



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.04.27

(51) Int. Cl. **G01N 33/50** (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(21) Номер заявки
201992280

(22) Дата подачи заявки
2018.03.27

(54) СПОСОБЫ ВЫЯВЛЕНИЯ СОЕДИНЕНИЙ, МОДУЛИРУЮЩИХ АГРЕГАЦИЮ ТАУ-БЕЛКА

(31) **17163426.4**

(32) **2017.03.28**

(33) **EP**

(43) **2020.02.29**

(86) **PCT/EP2018/057781**

(87) **WO 2018/178080 2018.10.04**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЯНССЕН ВЭКСИНС ЭНД
ПРЕВЕНШН Б.В. (NL)**

(72) Изобретатель:
**Креспо Родригес Роза, Апетри
Константин Адриан (NL)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) US-A1-2002197737
GOEDERT M. ET AL.: "Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans", NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD., ETC, vol. 383, no. 6600, 1 January 1996 (1996-01-01), pages 550-553, XP009141830, ISSN: 0028-0836, page 552 - page 553

PEREZ M. ET AL.: "POLYMERIZATION OF TAU INTO FILAMENTS IN THE PRESENCE OF HEPARIN: THE MINIMAL SEQUENCE REQUIRED FOR TAU-TAU INTERACTION", JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY, WILEY INTERSCIENCE, NEW YORK, NY, US, vol. 67, no.

3, 1 September 1996 (1996-09-01), pages 1183-1190, XP002066480, ISSN: 0022-3042, abstract

S. BARGHORN ET AL.: "Toward a Unified Scheme for the Aggregation of Tau into Alzheimer Paired Helical Filaments +", BIOCHEMISTRY, vol. 41, no. 50, 1 December 2002 (2002-12-01), pages 14885-14896, XP055389351, US, ISSN: 0006-2960, DOI: 10.1021/bi026469j, cited in the application, page 14886; figures

PETER FRIEDHOFF ET AL.: "Rapid Assembly of Alzheimer-like Paired Helical Filaments from Microtubule-Associated Protein Tau Monitored by Fluorescence in Solution +", BIOCHEMISTRY, vol. 37, no. 28, 1 July 1998 (1998-07-01), pages 10223-10230, XP055389369, US, ISSN: 0006-2960, DOI: 10.1021/bi980537d, page 10224 - page 10228; figures

US-A1-2007218491

YAO T.-M.: "Aggregation Analysis of the Microtubule Binding Domain in Tau Protein by Spectroscopic Methods", JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, OXFORD UNIVERSITY PRESS, GB, vol. 134, no. 1, 1 January 2003 (2003-01-01), pages 91-99, XP002996491, ISSN: 0021-924X, DOI: 10.1093/JB/MVG116, page 92 - page 92; figures

SADASIVAM JEGANATHAN ET AL.: "The Natively Unfolded Character of Tau and Its Aggregation to Alzheimer-like Paired Helical Filaments +", BIOCHEMISTRY, vol. 47, no. 40, 7 October 2008 (2008-10-07), pages 10526-10539, XP055389341, US, ISSN: 0006-2960, DOI: 10.1021/bi800783d, page 10527 - page 10528; figures

(57) В изобретении представлен способ *in vitro* обеспечения образования и/или выявления парных спиральных филаментов (PHF) тау-белка, включающий инкубирование смеси, содержащей препарат на основе тау-белка и полианионный кофактор, в течение предварительно заданного периода времени в условиях, стимулирующих образование PHF.

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к новым способам *in vitro* обеспечения образования и выявления парных спиральных филаментов (PHF) тау-белка. Эти способы можно использовать для отбора соединений, способных к модулированию, например, ингибированию патологической белковой ассоциации тау-тау и патологической агрегации нейрофиламентов. Способы по настоящему изобретению особенно применимы в скрининге соединений, предназначенных для профилактики и лечения болезни Альцгеймера (AD).

Предпосылки к созданию изобретения

Деменция представляет собой синдром, который может быть вызван рядом прогрессирующих нарушений, оказывающих негативное влияние на память, мышление, поведение и способность к повседневной активности. В настоящее время приблизительно 36 миллионов человек во всем мире страдают от деменции. По прогнозам количество людей с деменцией удвоится к 2030 году и более чем утроится к 2050 году, что составит 115,4 миллиона человек.

Болезнь Альцгеймера (AD) является наиболее распространенным типом деменции. На текущий момент у одного из девяти человек 65 летнего возраста и старше (11%) и почти у половины лиц старше 85 лет имеется болезнь Альцгеймера. Согласно международной федерации "Alzheimer's Disease International" текущие глобальные затраты на уход за этими пациентами ежегодно превышают 600 миллиардов долларов. Эти расходы, вероятно, возрастут еще быстрее, чем распространенность заболевания, особенно в развивающихся странах, поскольку появляется больше официальных систем социальной защиты и рост доходов приводит к повышению альтернативных издержек.

AD характеризуется двумя видами патологических накоплений белка в головном мозге пораженных индивидуумов, а именно амилоидными бляшками, состоящими в основном из амилоидных волокон, которые собираются из бета-амилоидного (A β) пептида (производного амилоидного белка-предшественника, APP), и нейрофибриллярными клубками (NFT). NFT образуются за счет гиперфосфорилирования ассоциированного с микротрубочками белка, известного под названием тау, в результате чего он агрегируется или группируется в нерастворимой форме. Эти агрегаты гиперфосфорилированного тау-белка также называются PHF или "парные спиральные филаменты". Эти агрегаты являются гистопатологическим признаком не только AD, но и многих нейродегенеративных заболеваний, которые в совокупности известны под названием таупатии. Таупатии включают, например, болезнь Альцгеймера (AD), болезнь Пика (PiD), прогрессирующий надъядерный паралич (PSP), кортикобазальную дегенерацию (CBD) и лобно-височную лобарную дегенерацию (FTLD).

Помимо того что агрегаты тау-белка служат в качестве маркера для дифференциальной диагностики и определения стадии заболевания, они также могут способствовать прогрессированию заболевания. Таким образом, различные стратегии ингибирования агрегации тау-белка исследуют в качестве потенциальных способов лечения, направленных против образования нейрофибриллярных очагов поражения и прогрессирования заболевания. Из предшествующего уровня техники было описано несколько анализов для *in vitro* определения образования PHF (Friedhoff et al., *Biochemistry* 1998, 37: 10223-10230; Barghorn and Mandelkow, *Biochemistry* 2002, 41: 14885-14896; Morozova et al., *Biochemistry* 2013, 52:6960-6967). Таким образом, сборка тау-белка в филаменты может быть воспроизведена *in vitro* путем добавления таких соединений, как полианионы и жирные кислоты (и их производные). Однако эти способы показали низкую воспроизводимость, и до сих пор не существует надежных способов получения однородной совокупности тау-олигомеров, что затрудняет возможность оценки токсичности тау-олигомера и его возможной роли в развитии заболевания.

Следовательно, все еще существует потребность в новых и надежных способах, которые могут быть использованы, в частности, для тестирования потенциальных лекарственных средств, которые могут нарушать описанную выше патологическую сборку тау-белка, что может быть применимым для отбора новых и эффективных лекарственных средств, применимых в диагностике и/или лечении таупатии, таких как AD.

Краткое описание изобретения

В первом аспекте в настоящем изобретении представлен способ обеспечения образования *in vitro* парных спиральных филаментов (PHF) тау-белка, включающий инкубирование смеси, содержащей препарат на основе тау-белка и полианионный кофактор, в течение предварительно заданного периода времени в условиях, стимулирующих образование PHF.

В дополнительном аспекте в настоящем изобретении представлен способ выявления *in vitro* образования парных спиральных филаментов (PHF) тау-белка, включающий стадии:

(a) инкубирования смеси, содержащей белковый препарат на основе тау-белка и полианионный кофактор, в течение предварительно заданного периода времени в условиях, стимулирующих образование PHF; и

(b) выявления образовавшихся PHF с помощью средств микроскопии или спектроскопии.

В настоящем изобретении дополнительно представлен способ идентификации *in vitro* соединения, которое способно ингибировать или стимулировать образование парных спиральных филаментов тау-белка, включающий стадии:

(a) проведения способа, описанного выше, в отсутствие и в присутствии тестируемого соединения; и

(b) сравнения кинетических параметров образования РНФ в отсутствие указанного тестируемого соединения с кинетическими параметрами образования РНФ в присутствии указанного тестируемого соединения.

В настоящем изобретении представлены новые и надежные способы обеспечения образования и выявления РНФ, которые могут быть применимы для идентификации и отбора соединений, способных к модулированию, например стимулированию или ингибированию патологической ассоциации тау-тау-белка и патологической агрегации нейрофиламентов. Способы по настоящему изобретению особенно применимы в скрининге соединений, предназначенных для профилактики и лечения болезни Альцгеймера (AD).

Краткое описание фигур

Фиг. 1- кинетические параметры агрегации рекомбинантного тау-белка (15 мкМ, pH 7,4), измеренные с помощью флуоресцентной спектроскопии с использованием ThT. Показано, что данные демонстрируют неудовлетворительную воспроизводимость (4 повторности);

фиг. 2 - кинетические параметры агрегации рекомбинантного тау-белка, 10 мкМ (○) и 20 мкМ (▲), pH 7,4, измеренные с помощью флуоресцентной спектроскопии с использованием ThT. Данные продемонстрировали неудовлетворительную воспроизводимость (2 повторности для каждой концентрации);

фиг. 3 - результаты способов из предшествующего уровня техники;

фиг. 4 - кинетические параметры агрегации рекомбинантного тау-белка при концентрации 10 мкМ в отсутствие (○) и в присутствии (●) 1 мМ ТСЕР (3 повторности для каждого условия), измеренные с помощью флуоресцентной спектроскопии с использованием ThT4;

фиг. 5 - кинетические параметры агрегации рекомбинантного тау-белка, (DCysM гТау в PBS, заморожено), 15 мкМ, pH 7,4, измеренные с помощью флуоресцентной спектроскопии с использованием ThT. Показатели измерения регистрировали с использованием коэффициента усиления 60. Данные продемонстрировали неудовлетворительную воспроизводимость (5 повторностей);

фиг. 6 - четыре повторности для измерения кинетических параметров агрегации рекомбинантного тау-белка (DCysM гТау, замороженный в PBS, pH 7,4), 15 мкМ, измеренной с помощью флуоресцентной спектроскопии с использованием ThT. Показатели измерения регистрировали с использованием коэффициента усиления 80;

фиг. 7 - четыре повторности для кинетических параметров агрегации рекомбинантного тау-белка (DCysM гТау, лиофилизированного в PBS, 0,5 мМ ТСЕР, pH 6,5), 15 мкМ, измеренных с помощью флуоресцентной спектроскопии с использованием ThT. Показатели измерения регистрировали с использованием коэффициента усиления 80;

фиг. 8 - изображения, полученные с помощью AFM (атомно-силовой микроскопии), для DCysM гТау в концентрации 15 мкМ, лиофилизированного в PBS, 0,5 мМ ТСЕР, pH 6,5. А: изображение с масштабированием 1 мкм. В: изображение с масштабированием 300 нм;

фиг. 9 - данные анализа с использованием затравки: кинетические параметры агрегации рекомбинантного тау-белка (DCysM гТау в PBS, 0,5 мМ ТСЕР, лиофилизированный), 15 мкМ, pH 6,5, измеренная по флуоресценции ThT. Данные показаны при отсутствии затравки (●) или при добавлении соответственно 2,5% (○), 0,63% (Л) или 0,16% (□) предварительно полученной затравки;

фиг. 10 - данные по зависимости от концентрации: кинетических параметров агрегации рекомбинантного тау-белка (DCysM гТау в PBS, 0,5 мМ ТСЕР, лиофилизированный) 5 (Δ), 10 (○), 15 (∨) и 20 мкМ (□), измеренной по флуоресценции ThT. Показатели измерения регистрировали с использованием коэффициента усиления 80. Выявили, что критическая концентрация (минимальная концентрация тау-белка в воде, необходимая для агрегации) находится в диапазоне от 5 до 10 мкМ;

фиг. 11 - кинетические параметры агрегации рекомбинантного тау-белка (DCysM гТау, pH 6,7), 15 мкМ, измеренные по флуоресценции ThT в отсутствие и в присутствии СВТАУ 27.1 (гТау отдельно - сплошная линия или с СВТАУ-27.1 при концентрации 3 мкМ - точечная линия; 6 мкМ - линия из тире/точек; 9 мкМ - пунктирная линия).

Подробное описание изобретения

NFT представляют собой внутринейрональные агрегаты тау-белка, ассоциированного с микротрубочками, образующиеся за счет гиперфосфорилирования тау-белка, в результате чего он агрегируется в нерастворимой форме. Эти агрегаты гиперфосфорилированного тау-белка также называют "парными спиральными филаментами" (РНФ). Точный механизм образования клубков полностью не выяснен, а вопрос о том, являются ли клубки первичным этиологическим фактором в заболевании или играют более второстепенную роль, все еще остается предметом дискуссий. Однако поскольку РНФ вовлечены в нейродегенерацию, представляет интерес воспроизведение процесса агрегации *in vitro* в надежде на понимание основных принципов агрегации и выявление средств, которые предотвращают возникновение или вызывают регресс данного процесса.

Известно, что агрегация тау-белка осуществляется по механизму нуклеационно зависимой полимеризации (NDP), что выражается в образовании сигмоидальных кривых, в которых различают две отдельные стадии: стадию нуклеации (лаг-фазы) и фазу роста (экспоненциального роста после лаг-фазы), при-

водящих в результате к конечному уровню плато агрегации.

Определяющими критериями для механизма NDP, как правило, являются следующие:

сигмоидальные кинетические кривые, демонстрирующие лаг-фазу, после которой следует экспоненциальный рост;

эффективное внесение затравки с исключением нуклеации (т.е. при добавлении затравки должен наблюдаться экспоненциальный рост с полным исключением лаг-фазы; и зависимость от концентрации.

В соответствии с изобретением был разработан *in vitro* анализ образования РНФ, с помощью которого обнаруживают параметры, присущие для механизма нуклеационно зависимой полимеризации.

Таким образом, в первом аспекте в настоящем изобретении представлен способ обеспечения образования *in vitro* парных спиральных филаментов (РНФ) тау-белка, включающий инкубирование препарата на основе тау-белка и полианионного кофактора в течение предварительно заданного периода времени в условиях, стимулирующих образование РНФ.

В некоторых вариантах осуществления условия, стимулирующие образование РНФ, предусматривают встряхивание инкубационной смеси при 350-500 циклах в минуту, предпочтительно 400-450 циклах в минуту, в частности 425 циклах в минуту.

Тау-белки получают из альтернативных сплайс-вариантов мРНК, которые образуются в результате транскрибирования одного гена и дают в результате зрелые белки, размер которых варьирует от 352 до 441 аминокислоты (от 36,8 до 45,9 кДа). Существует шесть изоформ тау-белка, каждая из которых отличается друг от друга тремя или четырьмя повторами, связывающими микротрубочки (R), и состоит из 31-32 аминокислот, и двумя, одной аминоконцевыми вставками (N), каждая из которых состоит из 29 аминокислот, или ни одной из них. В некоторых вариантах осуществления тау-белок представляет собой полноразмерный рекомбинантный тау-белок, самая длинная изоформа которого предпочтительно содержит две N-концевые вставки и четыре домена, связывающие микротрубочки, в частности тау 441.

В некоторых вариантах осуществления препарат на основе тау-белка представляет собой по сути чистый препарат на основе тау-белка. По сути, чистый препарат на основе тау-белка, используемый в данном документе, обозначает препарат на основе тау-белка, который является чистым на по меньшей мере 99%.

В некоторых вариантах осуществления концентрация тау-белка в инкубационной смеси находится в диапазоне от 10 до 30 мкМ, предпочтительно от 12 до 20 мкМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация тау-белка в инкубационной смеси составляет 15 мкМ.

В некоторых вариантах осуществления тау-белок находится в восстановленной форме. Это может быть достигнуто путем добавления восстанавливающего средства к инкубационной смеси, такого как трис(2-карбоксиэтил)фосфина гидрохлорид (ТСЕР). В качестве альтернативы в некоторых вариантах осуществления тау-белок представляет собой мутантный рекомбинантный тау-белок, в котором цистеиновые остатки подвергнуты мутации. Таким образом, тау-белок останется в восстановленной форме и восстанавливающее средство не потребуется.

В некоторых вариантах осуществления инкубацию проводят при показателе pH от 6,0 до 7,4, предпочтительно от 6,5 до 7,0, более предпочтительно при показателе pH 6,7.

В некоторых вариантах осуществления инкубацию проводят при температуре от 36 до 38°C, предпочтительно при температуре 37°C.

В некоторых вариантах осуществления полианионный кофактор представляет собой гепарин. В некоторых вариантах осуществления соотношение гепарина и тау-белка составляет 1:2.

В некоторых вариантах осуществления предварительно заданный период времени составляет от 20 до 60 ч, предпочтительно от 25 до 45 ч, в частности приблизительно 40 ч.

В соответствии с настоящим изобретением было обнаружено, что при использовании высокоочищенного препарата на основе тау-белка и оптимизированных условий инкубации агрегацию тау-белка можно имитировать *in vitro* с высокой воспроизводимостью. В способе по настоящему изобретению проявляются характеристики, присущие механизму нуклеационно зависимой полимеризации (лаг-фаза с последующим экспоненциальным ростом и стационарной фазой). Полученные агрегаты демонстрируют РНФ-подобную морфологию, что было подтверждено на изображениях, полученных с помощью атомно-силовой микроскопии, и они являются исключительно эффективными при внесении в качестве затравки для *de novo* агрегации тау-белка.

В настоящем изобретении дополнительно представлен способ *in vitro* выявления образования парных спиральных филаментов (РНФ) тау-белка, включающий стадии:

(а) инкубирования тау-белка и полианионного кофактора в течение предварительно заданного периода времени в условиях, стимулирующих образование РНФ; и

(б) выявления образовавшихся РНФ с помощью средств микроскопии или спектроскопии.

Известно несколько способов выявления образовавшихся РНФ.

Согласно настоящему изобретению выявление образовавшихся РНФ можно осуществлять с помощью средств микроскопии, таких как электронная микроскопия (ЕМ), атомно-силовая микроскопия (AFM), или средств спектроскопии. В некоторых вариантах осуществления средства спектроскопии

включают флуоресцентную спектроскопию, преимущественно флуоресцентную спектроскопию с использованием тиофлавина Т.

В настоящем изобретении дополнительно представлен способ *in vitro* идентификации соединения, которое способно к ингибированию или стимулированию образования парных спиральных филаментов тау-белка, включающий осуществление способа, описанного выше, как в отсутствие, так и в присутствии тестируемого соединения; и сравнение кинетических параметров образования РНФ в отсутствие указанного тестируемого соединения с кинетическими параметрами образования РНФ в присутствии указанного тестируемого соединения.

Если тестируемое соединение ингибирует образование РНФ, то кинетические параметры будут более низкими и будут характеризоваться более длительной лаг-фазой, и/или фазой роста со слабым наклоном, и/или более низким плато.

Если тестируемое соединение стимулирует образование РНФ, то кинетические параметры будут характеризоваться более короткой лаг-фазой, и/или более крутой фазой роста, и/или более высоким плато.

Термин "образование РНФ", используемый в соответствии с настоящим изобретением, означает сборку или агрегацию тау-белка или его фрагментов в парные спиральные филаменты. РНФ характеризуются сборкой высокого порядка неправильно уложенных молекул тау-белка с фибриллярной морфологией.

Термин "ингибирование образования РНФ", используемый в данном документе, не ограничивается (полным) "ингибированием" и дополнительно включает "замедление" образования РНФ в подходящих *in vitro* условиях.

Согласно настоящему изобретению соединение, которое способно к стимулированию или ингибированию образования РНФ, может представлять собой антитело или его производное и/или фрагмент.

Другие потенциальные индукторы или ингибиторы, подлежащие скринингу с применением способа по настоящему изобретению, включают малые молекулы, которые связываются с соответствующими сайтами на тау-белке, взаимодействуют с ними и/или оккупируют их. Настоящее изобретение особенно применимо в проведении анализа потенциальных ингибиторов образования РНФ.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано в примерах, которые не направлены на ограничение настоящего изобретения.

Примеры

Пример 1. Анализ агрегации *in vitro*, проводимый в формате кюветы.

Полноразмерный тау-белок экспрессировали в *E.coli* BL21 (DE3), очищали с помощью аффинной хроматографии His-Тар и хранили в PBS при pH 7,4 (в аликвотах) при -80°C. Исходный раствор тиофлавина Т (ThT) 500 мкМ готовили путем растворения сухого порошка (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) в PBS, pH 7,4, и фильтровали через стерильный мембранный фильтр PES с размером пор 0,22 мкм (Корнинг, Нью-Йорк, США). Концентрацию определяли путем измерения поглощения при 411 нм с использованием коэффициента погашения $22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Свежий исходный раствор гепарина готовили путем растворения сухого порошка ($M_w=17-19 \text{ кДа}$; Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) в PBS, pH 7,4, фильтровали через стерильный мембранный фильтр PVDF с размером пор 0,22 мкм (Merck Millipore, Таллагрин, Корк, Ирландия).

Образцы объемом 200 мкл, содержащие ThT в конечной концентрации, составляющей 25 мкМ, рекомбинантный тау-белок в концентрации 10-15 мкМ (концентрацию определяли путем измерения поглощения при 280 нм с использованием коэффициента погашения $0,31 \text{ мл мг}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) и гепарин при соотношении рекомбинантный тау-белок и гепарин=2:1, инкубировали при 37°C в 0,5 мл пробирках типа эппендорф при непрерывном встряхивании в цифровом ротаторе ИКА Loopster (15 об/мин.).

Небольшие количества вышеописанной инкубационной реакционной смеси (10 мкл) периодически отбирали и смешивали с раствором ThT 25 мкМ в конечном объеме 500 мкл. Измерения кинетических параметров по флуоресценции ThT проводили при температуре 25°C в кварцевых ячейках с толщиной светопоглощающего слоя 5 мм (Hellma Analytics, Германия) в дифференциальном/работающем на дискретных длинах волн спектрофлуориметре ATF 105 (Aviv, Нью-Джерси, США). Эмиссионные сканогаммы в диапазоне 600-460 нм (максимум 482 нм) регистрировали с длиной волны возбуждения 440 нм, используя ширину полосы пропускания 4 нм и напряжение 700/260 В. В процессе фибриллизации рекомбинантного тау-белка наблюдали отсутствие воспроизводимости в лаг-фазе, фазе роста и конечных уровнях плато агрегации. (фиг. 1 и 2). Определяющие критерии нуклеационно зависимой полимеризации (NDP) не были удовлетворены. Об этом также сообщали в литературных источниках (фиг. 3). Значительная часть опубликованных данных относится к фрагментам рекомбинантного тау-белка, но не к полноразмерному рекомбинантному тау-белку, которые агрегируются с намного большей скоростью. Наблюдали полное отсутствие воспроизводимости данных; при этом показана сигмоидальная кинетическая кривая без отчетливо выраженной лаг-фазы с последующим экспоненциальным ростом или с одновременным неэффективным внесением затравки.

Молекула тау-белка содержит два цистеина, которые могут образовывать дисульфидные мостики, приводящие в результате к различным конформациям, которые оказывают большое влияние на кинетические параметры агрегации. Для уменьшения количества дисульфидных мостиков к раствору белка до-

бавляли восстанавливающее средство, представляющее собой трис(2-карбокситил)фосфина гидрохлорид (ТСЕР). Кинетические параметры процесса агрегации определяли с помощью флуоресценции ThT в отсутствие и в присутствии ТСЕР (фиг. 4).

Результаты в присутствии ТСЕР показали более высокий показатель воспроизводимости и разный характер изменения кинетических параметров. В отсутствие ТСЕР наблюдали разный характер реакции (вариабельность партий). Дисульфидные мостики могут образовывать компактные мономер или димеры, и при уменьшении количества дисульфидных мостиков ожидается, что молекула тау-белка будет представлять собой открытый мономер. С одной стороны, присутствие компактных мономеров удлинит лаг-фазу, а также снизит конечный уровень плато агрегации. С другой стороны, присутствие димеров значительно ускорит процесс агрегации. Сочетание различных молекулярных конформаций может оказывать влияние на конечный уровень плато агрегации.

На основании этих результатов приняли решение использовать мутантный тау-белок (DCysM rTau), в котором остаток цистеина подвергли мутации путем их замены аланином.

Пример 2. Анализ агрегации *in vitro*, проводимый в формате планшет-ридера.

Полноразмерный тау-белок с мутацией по двум цистеинам (DCysM Tau) экспрессировали в *E. coli* BL21 (DE3), очищали с помощью аффинной хроматографии His-Тгар и хранили в PBS, pH 7,4, (в аликвотах) при -80°C . Измерения кинетических параметров по флуоресценции ThT проводили при температуре 37°C в 96-луночных планшетах (Thermo Scientific, Вантаа, Финляндия) в многорежимном планшет-ридере Biotek Synergy Neo2 (Biotek, Вермонт, США) при длине волны возбуждения 440 нм и длине волны излучения 485 нм.

Образцы объемом 200 мкл, содержащие ThT в конечной концентрации, составляющей 50 мкМ, гепарин в концентрации 8 мкМ и рекомбинантный тау-белок в концентрации 15 мкМ (концентрацию определяли путем измерения поглощения при 280 нм с использованием коэффициента погашения $0,31 \text{ мл мг}^{-1}\text{см}^{-1}$), запечатывали с использованием герметизирующей пленки для планшетов (R&D Systems, Миннеаполис, Миннесота). Анализ оптимизировали путем оценки влияния восстанавливающих средств и условий хранения исходного материала, представляющего собой рекомбинантный тау-белок (фиг. 5-6). Данные регистрировали каждые 900 с при непрерывном встряхивании (425 циклов в минуту, 3 мм). Конечные условия анализа, которые удовлетворяют определяющие критерии NDP, показаны на фиг. 7-10:

сигмоидальные кинетические кривые, демонстрирующие лаг-фазу, после которой следует экспоненциальный рост (фиг. 7);

агрегаты демонстрируют фибриллярные структуры (фиг. 8);

внесение затравки эффективно исключает нуклеацию (при добавлении затравки должен наблюдаться экспоненциальный рост в случае совместимости затравок и мономера или при их 100% совместимости; фиг. 9);

зависимость от концентрации (фиг. 10).

Пример 3. Анализ агрегации *in vitro*, проводимый в формате планшет-ридера: внесение затравки.

Агрегированные образцы рекомбинантного тау-белка объединяли после 50 циклов и использовали в качестве затравок для *de novo* агрегации рекомбинантного тау-белка (фиг. 9). Добавление обработанных ультразвуком агрегатов в свежие растворы рекомбинантного тау-белка привело к полному исключению лаг-фазы, что наблюдали в виде спонтанного превращения рекомбинантного тау-белка (один из жестких определяющих критериев для механизма NDP).

Пример 4. Анализ агрегации *in vitro*, проводимый в формате планшет-ридера: скрининг ингибиторов 15 мкМ рекомбинантного тау-белка инкубировали либо отдельно, либо в присутствии 3, 6 и 9 мкМ СВТАУ 27.1 (тау-связывающего антитела) в 200 мкл раствора PBS, содержащего 50 мкМ ThT, 8 мкМ гепарина и 0,5 мМ ТСЕР. Планшет запечатывали с использованием герметизирующей пленки (R&D Systems, Миннеаполис, Миннесота) и показатели регистрировали каждые 900 с при непрерывном встряхивании (425 циклов в минуту, 3 мм), см. фиг. 11. Отметили, что в присутствии 9 мкМ СВТАУ-27.1 превращение рекомбинантного тау-белка полностью блокируется на весь период анализа (160 ч). В присутствии 6 мкМ СВТАУ-27.1 лаг-фаза превращения удлинилась до 70 ч, и при этом превращение не завершилось полностью на протяжении периода анализа, составившего 160 ч. 3 мкМ СВТАУ-27.1 также подавляет превращение рекомбинантного тау-белка, на что указывает более продолжительная лаг-фаза и более низкое конечное плато.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ формирования *in vitro* парных спиральных филаментов (PHF) тау-белка, с помощью которого обнаруживают параметры, присущие для механизма нуклеационно зависимой полимеризации, включающий инкубацию смеси, содержащей препарат тау-белка и полианионный кофактор, в течение предварительно заданного периода времени в условиях, стимулирующих образование PHF, где тау-белок представляет собой мутантный рекомбинантный тау-белок, в котором цистеиновые остатки подвергнуты мутации.

2. Способ по п.1, в котором условия, стимулирующие образование PHF, включают встряхивание

инкубационной смеси при 350-500 циклах в минуту, предпочтительно 400-450 циклах в минуту, в частности 425 циклах в минуту.

3. Способ по п.1 или 2, в котором тау-белок представляет собой полноразмерный рекомбинантный тау-белок, самая длинная изоформа которого предпочтительно содержит две N-концевые вставки и четыре домена, связывающих микротрубочки.

4. Способ по пп.1, 2 или 3, в котором препарат тау-белка является по существу чистым препаратом тау-белка.

5. Способ по любому из пп.1-4, в котором концентрация тау-белка в инкубационной смеси находится в диапазоне от 10 до 30 мкМ, предпочтительно от 12 до 20 мкМ.

6. Способ по любому из пп.1-5, в котором тау-белок находится в восстановленной форме.

7. Способ по любому из пп.1-6, в котором инкубацию проводят при pH от 6,0 до 7,4, предпочтительно от 6,5 до 7,0, более предпочтительно при pH 6,7.

8. Способ по любому из пп.1-7, в котором инкубацию проводят при температуре от 36 до 38°C, предпочтительно при температуре 37°C.

9. Способ по любому из пп.1-8, в котором полианионный кофактор представляет собой гепарин.

10. Способ детекции *in vitro* формирования парных спиральных филаментов (PHF) тау-белка, включающий стадии:

(a) индукции образования PHF с использованием способа по любому из пп.1-9; и

(b) детекции образовавшихся PHF с помощью средств микроскопии или спектроскопии.

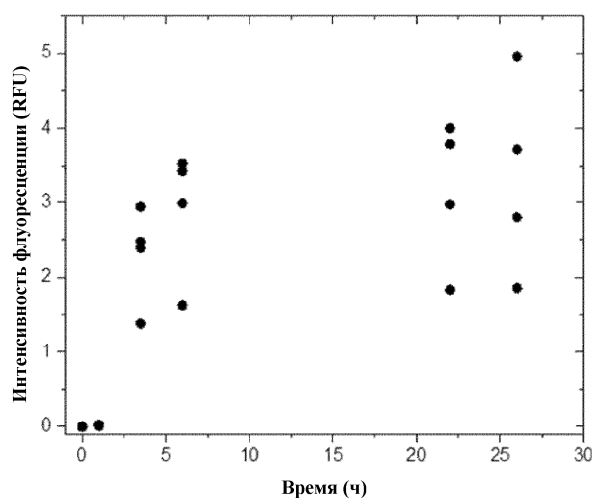
11. Способ по п.10, в котором средство спектроскопии включает флуоресцентную спектроскопию, предпочтительно флуоресцентный анализ с использованием тиофлавина Т.

12. Способ идентификации *in vitro* соединения, которое способно к ингибированию или стимуляции формирования парных спиральных филаментов тау-белка, включающий стадии:

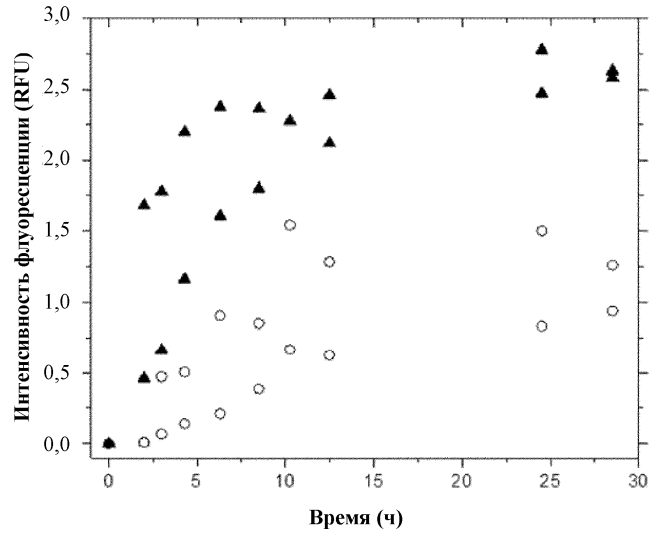
(a) проведения способа по п.10 или 11 в отсутствие и в присутствии тестируемого соединения; и

(b) сравнения кинетических параметров формирования PHF в отсутствие указанного тестируемого соединения с кинетическими параметрами формирования PHF в присутствии указанного тестируемого соединения.

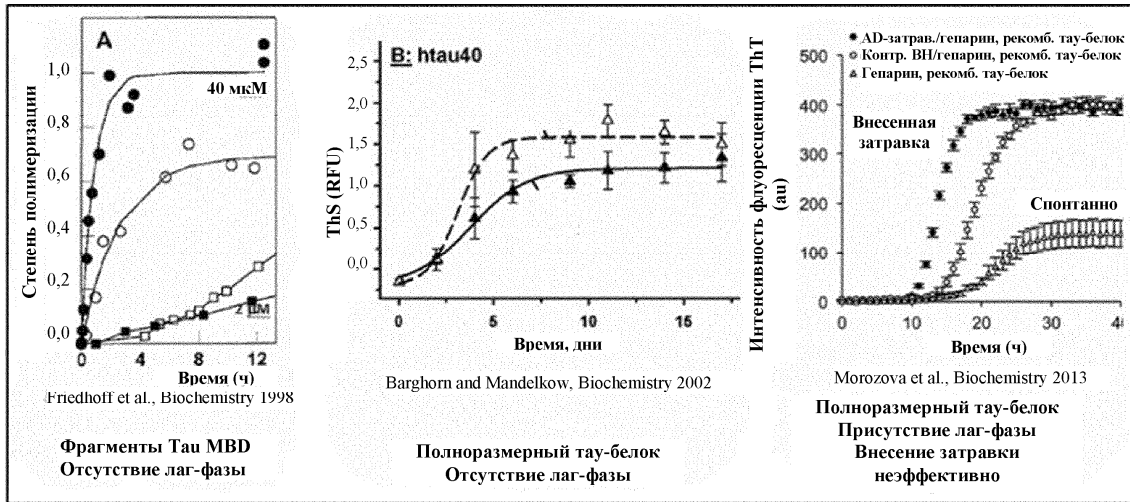
13. Способ по п.12, в котором соединение представляет собой антитело или его фрагмент.



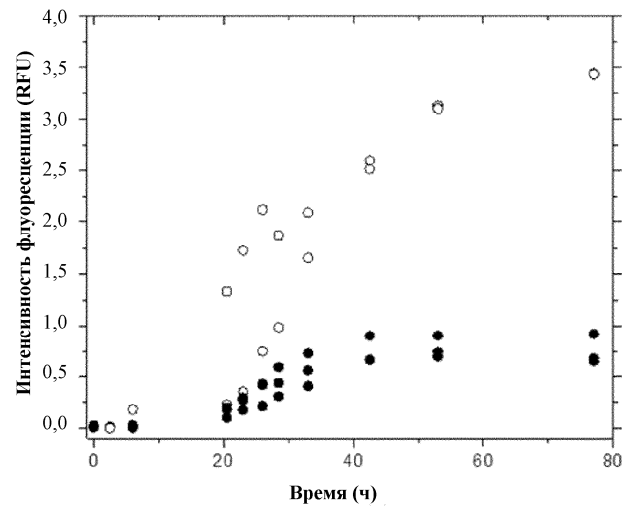
Фиг. 1



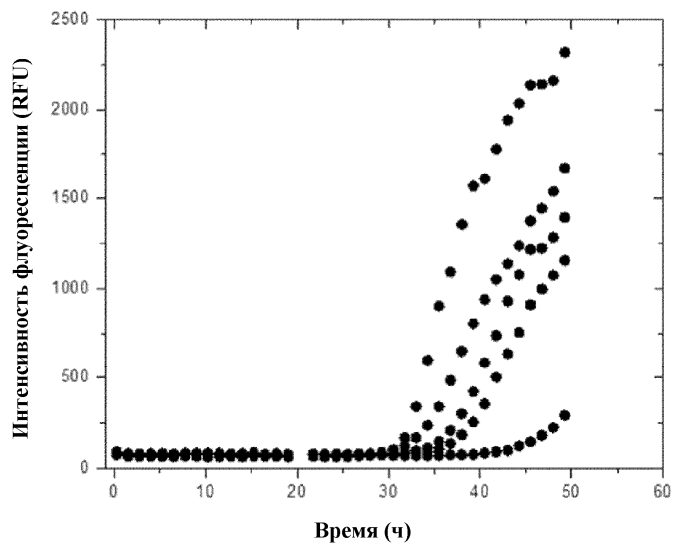
Фиг. 2



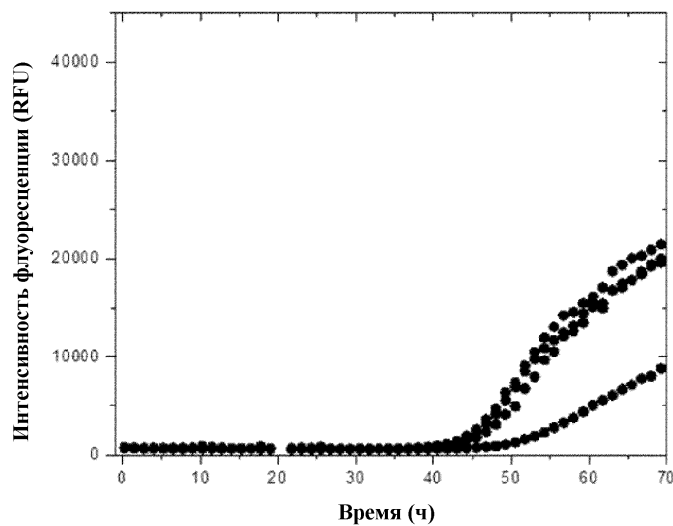
Фиг. 3



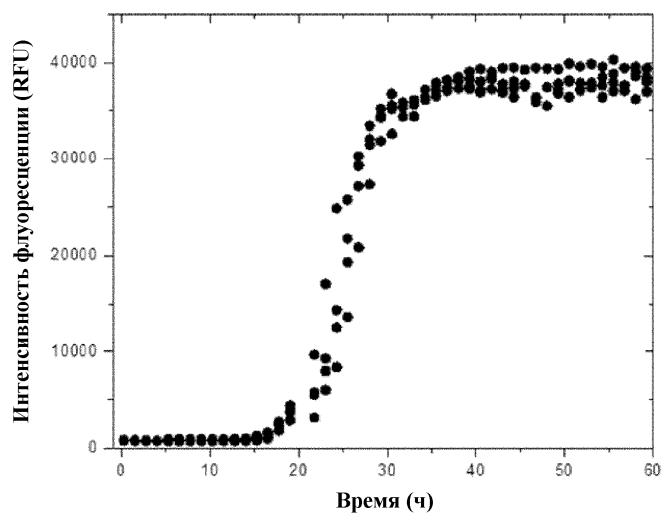
Фиг. 4



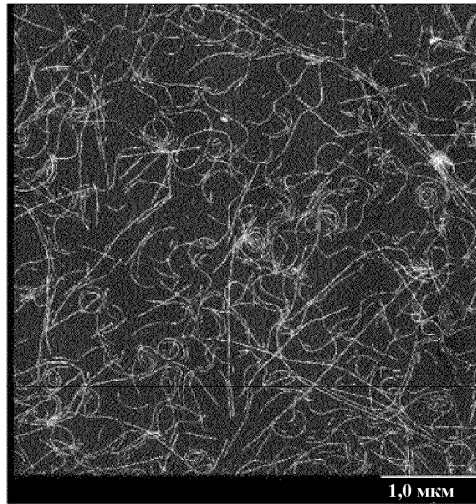
Фиг. 5



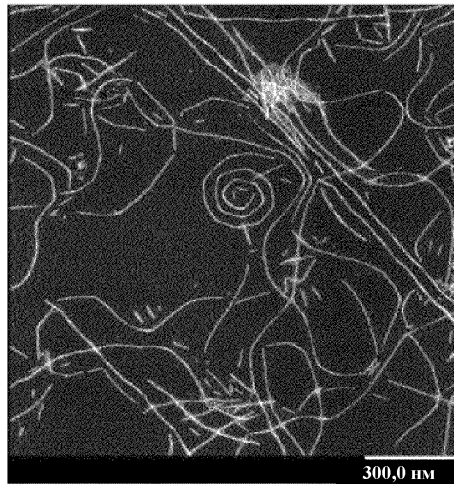
Фиг. 6



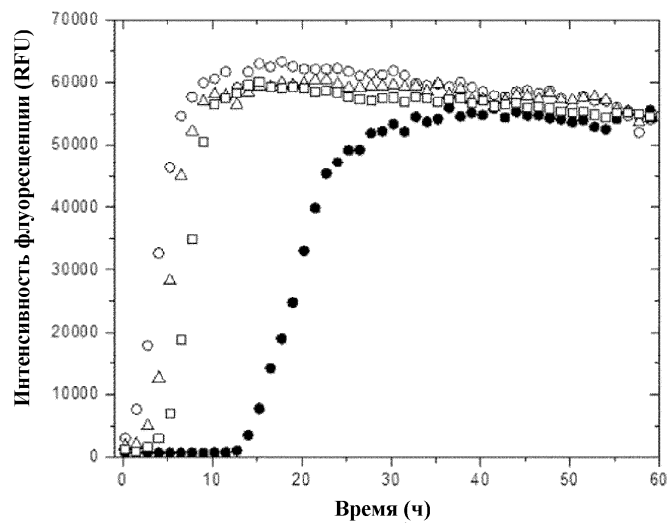
Фиг. 7



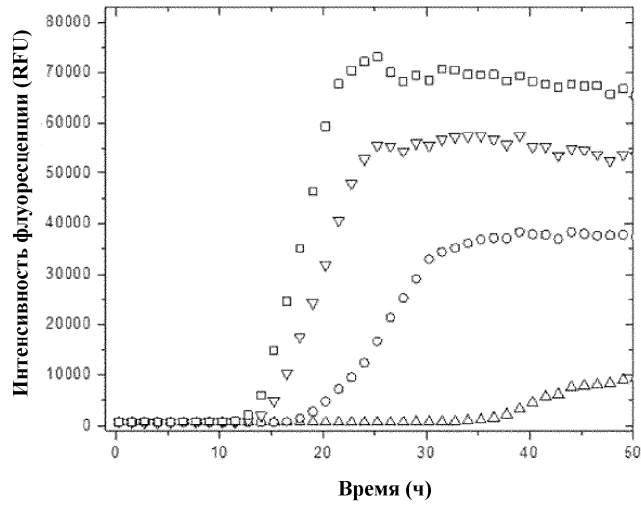
А



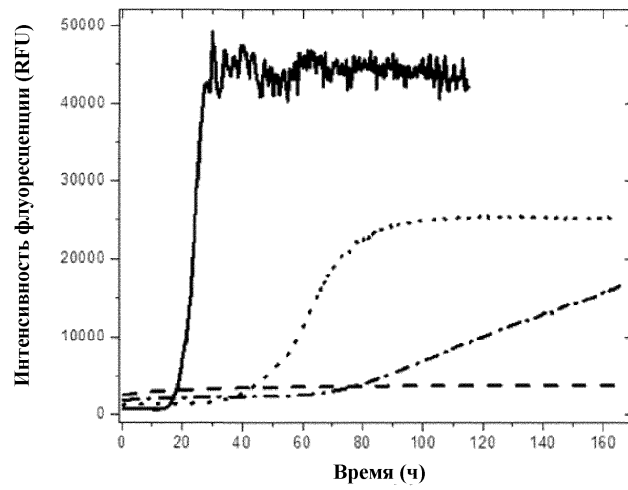
Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11