ng/μl in microinjection buffer.

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-72-

Microinjection:

One micromanipulator is mounted on each side of an inverted
5 microscope stage; one micromanipulator controls the holding pipette
and the other the injection pipette. The eggs are placed in a
depression slide injection chamber with M2 medium covered with
paraffin oil. One egg is positioned on the holding pipette and the
male pronucleus is injected with the injection pipette containing
10 the DNA solution. After injection the oocytes are again cultured in
MI6 medium at 37°C in a 5% CO₂ incubator until retransfer.

Retransfer:

15 Pseudopregnant mice are anesthetized and the intact injected oocytes
are retransferred into the oviduct of the mouse (10-15 oocytes into
one oviduct). These foster mothers carried the implanted embryos
to term.

20 Identification of transgenic mice:

Two different approaches to identify transgenic animals were used.

PCR:

25 Transgenic mice were detected with PCR using transgene specific
primers.

Thy 1F2: gCA ggA ggT gCT CAg ggA CAg c
30 TautxR: CAC TgC CgC CTC CCg ggA CgT g

This primer combination yields a 415 bp PCR fragment only in mice
carrying the ThyI-sstau296-390 transgene and a 711bp PCR fragment in
the mice carrying the Thy1-sstau186-441 transgene.

35 Genomic DNA was prepared from 0.5 cm mouse tail using DNeasy™ Tissue

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-73-

Kit (Qiagen, Hilden, Germany)

Southern Blot

5 10 µg genomic DNA of PCR positive tested animals were digested with
EcoRI and electrophoresed on an 1% agarose gel. Southern blots were
prepared and hybridized with 2 ³²P-labeled fragments from the
promoter. These were obtained by digestion with XbaI and NcoI. The
endogenous signal can be compared with the transgene signal to
10 estimate the copy number.

In order to test the mode of integration the genomic DNA was
digested with XbaI. Founder 1 and F1 animals showed single
integration. Founder 86 and F1 animals showed double integration and
15 could be split into two independent lines.

Blots were hybridized at 65°C for 20 hours and washed at 65°C 2x 1
hour.

20 RNA expression

To study RNA expression Northern blot analysis has been done. RNA
was prepared of whole brain using Trizol™ (Gibco BRL, Paisley,
Scotland). 20 µg RNA was electrophoresed and blotted. Hybridisation
25 was performed against a 247bp PCR fragment. Primers were transgene
specific: glob578-597 (AAG AAC AAT CAA ggg T CC CC), oligo20 (ATT
Agg CAA CAT CCA TCA TAA ACC).

Blots were hybridized at 65°C for 20 hours and washed at 65°C 2x 1
30 hour.

Figures 12-15 show the results obtained with the mouse model and
describe how an 18 kD species is generated by aggregation-dependent
proteolytic processing of endogenous mouse brain tau through a
35 pathway believed to correspond to that given in Figure 1(E).

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-74-

References

- Arendt et al. (1995) Neuroscience 69, 691-698.
- 5 Braak et al. (1994) Neuroscience letters 171, 1-4.
- Brion et al. (1999) American Journal of Pathology 154, 255-270.
- Cork et al. (1988) Journal of Neuropathology and Experimental
10 Neurology 49, 629-641.
- Duff et al. (2000) Neurobiology of Disease 7, 87-98.
- Geula et al. (1998) Nature Medicine 4, 827-834.
- 15 Gotz et al. (1995) EMBO Journal 14, 1304-1313.
- Harada et al. (1994) Nature 369, 488-491.
- 20 Ikegami et al. (2000) Neuroscience letters 279, 129-132.
- Ishihara et al. (1999) Neuron 24, 751-762.
- Janus et al. (2000) Biochimica et Biophysica Acta 1502, 63-75.
- 25 Lewis et al. (2000) Nature Genetics 25, 402-405.
- Nelson et al. (1995) Neurobiology of Aging 16, 315-323.
- 30 Roertgen et al. Neurobiology of Aging 17, 243-247.
- Schultz et al. (2000) Journal of Neuropathology and Experimental
Neurology 59, 39-52.
- 35 Spittaels et al. (1999) American Journal of Pathology 155 2153-2165.

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-75-

Sturchler-Pierrat et al. (1997) Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 93, 13287-13292.

Thuncke et al. (2000) unpublished.

5

Additional References

- 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.
- 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.
- 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 Alzheimer's disease: 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., Lachawan, F., Krasnewich, D., Muenke, M., Lawrence, D.A., Yerby, 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

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-76-

- neuronal 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)
- 5 Insulin as an amyloid-fibril protein at sites of repeated insulin injections in 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
- 10 form amyloid. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 89, 10940-10944.
- Glennner, G.G. & Wong, C.W. (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterisation of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and Biophysical*
- 15 *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., Mant, R., Newton, P., Rooke, K., Roques, P., Talbot, C., Pericak-Vance, M., Roses, A., Williamson, R., Rossor, M., Owen, M. & Hardy,
- 20 J. (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *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.
- 25 Gustavsson, A., Engström, U. & Westermark, P. (1991) Normal transthyretin and synthetic transthyretin fragments form amyloid-like fibrils in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 175, 1159-1164.
- 30 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.,

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-77-

- 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., Gostra, 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, G.A., Scutar, A.K., Totty, N., Nguyen, O., Blake, C.C.F., Terry, C.J., Feast, 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., Stenroos, E.S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papadimitropoulos, 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.
- 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.,

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-78-

- Hung, W.Y., Kato, T. & Asayama, K. (1996) Intense superoxide dismutase-1 immunoreactivity in intracytoplasmic hyaline inclusions of familial amyotrophic lateral sclerosis with posterior column involvement. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 55, 481-490.
- Sletten, K., Westermark, P. & Natvig, J.B. (1976) Characterization of amyloid fibril proteins from medullary carcinoma of the thyroid. *Journal of Experimental Medicine* 143, 993-998.
- Spillantini, M.G., Crowther, R.A., Jakes, R., Hasegawa, M. & Goedert, M. (1998) α -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 amyloidosis with a novel variant fibrinogen. *Journal of Clinical Investigation* 93, 731-736.
- Westermark, P., Engstrom, U., Johnson, K.H., Westermark, 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.
- Westermark, P., Johnson, K.H., O'Brien, T.D. & Betsholtz, C. (1992) Islet amyloid polypeptide - a novel controversy in diabetes research. *Diabetologia* 35, 297-303.
- Westermark, P., Johnson, K.H. & Pitkanen, P. (1985) Systemic amyloidosis: A review with emphasis on pathogenesis. *Applied Physiology* 3, 55-68.
- Wischik, C.M., Novak, M., Thøgersen, 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 disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 85, 4506-4510.

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-79-

Claims

1 A method of inducing or modeling the pathological state of an
aggregating disease protein (ADP) which is associated with a disease
5 state in which the ADP aggregates pathologically through an induced
conformational polymerisation interaction, the method being
characterised by the step of providing a membrane-localisable fusion
protein comprising (i) an aggregating portion, which is derived from
the ADP, or from a protein which initiates pathological aggregation
10 of the ADP, (ii) a heterologous membrane-localising portion.

2 A method as claimed in claim 2 wherein the aggregating portion
of the fusion protein is derived from the ADP, and wherein membrane-
localisation of the fusion protein causes the high-affinity capture
15 site of the ADP protein to become exposed such that aggregation of
further ADP is promoted.

3 A method as claimed in claim 1 or claim 2 comprising the steps
of:
20 (a) providing the fusion protein
(b) introducing it into a membrane.

4 A method as claimed in any one of the preceding claims wherein
the aggregation of the ADP in the disease state is associated with
25 neurodegeneration and/or clinical dementia

5 A method as claimed in any one of the preceding claims wherein
pathological aggregation of the ADP in the disease state leads to
proteolytic processing of the ADP to a core domain fragment.
30

6 A method as claimed in claim 5 wherein the aggregating portion
comprises at least the core fragment of the ADP.

7 A method as claimed in claim 6 wherein the aggregating portion
35 consists essentially of the core fragment.

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-80-

- 8 A method as claimed in any one of the preceding claims wherein the membrane localising portion includes a membrane anchor sequence and/or a stop-transfer sequence.
- 5 9 A method as claimed in claim 8 wherein the membrane localising portion comprises a mammalian signal sequence.
- 10 A method as claimed in claim 9 wherein the mammalian signal sequence is the rat albumin signal sequence.
- 10 11 A method as claimed in any one of the preceding claims wherein the disease is selected from Pick's disease, Progressive Supranuclear Palsy, Alzheimer's disease.
- 15 12 A method as claimed in any one of the preceding claims wherein the ADP is tau protein.
- 13 A method as claimed in claim 12 wherein the aggregating portion of the fusion protein comprises a core fragment of tau
- 20 14 A method as claimed in claim 13 wherein the aggregating portion of the fusion protein comprises a fragment of tau extending from amino acids 186-296 to 390-441 of the full-length tau protein shown in Fig 5.
- 25 15 A method as claimed in claim 14 wherein the aggregating portion of the fusion protein consists of amino acid residues 296-390, 190-441 or 190-390 of the full-length protein.
- 30 16 A method as claimed in any one of claims 2 to 15 for screening for a specific binding partner of the ADP high-affinity capture site, the method comprising the steps of:
- (a) providing the fusion protein in membrane localised form,
- (b) contacting the fusion protein with one or more potential binding
- 35 partners, and
- (c) determining whether or not the potential binding partner binds

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-81-

to the fusion protein

17 A method as claimed in claim 16 wherein the contacting step is intracellular and the binding partner is present within the cell.

5

18 A method as claimed in claim 17 further comprising the step of recovering the binding partner from cell

19 A method as claimed in any one of claims 1 to 15 for inducing aggregation of ADP molecules, the method comprising the steps of:

10

(a) providing the fusion protein in membrane localised form,
(b) causing or permitting an induced conformational polymerisation interaction between the fusion protein and a further ADP molecule which is ADP or a derivative thereof

15

(c) optionally monitoring extent of aggregation of the further ADP molecule.

20 A method as claimed in claim 19 wherein the membrane is a cell membrane and the aggregation occurs intracellularly

20

21 A method as claimed in claim 20 wherein step (a) consists of introducing the fusion protein into a cell, such that it becomes membrane localised at a membrane in the cell.

25

22 A method as claimed in claim 20 wherein step (a) consists of introducing nucleic acid encoding the fusion protein into a cell or an ancestor thereof, such that the fusion protein is expressed in the cell and becomes membrane localised at a membrane in the cell.

30

23 A method as claimed in any one of claims 20 to 22 wherein the further ADP molecule is native to the cell

24 A method as claimed in claim 23 wherein the further ADP molecule is native full length, soluble ADP.

35

25 A method as claimed in any one of claims 20 to 22 wherein the

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-82-

further ADP molecule is heterologous to the cell.

26 A method as claimed in claim 25 comprising the step of
introducing a nucleic acid encoding the further ADP molecule into
5 the cell or an ancestor thereof, such that the further ADP molecule
is expressed in the cell.

27 A method as claimed in claim 26 wherein the fusion protein is
expressed under the transcriptional control of a constitutive
10 promoter, and the further ADP molecule is expressed under the
transcriptional control of an inducible promoter in the presence of
the appropriate inducing agent.

28 A method as claimed in any one of claims 25 to 27 wherein the
15 further ADP molecule is an ADP derivative which is (i) a fragment
the ADP (ii) a mutant of the ADP.

29 A method as claimed in any one of claims 25 to 27 wherein the
further ADP molecule incorporates mutations into the ADP
20 corresponding to those known or suspected to be associated with the
disease state.

30 A method as claimed in any one of claims 25 to 27 wherein the
further ADP molecule is full length, soluble ADP.

25

31 A method as claimed in any one of claims 19 to 30 wherein the
aggregation is monitored by monitoring the concentration or level
any one or more of the following species: (i) non-aggregated fusion
protein and/or further ADP molecule, (ii) an aggregate of the fusion
30 protein and/or further ADP molecule, (iii) a proteolytic fragment of
the fusion protein and/or further ADP molecule resulting from
aggregation thereof.

32 A method as claimed in claim 31 wherein the extent of
35 proteolytic processing of the further ADP molecule is monitored.

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-83-

- 33 A method as claimed in claim 31 or claim 32 wherein the ADP is tau, and the aggregation is monitored on the basis of increasing levels of an approximately 25 kDa fragment of tau.
- 5 34 A method as claimed in claim 31 or claim 32 wherein the ADP is tau, and the aggregation is monitored on the basis of increasing levels of an approximately 18 kDa fragment of tau.
- 35 A method as claimed in any one of claims 31 to 34 wherein the
10 monitoring step comprises use of an antibody specific for any of (i) the fusion protein (ii) the further ADP molecule (iii) a proteolytic fragment of the fusion protein and/or further ADP molecule resulting from aggregation thereof.
- 15 36 A method as claimed in any one of claims 31 to 34 wherein the fusion protein is immunologically distinct from the further ADP molecule.
- 37 A method as claimed in claim 36 wherein the ADP is tau, and
20 the antibody is selected from a monoclonal antibody which (i) is specific for a human-specific epitope located in the region between Gly-16 and Gln-26 of tau; (ii) is specific for the core tau fragment truncated at Glu-391; (iii) is specific for a generic tau epitope in the repeat domain; or (iv) is specific for a non-species specific
25 generic tau epitope located between Ser-208 and Ser-238.
- 38 A method for identifying a modulator of aggregation of an aggregating disease protein (ADP) which is associated with a disease state in which the ADP aggregates pathologically through an induced
30 conformational polymerisation interaction, which method comprises (a) performing a method as claimed in any one of claims 19 to 37 in the presence of an agent suspected of being capable of modulating the aggregation,
(b) monitoring the extent of aggregation, and optionally
35 (c) correlating the extent of aggregation with the modulatory activity of the agent.

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-84-

39 A method as claimed in claim 38 further comprising the step of comparing the result obtained in the presence of the agent with the result obtained in the absence of the agent.

5

40 A method as claimed in claim 38 or claim 39 for screening for a modulator for use as a therapeutic, prognostic or diagnostic agent in the disease state in which the ADP aggregates pathologically.

10 41 A method as claimed in any one of claims 38 to 40 which is performed intracellularly

42 A method as claimed in claim 41 wherein the cells are incubated with the agent for a period of time sufficient to entry of the agent into the cell.

15

43 A method as claimed in claim 41 or claim 42 wherein the cell is from a neuronal cell line or a fibroblast cell line.

20 44 A method as claimed in any one of claims 41 to 43 further comprising the step of assessing the ability of the agent to affect a non-pathological function of the ADP.

45 A method as claimed in claim 44 wherein the viability of the cell is assessed.

25

46 A method as claimed in claim 41 wherein the cell is comprised within a transgenic animal

30 47 A method as claimed in claim 46 wherein the agent is administered to the animal.

48 An isolated nucleic acid molecule comprising a chimeric nucleotide sequence encoding a membrane-localisable fusion protein having (i) an aggregating portion, which is derived from an aggregating disease protein (ADP) which is associated with a disease

35

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-85-

state in which the ADP aggregates pathologically through an induced conformational polymerisation interaction (ii) a heterologous membrane-localising portion

- 5 49 A nucleic acid as claimed in claim 48 wherein the membrane-localising portion is comprises a signal sequence and optionally sequence encoding a membrane anchor domain or a stop-transfer sequence.
- 10 50 A nucleic acid as claimed in claim 48 or claim 49 wherein the chimeric nucleotide sequence includes an exogenous 3'UTR sequence.
- 15 51 A nucleic acid as claimed in any one of claims 48 to 50 wherein the aggregating portion nucleotide sequence encodes tau, or a core fragment of tau.
- 20 52 A nucleic acid as claimed in claim 51 wherein the aggregating portion nucleotide sequence encodes a truncated fragment of tau extending from between amino acids 186-296 to 390-441 of the full-length protein.
- 25 53 A nucleic acid as claimed in claim 52 wherein the aggregating portion nucleotide sequence encodes amino acids 296-390, 190-441 or 190-390.
- 30 54 An isolated nucleic acid which comprises a nucleotide sequence which is the complement of the chimeric nucleotide sequence of any one of claims 48 to 53.
- 35 55 A nucleic acid primer selected from:
- forward primer: 5'-tctggtgaaccggtaaaatacgggg-3'
reverse primer: 5'-ccccgtattttaccggaacaccaga-3'
- forward primer: 5'-cttgactcgagctaagccccgtgg-3'
reverse primer: 5'-cggggcgtaggataagtaagtcg-3'

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-86-

forward primer: 5'-ggctcaccggttaatatcaaac-3'
reverse primer: 5'-gtttgatattaaccggtgagcc-3'

5 Thy 1F2: gCA ggA ggT gCT CAg ggA CAg c
TautxR: CAC TgC CgC CTC CCg ggA CgT g

56 A process for producing a nucleic acid as claimed in any one
of claims 48 to 53 comprising the step of ligating a nucleic acid
10 encoding the aggregating portion to a nucleic acid encoding the
heterologous membrane-localising portion.

57 A process as claimed in claim 56 wherein the nucleic acid
encoding the heterologous membrane-localising portion is part of a
15 recombinant vector into which the nucleic acid encoding the
aggregating portion is inserted.

58 A recombinant vector which comprises the nucleic acid of any
one of claims 48 to 53.

20

59 A vector as claimed in claim 58 wherein the nucleic acid is
operably linked to a promoter for transcription in a host cell,
wherein the promoter is optionally an inducible promoter.

25 60 A vector as claimed in claim 59 wherein the promoter is a
tissue specific promoter.

61 A vector as claimed in claim 59 wherein the promoter is
the prion specific promoter or the neurospecific enolase promoter.

30

62 A method which comprises the step of introducing the vector of
any one of claims 58 to 61 into a host cell.

63 A host cell containing or transformed with a heterologous
35 vector of any one of claims 58 to 61.

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-87-

- 64 A host cell as claimed in claim 63 which is a member of a fibroblast cell line.
- 65 A method of modulating in a transgenic non-human animal a disease state in which an aggregating disease protein (ADP) aggregates pathologically, which method comprises causing or allowing expression of the nucleic acid as claimed in any one of claims 48 to 53 in the cells of the animal.
- 66 A method of preparing a transgenic non-human animal model with enhanced or accelerated pathology for the disease state in which an aggregating disease protein (ADP) aggregates pathologically, which method comprises the step of introducing into a fertilized egg of the animal a vector as claimed any one of claims 58 to 61.
- 67 A method as claimed in claim 66 wherein the animal is a mammal and the method further comprises the step of implanting the egg into a pseudo pregnant female and growing the resultant embryo to term.
- 68 A method of producing an F₁ generation transgenic non-human animal model with enhanced or accelerated pathology for the disease state in which an aggregating disease protein (ADP) aggregates pathologically, the method comprising crossing a founder animal obtained by the method of claim 66 or claim 67 with an animal which is non-transgenic in respect of the fusion protein, and screening the offspring for those which carry the nucleic acid encoding the fusion protein.
- 69 A method of producing an F₂ generation transgenic non-human animal model with enhanced or accelerated pathology for the disease state in which an aggregating disease protein (ADP) aggregates pathologically, the method comprising crossing 2 F₁ animals obtained by the method of claim 68, and screening the offspring for those are hetero or homozygous with respect to the nucleic acid encoding the fusion protein.

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-88-

- 70 A transgenic non-human animal which includes within a plurality of its cells a promoter operably linked to a nucleotide sequence encoding a membrane-localisable fusion protein comprising (i) an aggregating portion, which is derived from an aggregating disease protein (ADP) which is associated with a disease state in which the ADP aggregates pathologically through an induced conformational polymerisation interaction (ii) a heterologous membrane-localising portion.
- 10 71 A cell or tissue sample of the animal of claim 70 comprising a promoter operably linked to a nucleotide sequence encoding the membrane-localisable fusion protein.
- 15 72 A method, animal or sample as claimed in any one of claims 65 to 71 wherein the animal is a rodent.
- 73 A method, animal or sample as claimed in claim 72 wherein the rodent is a mouse.
- 20 74 An isolated fusion protein which is encoded by the chimeric nucleotide sequence of any one of claims 48 to 53.
- 25 75 A method of making the protein of claim 74, which method comprises the step of causing or allowing expression from a nucleic acid of any one of claims 48 to 53 in a suitable host cell.
- 76 A method of inducing in the transgenic non-human animal of claim 70 a disease state in which the aggregating disease protein (ADP) aggregates pathologically, which method comprises causing or allowing expression of the nucleotide sequence encoding the membrane-localisable fusion protein.
- 30 77 A method for screening for an agent for use as a therapeutic, prognostic or diagnostic agent in a disease state in which an aggregating disease protein (ADP) aggregates pathologically, comprising carrying out a method as claimed in claim 76 in the
- 35

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-89-

presence of an agent suspected of being capable of modulating the aggregation

78 A method as claimed in claim 47 or claim 77 wherein the agent
5 is capable of crossing the blood-brain barrier.

79 A method as claimed in claim 47, claim 77 or claim 78 wherein
the agent is administered to a control animal which is not the
transgenic animal.

10

80 A method as claimed in claim 47, or any one of claims 77 to 79
wherein the extent of proteolytic processing of the ADP in the brain
of the animal is determined.

15

81 A method as claimed in claim 47, or any one of claims 77 to 80
wherein the ability of the agent to decrease the amount of ADP
aggregates which form within the brain of the animal is determined.

20

82 A method as claimed in claim 47, or any one of claims 77 to 80
wherein the ability of the agent to eliminate or reduce the level of
ADP aggregate already formed within the brain of the animal is
determined.

25

83 A method as claimed in claim 81 or claim 82 wherein the ADP
aggregates within the brain of the animal are visualized
histologically and/or by electron microscopy.

30

84 A method for producing an agent for use as a therapeutic,
prognostic or diagnostic agent in a disease state in which an ADP
aggregates pathologically, which method comprises
(i) carrying out a method as claimed in any of claims 38 to 47 or
claims 77 to 83 to identify the agent,
(ii) providing the agent in isolated form,
(iii) optionally formulating the agent as a composition for use in
35 the treatment of the disease state.

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

-90-

85 A method for the treatment or prophylaxis of a disease state
in which an ADP aggregates pathologically, which method comprises:
(i) producing an agent by a method as claimed in claim 64
(ii) administering a therapeutically effective amount of said agent
5 to a patient in the need of the same.

86 A method or animal as claimed in any one of claims 19-32, 38-
47, 76 to 85 wherein the ADP is tau and the disease state
corresponds to Alzheimer's disease.

10

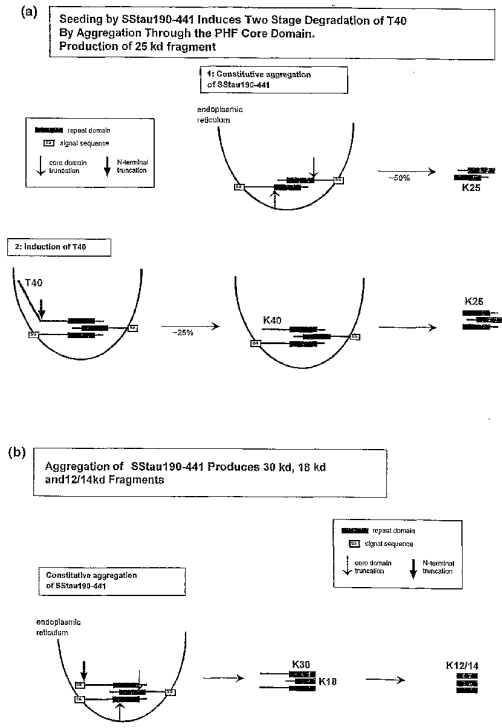
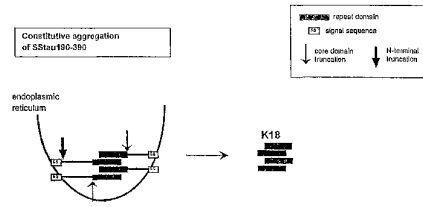


Figure 1a and 1b

(c) Aggregation of SStau190-390 Produces an 18 kd Fragment



(d) Aggregation of SStau296-390: Interaction with T40 Produces Two Possible 18 kd Fragments, and a 12/14 kd Fragment

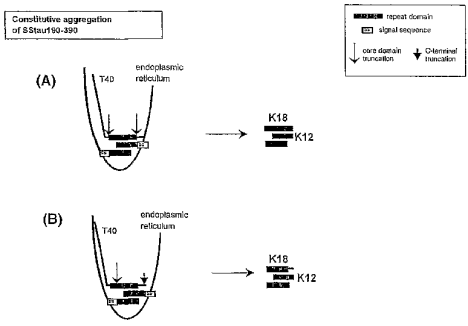


Figure 1c and 1d

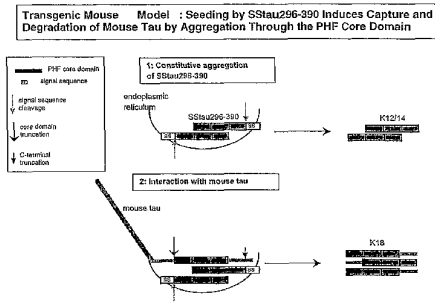


Figure 1e

Activities of compounds in the
↑T40 + 40 kD ⇒ ↑25 kD cell assay
Results shown as relative production of 25 kD band

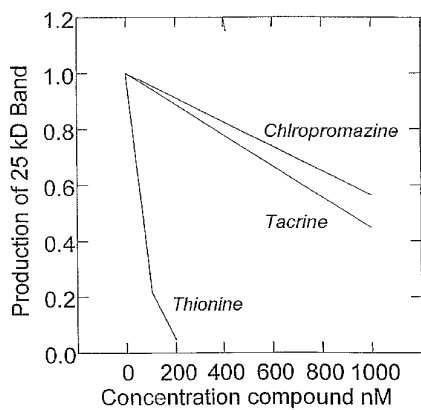


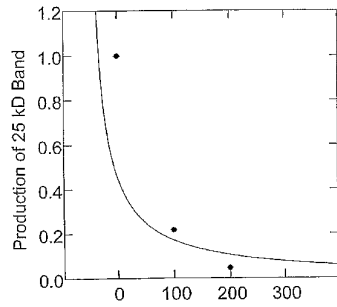
Figure 2

Thionine : memb-Tau model

↑T40 + 40 kD ⇒ ↑25 kD cell assay

Cellular activity predicted via standard inhibition model:

$$\text{activity} = [\text{tau}] / ([\text{tau}] + Kd * (1 + [\text{thionine}] / KI))$$



Observed vs predicted activity r = 0.999

Intracellular tau concentration	415 nM
Tau-tau binding affinity	500 nM
Thionine KI	33 nM

Figure 3

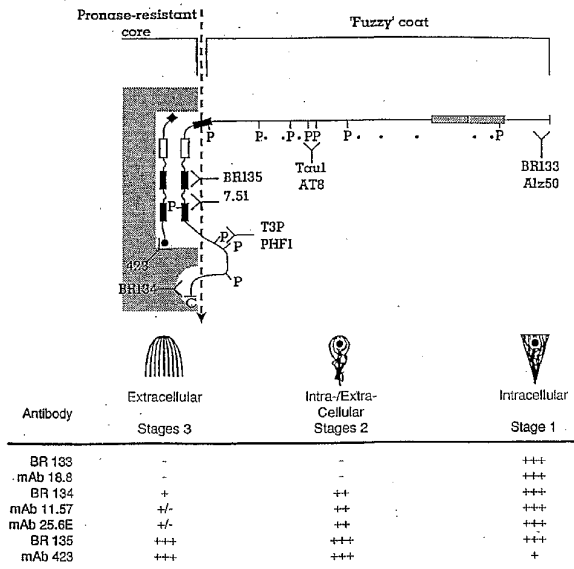


Figure 4a

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

7/32

N- & C-terminal truncation of tau

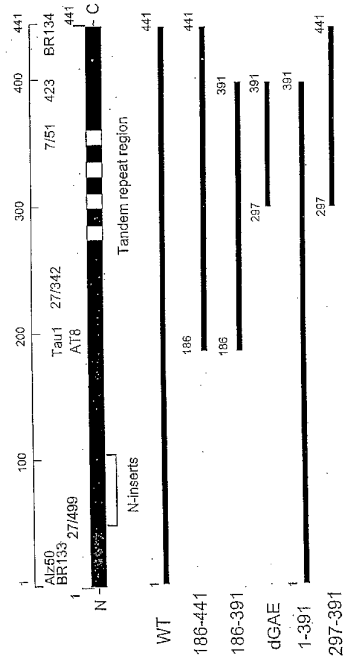


Figure 4b

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

8/32

```

ATG GCT GAG CCC CGC CAG GAG TTC GAA GTG ATG GAA GAT CAC GCT GGG ACG TAC GGG TTC
Met ala glu pro arg gln glu phe glu val met glu asp his ala gly thr tyr gly leu
1 5 10 15 20
GGG GAC AGG AAA GAT CAG GGG GGC TAC ACC ATG CAC CAA GAC CAA GAG GGT GAC ACG GAC
gly asp arg lys asp din gly gly tyr thr met his gln asp gln glu gly asp thr asp
25 30 35 40
GCT GGC CTG AAA GAA TCT CCC CTG CAG ACC CCC ACT GAG GAC GGA TCT GAG GAA CCG GGC
ala gly leu lys glu ser pro leu gln thr pro thr glu asp gly ser glu glu pro gly
45 50 55 60
TCT GAA ACC TCT GAT GCT AAG AGC ACT CCA ACA GCG GAA GAT GTG ACA CCA CCC TTA GTG
ser glu thr ser 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 GCG GCG CAG CCG CAC AGG CAG ATC CCA GAA GGA
asp glu gly ala pro gly lys gln ala ala ala gln pro his thr glu ile pro glu gly
85 90 95 100
ACC ACA GCT GAA GAA GCA GGC AIT GGA GAC ACC CCC AGC CTG GAA GAC GAA GCT GCT GGT
thr thr ala glu glu ala gly ile gly asp thr pro ser leu glu asp glu ala ala gly
105 110 115 120
CNC GTG ACC CAA GCT GGC ATG GTC AGT AAA AGC AAA GAC GGG ACT GCA AGC GAT GAC AAA
his val thr gln ala arg met val ser lys ser lys asp gly thr gly ser asp asp lys
125 130 135 140
AAA GCC AAG GGG GCT GAT GGT AAA ACG AAG ATC GCC ACA CCG CGG GGA GCA GCC CCT CCA
lys ala lys gly 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 CCC GCT CCA AAG
gly gln lys gly gln ala asn ala thr arg ile pro ala lys thr pro pro ala pro lys
165 170 175 180
ACA CCA CCC AGC TCT GGT GAA CTT CCA AAA TCA GGG GAT CCG AGC GGC TAC AGC AGC CCC
thr pro pro ser ser gly glu pro pro lys ser gly asp arg ser gly tyr ser ser pro
185 190 195 200
GGC TCC CCA GGC ACT CCC GGC AGC CGC TCC CGC ACC CCG TCC CTT CCA ACC CCA CCC ACC
gly ser pro gly thr pro gly ser arg ser arg thr pro ser leu pro thr pro thr
205 210 215 220
CGG GAG CCC AAG AAG GTG CCA GTG GTC GGT ACT CCA CCC AAG TGG CCG TCT TCC GGC AAG
arg glu pro lys lys val ala val val arg thr pro pro lys ser pro ser ser ala lys
225 230 235 240
AGC CGC CTG CAG ACA GCC CCC GTG CCC ATG CCA GAC CTG AAG AAT GTC AAG TCC AAG ATC
ser arg leu gln thr ala pro val pro met pro asp leu lys asn val lys ser lys ile
245 250 255 260
GGC TCC ACT GAG AAC CTG AAG CAC CAG CCG GGA GGC GGG AAG GTG CAG ATA ATT AAT AAG
gly ser thr glu asn leu lys his gln pro gly gly gly lys val gln ile ile asn lys
265 270 275 280
AAG CTG GAT CTT AGC ABC GTC CAG TCC AAG TGT GGC TCA AAG GAT AAT ATC AAA CAC GTC
lys leu asp leu ser asn val gln ser lys cys gly ser lys asp asn ile lys his val
285 290 295 300
CCG GGA GGC GGC AGT GTG CAA ATA GTC TAC AAA CCA GTT GAC CTG AGC AAG GTG ACC TCC
pro gly gly gly 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 CTT AAA CCA GGT GGC CAG GTG GAA GTA AAA
lys cys gly ser leu gly asn ile his his lys pro gly gly gly gln val glu val lys
325 330 335 340
TCT GAG AAG CTT GAC TTC AAG GAC AGA GTC CAG TCG AAG ATT GGG TCC CTG GAC AAT ATC
ser glu lys leu asp phe lys asp arg val gln ser lys ile gly ser leu asp asn ile
345 350 355 360
ACC CNC CTC CCT GGC CGA GGA AAT AAA AAG ATT GAA ACC CAC AAG CTG ACC TTC CGC GAG
thr his val pro gly gly gly asn lys lys ile glu thr his lys leu thr phe arg glu

```

Figure 5a

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

9/32

```

365          370          375          380
ATC GCC AAA GCC 365 ACA GAC CAC GGG GCG GAG ATC GTG TAC AAG TGG CCA GTC GTG TCT
asn ala lys ala 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 CCG CAT CTC AGC AAT GTC TCC TCC ACC GGC AGC ATC GAC ATG CTA
gly asp thr ser pro arg his leu ser asn val ser ser thr gly ser ile asp met val
405          410          415          420
GAC TCG CCC CAG CTC GCC ACG CTA GCT GAC GAG GTG TCT GCC TCC CTG GCC AAG CAG GGT
asp ser pro gln leu ala thr leu ala asp glu val ser ala ser leu ala lys gln gly
425          430          435          440
TTG TGA
leu ***

```

Figure 5a cont ...

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

10/32

square brackets indicates signal sequence
 bold indicates tubulin-binding segments

SStau186-441

[MKWVTFLLLLFISGSFAFSPV]KSGDRSGYSSPGSPGTPGSRRTPSLPTPP
 TREPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMFDLKNVKSIGSTENLKHQP
GGGKVQIHHKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSK
CGSLGNIHHKPPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIE
 THKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSAGDTSRHLNSVSGSIDMVDSP
 QLATLADEVASLAKQGL

SStau186-390

[MKWVTFLLLLFISGSFAFSPV]KSGDRSGYSSPGSPGTPGSRRTPSLPTPP
 TREPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMFDLKNVKSIGSTENLKHQP
GGGKVQIHHKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSK
CGSLGNIHHKPPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIE
 THKLTFRENAKAKTDHGA

SStau296-390

[MKWVTFLLLLFISGSFAFSPV]**NIKHVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCGSLG**
NIHHKPPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFR
 ENAKAKTDHGA

Figure 5b

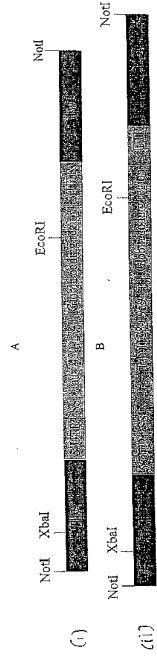


Figure 6a

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

12/32

Construct aa296-390 used for DNA microinjection into fertilized oocytes of mice

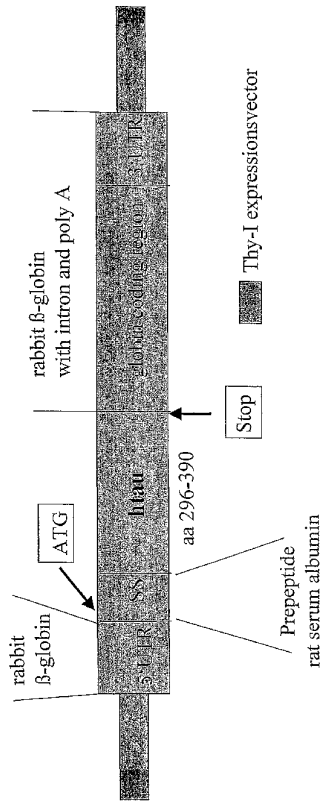


Figure 6b

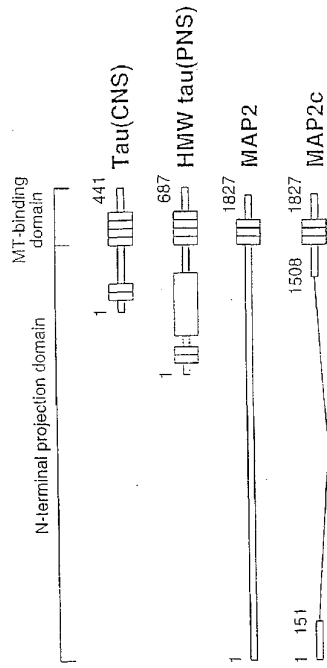


Figure 7

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

14/32

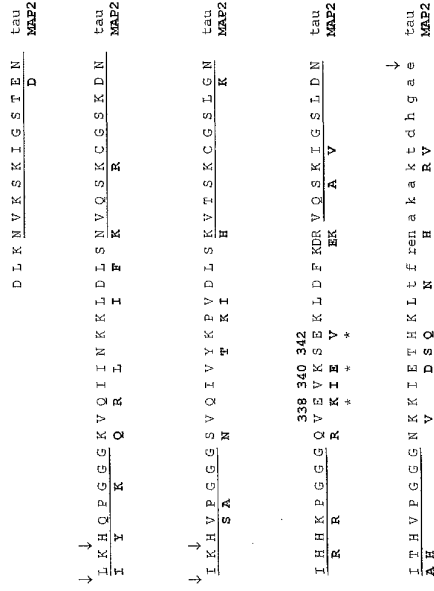


Figure 8

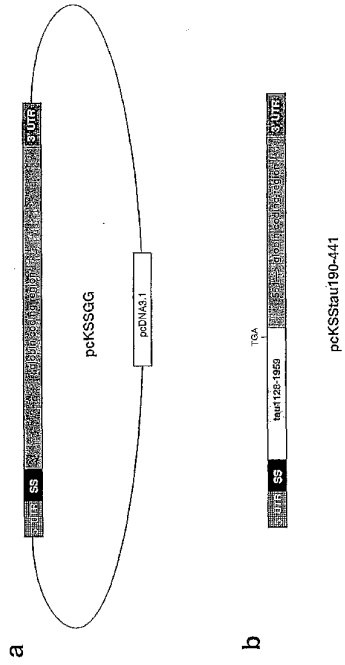


Figure 9

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

16/32

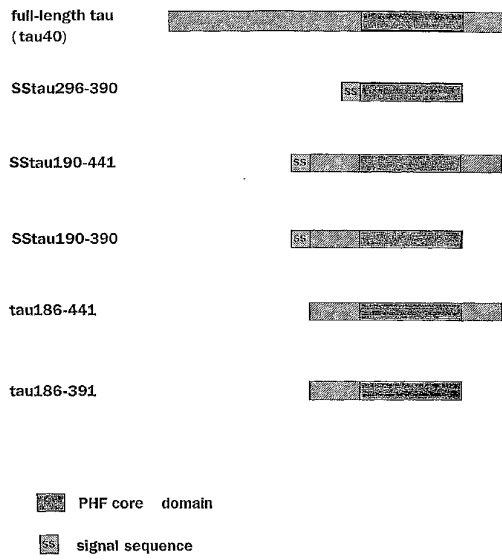


Figure 10

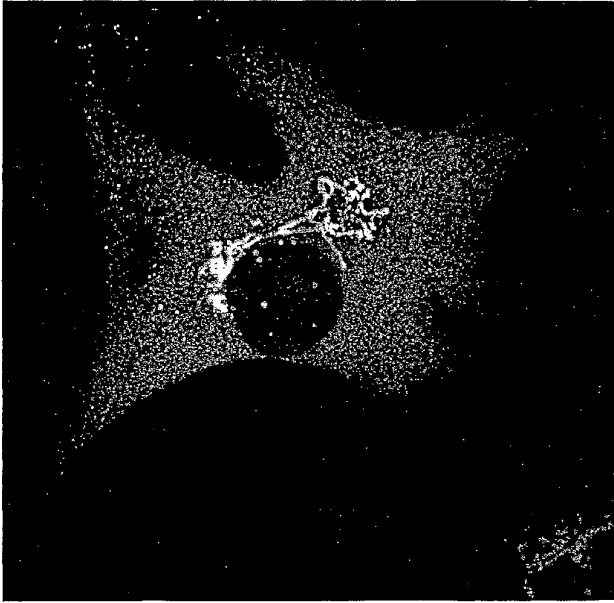


Figure 11

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

18/32

**Northern blot analysis of construct aa296-390 (line 1)
shows high expression level**

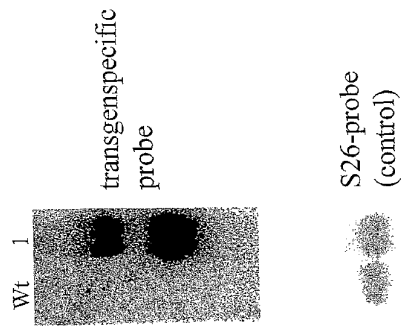


Figure 12

**Pre-IP followed by IP7.51 shows
significant difference between wt and tg
at 12kD**

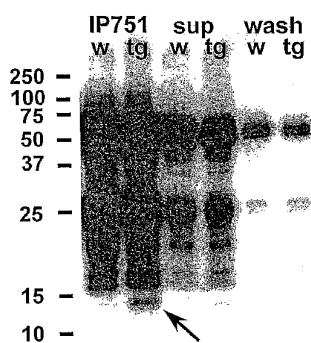


Figure 13

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

20/32

**S1 fraction from three different mice of
line 1 show 18kD**

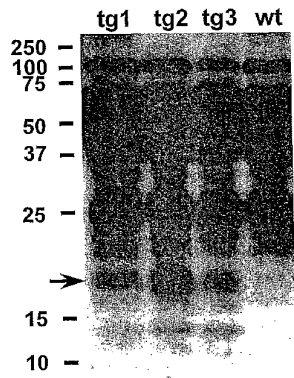


Figure 14

2-DE of boiled and concentrated S1 from mouse brain (6months) line 1 (aa296-390)

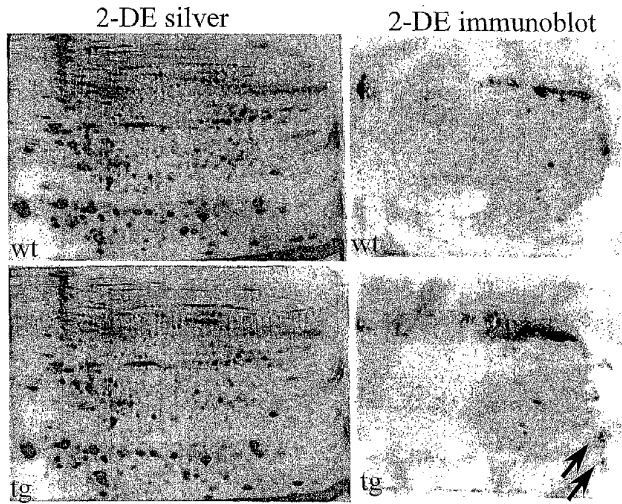


Figure 15

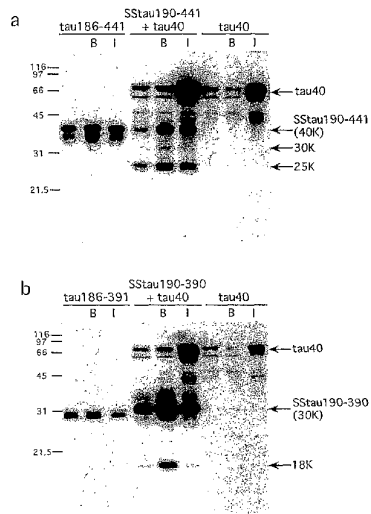


Figure 16a and 16b

WO 02/059150

PCT/GB02/00005

23/32

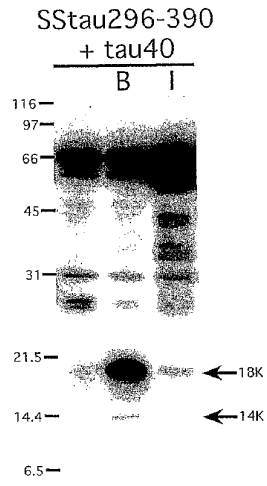


Figure 16c

In vitro aggregation of
bacterially expressed dGAE

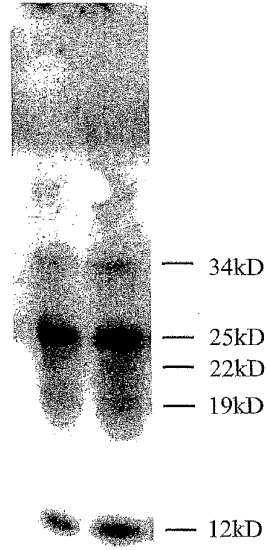


Figure 16d

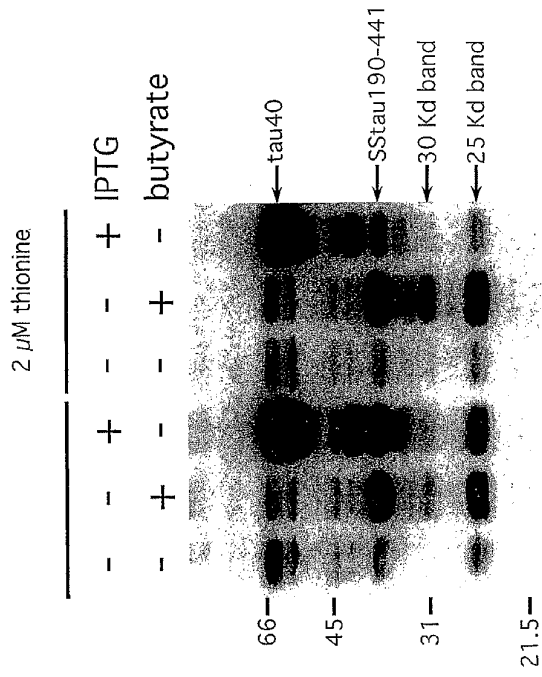


Figure 16e

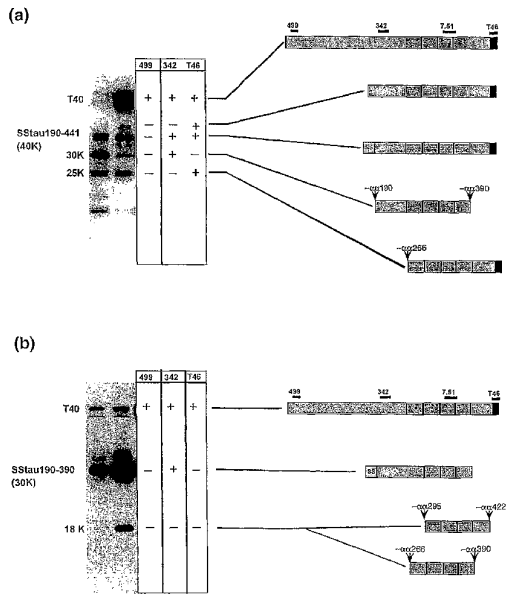


Figure 17

27/32

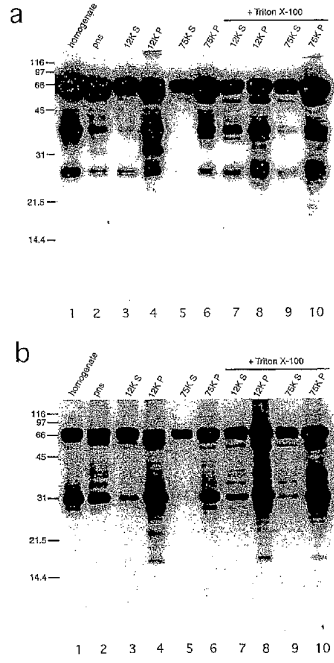


Figure 18

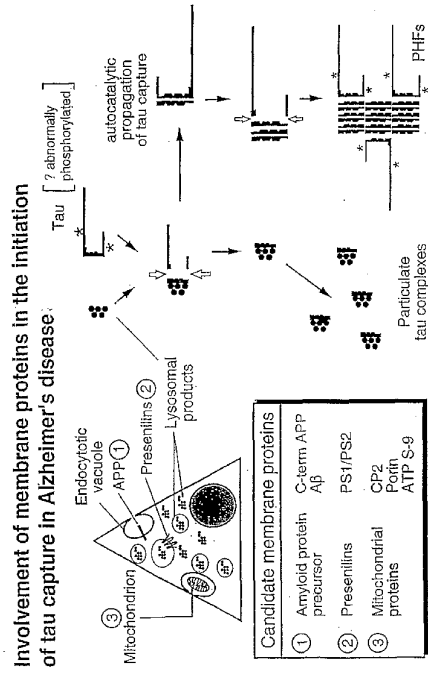


Figure 19a

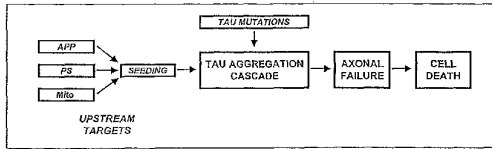


Figure 19b

Protein	Disease	Aggregating domain and/or mutations	Ref. subunit size (kDa)	Reference
Neurodegenerative disorders				
Prion protein				
	Prion diseases (CJD, vCJD, fatal familial insomnia, Gerstmann-Strausler-Scheutler syndrome, etc)	Invariant and sporadic forms P142-200, many residues	27	Prusiner (1986)
		Pathogenic domains: 175-200, 175-181, 202-216		Grassia et al. (1992)
Tau protein	Alzheimer's disease, Down's syndrome, FTDP-17, CBD, post-traumatic parkinsonism, Pick's disease, Picksonism with dementia complex of Guam	Microtubule-associated kinase Truncated tau (microtubule-binding domain) 297-384 Mutations in tau in FTDP-17 Many mutations in presenilin proteins	10-12	Wielicki et al. (1989) Holtzman et al. (1989) Cochran et al. (2000)
Amyloid β-protein	Alzheimer's disease, Down's syndrome	Inherited and sporadic forms A214G mutation 11 mutations in APP in kind families	4	Glenner & Wong, (1984) Gare et al. (1991)
Huntingtin	Huntington's disease	Normal C-terminal with expanded glutamine repeats	40	Difiglia et al. (1997)
Alexin (1, 2, 3, 7)	Spongiform ataxia (SCA1, 2, 3, 7)	Proteins with expanded glutamine repeats		Paulson et al. (2000)
Ataxin	Dentatorubral-pallidum atrophy (DRPLA)	Proteins with expanded glutamine repeats		Paulson et al. (2000)
Ataxin receptor	Spinal and tubular muscular atrophy	Proteins with expanded glutamine repeats		Paulson et al. (2000)
Neurospirin	Familial amyotrophic lateral sclerosis (FALS)	Neurospirin, 349P, S35R	27	Davis et al. (1999)
α-Synuclein	Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies, multiple system atrophy	Microtubule-associated with expanded glutamine repeats A53T, A30P in rare autosomal-dominant PD families	16	Schmechel et al. (1999) Polymeropoulos et al. (1997)
Cystatin C	Hereditary cerebral amyloidosis (Osaka)	Cystatin C has 10 residues, 58Q	15-13	Abramson et al. (1992)
Speroxida dismutase 1	Amyotrophic lateral sclerosis	SOD1 mutations		Shibata et al. (1996)
Non-neurodegenerative disorders				
Hemoglobin	Sickle cell anemia Iron-deficiency anemia	Hemoglobin beta chain (H)		Conell & Goepfer (1989)
Serpin	α -1-antitrypsin deficiency (emphysema, cirrhosis) A1-antitrypsin deficiency (hepatocellular carcinoma)	Mutations		Lomas et al. (1997)
Immunoglobulin light chain	Pharyngeal amyloidosis (AL amyloidosis)	Mutations		Cornis & Groppe (1995)
Serum amyloid A	Discrete secondary systemic AL amyloidosis	light chain or fragments	0.5-25	Wiedemars et al. (1986)
	Chronic inflammatory diseases	Variable N-terminal fragments of SAA	4.5-10	Westermarck et al. (1982)

(continued.....)

Figure 20

(.....continued)

Tritrichyalis	Familial amyloid polyneuropathy (systemic; FAP 1)	Tetranic; dissociated to conformational monomer variant Many mutations (some not associated with amyloid; several different types of disease)	10-14	Gustavsson et al. (1991)
Gelsolin	Senile cardiac amyloidosis Familial amyloidosis - Finnish type (FAP 7)	Normal transthyretin D197G locus is implicated (173-228/243 critical residues 182-182)	10-14 8-9	Gustavsson et al. (1991) Murry & Baranov (1990)
β 2-Microglobulin	Hemodialysis amyloidosis Prostatic amyloid	β 2-Microglobulin	12-25	Grover et al. (1995)
ApoA2/ApoA1	Familial amyloid polyneuropathy (systemic; FAP 10)	N-terminal 63-53 residues; G26R, W56R, L40R	9	Brodie et al. (1992)
Lysosomal	Familial visceral amyloidosis	Lysosome of fragments (with or without 157, 207)	14	Flajs et al. (1993)
Amylin (Irat amyloid polypeptide)	Type II diabetes (NIDDM)	Fragmente (critical core of 20-29); no mutations	3-9	Westmark (1990)
Fibrinogen α -chain	Hemodialysis renal amyloidosis	Fibrinogen fragments	7-10	Uemachi et al. (1984)
Fibrinogen	Mesangial carcinoma of thyroid	Calcium fragments	3-4	Selvan et al. (1979)
Actin	Cardiac amyloidosis	AMF; no mutants	3-5	Johansson et al. (1997)
Retinulin	Injection localized amyloidosis (in vitro)	Insulin		Dietze et al. (1988)
Other proteins forming amyloid		Other proteins		Chill et al. (1989)

Figure 20 cont ...

Col. 1	Row	Seq. No.	Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
46/44	2.3	PHF-1au	ubiquitin	Q ²⁰⁹	P	G	G	G	K	V	Q	I	V	Y	P ²⁰¹									
54/32	7.2	PHF-1au	ubiquitin	Q ²⁰⁹	P	G	G	G	K	V	I	V	Y	P ²⁰¹										
		perin	"	A ¹	V	P	T	Y	D	L	G ¹⁰													
		"	"	D ²⁰	L	K	T	K	E ²¹															
		"	"	N ²⁵⁵	F	E	.	.	N	L	A ²⁰⁴													
20/24	7.9	PHF-1au	ubiquitin	Q ²⁰⁹	P	G	G	G	K	V	Q	I	V	Y	K	P ²⁰¹								
		core-2	"	V ⁴	T	L	G	T							V ¹⁷									
		core-2	"	G ¹⁶	A	P	Q	P	Q	D	L	E	F	T	K	L	P							
20/18	1.7	subunit 9	"	D ¹	I	D	A	K	I	A	A ¹⁴													
14/12	4.0	PHF-1au	"	F ²⁴	Q	V	P	G	G	K	S	V	Q	I	V	Y	K	P	V	D	L	S	K	V ²⁰²
5		"	"	R ²	H	D	S	G	Y	E	V	H	Q	K	L	V	F	F	A	D	V ⁴			
		"	"	H ⁴	D	S	G	Y	E	V	H	L												
		"	"	Y ¹⁶	E	V	H	Q	L	P ¹⁰														
		"	"	Y ²⁰	E	V	H	Q	L	P ¹⁰														
		subunit 9	"	P ²	T	A	A	F	I	G	A	G	A	A	G ¹⁷									
Padua	2.6	PHF-1au	ubiquitin	P ²⁰⁹	K	V	Q	V	Y	K	P	V	D	L	S	K	V ²⁰²							
		ubiquitin	"	F ¹	V	L	T	G	T	T ¹⁴														
		subunit 9	"	P ²	D	T	A	A	K	F	I	G	A	G	A	T	V ¹⁶							
TOTAL	25.7																							

Figure 21

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
1 August 2002 (01.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/059150 A3

- (51) International Patent Classification: C12N 15/11, 15/12, 15/62, 15/85, C07K 14/47, 19/00, G01N 33/68, A01K 67/027
- (21) International Application Number: PCT/GB02/00005
- (22) International Filing Date: 2 January 2002 (02.01.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 01/00119.7 3 January 2001 (03.01.2001) GB
- (71) Applicant (for all designated States except US): THE UNIVERSITY COURT OF THE UNIVERSITY OF ABERDEEN [GB/GB]; Regent Walk, Aberdeen, Grampian AB24 3FX (GB).
- (72) Inventors and
(75) Inventors/Applicants (for US only): WISCHIK, Claude, Michel [FR/GB]; Department of Mental Health, University of Aberdeen, University Medical Buildings, Foresterhill, Aberdeen, Aberdeenshire AB25 2ZD (GB). RICKARD, Janet, Elizabeth [GB/GB]; Department of Mental Health, University of Aberdeen, University Medical Buildings, Foresterhill, Aberdeen, Aberdeenshire AB25 2ZD (GB). HORSLEY, David [GB/GB]; Department of Mental Health, University of Aberdeen, University Medical Buildings, Foresterhill, Aberdeen, Aberdeenshire AB25 2ZD (GB). HARRINGTON, Charles, Robert [GB/GB]; Department of Mental Health, University of Aberdeen, University Medical Buildings, Foresterhill, Aberdeen, Aberdeenshire AB25 2ZD (GB). THEURING, Franz [DE/DE]; University Hospital Charité, Institute of Pharmacology and Toxicology, Dorotheenstr. 94, 10117 Berlin (DE). STAMER, Karsten [DE/DE]; University Hospital Charité, Institute of Pharmacology and Toxicology, Dorotheenstr. 94, 10117 Berlin (DE). ZABKE, Claudia [DE/DE]; University Hospital Charité, Institute of Pharmacology and Toxicology, Dorotheenstr. 94, 10117 Berlin (DE).
- (74) Agents: KREMER, Simon, M. et al.; Mewburn Ellis, York House, 23 Kingsway, London, Greater London WC2B 6HP (GB).
- (81) Designated States (national): AI, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report
before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- (88) Date of publication of the international search report: 5 December 2002
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/059150 A3

(54) Title: MATERIALS AND METHODS RELATING TO PROTEIN AGGREGATION IN NEURODEGENERATIVE DISEASE

(57) Abstract: Disclosed are methods of inducing or modelling the pathological state of an aggregating disease protein (ADP - e.g. tau protein) which is associated with a disease state in which the ADP aggregates pathologically (e.g. Alzheimer's disease) through an induced conformational polymerisation interaction, the method being characterised by the step of providing a membrane-localisable fusion protein comprising (i) an aggregating portion, which is derived from the ADP, or from a protein which initiates pathological aggregation of the ADP, (ii) a heterologous membrane-localising portion. Membrane-localisation of the ADP-based fusion protein is believed to cause the high-affinity capture site of the ADP protein to become exposed such that aggregation of further ADP, which may be native or heterologous to the system, to be promoted. The method can be carried out in vitro, or in cell- and animal-models, and may be used to screen for modulators of the aggregation process by monitoring aggregation e.g. by monitoring the production of the ADP-related degradation products resulting from the aggregation. Also provided are materials, processes for use in or with the methods.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		In	ai Application No
		PCT/GB	02/00005
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER			
IPC 7	C12N15/11 C07K19/00	C12N15/12 G01N33/68	C12N15/62 A01K67/027
	C12N15/85	C07K14/47	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC			
B. FIELDS SEARCHED			
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)			
IPC 7	C12N	C07K	G01N A01K
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched			
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)			
BIOSIS, SEQUENCE SEARCH			
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
Y	WO 99 62548 A (GHETTI BERNARDINO; FARLOW MARTIN R; GOEDERT MICHEL; KLUG AARON; MURRELL) 9 December 1999 (1999-12-09) the whole document	1-54, 56-86	
Y	WO 96 30766 A (HOFFMANN LA ROCHE ; HARRINGTON CHARLES ROBERT (GB); WISCHIK CLAUDE) 3 October 1996 (1996-10-03) the whole document	1-54, 56-86	
P, X	WO 01 53340 A (GURNEY MARK E ; ABRAHAM IRENE (US); UPJOHN CO (US)) 26 July 2001 (2001-07-26) the whole document	1-54, 56-86	
P, X	WO 01 95709 A (TAKASHIMA AKIHIKO ; RIKEN (JP)) 20 December 2001 (2001-12-20) abstract	1-54, 56-86	
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.			
* Special categories of cited documents:			
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone ** document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *A* document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report	
18 September 2002		26/09/2002	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P. B. 5618 Patentleien 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 840-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 840-3016		Authorized officer Hillenbrand, G	

International Application No. PCT/GB 02 00005

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Present claims 1-54 and 56-86 relate to an extremely large number of possible compounds designated as aggregating disease protein (ADP). Support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the compounds and methods claimed. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, namely those parts relating to Tau (MAPT or MTBI) as one part of the fusion protein.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/GB 02/00005
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:	
2. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210	
3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:	
1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
Remark on Protest	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International Application No. PCT/GB 02/00005				
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	Publication date	Publication date			
WO 9962548	A	09-12-1999	AU 4322999 A	20-12-1999				
			WO 9962548 A1	09-12-1999				
			US 2002018995 A1	14-02-2002				
WO 9630766	A	03-10-1996	AT 221662 T	15-08-2002				
			AU 5334496 A	16-10-1996				
			BR 9607846 A	14-07-1998				
			CA 2215397 A1	03-10-1996				
			DE 69622701 D1	05-09-2002				
			WO 9630766 A1	03-10-1996				
			EP 1067386 A2	10-01-2001				
			EP 0817969 A1	14-01-1998				
			JP 11502925 T	09-03-1999				
			TR 9701039 T1	21-02-1998				
			US 6376205 B1	23-04-2002				
			WO 0153340	A	26-07-2001	AU 2961901 A	31-07-2001	
						WO 0153340 A2	26-07-2001	
US 2002010947 A1	24-01-2002							
WO 0195709	A	20-12-2001	JP 2001352860 A	25-12-2001				
			WO 0195709 A1	20-12-2001				

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 14/47	4 H 0 4 5
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 5/00	B

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ヴィスシク, クロード・ミシェル

イギリス国、アバディーンシャー エービー 2 5 2 ゼットディー、アバディーン、フォレスターヒル、ユニバーシティ・メディカル・ビルディングズ、ユニバーシティ・オブ・アバディーン、デパートメント・オブ・メンタル・ヘルス

(72) 発明者 リッカード, ジャネット・エリザベス

イギリス国、アバディーンシャー エービー 2 5 2 ゼットディー、アバディーン、フォレスターヒル、ユニバーシティ・メディカル・ビルディングズ、ユニバーシティ・オブ・アバディーン、デパートメント・オブ・メンタル・ヘルス

(72) 発明者 ホースレイ, デービッド

イギリス国、アバディーンシャー エービー 2 5 2 ゼットディー、アバディーン、フォレスターヒル、ユニバーシティ・メディカル・ビルディングズ、ユニバーシティ・オブ・アバディーン、デパートメント・オブ・メンタル・ヘルス

(72) 発明者 ハリントン, チャールズ・ロバート

イギリス国、アバディーンシャー エービー 2 5 2 ゼットディー、アバディーン、フォレスターヒル、ユニバーシティ・メディカル・ビルディングズ、ユニバーシティ・オブ・アバディーン、デパートメント・オブ・メンタル・ヘルス

(72) 発明者 テーリング, フランツ

ドイツ国、1 0 1 1 7 ベルリン、ドロシエンシュトラッセ 9 4、インスティテュート・オブ・ファーマコロジー・アンド・トキシコロジー、ユニバーシティ・ホスピタル・チャリテ

(72) 発明者 シュタメル, カルステン

ドイツ国、1 0 1 1 7 ベルリン、ドロシエンシュトラッセ 9 4、インスティテュート・オブ・ファーマコロジー・アンド・トキシコロジー、ユニバーシティ・ホスピタル・チャリテ

(72) 発明者 ツァブケ, クラウディア

ドイツ国、1 0 1 1 7 ベルリン、ドロシエンシュトラッセ 9 4、インスティテュート・オブ・ファーマコロジー・アンド・トキシコロジー、ユニバーシティ・ホスピタル・チャリテ

F ターム(参考) 2G045 AA40 BB03 BB20 CB01 CB17 DA12 DA13 DA14 DA36 DA77

FA16 FB03

4B024 AA01 AA11 BA80 CA05 CA07 DA02 FA18 HA11 HA17

4B064 AG01 CA19 CC24 DA01 DA13

4B065 AA91X AA91Y AB01 CA24 CA44 CA46

4C084 AA17 NA14 ZA152 ZA162 ZC022

4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 CA45 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	神经退行性疾病中蛋白质聚集的材料和方法		
公开(公告)号	JP2004531224A	公开(公告)日	2004-10-14
申请号	JP2002559452	申请日	2002-01-02
申请(专利权)人(译)	阿伯丁大学的大学学院		
[标]发明人	ヴイスシッククロードミシェル リッカードジャネットエリザベス ホースレイデービッド ハリントンチャールズロバート テーリングフランツ シュタメルカルステン ツアブケクラウディア		
发明人	ヴイスシック,クロード・ミシェル リッカード,ジャネット・エリザベス ホースレイ,デービッド ハリントン,チャールズ・ロバート テーリング,フランツ シュタメル,カルステン ツアブケ,クラウディア		
IPC分类号	A01K67/027 A61K45/00 A61P25/28 A61P43/00 C07K14/47 C07K19/00 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12N15/85 C12P21/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	A01K67/0275 A01K2207/15 A01K2217/00 A01K2217/05 A01K2217/20 A01K2227/105 A01K2267/0312 A01K2267/0318 A61P25/28 C07K14/4711 C07K2319/00 C12N15/8509 G01N33/6896 G01N2500/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61K45/00 A61P25/28 A61P43/00.111 C07K14/47 C07K19/00 C12P21/02.C G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D C12N5/00.B		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FA16 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA05 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/FA18 4B024/HA11 4B024/HA17 4B064/AG01 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065/AB01 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA152 4C084/ZA162 4C084/ZC022 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA45 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	津国 肇 筱田文雄		
优先权	2001000119 2001-01-03 GB		
其他公开文献	JP2004531224A5 JP4580618B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

聚合相互作用构象，病理疾病的聚集蛋白（ADP，例如 τ 蛋白）聚集疾病蛋白质与病理的诱导（例如，阿尔茨海默氏病）病理聚合（ADP，例如 τ 蛋白）的任一方法或模型化诱导状态，数据开始的病理聚集或ADP选自（i）衍生ADP和（ii）包含能够异源膜定位的蛋白质的膜定位融合蛋白。基于ADP的融合蛋白膜定位导致ADP蛋白的高亲和力捕获位点暴露，从而促进系统天然或异源的另一ADP的聚集有人认为。可以在体外或在细胞和动物模型，并且通过通过监测ADP观察相关改性产物的产生使用该监视观测聚集，聚集过程的一个调制器来执行该方法是，例如，聚合的结果可以筛选。还提供了与该方法相关的材料和工艺。

(51) Int. Cl. ⁷		F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N	15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 2 G O 4 5
A O 1 K	67/027	A O 1 K 67/027	4 B O 2 4
A 6 1 K	45/00	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 4
A 6 1 P	25/28	A 6 1 P 25/28	4 B O 6 5
A 6 1 P	43/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1 4 C O 8 4
		審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 184 頁) 最終頁1
(21) 出願番号	特願2002-559452 (P2002-559452)	(71) 出願人	503241331
(86) (22) 出願日	平成14年1月2日 (2002.1.2)		ザ・ユニバーシティ・コト・オブ・
(85) 翻訳文提出日	平成15年7月3日 (2003.7.3)		ユニバーシティ・オブ・アバディーン
(86) 国際出願番号	PCT/GB2002/000005		THE UNIVERSITY CO
(87) 国際公開番号	W02002/059150		T OF THE UNIVERSI
(87) 国際公開日	平成14年8月1日 (2002.8.1)		OF ABERDEEN
(31) 優先権主張番号	0100119.7		イギリス国、グランビアン エービー
(32) 優先日	平成13年1月3日 (2001.1.3)		3エフエックス、アバディーン、リ
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		ェント・ウォーク
		(74) 代理人	100078662
			弁理士 津国 肇
		(74) 代理人	100075225
			弁理士 篠田 文雄