

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202392776** (13) **A2**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2024.02.29**

(51) Int. Cl. **C07K 16/18** (2006.01)  
**G01N 33/53** (2006.01)  
**G01N 33/58** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2019.03.04**

---

(54) **АНАЛИЗЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

---

(31) **62/638,524**

(32) **2018.03.05**

(33) **US**

(62) **202092087; 2019.03.04**

(71) Заявитель:  
**ЯНССЕН ФАРМАЦЕВТИКА НВ (BE)**

(72) Изобретатель:

**Колб Хартмут Кристиан, Триана-  
Балтцер Галлен, Слеммон Джон  
Ренделл (US)**

(74) Представитель:

**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,  
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов  
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,  
Кузнецова Т.В. (RU)**

---

(57) Предложены способы измерения количества фосфорилированного по одному или множеству сайтов p217+ тау-белка в пробе. Кроме того, предложены способы обнаружения или диагностики таупатий, способы определения эффективности лечения таупатии и способы определения приемлемости пациента для терапии антителом к p217+ тау-белку. Дополнительно описаны антитела для применения в способах и наборы, содержащие такие антитела.

**A2**

**202392776**

**202392776**

**A2**

### АНАЛИЗЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

#### ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[0001]** Изобретение относится к композициям и способам для выявления нейродегенеративных заболеваний. В частности, изобретение относится к способам измерения количества фосфорилированных по одному или множеству сайтов форм тау-белка p217+ в биологической пробе и их применению, а также к антителам и наборам для применения в этих способах.

#### ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[0002]** Болезнь Альцгеймера (БА) представляет собой дегенеративное расстройство мозга, клинически характеризуемое прогрессирующей потерей памяти, когнитивных функций, способности к рассуждению, принятию решений и эмоциональной устойчивости, что постепенно приводит к глубокому умственному нарушению и в конечном итоге смерти. БА является очень частой причиной прогрессирующего умственного угасания (деменции) у пожилых людей и считается четвертой по частоте медицинской причиной смерти в США. БА наблюдается в различных этнических группах по всему миру и является сегодня и останется в будущем одной из основных проблем здравоохранения.

**[0003]** В мозге пациентов с БА наблюдаются характерные повреждения, называемые сенильными (или амилоидными) бляшками, амилоидной ангиопатией (амилоидными отложениями в кровеносных сосудах) и нейрофибриллярными клубками. У пациентов с БА обычно обнаруживают большие количества таких повреждений, в особенности амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клубков из парных спиральных филаментов, в нескольких областях мозга человека, важных для памяти и когнитивных функций.

**[0004]** Нейрофибриллярные клубки главным образом состоят из агрегатов гиперфосфорилированного тау-белка. Главной физиологической функцией тау-белка является полимеризация и стабилизация микротрубочек. Связывание тау-белка с микротрубочками происходит за счет ионных взаимодействий между положительными зарядами в области связывания тау-белка с микротрубочками и отрицательными зарядами на сетке микротрубочек (Butner and Kirschner, *J Cell Biol.* 115(3):717-30, 1991). Тау-белок содержит 85 возможных сайтов фосфорилирования, а фосфорилирование по многим из этих сайтов препятствует основной функции тау-белка. Тау-белок, связанный с сеткой аксональных микротрубочек, находится в состоянии гипофосфорилирования, тогда как агрегированному тау-белку при БА свойственны гиперфосфорилированность и формирование уникальных эпитопов, отличающихся от пула физиологически активного тау-белка (Iqbal et al., *Curr Alzheimer Res.* 7(8): 656-664, 2010).

**[0005]** Прогрессирование таупатии в головном мозге при БА происходит по-разному. Описана гипотеза о передаче и распространении таупатии на основе стадий

развития таупатии по Брааку в человеческом мозге, и таупатии, распространяющейся после инъекций агрегатов тау-белка в доклинических моделях таупатии (Frost et al., *J Biol Chem.* 284:12845-52, 2009; Clavaguera et al., *Nat Cell Biol.* 11:909-13, 2009). Считается, что таупатия может распространяться подобно прионам от одной области головного мозга к другой. Этот процесс распространения может включать в себя экстернализацию затравок тау-белка, которые могут быть захвачены близлежащими нейронами и могут индуцировать дальнейшую таупатию.

**[0006]** Фрагменты тау-белка в нейрофибриллярных клубках попадают в спинномозговую жидкость (CSF), откуда их можно отбирать с помощью люмбарной пункции и измерять с помощью чувствительных тестов. Таким образом, наличие неврологического заболевания можно определять с помощью анализов, которые распознают производные от тау-белка фрагменты в CSF. В таких анализах на тау-белок требуется способность распознавать виды тау-белка, характерные для нейродегенеративного состояния. Главным примером тау-белка, ассоциированного с БА, является тау-белок с множественным фосфорилированием. Таким образом, анализы, посредством которых обнаруживают тау-белок с множественным фосфорилированием в CSF, могут быть наиболее эффективными при обнаружении БА.

**[0007]** Фосфорилирование - не единственная посттрансляционная модификация, которую необходимо учитывать при измерении тау-белка. Недавние исследования показали, что в CSF тау-белок существует преимущественно в виде фрагментов, а не в виде полноразмерного белка (Meredith et al. *PLoS one.* 8(10):e76523, 2013). Кроме того, заболевание может влиять на характер фрагментации тау-белка в связи с, как правило, аберрантным характером протеолиза в патологических состояниях. Следовательно, анализы на основе тау-белка для обнаружения нейродегенеративных изменений должны предоставлять информацию не только о состоянии фосфорилирования (например, о сайте фосфорилирования), но также о характере обнаруживаемых фрагментов тау-белка (например, длине фрагмента тау-белка, полярности). Однако трудно воплотить эту идею из-за низких эндогенных уровней фосфорилированного тау-белка, особенно в пробах здоровых людей.

**[0008]** Таким образом, сохраняется потребность в чувствительных, достоверных и точных способах обнаружения множественно-фосфорилированного тау-белка в биологических жидкостях. Такие способы могут быть использованы для эффективного обнаружения, диагностики, определения стадии и отслеживания прогрессирования нейродегенеративных заболеваний, таких как БА и другие таупатии. Способы могут быть также использованы в качестве фармакодинамических маркеров для измерения уровней общего, свободного и связанного с терапевтическими антителами множественно-фосфорилированного тау-белка. Возможность обнаружения и измерения множественно-фосфорилированных фрагментов тау-белка имеет особое значение для данной области, поскольку передаваемые формы тау-белка могут представлять собой один или более фрагментов тау-белка.

## КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[0009]** Изобретение удовлетворяет потребность в выявлении в CSF форм тау-белка, которые связаны с нейродегенеративными заболеваниями. Изобретение включает в себя обнаружение фосфорилированного по одному или множеству сайтов тау-белка, а также обнаружение фрагментов тау-белка.

**[0010]** Были разработаны и охарактеризованы высокочувствительные твердофазные иммуноферментные анализы (ИФА) для измерения p217+ тау-белка, содержащего фосфорилированный эпитоп тау-белка («эпитоп p217+ тау» или «эпитоп pT3»), содержащий фосфорилированные остатки T212 и/или T217, имеющие последовательность (212) R(pT)PSLPTPPTTR (SEQ ID NO: 25), (217) RTPSLP(pT)PPTTR (SEQ ID NO: 26) или (212&217) R(pT)PSLP(pT)PPTTR (SEQ ID NO: 27).

**[0011]** Анализы в соответствии с вариантами осуществления изобретения выполнены с возможностью измерения форм тау-белка p217+ в различных текучих основах, включая, без ограничений, CSF, интерстициальную жидкость (ISF), гомогенат головного мозга, сыворотку, плазму и их денатурированные или обогащенные производные. В анализах в соответствии с вариантами осуществления изобретения применяют первое моноклональное антитело, относящееся к эпитопу pT3 тау-белка, в качестве захватного антитела, и второе моноклональное антитело, относящееся ко второму эпитопу тау-белка, в качестве детекторного антитела. Анализы отличаются чувствительностью, точностью, достоверностью, переносимостью между лабораториями, линейностью при разведении, и их можно применять ко многим типам проб. Кроме измерения видов тау-белка p217+ в исходной биологической жидкости данные анализы можно применять для измерения проб с денатурированием или без него или после иммунопреципитации, причем эти два метода представляют собой две дополняющих друг друга методики количественной оценки свободного p217+ тау-белка или p217+ тау-белка, связанного с эндогенным или терапевтическим антителом. Анализы можно использовать параллельно с обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографией (офВЭЖХ) для измерения фракционированной CSF, за счет чего можно анализировать профиль фрагментов p217+ тау-белка.

**[0012]** В одном общем аспекте изобретение относится к способу измерения количества тау-пептидов p217+ в пробе. Способ включает: (i) приведение пробы в контакт с захватным антителом, направленным против эпитопа p217+ тау-белка, для захвата p217+ тау-пептидов в пробе и (ii) приведение в контакт захваченных p217+ тау-пептидов с детекторным антителом, направленным против эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 119-126 тау-белка, например аминокислотные остатки 116-127 тау-белка, или против эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 7-20 тау-белка, чтобы измерить таким образом соответственно количество p217+ тау-пептидов или количество длинных p217+ тау-пептидов, причем нумерация аминокислот дается по аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1.

**[0013]** В одном конкретном аспекте изобретение относится к способу определения

относительного количества длинных p217+ тау-пептидов или коротких p217+ тау-пептидов в пробе. Способ включает в себя (i) приведение пробы в контакт с захватным антителом, направленным против эпитопа p217+ тау-белка, для захвата p217+ тау-пептидов в пробе, (ii) приведение в контакт захваченных p217+ тау пептидов с первым детекторным антителом, направленным против эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 119-126 тау-белка, чтобы измерить таким образом количество p217+ тау-пептидов, (iii) приведение в контакт захваченных p217+ тау-пептидов со вторым детекторным антителом, направленным против эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 7-20 тау-белка, чтобы измерить таким образом количество длинных p217+ тау-пептидов, и (iv) определение относительного количества длинных p217+ тау-пептидов или коротких p217+ тау-пептидов на основании количества p217+ тау-пептидов и количества длинных p217+ тау-пептидов, причем нумерация аминокислот дается по аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1.

**[0014]** В одном варианте осуществления изобретения количество коротких p217+ тау-пептидов в пробе рассчитывается на основании количества p217+ тау-пептидов и количества длинных p217+ тау-пептидов в пробе, например путем вычитания количества длинных p217+ тау-пептидов из количества p217+ тау-пептидов. В другом варианте осуществления отношение количества коротких p217+ тау-пептидов к количеству p217+ тау-пептидов, отношение количества длинных p217+ тау-пептидов к количеству p217+ тау-пептидов или отношение количества длинных p217+ тау-пептидов к количеству коротких p217+ тау-пептидов определяют на основании количества p217+ тау-пептидов и количества длинных p217+ тау-пептидов в пробе. В соответствии с вариантами осуществления изобретения количество p217+ тау-пептидов и/или количество длинных p217+ тау-пептидов в пробе, а также информацию, основанную на измеренных количествах, такую как расчетное количество коротких p217+ тау-пептидов и одно или более описанных выше соотношений, можно использовать для одной или более диагностических целей.

**[0015]** Соответственно, в одном конкретном аспекте изобретение относится к способу определения отношения p217+ тау-пептидов к общему количеству тау-пептидов в пробе. Способ включает в себя (i) приведение пробы в контакт с захватным антителом, направленным против эпитопа p217+ тау-белка, для захвата p217+ тау-пептидов в пробе и приведение пробы в контакт с не зависящим от фосфорилирования захватным антителом, направленным против эпитопа между аминокислотами 150 и 250 тау-белка, предпочтительно эпитопа, содержащего аминокислоты 159-163 тау-белка, для захвата общих тау-пептидов в пробе, и (ii) выполнение по меньшей мере одного из (a) приведения захваченных p217+ тау-пептидов в контакт с первым детекторным антителом, направленным против эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 119-126 тау-белка, с измерением таким образом количества p217+ тау-пептидов, и приведения захваченных общих тау-пептидов в контакт с первым детекторным антителом с измерением таким образом количества всех тау-пептидов; и (b) приведения захваченных p217+ тау-пептидов

в контакт со вторым детекторным антителом, направленным против эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 7-20 тау-белка, с измерением таким образом количества длинных p217+ тау-пептидов, и приведения захваченных общих тау-пептидов в контакт со вторым детекторным антителом для измерения таким образом общего числа длинных общих тау-пептидов, и (iii) определение отношения количества p217+ тау-пептидов к количеству общих тау-пептидов или отношения количества длинных p217+ тау-пептидов к количеству длинных общих тау-пептидов, причем нумерация аминокислот дается по аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1. В одном варианте осуществления количество коротких p217+ тау-пептидов рассчитывают путем вычитания количества длинных p217+ тау-пептидов из количества p217+ тау-пептидов, количество общих коротких тау-пептидов вычисляют путем вычитания количества длинных общих тау-пептидов из количества общих тау-пептидов и определяют отношение количества коротких p217+ тау-пептидов к количеству общих коротких тау-пептидов.

**[0016]** В соответствии с конкретным аспектом способ изобретения включает в себя (i) приведение биологической пробы, предпочтительно пробы CSF, от пациента, в контакт с захватным антителом, направленным против эпитопа p217+ тау-белка, для захвата p217+ тау-пептидов в пробе, (ii) проведение по меньшей мере одного из (a) приведения в контакт захваченных p217+ тау-пептидов с первым детекторным антителом, направленным против эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 119-126 тау-белка, чтобы измерить таким образом количество p217+ тау-пептидов, и (b) приведения в контакт захваченных p217+ тау-пептидов со вторым детекторным антителом, направленным против эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 7-20 тау-белка, чтобы измерить таким образом количество длинных p217+ тау-пептидов, и (iii) определение, страдает ли пациент от таупатии или подвержен риску развития таупатии на основании по меньшей мере одного из количества p217+ тау-пептидов, количества длинных p217+ тау-пептидов, количества коротких p217+ тау-пептидов, полученного вычитанием количества длинных p217+ тау-пептидов из количества p217+ тау-пептидов, и их соотношений, причем нумерация аминокислот дается по аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает введение пациенту терапевтического средства для лечения или профилактики таупатии.

**[0017]** В соответствии с конкретным аспектом способ изобретения включает в себя (i) приведение биологической пробы, предпочтительно пробы CSF, от пациента в контакт с захватным антителом, направленным против эпитопа p217+ тау-белка, для захвата p217+ тау-пептидов в пробе и приведение пробы в контакт с не зависящим от фосфорилирования захватным антителом, направленным против эпитопа между аминокислотами 150 и 250 тау-белка, предпочтительно эпитопа, содержащего аминокислоты 159-163 тау-белка, для захвата общих тау-пептидов в пробе, и (ii) выполнение по меньшей мере одного из (a) приведения захваченных p217+ тау-пептидов в контакт с первым детекторным антителом, направленным против эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 119-126 тау-белка,

с измерением таким образом количества p217+ тау-пептидов, и приведения захваченных общих тау-пептидов в контакт с первым детекторным антителом с измерением таким образом количества всех тау-пептидов; и (b) приведения захваченных p217+ тау-пептидов в контакт со вторым детекторным антителом, направленным против эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 7-20 тау-белка, для измерения таким образом количества длинных p217+ тау-пептидов, и приведения захваченных общих тау-пептидов со вторым детекторным антителом для измерения таким образом количества длинных общих тау-пептидов, и (iii) определение, страдает ли пациент от таупатии или подвержен риску развития таупатии на основании по меньшей мере одного из: (a) отношения количества p217+ тау-пептидов к количеству общих тау-пептидов, (b) отношения количества длинных p217+ тау-пептидов к количеству общих длинных тау-пептидов, и (c) отношения количества коротких p217+ тау-пептидов к количеству общих коротких тау-пептидов, причем количество коротких p217+ тау-пептидов получают посредством вычитания количества длинных p217+ тау-пептидов из количества p217+ тау-пептидов, а количество общих коротких тау-пептидов получают посредством вычитания количества общих коротких тау-пептидов из количества общих тау-пептидов, причем нумерация аминокислот дается по аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает введение пациенту терапевтического средства для лечения или профилактики таупатии.

**[0018]** В соответствии с другим конкретным аспектом способ изобретения включает в себя (i) приведение биологической пробы, предпочтительно пробы CSF, от пациента, получающего лечение, в контакт с захватным антителом, направленным против эпитопа p217+ тау-белка для захвата p217+ тау-пептидов в пробе, (ii) проведение по меньшей мере одного из (a) приведения в контакт захваченных p217+ тау-пептидов с первым детекторным антителом, направленным против эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 119-126 тау-белка, чтобы измерить таким образом количество p217+ тау-пептидов, и (b) приведения в контакт захваченных p217+ тау-пептидов со вторым детекторным антителом, направленным против эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 7-20 тау-белка, чтобы измерить таким образом количество длинных p217+ тау-пептидов, и (iii) определения эффективности лечения пациента на основании по меньшей мере одного из количества p217+ тау-пептидов, количества длинных p217+ тау-пептидов, количества коротких p217+ тау-пептидов, полученного вычитанием количества длинных p217+ тау-пептидов из количества p217+ тау-пептидов, и их соотношений, причем нумерация аминокислот дается по аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает введение пациенту терапевтического средства для лечения или профилактики таупатии.

**[0019]** В соответствии с другим конкретным аспектом способ изобретения включает в себя (i) приведение биологической пробы, предпочтительно пробы CSF, от пациента, получающего лечение, в контакт с захватным антителом, направленным против

эпитопа p217+ тау-белка для захвата p217+ тау-пептидов в пробе и приведение пробы в контакт с не зависящим от фосфорилирования захватным антителом, направленным против эпитопа между аминокислотами 150 и 250 тау-белка, предпочтительно эпитопа, содержащего аминокислоты 159-163 тау-белка, для захвата общих тау-пептидов в пробе, и (ii) выполнение по меньшей мере одного из (а) приведения захваченных p217+ тау-пептидов в контакт с первым детекторным антителом, направленным против эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 119-126 тау-белка, с измерением таким образом количества p217+ тау-пептидов, и приведения захваченных общих тау-пептидов в контакт с первым детекторным антителом с измерением таким образом количества всех тау-пептидов; и (b) приведения захваченных p217+ тау-пептидов в контакт со вторым детекторным антителом, направленным против эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 7-20 тау-белка, для измерения таким образом количества длинных p217+ тау-пептидов, и приведения захваченных общих тау-пептидов со вторым детекторным антителом для измерения таким образом количества длинных общих тау-пептидов, и (iii) определение эффективности лечения пациента на основе по меньшей мере одного из (а) отношения количества p217+ тау-пептидов к количеству общих тау-пептидов, (b) отношения количества длинных p217+ тау-пептидов к количеству общих длинных тау-пептидов и (c) отношения количества коротких p217+ тау-пептидов к количеству общих коротких тау-пептидов, причем количество коротких p217+ тау-пептидов получают посредством вычитания количества длинных p217+ тау-пептидов из количества p217+ тау-пептидов, а количество общих коротких тау-пептидов получают посредством вычитания количества общих коротких тау-пептидов из количества общих тау-пептидов, причем нумерация аминокислот дается по аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает введение пациенту терапевтического средства для лечения или профилактики таупатии.

**[0020]** В соответствии с другим конкретным аспектом способ изобретения включает в себя (i) приведение биологической пробы, предпочтительно пробы CSF, от пациента в контакт с захватным антителом, направленным против эпитопа p217+ тау-белка для захвата p217+ тау-пептидов в пробе, (ii) проведение по меньшей мере одного из (а) приведения в контакт захваченных p217+ тау-пептидов с первым детекторным антителом, направленным против эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 119-126 тау-белка, чтобы измерить таким образом количество p217+ тау-пептидов, и (b) приведения в контакт захваченных p217+ тау-пептидов со вторым детекторным антителом, направленным против эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 7-20 тау-белка, чтобы измерить таким образом количество длинных p217+ тау-пептидов, и (iii) определение, подходит ли пациент для применения антитела к p217+ тау-белку на основании по меньшей мере одного из количества p217+ тау-пептидов, количества длинных p217+ тау-пептидов, количества коротких p217+ тау-пептидов, полученного вычитанием количества длинных p217+ тау-пептидов из количества p217+ тау-пептидов, и



их соотношений, причем нумерация аминокислот дается по аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает введение пациенту антитела к p217+ тау-белку для лечения или профилактики таупатии.

**[0021]** В соответствии с другим конкретным аспектом способ изобретения включает в себя (i) приведение биологической пробы, предпочтительно пробы CSF, от пациента в контакт с захватным антителом, направленным против эпитопа p217+ тау-белка для захвата p217+ тау-пептидов в пробе и приведение пробы в контакт с не зависящим от фосфорилирования захватным антителом, направленным против эпитопа между аминокислотами 150 и 250 тау-белка, предпочтительно эпитопа, содержащего аминокислоты 159-163 тау-белка, для захвата общих тау-пептидов в пробе, и (ii) выполнение по меньшей мере одного из (a) приведения захваченных p217+ тау-пептидов в контакт с первым детекторным антителом, направленным против эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 119-126 тау-белка, с измерением таким образом количества p217+ тау-пептидов, и приведения захваченных общих тау-пептидов в контакт с первым детекторным антителом с измерением таким образом количества всех тау-пептидов; и (b) приведения захваченных p217+ тау-пептидов в контакт со вторым детекторным антителом, направленным против эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 7-20 тау-белка, для измерения таким образом количества длинных p217+ тау-пептидов, и приведения захваченных общих тау-пептидов со вторым детекторным антителом для измерения таким образом количества длинных общих тау-пептидов, и (iii) определение, подходит ли пациент для терапии антителами к p217+ тау-белку на основании по меньшей мере одного из (a) отношения количества p217+ тау-пептидов к количеству общих тау-пептидов, (b) отношения количества длинных p217+ тау-пептидов к количеству общих длинных тау-пептидов и (c) отношения количества коротких p217+ тау-пептидов к количеству общих коротких тау-пептидов, причем количество коротких p217+ тау-пептидов получают посредством вычитания количества длинных p217+ тау-пептидов из количества p217+ тау-пептидов, а количество общих коротких тау-пептидов получают посредством вычитания количества общих коротких тау-пептидов из количества общих тау-пептидов, причем нумерация аминокислот дается по аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает введение пациенту антитела к p217+ тау-белку для лечения или профилактики таупатии.

**[0022]** В другом конкретном аспекте изобретение относится к способу контроля лечения антителом к p217+ тау-белку у пациента, при этом способ включает в себя этапы, на которых: (i) получают биологическую пробу от пациента, (ii) разделяют биологическую пробу на первую пробу, содержащую p217+ тау-пептиды без антитела к p217+ тау-белку, предпочтительно класса IgG, и вторую пробу, содержащую p217+ тау-пептиды, связанные с антителом к p217+ тау-белку, (iii) получают третью пробу, содержащую p217+ тау-белок без антитела к p217+ тау-белку, из второй пробы,

предпочтительно посредством оф-ВЭЖХ, (iv) вводят каждую из первой пробы и третьей пробы в контакт с захватным антителом, направленным против эпитопа p217+ тау-белка, для захвата p217+ тау-пептидов в каждой пробе, (v) проводят по меньшей мере одно из: (a) введения захваченных p217+ тау-пептидов в контакт с первым детекторным антителом, направленным против эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 119-126 тау-белка, с измерением таким образом количества p217+ тау-пептидов в каждой пробе, и (b) введения захваченных p217+ тау-пептидов в контакт со вторым детекторным антителом, направленным против эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 7-20 тау-белка, с измерением таким образом количества длинных p217+ тау-пептидов в каждой пробе, (vi) контролируют лечение антителом к tp217+ тау-белку на основании по меньшей мере одного из количества p217+ тау-пептидов и количества длинных p217+ тау-пептидов в каждой пробе, причем нумерация аминокислот дается по аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1. Например, лечение антителом к p217+ тау-белку можно контролировать на основании отношения количества длинных p217+ тау-пептидов в первой пробе к количеству в третьей пробе, отношения количества p217+ тау-пептидов в первой пробе к количеству в третьей пробе или отношения количества коротких p217+ тау-пептидов (которое можно вычислить путем вычитания количества длинных p217+ тау-пептидов из количества p217+ тау-пептидов) в первой пробе к количеству в третьей пробе. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает введение пациенту антитела к p217+ тау-белку для лечения или профилактики таупатии.

**[0023]** В другом общем аспекте изобретение относится к способу контроля лечения антителом к p217+ тау-белку у пациента, при этом способ включает в себя этапы, на которых: (i) получают биологическую пробу от пациента, (ii) получают полуденатурированную пробу из биологической пробы, содержащей общий p217+ тау-белок, причем полуденатурированную пробу нагревают для денатурирования антител в пробе, и получают неденатурированную пробу из биологической пробы, содержащей p217+ тау-белок без антител к p217+ тау-белку, (iii) вводят каждую из полуденатурированной пробы и неденатурированной пробы в контакт с захватным антителом, направленным против эпитопа p217+ тау-белка для захвата p217+ тау-пептидов в каждой пробе, (v) проводят по меньшей мере одно из: (a) введения захваченных p217+ тау-пептидов в контакт с первым детекторным антителом, направленным против эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 119-126 тау-белка, с измерением таким образом количества p217+ тау-пептидов в каждой пробе, и (b) вводят захваченные p217+ тау-пептиды в контакт со вторым детекторным антителом, направленным против эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 7-20 тау-белка, с измерением таким образом количества длинных p217+ тау-пептидов в каждой пробе, (vi) контролируют лечение антителом к tp217+ тау-белку на основании по меньшей мере одного из: количества p217+ тау-пептидов и количества длинных p217+ тау-пептидов в каждой пробе, причем нумерация аминокислот дается по аминокислотной

последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1. Например, лечение антителом к p217+ тау-белку можно контролировать на основании отношения количества длинных p217+ тау-пептидов в полуденатурированной пробе к количеству длинных p217+ тау-пептидов в неденатурированной пробе, отношения количества p217+ тау-пептидов в полуденатурированной пробе к количеству p217+ тау-пептидов в неденатурированной пробе или отношения количества коротких p217+ тау-пептидов (которое можно вычислить путем вычитания количества длинных p217+ тау-пептидов из количества p217+ тау-пептидов) в полуденатурированной пробе к количеству коротких p217+ тау-пептидов в неденатурированной пробе. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает введение пациенту антитела к p217+ тау-белку для лечения или профилактики таупатии.

**[0024]** В соответствии с конкретным аспектом таупатия включает в себя, без ограничений, одно или более состояний, выбранных из группы, состоящей из болезни Альцгеймера (включая семейную болезнь Альцгеймера и спорадическую болезнь Альцгеймера), лобно-височной деменции с паркинсонизмом, связанной с хромосомой 17 (FTDP-17), прогрессирующего супрануклеарного пареза взора, кортикобазальной дегенерации, болезни Пика, прогрессирующего субкортикального глиоза, деменции с преобладанием нейрофибриллярных клубков, диффузных нейрофибриллярных клубков с кальцификацией, деменции с аргирофильными зернами, комплекса амиотрофического бокового склероза - паркинсонизма - деменции, синдрома Дауна, болезни Герстманна - Штреусслера - Шейнкера, болезни Галлервордена - Шпатца, миозита с тельцами включения, болезни Крейтцфельда - Якоба, множественной системной атрофии, болезни Ниманна - Пика типа С, прионной церебральной амилоидной ангиопатии, подострого склерозирующего панэнцефалита, миотонической дистрофии, негуамской мотонейронной болезни с нейрофибриллярными клубками, постэнцефалитного паркинсонизма, хронической травматической энцефалопатии и dementia pugilistica (деменции боксеров).

**[0025]** Таупатия предпочтительно представляет собой болезнь Альцгеймера (включая семейную болезнь Альцгеймера и спорадическую болезнь Альцгеймера), FTDP-17 и прогрессирующий супрануклеарный парез взора.

**[0026]** Наиболее предпочтительно таупатия представляет собой болезнь Альцгеймера (включая семейную болезнь Альцгеймера и спорадическую болезнь Альцгеймера).

**[0027]** В соответствии с конкретным аспектом нижний предел количественного определения способа изобретения составляет около 40 фг/мл p217+ тау-пептидов, а нижний предел обнаружения способа изобретения составляет около 2 фг/мл p217+ тау-пептидов.

**[0028]** В соответствии с конкретным аспектом проба представляет собой биологическую пробу, такую как проба крови, гомогената головного мозга или спинномозговой жидкости (CSF), полученную от пациента. Биологическая проба предпочтительно представляет собой пробу CSF от пациента, которому требуется

диагностика таупатии, отслеживание эффективности лечения таупатии или определение пригодности к терапии антителом к p217+ тау-белку.

**[0029]** В соответствии с конкретным аспектом захватное антитело, используемое в способах изобретения, направлено против эпитопа p217+ тау-белка, предпочтительно эпитопа p217+ тау-белка, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, 26 или 27. В одном варианте осуществления захватное антитело, используемое в способах изобретения, содержит участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 32, 33 и 34, и участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 35, 36 и 37. Захватное антитело предпочтительно имеет переменную область тяжелой цепи, содержащую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 28 или 30, и переменную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 29 или 31.

**[0030]** В соответствии с конкретным аспектом детекторное антитело, используемое в способах изобретения, направлено против эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 119-126 тау-белка, предпочтительно эпитопа, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, например аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11. В одном варианте осуществления детекторное антитело, используемое в способах изобретения, содержит участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 2, 3 и 4; и участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 5, 6 и 7. Детекторное антитело предпочтительно представляет собой антитело pT82, содержащее переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 8, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 9.

**[0031]** В соответствии с другим конкретным аспектом детекторное антитело, используемое в способах изобретения, направлено против эпитопа, содержащего аминокислотные остатки от 7 до 20 тау-белка, предпочтительно эпитопа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20. В одном варианте осуществления детекторное антитело, используемое в способах изобретения, содержит участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 12, 13 и 14; и участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 15, 16 и 17. Детекторное антитело предпочтительно представляет собой антитело hT43, содержащее переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 18, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 19.

**[0032]** В соответствии с другим конкретным аспектом не зависящее от фосфорилирования захватное антитело, используемое в изобретении, направлено против

эпитопа между аминокислотами 150 и 250 тау-белка, предпочтительно эпитопа, содержащего аминокислоты 211-221 тау-белка, или эпитопа, содержащего аминокислоты 159-163 тау-белка, более предпочтительно эпитопа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21. В одном варианте осуществления не зависящее от фосфорилирования захватное антитело, используемое в изобретении, представляет собой антитело hT7.

**[0033]** В соответствии с другим конкретным аспектом, пробу, используемую в способах изобретения, получают путем фракционирования биологической пробы с использованием обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии (офВЭЖХ).

**[0034]** В другом общем аспекте изобретение относится к выделенному детекторному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который связывается с тау-белком в эпитопе, включающем аминокислотные остатки 7-20 тау-белка, содержащему (а) участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 12, 13 и 14; и (b) участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 15, 16 и 17. В соответствии с конкретным аспектом выделенное детекторное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 18, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 19. Выделенное детекторное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с тау-белком в эпитопе, содержащем аминокислотные остатки 7-20 тау-белка, предпочтительно представляет собой антитело hT43.

**[0035]** В другом общем аспекте изобретение относится к набору, содержащему (а) захватное антитело, направленное против эпитопа p217+ тау-белка, и (b) детекторное антитело, направленное против эпитопа тау-белка, содержащего аминокислотные остатки 7-20 или 116-127 тау-белка. Набор необязательно дополнительно содержит не зависящее от фосфорилирования захватное антитело, направленное против эпитопа тау-белка между аминокислотами 150 и 250 тау-белка. Набор можно использовать, например, для измерения количества p217+ тау-пептидов, количества длинных p217+ тау-пептидов, количества коротких p217+ тау-пептидов, отношения количества коротких p217+ тау-пептидов к количеству длинных p217+ тау-пептидов, отношения количества коротких p217+ тау-пептидов к количеству общих коротких тау-пептидов и т. п. Набор можно также использовать для различных диагностических и мониторинговых целей, например для определения, имеется ли у пациента таупатия или риск развития таупатии, для мониторинга эффективности лечения от таупатии, например лечения антителом к p217+ тау-белку для определения приемлемости пациента для лечения антителом к p217+ тау-белку и т. п.

**[0036]** В соответствии с конкретным аспектом набор изобретения содержит

захватное антитело, в котором имеются участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 32, 33 и 34, и участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 35, 36 и 37. Захватное антитело предпочтительно имеет переменную область тяжелой цепи, содержащую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 28, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 29.

**[0037]** В соответствии с другим конкретным аспектом набор изобретения содержит детекторное антитело, в котором имеются участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 2, 3 и 4; и участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 5, 6 и 7. Детекторное антитело предпочтительно представляет собой антитело рТ82, содержащее переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 8, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 9.

**[0038]** В соответствии с другим конкретным аспектом набор изобретения содержит детекторное антитело, в котором имеются участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 12, 13 и 14; и участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 15, 16 и 17. Детекторное антитело предпочтительно представляет собой антитело hT43, содержащее переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 18, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 19.

**[0039]** Другие аспекты, признаки и преимущества изобретения будут очевидны из представленного ниже описания, включающего подробное описание изобретения и его предпочтительных вариантов осуществления, и прилагаемой формулы изобретения.

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

**[0040]** Предшествующее краткое изложение, а также последующее подробное описание изобретения, будут более понятными при рассмотрении вместе с прилагаемыми чертежами. Необходимо понимать, что изобретение не ограничено точными вариантами осуществления, показанными на чертежах.

**[0041]** На **ФИГ. 1** представлена репрезентативная стандартная кривая для анализов рТ3хhT43 и рТ3хрТ82, полученная с использованием калибровочных пептидов, на которой для каждой точки показано среднее значение +/- станд. откл для двух повторов.

**[0042]** На **ФИГ. 2А-2Е** показана линейность разведения в анализах рТ3хhT43 и рТ3хрТ82 в пробах CSF и измерения (**А, С и Е**) с коррекцией на разведение в пг/мл или (**В и D**) в виде скорректированного на разведение процентного значения от разведения 1 : 4, причем пунктирными линиями указано +/- 20% от разведения 1 : 4.

[0043] На **ФИГ. 3** показана внутритестовая и межтестовая прецизионность анализов **(А)** pT3xhT43 и **(В)** pT3xpT82.

[0044] На **ФИГ. 4А-4В** показана межцентровая прецизионность анализов pT3xhT43 и pT3xpT82 с данными, представленными в виде отношения сигнал/шум (С/Ш).

[0045] На **ФИГ. 5А-5В** показано конкурентное влияние на сигнал анализа на основе pT3 растворимых антител к p217+ тау-белку в анализах **(А)** pT3xhT43 и **(В)** pT3xpT82.

[0046] На **ФИГ. 6** показана зависимость анализов pT3xhT43 и pT3xpT82 от фосфорилирования.

[0047] На **ФИГ. 7** показан профиль фрагментов p217+ тау-белка в CSF от пациентов с БА, измеренный с использованием анализов pT3xhT43 и pT3xpT82, причем данные представлены графически в виде сигнала за вычетом шума.

[0048] На **ФИГ. 8А-8В** показаны температурная стабильность и стабильность после размораживания для сигнала p217+ тау-белка в пробе CSF от пациентов с БА при использовании анализов **(А)** pT3xhT43 и **(В)** hT7xpT82.

[0049] На **ФИГ. 9** показана долговременная стабильность сигнала p217+ тау-белка в пробах CSF после хранения при -70 °С. Изменений в сигнале не обнаружено.

[0050] На **ФИГ. 10А-10F** показана корреляция между p217+ тау-белком и классическими биомаркерами БА, такими как Aβ42, tTau (общий тау-белок) и pTau181, измеренная с использованием анализа **(А-С)** pT3xhT43 и **(D-F)** pT3xpT82.

[0051] На **ФИГ. 11А-11В** показана корреляция между иммуногистохимическим (ИГХ) анализом биопсии головного мозга и p217+ тау-белком, измеренным анализами **(А)** pT3xhT43 и **(В)** pT3xpT82.

[0052] На **ФИГ. 12А-12D** показаны результаты анализов **(А)** pT3xhT43, **(В)** pT3xpT82, **(С)** hT7xpT82 и **(D)** отношение pT3xpT82 к hT7xpT82 для неочищенной CSF от пациентов с БА и здоровых добровольцев (HV).

[0053] На **ФИГ. 13** показана прогнозирующая способность анализов pT3xhT43 («343»), pT3xpT82 («382») и hT7xpT82 («782») при дифференцировке пациентов с БА от пациентов-HV.

[0054] На **ФИГ. 14А-14F** показан сигнал для анализов **(А, В)** pT3xhT43 («343»), **(С, D)** pT3xpT82 («382») и **(Е, F)** hT7xpT82 («782»), выполненных на полученных методом офВЭЖХ фракциях CSF от пациентов с БА **(А, С, Е)** и пациентов HV **(В, D, F)**.

[0055] На **ФИГ. 15А-15O** показаны сигналы для анализов **(А-Е)** pT3xhT43, **(F-J)** pT3xpT82 и **(K-O)** hT7xpT82, выполненных на полученных методом офВЭЖХ фракциях CSF от пациентов CDR 0 и CDR 0,5.

[0056] На **ФИГ. 16А-16В** показаны **(А)** отношение pT3xpT82 к hT7xpT82 (pTau короткие) или отношение pT3xhT43 к hT7xpT82 (pTau длинные) для исходной CSF и **(В)** отношение pT3xpT82 к hT7xpT82 для полученных методом офВЭЖХ фракций CSF по сравнению с показателем MMSE; все из закрытой когорты пациентов CDR 0 и CDR1.

[0057] На **ФИГ. 17А-17Т** показаны результаты анализа **(А)** pT3xhT43, **(В)**

pT3xpT82 и (C) hT7xpT82 на неочищенной CSF, (D) корреляция двух анализов pT3 на неочищенной CSF, (E) корреляция pT3xpT82 и hT7xpT82 на неочищенной CSF, (F) корреляция pT3xhT43 и Innotest tTau на неочищенной CSF, (G) корреляция pT3xhT43 и Innotest pTau181 на неочищенной CSF, (H) корреляция pT3xhT43 и Innotest AB42 на неочищенной CSF, (I) корреляция pT3xhT43 и отношения Innotest AB42/40 на неочищенной CSF; (J-I) сигнал pT3xhT43, (M-P) сигнал pT3xpT82 или (Q-T) сигнал hT7xpT82 во всех (J, M, Q) полученных офВЭЖХ фракциях, а также (K, N, R) суммы всех фракций, (O, S) суммы фракций ранних пиков (короткие тау-фрагменты), или (L, P, T) суммы фракций поздних пиков (более крупные тау-фрагменты); все из когорты пациентов HV, с MCI и БА.

[0058] На **ФИГ. 18А-18Р** показаны результаты по соотношениям (A) pT3xpT82 (p217+ короткие) против pT3xhT43 (p217+ длинные), (B) pT3xpT82 против hT7xpT82 (tTau короткие), (C) pT3xpT82 против NFL и (D) pT3xhT43 или (E) pT3xpT82 против амилоидного статуса, а также корреляция (F-I, N-P) pT3xhT43 или (J-M) pT3xpT82 с (F-M) различными оценками когнитивных функций или (N-P) изменениями этих оценок за 78 недель; все входили в когорту из 235 пациентов (для 90 из которых проводили 78-недельное последующее наблюдение) из исследования Janssen ELN115727301/302 на пациентах с умеренной БА. Первоначально пациентов привлекали (и классифицировали как имеющих БА) на основании оценки когнитивных функций, однако после биохимической оценки (AB40 и AB42) было установлено, что 27 пациентов были отрицательными по амилоиду и, таким образом, скорее всего, отражают случаи деменции, не связанные с БА. Этих пациентов анализировали в виде отдельной когорты на приведенных выше фигурах и обозначали как амилоид-негативных=0, тогда как амилоид-позитивные пациенты были обозначены как=1.

[0059] На **ФИГ. 19** представлен сигнал анализа pT3xhT43, проведенного на полученных методом оф-ВЭЖХ фракциях CSF от пациентов с БА с добавлением IgG, моноклонального антитела (mAb) pT3, гуманизированного mAb pT3 или ложного контроля с последующей иммунопреципитацией для сбора связанного с антителом p217+ тау-белка.

[0060] На **ФИГ. 20А-20В** показана зависимость дозы от антитела для способа иммунный захват/офВЭЖХ при количественном определении (A) не связанного с антителом и (B) связанного с антителом p217+ тау-белка, причем данные представлены в виде суммы сигналов в фракциях 12-16 офВЭЖХ.

[0061] На **ФИГ. 21А-21С** показана зависимость дифференциальной кинетики антитела от повреждения p217+ тау-белка либо с термической денатурацией (A, C), либо без нее (B); (A) смесь гуманизированного mAb pT3 с CSF; (B) CSF без обработки; (C) гуманизированное mAb pT3.

[0062] На **ФИГ. 22А-22С** показаны (A) термическая денатурация и (B) методы иммунный захват/отВЭЖХ для количественной оценки p217+ тау-белка связанного и не связанного с антителом. (C) Представлено сравнение методов.



[0063] На **ФИГ. 23** показано отсутствие распознавания p217+ тау-белка в анализе на основе pT3 в CSF яванского макака.

[0064] На **ФИГ. 24A-24C** показаны измерения p217+ тау-белка в CSF обезьяны-игрунки анализами **(A)** pT3xhT43, **(B)** pT3xpT82 и **(C)** hT7xpT82.

[0065] На **ФИГ. 25A-25D** показаны измерения **(A, B)** hT7xpT82 (tTau) или **(C, D)** pT3xpT82 (p217+ тау-белок) в неочищенной сыворотке 4 пациентов с БА и 4 пациентов HV. Измерения проводили при разбавлении **(A, C)** 1 : 4 или **(B, D)** 1 : 16, следует отметить отсутствие линейности при разведении и чувствительности.

[0066] На **ФИГ. 26A-26B** показаны измерения **(A)** hT7xpT82 (tTau) или **(B)** pT3xpT82 (короткий p217+ тау-белок) в сыворотках, предварительно обработанных NaOAc и термической денатурацией, и взятых от тех же 4 пациентов с БА и 4 пациентов HV, что и на **ФИГ. 25A-25D**.

[0067] На **ФИГ. 27** показаны измерения при помощи pT3xpT82 (p217+ тау-фрагменты короткие) в иммунопреципитатах (IP) pT3 в сыворотке, взятой от тех же 4 пациентов с БА и 4 пациентов HV, что и на **ФИГ. 25A-25D** и **ФИГ. 26A-26B**.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0068] В разделе «Предпосылки создания изобретения» и в тексте настоящей заявки приведены цитаты или описания различных публикаций, статей и патентов; причем каждая из этих ссылок полностью включена в настоящее описание путем ссылки. Обсуждение документов, актов, материалов, устройств, изделий и т. п., которые были включены в настоящее описание, приведено в качестве контекста для изобретения. Такое обсуждение не является допущением того, что любой из таких источников или все такие источники являются частью предшествующего состояния знаний в отношении каких-либо описываемых или заявленных изобретений.

#### [0069] *Определения*

[0070] Все технические и научные термины в настоящем документе, если не указано иное, имеют общепринятое значение, понятное любому специалисту в области, к которой относится данное изобретение. В ином случае определенные термины в настоящем документе имеют значения, установленные в настоящем описании. Все патенты, опубликованные заявки на патенты и публикации, упомянутые в настоящем документе, включены в него путем ссылки, как если бы они были полностью изложены в настоящем документе. Следует отметить, что в настоящем документе и в приложенной формуле изобретения форма единственного числа включает объекты и во множественном числе, если из контекста явно не следует иное.

[0071] Если не указано иное, любые числовые значения, такие как концентрация или диапазон концентраций, описанные в настоящем документе, следует понимать как модифицированные во всех случаях термином «около». Таким образом, числовое значение, как правило, включает  $\pm 10\%$  от указанного значения. Например, концентрация 1 мг/мл включает от 0,9 мг/мл до 1,1 мг/мл. Аналогичным образом диапазон концентраций от 1% до 10% (мас/об) включает от 0,9% (мас/об) до 11% (мас/об). В контексте

настоящего документа использование числового диапазона явным образом включает все возможные поддиапазоны, все отдельные числовые значения в пределах этого диапазона, включая целые числа в пределах таких диапазонов и дробные значения, если из контекста явно не следует иное.

**[0072]** В контексте данного документа термин «антитело» или «иммуноглобулин» используется в широком значении и относится к молекулам иммуноглобулинов или антител, включая поликлональные антитела, моноклональные антитела включая мышинные, человеческие, адаптированные для человека, гуманизированные и химерные моноклональные антитела и фрагменты антитела.

**[0073]** В целом антитела представляют собой белки или пептидные цепи, которые демонстрируют специфичность связывания с конкретным антигеном. Структуры антител хорошо известны. Иммуноглобулины могут относиться к пяти основным классам, а именно IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи. IgA и IgG дополнительно подразделяются на изоотипы IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Соответственно, антитела согласно данному изобретению могут быть из любого из пяти основных классов или соответствующих подклассов. Антитела изобретения предпочтительно представляют собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Легкие цепи антител любых видов позвоночных можно относить в зависимости от аминокислотных последовательностей их константных доменов к одному из двух четко отличающихся типов, а именно, каппа и лямбда. Соответственно, антитела изобретения могут содержать константный домен легкой цепи каппа или лямбда. В соответствии с конкретными вариантами осуществления антитела изобретения включают константные области тяжелой и/или легкой цепи, мышинных антител или человеческих антител.

**[0074]** В дополнение к константным доменам тяжелой и легкой цепей антитела содержат переменные области легкой и тяжелой цепей. Переменная область легкой или тяжелой цепи иммуноглобулина состоит из «каркасной» области, прерываемой «антигенсвязывающими сайтами». Антигенсвязывающие сайты определяют с использованием различных терминов и схем нумерации, описанных ниже.

(i) Kabat: «Определяющие комплементарность области» или «CDR» основаны на изменчивости последовательности (Wu and Kabat, *J Exp Med.* 132:211-50, 1970). Антигенсвязывающий участок по существу имеет три CDR в каждой переменной области (например, HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в переменной области тяжелой цепи (VH) и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в переменной области легкой цепи (VL));

(ii) Chothia: термин «гипервариабельная область», «HVR», относится к областям переменного домена антитела, которые гипервариабельны по структуре согласно определению Chothia и Lesk (Chothia and Lesk, *J Mol Biol.* 196:901-17, 1987). Антигенсвязывающий сайт по существу имеет по три гипервариабельные области в каждой из переменной областей тяжелой цепи VH (H1, H2, H3) и легкой цепи VL (L1, L2, L3). Системы нумерации, а также аннотации CDR и HVR были пересмотрены Abhinandan и Martin (Abhinandan and Martin, *Mol Immunol.* 45:3832-9, 2008).

(iii) IMGT: другое определение областей, образующих антигенсвязывающий сайт, было предложено Lefranc (Lefranc et al., *Dev Comp Immunol.* 27:55-77, 2003), на основании сравнения V-доменов иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов. В международной базе данных ImMunoGeneTics (IMGT) ([http://www\\_imgt\\_org](http://www_imgt_org)) представлены стандартизированная нумерация и определение этих областей. Соответствие между разграничениями CDR, HVR и IMGT описано в публикации Lefranc et al., 2003, *Id.*;

(iv) Антигенсвязывающий сайт может также быть определен по публикации «Specificity Determining Residue Usage» (SDRU) (Almagro, *Mol Recognit.* 17:132-43, 2004), в которой в качестве SDR представлены аминокислотные остатки иммуноглобулина, которые непосредственно участвуют в контакте с антигеном.

**[0075]** Термины «каркас» или «каркасные последовательности» представляют собой оставшиеся последовательности вариабельной области антитела, которые отличаются от тех, которые определены как антигенсвязывающие сайты. Поскольку конкретное определение антигенсвязывающего сайта может быть сформулировано на основе разных признаков, как описано выше, конкретная каркасная последовательность зависит от определения антигенсвязывающего сайта. Каркасные области (FR) представляют собой более высоко консервативные участки вариабельных доменов. Каждый из вариабельных доменов нативной тяжелой и легкой цепей содержит четыре FR (соответственно FR1, FR2, FR3 и FR4), которые по существу принимают конфигурацию бета-листов, соединенных тремя гипервариабельными петлями. Гипервариабельные петли в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости при помощи FR и, вместе с гипервариабельными петлями из другой цепи, способствуют образованию антигенсвязывающего сайта антител. Структурный анализ антител выявил взаимосвязь между последовательностью и формой участка связывания, образованного определяющими комплементарность областями (Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 227: 799-817, 1992; Tramontano et al., *J. Mol. Biol.* 215:175-182, 1990). Несмотря на высокую вариабельность последовательности пять из шести петель имеют лишь небольшой набор конформаций основной цепи, называемый «каноническими структурами». Эти конформации, во-первых, определяются длиной петель и, во-вторых, наличием ключевых остатков в определенных положениях в петлях и в каркасных областях, которые определяют конформацию посредством их упаковки, водородных связей или способности принимать необычные конформации основной цепи.

**[0076]** При использовании в настоящем документе термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к фрагменту антитела, такому как, например, диатело, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv-фрагмент, стабилизированный дисульфидными связями Fv-фрагмент (dsFv), (dsFv)<sub>2</sub>, биспецифический dsFv (dsFv-dsFv'), стабилизированное дисульфидными связями диатело (ds-диатело), одноцепочечная молекула антитела (scFv), однодоменное антитело (sdab), scFv-димер (двухвалентное антитело), мультиспецифическое антитело, образованное из части антитела, содержащей одну или более CDR, верблюжье однодоменное антитело, нанотело, доменное антитело, двухвалентное доменное антитело

или любой другой фрагмент антитела, который связывается с антигеном, но не содержит полную структуру антитела. Антигенсвязывающий фрагмент обладает возможностью связывания с тем же антигеном, с которым связывается исходное антитело или исходный фрагмент антитела. В соответствии с конкретными вариантами осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, константную область легкой цепи и Fd-сегмент константной области тяжелой цепи. В соответствии с другими конкретными вариантами осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит Fab и F(ab').

**[0077]** При использовании в настоящем документе термин «эпитоп» относится к сайту на антигене, с которым специфически связывается иммуноглобулин, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Эпитопы могут быть образованы как из смежных аминокислот, так и из несмежных аминокислот, расположенных рядом друг с другом в результате третичной укладки белка. Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, как правило, сохраняются под воздействием денатурирующих растворителей, тогда как структура эпитопов, образованных в результате третичной укладки, как правило, нарушается при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп обычно включает по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Способы определения пространственной конформации эпитопов включают, например, рентгеновскую кристаллографию и двухмерный ядерный магнитный резонанс. См., например, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996).

**[0078]** В настоящем документе термин «тау» или «тау-белок» относится к встречающемуся в избытке белку центральной и периферической нервной системы, имеющему множество изоформ. В центральной нервной системе (CNS) человека существует шесть основных изоформ тау-белка, имеющих длину от 352 до 441 аминокислот, обусловленных альтернативным сплайсингом (Hanger et al., *Trends Mol Med.* 15:112-9, 2009). Изоформы отличаются друг от друга посредством регулируемого включения 0-2 N-концевых вставок и 3 или 4 тандемно расположенных повторов, связывающихся с микротрубочками и называемых 0N3R, 1N3R, 2N3R, 0N4R, 1N4R и 2N4R. В настоящем документе термин «контрольный тау-белок» относится к изоформе тау-белка с SEQ ID NO: 1, в которой отсутствуют фосфорилирование и другие посттрансляционные модификации. В настоящем документе термин «тау-белок» включает белки, содержащие мутации, например точечные мутации, фрагменты, вставки, делеции и варианты сплайсинга полноразмерного тау-белка дикого типа. Термин «тау-белок» включает также пост-трансляционные модификации аминокислотной последовательности тау-белка. К пост-транскрипционной модификации относится, без ограничений, фосфорилирование.

**[0079]** Если не указано иное, в настоящем документе нумерация аминокислот в тау-белке или его фрагменте дается по аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1.

**[0080]** При использовании в настоящем документе термин «p217+ тау-пептиды», «p217+ тау» или «p217+ тау-белок» означает человеческий тау-белок или тау-фрагмент, который фосфорилирован по одному или обоим остаткам 217 (pT217) и 212 (pT212) тау-белка, причем нумерация положений соответствует нумерации в SEQ ID NO: 1.

**[0081]** При использовании в настоящем документе термин «эпитоп p217+ тау-белка» относится к эпитопу тау-белка, содержащему по меньшей мере один из фосфорилированного T217 и фосфорилированного T212, причем нумерация положений соответствует нумерации в SEQ ID NO: 1. Примеры эпитопа p217+ тау-белка включают, например, эпитоп pT3. При использовании в настоящем документе термин «эпитоп pT3» относится к эпитопу, содержащему аминокислоты 210-220 человеческого тау-белка, который фосфорилирован по меньшей мере по одному остатку из T217 и T212 человеческого тау-белка, причем нумерация положений соответствует нумерации в SEQ ID NO: 1. К примерам эпитопа pT3 относятся, например, SEQ ID NO: 25, 26 и 27.

**[0082]** При использовании в настоящем документе каждый из терминов «длинные тау-пептиды p217+», «длинный тау-белок p217+», «длинная форма тау-пептидов p217+» или «длинный фрагмент тау-пептидов p217+» имеет одно и то же значение и обозначает тау-пептиды p217+, которые содержат эпитоп тау-белка p217+ и эпитоп, содержащий аминокислотные остатки 7-20 тау-белка. «Длинные тау-пептиды p217+» в соответствии с вариантами осуществления изобретения могут иметь разную длину. Например, N-конец «длинного фрагмента тау-пептидов p217+» может представлять собой 1-й, 2-й, 4-й, 5-й, 6-й или 7-й аминокислотный остаток тау-белка.

**[0083]** При использовании в настоящем документе каждый из терминов «короткие тау-пептиды p217+», «короткий тау-белок p217+», «короткая форма тау-пептидов p217+» или «короткий фрагмент тау-пептидов p217+» имеет одно и то же значение и обозначает тау-пептиды p217+, которые содержат эпитоп тау-белка p217+ и эпитоп, содержащий аминокислотные остатки 119-126 тау-белка, но не содержат эпитоп, содержащий аминокислотные остатки 7-20 тау-белка. «Короткие тау-пептиды p217+» в соответствии с вариантами осуществления изобретения могут иметь разную длину. Например, N-конец «коротких тау-пептидов p217+» может представлять собой любой из аминокислотных остатков между эпитопом, содержащим аминокислотные остатки 7-20 тау-белка, и эпитопом, содержащим аминокислотные остатки 119-126 тау-белка.

**[0084]** При использовании в настоящем документе каждый из терминов «длинный тау-пептид», «длинный тау-белок», «длинная форма тау-пептида» или «длинный фрагмент тау-пептида» имеет одно и то же значение и означает тау-пептид, который содержит эпитоп тау-белка, распознаваемый не зависящим от фосфорилирования захватным антителом, и эпитоп, содержащий аминокислотные остатки 7-20 тау-белка. «Длинные фрагменты тау-пептидов» в соответствии с вариантами осуществления изобретения могут иметь разную длину. Например, N-конец «длинного фрагмента тау-пептидов» может представлять собой 1-й, 2-й, 4-й, 5-й, 6-й или 7-й аминокислотный остаток тау-белка.

**[0085]** При использовании в настоящем документе каждый из терминов «короткий тау-пептид», «короткий тау-белок», «короткая форма тау-пептида» или «короткий фрагмент тау-пептида» имеет одно и то же значение и означает тау-пептид, который содержит эпитоп тау-белка, распознаваемый не зависящим от фосфорилирования захватным антителом, и эпитоп, содержащий аминокислотные остатки 119-126 тау-белка, но не включает в себя эпитоп, содержащий аминокислотные остатки 7-20 тау-белка. «Короткие фрагменты тау-пептидов» в соответствии с вариантами осуществления изобретения могут иметь разную длину. Например, N-конец «короткого тау-пептида» может представлять собой любой из аминокислотных остатков между эпитопом, содержащим аминокислотные остатки 7-20 тау-белка, и эпитопом, содержащим аминокислотные остатки 119-126 тау-белка.

**[0086]** При использовании в настоящем документе термин «захватное антитело» относится к антителу, которое связывается с интересующим антигеном и прямо или косвенно связано с твердой подложкой. Примеры твердых подложек включают, без ограничений, микрочастицы или гранулы, такие как магнитные гранулы. Примеры захватных антител, без ограничений, включают моноклональное антитело, которое связывается с эпитопом тау-белка p217+. В соответствии с вариантами осуществления изобретения захватное антитело может представлять собой моноклональное антитело, содержащее области HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 32, 33 и 34, и участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 35, 36 и 37. В конкретных вариантах осуществления захватное антитело представляет собой pT3. При использовании в настоящем документе термин «pT3» относится к антителу, которое связывается с p217+ тау-пептидами и имеет аминокислотную последовательность вариательной области тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO: 28 и последовательность аминокислот вариательной области легкой цепи SEQ ID NO: 29. В одном варианте осуществления моноклональное антитело pT3 экспрессируется мышью гибридомой. В другом варианте осуществления захватное антитело представляет собой гуманизованное антитело, имеющее аминокислотную последовательность вариательной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 30 и последовательность аминокислот вариательной области легкой цепи SEQ ID NO: 31.

**[0087]** В соответствии с другими вариантами осуществления захватное антитело может представлять собой моноклональное антитело, которое связывается с эпитопом между аминокислотами 150 и 250 тау-белка, предпочтительно аминокислотами 211-221 или аминокислотами 159-163 человеческого тау-белка, независимо от фосфорилирования, и нумерация положений соответствует нумерации в SEQ ID NO: 1. В конкретных вариантах осуществления захватное антитело представляет собой hT7. При использовании в настоящем документе термин «hT7» относится к общедоступному моноклональному антителу, которое связывается с эпитопом, содержащим аминокислоты 159-163

человеческого тау-белка, причем нумерация положений соответствует нумерации в SEQ ID NO: 1. Моноклональное антитело к hT7 предлагается к продаже, например, компанией ThermoFisher (например, № по каталогу: MN1000).

**[0088]** В настоящем документе термин «детекторное антитело» относится к антителу, которое связывается с интересующим антигеном и имеет обнаруживаемую метку или связывается со вторичной системой обнаружения. Примеры обнаруживаемых меток включают, без ограничений, различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы, биолюминесцентные материалы и радиоактивные материалы. Примеры детекторных антител включают, без ограничений, моноклональное антитело, которое связывается с тау-белком, предпочтительно эпитопом, содержащим аминокислоты 7-20 или 116-127 человеческого тау-белка, причем нумерация положений соответствует нумерации в SEQ ID NO: 1. При использовании моноклонального антитела, которое связывается с тау-белком в эпитопе, содержащем аминокислоты 7-20, в качестве детекторного антитела для захваченных p217+ тау-пептидов, обнаруживают длинные фрагменты тау-белка. При использовании моноклонального антитела, которое связывается с тау-белком в эпитопе, содержащем аминокислоты 116-127, в качестве детекторного антитела для захваченных p217+ тау-пептидов, обнаруживают как короткие, так и длинные фрагменты тау-белка.

**[0089]** В конкретных вариантах осуществления детекторное антитело представляет собой hT43. При использовании в настоящем документе термин «hT43» относится к моноклональному антителу, которое связывается с эпитопом, содержащим аминокислоты 7-20 человеческого тау-белка, причем нумерация положений соответствует нумерации в SEQ ID NO: 1, а антитело содержит в вариательной области тяжелой цепи последовательность аминокислот SEQ ID NO: 8 и последовательность аминокислот вариательной области легкой цепи SEQ ID NO: 9. В другом конкретном варианте осуществления детекторное антитело представляет собой pT82. При использовании в настоящем документе термин «pT82» относится к моноклональному антителу, которое связывается с эпитопом, содержащим аминокислоты 119-126, предпочтительно 116-127, человеческого тау-белка, причем нумерация положений соответствует нумерации в SEQ ID NO: 1, а антитело содержит в вариательной области тяжелой цепи последовательность аминокислот SEQ ID NO: 18 и последовательность аминокислот вариательной области легкой цепи SEQ ID NO: 19.

**[0090]** При использовании в настоящем документе термин «анализ на основе pT3» относится к анализу в соответствии с вариантом осуществления изобретения, в котором в качестве захватного антитела используют антитело pT3. При использовании в настоящем документе термин «pT3xhT43» относится к анализу в соответствии с вариантом осуществления изобретения, в котором в качестве захватного антитела используют антитело pT3, а в качестве детекторного антитела используют антитело hT43. При использовании в настоящем документе термин «pT3xpT82» относится к анализу в соответствии с вариантом осуществления изобретения, в котором в качестве захватного

антитела используют антитело pT3, а в качестве детекторного антитела используют антитело pT82.

**[0091]** При использовании в настоящем документе термин «анализ на основе hT7» относится к анализам в соответствии с вариантами осуществления изобретения, в которых в качестве захватного антитела используют антитело hT7. При использовании в настоящем документе термин «hT7xpT82» относится к анализам в соответствии с вариантами осуществления изобретения, в которых в качестве захватного антитела используют антитело hT7, а в качестве детекторного антитела используют антитело pT82.

**[0092]** Используемый в данном документе термин «пациент» относится к животному, предпочтительно к млекопитающему. В соответствии с конкретными вариантами осуществления пациент представляет собой млекопитающее, включая млекопитающих, отличных от приматов (например, верблюда, осла, зебру, корову, свинью, лошадь, козу, овцу, кошку, собаку, крысу, кролика, морскую свинку, игрунку или мышь) или приматов (например, обезьяну, шимпанзе или человека). В конкретных вариантах осуществления пациент представляет собой человека.

**[0093]** При применении в настоящем документе термин «таупатия» охватывает любые нейродегенеративные заболевания, которые связаны с патологическим агрегированием тау-белка в мозге. Наряду с семейной и спорадической БА к другим примерам таупатии относятся лобно-височная деменция с паркинсонизмом, связанная с хромосомой 17 (FTDP-17), прогрессирующий супрануклеарный парез взора, кортикобазальная дегенерация, болезнь Пика, прогрессирующий субкортикальный глиоз, деменция с преобладанием нейрофибриллярных клубков, диффузные нейрофибриллярные клубки с кальцификацией, деменция с аргирофильными зернами, комплекс амиотрофический боковой склероз - паркинсонизм - деменция, синдром Дауна, болезнь Герстманна - Штреусслера - Шейнкера, болезнь Галлервордена - Шпатца, миозит с тельцами включения, болезнь Крейтцфельда - Якоба, множественная системная атрофия, болезнь Ниманна - Пика типа С, прионная церебральная амилоидная ангиопатия, подострый склерозирующий панэнцефалит, миотоническая дистрофия, негуамская мотонейронная болезнь с нейрофибриллярными клубками, постэнцефалитный паркинсонизм и хроническая травматическая энцефалопатия, такая как *dementia pugilistica* (деменция боксеров) (Morris et al., *Neuron*, 70:410-26, 2011).

**[0094]** В настоящем документе термины «определение», «измерение», «оценка» и «анализ» используются взаимозаменяемо и включают как количественное, так и качественное определение. Эти термины относятся к любой форме измерения и включают в себя определение наличия или отсутствия характеристики, признака или особенности. Оценивание может быть относительным или абсолютным. Термин «оценивание наличия» включает определение количества присутствующего вещества, а также определение наличия или отсутствия такого вещества.

**[0095]** Используемый в настоящем документе термин «диагностика» означает обнаружение заболевания или расстройства или определение стадии или степени



заболевания или расстройства, такого как таупатия. Как правило, диагностика заболевания или расстройства основана на оценке одного или более факторов и/или симптомов, указывающих на заболевание. Диагностика может быть выполнена на основании наличия, отсутствия или количества фактора, указывающего на наличие или отсутствие заболевания или состояния, например тау-белка p217+. Каждый фактор или симптом, который считается показателем для диагностики конкретного заболевания, не обязательно должен относиться исключительно к конкретному заболеванию, т. е. возможны дифференциальные диагнозы, которые могут быть основаны на диагностическом факторе или симптоме. Аналогичным образом возможны случаи, когда фактор или симптом, указывающий на конкретное заболевание, присутствует у субъекта, не имеющего данного заболевания. Термин «диагностика» также включает определение терапевтического эффекта лекарственной терапии, например терапии антителом против тау-белка p217+, или прогнозирование характера ответа на лекарственную терапию, например терапию антителом против тау-белка p217+. Диагностические способы можно применять независимо или в комбинации с другими диагностическими и/или определяющими стадии способами, известными специалистам в области медицины, для конкретного заболевания или расстройства, например болезни Альцгеймера.

**[0096]** В настоящем документе термины «увеличение» и «уменьшение» относятся к различиям в количестве конкретного биомаркера в пробе по сравнению с уровнем контрольного образца или эталона. Например, количество конкретного пептида может быть повышено или снижено в пробах пациентов с заболеванием по сравнению с эталонным уровнем. В одном варианте осуществления «повышение уровня» или «снижение уровня» может представлять собой разницу между уровнями биомаркера, присутствующего в пробе и в контрольном образце, составляющую по меньшей мере около 1%, по меньшей мере около 2%, по меньшей мере около 3%, по меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80% или более. В одном варианте осуществления «повышение уровня» или «снижение уровня» может представлять собой статистически значимую разницу между уровнями биомаркера, присутствующего в пробе и в контрольном образце. Например, разница может быть статистически значимой, если измеренный уровень биомаркера находится за пределами около 1,0 среднеквадратичного отклонения, около 1,5 среднеквадратичного отклонения, около 2,0 среднеквадратичного отклонения или около 2,5 среднеквадратичного отклонения от среднего значения любой группы контрольного образца или эталона. Эталон или контрольный образец может представлять собой, например, пробу от здорового субъекта или пробу, взятую от того же субъекта в более ранний момент времени, такой как момент времени до введения лекарства, или в более ранний момент времени во время терапевтического режима.

**[0097]** Используемый в настоящем документе термин «выделенный» означает, что биологический компонент (например, нуклеиновая кислота, пептид или белок) был по существу отделен, получен отдельно или очищен от других биологических компонентов организма, в котором компонент встречается в природе, т. е. от других хромосомных и внехромосомных ДНК, РНК и белков. Таким образом, нуклеиновые кислоты, пептиды и белки, которые были «выделены», включают в себя нуклеиновые кислоты и белки, очищенные стандартными способами очистки. «Выделенные» нуклеиновые кислоты, пептиды и белки могут быть частью композиции и все еще считаться выделенными, если такая композиция не является частью исходной среды нуклеиновой кислоты, пептида или белка. Термин также включает в себя нуклеиновые кислоты, пептиды и белки, полученные путем рекомбинантной экспрессии в клетке-хозяине, а также химически синтезированные нуклеиновые кислоты.

**[0098]** Под «выделенным антителом, которое связывается с тау-белком», или «выделенным антителом к тау-белку» в настоящем документе подразумевается антитело, которое специфически связывается с тау-белком и по существу не содержит других антител со специфичностями к другим антигенам (например, выделенное антитело к тау-белку по существу не содержит антител, специфически связывающих антигены, отличные от тау-белка). Однако выделенное детекторное антитело к тау-белку может иметь перекрестную реактивность с другими родственными антигенами, например антигенами видов (например, видовыми гомологами тау-белка).

**[0099]** В контексте настоящего документа термин «специфически связывается» или «специфическое связывание» относится к способности антитела к тау-белку изобретения связываться с предварительно заданной мишенью с константой диссоциации ( $K_D$ ) около  $1 \times 10^{-6}$  М или прочнее, например около  $1 \times 10^{-7}$  М или менее, около  $1 \times 10^{-8}$  М или менее, около  $1 \times 10^{-9}$  М или менее, около  $1 \times 10^{-10}$  М или менее, около  $1 \times 10^{-11}$  М или менее, около  $1 \times 10^{-12}$  М или менее или около  $1 \times 10^{-13}$  М или менее.  $K_D$  представляет собой отношение  $K_d$  к  $K_a$  (т. е.  $K_d/K_a$ ) и выражается в молярной концентрации (М). Значения  $K_D$  для антител можно определять с помощью способов данной области техники, относящихся к настоящему описанию. Например, значение  $K_D$  для антитела к тау-белку может быть определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например с помощью биосенсорной системы, например прибора Biacore®, прибора Proteon (BioRBA), прибора KinExA (Sapidyne), твердофазного ИФА или анализов конкурентного связывания, известных специалистам в данной области. Как правило, антитело к тау-белку связывается с предварительно заданной мишенью (т. е. тау-белком) с  $K_D$ , которая по меньшей мере в десять раз меньше его  $K_D$  для неспецифической мишени по результатам измерения методом поверхностного плазмонного резонанса с использованием, например, прибора Proteon (BioRBA). Однако антитела к тау-белку, специфически связывающиеся с тау-белком, могут иметь перекрестную реактивность с другими родственными мишенями, например с той же предварительно заданной мишенью, но от другого биологического вида (гомологи), например от мыши, крысы, обезьяны-игрунки, собаки или свиньи.

**[00100]** Используемый в настоящем документе термин «полинуклеотид», который является синонимом термину «молекула нуклеиновой кислоты», «нуклеотиды» или «нуклеиновые кислоты», относится к любому полирибонуклеотиду или полидезоксирибонуклеотиду, который может представлять собой немодифицированную РНК или ДНК или модифицированную РНК или ДНК. «Полинуклеотиды» включают, без ограничений, одно- и двухцепочечные ДНК, ДНК, которые представляют собой смесь одно- и двухцепочечных областей, одно- и двухцепочечные РНК, РНК, которые представляют собой смесь одно- и двухцепочечных областей, гибридные молекулы, содержащие ДНК и РНК, которые могут быть одноцепочечными или, более типично, двухцепочечными или представлять собой смесь одно- и двухцепочечных областей. Кроме того, «полинуклеотидом» называют трехцепочечные области, содержащие РНК или ДНК, или как РНК, так и ДНК. Термин «полинуклеотид» также включает ДНК или РНК, содержащую одно или более модифицированных оснований, и ДНК или РНК с основными цепями, модифицированными для стабильности или для других целей. «Модифицированные» основания включают, например, тритилированные основания и нетипичные основания, такие как инозин. В ДНК и РНК могут быть внесены различные модификации; следовательно, термин «полинуклеотид» охватывает химически, ферментативно или метаболически модифицированные формы полинуклеотидов, обычно встречающиеся в природе, а также химические формы ДНК и РНК, характерные для вирусов и клеток. Термин «полинуклеотид» также охватывает относительно короткие цепи нуклеиновых кислот, часто называемые олигонуклеотидами.

**[00101]** При использовании в настоящем документе термин «вектор» представляет собой репликон, в который может быть функционально вставлен другой нуклеотидный сегмент так, чтобы происходила репликация или экспрессия сегмента.

**[00102]** В настоящем документе термин «клетка-хозяин» относится к клетке, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты изобретения. Термин «клетка-хозяин» может относиться к любому типу клетки, например к первичной клетке, клетке в культуре или клетке из клеточной линии. В одном варианте осуществления «клетка-хозяин» представляет собой клетку, трансфицированную молекулой нуклеиновой кислоты изобретения. В другом варианте осуществления «клетка-хозяин» представляет собой потомство или потенциальное потомство такой трансфицированной клетки. Потомство клетки может быть или не быть идентичным родительской клетке, например, из-за мутаций или воздействий окружающей среды, которые могут происходить в последующих поколениях, или из-за интеграции молекулы нуклеиновой кислоты в геном клетки-хозяина.

**[00103]** Термин «экспрессия» в настоящем документе обозначает биосинтез продукта гена. Термин охватывает транскрипцию гена в РНК. Термин также охватывает трансляцию РНК в один или более полипептидов и дополнительно охватывает все посттранскрипционные и посттрансляционные модификации природного происхождения. Экспрессированное детекторное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент,

связывающийся с тау-белком, может находиться в цитоплазме клетки-хозяина во внеклеточной среде, такой как питательная среда для клеточной культуры, или быть прикрепленным к клеточной мембране.

**[00104]** *Антитела к тау-белку*

**[00105]** В одном общем аспекте изобретение относится к выделенным детекторным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с тау-белком, иммобилизованным захватным антителом. Такие антитела к тау-белку могут обладать свойствами связывания с фосфорилированным эпитопом на тау-белке или связывания с нефосфорилированным эпитопом на тау-белке. Детекторные антитела к тау-белку можно использовать в качестве исследовательских или диагностических реагентов для обнаружения тау-белка в биологических пробах.

**[00106]** В соответствии с конкретным аспектом изобретение относится к выделенному детекторному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который связывается с тау-белком в эпитопе, включающем аминокислотные остатки 119-126, предпочтительно аминокислотные остатки 116-127 тау-белка.

**[00107]** В соответствии с конкретным аспектом выделенное детекторное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тау-белком в эпитопе, содержащем аминокислотные остатки 116-127 тау-белка, содержит (а) участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 2, 3 и 4; и (b) участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 5, 6 и 7.

**[00108]** В соответствии с конкретным аспектом выделенное детекторное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с тау-белком в эпитопе, содержащем аминокислотные остатки 116-127 тау-белка, содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85% или 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 95% и наиболее предпочтительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 8, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85% или 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 95% и наиболее предпочтительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 9.

**[00109]** Выделенное детекторное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с тау-белком в эпитопе, содержащем аминокислотные остатки 116-127 тау-белка, предпочтительно представляет собой антитело pT82.

**[00110]** В соответствии с конкретным аспектом изобретение относится к выделенному детекторному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который связывается с тау-белком в эпитопе, содержащем аминокислотные остатки 7-20 тау-белка.

**[00111]** В соответствии с конкретным аспектом выделенное детекторное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тау-белком в эпитопе,

содержащем аминокислотные остатки 7-20 тау-белка, содержит (а) участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 12, 13 и 14; и (b) участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 15, 16 и 17.

**[00112]** В соответствии с конкретным аспектом выделенное детекторное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с тау-белком в эпитопе, содержащем аминокислотные остатки 7-20 тау-белка, содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85% или 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 95% и наиболее предпочтительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 18, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85% или 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 95% и наиболее предпочтительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 19.

**[00113]** Выделенное детекторное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с тау-белком в эпитопе, содержащем аминокислотные остатки 7-20 тау-белка, предпочтительно представляет собой антитело hT43.

**[00114]** Антитела настоящего изобретения могут быть получены с помощью различных методик, например с помощью метода гибридомы (Kohler and Milstein, *Nature*. 256:495-7, 1975). Химерные mAb, содержащие переменную область легкой цепи и тяжелой цепи, полученные из донорского антитела (как правило, мышиного) в комбинации с константными областями легкой и тяжелой цепей, полученными из акцепторного антитела (как правило, другого вида млекопитающих, такого как человек), могут быть получены способом, описанным в публикации US4816567. mAb с привитой областью CDR, имеющие CDR из донорского иммуноглобулина, не относящегося к человеку (как правило, мышиного), и оставшиеся производные от иммуноглобулина части молекулы, происходящие от одного или более иммуноглобулинов человека, могут быть получены методиками, известными специалистам в данной области, такими как описанные в публикации US5225539. Полностью человеческие mAb, в которых отсутствуют какие-либо нечеловеческие последовательности, можно получать из трансгенных по человеческим иммуноглобулинам мышей по методикам, описанным в публикации (Lonberg et al., *Nature*. 368:856-9, 1994; Fishwild et al., *Nat Biotechnol*. 14:845-51, 1996; Mendez et al., *Nat Genet*. 15:146-56, 1997). Человеческие mAb также могут быть получены и оптимизированы из библиотек фаговых дисплеев (Knappik et al., *J Mol Biol*. 296:57-86, 2000; Krebs et al., *J Immunol Methods*. 254:67-84, 2001; Shi et al., *J Mol Biol*. 397:385-96, 2010).

**[00115]** Функциональную активность детекторных антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с тау-белком, можно охарактеризовать способами, известными в данной области. Способы характеристики

антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с тау-белком, включают, без ограничений, анализы аффинности и анализы специфичности, включая анализ Viacore, твердофазный ИФА и FACS, иммуногистохимический анализ и т. д.

**[00116]** Для определения эпитопа, с которым связываются антитела изобретения, можно использовать несколько общеизвестных методов. Например, в случае, когда известны структуры обоих отдельных компонентов, можно использовать анализ *in silico* прикрепления одного белка к другому белку для идентификации способных к взаимодействию участков. Может быть проведено замещение водорода дейтерием (H/D) в комплексе антигена и антитела для картирования участков антигена, связывающихся с антителом. Для определения местоположения важных для связывания с антителом аминокислот может быть применен сегментный и точечный мутагенез антигена. Для идентификации остатков, участвующих в образовании эпитопа и паратопа, применяется со-кристаллическая структура комплекса антиген-антитело.

**[00117]** В другом общем аспекте изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему детекторное антитело изобретения или его антигенсвязывающий фрагмент. Специалистам в данной области техники будет понятно, что кодирующая последовательность белка может быть изменена (например, путем замены, делеции, вставки и т. п.) без изменения аминокислотной последовательности белка. Соответственно, специалистам в данной области техники будет понятно, что последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие детекторные антитела согласно изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты, можно изменять без изменения аминокислотных последовательностей белков. Примерами изолированных полинуклеотидов являются кодирующие полипептиды полинуклеотиды, содержащие участки CDR HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, показанные соответственно в SEQ ID NO: 2, 3 и 4, или полипептиды, содержащие CDR участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина с соответственно SEQ ID NO: 5, 6 и 7. Другими примерами изолированных полинуклеотидов являются кодирующие полипептиды полинуклеотиды, содержащие участки CDR HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, показанные соответственно в SEQ ID NO: 12, 13 и 14, или полипептиды, содержащие CDR участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина с соответственно SEQ ID NO: 15, 16 и 17. Другие примеры изолированных полинуклеотидов представляют собой полинуклеотиды, кодирующие переменные области антитела изобретения. Другие полинуклеотиды, которые, принимая во внимание вырожденность генетического кода или предпочтительность применения кодонов в данной экспрессирующей системе, кодируют антитела изобретения, также находятся в пределах объема изобретения. Выделенные нуклеиновые кислоты настоящего изобретения можно получить с применением хорошо известных рекомбинантных или синтетических методов. Кодирующие моноклональные антитела ДНК легко выделяются и секвенируются с применением способов, известных специалистам в данной области. При получении гибридомы такие клетки могут служить источником такой ДНК. В

альтернативном варианте осуществления можно использовать дисплейные методики, в которых кодирующая последовательность и продукт трансляции соединены, например библиотеки фаговых или рибосомных дисплеев.

**[00118]** В другом общем аспекте изобретение относится к вектору, содержащему выделенный полинуклеотид, кодирующий детекторное антитело изобретения или его антигенсвязывающий фрагмент. Можно использовать любой вектор, известный специалистам в данной области техники с учетом данного описания, такой как плаزمид, космида, фаговый вектор или вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой рекомбинантный экспрессионный вектор, такой как плаزمид. Вектор может включать любой элемент для обеспечения стандартной функции экспрессионного вектора, например промотор, элемент для связывания с рибосомой, терминатор, энхансер, селективный маркер и точку начала репликации. Промотор может представлять собой конститутивный, индуцируемый или репрессируемый промотор. Ряд экспрессионных векторов, способных доставлять нуклеиновые кислоты в клетку, известны в данной области и могут быть использованы в настоящем изобретении для получения в клетке антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Для генерации рекомбинантного экспрессионного вектора по вариантам осуществления изобретения можно использовать традиционные клональные методы или синтез искусственных генов.

**[00119]** В другом общем аспекте изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей выделенный полинуклеотид, кодирующий детекторное антитело изобретения или его антигенсвязывающий фрагмент. В контексте настоящего описания для рекомбинантной экспрессии антител или их антигенсвязывающих фрагментов настоящего описания можно применять любую клетку-хозяин, известную специалистам в данной области. Такими клетками-хозяевами могут быть эукариотические клетки, бактериальные клетки, растительные клетки или клетки архей. Примерами эукариотических клеток могут быть клетки млекопитающих, насекомых, птиц или другие клетки животного происхождения. Эукариотические клетки млекопитающих включают иммортализованные клеточные линии, такие как гибридомы или клеточные линии миеломы, например мышинные клеточные линии SP2/0 (Американская коллекция типовых культур (ATCC), г. Манассас, штат Вирджиния, CRL-1581), NS0 (Европейская коллекция клеточных культур (ECACC), г. Солсбери, Уилтшир, Великобритания, ECACC № 85110503), FO (ATCC CRL-1646) и Ag653 (ATCC CRL-1580). Примером клеточной линии миеломы человека является U266 (ATCC CRL-TIB-196). Другие используемые клеточные линии включают в себя линии, полученные из клеток яичника китайского хомячка (CHO), например CHO-K1 SV (Lonza Biologics), CHO-K1 (ATCC CRL-61, Invitrogen) или DG44.

**[00120]** В другом общем аспекте изобретение относится к способам получения детекторного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, включающим культивирование клеток, содержащих полинуклеотид, кодирующий детекторное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях, способствующих продукции детекторного антитела или его антигенсвязывающего

фрагмента изобретения, и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры клеток (например, из супернатанта). Экспрессированные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты можно собирать из клеток и очищать в соответствии с традиционными способами, известными в данной области.

**[00121] Способы диагностики**

**[00122]** Изобретение относится к измерению форм p217+ тау-белка, которых больше у больных БА, например, с использованием захватного антитела, такого как pT3, которое избирательно иммобилизует формы p217+ тау-белка, в комбинации с детекторным антителом к тау-белку, которое мечено репортерным элементом, позволяющим обнаруживать захваченные формы p217+ тау-белка. Способы изобретения можно применять в различных диагностических целях, например для диагностики БА или других тауопатий у пациента, отслеживания эффективности лечения, идентификации пациентов, приемлемых для лечения антителами к p217+ тау-белку, и т. д.

**[00123]** В соответствии с вариантом осуществления изобретения p217+ тау-пептиды в интересующей пробе захватываются захватным антителом, направленным к эпитопу p217+ тау-белка, такому как эпитоп, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, 26 или 27. Захваченные p217+ тау-пептиды, каждый из которых содержит эпитоп p217+ тау-белка, могут иметь разную длину, которая может быть определена при помощи детекторных антител, связывающихся с различными эпитопами. Например, детекторное антитело к эпитопу, содержащему аминокислотные остатки 7-20 тау-белка, может обнаруживать только захваченные p217+ тау-пептиды или их фрагменты, которые все еще содержат аминокислотные остатки 7-20 тау-белка («длинные p217+ тау-пептиды»), а детекторное антитело, направленное против эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 119-126 тау-белка, может обнаруживать не только длинные p217+ тау-пептиды, но и короткие p217+ тау-пептиды. Захваченные p217+ тау-пептиды можно приводить в контакт с детекторным антителом, направленным против эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 7-20 или 116-127 тау-белка, и таким образом обнаруживать и измерять количество длинных p217+ тау-пептидов или p217+ тау-пептидов (длинные и короткие p217+ тау-пептиды) в пробе. Количество коротких p217+ тау-пептидов в пробе вычисляют путем вычитания количества длинных p217+ тау-пептидов из количества p217+ тау-пептидов.

**[00124]** В соответствии с другим вариантом осуществления изобретения в дополнение к захвату и измерению количества p217+тау-пептидов в пробе, захватывают общие тау-пептиды в пробе не зависящим от фосфорилирования захватным антителом, таким как антитело, направленное против эпитопа между аминокислотами 150 и 250 тау-белка, предпочтительно эпитопа, содержащего аминокислоты 159-163 тау-белка. Захваченные общие тау-пептиды можно приводить в контакт с детекторным антителом, направленным против эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 7-20 или 116-127 тау-белка, и таким образом обнаруживать и измерять количество длинных общих тау-пептидов или общих тау-пептидов (длинные и короткие фрагменты тау-пептидов) в пробе.



Количество коротких общих тау-пептидов в пробе вычисляют путем вычитания количества длинных общих тау-пептидов из количества общих тау-пептидов.

**[00125]** В соответствии с вариантами осуществления изобретения для диагностических целей можно использовать значение, относящееся к p217+ тау-пептидам в пробе, такое как количество p217+ тау-пептидов и количество длинных p217+ тау-пептидов, необязательно количество общих тау-пептидов и количество общих длинных тау-фрагментов в пробе, а также данные, основанные на измеренных количествах, такие как расчетное количество коротких p217+ тау-пептидов и коротких общих тау-пептидов, или отношение, основанное на p217+ тау-пептидах, например отношение количества коротких тау-пептидных фрагментов к количеству длинных тау-пептидных фрагментов, отношение количества коротких p217+ тау-пептидов к количеству общих коротких тау-фрагментов, отношение количества длинных p217+ тау-пептидов к общему количеству длинных тау-фрагментов и т. п.

**[00126]** Диагностику выполняют путем сравнения значения, связанного с p217+ тау-пептидами в пробе, взятой у пациента, с соответствующими исходными значениями. Исходные значения могут представлять собой средние уровни в популяции здоровых людей. Исходные значения могут также представлять собой предшествующие уровни значений, определенные у того же пациента. В одном варианте осуществления определено, что пациент страдает от таупатии, если значение, связанное с p217+ тау-пептидами в биологической пробе, взятой у пациента, например количество длинных или коротких p217+ тау-пептидов, или отношение, связанное с p217+ тау-пептидами, например отношение количества коротких p217+ тау-пептидов к количеству длинных p217+ тау-пептидов, существенно превышает соответствующее исходное значение. В настоящем документе термин «значительно превышает» относится к значению, не только случайно превышающему статистически значимое, и значение  $p$  для которого равно 0,05 или меньше. «Значительно превышает» может представлять собой превышение по меньшей мере на около 1%, 2%, 5% или 10%, чем у здоровых добровольцев, при значении  $p$  менее 0,05, 0,04, 0,03, 0,01, 0,005, 0,001 и т. д.

**[00127]** В одном варианте осуществления способ изобретения включает (i) приведение в контакт биологической пробы, предпочтительно пробы CSF, с захватным антителом, направленным против эпитопа, содержащего фосфорилированный p217+ тау-белок, для захвата p217+ тау-пептидов в пробе, (ii) приведение в контакт захваченных p217+ тау-пептидов с детекторным антителом, направленным против эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 7-20 с измерением таким образом количества длинных p217+ тау-пептидов, и/или с детекторным антителом, направленным против эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 119-126 тау-белка, с измерением таким образом количества длинных и коротких p217+ тау-пептидов в пробе, и (iii) определение, имеется ли у пациента таупатия или риск развития таупатии на основе этого количества p217+ тау-пептидов или отношения количества коротких p217+ тау-пептидов к количеству длинных p217+ тау-пептидов. Диагностика может быть выполнена путем

сравнения количества или концентрации p217+ тау-пептидов в пробе, взятой у пациента, с соответствующими исходными значениями. Диагностика может также быть выполнена путем сравнения соотношения количества коротких p217+ тау-пептидов и количества длинных p217+ тау-пептидов в пробе, взятой у пациента, с соответствующими исходными значениями.

**[00128]** В другом варианте осуществления способ изобретения включает (i) приведение в контакт биологической пробы, предпочтительно пробы CSF, с захватным антителом, направленным против эпитопа p217+ тау-белка для захвата p217+ тау-пептидов в пробе, или с не зависящим от фосфорилирования захватным антителом, направленным против эпитопа тау-белка между аминокислотами 150 и 250 тау-белка, для захвата общих тау-пептидов в пробе, (ii) приведение захваченных p217+ тау-пептидов или захваченных общих тау-пептидов в контакт с детекторным антителом, направленным против эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 116-127 тау-белка, с измерением таким образом количества длинных и коротких p217+ тау-пептидов, или количества общих коротких тау-пептидов в пробе, и (iii) определение, имеется ли у пациента таупатия или риск развития таупатии на основании этого количества или отношения количества коротких p217+ тау-пептидов к количеству общих коротких тау-пептидов в биологической пробе. Диагностика может быть выполнена путем сравнения соотношения количества коротких p217+ тау-пептидов и количества коротких общих тау-пептидов, содержащих ту же область белка тау-белка, что и распознаваемая антителом pT3, т. е. аминокислот 211-221 тау-белка, в пробе, взятой у пациента, с соответствующими исходными значениями.

**[00129]** В другом варианте осуществления способ изобретения включает (i) приведение в контакт биологической пробы, предпочтительно пробы CSF, с захватным антителом, направленным против эпитопа p217+ тау-белка, для захвата p217+ тау-пептидов в пробе, (ii) приведение в контакт захваченных p217+ тау-пептидов с детекторным антителом, направленным против эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 7-20, с измерением таким образом количества длинных p217+ тау-пептидов, и/или с детекторным антителом, направленным против эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 116-127 тау-белка, с измерением таким образом количества длинных и коротких p217+ тау-пептидов в пробе, и (iii) определение эффективности лечения пациента на основании этого количества p217+ тау-пептидов или отношения количества коротких p217+ тау-пептидов к количеству длинных p217+ тау-пептидов.

**[00130]** В еще одном варианте осуществления способ изобретения включает (i) приведение в контакт биологической пробы, предпочтительно пробы CSF, с захватным антителом, направленным против эпитопа p217+ тау-белка для захвата p217+ тау-пептидов в пробе, или с не зависящим от фосфорилирования захватным антителом, направленным против эпитопа тау-белка между аминокислотами 150 и 250 тау-белка, для захвата общих тау-пептидов в пробе, (ii) приведение захваченных p217+ тау-пептидов, или захваченных общих тау-пептидов в контакт с детекторным антителом, направленным

против эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 116-127 тау-белка, с измерением таким образом количества длинных и коротких p217+ тау-пептидов, или количества общих коротких тау-пептидов в пробе, и (iii) определение эффективности лечения пациента на основе этого количества или отношения количества коротких p217+ тау-пептидов к количеству общих коротких тау-пептидов в биологической пробе.

**[00131]** В еще одном варианте осуществления эффективность лечения пациента определяют путем отслеживания количества p217+ тау-пептидов, отношения количества коротких p217+ тау-пептидов к количеству длинных p217+ тау-пептидов или отношения количества коротких p217+ тау-пептидов к количеству общих коротких тау-пептидов до, во время или после лечения. Уменьшение значений по сравнению с базовыми значениями указывает на положительный ответ на лечение. В биологических жидкостях значения могут также временно возрастать при выводе патологического тау-белка из мозга.

**[00132]** В соответствии с конкретным аспектом таупатия включает в себя, без ограничений, одно или более состояний, выбранных из группы, состоящей из болезни Альцгеймера (включая семейную болезнь Альцгеймера и спорадическую болезнь Альцгеймера), лобно-височной деменции с паркинсонизмом, связанной с хромосомой 17 (FTDP-17), прогрессирующего супрануклеарного пареза зрения, кортикобазальной дегенерации, болезни Пика, прогрессирующего субкортикального глиоза, деменции с преобладанием нейрофибриллярных клубков, диффузных нейрофибриллярных клубков с кальцификацией, деменции с аргирофильными зернами, комплекса амиотрофического бокового склероза - паркинсонизма - деменции, синдрома Дауна, болезни Герстманна - Штреусслера - Шейнкера, болезни Галлервордена - Шпатца, миозита с тельцами включения, болезни Крейтцфельда - Якоба, множественной системной атрофии, болезни Ниманна - Пика типа С, прионной церебральной амилоидной ангиопатии, подострого склерозирующего панэнцефалита, миотонической дистрофии, негуамской мотонейронной болезни с нейрофибриллярными клубками, постэнцефалитного паркинсонизма, хронической травматической энцефалопатии и dementia pugilistica (деменции боксеров).

**[00133]** Таупатия предпочтительно представляет собой болезнь Альцгеймера (включая семейную болезнь Альцгеймера и спорадическую болезнь Альцгеймера), FTDP-17 и прогрессирующий супрануклеарный парез зрения.

**[00134]** Наиболее предпочтительно таупатия представляет собой болезнь Альцгеймера (включая семейную болезнь Альцгеймера и спорадическую болезнь Альцгеймера).

**[00135]** В соответствии с одним вариантом осуществления способ изобретения включает (i) приведение в контакт биологической пробы, предпочтительно пробы CSF, с захватным антителом, направленным против эпитопа p217+ тау-белка, для захвата p217+ тау-пептидов в пробе, (ii) приведение в контакт захваченных p217+ тау-пептидов с детекторным антителом, направленным против эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 7-20, с измерением таким образом количества длинных p217+ тау-пептидов, и/или с детекторным антителом, направленным против эпитопа, содержащего аминокислотные

остатки 116-127 тау-белка, с измерением таким образом количества длинных и коротких p217+ тау-пептидов в пробе, и (iii) определение, подходит ли пациент для терапии антителом к p217+ тау-белку на основе количества p217+ тау-пептидов или отношения количества коротких p217+ тау-пептидов к количеству длинных p217+ тау-пептидов.

**[00136]** В соответствии с конкретным аспектом определено, что пациент подходит для терапии антителом к p217+ тау-белку, если количество p217+ тау-пептидов в биологической пробе или отношение количества коротких p217+ тау-пептидов к количеству длинных p217+ тау-пептидов в биологической пробе значительно выше соответствующего исходного значения.

**[00137]** В соответствии с другим конкретным аспектом способ изобретения включает (i) приведение в контакт биологической пробы, предпочтительно пробы CSF, с захватным антителом, направленным против эпитопа p217+ тау-белка, для захвата p217+ тау-пептидов в пробе, или с не зависящим от фосфорилирования захватным антителом, направленным против эпитопа тау-белка между аминокислотами 150 и 250 тау-белка, для захвата общих тау-пептидов в пробе, (ii) приведение захваченных p217+ тау-пептидов или захваченных общих тау-пептидов в контакт с детекторным антителом, направленным против эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 116-127 тау-белка, с измерением таким образом количества длинных и коротких p217+ тау-пептидов или количества общих коротких тау-пептидов в пробе, и (iii) определение, подходит ли пациент для терапии антителами к p217+ тау-белку на основании этого количества или отношения количества коротких p217+ тау-пептидов к количеству общих коротких тау-пептидов в биологической пробе.

**[00138]** В соответствии с одним вариантом осуществления определено, что пациент подходит для терапии антителом к p217+ тау-белку, если отношение количества коротких p217+ тау-пептидов к количеству общих коротких тау-пептидов значительно превышает соответствующее исходное значение.

**[00139]** Изобретение также относится к измерению количества p217+ тау-белка, который находится в комплексе с антителом в биологической пробе, а также количества свободного, не связанного с антителом тау-белка p217+ в пробе. В одном варианте осуществления общие антитела захватывают с использованием методов аффинной обработки с последующим применением денатурирующих условий, в том числе хаотропов, тепловой инактивации или других способов разрушения белка. Тау-белок p217+ отделяют от антитела с помощью системы офВЭЖХ и измеряют с использованием способов изобретения, что позволяет провести количественную оценку связанного с антителом p217+ тау-белка.

**[00140]** В соответствии с общим аспектом изобретение относится к способу контроля лечения антителом к p217+ тау-белку у пациента, при этом способ включает в себя этапы, на которых: (i) получают биологическую пробу от пациента, (ii) разделяют биологическую пробу на обогащенную IgG пробу, содержащую связанный с антителом p217+ тау-белок, и обедненную IgG пробу, содержащую не связанный с антителом p217+

тау-белок, (iii) очищают p217+ тау-белок от IgG методом офВЭЖХ с получением пробы не связанного с антителом p217+ тау-белка, (iv) приводят обогащенную IgG пробу и пробу не связанного с антителом p217+ тау-белка в контакт с захватным антителом, направленным против эпитопа p217+ тау-белка, для захвата p217+ тау-пептидов в каждой из проб, (v) приводят захваченные p217+ тау-пептиды в каждой пробе в контакт с детекторным антителом, направленным против эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 7-20, с измерением таким образом количества длинных p217+ тау-пептидов, с детекторным антителом, направленным против эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 116-127, с измерением таким образом количества длинных и коротких p217+ тау-пептидов в каждой из проб, (vi) вычисляют отношение количества связанного с антителом p217+ тау-белка к количеству не связанного с антителом p217+ тау-белка и (vii) контролируют лечение пациента антителом к p217+ тау-белку на основе вычисленного отношения.

**[00141]** В соответствии с другим общим аспектом изобретение относится к способу контроля лечения антителом к p217+ тау-белку у пациента, при этом способ включает в себя этапы, на которых: (i) получают биологическую пробу от пациента, (ii) получают полуденатурированную пробу из биологической пробы, содержащей общий p217+ тау-белок, и получают неденатурированную пробу из биологической пробы, содержащей не связанный с антителом p217+ тау-белок, причем полуденатурированную пробу нагревают для денатурирования антител в пробе, (iii) приводят полуденатурированную пробу и неденатурированную пробу в контакт с захватным антителом, направленным против эпитопа p217+ тау-белка, для захвата p217+ тау-пептидов в каждой из проб, (iv) приводят захваченные p217+ тау-пептиды в каждой пробе в контакт с детекторным антителом, направленным против эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 7-20, с измерением таким образом количества длинных p217+ тау-пептидов, или с детекторным антителом, направленным против эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 116-127, с измерением таким образом количества длинных и коротких p217+ тау-пептидов в каждой из проб, (v) вычисляют отношение количества связанного с антителом p217+ тау-белка путем вычитания количества не связанного с антителом p217+ тау-белка из общего количества p217+ тау-белка, (vi) вычисляют отношение связанного с антителом p217+ тау-белка к количеству не связанного с антителом p217+ тау-белка и (vii) контролируют лечение пациента антителом к p217+ тау-белку на основе вычисленного отношения.

**[00142]** В соответствии с конкретным аспектом эффективность лечения пациента определяют путем отслеживания количества связанных с антителом и не связанных с антителом p217+ тау-пептидов до, во время или после лечения. Уменьшение количества не связанного с антителом p217+ тау-белка относительно исходного уровня или увеличение количества связанного с антителом p217+ тау-белка относительно исходного уровня и, следовательно, увеличение отношения количества связанного с антителом p217+ тау-белка к количеству не связанного с антителом p217+ тау-белка относительно исходного уровня сигнализирует о положительном ответе на лечение. Количество не

связанного с антителом p217+ тау-белка может также временно увеличиваться в биологических текучих средах по мере выведения патологического тау-белка из головного мозга.

**[00143]** В соответствии с конкретными аспектами захватное антитело способов изобретения конъюгировано с гранулами, такими как магнитные гранулы. В соответствии с другими конкретными аспектами детекторное антитело является биотинилированным.

**[00144]** В соответствии с некоторыми аспектами количество p217+ тау-пептидов, измеренное в способах изобретения, можно определять с использованием любых приемлемых способов, известных в данной области, включая твердофазный ИФА и платформу с одномолекулярными матрицами. В соответствии с конкретными аспектами в способах изобретения для измерения количества p217+ тау-пептидов в пробе применяют высокочувствительную матричную платформу, такую как Quanterix Simoa или MSD S-plex. В соответствии с конкретным аспектом нижний предел количественного определения у способов изобретения составляет около 40 фг/мл, а нижний предел обнаружения у способа составляет около 2 фг/мл.

**[00145]** В соответствии с конкретным аспектом проба, используемая в способах изобретения, представляет собой биологическую пробу, такую как проба крови, гомогената головного мозга или спинномозговой жидкости (CSF). Проба предпочтительно представляет собой пробу CSF. В соответствии с конкретным аспектом проба представляет собой неочищенную пробу CSF. В соответствии с другим конкретным аспектом пробу получают после фракционирования биологической пробы, такого как CSF, с использованием обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии (офВЭЖХ), которая разделяет полноразмерный тау-белок и имеющие различные размеры фрагменты тау-белка.

**[00146]** В соответствии с конкретным аспектом захватное антитело по способам изобретения содержит участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 32, 33 и 34, и участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 35, 36 и 37. Захватное антитело предпочтительно представляет собой антитело pT3, содержащее переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 28, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 29.

**[00147]** В соответствии с конкретным аспектом детекторное антитело по способам изобретения содержит участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 2, 3 и 4; и участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 5, 6 и 7. Детекторное антитело предпочтительно представляет собой антитело pT82, содержащее переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ

ID NO: 8, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 9.

**[00148]** В соответствии с другим конкретным аспектом детекторное антитело по способам изобретения содержит участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 12, 13 и 14; и участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 15, 16 и 17. Детекторное антитело предпочтительно представляет собой антитело hT43, содержащее переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 18, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 19.

#### **[00149] Наборы**

**[00150]** В другом общем аспекте изобретение относится к набору, содержащему (a) захватное антитело, направленное против эпитопа p217+ тау-белка, необязательно не зависящее от фосфорилирования захватное антитело, направленное против эпитопа тау-белка между аминокислотами 150 и 250 тау-белка, и (b) по меньшей мере одно детекторное антитело, направленное против эпитопа тау-белка, содержащего аминокислотные остатки от 7-20 или 116-127 тау-белка. Набор используют для измерения количества p217+ тау-пептидов, используемого при расчете отношения количества коротких p217+ тау-пептидов к количеству длинных p217+ тау-пептидов и/или отношения количества коротких p217+ тау-пептидов к количеству общих коротких тау-пептидов в пробе.

**[00151]** Детекторное антитело может содержать любую обнаруживаемую метку (например, флуоресцентную молекулу, биотин и т. п.), обнаруживаемую непосредственно или обнаруживаемую посредством вторичной реакции (например, реакции с стрептавидином). В альтернативном варианте осуществления можно использовать второй реагент, содержащий обнаруживаемую метку, причем второй реагент имеет специфичность связывания с первичным антителом. В диагностическом наборе, приемлемом для измерения p217+ тау-белка в биологической пробе, антитела комплекта могут быть поставлены предварительно связанными с твердой фазой, например с лунками микротитровального планшета или гранулами.

**[00152]** В соответствии с конкретным аспектом захватное антитело в наборе изобретения содержит участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 32, 33 и 34, и участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 35, 36 и 37. Захватное антитело предпочтительно представляет собой антитело pT3, содержащее переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 28, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 29.

**[00153]** В соответствии с конкретным аспектом детекторное антитело в наборе изобретения содержит участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 2, 3 и 4; и участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 5, 6 и 7. Детекторное антитело предпочтительно представляет собой антитело pT82, содержащее переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 8, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 9.

**[00154]** В соответствии с другим конкретным аспектом детекторное антитело в наборе изобретения содержит участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 12, 13 и 14; и участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 15, 16 и 17. Детекторное антитело предпочтительно представляет собой антитело hT43, содержащее переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 18, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 19.

**[00155]** В соответствии с еще одним конкретным аспектом набор изобретения используют для измерения количества p217+ тау-пептидов, отношения количества коротких p217+ тау-пептидов к количеству длинных p217+ тау-пептидов и/или отношения количества коротких p217+ тау-пептидов к количеству общих коротких тау-пептидов в пробе с использованием способа изобретения.

**[00156]** Содержание всех указанных ссылок (в том числе ссылок на литературу, выданные патенты, опубликованные патентные заявки и одновременно находящиеся на рассмотрении патентные заявки), упомянутых в настоящей заявке, явным образом полностью включено в настоящий документ путем ссылки.

#### **ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ**

**[00157]** В изобретении также предложены следующие не имеющие ограничительного характера варианты осуществления.

**[00158]** Вариант осуществления 1 представляет собой способ измерения количества p217+ тау-пептидов в пробе, включающий:

(i) приведение пробы в контакт с захватным антителом, направленным против эпитопа p217+ тау-белка, для захвата p217+ тау-пептидов в пробе и

(ii) приведение захваченных p217+ тау-пептидов в контакт с детекторным антителом, направленным против эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 119-126, например аминокислотные остатки 116-127, тау-белка, или эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 7-20 тау-белка, с измерением таким образом соответственно количества p217+ тау-пептидов или количества длинных p217+ тау-пептидов.

**[00159]** Вариант осуществления 2 представляет собой способ определения



относительного количества длинных p217+ тау-пептидов или коротких фрагментов p217+ тау-пептидов в пробе, включающий:

(i) приведение пробы в контакт с захватным антителом, направленным против эпитопа p217+ тау-белка, для захвата p217+ тау-пептидов в пробе,

(ii) приведение захваченных p217+ тау-пептидов в контакт с первым детекторным антителом, направленным против эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 119-126 тау-белка, с измерением таким образом количества p217+ тау-пептидов,

(iii) приведение захваченных p217+ тау-пептидов в контакт со вторым детекторным антителом, направленным против эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 7-20 тау-белка, с измерением таким образом количества длинных p217+ тау-пептидов и

(iv) определение относительного количества длинных p217+ тау-пептидов или коротких p217+ тау-пептидов на основе количества p217+ тау-пептидов и количества длинных p217+ тау-пептидов.

**[00160]** Вариант осуществления 3 представляет собой способ по варианту осуществления 1 или 2, причем захватное антитело конъюгировано с гранулой, и при этом детекторное антитело биотинилировано.

**[00161]** Вариант осуществления 4 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 1-3, причем количество p217+ тау-пептидов в пробе измеряют с использованием высокочувствительной платформы.

**[00162]** Вариант осуществления 5 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 1-4, причем нижний предел количественного определения способа составляет около 40 фг/мл для p217+ тау-пептидов, а нижний предел обнаружения способа составляет около 2 фг/мл для p217+ тау-пептидов.

**[00163]** Вариант осуществления 6 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 1-5, причем проба представляет собой биологическую пробу, предпочтительно пробу CSF, взятую от пациента, и способ дополнительно включает определение, имеется ли у пациента таупатия или риск развития таупатии на основании количества p217+ тау-пептидов, отношения количества коротких p217+ тау-пептидов к количеству длинных p217+ тау-пептидов, или отношения количества коротких p217+ тау-пептидов к количеству общих коротких тау-пептидов в биологической пробе.

**[00164]** Вариант осуществления 7 представляет собой способ по варианту осуществления 6, в котором определяют, что у пациента имеется таупатия или риск развития таупатии, если количество p217+ тау-пептидов в биологической пробе, отношение количества коротких p217+ тау-пептидов к количеству длинных p217+ тау-пептидов или отношение количества коротких p217+ тау-пептидов к количеству общих коротких тау-пептидов существенно выше, чем соответствующее исходное значение, например соответствующее среднее значение у здоровых добровольцев.

**[00165]** Вариант осуществления 8 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 1-5, причем проба представляет собой биологическую пробу, предпочтительно пробу CSF, взятую от пациента, получающего лечение от таупатии, и

способ дополнительно включает определение эффективности лечения пациента на основе количества p217+ тау-пептидов, отношения количества коротких p217+ тау-пептидов к количеству длинных p217+ тау-пептидов или отношения количества коротких p217+ тау-пептидов к количеству общих коротких тау-пептидов в биологической пробе.

**[00166]** Вариант осуществления 9 представляет собой способ по варианту осуществления 8, причем лечение считают эффективным, если количество p217+ тау-пептидов в биологической пробе снижается в течение курса лечения.

**[00167]** Вариант осуществления 10 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 6-9, причем таупатия выбрана из группы, состоящей из болезни Альцгеймера (включая семейную болезнь Альцгеймера и спорадическую болезнь Альцгеймера), лобно-височной деменции с паркинсонизмом, связанной с хромосомой 17 (FTDP-17), прогрессирующего супрануклеарного пареза взора, кортикобазальной дегенерации, болезни Пика, прогрессирующего субкортикального глиоза, деменции с преобладанием нейрофибриллярных клубков, диффузных нейрофибриллярных клубков с кальцификацией, деменции с аргирофильными зернами, комплекса амиотрофический боковой склероз - паркинсонизм - деменция, синдрома Дауна, болезни Герстманна - Штреусслера - Шейнкера, болезнь Галлервордена - Шпатца, миозита с тельцами включения, болезни Крейтцфельда - Якоба, множественной системной атрофии, болезни Ниманна - Пика типа С, прионной церебральной амилоидной ангиопатии, подострого склерозирующего панэнцефалита, миотонической дистрофии, негуамской мотонейронной болезни с нейрофибриллярными клубками, постэнцефалитного паркинсонизма, хронической травматической энцефалопатии и *dementia pugilistica* (деменции боксеров).

**[00168]** Вариант осуществления 11 представляет собой способ по варианту осуществления 10, в котором таупатия представляет собой болезнь Альцгеймера.

**[00169]** Вариант осуществления 12 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 1-5, причем проба представляет собой биологическую пробу, предпочтительно пробу CSF, взятую от человеческого индивида, и способ дополнительно включает определение, подходит ли пациент для терапии антителом к p217+ тау-белку на основании количества p217+тау-пептидов, отношения количества коротких p217+ тау-пептидов к количеству длинных p217+ тау-пептидов или отношения количества коротких p217+ тау-пептидов к количеству общих коротких тау-пептидов в биологической пробе.

**[00170]** Вариант осуществления 13 представляет собой способ по варианту осуществления 12, в котором определяют, что пациент подходит для терапии антителом к p217+ тау-белку, если количество p217+ тау-пептидов в биологической пробе, отношение количества коротких p217+ тау-пептидов к количеству длинных p217+ тау-пептидов или отношение количества коротких p217+ тау-пептидов к количеству общих коротких тау-пептидов существенно выше, чем соответствующее исходное значение, например соответствующее среднее значение у здоровых добровольцев.

**[00171]** Вариант осуществления 14 представляет собой способ контроля лечения антителом к p217+ тау-белку у пациента, при этом способ включает в себя этапы, на

которых:

- i. получают биологическую пробу от пациента,
- ii. разделяют биологическую пробу на обогащенную IgG пробу, содержащую связанный с антителом p217+ тау-белок, и обедненную IgG пробу, содержащую не связанный с антителом p217+ тау-белок,
- iii. приводят в контакт каждую из обогащенной IgG пробы и обедненной IgG пробы с захватным антителом, направленным против эпитопа, содержащего фосфорилированный по T212 и/или фосфорилированный по T217 тау-белок, для захвата p217+ тау-пептидов в каждой из проб,
- iv. приводят захваченные p217+ тау-пептиды в контакт с детекторным антителом, направленным против эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 7-20 или 116-127 тау-белка, с измерением таким образом количества связанного с антителом p217+ тау-белка и количества не связанного с антителом p217+ тау-белка в биологической пробе,
- v. вычисляют отношение количества связанного с антителом p217+ тау-белка к количеству не связанного с антителом p217+ тау-белка и
- vi. контролируют лечение пациента антителом к 217+ тау-белку на основании рассчитанного соотношения.

**[00172]** Вариант осуществления 15 представляет собой способ контроля лечения антителом к p217+ тау-белку у пациента, при этом способ включает в себя этапы, на которых:

- i. получают биологическую пробу от пациента,
- ii. получают полуденатурированную пробу из биологической пробы, содержащей общий p217+ тау-белок, и получают неденатурированную пробу из биологической пробы, содержащей не связанный с антителом p217+ тау-белок, причем полуденатурированную пробу нагревают для денатурации антител в пробе,
- iii. приводят в контакт полуденатурированную пробу и неденатурированную пробу с захватным антителом, направленным против эпитопа, содержащего фосфорилированный по T212 и/или фосфорилированный по T217 тау-белок, для захвата p217+ тау-пептидов в каждой из проб,
- iv. приводят захваченные p217+ тау-пептиды в контакт с детекторным антителом, направленным против эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 7-20 или 116-127 тау-белка, с измерением таким образом количества общего p217+ тау-белка и количества не связанного с антителом p217+ тау-белка в биологической пробе,
- v. вычисляют количество связанного с антителом p217+ тау-белка в пробе путем вычитания количества не связанного с антителом p217+ тау-белка из количества общего p217+ тау-белка,
- vi. вычисляют отношение количества связанного с антителом p217+ тау-белка к количеству не связанного с антителом p217+ тау-белка и
- vii. контролируют лечение пациента антителом к 217+ тау-белку на основании рассчитанного соотношения.

**[00173]** Вариант осуществления 16 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 1-15, причем захватное антитело содержит участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 32, 33 и 34, и участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 35, 36 и 37; причем захватное антитело предпочтительно имеет переменную область тяжелой цепи, содержащую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 28, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 29.

**[00174]** Вариант осуществления 17 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 1-16, причем детекторное антитело содержит участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 2, 3 и 4; и участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 5, 6 и 7; причем детекторное антитело предпочтительно содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 8, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 9.

**[00175]** Вариант осуществления 18 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 1-16, причем детекторное антитело содержит участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 12, 13 и 14; и участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 15, 16 и 17; причем детекторное антитело предпочтительно содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 18, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 19.

**[00176]** Вариант осуществления 19 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 1-18, причем проба представляет собой пробу крови, гомогената головного мозга или спинномозговой жидкости (CSF).

**[00177]** Вариант осуществления 20 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 1-19, причем пробу получают после фракционирования биологической пробы с использованием обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии (офВЭЖХ).

**[00178]** Вариант осуществления 21 представляет собой выделенное детекторное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с тау-белком в эпителии, содержащем аминокислотные остатки 116-127 тау-белка, содержащее:

- a. участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 2, 3 и 4; и
- b. участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие

соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 5, 6 и 7.

**[00179]** Вариант осуществления 22 представляет собой выделенное детекторное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 21, содержащее переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 8, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 9 (предпочтительно).

**[00180]** Вариант осуществления 23 представляет собой выделенное детекторное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с тау-белком в эпитопе, содержащем аминокислотные остатки 7-20 тау-белка, содержащее:

а. участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 12, 13 и 14; и

б. участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 15, 16 и 17.

**[00181]** Вариант осуществления 24 представляет собой выделенное детекторное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 23, содержащее переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 18, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 19 (предпочтительно).

**[00182]** Вариант осуществления 25 представляет собой выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую детекторное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 21-24.

**[00183]** Вариант осуществления 26 представляет собой вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 25.

**[00184]** Вариант осуществления 27 представляет собой клетку-хозяина, содержащую нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 25.

**[00185]** Вариант осуществления 28 представляет собой способ получения детекторного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления 21-24, включающий культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело или антигенсвязывающий фрагмент, в условиях, обеспечивающих получение антитела или антигенсвязывающего фрагмента и извлечение антитела или антигенсвязывающего фрагмента из клетки или клеточной культуры.

**[00186]** Вариант осуществления 29 представляет собой набор, содержащий:

а. захватное антитело, направленное против фосфорилированного по одному или множеству сайтов эпитопа тау-белка, содержащего фосфорилированный T212 и/или фосфорилированный T217 тау-белка, и

б. детекторное антитело, направленное против эпитопа тау-белка, содержащего аминокислотные остатки 7-20 или 116-127 тау-белка;

причем набор применяют для измерения количества p217+ тау-пептидов в пробе.

**[00187]** Вариант осуществления 30 представляет собой набор по варианту осуществления 29, причем захватное антитело содержит участки HCDR1, HCDR2 и

HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 32, 33 и 34, и участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 35, 36 и 37; причем захватное антитело предпочтительно имеет переменную область тяжелой цепи, содержащую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 28, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 29.

**[00188]** Вариант осуществления 31 представляет собой набор по варианту осуществления 29 или 30, причем детекторное антитело представляет собой выделенное детекторное антитело по любому из вариантов осуществления 20-23.

### **ПРИМЕРЫ**

**[00189]** Для дополнительной иллюстрации характера изобретения предложены следующие примеры изобретения. Следует понимать, что следующие примеры не ограничивают изобретение и что объем изобретения определен прилагаемыми пунктами формулы изобретения.

**[00190] Пример 1. Высокочувствительный анализ для обнаружения p217+ тау-белка**

**[00191]** Представлены следующие специфические реагенты для анализа: набор Simoa Homebrew (Quanterix, кат. № 101351), вспомогательные гранулы (Quanterix, кат. № 101732), мышинные моноклональные антитела pT3 (mAb), mAb hT43, mAb pT82 и mAb hT7. pT3 представляет собой исходное антитело, разработанное в Janssen, которое распознает p217+ тау-белок, а его гуманизованное производное в настоящем документе называется гуманизованным mAb pT3.

**[00192]** пробы разводили в 50 mM Tris, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2%-ом бычьим сывороточным альбумине, 0,1% Tween 20, 0,05% ProClin 300, pH 7,8.

**[00193]** Для калибровки анализа использовали три пептида, специально изготовленных компанией New England Peptide (калибровочные пептиды).

**[00194]** Пептид pT3xhT43 содержит эпитопы hT43, pT51 и pT3, соединенные PEG4 линкерами, и имеет молекулярную массу 6893 г/моль. Аминокислотная последовательность пептида pT3xhT43 представляет собой PRQEFVMEHDHAGTYGLGDR(dPEG4)GKTKIATPRGAAPPQKG(dPEG4)GSRSR(pT)PSLP(pT)PPTREPKKV-амид (SEQ ID NO: 22).

**[00195]** Пептид pT3xpT82 содержит эпитопы pT82 и pT3, соединенные PEG4 линкером, и имеет молекулярную массу 4551 г/моль. Аминокислотная последовательность пептида pT3xpT82 представляет собой Ac-SLEDEAAGHVTQARMVSK(dPEG4)GSRSR(pT)PSLP(pT)PPTREPKKV-амид (SEQ ID NO: 23).

**[00196]** Пептид hT7xpT82 содержит эпитопы pT82 и hT7, соединенные PEG4 линкером, и имеет молекулярную массу 3619 г/моль. Аминокислотная последовательность пептида hT7xpT82 представляет собой Ac-

SLEDEAAGHVVTQARMVSK(dPEG4)PRGAAPPQKQANA-амид (SEQ ID NO: 24).

**[00197]** *Подготовка реагентов*

**[00198]** Захватывающие гранулы покрывали 0,3 мг/мл иммобилизующего Ат в соответствии с протоколом, представленным в руководстве Quanterix. Захватывающие гранулы с покрытием разводили в буфере разбавителя гранул до 200 000 гранул/мл и добавляли 200 000 гранул/мл вспомогательных гранул так, чтобы общая концентрация гранул составляла 400 000 гранул/мл.

**[00199]** Детекторные антитела биотинилировали при 60x в соответствии с протоколом, приведенным в руководстве Quanterix, и разводили в разбавителе для детектора/пробы Homebrew до 1,8 мкг/мл.

**[00200]** Калибровочные пептиды разводили до концентрации 5 мг/мл в 0,1% смеси фосфорной кислоты и воды, разделяли на аликвоты по 20 мкл и замораживали. При готовности к применению аликвоты калибровочных пептидов размораживали и разбавляли в соотношении 1 : 1000 (например, 1,5 мкл в 1498,5 мкл), и этот раствор разводили 1 : 1000 таким образом, чтобы конечная концентрация пептидов составляла 5000 пг/мл. Строили стандартную кривую с 3х разведениями, начиная с 30 пг/мл.

**[00201]** Пробы CSF разводили по меньшей мере 1 : 4 в разбавителе для проб. Пробы здоровых добровольцев (HV) разводили 1 : 5 или 1 : 10, а пробы от больных БА разводили по меньшей мере 1 : 20.

**[00202]** *Анализ Simoa*

**[00203]** Был создан специализированный анализ Simoa, включающий двухэтапный протокол, включающий инкубацию 35 минут захватных Ат, пробы и детекторных Ат, промывку, а затем 5 минут стрептавидин-β-галактозидазой (SBG). Каждая реакционная смесь содержала 25 мкл раствора гранул, 100 мкл пробы или калибровочных пептидов, 20 мкл детекторного раствора, 100 мкл SBG. Антителам присваивали имена, и за один раз можно было загрузить до пяти захватных антител и пяти детекторных антител. Реакции проводили в кюветах Simoa с помощью прибора, промывали последний раз и загружали в измерительные диски с субстратом β-галактозидазы (RGP), после чего проводили измерения прибором.

**[00204]** **Пример 2. Разделение нативных фрагментов тау-белка на офВЭЖХ**

**[00205]** Использовали следующие реактивы: трифторуксусная кислота (для ВЭЖХ), вода (для ВЭЖХ), ацетонитрил (для ВЭЖХ), фосфорная кислота (аналитический класс) и бинарную градиентную систему для ВЭЖХ, буфер для иммунологического анализа (100 мм TrisHCl, 100 мм NaCl, 0,05% Tween и BSA, pH 7,8).

**[00206]** Использовали следующий протокол: 500 мкл замороженной CSF размораживали на льду в течение 30 мин. Размороженный CSF добавляли в 1,5 мл 100 мМ раствора фосфата натрия, pH 2,5, содержащего 100 мМ хлорида натрия, и перемешивали. 1,8 мл полученной смеси наносили на колонку C18 или аналогичную колонку для обращенно-фазной хроматографии, уравновешенную в 0,1%-ом растворе трифторуксусной кислоты в воде. Впоследствии колонку для ВЭЖХ проявляли в

увеличивающемся градиенте ацетонитрила. Во время элюирования собирали фракции. Фракции доводили до концентрации 10 мМ в гуанидин-НСl и впоследствии высушивали в вакуумном концентраторе. Высушенные фракции ресуспендировали в буферном растворе для иммуноанализа и подвергали измерению тау-пептида в фракции на основе захвата парой из захватного и детекторного антитела к тау-белку изобретения.

**[00207] Пример 3. Количественное определение p217+ тау-белка, не связанного или связанного с антителами**

**[00208]** При использовании дополнительных предварительных манипуляций с пробами, высокочувствительные анализы на основе рТЗ можно применять для измерения связывания p217+ тау-белка с антителами, которые либо вырабатываются в организме пациента, либо их вводят экзогенно, например, гуманизированными с рТЗ mAb. Этот способ можно использовать в качестве анализа фармакодинамики для изучения терапевтических антител к p217+ тау-белку, таких как гуманизированное mAb рТЗ. Например, для измерения связанного и не связанного с антителом p217+ тау-белка можно использовать следующие способы.

**[00209]** *Анализ 1. Количественное определение свободного и связанного p217+ тау-белка в биологических текучих средах с использованием иммунозахвата/обеднения с последующей офВЭЖХ*

**[00210]** Биологическую текучую среду (например, CSF) инкубировали с покрытыми белком A/G магнитными гранулами (15 мкл суспензии гранул на 0,5 мл CSF) в течение 2 часов с качанием при комнатной температуре для захвата иммуноглобулинов пробы. Гранулы осаждали магнитом и переносили супернатант во вторую пробирку (проба = «супернатант, обедненный IgG»). Гранулы промывали 4×1 мл холодного фосфатно-солевого буферного раствора (PBS). Впоследствии в пробирки, содержащие (а) промытые гранулы и (b) супернатант, обедненный IgG, добавляли 0,5 мл 6M GuHCl и инкубировали пробирки в течение 20 минут при комнатной температуре. Гранулы впоследствии осаждали магнитом и переносили полученный супернатант в третью пробирку (проба = «супернатант с концентрированным IgG»). Наконец, к этим двум растворам добавляли 0,1 М фосфорную кислоту (рН 2) (к денатурированному супернатанту, обедненному IgG, добавляли 1,0 мл фосфорной кислоты, а к супернатанту с концентрированным IgG добавляли 1,5 мл фосфорной кислоты, с получением конечного объема 2,0 мл) перед разделением с помощью офВЭЖХ, как описано в примере 2. Полученные фракции офВЭЖХ разводили, как описано в примере 2, и измеряли с использованием анализов Simoa на p217+ тау-белок из примера 1. Сигнал от супернатанта, обедненного IgG, представляет свободный p217+ тау-белок (т. е. не связанный с антителами), тогда как сигнал от супернатанта с концентрированным IgG представляет связанный p217+ тау-белок (т. е. связанный с антителами, такими как гуманизированное mAb рТЗ). Для оценки сигнала общего p217+ тау-белка в качестве контрольного образца или нормализатора для измерений свободных и связанных белков, одновременно анализировали ту же исходную биологическую текучую среду (например,



CSF), не подвергаемую иммунному захвату/обеднению, используя методы разделения офВЭЖХ и измерения Simoa p217+.

**[00211]** *Анализ 2. Количественное определение свободного и связанного p217+ тау-белка в биологических текучих средах с использованием термической денатурации антител*

**[00212]** Аликвоту интересующей биологической жидкости (например, CSF) нагревали при 95 °С в течение 4 минут с последующим охлаждением на водном льду в течение 4 минут (проба = «полуденатурированная текучая среда»). Параллельно вторую аликвоту той же жидкости охлаждали на водном льду в течение 8 минут (проба = «неденатурированная текучая среда»). Впоследствии в обеих пробах проводили измерения с использованием анализов Simoa на p217+ тау-белок из примера 1. Сигнал от полуденатурированной текучей среды представляет общее количество p217+ тау-белка, тогда как сигнал от неденатурированной текучей среды представляет собой свободный тау-белок p217+. Посредством вычитания последнего из первого получают измерение связанного тау-белка. Было определено точное время нагревания и температура, необходимые для необратимого изменения любых антител в текучей среде так, что они больше не могли воздействовать на анализы Simoa на тау-белок p217+, в то время как сам сигнал p217+ тау-белка сохранялся. В этом анализе не показано прямо, связаны ли антитела с p217+ тау-белком, а отмечено присутствие конкурирующих с аналитом антител. Однако анализ дал сходные результаты по сравнению с результатами более трудоемкого анализа 1.

#### **[00213] Пример 4. Биологические пробы**

**[00214]** *Пробы, используемые для разработки анализа и проверки соответствия техническим требованиям*

**[00215]** Анализы из примеров 1-3 были разработаны с использованием объединенной CSF, собранной у человеческих индивидов с высокими уровнями тау-белка. Некоторые эксперименты были также проведены с использованием объединенной CSF, собранной у человеческих индивидов с низким уровнем тау-белка, для обеспечения чувствительности анализа, которая необходима для тестирования здоровых добровольцев при клинических испытаниях фазы 1. Кроме того, проводили измерения в CSF от яванского макака (*Macaca fascicularis*) и обыкновенной игрунки (*Callithrix jacchus*), полученных от компании Neu Encepharm GmbH (контрактная исследовательская организация по тестированию на животных), с использованием анализов из примеров 1-3. Кроме того, быстро замороженные пробы из мозга человеческих индивидов с нормальными когнитивными функциями и пробы из мозга обыкновенной игрунки гомогенизировали и проводили в них измерения с помощью анализов из примеров 1 и 3. Некоторые эксперименты проводили с индивидуальными сыворотками пациентов, по клиническим данным здоровых (HV) или больных БА.

**[00216]** *Пробы, использованные для предварительного клинического количественного определения*

**[00217]** Когорта 1 («когорта определения корреляции для серии анализов»). Пробы CSF, представляющие собой жидкость из желудочков (VF) и жидкость люмбарной пункции (LF), были получены от пациентов с нормотензивной гидроцефалией (NPH) (n=11) (Университет Куорю, профессор Ville Lenoinen). Эти пробы были разделены по измеренным в CSF A $\beta$ 42, общему тау-белку (tTau) и pTau181 в соответствии с методом Innotech, выполненным в Университет Sahlgrenska (профессор Kaj Blennow), и по иммуногистохимическому (ИНС) определению амилоида и тау-белка в препаратах биопсии мозга. оФВЭЖХ и измерения Simoa на p217+ тау-белок проводили в Janssen Neuroscience Biomarkers, Ла Холья.

**[00218]** Когорта 2 («когорта сравнения очевидных HV с очевидными БА»). Пробы LF CSF от пациентов с болезнью Альцгеймера (БА), определенных по биохимическим показателям, и, для сравнения, от здоровых добровольцев (HV) (n=20 на группу) были получены из университета Sahlgrenska (профессор Kaj Blennow). Измерения A $\beta$ 42, tTau и pTau181 в CSF методом Innotech проводили в университете Sahlgrenska. Пробы отбирали из большой группы проб с сегрегацией по предварительно заданным пороговым уровням БА и HV (БА=CSF A $\beta$ 42<400 пг/мл И CSF tTau > 600 пг/мл, HV=CSF A $\beta$ 42 > 400 пг/мл И CSF tTau < 600 пг/мл). оФВЭЖХ и измерения Simoa p217+ тау-белка проводили в Janssen Neuroscience Biomarkers, Ла Холья.

**[00219]** Когорта 3 («когорта сравнения HV с ARAD и с ранней стадией БА»). Пробы LF CSF от нормальных по клиническим данным пациентов (клинический рейтинг деменции 0; CDR 0) и для сравнения пациентов с небольшими жалобами на память (CDR 0,5) (n=20 на группу) были получены в исследовании Janssen ALZ1005/1002. Измерения A $\beta$ 42, tTau и pTau181 в CSF методом Innotech проводили в университете Sahlgrenska. На основе показателей CDR и A $\beta$ 42 в CSF пациенты были классифицированы на (a) HV=CDR 0 и A $\beta$ 42 > 600 пг/мл, (b) подверженных риску БА (ARAD) = CDR 0 и A $\beta$ 42<600 пг/мл, (c) потенциальная деменция без БА=CDR 0,5 и A $\beta$ 42 > 600 пг/мл и (d) ранняя стадия БА=CDR 0,5 и A $\beta$ 42<600 пг/мл. оФВЭЖХ и измерения методом Simoa p217+ тау-белка проводили в Janssen Neuroscience Biomarkers, Ла Холья.

**[00220]** Когорта 4 («когорта сравнения CDR 0 и CDR1»). Пробы LF CSF от нормальных по клиническим данным пациентов (клинический рейтинг деменции 0; CDR 0) и для сравнения пациентов с небольшими жалобами на память (CDR 1) (n=5 на группу) были получены из университета Washington. CDR и MMSE, а также измерения A $\beta$ 42, tTau и pTau181 в CSF методом Innotech были получены в университете Washington. Перед отправкой пробы кодировали таким образом, чтобы скрыть от специалистов Janssen идентификатор или описание пробы. оФВЭЖХ и измерения методом Simoa tTau и p217+ тау-белка проводили в Janssen Neuroscience Biomarkers, Ла Холья, и направляли в университет Washington для анализа.

**[00221]** Когорта 5 («когорта сравнения HV, MCI и БА»). Пробы LF CSF от пациентов, являющихся HV по клиническим и биохимическим данным (Innotest A $\beta$ 42 > 600 пг/мл) (n=7), были получены от компании Precision Medicine, г. Сан-Диего. Пробы LF

CSF от пациентов, обладающих по клиническим и биохимическим данным умеренными когнитивными нарушениями (MCI) (Innotest AB42<600 пг/мл) (n=28) и БА (n=12), были получены из университета Антверпена. офВЭЖХ и измерения методом Simoa p217+ тау-белка проводили в Janssen Neuroscience Biomarkers, Ла Холья.

**[00222]** Когорта 6 («когорта оценки тяжести и прогрессирования заболевания»). Пробы LF CSF от пациентов с БА по клиническим данным (клинический рейтинг деменции 1+) (n=235) были получены из исследования Janssen ELN115727301/302. Эти пробы представляли собой исходные пробы (до введения) от всех пациентов в исследовании. Кроме того, для оценки биомаркеров прогрессирования заболевания были включены пробы CSF, полученные после 78-недельного наблюдения за пациентами, получавшими плацебо (n=90). В ходе исследования получали данные по оценке когнитивных функций (ADAS-COG, MMSE, NTB, CDR.SOB), генотипу ApoE, полу и возрасту. Анализы Innotest AB42, Innotest AB40, Simoa NFL, pT3xpT82, pT3xhT43 и hT7xpT82 проводили в Janssen Neuroscience Biomarkers, Ла Холья. У пациентов подтверждали положительность или отрицательность по амилоиду на основе порогового значения 0,09 для отношения AB42/40 (например, пациенты с отношением < 0,09=амилоид-положительные=БА, а пациенты с отношением > 0,09=амилоид-отрицательные=деменция не Альцгеймеровского происхождения). 27 из 235 пациентов определены как амилоид-отрицательные, и обе группы анализировали отдельно.

**[00223]** *Пробы, используемые для оценки целевого взаимодействия после лечения средствами с антителами к p217+*

LF CSF от пациентов HV (n=40), получавших плацебо, или JNJ63733657 (одна внутривенная инъекция), были получены из исследования Janssen JNJ63733657EDI1001. Анализы pT3xpT82 проводили в Janssen Neuroscience Biomarkers, Ла Холья. Анализы pT3xhT43 проводили в компании Quanterix Corporation, г. Лексингтон, штат Массачусетс.

**[00224]** **Пример 5. Скрининг пар из захватного и детекторного антитела с использованием платформы Simoa**

**[00225]** Предшествующие данные Janssen Neuroscience Discovery и литературные данные (например, Meredith et al. *PLoS One*. 8(10):e76523, 2013; Barthelemy et al., *J Alzheimers Dis*. 51(4):1033-43, 2016; Russell et al., *J Alzheimers Dis*. 55(1):303-313, 2017; Hanger et al. *J Biol Chem*. 282(32):23645-54, 2007) показали, что фрагменты тау-белка, содержащие аминокислоты 200-220, и в частности некоторую комбинацию фосфорилирования по аминокислотам 212, 214, 217, чаще встречаются при БА. Таким образом, разработка анализа для измерения данных конкретных форм тау-белка («p217+ тау-белок») позволяет получить улучшенный биомаркер для диагностики и/или определения стадий БА, а также потенциальный прогностический и/или фармакодинамический анализ для новых лекарственных средств, нацеленных на этот тау-фрагмент. Однако тау-белок может присутствовать в низких концентрациях (< 200 пг/мл) у здоровых добровольцев, и p217+ тау-белок является минорным компонентом общего тау-белка, поэтому для анализа p217+ тау-белка требуются оптимальные пары антител и

высокая чувствительность.

[00226] Для достижения этой цели ряд mAb к тау-белку, обнаруженных в Janssen, а также некоторые высокоаффинные коммерческие mAb к тау-белку оценивали на способность давать сигнал в формате сэндвич-ИФА (сИФА) в комбинации с pT3. Пары антител подвергали скрининговому исследованию на анализаторе Simoa HD-1 (Quanterix Corporation) для обеспечения необходимой чувствительности, используя серийное разведение пула CSF пациентов с БА. Характеристики анализа были основаны на отношении сигнал/шум, равном следующему отношению: среднее число ферментов на гранулу (АЕВ) для пробы, разведенной в разбавителе для проб/АЕВ только для аналитического разбавителя. Оптимальными детекторными антителами для комбинации с pT3 были hT43, pT82, детекторный реагент Quanterix tau 2.0 и BT2, по порядку чувствительности (таблица 1). hT43 и детекторный реагент Quanterix tau 2.0 распознают N-концевую область тау-белка, а pT82 и BT2 распознают последовательности ближе к средней области тау-белка. Для дальнейшей оптимизации отбирали лучшие N-концевые (hT43) и срединные (pT82) mAb. Скрининг проводили параллельно в Janssen Neuroscience Biomarkers и компании Quanterix Corporation и получали аналогичные результаты.

**Таблица 1** Скрининг специфичности детекторных антител к тау-белку в комбинации с pT3 на CSF от пациентов с БА.

Детекторное антитело	Эпитоп (аминокислоты тау-белка)	С/Ш при разведении 1 : 2	С/Ш при разведении 1 : 4	С/Ш при разведении 1 : 8	С/Ш при разведении 1 : 16	С/Ш при разведении 1 : 32	С/Ш при разведении 1 : 64
hT43	7-20	955	587	313	183	102	55
Детекторный реагент анализа Quanterix tau 2.0	16-24	525	262	147	75	35	19
pT82	116-127	733	400	211	105	48	23
PT51	151-158	165	52	17	6	3	1
PT98	159-163	н/и	н/и	17	7	3	2
pT89	166-182	87	24	9	4	2	1
BT2	193-198	732	245	78	28	10	4
HT52	393-398	н/и	н/и	1	1	1	1
HT60	423-440	н/и	н/и	1	1	1	1

Показаны эпитоп антитела на тау-белке и соотношения сигнал/шум (С/Ш) при измерении в смешанной CSF от пациентов с БА; н/и=не исследовали.

**[00227] Пример 6. Оптимизация анализов рТ3хhТ43 и рТ3хрТ82**

**[00228]** Была проведена серия экспериментов по оптимизации на основании общего опыта компании Quanterix по оптимизации анализов на платформе Simoa. К разбавителям для детекторных антител добавляли 10% мышинной сыворотки или 500 мкг/мл мышинных IgG, но это не улучшало чувствительность анализа. Оценивали титры концентрации детекторных mAb (0,15, 0,3, 0,6, 1,2 и 1,8 мкг/мл), концентрации стрептавидин-бета-галактозидазы (SβG) (100, 200 или 300 пМ) и концентрации гранул с захватными mAb (300 тыс./лунка, 150 тыс. + 200 тыс. вспомогательных гранул). Кроме того, оценивали времена инкубации по протоколу (65 минут против 35 минут) и объем пробы (100 мкл против 150 мкл). Идеальными концентрациями реагентов для обоих анализов были соответственно 150 тыс. захватывающих гранул+200 тыс. вспомогательных гранул, 1,8 мкг/мл детекторных антител и 200 пМ SβG. Объем пробы и время инкубации оказывали минимальное влияние на анализ, поэтому были выбраны более низкие значения: 100 мкл пробы и 35-минутная инкубация.

**[00229] Пример 7. Проверка соответствия техническим требованиям анализов рТ3хhТ43 и рТ3хрТ82**

**[00230]** *Линейный диапазон по калибровочному материалу*

**[00231]** Были получены калибровочные пептиды, описанные в примере 1. Калибровочные пептиды содержали основные эпитопы рТ3 и hТ43, или рТ3 и рТ82, разделенные линкерами PEG4, и их использовали для создания стандартных кривых. Характерная стандартная кривая показана на Фиг. 1. Калибровочные пептиды титровали от 30 пг/мл до 0,041 пг/мл с шагом 1 : 3 в буфере для анализа и измеряли при помощи анализов рТ3хhТ43 и рТ3хрТ82. Для создания калибровочной кривой применяли метод предварительной обработки данных с аппроксимацией 4-параметрической кривой (4PL, взвешивание по 1/y<sup>2</sup>). Нижний предел обнаружения (LLOD) определяли как рассчитанный калибровочный уровень, дающий значение АЕВ, равное среднему показателю нулевого калибратора+2,5 среднеквадратичных отклонений (СО), включая 10% коэффициент вариации (КВ). По этим критериям репрезентативные данные показали значение LLOD, равное ~ 0,002 пг/мл. Линейный диапазон анализа, нижний предел количественного определения (LLOQ) и верхний предел количественного определения (ULOQ) определяли как минимальную и максимальную точки стандартной кривой, достигающую значения КВ < 20% и восстановление 80-120% от ожидаемого. По этим критериям линейный диапазон для анализов рТ3хhТ43 и рТ3хрТ82 составил от 0,041 до 30 пг/мл (Фиг. 1, таблица 2).

**Таблица 2.** Репрезентативная калибровочная кривая для оптимизированного анализа рТ3хhТ43 с расчетом LLOD

пг/мл калибровочного пептида	Среднее АЕВ	СО	КВ (%)	Сигнал/фон

0	0,0185	0,0019	10	
0,034	0,1369	0,0260	19	7
0,103	0,1952	0,0039	2	11
0,309	0,5221	0,0626	12	28
0,926	1,4545	0,0145	1	78
2,78	5,4789	0,1096	2	295
8,33	11,4588	1,0313	9	617
25	24,0576	0,2406	1	1297
<i>LLOD=0,0185 + (2,5×0,0019) = 0,0231 АЕВ, что дает теоретическую концентрацию 0,002 пг/мл</i>				

**[00232]** *Линейность разведения для CSF*

**[00233]** Для оценки линейности разведения и определения идеального разведения для тестирования проб CSF, панель из 4 проб CSF от пациентов с БА (высокий уровень тау-белка, низкий уровень АВ42) разбавляли с разведением от 1 : 2 до 1 : 4096 в буфере для анализа и измеряли в анализе на р217+ тау-белок. Пробы с разведением более 1 : 512, как правило, имели сигнал ниже LLOQ. Измерения в пробах с 1 : 4 по 1 : 512 линейно зависели от разведения так, что был определен диапазон для измерения проб CSF. Для подтверждения на пациентах с нормальными когнитивными функциями были аналогичным образом выполнены измерения на объединенной CSF пациентов с низким уровнем тау-белка и высоким уровнем АВ42. Линейность наблюдали в диапазоне разведений от 1 : 4 до 1 : 256, а за пределами этого диапазона значения были ниже LLOQ (Фиг. 2).

**[00234]** *Точность*

**[00235]** Для оценки прецизионности измерений была подготовлена стандартная кривая для рТ3хhТ43 и проведены измерения в 3 отдельных днях (Фиг. 3 и таблица 3). Калибровочный пептид разбавляли от 30 до 0,041 пг/мл с последовательными шагами 1 : 3 и измеряли в двух повторностях анализом рТ3хhТ43. Процедуру повторяли в течение 3 последовательных дней в одном и том же месте, и ее проводил один и тот же лаборант. Анализ 4 точек в середине кривой (при измерении проб CSF) показал, что внутрисерийная воспроизводимость (внутри тестовый КВ %) всегда была < 10% и в среднем имела 2,46-5,18% КВ, а точность межсерийной прецизионности в среднем составляла 6,46% КВ. Эти значения лежат в пределах принятых предельных величин 20% КВ при использовании

только в исследовательских целях (RUO) и частично обусловлены автоматизированным характером всех этапов ИФА в анализаторе Simoa HD-1.

**Таблица 3** Внутрисерийная и межсерийная прецизионность анализа pT3xhT43

	Анализ 1			Анализ 2			Анализ 3			Общее количество во анализов		
фг/мл калибровоч ного пептида	Средне е значен ие АЕВ	СО	КВ %	Средне е значен ие АЕВ	СО	КВ %	Средне е значен ие АЕВ	СО	КВ %	Среднее значение АЕВ	СО	КВ %
49	0,0228	0,0005	2,03	0,0248	0,0024	9,64	0,0319	0,0005	1,41	0,0265	0,0048	18,04
195	0,0762	0,0019	2,55	0,0777	0,0011	1,39	0,0785	0,0028	3,52	0,0775	0,0012	1,54
781	0,2130	0,0084	3,95	0,2161	0,0200	9,26	0,0210	0,0129	6,14	0,2130	0,0030	1,43
3125	0,8012	0,0105	1,31	0,8193	0,0036	0,44	0,7460	0,0289	3,88	0,7888	0,0382	4,84
Среднее			2,46			5,18			3,74			6,46

**[00236]** *Переносимость между лабораториями*

**[00237]** Для оценки прецизионности анализов p217+ тау-белка между испытательными площадками измеряли одну и ту же объединенную CSF от пациентов с БА после раститровки с использованием одной партии реагентов в Janssen Neuroscience Biomarkers и в Quanterix Corporation. На Фиг. 4 показано, что измерения с использованием анализов pT3xhT43 и pT3xpT82 на двух испытательных площадках очень похожи.

**[00238]** *Точность*

**[00239]** Для оценки точности анализов к двум различным пулам CSF от HV были добавлены известные концентрации калибровочных пептидов (0, 2 или 20 пг/мл), выполнено разбавление до рекомендованного разведения 1 : 4, а впоследствии выполнены измерения анализами pT3xhT43 и pT3xpT82. Это один из показателей возможных мешающих влияний со стороны компонентов матрикса пробы. Уровни эндогенного сигнала вычитали из измеренных значений для добавок 2 и 20 пг/мл, а впоследствии

наблюдаемую концентрацию калибровочного материала сравнивали с ожидаемой концентрацией для расчета процента восстановления. Измеренные концентрации сравнивали с ожидаемыми концентрациями и вычисляли степень восстановления, которая в среднем составляла 114% (таблица 4). Это хорошо согласуется с принятыми ограничениями восстановления 80-120% при анализе RUO, что указывает на отсутствие существенного мешающего влияния со стороны CSF при тестировании при разведении  $\geq 1$  : 4.

**Таблица 4** Степень восстановления в анализе pT3xhT43

Проба CSF	Добавка калибровочного пептида (пг/мл)	АЕВ	Расчетное пг/мл	пг/мл КВ%	Среднее пг/мл	С коррекция на разведение пг/мл	% извлечения
1	0	1,4863	0,945	3	0,924	3,69	н/п
		1,4209	0,902				
	2	2,2451	1,44	2	1,42	5,69	100
		2,1776	1,40				
	20	8,9800	6,33	2	6,40	25,6	110
		9,1679	6,48				
2	0	1,9960	1,28	6	1,23	4,91	н/п
		1,8397	1,18				
	2	2,8076	1,82	2	1,85	7,39	124
		2,8886	1,88				
	20	10,1636	7,28	1	7,34	29,4	122
		10,3026	7,40				
<b>СРЕДНЕЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ</b>							<b>114%</b>

**[00240]** Конкуренция сигналу со стороны антител к p217+ в CSF

**[00241]** Для подтверждения точности аналитических сигналов pT3xhT43 и pT3xpT82 в CSF и для оценки ее потенциальной пригодности в качестве



фармакодинамического анализа в клинических исследованиях антител к p217+ тау-белку, к объединенной CSF от пациентов с БА добавляли определенные титры mAb pT3 или гуманизированного mAb pT3 и измеряли с помощью анализов pT3xhT43 и pT3xpT82 после 2 часов инкубации при комнатной температуре (Фиг. 5). За счет введения растворимого антитела pT3 и гуманизированного антитела pT3 снижался сигнал в анализах на основе pT3 дозозависимым образом. Добавление mIgG (отрицательный контроль) в сопоставимых концентрациях не влияло на какие-либо показатели. Снижение конкурентной способности гуманизированного mAb pT3 по сравнению с pT3 можно объяснить более высокой аффинностью pT3 к p217+ тау-белку.

**[00242]** *Зависимость от фосфорилирования*

**[00243]** Для подтверждения, что сигнал от CSF, полученный в анализах pT3xhT43 и pT3xpT82, действительно был основан на фосфорилированном эпитопе, CSF от пациентов с БА обрабатывали щелочной фосфатазой для дефосфорилирования всех остатков. Впоследствии пробы анализировали с использованием анализов на основе pT3 и в двух анализах на основе hT7, hT7xpT82 или hT7xBT2. Известно, что hT7 не зависит от фосфорилирования, поэтому его использовали в качестве отрицательного контроля.

**[00244]** Объединенную CSF от пациентов с БА обрабатывали возрастающими количествами щелочной фосфатазы (ЩФ) при 37 °C в течение 4 часов в буферном растворе, содержащем хлорид цинка и хлорид магния. Влияние на эпитоп, на который направлено антитело pT3, измеряли с использованием анализов pT3xhT43 и pT3xpT82. Сигнал pT3xhT43 и pT3xpT82 снижался при обработке щелочной фосфатазой дозозависимым образом. Однако не зависящие от фосфорилирования анализы hT7xpT82 или hT7xBT2 не показали снижения сигнала, фактически в них продемонстрировано увеличение, как и ожидалось, поскольку связывание pT7 уменьшается при фосфорилировании (Фиг. 6).

**[00245]** *Профиль фрагментов p217+ тау-белка*

**[00246]** Для изучения характера сигнала p217+ тау-белка от исходной CSF, проводили фракционирование пробы CSF от пациентов с БА при помощи оФВЭЖХ с использованием способа, схожего с описанным в работе Meredith et al. *PLoS One*. 8(10):e76523, 2013. Фракции собирали и выполняли измерения с использованием анализов pT3xhT43 и pT3xpT82 (Фиг. 7). В таком формате хроматографии более мелкие фракции тау-белка элюируются быстрее (меньший номер фракции), тогда как более крупные фракции элюируются позже (большой номер фракции). Полноразмерный тау-белок элюируется в фракции 19. Профиль фрагментов тау-белка показал, что в любом из анализов обнаруживается очень мало полноразмерного тау-белка, что соответствует предыдущим данным (Meredith et al. *PLoS One*. 8(10):e76523, 2013, Barthelemy et al., *J Alzheimers Dis*. 51(4):1033-43 2016). Анализом pT3xpT82 обнаружили два крупных пика (форы тау-белка), которые были меньше полноразмерного тау-белка (фракции 12 и 14), тогда как при анализе pT3xhT43 обнаружили только один из этих крупных пиков (фракция 14). Это указывает на то что p217+ тау-белок в CSF существует в по меньшей

мере двух фрагментах, причем более большой фрагмент кодирует по меньшей мере область от hT43 до pT3 (аминокислоты 7-220 тау-белка), а меньший фрагмент кодирует по меньшей мере область от pT82 до pT3 (аминокислоты 116-220 тау-белка), но не на всем протяжении до эпитопа hT43. То есть, вероятно, существует сайт протеолитического расщепления между аминокислотами 20 и 116, расщепление по которому в любой данный момент времени произошло только в части молекул тау-белка. Профиль не специфичен к p217+, так как измерения другими анализами на тау-белок, которые распознают сходный участок тау-белка, но не являются специфичными к фосфорилированию, дают сходные результаты (данные не показаны).

**[00247]** *Стабильность анализа*

**[00248]** Стабильность эндогенного эпитопа p217+ тау-белка оценивали при различных температурах. Объединенную CSF от пациентов с БА разделяли на аликвоты, и все эти аликвоты хранили при 4 °C, 22 °C или 37 °C в течение 1, 2 или 4 часов. Кроме того, часть аликвот размораживали (от -80 °C до 22 °C) 2 или 3 раза. Все пробы впоследствии разводили 1 : 20 и анализировали с использованием анализов pT3xhT43 и hT7xpT82 (Фиг. 8). Ни при одном из протестированных условий не наблюдалось существенных изменений сигнала, и это указывает на то, что все 4 эпитопа, распознаваемые этими анализами, достаточно стабильны, чтобы можно было использовать стандартные процедуры хранения/тестирования. Наконец, заранее взяли CSF от 4 доноров, впоследствии разделили на аликвоты и заморозили при 70 °C; пробы отбирали каждые 3 месяца и измеряли с помощью анализа pT3xpT82. Значимых изменений в сигнале через 3, 6 или 9 месяцев не наблюдали (Фиг. 9).

**[00249]** **Пример 8. Проверка соответствия клиническим требованиям анализов pT3xhT43 и pT3xpT82**

**[00250]** Для оценки пригодности анализов pT3xhT43 и pT3xpT82 для диагностики и определения стадий БА были получены три когорты проб CSF для измерения p217+ тау-белка. Измерения проанализировали на корреляцию с оценками когнитивных функций и с другими классическими биомаркерами БА.

**[00251]** Когорта 1. «Когорта определения корреляции для серии анализов»

**[00252]** Пробы CSF, VF и LF, а также образцы биопсии головного мозга (из желудочка) взяли от 10 пациентов с нейродегенеративным заболеванием нормотензивная гидроцефалия (NPH), характеризующимся избыточной продукцией интерстициальной жидкости в головном мозге и высокой частотой сочетающимся с БА. Измерения p217+ тау-белка проводили в исходной CSF и анализировали на корреляцию с традиционными биомаркерами БА.

**[00253]** Уровни A $\beta$ 42 (Фиг. 10A, 10D), tTau (Фиг. 10B, 10E), pTau181 (Фиг. 10C, 10F) в VF определяли методом Innostest ELISA (классическое измерение). В тех же пробах проводили измерения с помощью анализов pT3xhT43 (Фиг. 10A, 10B, 10C) и pT3xpT82 (Фиг. 10D, 10E, 10F) и оценивали корреляции. Анализы pT3xpT82 и pT3xhT43 показали отрицательную корреляцию с CSF A $\beta$ 42 (соответственно  $r^2=0,609$ ,  $p=0,0077$  и  $r^2=0,590$ ,

$p=0,0095$ ), и положительную корреляцию с CSF tTau (соответственно  $r^2=0,525$ ,  $p=0,0177$  и  $r^2=0,435$ ,  $p=0,0381$ ), но не имели существенной корреляции с CSF pTau181 (Фиг. 10).

**[00254]** Образцы биопсии головного мозга из тех же 10 пациентов с NPH проанализировали методом ИНС, и патологоанатом оценивал их с точки зрения положительности/отрицательности по амилоиду и положительности/отрицательности по тау-белку. При положительности по обоим белкам пробу обозначали как «биопсия +», и это был классический диагноз БА. При отрицательности по обоим белкам пробу обозначали как «биопсия -», и это был классический диагноз отсутствия БА. Пробы, обозначенные как «биопсия + (амил)», были положительными по амилоиду, но отрицательными по тау-белку. С помощью анализов pT3xhT43 и pT3xpT82 проводили измерения в CSF, полученной при желудочковой пункции (VF=черные точки) или люмбарной пункции (LF=красные точки), и оценивали корреляции (Фиг. 11). С помощью анализа pT3xhT43 и анализа pT3xpT82 отличали отрицательные пробы биопсии мозга (амилоид-/тау-) от положительных проб (амилоид+/тау+) (соответственно  $p=0,04$  и  $0,02$ ). Пробы, положительные по амилоиду, но не по тау-белку, часто встречались среди проб биопсия+ и биопсия-. Считается, что амилоидные бляшки в головном мозге появляются раньше тау-клубков, поэтому пробы амилоид+/тау- могут отражать раннюю стадию БА или другое заболевание.

**[00255]** Когорта 2. «Когорта сравнения HV с БА»

**[00256]** Пробы CSF (LF) от пациентов, являющихся по биохимическим данным БА и HV ( $n=20$  на группу) получали из университета Sahlgrenska. Уровни A $\beta$ 42 и tTau определили методом Innostest ELISA (классическое измерение) для разделения на группы (БА=CSF A $\beta$ 42<400 пг/мл И tTau > 600 пг/мл, HV=CSF A $\beta$ 42 > 400 пг/мл И CSF tTau < 600 пг/мл). Выполняли измерения с использованием анализов pT3xhT43, pT3xpT82 и hT7xpT82 в исходной CSF и в части CSF, фракционированных методом офВЭЖХ. Результаты анализировали на корреляцию с традиционными биомаркерами БА (Фиг. 12). Данные, представленные на панелях А и В на Фиг. 12, продемонстрировали, что эпитоп pT3 является показателем пациентов с высокой степенью риска быстрого прогрессирования до БА со слабоумием. Эпитоп pT3 был сильно повышен у пациентов, демонстрирующих высокое общее содержание тау-белка и низкий уровень A $\beta$ 42. И наоборот эпитоп pT3 имел низкие уровни у пациентов с низким общим содержанием тау-белка и высоким уровнем A $\beta$ 42. Фиг. 11С подтверждает, что повышенное содержание тау-белка с эпитопом pT3 было по меньшей мере частично, но не полностью обусловлено повышенным уровнем общего тау-белка, о чем свидетельствует анализ общего тау-белка при помощи hT7xpT82 (Фиг. 12D). Это указывает, что при БА повышено как количество тау-белка, так и степень его фосфорилирования по эпитопу p217+.

**[00257]** Данные, представленные на Фиг. 11, использовали для построения кривых эксплуатационной надежности (ROC) для способности анализов pT3xhT43, pT3xpT82 и hT7xpT82 дифференцировать пробы пациентов с БА от проб пациентов HV. Все три анализа продемонстрировали отличную специфичность и чувствительность. Однако два

анализа на основе рТЗ (рТЗхТ43, рТЗхрТ82, которые обнаруживали р217+ тау-белок) имели лучшую диагностическую мощностъ по сравнению с анализом на основе hТ7 (Фиг. 13).

**[00258]** Часть тех же проб CSF, измерения по которым представлены на Фиг. 12 (n=11 на группу), фракционировали методом офВЭЖХ, а впоследствии проводили измерения с помощью анализов рТЗхТ43, рТЗхрТ82 и hТ7хрТ82 (в последнем измеряют те же фрагменты тау-белка, но независимо от фосфорилирования) (Фиг. 14). Наблюдаемый профиль фрагментов тау-белка был аналогичен профилю, представленному в примере 7 и на Фиг. 7. То есть в обоих анализах на основе рТ82, т. е. рТЗхрТ82 и hТ7хрТ82, наблюдали две основных формы, в то время как в анализе рТЗхТ43 наблюдали только один из пиков. Обе основных формы присутствовали в более высоких концентрациях в группе БА, чем в группе НV. Кроме того, при анализировании исходной CSF, анализы на основе рТЗ (на р217+тау-белок) показали большую разницу между группами, чем анализ на основе hТ7 (на общий тау-белок). Более крупные формы р217+ тау-белка (фракции 13-14) обеспечивали наибольшую разницу при сравнении групп БА и НV (Фиг. 14).

**[00259]** Вычисляли сумму всех основных фрагментов тау-белка, приведенных на Фиг. 14 (фракции 11-14), а впоследствии проводили сравнение между группами БА и НV. Процентное увеличение тау-белка, содержащего эпитоп рТЗ (рТЗхТ43 или рТЗхрТ82) в группе БА, было более чем в два раза выше, чем тау-белка, не содержащего эпитоп рТЗ (hТ7хрТ82) (таблица 5).

**Таблица 5** Сигнал общего тау-белка в анализах с рТЗ и без рТЗ

Анализ	Средне е АЕВ в группе БА	Среднеквадратично е отклонение в группе БА	Средне е АЕВ в группе НV	Среднеквадратично е отклонение в группе НV	% увеличени е в группе БА
рТЗ/рТ8 2	0,74	0,32	0,12	0,05	620
рТЗ/hТ4 3	1,65	1,88	0,22	0,14	750
hТ7/рТ8 2	2,00	1,66	0,84	0,66	250

**[00260]** Оценку сигнала независимо по каждой из фракций на Фиг. 14 по сравнению с общим количеством, представленным в таблице 5, проводили, чтобы показать, какая фракция дала наибольший вклад в разницу между БА и НV. Наиболее информативный пул фрагментов был выявлен с использованием антитела рТЗ на пулах 13 и 14 фрагментов (таблица 6).

**Таблица 6** Сигнал тау-белка в разных пулах тау-фрагментов в анализах с рТЗ и без

pT3

Анализ с pT3 идентифицирует пациентов с БА лучше, чем анализ без pT3. Различия по пулам фрагментов				
Анализ	Пул фрагментов	Среднее АЕВ в группе БА	Среднее АЕВ в группе HV	% БА относительно HV
pT3xhT43	11	0,22	0,105	210
	12	0,333	0,113	295
	13	1,78	0,235	757
	14	4,25	0,407	1044
pT3xpT82	11	0,447	0,079	566
	12	0,631	0,098	644
	13	0,681	0,121	563
	14	1,2	0,193	622
hT7xpT82	11	0,51	0,29	176
	12	2,8	1,51	185
	13	0,73	0,26	281
	14	3,94	1,31	301

**[00261]** Когорта 3. «Когорта сравнения HV с ARAD и с ранней стадией БА»

**[00262]** Пробы CSF (LF) из нормальных по клиническим данным (CDR 0) и для сравнения пациентов с небольшими жалобами на память (CDR 0,5) (n=20 на группу) были получены в исследовании Janssen ALZ1005/2002. Уровни A $\beta$ 42, tTau и pTau181 определяли с помощью Innostest ELISA. На основе показателей CDR и A $\beta$ 42 в CSF пациенты были классифицированы на (a) HV=CDR 0 и A $\beta$ 42 > 600 пг/мл, (b) ARAD=CDR 0 и A $\beta$ 42<600 пг/мл, (c) потенциальная деменция без БА=CDR 0,5 и A $\beta$ 42 > 600 пг/мл и (d) ранняя стадия БА=CDR 0,5 и A $\beta$ 42<600 пг/мл.

**[00263]** Пробы CSF также фракционировали с помощью оФВЭЖХ и измеряли при помощи анализов на основе pT3 (pT3xhT43, Фиг. 15A-15E и pT3xpT82, Фиг. 15F-15J) и анализов общего тау-белка (hT7xpT82, Фиг. 15K-15O). Все анализы на основе pT3 и hT7 демонстрировали более высокий сигнал в группе CDR 0, чем в группе 0,5 (Фиг. 15A, 15F и 15K), и для проб с A $\beta$ 42<600 пг/мл в сравнении с > 600 пг/мл (Фиг. 15B, 15G и 15L). Разбиение по CDR x A $\beta$ 42 показано на Фиг. 15C, 15D, 15H, 15I, 15M и 15N, а суммарный сигнал по всем фракциям показан на Фиг. 15E, 15J и 15O. Уровни сигнала были наибольшими в подгруппе A $\beta$ 42<600 пг/мл+CDR 0,5 что согласуется с повышенным сигналом p217+ тау-белка на ранних стадиях БА по сравнению с HV или ARAD. Разделение между подгруппами было лучше в анализах на основе pT3 по сравнению с анализом на основе hT7, и это указывает на то, что гиперфосфорилирование эпитопа pT3

особенно повышено (выше, чем простое повышение общего тау-белка) при заболевании.

**[00264]** Когорта 4 («когорта сравнения CDR 0 и CDR1»).

**[00265]** Пробы LF CSF от нормальных по клиническим данным пациентов (клинический рейтинг деменции 0; CDR 0) и для сравнения пациентов с небольшими жалобами на память (CDR 1) (n=5 на группу) были получены из университета Washington. CDR и MMSE, а также измерения A $\beta$ 42, tTau и pTau181 в CSF методом Innostest были получены в университете Washington. Перед отправкой пробы закодировали таким образом, чтобы скрыть от специалистов Janssen идентификатор или описание пробы. офВЭЖХ и измерения методом Simoa tTau и p217+ тау-белка проводили в Janssen Neuroscience Biomarkers, Ла Холья, и направляли в университет Washington для анализа.

**[00266]** Измерения в пробах CSF проводили в исходном виде или после фракционирования офВЭЖХ с использованием как анализов на основе pT3, (pT3xhT43 & pT3xpT82) так и tTau (hT7xpT82). Данные выражали в виде соотношения между двумя анализами pT3 (таблица 7) для оценки относительного влияния коротких форм тау-белка, или (Фиг. 16А-16В) в виде соотношения между анализом pT3 и tTau для оценки относительного влияния фосфорилирования. В обоих случаях результат позволил точно предсказать статус CDR для 9 из 10 пациентов. 1 выпадающий пациент, как оказалось, имел аномально низкий уровень тау-белка по данным Innostest, и поэтому, возможно, имел деменцию, не связанную с таупатией. Интересно, что наблюдалась корреляция между отношением тау-белок p217+ / tTau и MMSE, и это значит, что сигнал, обнаруженный в анализах pT3, может изменяться вместе с когнитивной функцией.

**Таблица 7.** Отношение pT3xpT82 (p217+ короткие) к pT3xhT43 (p217+ длинные) в исходной CSF

					Innotest A $\beta$ , tTau, pTau			Тау-белок P217+
Ид. номер	CDR	MMSE	Пол	возраст_в_момент_LP	Innotest A $\beta$	Inno_Tau	Inno-pTau	P217+ короткие/ P217+ длинные
24								
064*	1	28	М	77	+	119,44	30,154	Низ.
24 593	1	23	Ж	55	+	816,427	104,47	1,25
25 711	1	28	М	79	+	450,005	65,486	1,78
62 496	1	24	М	85	+	1126,919	153,024	1,34
64 397	0	30	Ж	72	-	261,846	44,805	0,81
64 722	0	30	Ж	77	-	247,99	55,951	0,99
64 996	0	30	М	80	-	427,871	96,301	0,82
65 839	0	30	Ж	68	-	180,452	39,263	0,99

65 922	0	28	M	58	-	539,75	96,29	Низ.
68 031	1	27	M	68	+	1080,048	120,47	1,22

\* CDR 1 и A $\beta$ -положительный, но имеет низкие уровни Tau и pTau по данным Innotest и Simoa

**[00267]** Когорта 5 («когорта сравнения HV, MCI и БА»)

**[00268]** Пробы LF CSF от пациентов, являющихся HV по клиническим и биохимическим данным (Innotest AB42 > 600 пг/мл) (n=7), были получены от компании Precision Medicine, (г Сан-Диего, штат Калифорния). Пробы LF CSF от пациентов, обладающих по клиническим и биохимическим данным умеренными когнитивными нарушениями (MCI) (Innotest AB42<600 пг/мл) (n=28) и БА (n=12), были получены из университета Антверпена. офВЭЖХ и измерения методом Simoa p217+ тау-белка проводили в Janssen Neuroscience Biomarkers, Ла Холья.

**[00269]** Измерения в пробах CSF проводили в исходном виде или после фракционирования офВЭЖХ с использованием как анализов на основе pT3, (pT3xhT43 & pT3xpT82) так и tTau (hT7xpT82). Все анализы на основе pT3 и hT7 демонстрировали повышенный сигнал, увеличивающийся в последовательности HV, против MCI, против БА (Фиг. 17A-C), и хорошо коррелировали друг с другом (как видно в когорте 1, Фиг. 9) (Фиг. 17D и 17E). Анализы pT3 также в некоторой степени коррелировали с данными Innotest tTau и pTau181 (Фиг. 17F и 17G), но не с Innotest AB42 или отношением AB42/40 (Фиг. 17H и 17I). Сходные результаты по диагностике стадий наблюдали при измерениях на исходной CSF (Фиг. 17A-17C) или фракционированном офВЭЖХ материале (Фиг. 17J-17T). Как видно из когорты 3, разделение HV, MCI и БА было более выраженным (более статистически значимым) при использовании анализов, основанных на pT3, чем анализов tTau, что указывает на значимость данного измерения на основе pT3 применительно к данной патологии.

**[00270]** Когорта 6 («когорта оценки тяжести и прогрессирования заболевания»)

**[00271]** Пробы CSF (LF) от пациентов с БА по клиническим данным (клинический рейтинг деменции 1+) (n=235) были получены из исследования Janssen ELN115727301/302. Эти пробы представляли собой исходные пробы (до введения) от всех пациентов в исследовании. Кроме того, для оценки биомаркеров прогрессирования заболевания были включены пробы CSF, полученные после 78-недельного наблюдения за пациентами, получавшими плацебо (n=90). В ходе исследования получали данные по оценке когнитивных функций (ADAS-COG, MMSE, NTB и CDR.SOB), генотипу ApoE, полу и возрасту. Анализы Innotest AB42, Innotest AB40, анализ тонкого полипептидного нейрофиламента Simoa (Simoa neurofilament light (NFL)), pT3xpT82, pT3xhT43 и hT7xpT82 проводили в Janssen Neuroscience Biomarkers, Ла Холья. У пациентов подтверждали положительность или отрицательность по амилоиду на основе порогового значения 0,09 для отношения AB42/40 (например, пациенты с отношением < 0,09=амилоид-положительные=БА, а пациенты с отношением > 0,09=амилоид-отрицательные=деменция не Альцгеймеровского происхождения). 27 из 235 пациентов определены как амилоид-

отрицательные, и, таким образом, все группы анализировали отдельно.

[00272] Сигнал от измерений в исходной CSF снова показал хорошую корреляцию между двумя анализами pT3 и анализом tTau (Фиг. 18A и 18B), но не с NFL (Фиг. 18C), предполагаемым маркером *общей* нейродегенерации, и это значит, что посредством анализа pT3 можно распознавать конкретную форму или стадию нейродегенерации.

[00273] Анализы на основе pT3 снова показали более высокий сигнал у амилоид-положительных пациентов по сравнению с амилоид-отрицательными пациентами (Фиг. 18D-18E).

[00274] Анализы на основе pT3 показали умеренную корреляцию с несколькими оценками когнитивных функций (ADAS-COG, MMSE, NTB, CDR.SOB, Фиг. 18F-18M) и подтвердили данные по когорте 4 (Фиг. 16C). Интересно, что исходный сигнал анализа на основе pT3 также умеренно коррелировал с изменениями показателей когнитивных функций в течение 18-месячного периода последующего наблюдения, что указывает на способность прогнозировать ухудшение когнитивных функций (Фиг. 18N-18P).

[00275] Отношение сигнала на основе pT3 к сигналу tTau (p217\_tau/tTau) дало сходные результаты; данные не показаны.

[00276] Корреляции с когнитивными функциями и изменением в когнитивных функциях наблюдали как в группе амилоид-положительных, так и в группе амилоид-отрицательных пациентов, однако последняя группа имела малый размер выборки. Подтверждение теории будет означать, что связь p217+ с когнитивными функциями может быть не специфична для БА.

**[00277] Пример 9. Количественное определение p217+ тау-белка, не связанного или связанного с антителом**

[00278] Анализы, описанные в примере 3, проводили следующим образом.

[00279] *Анализ 1. Количественное определение свободного и связанного p217+ тау-белка в биологической текучей среде с использованием иммунного захвата/обеднения с последующей офВЭЖХ*

[00280] Этот анализ тестировали путем добавления антитела в пробы CSF. К объединенным CSF от пациентов с БА добавляли 10 мкг mAb pT3, гуманизированного mAb pT3, msIgG или сопоставимый объем PBS (ложный контроль) и инкубировали при 4 °C в течение 24 ч с последующим иммунным захватом. Пробы, а также исходные CSF, не подвергнутые иммунному захвату, фракционировали с использованием офВЭЖХ, и в каждой фракции проводили измерение с использованием анализа pT3xhT43 для оценки количества общего и связанного тау-белка p217+. Существенный сигнал наблюдали в одном крупном пике, аналогичном наблюдавшемуся в примере 7 и на Фиг. 7 для исходной пробы (общий тау-белок p217+), а также в случае иммунного захвата с mAb pT3 или гуманизированным mAb pT3 (связанный p217+ тау-белок), но не в случае иммунного захвата с ложным контролем или IgG (Фиг. 19).

[00281] В объединенную CSF от пациентов с БА вносили титры гуманизированного mAb pT3, инкубировали при 22 °C в течение 2 ч с последующими



иммунным захватом, офВЭЖХ и анализом рТ3хhТ43 для оценки связанного р217+ тау-белка (Фиг. 20А). Обедненный IgG супернатант также фракционировали и проводили измерения для оценки свободного р217+ тау-белка (Фиг. 20В). За счет добавления гуманизированного mAb рТ3 повышали количество измеренного связанного р217+ тау-белка и снижали количество свободного р217+ тау-белка дозозависимым образом.

**[00282]** В совокупности результаты показывают, что этот способ, который является прямым измерением взаимодействия с мишенью, специфичен к антителам, нацеленным на эпитоп р217+ тау-белка (Фиг. 19), и зависим от дозы нацеленного антитела (Фиг. 20).

**[00283]** *Анализ 2. Количественное определение свободного и связанного р217+ тау-белка в биологической текучей среде с использованием избирательной денатурации антител*

**[00284]** Биологические пробы (например, CSF) нагревали приблизительно до температуры кипения в течение 4 минут с последующим охлаждением на льду, после чего выполняли измерение с помощью анализов рТ3хhТ43 и/или рТ3хрТ82. Было определено точное время этого процесса, необратимо повреждающее антитела в пробе так, что они больше не могли мешать анализу (Фиг. 21), но не влияющее на сам сигнал р217+ тау-белка (Фиг. 21). Считается, что это обусловлено особой недостаточностью третичной структуры у тау-белка, что делает его особенно стабильным при высокой температуре. Эту пробу именовали общим р217+ тау-белком, тогда как параллельное измерение пробы, не подвергавшейся термической обработке, называли свободным р217+ тау-белком. Вычитание концентрации свободного из концентрации общего белка дает концентрацию связанного р217+ тау-белка.

**[00285]** Влияние нагревания на анализ определяли следующим образом.

**[00286]** Влияние нагревания на смесь CSF/гуманизированное mAb рТ3. К аликвотам объединенной CSF от пациентов с БА добавляли гуманизированное mAb рТ3 до концентрации 1 мкг/мл, инкубировали в течение 2 часов при 22 °С, нагревали в течение 0-20 минут при 95 °С, охлаждали до 4 °С, а впоследствии выполняли измерения с помощью анализа рТ3хрТ82 в разведении 1 : 10 (Фиг. 21А). Сигнал тау-белка р217+ был на низком уровне в течение ~ 2 минут после термической обработки, впоследствии возвращался к уровням, наблюдаемым в CSF без добавок, сохранял стабильность до ~ 10 минут нагревания, а затем падал.

**[00287]** Влияние нагревания на интактную CSF. Аликвоты объединенной CSF от пациентов с БА нагревали в течение 0-20 минут при 95 °С, впоследствии охлаждали до 4 °С, а затем измеряли с помощью анализа рТ3хрТ82 в разведении 1 : 10 (Фиг. 21В). Сигнал р217+ тау-белка был стабильным в течение ~ 10 минут нагревания, а затем падал.

**[00288]** Влияние нагревания на способность гуманизированного mAb рТ3 создавать помехи анализу рТ3хрТ82. Аликвоты гуманизированного mAb рТ3 в концентрации 10 мкг/мл в PBS нагревали в течение 0-20 минут при 95 °С, впоследствии охлаждали до 4 °С. Впоследствии эти пробы смешивали с объединенной CSF от пациентов с БА (до конечной концентрации гуманизированного mAb к рТ3 1 мкг/мл) и

инкубировали в течение 2 часов при 22 °С, а затем измеряли с использованием анализа рТ3хрТ82 в разведении 1 : 10 (Фиг. 21С). Сигнал р217+ тау-белка был низким в течение ~ 2 минут термической обработки JNJ, впоследствии возвращался к уровням, наблюдаемым в CSF без добавок (см. Фиг. 21В) и был стабильным в течение по меньшей мере 20 минут нагревания.

**[00289]** Параллельно алиquotы смешанной CSF от пациентов с БА добавляли титры гуманизованного mAb рТ3, инкубировали в течение 2 ч при 22 °С, впоследствии подвергали либо процессу термической денатурации (нагревание 4 минуты) (Фиг. 122А), либо иммунному захвату/офВЭЖХ (Фиг. 22В), после чего выполняли изменение с использованием анализа рТ3хрТ82. Оба способа продемонстрировали вызванное гуманизованным mAb рТ3 дозозависимое увеличение сигнала связанного, снижение свободного и отсутствие изменения общего р217+ тау-белка. Кроме того, способ с термическим денатурированием дал сопоставимую зависимость от дозы гуманизованного mAb рТ3 и относительные показатели свободного, связанного и общего р217+, в сравнении с применением более трудоемкой методики иммунного захвата/офВЭЖХ в анализе 1 (Фиг. 22С). Таким образом, для стандартного анализа проб рекомендуется использовать термический способ.

**[00290] Пример 10. Сигнал р217+ тау-белка в доклинических животных моделях**

**[00291]** Для поддержки доклинических исследований оценивали интактные пробы от различных распространенных лабораторных животных с использованием анализов на основе рТ3 и/или сопоставления последовательностей для прогнозирования перекрестной реактивности.

**[00292] Яванский макак**

**[00293]** В CSF от двух яванских макаков провели измерения с использованием анализов на основе рТ3 и анализов на основе hТ7 при различных разведениях (Фиг. 23). Для возможности сравнения одни и те же детекторные антитела сочетали с каждым из двух захватных антител. В некоторых случаях две индивидуальные CSF тестировали отдельно (Суно-1 или Суно-2), а в других случаях пробы CSF объединяли для экономии объема. Во всех анализах наблюдали существенный сигнал (АЕВ) при использовании hТ7 в качестве захватного антитела, независимо от детекторного антитела, но ни в одном из анализов с использованием рТ3 в качестве захватного антитела сигнал не обнаруживали. Кроме того, планшетные анализы на основе рТ3 показали, что даже в гомогенатах головного мозга яванских макаков рТ3-сигнал был очень слабым или отсутствовал, несмотря на большой сигнал в человеческом мозге пациентов с БА (данные не показаны). Это говорит о том, что, несмотря на высокие уровни тау-белка, эпитоп рТ3 у этого вида отсутствует. Действительно, анализ опубликованных белковых последовательностей показывает, что одна аминокислота в эпитопе рТ3 человека и яванского макака различается, и структурное моделирование на основе кристаллической структуры гуманизованного mAb рТ3 с тау-белком предполагает, что это изменение может

предотвратить связывание с pT3 (данные не показаны).

**[00294]** *Обыкновенная игрушка*

**[00295]** Измерения в CSF обыкновенной игрушки проводили с использованием анализов на основе pT3 и hT7 (Фиг. 24). Измерения в CSF трех обыкновенных игрушек проводили при различных разведениях с использованием анализов pT3xhT43, pT3xpT82 и hT7xpT82. Для возможности сравнения одновременно тестировали объединенную CSF яванского макака (отрицательный контроль) и объединенную CSF от людей с БА (положительный контроль). Существенный сигнал (АЕВ) наблюдали в CSF игрушки при использовании анализов pT3xpT82 (Фиг. 24B) и hT7xpT82 (Фиг. 20C), но не с помощью анализа pT3xhT43 (Фиг. 24A).

**[00296]** Это предполагает, что эпитоп hT43 отсутствует у данного вида, и, более того, сопоставление последовательностей белка указывает на различие одной аминокислоты в эпитопе hT43 у человека и обыкновенной игрушки с сохранением при этом эпитопов pT3, hT7 и pT82. Измерение в гомогенате головного мозга игрушки теми же анализами подтвердило наличие существенного сигнала при использовании анализов pT3xpT82 и hT7xpT82, но очень слабого сигнала при анализе pT3xhT43 (данные не показаны). Таким образом, анализ сигнала p217+ тау-белка у игрушки был обеспечен при использовании pT3xpT82.

**[00297]** *Мышь, крыса, собака, свинья*

**[00298]** Сопоставление прогнозируемых аминокислотных последовательностей тау-белка у мыши, крысы, собаки и свиньи (номера доступа NCBI соответственно: NP\_001033698.1, NP\_058908.2, NP\_001104271.1 и AGJ26517.1) с человеческой последовательностью указывает на 100% сохранение pT3 у этих видов. Однако последовательности hT43 и pT82 мыши, крысы, собаки и свиньи не идентичны человеческим последовательностям, и, таким образом, пробы от этих видов необходимо оценивать с использованием анализов pT3xhT43 и pT3xpT82.

**[00299]** Взятые вместе, представленные данные показывают, что анализам pT3xhT43 и pT3xpT82, разработанным на платформе Simoa для измерений в CSF, свойственна высокая чувствительность, фемтограммовая чувствительность, прецизионность, точность, линейность при разбавлении и стабильность при анализе. Анализы, по-видимому, хорошо коррелируют с классическими биомаркерами БА и шкалами деменции и могут превосходить эти показатели в плане идентификации БА у пациентов и определении стадий БА.

**[00300]** Эти анализы можно использовать для измерения уровня общего p217+ тау-белка в CSF или для оценки профиля фрагментов p217+ в CSF, фракционированной методом офВЭЖХ. Анализы можно также комбинировать с предварительными манипуляциями для измерения уровней p217+ тау-белка, связанного с эндогенными или экзогенно введенными антителами, в сравнении с p217+ тау-белком, не связанным с антителами. Таким образом, такие анализы можно использовать в качестве прогностических биомаркеров для идентификации пациентов, для которых будет

приемлема терапия антителами к p217+ тау-белку, путем идентификации пациентов с высокими уровнями целевого p217+ тау-белка. При измерении уровней общего, свободного и связанного с терапевтическим антителом p217+ тау-белка, анализы можно также использовать в качестве фармакодинамических маркеров.

**[00301] Пример 11. Сигнал p217+ тау-белка в крови**

**[00302]** Хотя была доказана состоятельность измерения тау-белка в CSF при диагностике и определении стадии нейродегенеративных расстройств, взятие CSF имеет ограничения (такие как нагрузка на пациента, опыт, имеющийся у клинического центра, ограничения по забираемому объему и частоте). Таким образом существует большой интерес к адаптации измерений тау-белка для применения на продуктах из крови (например, на сыворотке или плазме крови). Однако недавние литературные данные показали, что измерения тау-белка в исходной сыворотке или плазме не демонстрируют идеальной диагностической эффективности, и в этом случае может страдать чувствительность и могут наблюдаться мешающие влияния со стороны матрикса образца. Однако анализы на основе pT3 могут предоставлять новую возможность, благодаря высокой чувствительности и специфичности.

**[00303]** В сыворотке от пациентов, имеющих по клиническим данным БА или являющихся НВ (n=4 в каждой группе), провели измерения при помощи анализов pT3xpT82 и hT7xpT82, либо в исходной пробе при разных разведениях («исходная», Фиг. 25A-25D), либо в обработанном кислотой (NaOAc pH 5) и денатурированной пробе («кипяченая», Фиг. 26A-26B) как в публикации D'Abramo et al. 2016 для удаления большей части влияний матрицы, либо после иммунной преципитации (IP) с гранулами pT3 с последующей термической денатурацией элюата («pT3 IP», Фиг. 27).

**[00304]** Измерение в исходной сыворотке показало, что сигнал в большинстве проб был ниже предела количественного определения (LOQ) при нескольких выпадающих пробах, в которых уровни были намного более высокими. Однако этот сигнал не выдерживал умеренного разведения, и считается, что он представляет собой артефакт мешающих влияний. Оценка наибольшего исследуемого разведения (Фиг. 25B и 25D) и, следовательно, имеющего наименьшее мешающее влияние, показала, что анализ pT3xpT82 может обнаруживать несколько больший сигнал в пробах от пациентов с БА, но все они ниже LOQ, поэтому они могут быть не точными и/или не прецизионными.

**[00305]** Измерение в сыворотке после кислотной обработки (для диссоциации белок-белковых взаимодействий) и нагревания (для денатурации большей части белков, не являющихся тау-белком) снижало все сигналы pT3xpT82 и hT7xpT82 до значений близких к LOQ или ниже его (Фиг. 26A-26B). Кроме того, с помощью анализа pT3xpT82 можно обнаруживать несколько больший сигнал в пробах от пациентов с БА, но все они близки к LOQ, поэтому могут быть не точными и/или не прецизионными.

**[00306]** Измерение в сыворотке после pT3-IP и денатурирования для удаления большинства мешающих веществ и концентрирования p217+ тау-белка выявило гораздо более высокие уровни в пробах от пациентов с БА, чем в пробах от пациентов НВ (Фиг.

27). Концентрации p217+ были в ~ 4 раза выше, чем в исходных или кипяченых пробах, и по существу пробы HV теперь находились на уровне LOQ, а все пробы от пациентов БА были в линейном диапазоне.

[00307] Эти результаты указывают на то, что анализы на основе pT3, описанные в настоящем документе, могут быть использованы для измерения патологического тау-белка в крови, особенно в комбинации со стратегией обогащения, такой как IP.

[00308] Хотя изобретение включает подробное описание со ссылкой на конкретные варианты его осуществления, специалисту в данной области будет очевидно, что в него могут быть внесены различные изменения и модификации, без отступления от сущности и объема изобретения.

### СПИСОК СПРАВОЧНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Abhinandan and Martin, *Mol Immunol*. 45:3832-9, 2008.
- Almagro, *Mol Recognit*. 17:132-43, 2004.
- Barthelemy et al., *J Alzheimers Dis*. 51(4):1033-43, 2016.
- Butner and Kirschner, *J Cell Biol*. 115(3):717-30, 1991.
- Chothia and Lesk, *J Mol Biol*. 196:901-17, 1987.
- Chothia et al., *J. Mol. Biol*. 227: 799-817, 1992.
- Clavaguera et al., *Nat Cell Biol*. 11:909-13, 2009.
- D'Abramo et al *Neurobiol Aging*. 37:58-65, 2016.
- Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)
- Fishwild et al., *Nat Biotechnol*. 14:845-51, 1996.
- Frost et al., *J Biol Chem*. 284:12845-52, 2009.
- Hanger et al. *J Biol Chem*. 282(32):23645-54, 2007.
- Hanger et al., *Trends Mol Med*. 15:112-9, 2009.
- Iqbal et al., *Curr Alzheimer Res*. 7(8): 656-664, 2010.
- Knappik et al., *J Mol Biol*. 296:57-86, 2000.
- Kohler and Milstein, *Nature*. 256:495-7, 1975.
- Krebs et al., *J Immunol Methods*. 254:67-84, 2001.
- Lefranc et al., *Dev Comp Immunol*. 27:55-77, 2003.
- Lonberg et al., *Nature*. 368:856-9, 1994.
- Mendez et al., *Nat Genet*. 15:146-56, 1997.
- Meredith et al. *PLoS One*. 8(10):e76523, 2013.
- Morris et al., *Neuron*, 70:410-26, 2011.
- Russell et al., *J Alzheimers Dis*. 55(1):303-313, 2017.
- Shi et al., *J Mol Biol*. 397:385-96, 2010.
- Tramontano et al., *J. Mol. Biol*. 215:175-182, 1990.
- Wu and Kabat, *J Exp Med*. 132:211-50, 1970.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий:

(а) вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 18; и

(б) область, определяющую комплементарность легкой цепи иммуноглобулина (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи, которая содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 15, 16 и 17 соответственно;

где выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывает тау-белок в эпителии, содержащем аминокислотные остатки от 7 до 20 тау-белка, нумерация аминокислотных остатков соответствует аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1.

2. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где вариабельная область тяжелой цепи содержит область, определяющую комплементарность тяжелой цепи (HCDR) 2 и HCDR3, которые содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13 и 14, соответственно.

3. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или п. 2, где вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая на 95% идентична SEQ ID NO: 19.

4. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, где LCDR1, LCDR2 и LCDR3 состоят из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 15, 16 и 17 соответственно.

5. Набор, содержащий:

(а) композицию, содержащую захватывающее антитело, содержащее

(i) область, определяющую комплементарность тяжелой цепи иммуноглобулина (HCDR) 1, HCDR2 и HCDR3, которые содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 32, 33 и 34, соответственно, и

(ii) область, определяющую комплементарность легкой цепи иммуноглобулина (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3, которые содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 35, 36 и 37 соответственно; и

(b) композиция, содержащая детектирующее антитело, содержащее

(i) переменный участок тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 18; и

(b) иммуноглобулины LCDR1, LCDR2 и LCDR3 переменной области легкой цепи, которые содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 15, 16 и 17, соответственно,

в которых детектирующее антитело связывает тау-белок в эпитопе, содержащем аминокислотные остатки от 7 до 20 тау-белка, где нумерация аминокислотных остатков соотносится с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1.

6. Набор по п.5, в котором захватывающее антитело содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29.

7. Набор по п.5 или 6, в котором переменная область тяжелой цепи детектирующего антитела содержит HCDR2 и HCDR3, которые содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13 и 14, соответственно.

8. Набор по любому из пп.5-7, в котором переменная область легкой цепи детектируемого антитела содержит аминокислотную последовательность, которая на 95% идентична SEQ ID NO: 19.

9. Способ измерения p217+ тау-пептидов в образце, включающий:

(a) контактирование образца с композицией, содержащей захватывающее антитело, для захвата p217+ тау-пептидов в образце, при этом захватывающее антитело содержит

(i) область, определяющую комплементарность тяжелой цепи иммуноглобулина (HCDR) 1, HCDR2 и HCDR3, которая содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 32, 33 и 34, соответственно, и

(ii) область, определяющую комплементарность легкой цепи иммуноглобулина (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3, которая содержит аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 35, 36 и 37 соответственно; и

(b) контактирование захваченных p217+ тау-пептидов с композицией, содержащей детектирующее антитело, для измерения таким образом количества p217+ тау-пептидов, при этом детектирующее антитело содержит

(i) вариабельный участок тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 18; и

(b) иммуноглобулины LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи, которые содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 15, 16 и 17, соответственно,

где детектирующее антитело связывает тау-белок в эпитопе, содержащем аминокислотные остатки от 7 до 20 тау-белка, в котором нумерация аминокислотных остатков приведена со ссылкой на аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1.

10. Способ по п.9, в котором захватывающее антитело содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29.

11. Способ по п.9 или п.10, в котором вариабельная область тяжелой цепи детектирующего антитела содержит HCDR2 и HCDR3, которые содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13 и 14, соответственно.

12. Способ по любому из пп.9-11, в котором вариабельная область легкой цепи детектируемого антитела содержит аминокислотную последовательность, которая на 95% идентична SEQ ID NO: 19.



13. Способ по любому из пп.9-12, в котором образец представляет собой биологический образец от субъекта-человека.

14. Способ по п.13, в котором биологический образец отбирают из группы, состоящей из крови, гомогената головного мозга и спинномозговой жидкости (ликвора) субъекта.

15. Способ по п.13 или 14, дополнительно включающий фракционирование биологического образца с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с обратной фазой (rpHPLC) перед контактом образца с композицией, содержащей захватывающее антитело.

16. Способ по п.13 или 14, дополнительно включающий определение того, страдает ли субъект таупатией или подвержен риску развития таупатии, включающий сравнение количества p217+ тау-пептидов у субъекта с соответствующим исходным значением, где увеличение количества по сравнению с исходным уровнем указывает на то, что субъект страдает таупатией или находится в группе риска от нее.

17. Способ по п.13 или 14, дополнительно включающий определение эффективности лечения таупатии у субъекта, включающий сравнение количества p217+ тау-пептидов у субъекта с соответствующим исходным значением, при этом уменьшение количества по сравнению с исходным значением указывает на эффективность лечения.

18. Способ по п.16 или 17, в котором таупатию выбирают из группы, состоящей из состоящей из семейной болезни Альцгеймера, спорадической болезни Альцгеймера, лобно-височной деменции с паркинсонизмом, связанной с хромосомой 17 (FTDP-17), прогрессирующего супрануклеарного пареза взора, кортикобазальной дегенерации, болезни Пика, прогрессирующего субкортикального глиоза, деменции с преобладанием нейрофибриллярных клубков, диффузных нейрофибриллярных клубков с кальцификацией, деменции с аргирофильными зернами, комплекса амиотрофического бокового склероза - паркинсонизма - деменции, синдрома Дауна, болезни Герстманна - Штреусслера - Шейнкера, болезни Галлервордена - Шпатца, миозита с тельцами включения,

болезни Крейтцфельда - Якоба, множественной системной атрофии, болезни Ниманна - Пика типа С, прионной церебральной амилоидной ангиопатии, подострого склерозирующего панэнцефалита, миотонической дистрофии, негуамской мотонейронной болезни с нейрофибриллярными клубками, постэнцефалитного паркинсонизма, хронической травматической энцефалопатии и dementia pugilistica (деменции боксеров).

19. Способ по п.18, в котором таупатией является болезнь Альцгеймера.

20. Способ измерения p217+ тау-пептидов в образце, включающий:

- (а) контактирование образца с композицией, содержащей захватывающее антитело, для захвата p217+ тау-пептидов в образце, где захватывающее антитело содержит область, определяющую комплементарность тяжелой цепи иммуноглобулина (HCDR) 1, HCDR2 и HCDR3, которые содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 32, 33 и 34, соответственно, и область, определяющую комплементарность легкой цепи иммуноглобулина (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3, которые содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 35, 36 и 37, соответственно; и
- (б) контактирование захваченных p217+ тау-пептидов с композицией, содержащей по меньшей мере одно детектирующее антитело, выбранное из
- (i) детектирующего антитела, содержащего переменный участок тяжелой цепи иммуноглобулина, который содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 18, и иммуноглобулины LCDR1, LCDR2 и LCDR3 переменного участка легкой цепи, которые содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 15, 16 и 17, соответственно, где детектирующее антитело связывает тау-белок в эпитопе, содержащем аминокислотные остатки от 7 до 20 тау-белка, где нумерация аминокислотных остатков соответствует аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1; и
- (ii) детектирующего антитела, содержащего иммуноглобулин HCDR1, HCDR2 и HCDR3, которые содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2, 3 и 4, соответственно, и иммуноглобулин LCDR1, LCDR2 и LCDR3, которые

содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5, 6 и 7, соответственно;

для измерения, таким образом, по меньшей мере одного из количества p217+ тау-пептидов и количества длинных p217+ тау-пептидов, соответственно.

21. Способ по п.20, в котором захватывающее антитело содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29.

22. Способ по п.20 или 21, в котором переменная область тяжелой цепи детектирующего антитела (b)(i) содержит HCDR2 и HCDR3, которые содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13 и 14, соответственно.

23. Способ по любому из пп.20-22, в котором переменная область легкой цепи детектируемого антитела (b)(i) содержит аминокислотную последовательность, которая на 95% идентична SEQ ID NO: 19.

24. Способ по любому из пп.20-23, в котором образец представляет собой биологический образец от субъекта-человека.

25. Способ по п.24, в котором биологический образец отбирают из группы, состоящей из крови, гомогената головного мозга и спинномозговой жидкости (ликвора) субъекта.

26. Способ по п.24 или 25, дополнительно включающий фракционирование биологического образца с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с обратной фазой (rpHPLC) перед контактом образца с композицией, содержащей захватывающее антитело.

27. Способ по п.24 или 25, дополнительно включающий определение того, страдает ли субъект таупатией или подвержен риску развития таупатии, включающий сравнение, по меньшей мере, одного из:

(a) количество p217+ тау-пептидов,

(б) количество длинных p217+ тау-пептидов и  
(в) количество коротких p217+ тау-пептидов,  
от субъекта с соответствующим исходным значением, при этом увеличение количества по сравнению с исходным значением указывает на то, что субъект страдает таупатией или находится в группе риска от нее.

28. Способ по п.24 или 25, дополнительно включающий определение эффективности лечения таупатии у субъекта, включающий сравнение по меньшей мере одного из:

(а) количество p217+ тау-пептидов,  
(б) количество длинных p217+ тау-пептидов и  
(в) количество коротких p217+ тау-пептидов  
от субъекта с соответствующим исходным значением, при этом уменьшение количества по сравнению с исходным значением указывает на эффективность лечения.

29. Способ по п.27 или 28, в котором таупатию выбирают из группы, состоящей из семейной болезни Альцгеймера, спорадической болезни Альцгеймера, лобно-височной деменции с паркинсонизмом, связанной с хромосомой 17 (FTDP-17), прогрессирующего супрануклеарного пареза взора, кортикобазальной дегенерации, болезни Пика, прогрессирующего субкортикального глиоза, деменции с преобладанием нейрофибриллярных клубков, диффузных нейрофибриллярных клубков с кальцификацией, деменции с аргирофильными зернами, комплекса амиотрофического бокового склероза - паркинсонизма - деменции, синдрома Дауна, болезни Герстманна - Штреусслера - Шейнкера, болезни Галлервордена - Шпатца, миозита с тельцами включения, болезни Крейтцфельда - Якоба, множественной системной атрофии, болезни Ниманна - Пика типа С, прионной церебральной амилоидной ангиопатии, подострого склерозирующего панэнцефалита, миотонической дистрофии, негуамской мотонейронной болезни с нейрофибриллярными клубками, постэнцефалитного паркинсонизма, хронической травматической энцефалопатии и dementia pugilistica (деменции боксеров).

30. Способ по п.29, в котором таупатией является болезнь Альцгеймера.

31. Композиция, полученная гибридомой, композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий:

(а) переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 18; и

(б) область, определяющую комплементарность легкой цепи иммуноглобулина (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3 переменной области легкой цепи, которая содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 15, 16 и 17 соответственно;

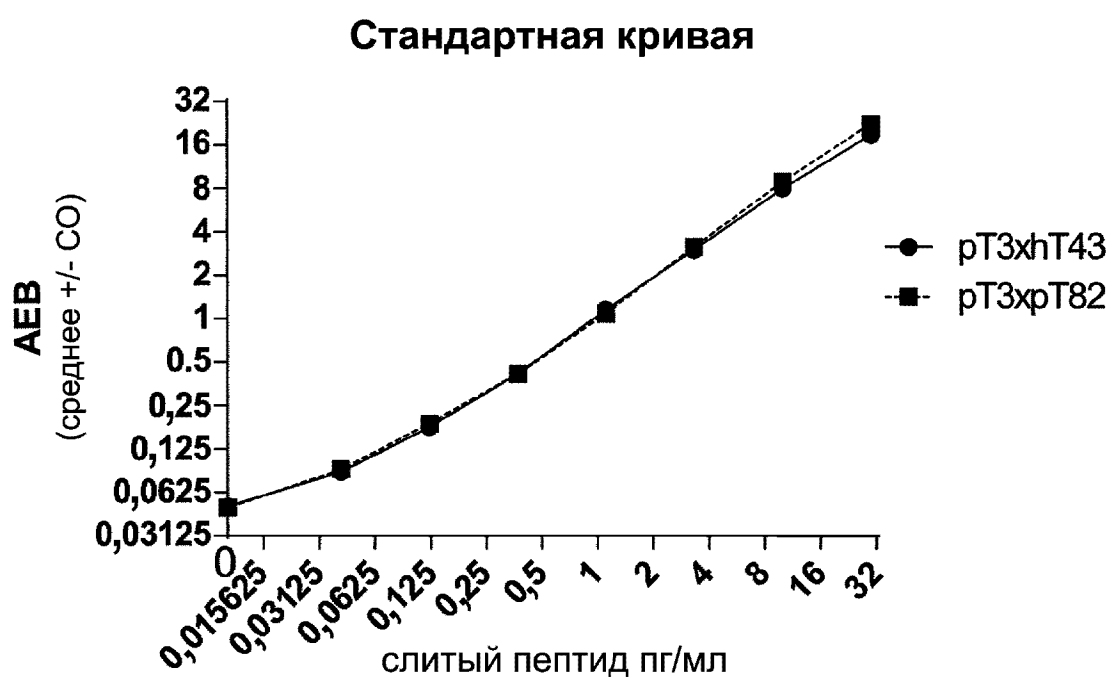
в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывает тау-белок в эпитопе, содержащем аминокислотные остатки от 7 до 20 тау-белка, нумерация аминокислотных остатков соответствует аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1.

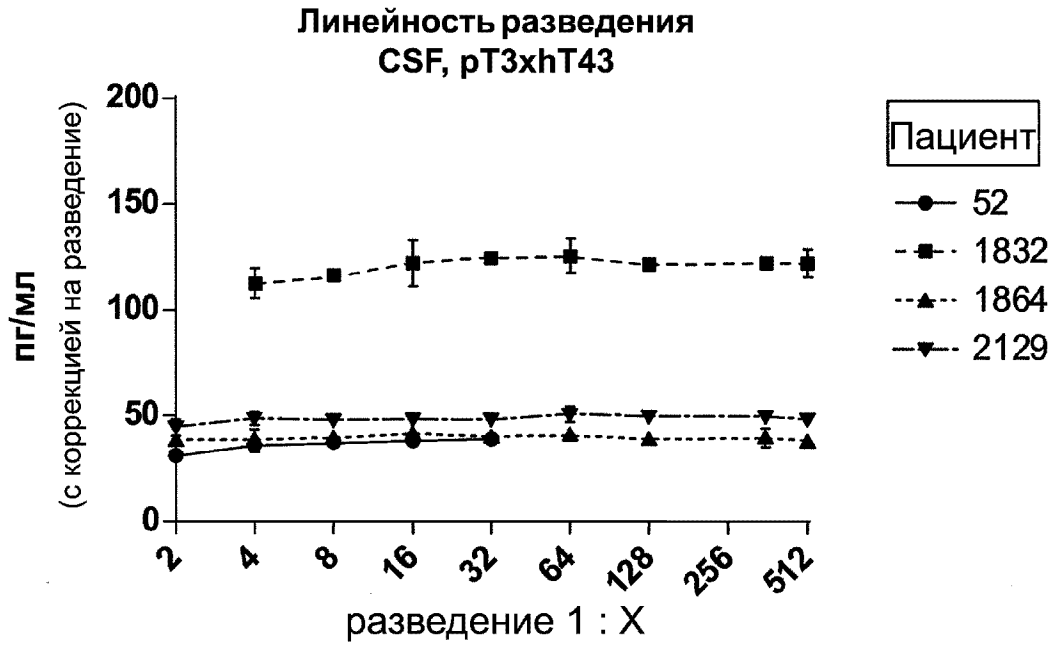
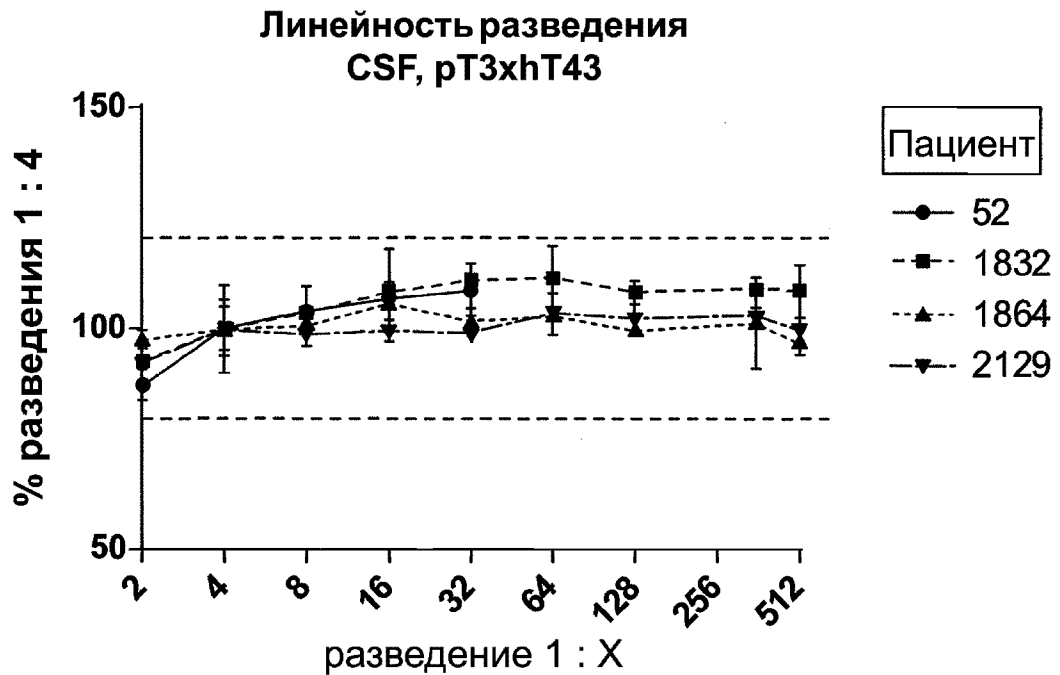
32. Композиция по п.31, в которой переменная область тяжелой цепи содержит область, определяющую комплементарность тяжелой цепи (HCDR) 2 и HCDR3, которые содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13 и 14, соответственно.

33. Композиция по п.31 или 32, в которой переменный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая на 95% идентична SEQ ID NO: 19.

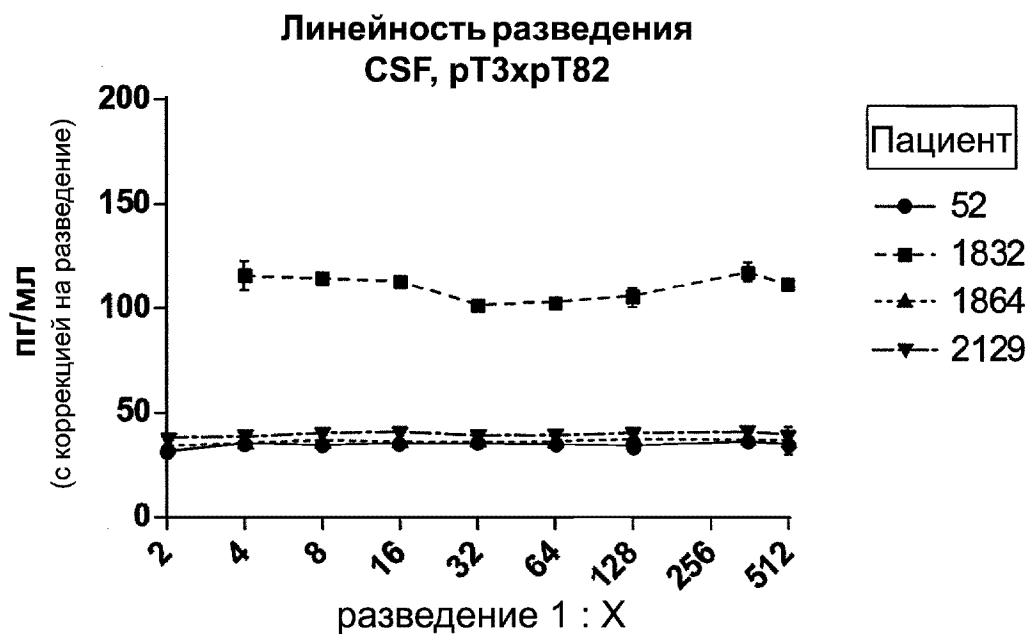
34. Композиция по любому из пп.31-33, в которой LCDR1, LCDR2 и LCDR3 состоят из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 15, 16 и 17 соответственно.

ФИГ. 1

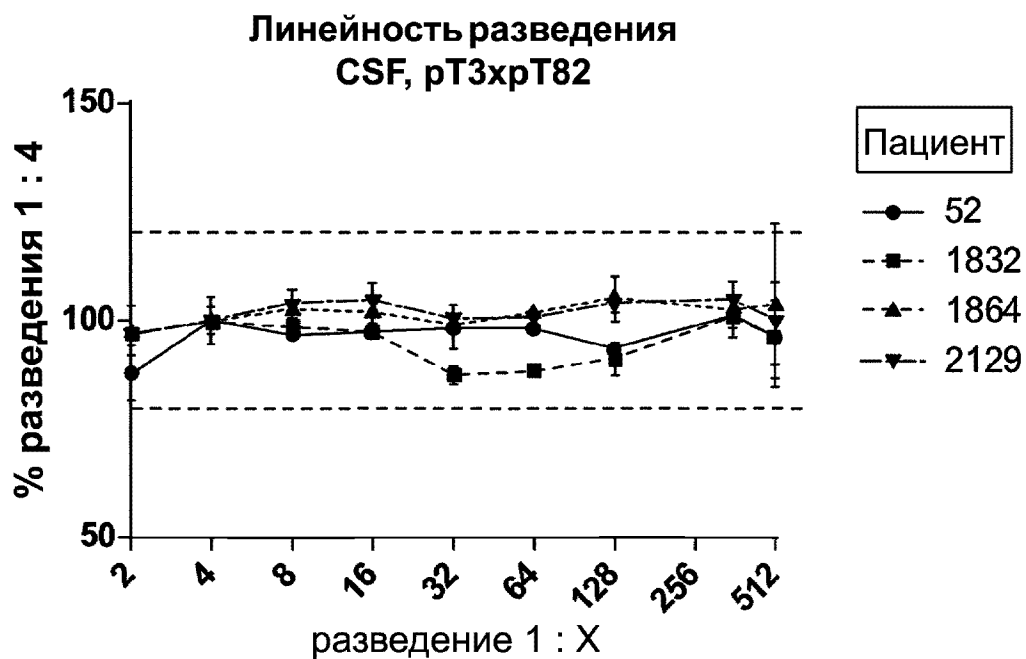


**ФИГ. 2А****ФИГ. 2В**

## ФИГ. 2С



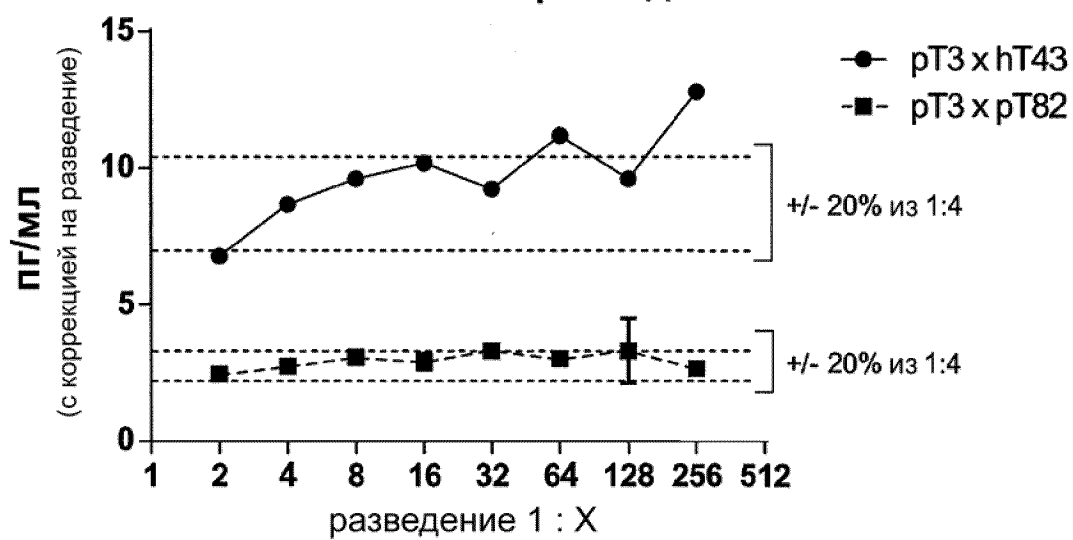
## ФИГ. 2D



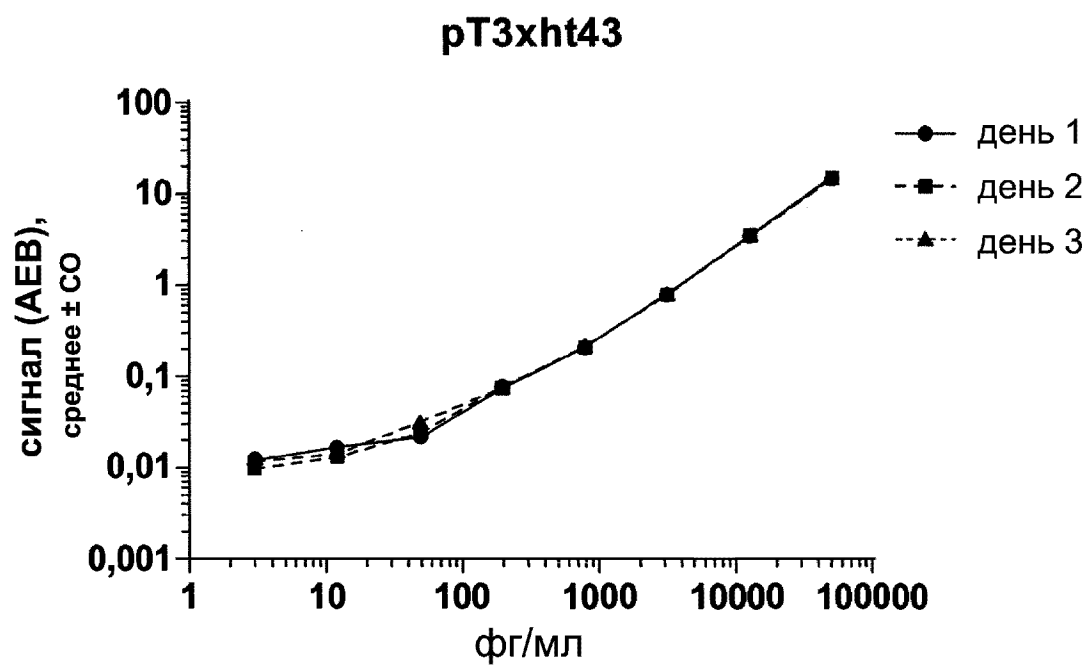


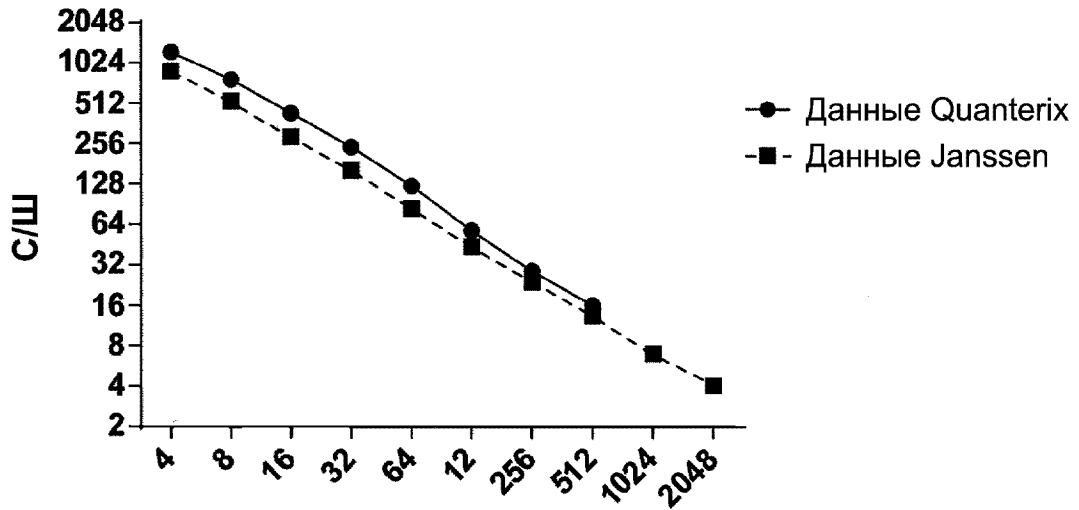
**ФИГ. 2Е**

**CSF от пациентов с норм. когнит. функциями (низкий уровень тау-белка), линейность разведения**

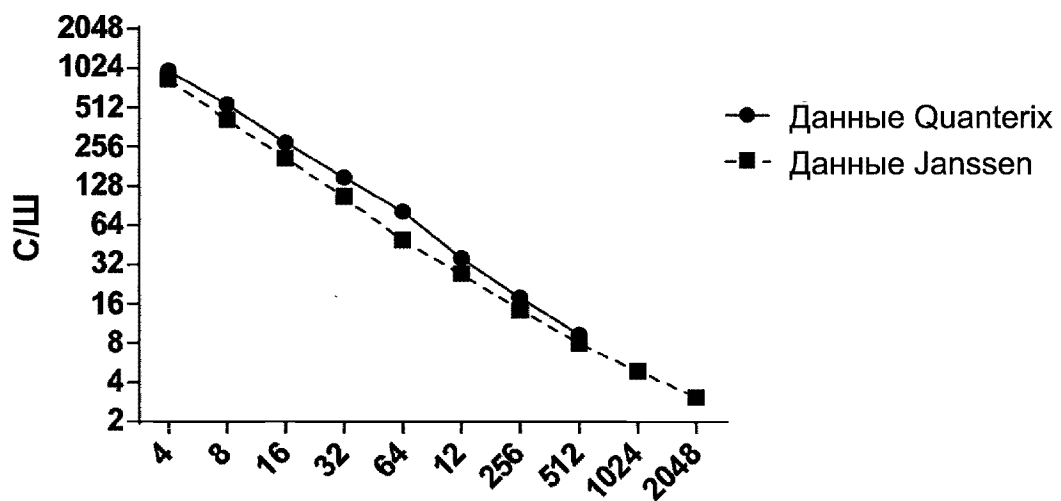


ФИГ. 3



**ФИГ. 4А****pt3xht43**

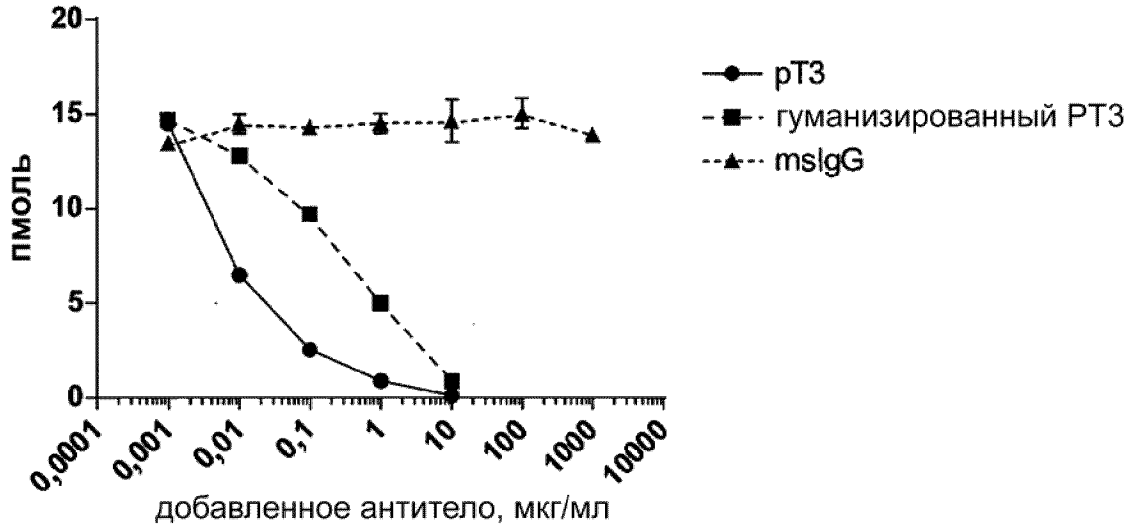
CSF от пациентов с БА, разведение 1 : X

**ФИГ. 4В****pt3xpt82**

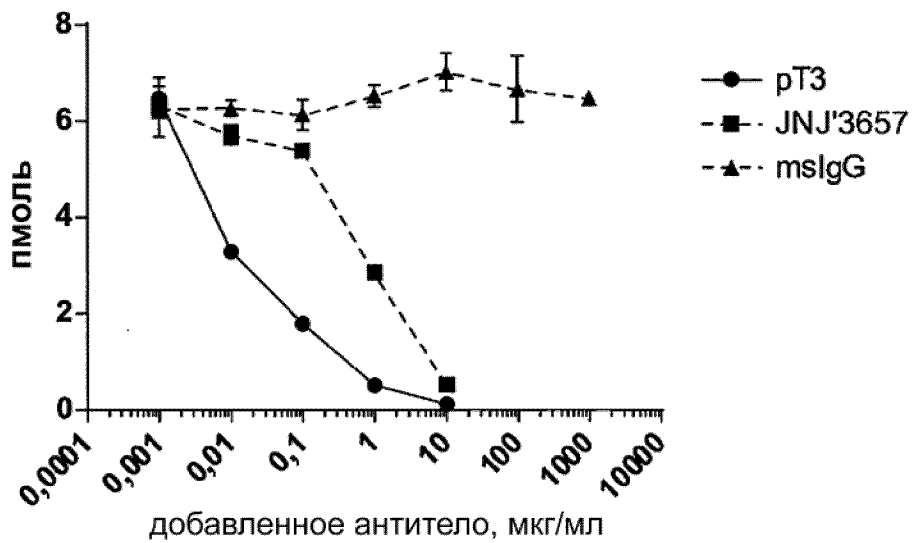
CSF от пациентов с БА, разведение 1 : X

**ФИГ. 5А**

Влияние растворимых mAb к p217+ тау-белку на сигнал pT3хhT43 в CSF

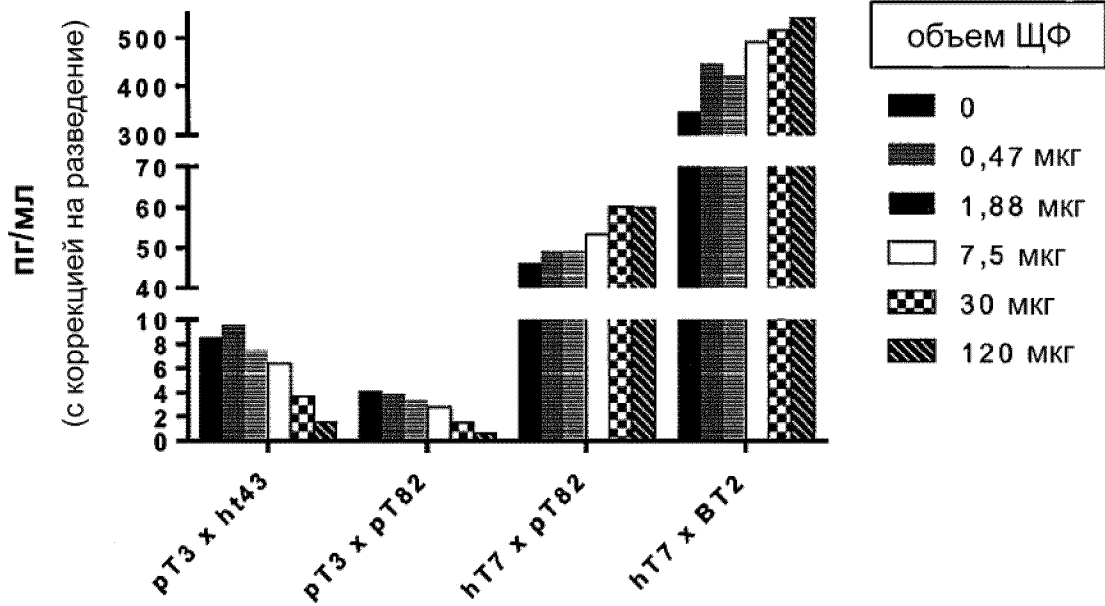
**ФИГ. 5В**

Влияние растворимых mAb к p217+ тау-белку на сигнал pT3хpT82 в CSF

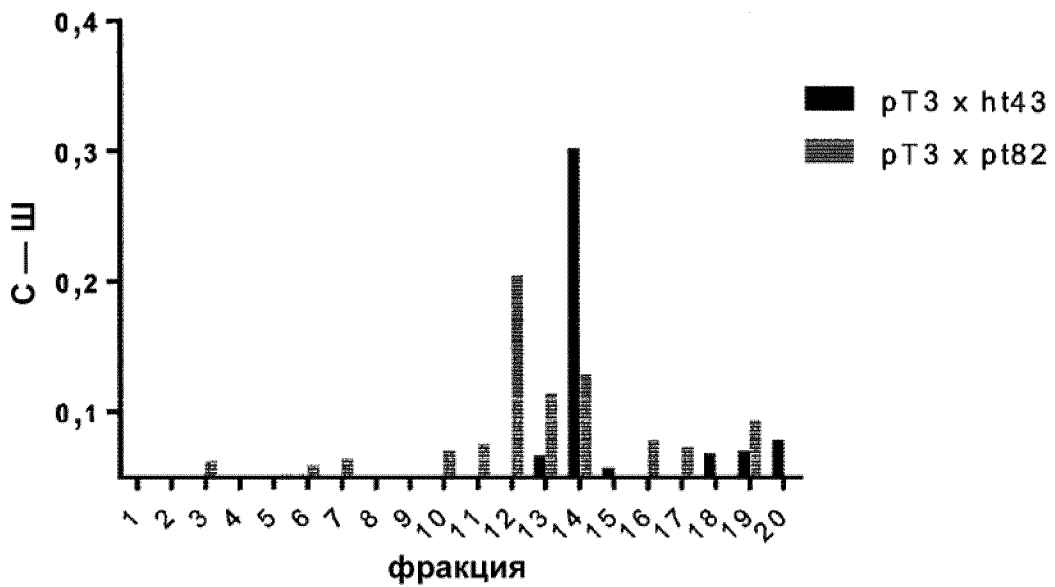


**ФИГ. 6**

Обработка CSF щелочной  
фосфатазой

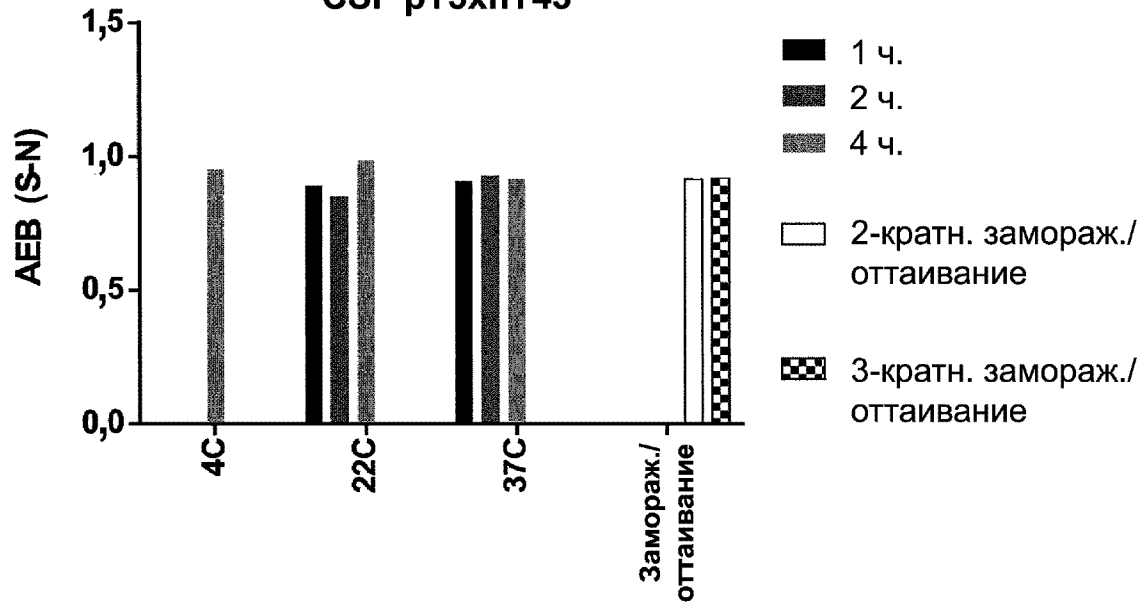
**ФИГ. 7**

Профиль p217+ тау-фрагментов

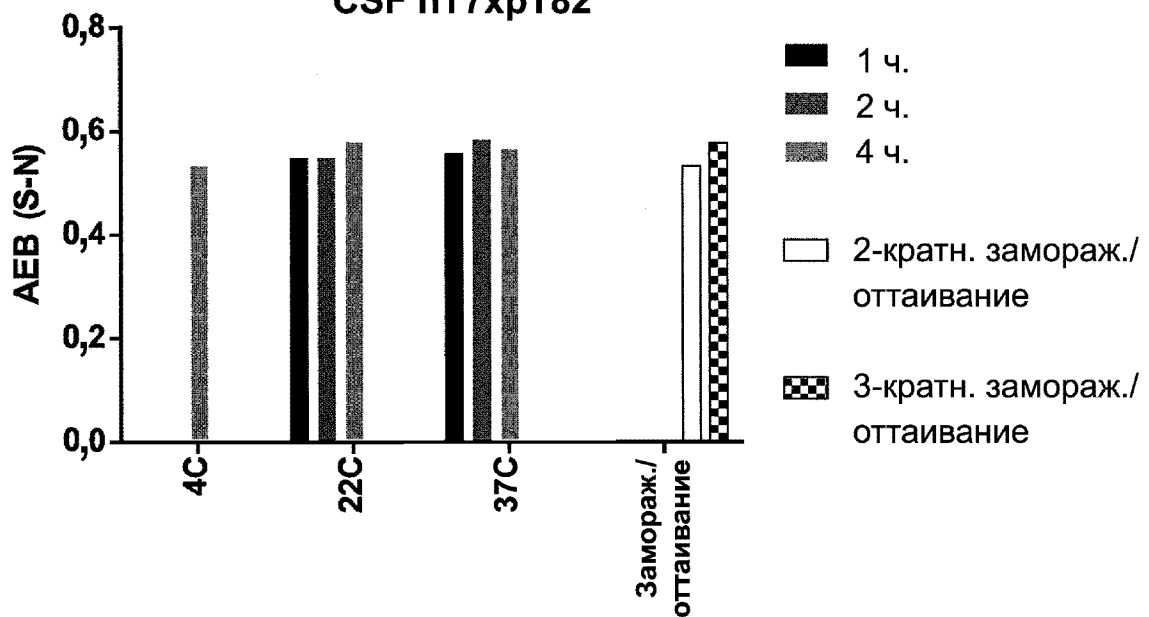


**ФИГ. 8А**

Стабильность сигнала  
CSF pT3xhT43

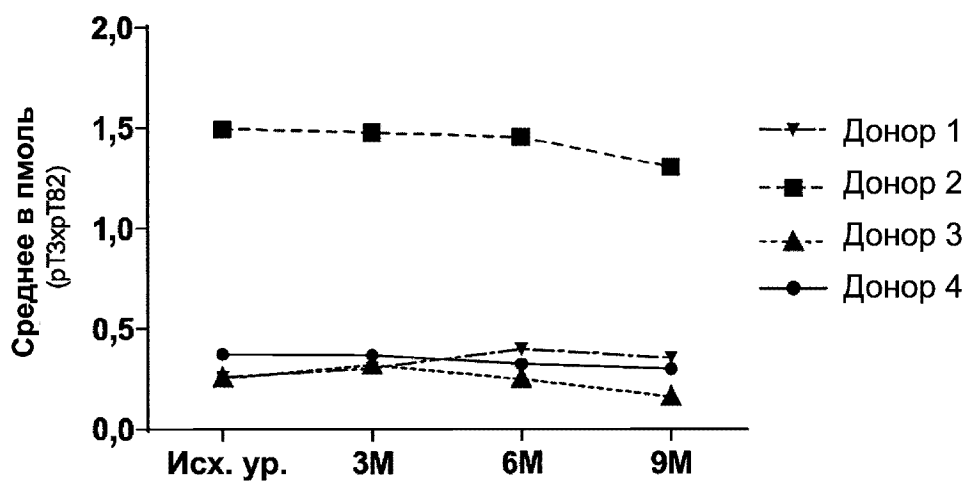
**ФИГ. 8В**

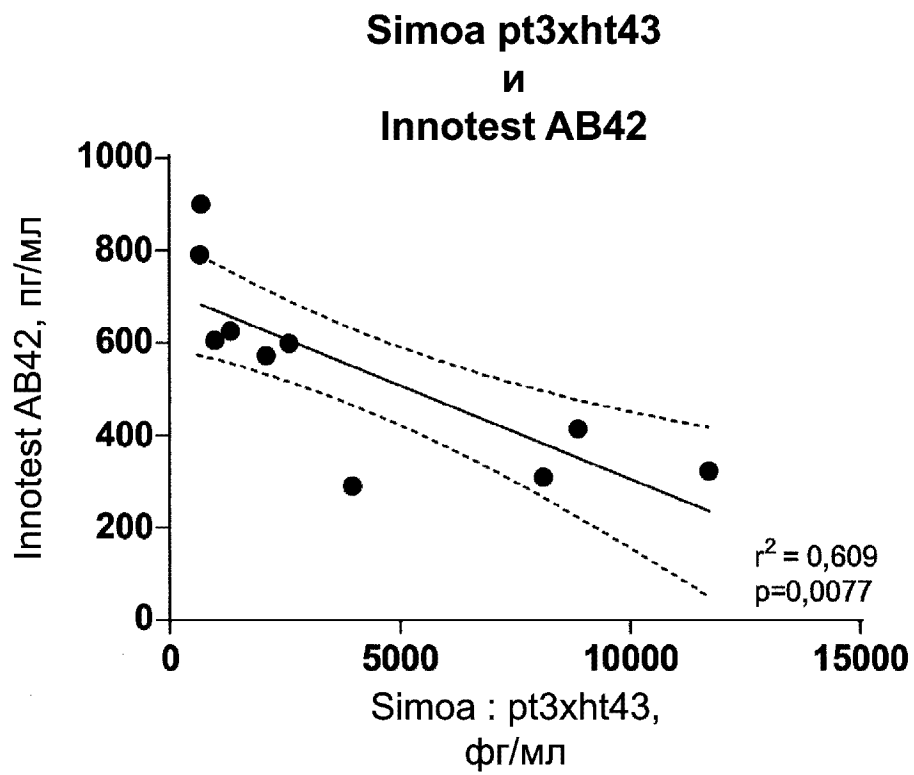
Стабильность сигнала  
CSF hT7xpT82



ФИГ. 9

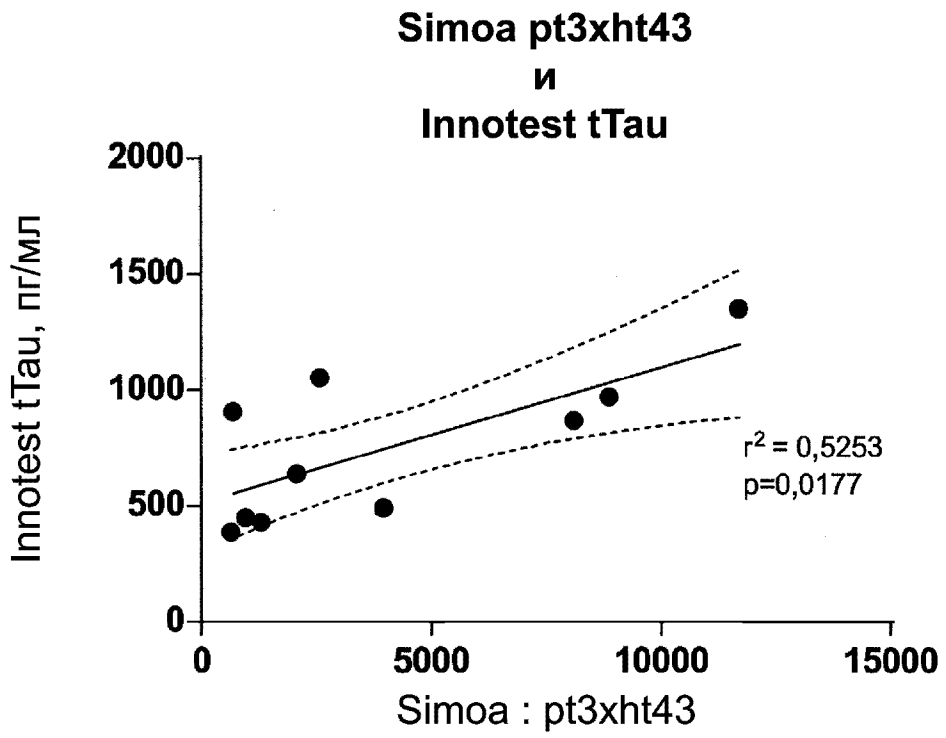
Долгосрочная стабильность CSF с p217+ тау-белком



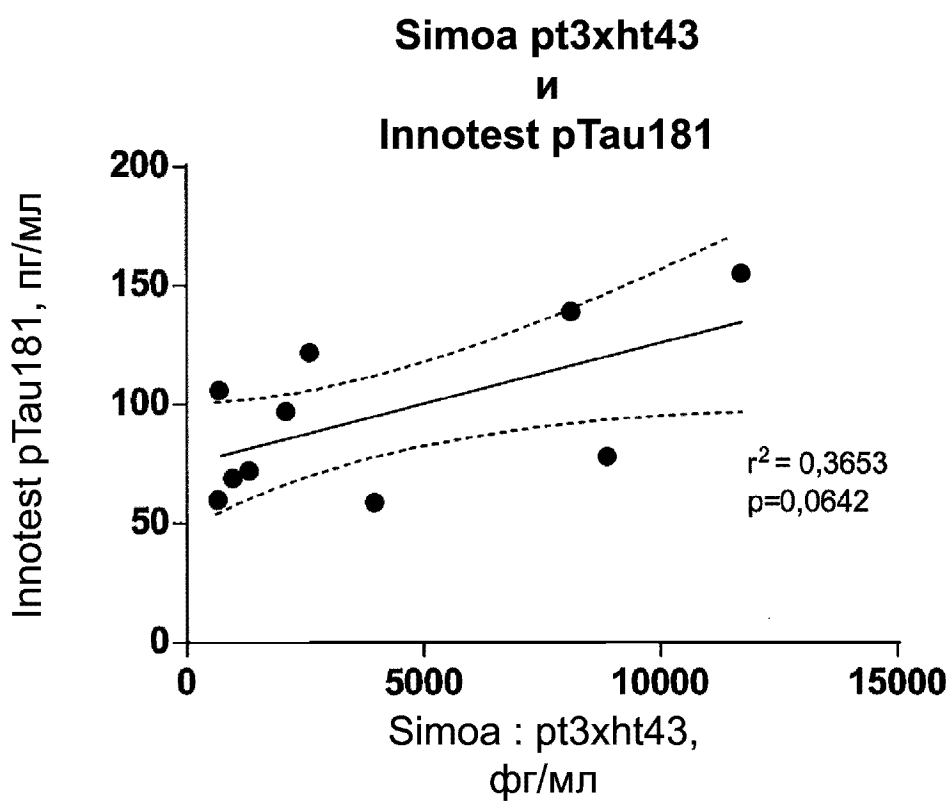
**ФИГ. 10А**



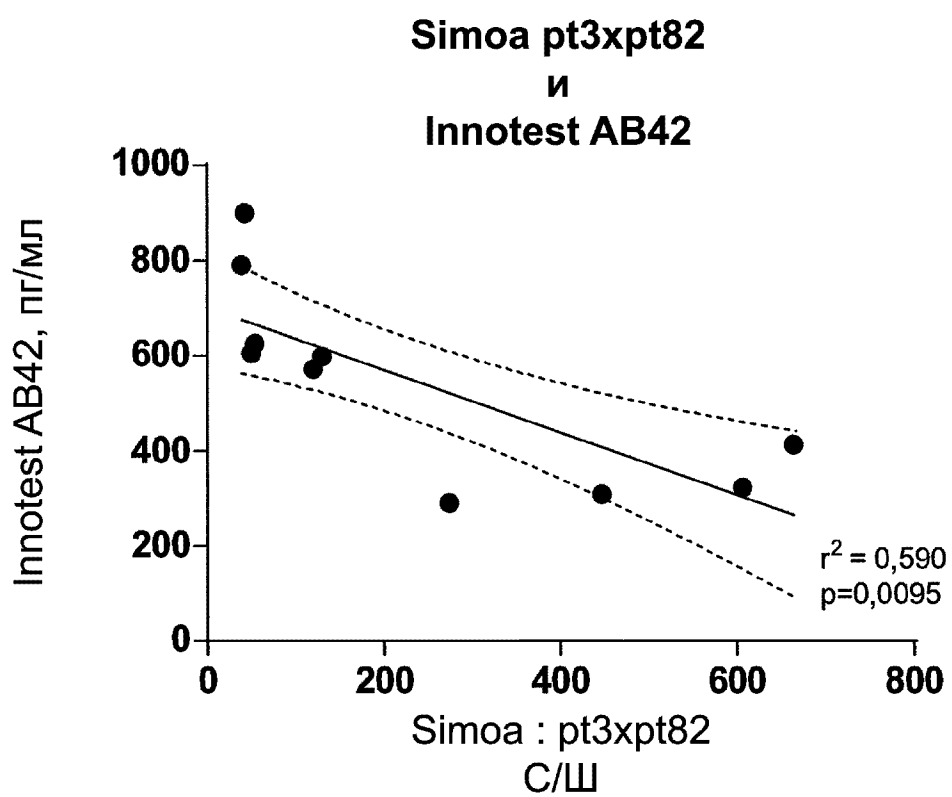
**ФИГ. 10В**

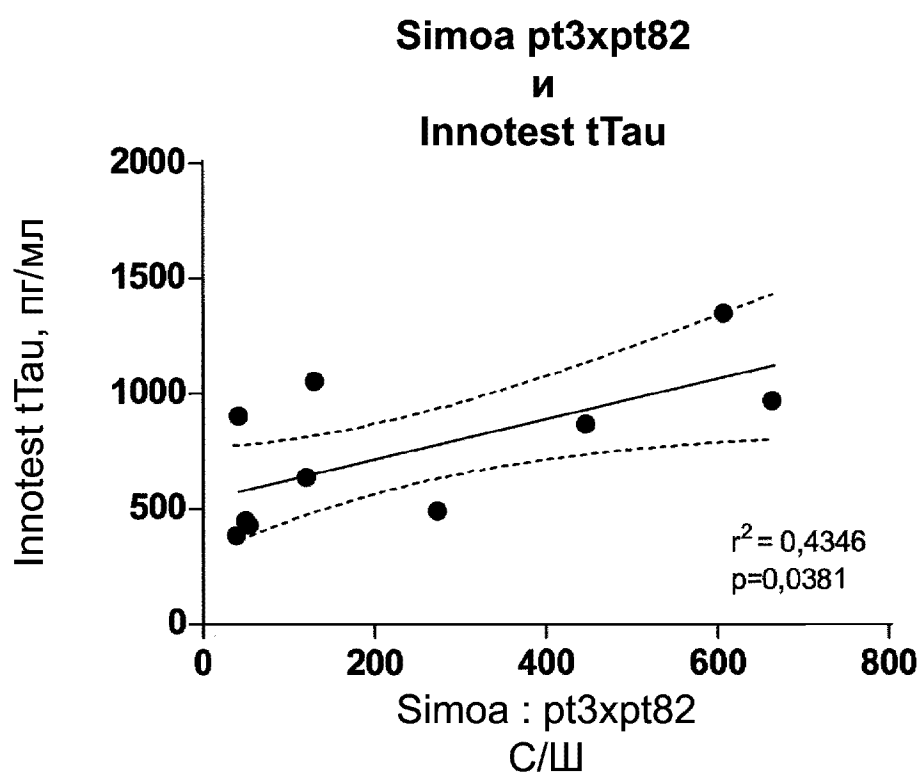


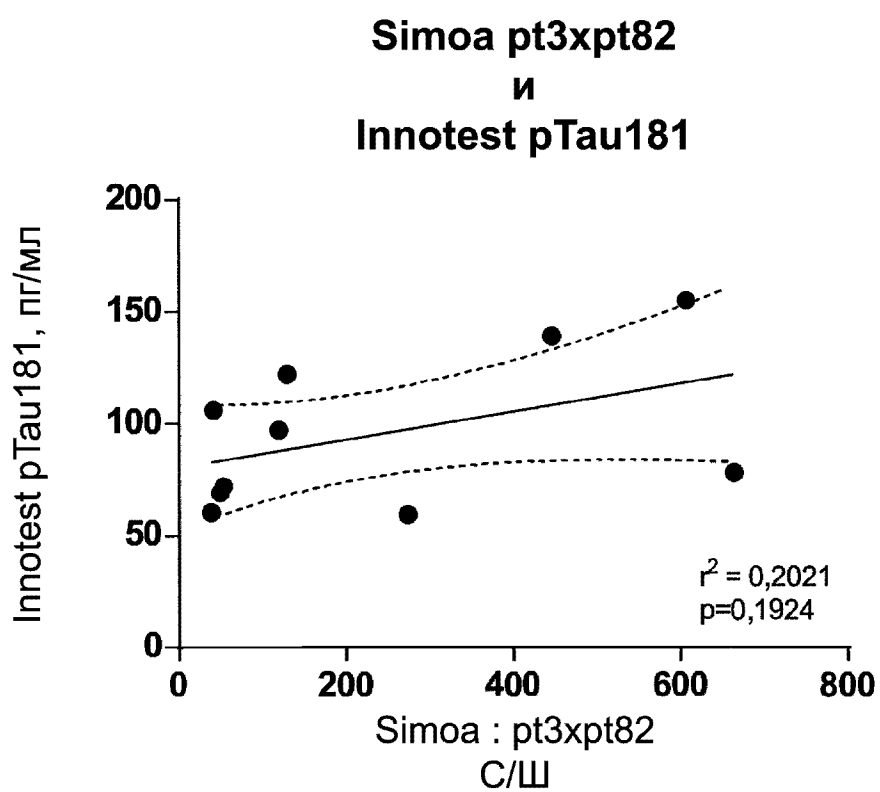
**ФИГ. 10С**

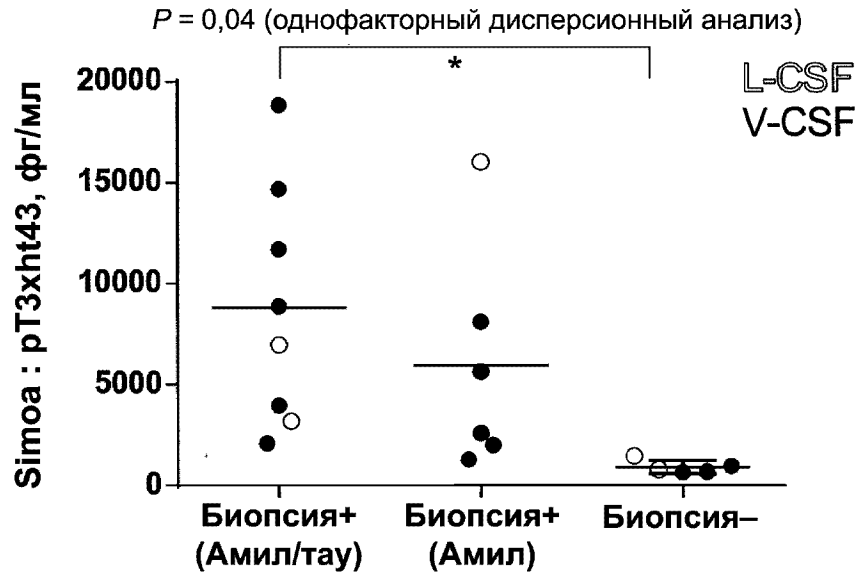
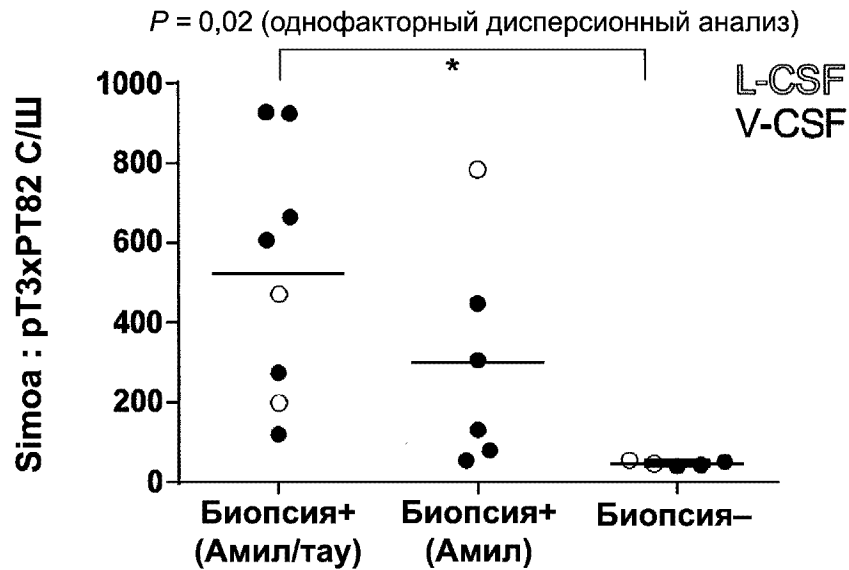


ФИГ. 10D

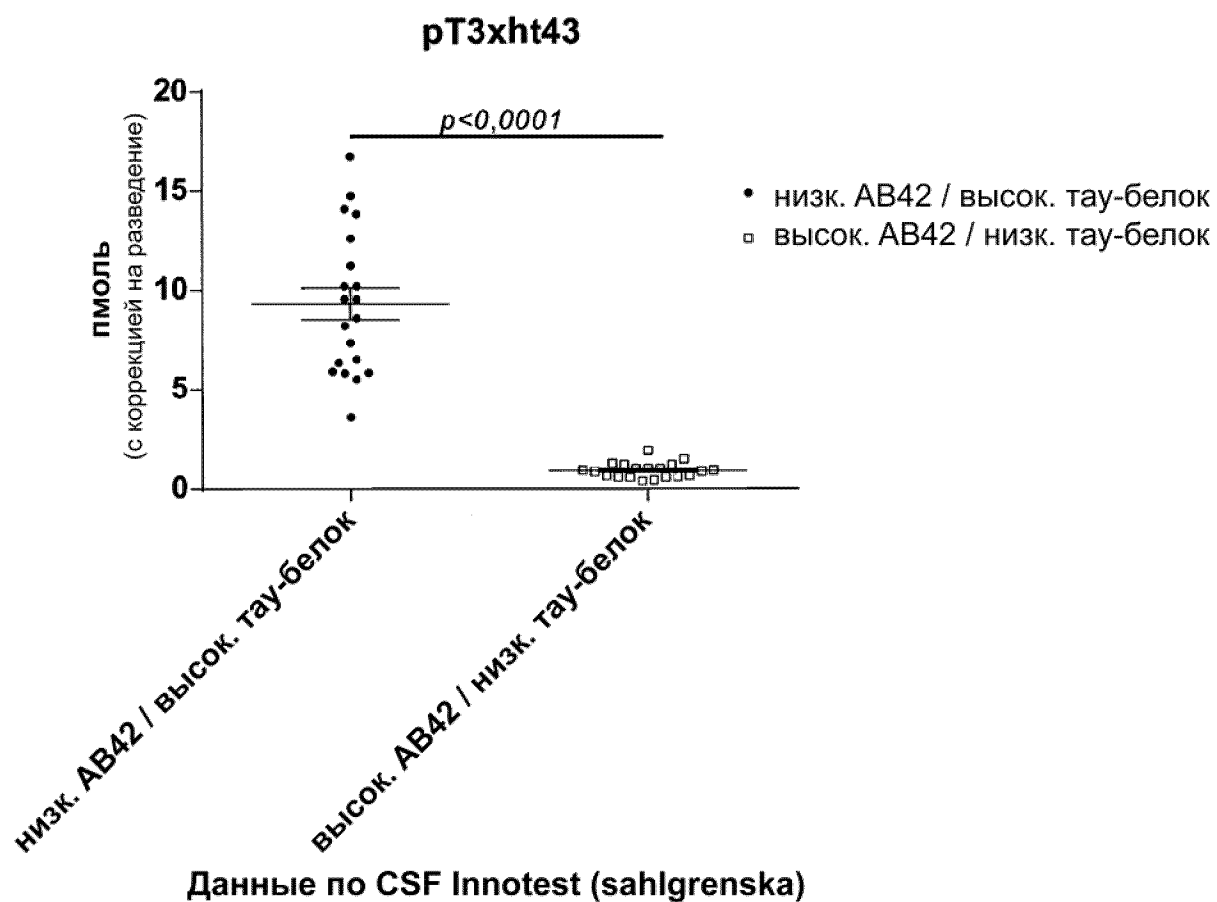


**ФИГ. 10Е**

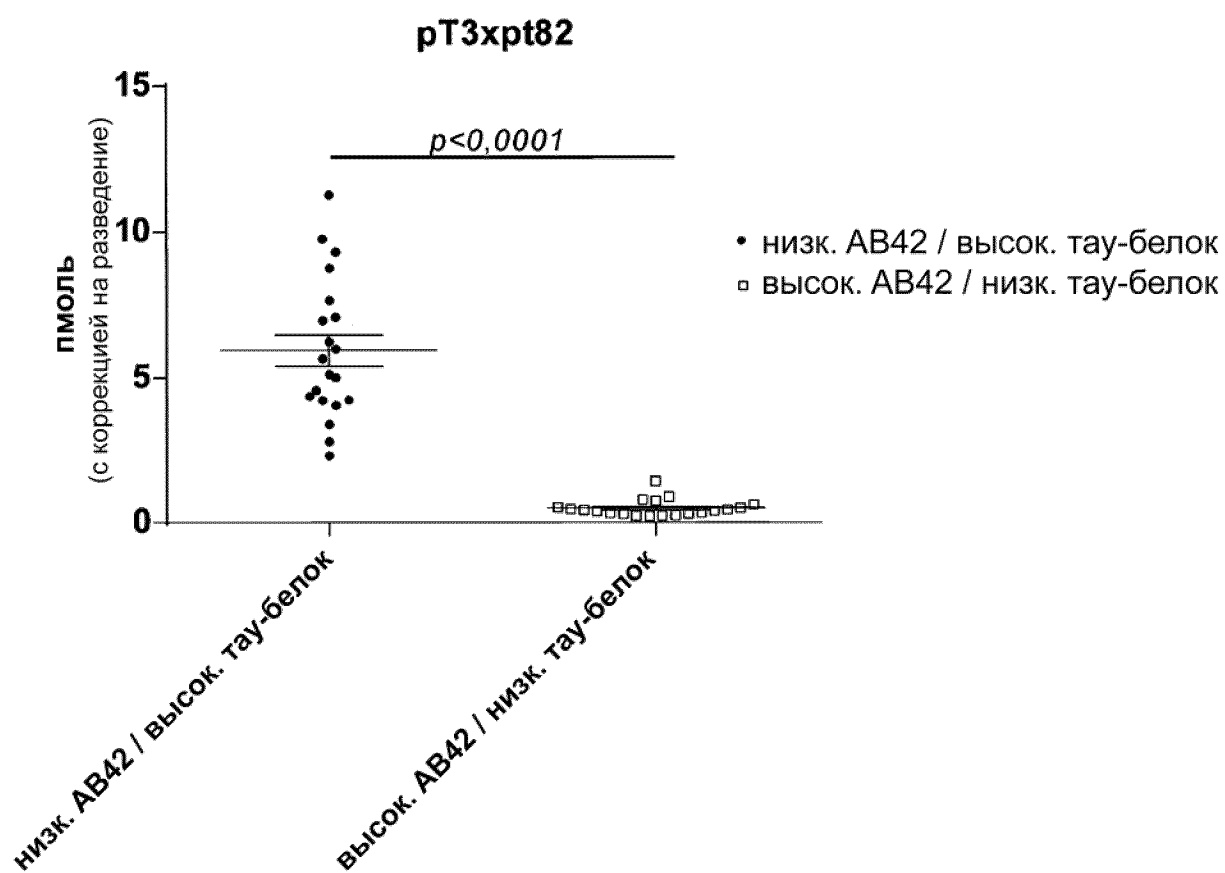
**ФИГ. 10F**

**ФИГ. 11А****SiMoA : PT3-h Tau43****ФИГ. 11В****SiMoA : PT3-PT82**

ФИГ. 12А



ФИГ. 12В

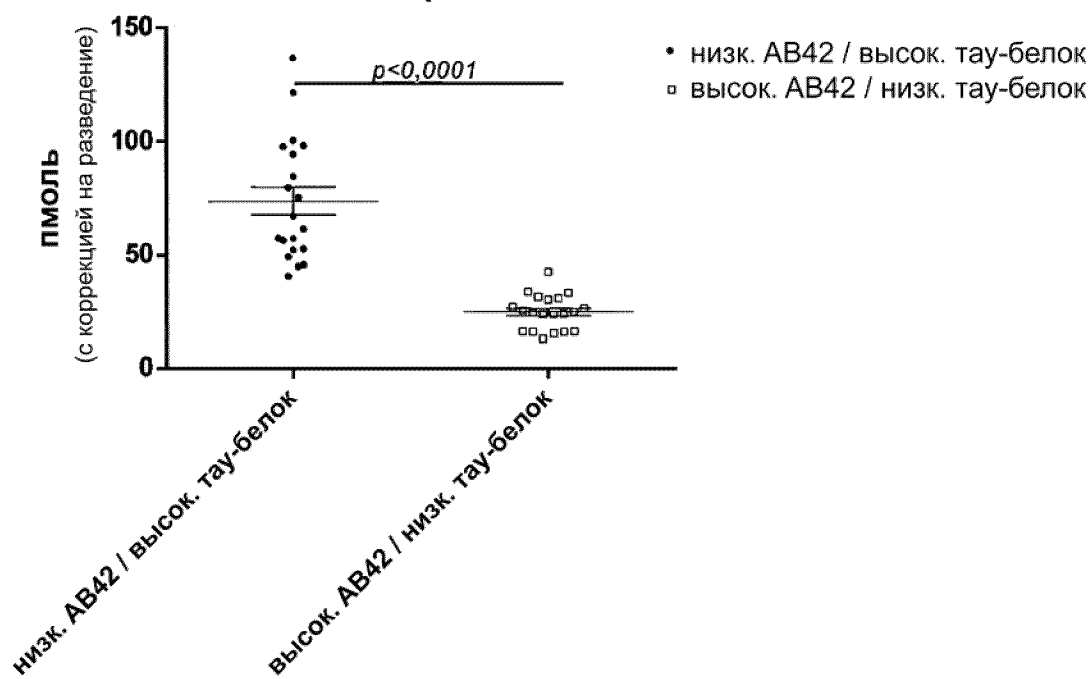


Данные по CSF Innotest (sahlgrenska)



## ФИГ. 12С

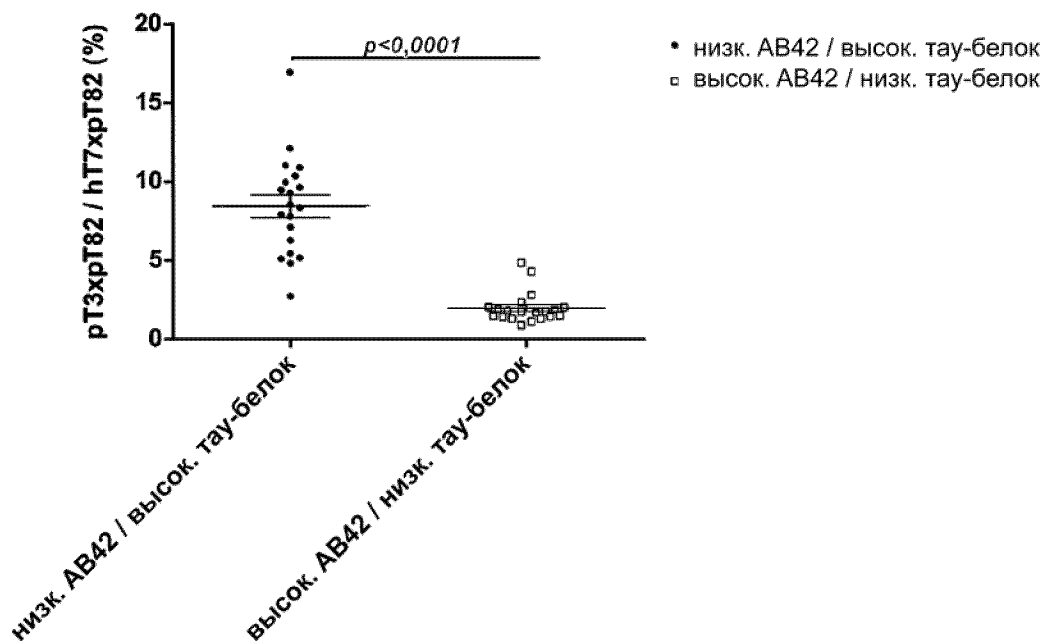
ht7хpt82



Данные по CSF Innotest (sahlgrenska)

## ФИГ. 12D

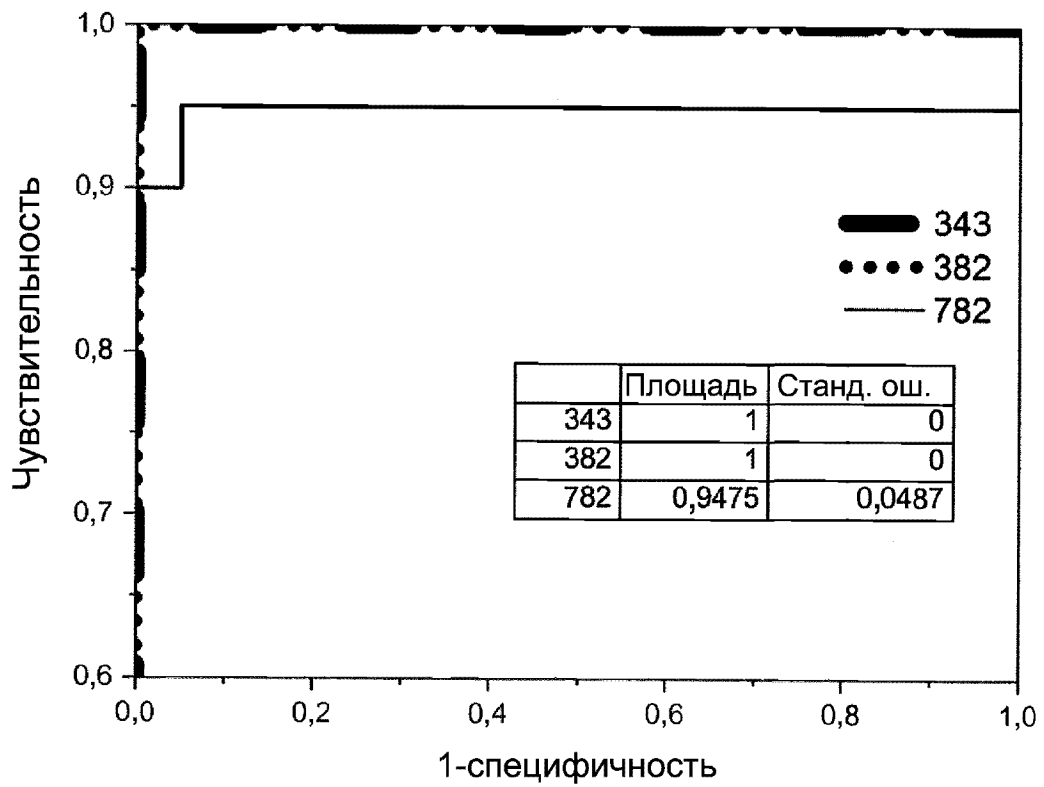
Доля общего тау-белка p217+

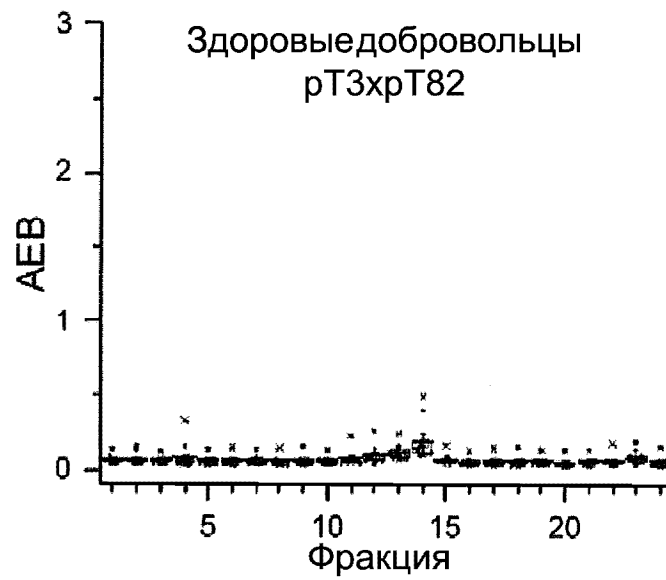
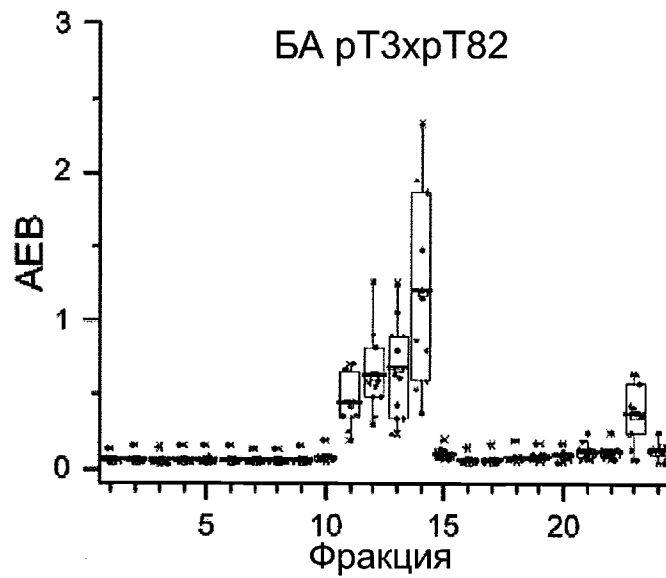


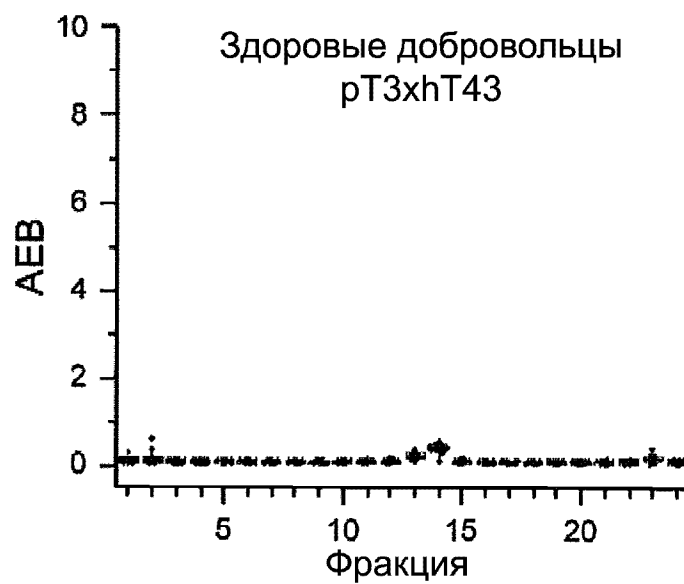
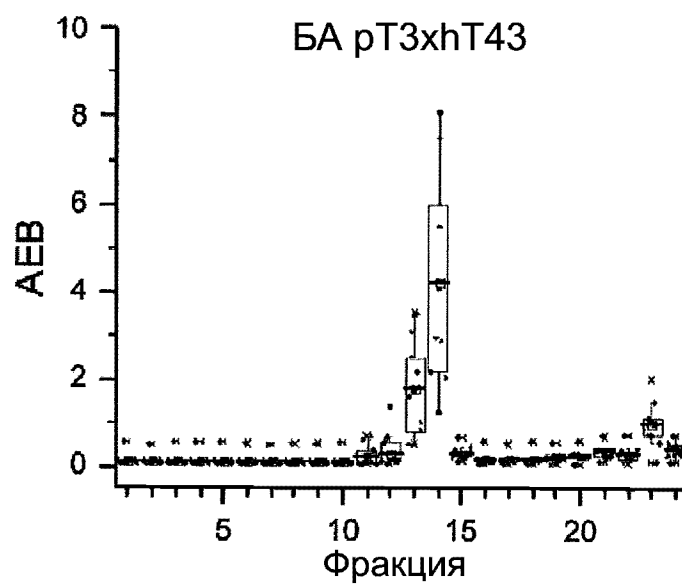
Данные по CSF Innotest (sahlgrenska)

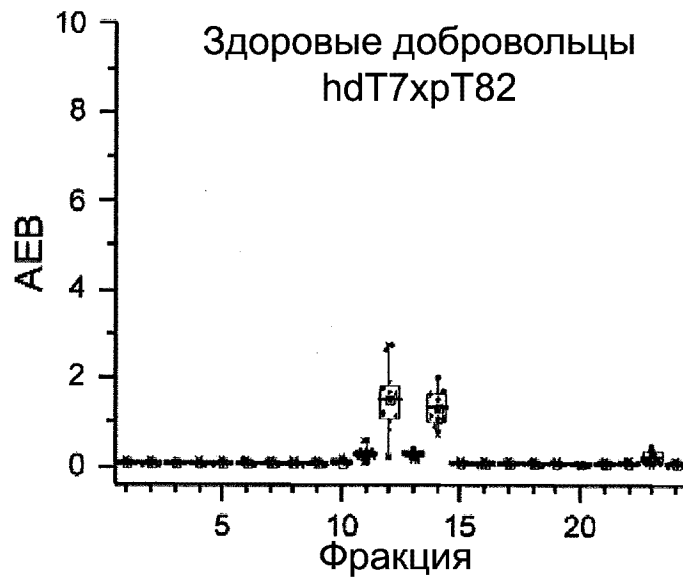
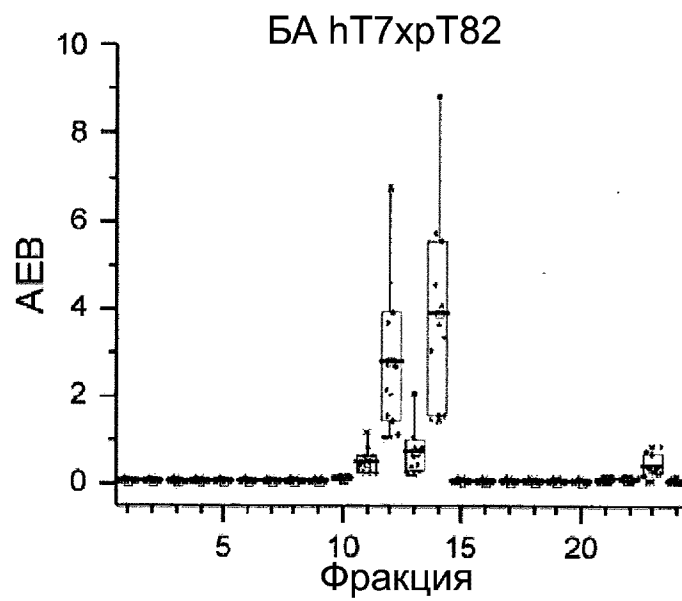
**ФИГ. 13**

Анализ тау-белка в исходной CSF



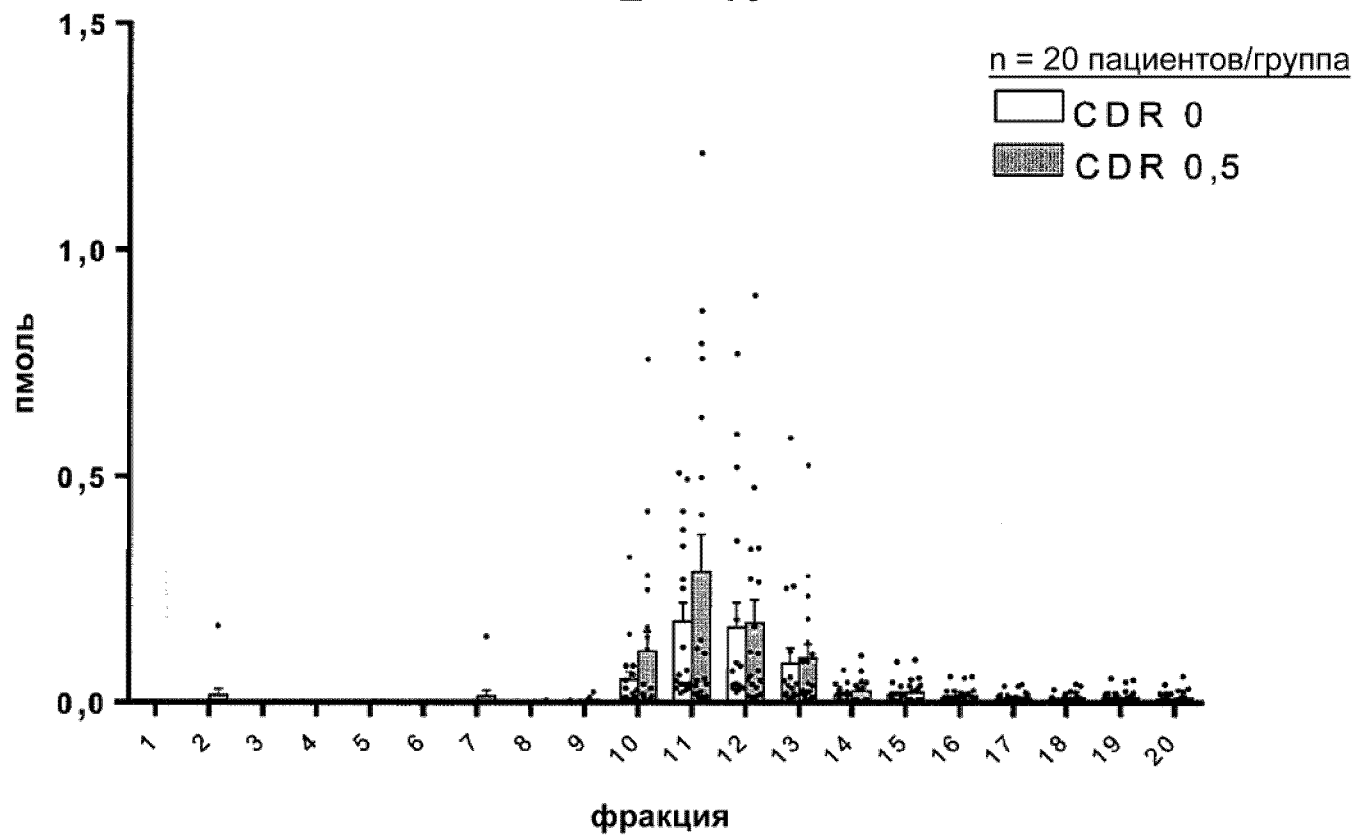
**ФИГ. 14А****ФИГ. 14В**

**ФИГ. 14С****ФИГ. 14D**

**ФИГ. 14Е****ФИГ. 14F**

# ФИГ. 15А

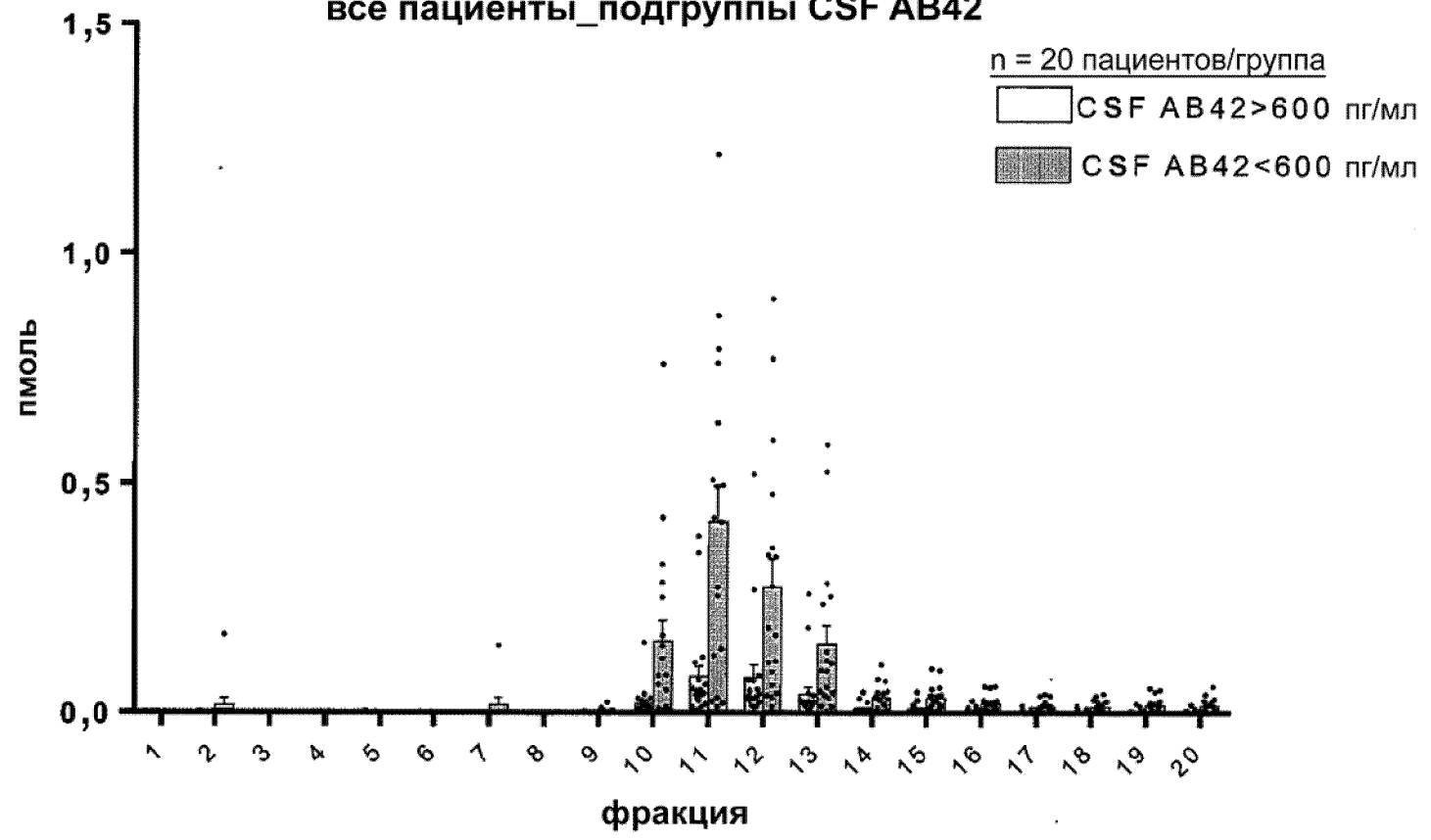
рТ3хТ43  
профиль фрагментов  
все пациенты\_подгруппы CDR



9

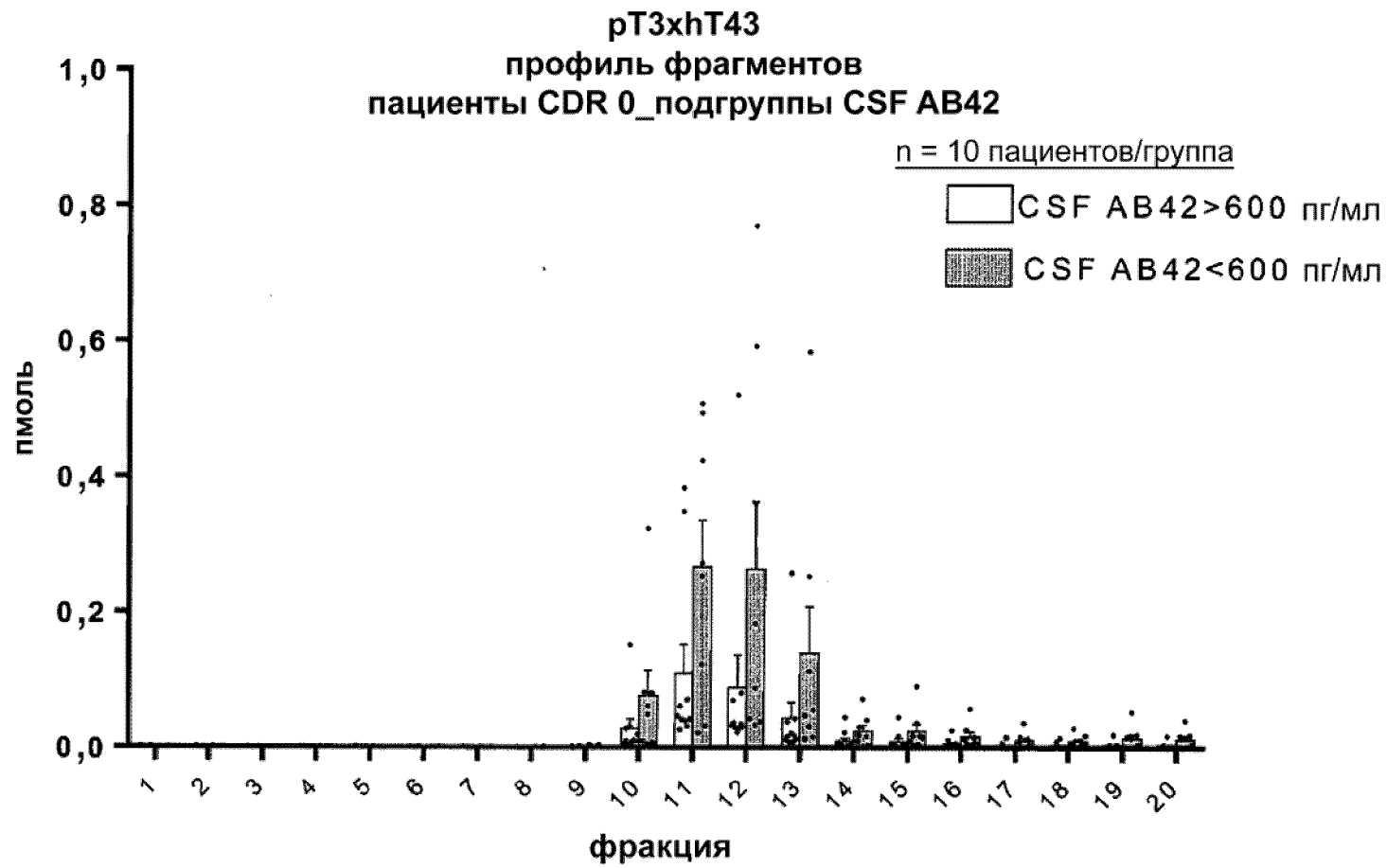
**ФИГ. 15В**

**pT3xhT43  
профиль фрагментов  
все пациенты\_подгруппы CSF Aβ42**



26/73

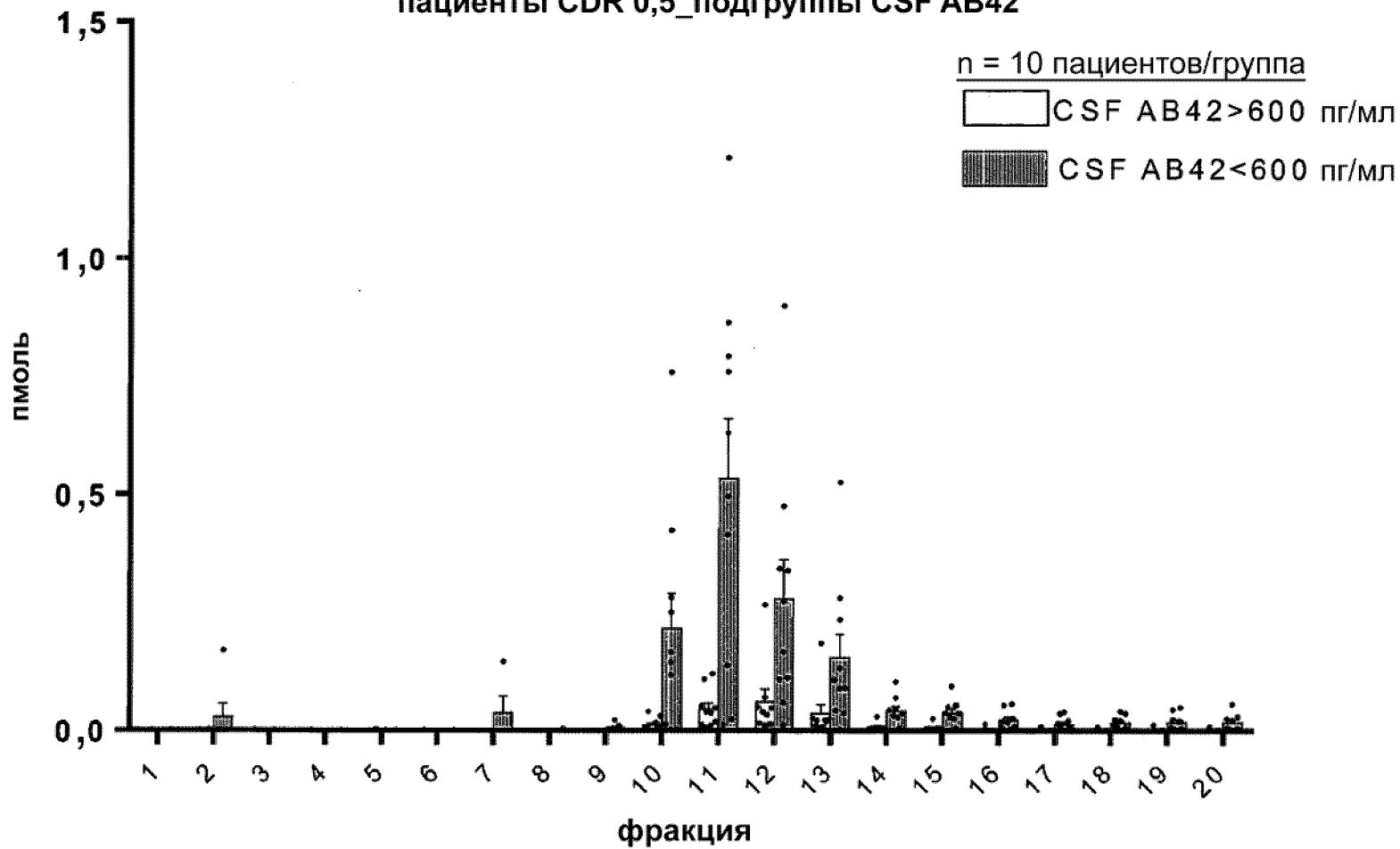
**ФИГ. 15С**



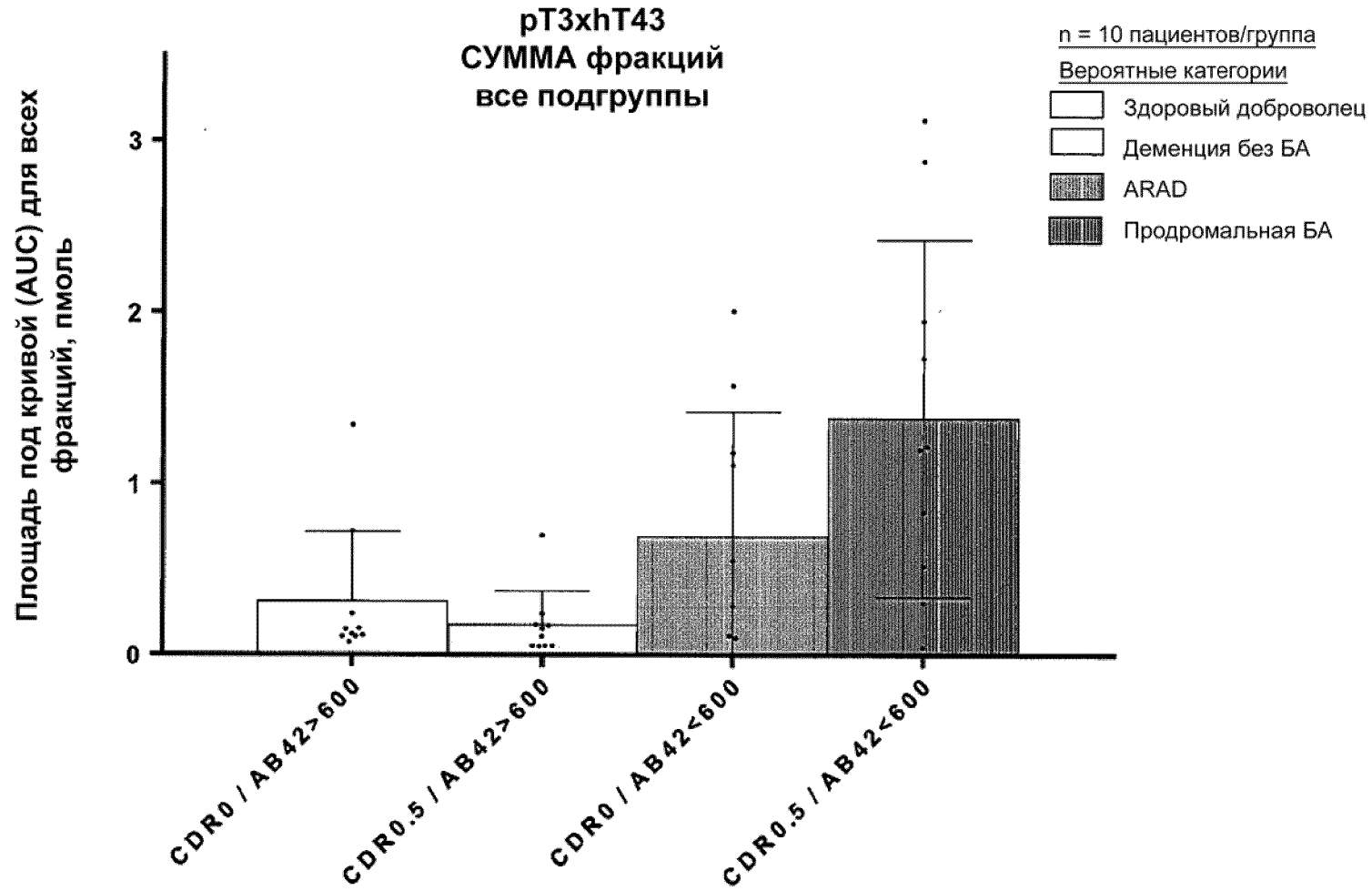


# ФИГ. 15D

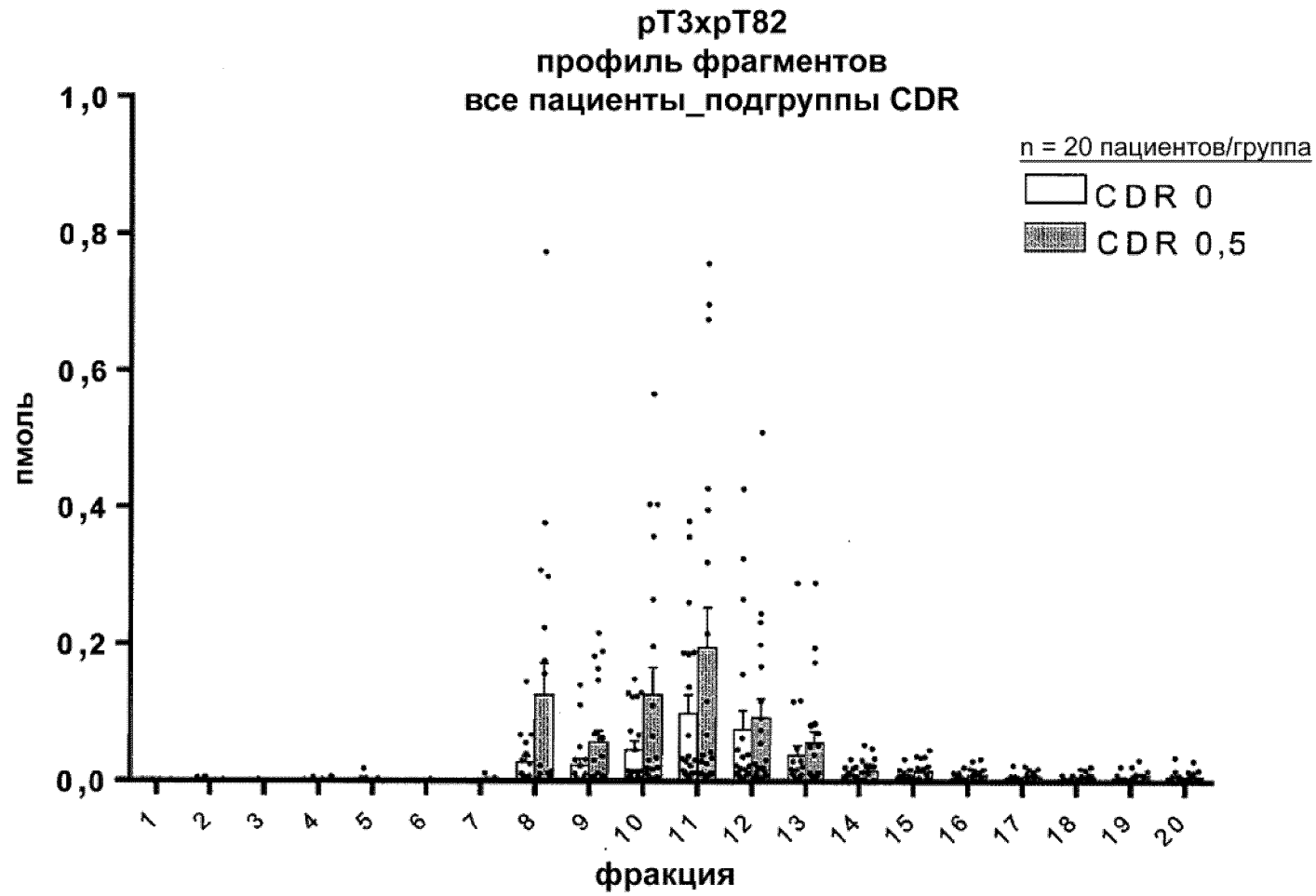
рТ3хТ43  
профиль фрагментов  
пациенты CDR 0,5\_подгруппы CSF Aβ42



**ФИГ. 15Е**

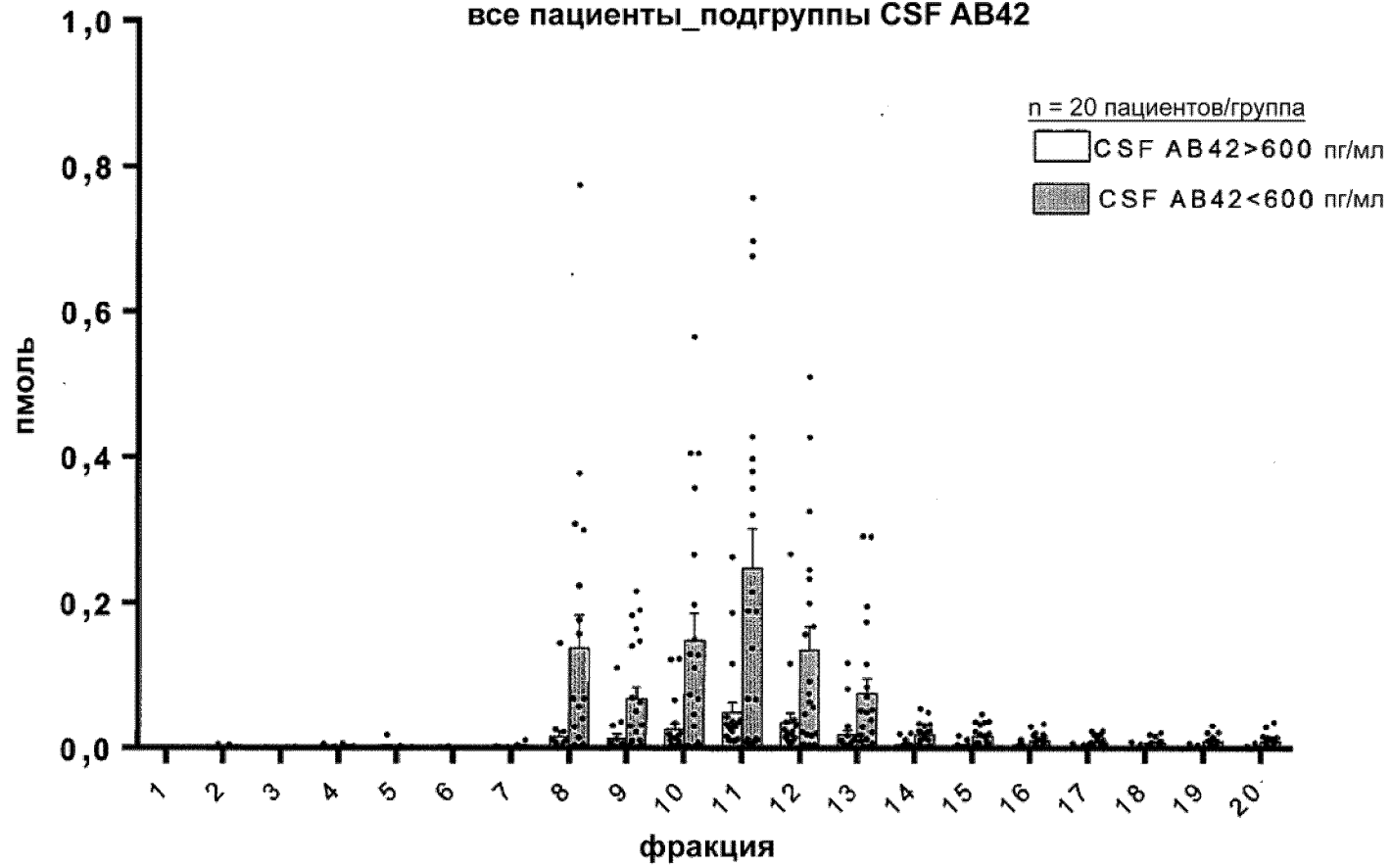


**ФИГ. 15F**



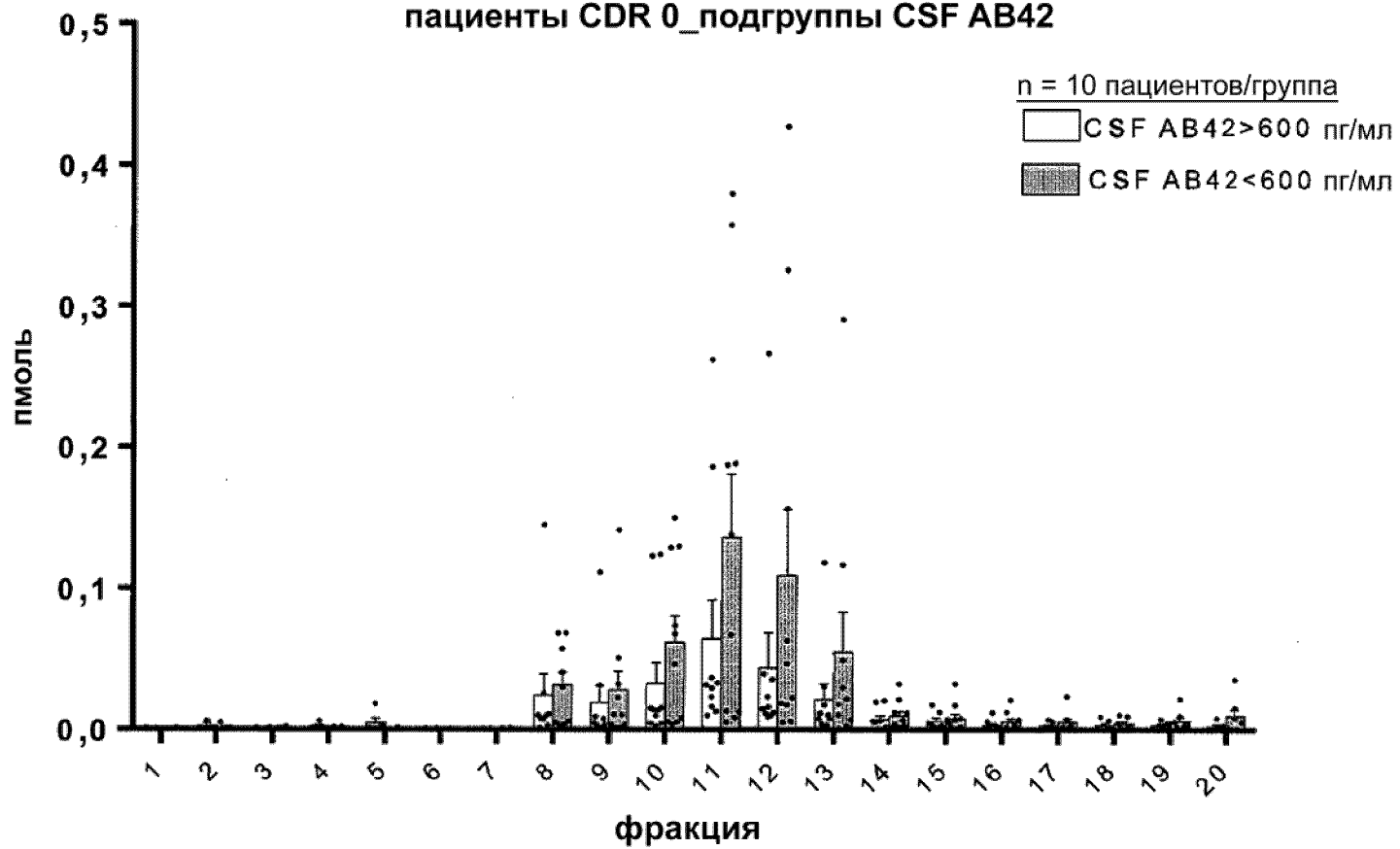
# ФИГ. 15G

рТ3хрТ82  
профиль фрагментов  
все пациенты\_подгруппы CSF Aβ42



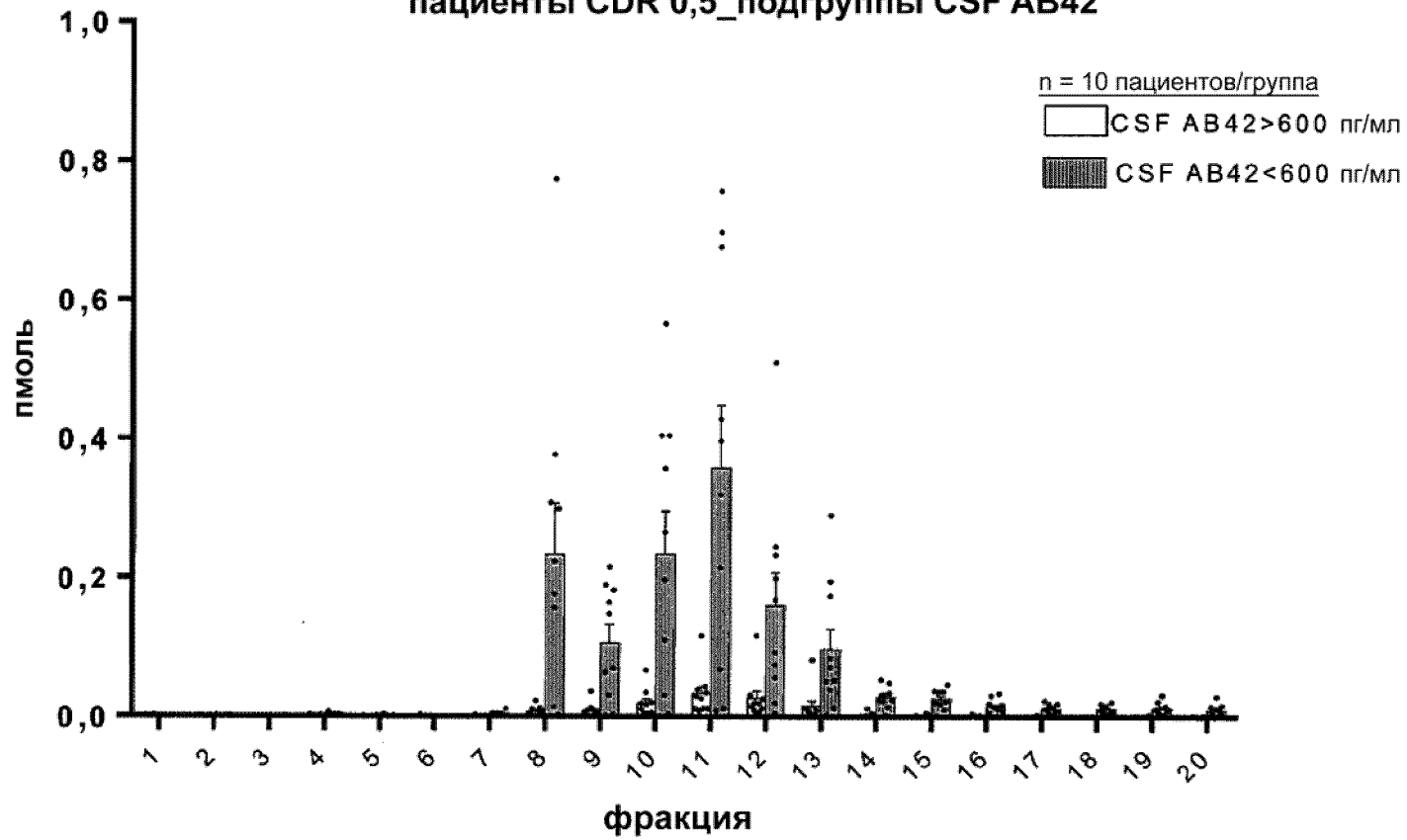
# ФИГ. 15Н

рТ3хрТ82  
профиль фрагментов  
пациенты CDR 0\_подгруппы CSF Aβ42



**ФИГ. 15I**

**рТ3хрТ82  
профиль фрагментов  
пациенты CDR 0,5\_подгруппы CSF Aβ42**







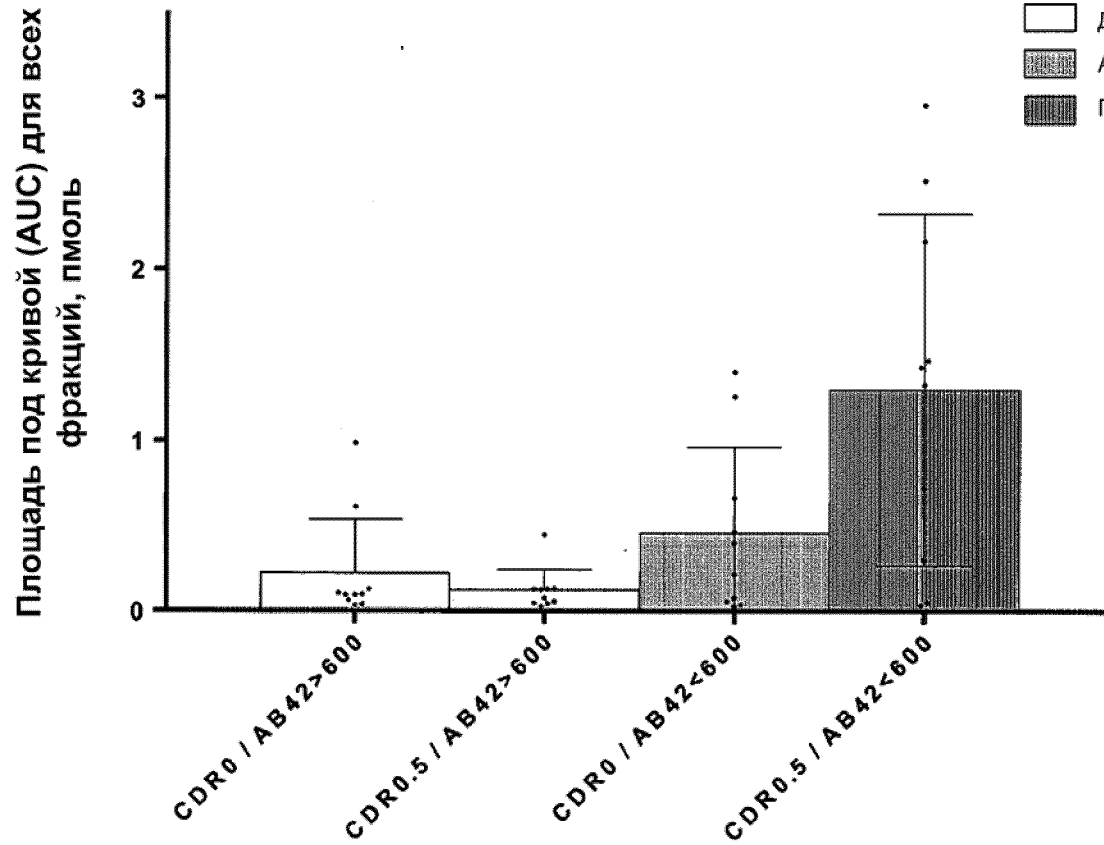
**ФИГ. 15J**

**рТ3хрТ82  
СУММА фракций  
все пациенты**

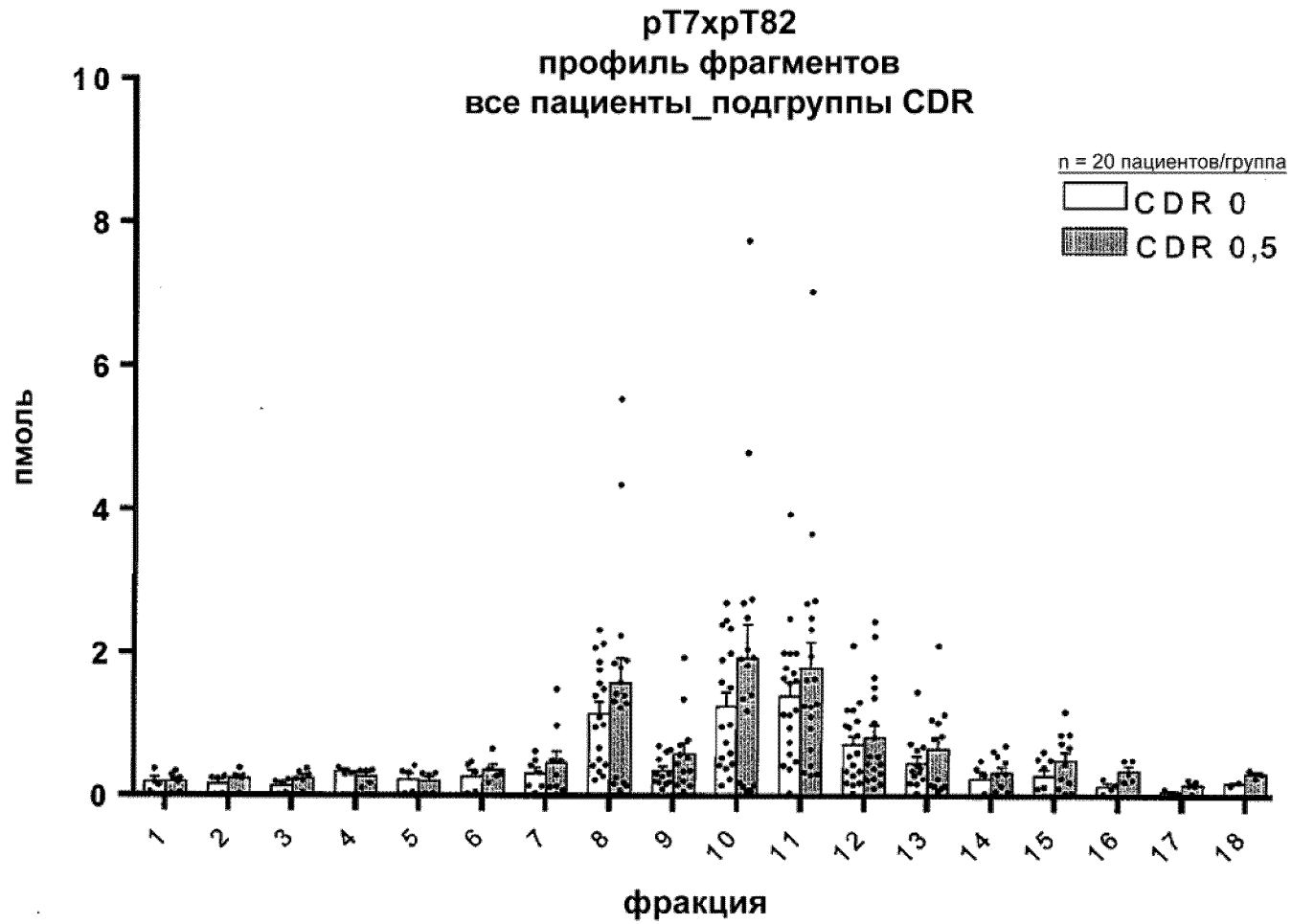
n = 10 пациентов/группа

Вероятные категории

-  Здоровый доброволец
-  Деменция без БА
-  ARAD
-  Продромальная БА



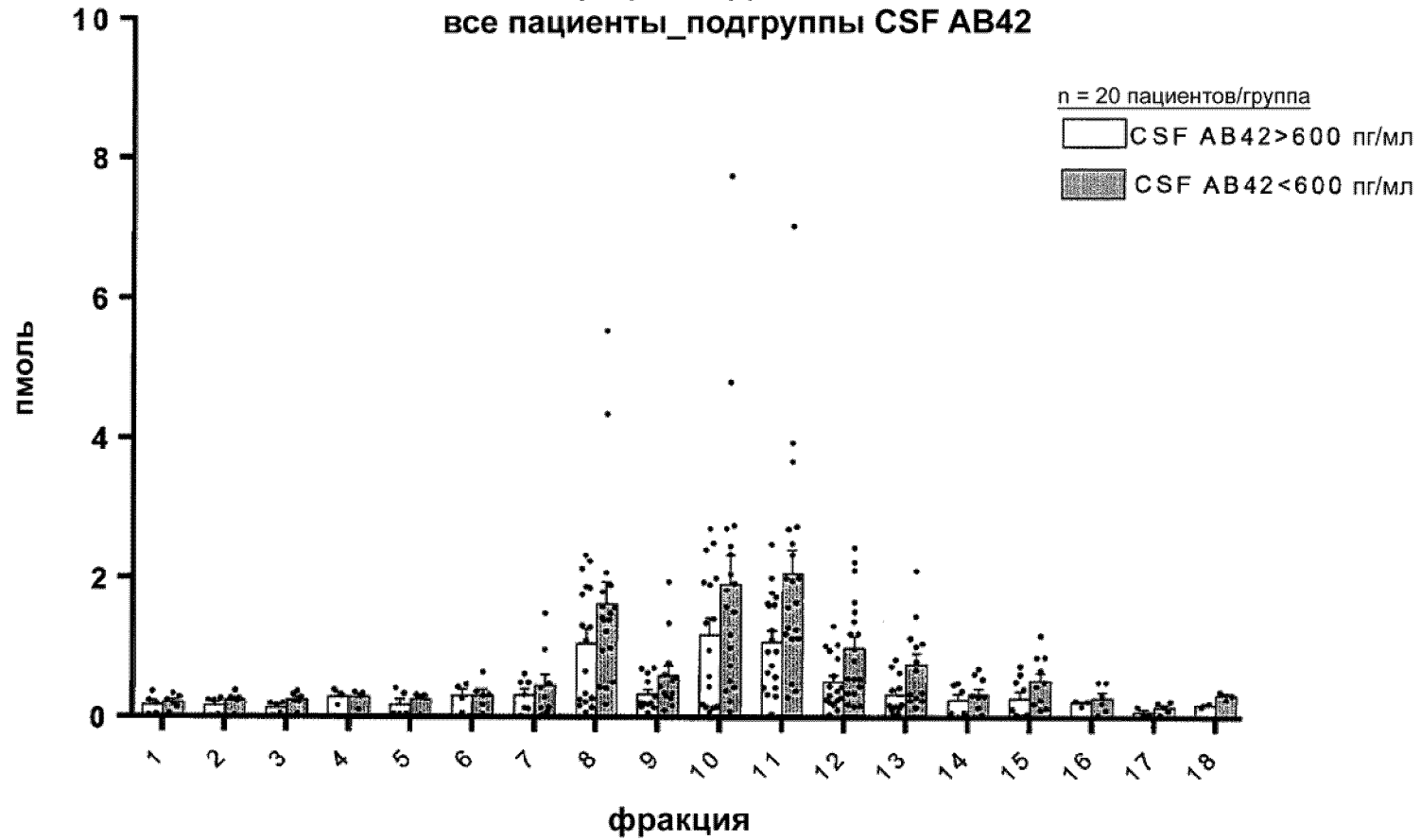
**ФИГ. 15К**





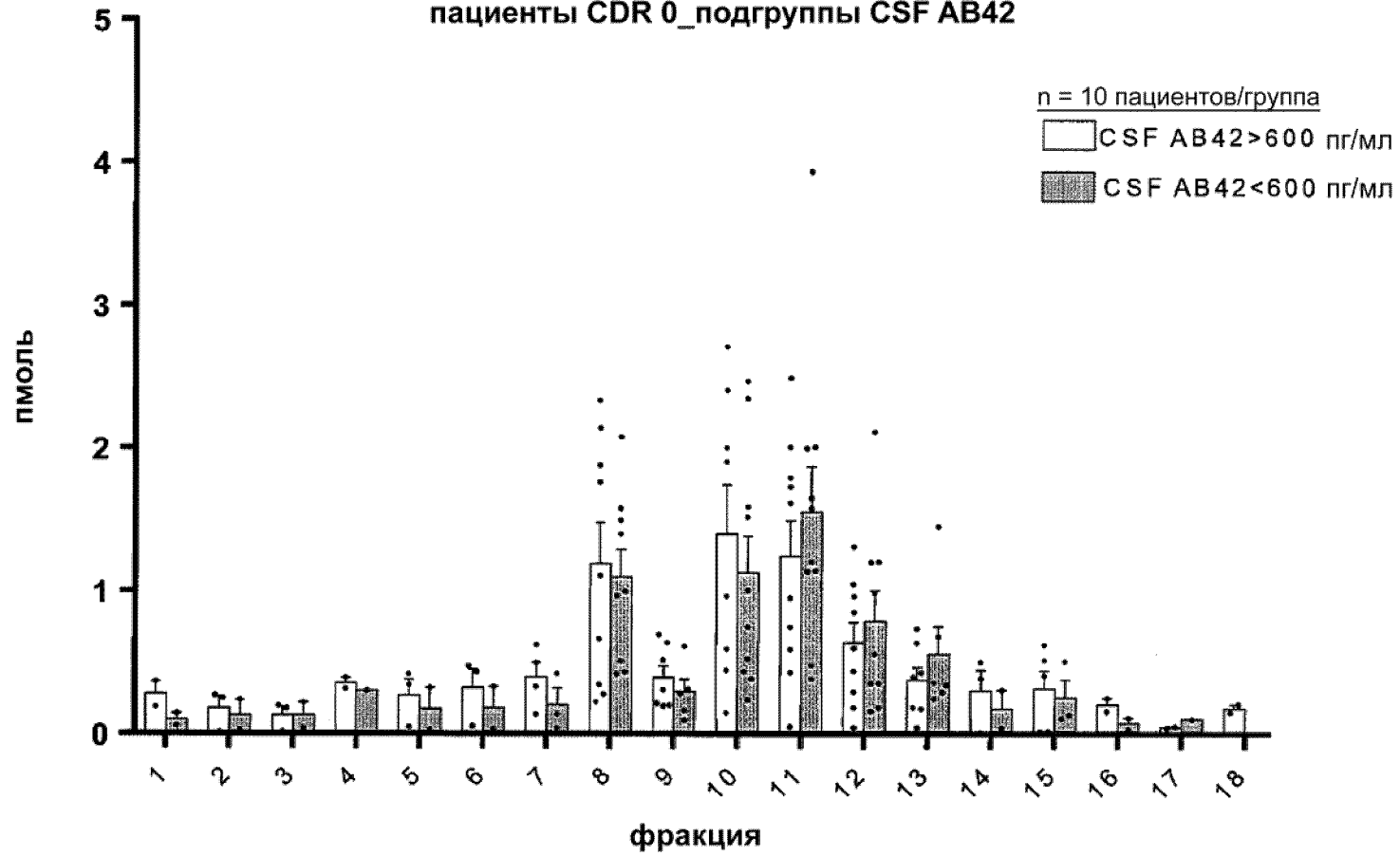
# ФИГ. 15L

hT7xpT82  
профиль фрагментов  
все пациенты\_подгруппы CSF Aβ42

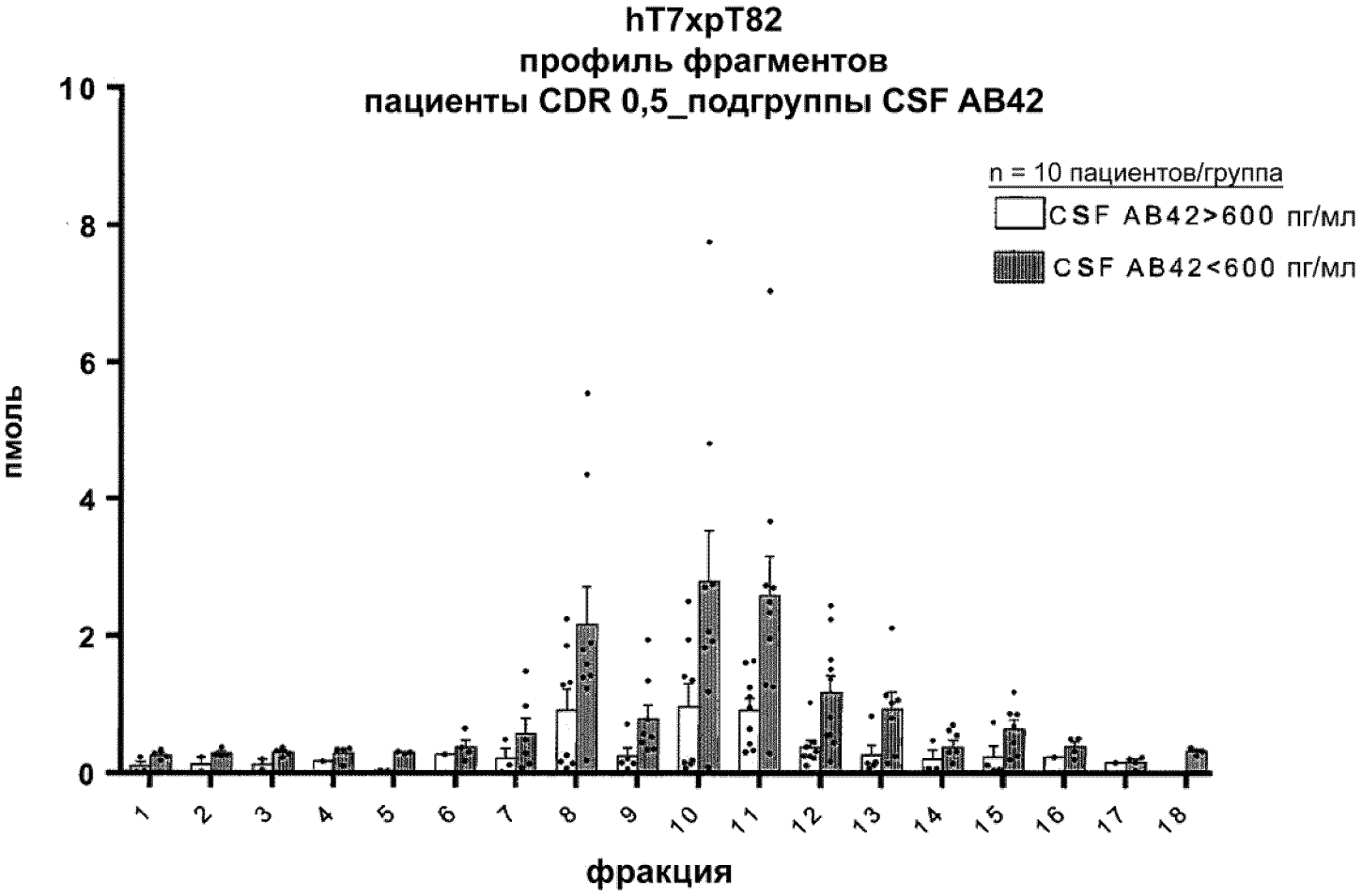


# ФИГ. 15М

hT7xpT82  
профиль фрагментов  
пациенты CDR 0\_подгруппы CSF Aβ42



**ФИГ. 15N**







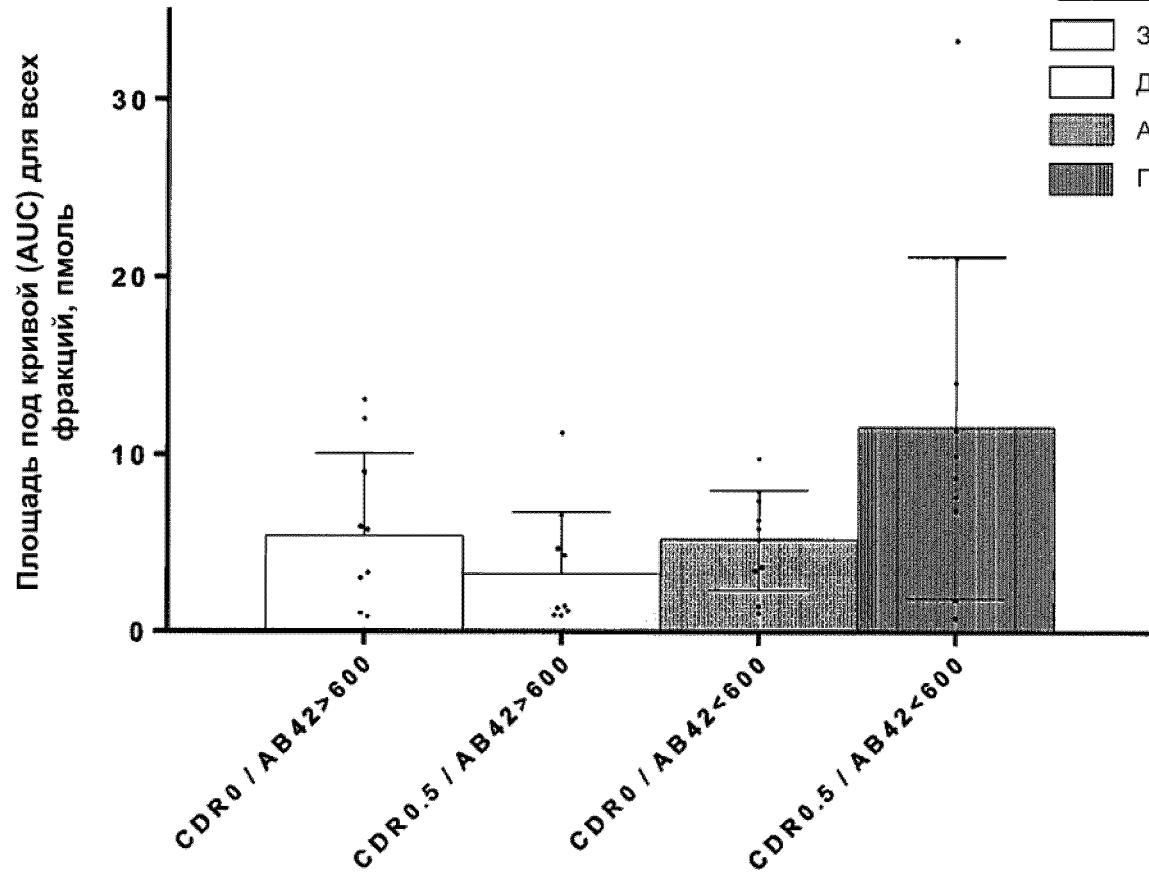
**ФИГ. 150**

hT7xpT82  
СУММА фракций  
все подгруппы

n = 10 пациентов/группа

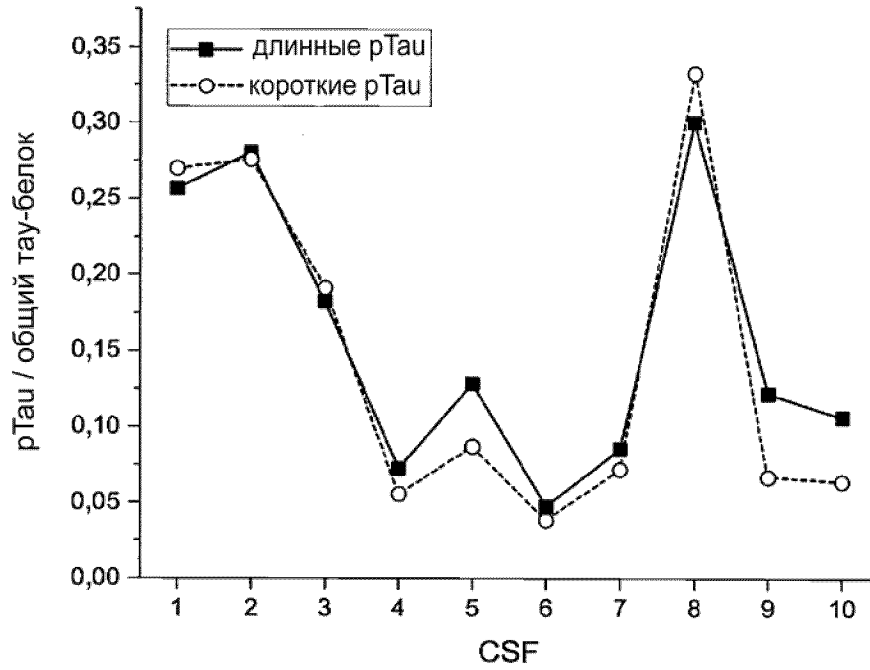
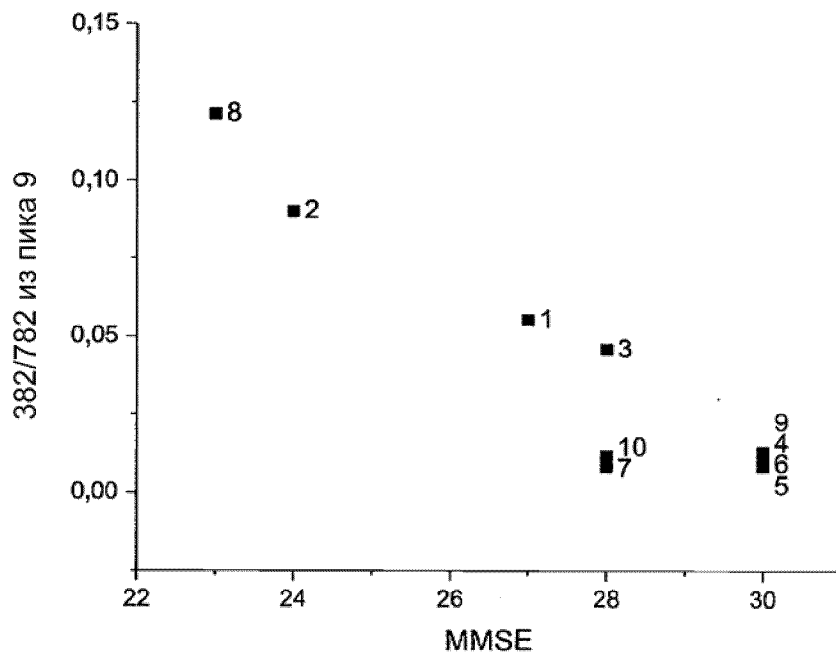
Вероятные категории

-  Здоровый доброволец
-  Деменция без БА
-  ARAD
-  Продромальная БА



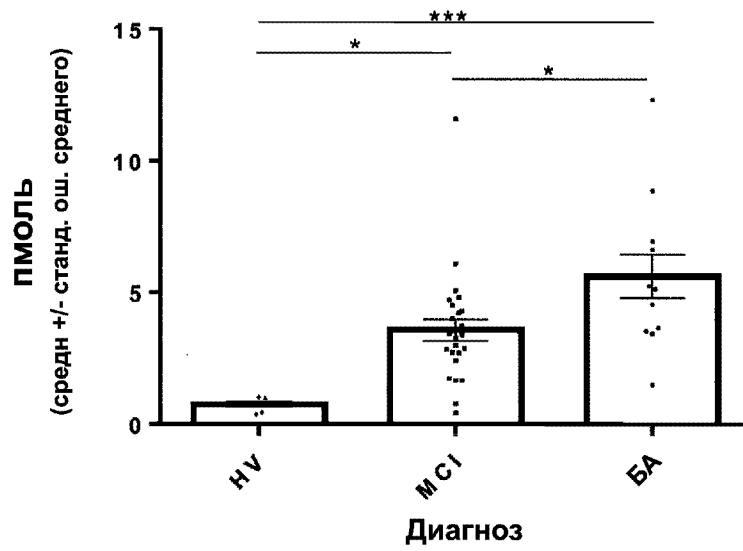
**ФИГ. 16А**

Отношение рТau / общий тау-белок (pM) в исходной CSF

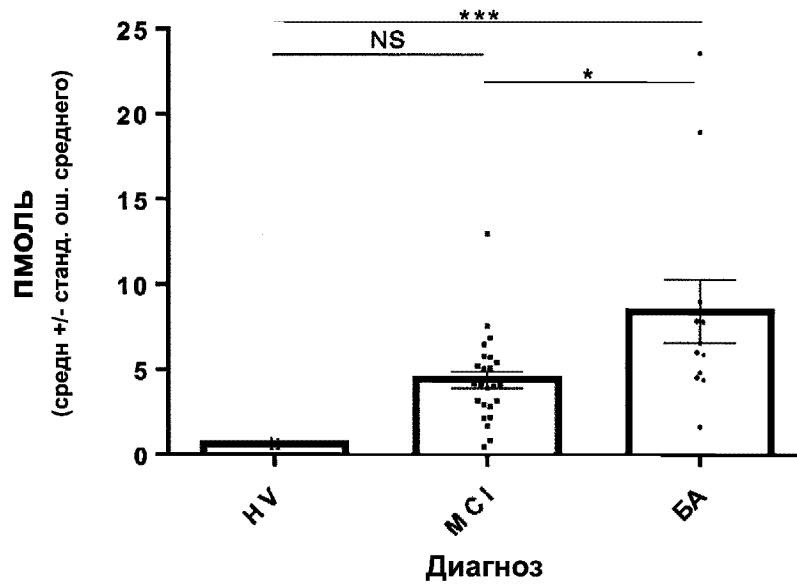
**ФИГ. 16В**

**ФИГ. 17А**

Группа 1 из Антверпена:  
pT3xhT43

**ФИГ. 17В**

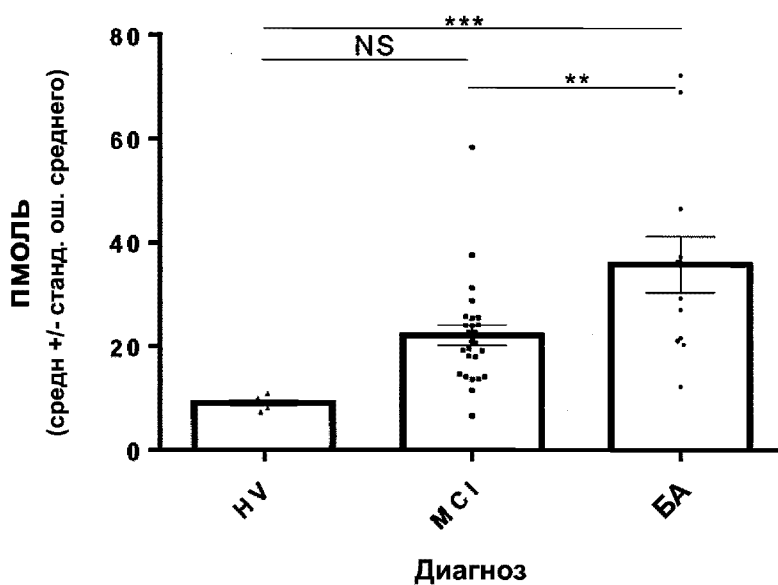
Группа 1 из Антверпена:  
pT3xpT82



**ФИГ. 17С**

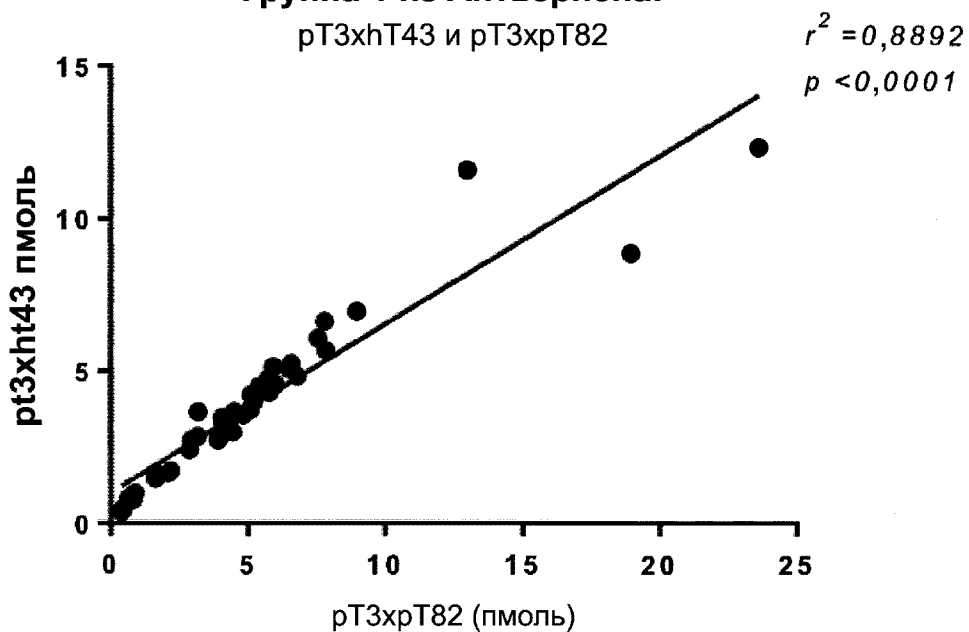
Группа 1 из Антверпена:

hT7xpT82

**ФИГ. 17D**

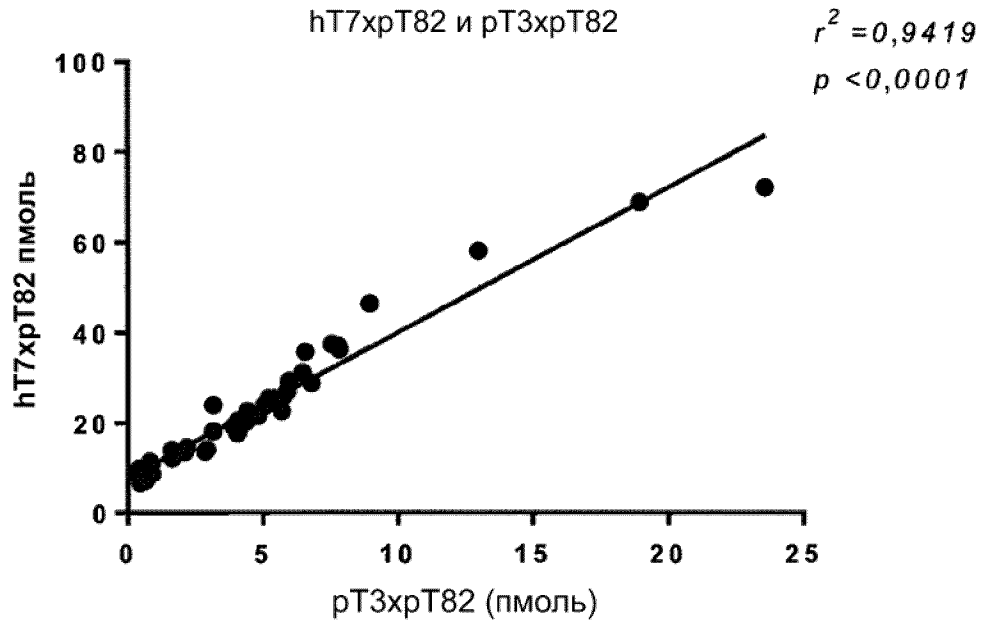
Группа 1 из Антверпена:

pT3xht43 и pT3xpT82

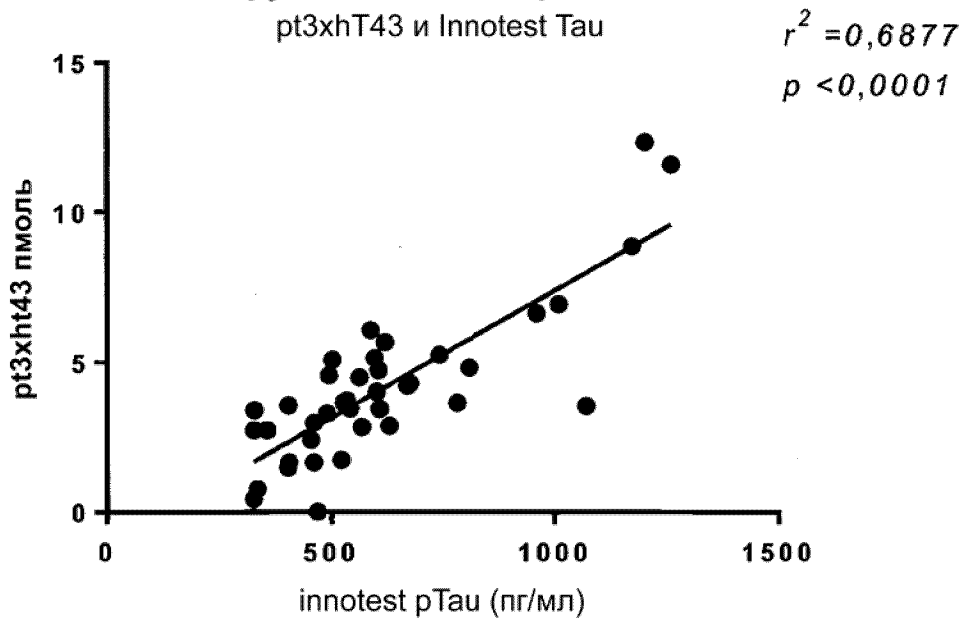


**ФИГ. 17Е**

Группа 1 из Антверпена:  
hT7xpT82 и pT3xpT82

**ФИГ. 17F**

Группа 1 из Антверпена:  
pt3xht43 и Innotest Tau





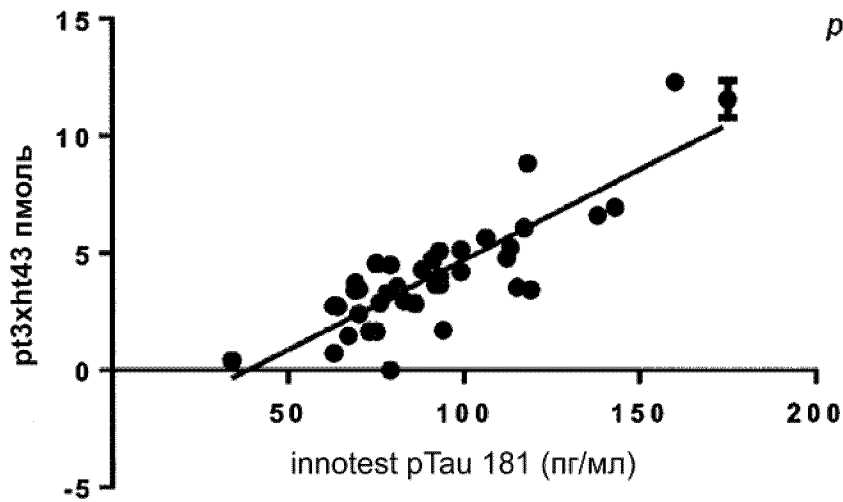
**ФИГ. 17G**

Группа 1 из Антверпена:

pT3xhT43 и innotest Tau 181

$r^2 = 0,7357$

$p < 0,0001$

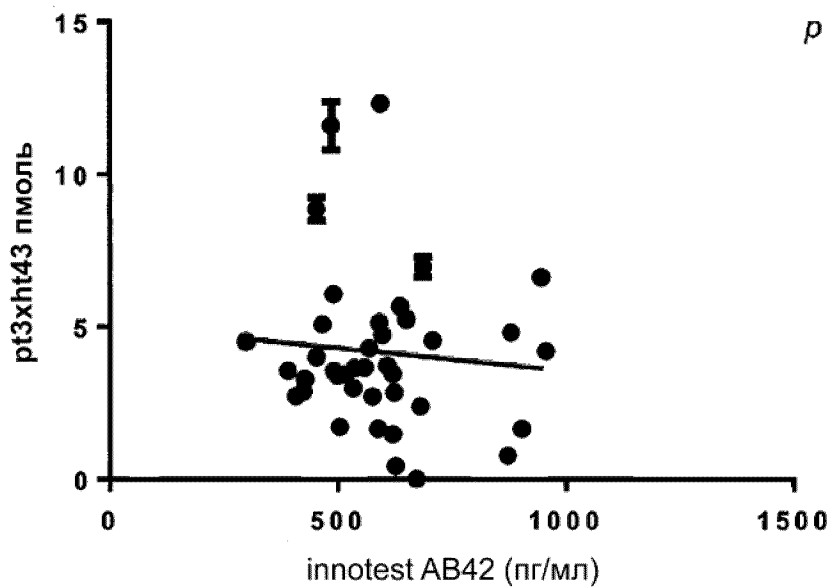
**ФИГ. 17H**

Группа 1 из Антверпена:

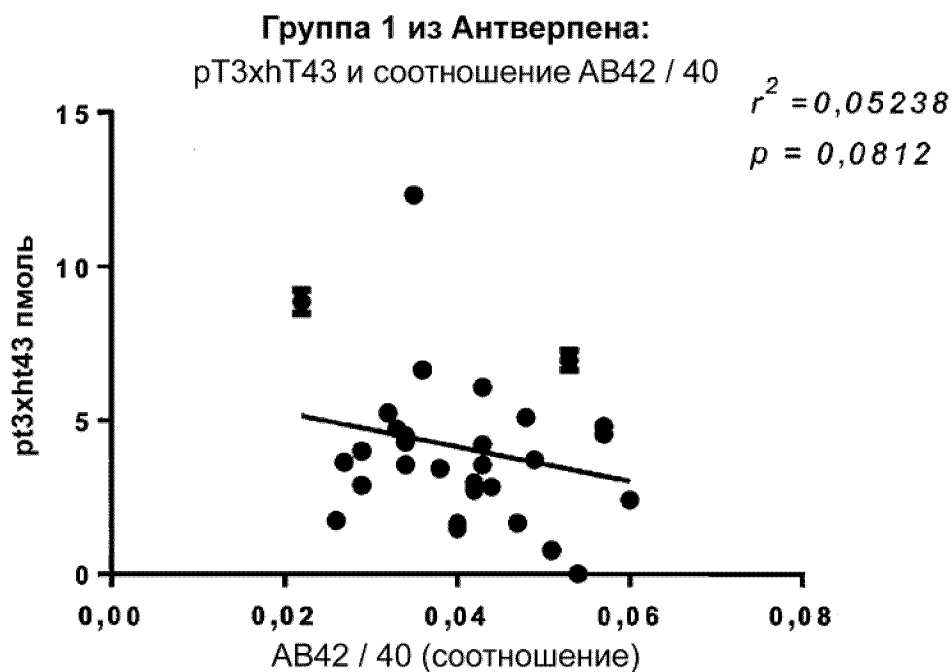
pT3xhT43 и Innotest AB42

$r^2 = 0,00823$

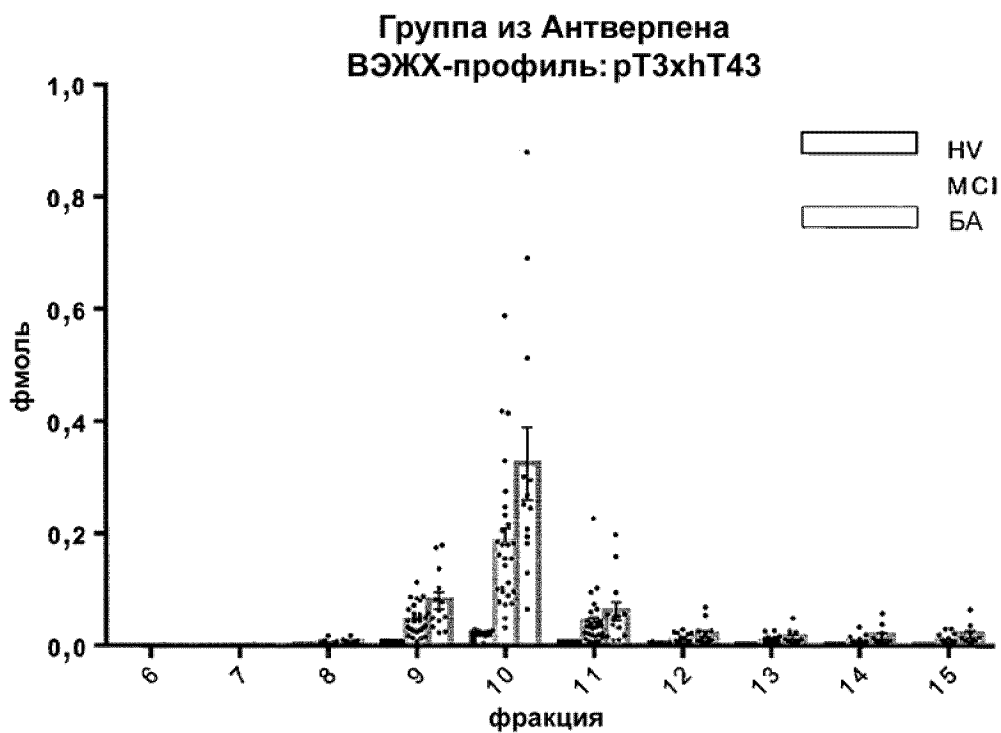
$p = 0,4358$



## ФИГ. 17I

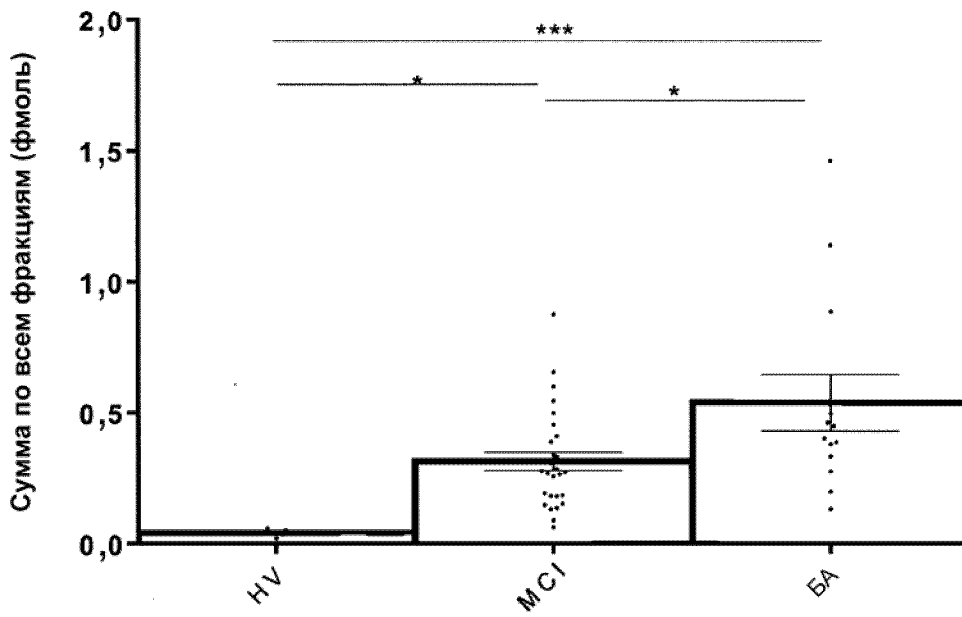


## ФИГ. 17J

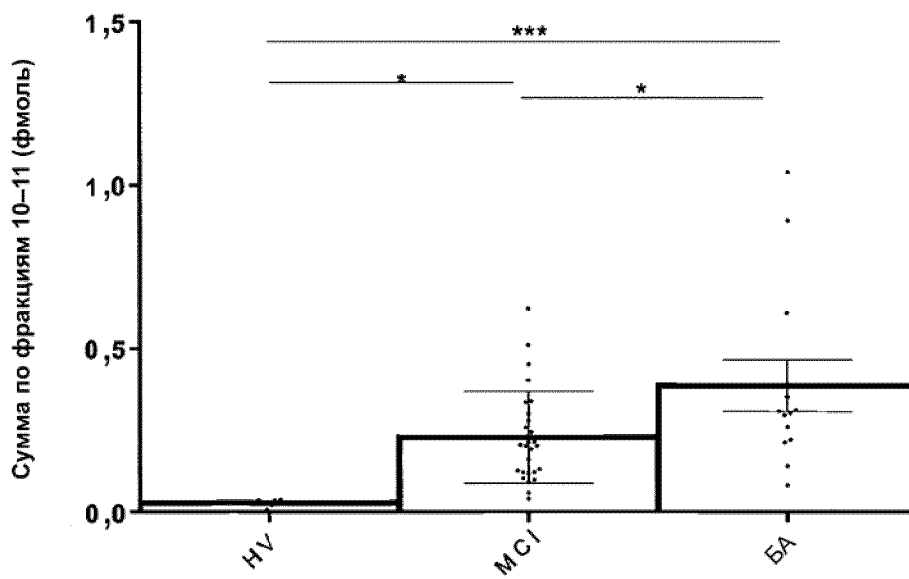


**ФИГ. 17К**

Группа из Антверпена  
СУММА по всем фракциям ВЭЖХ  
pT3xhT43

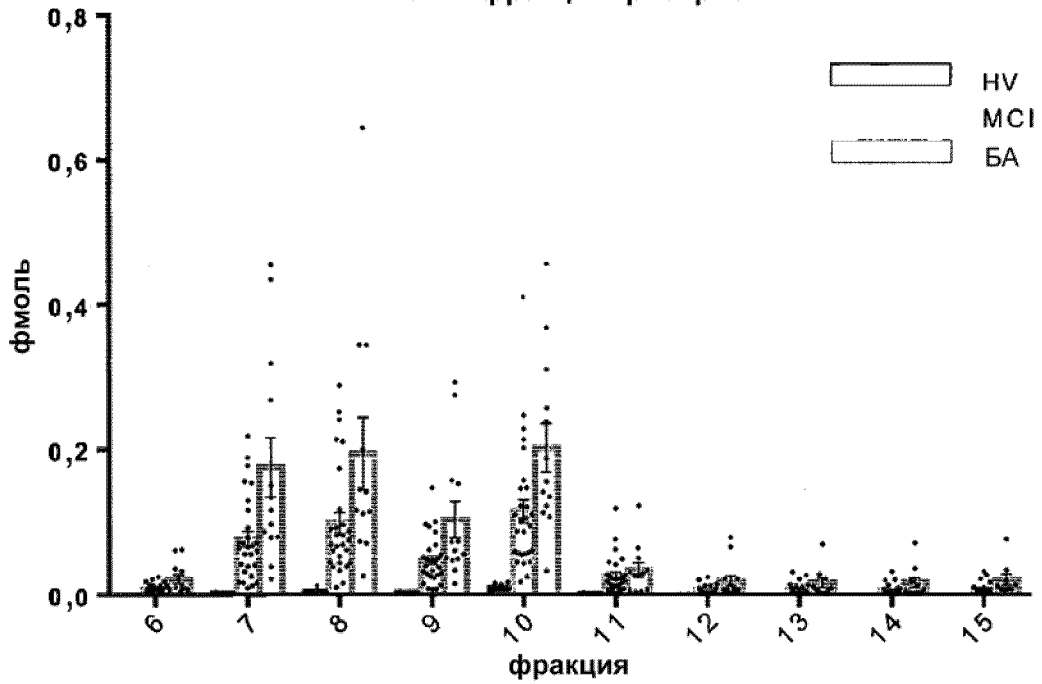
**ФИГ. 17L**

Группа из Антверпена  
СУММА поздн. пик  
pT3xhT43

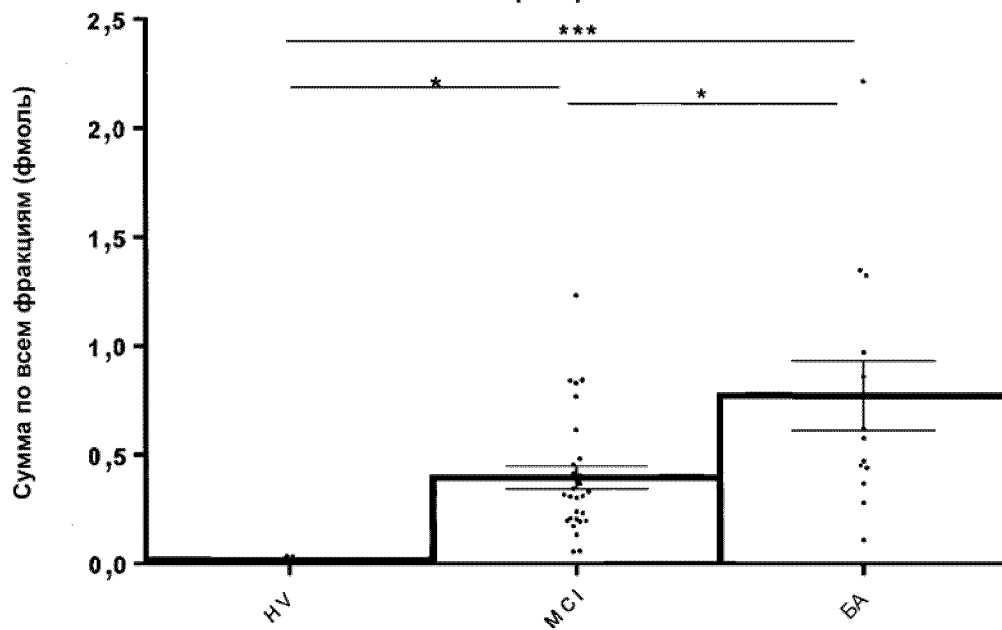


**ФИГ. 17М**

Группа из Антверпена  
ВЭЖХ-фракции: рТЗхрТ82

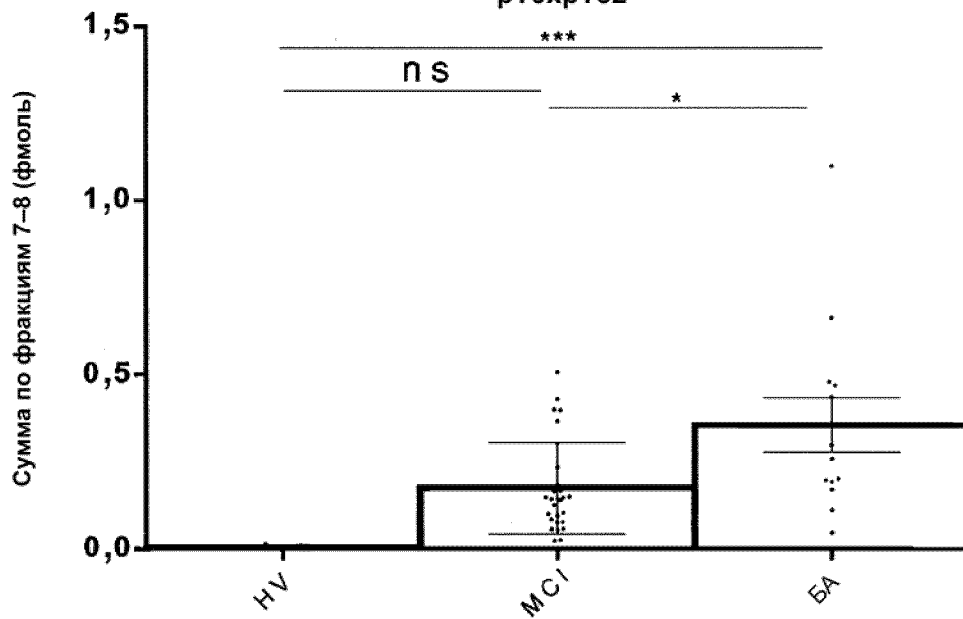
**ФИГ. 17N**

Группа из Антверпена  
СУММА по всем фракциям ВЭЖХ  
рТЗхрТ82

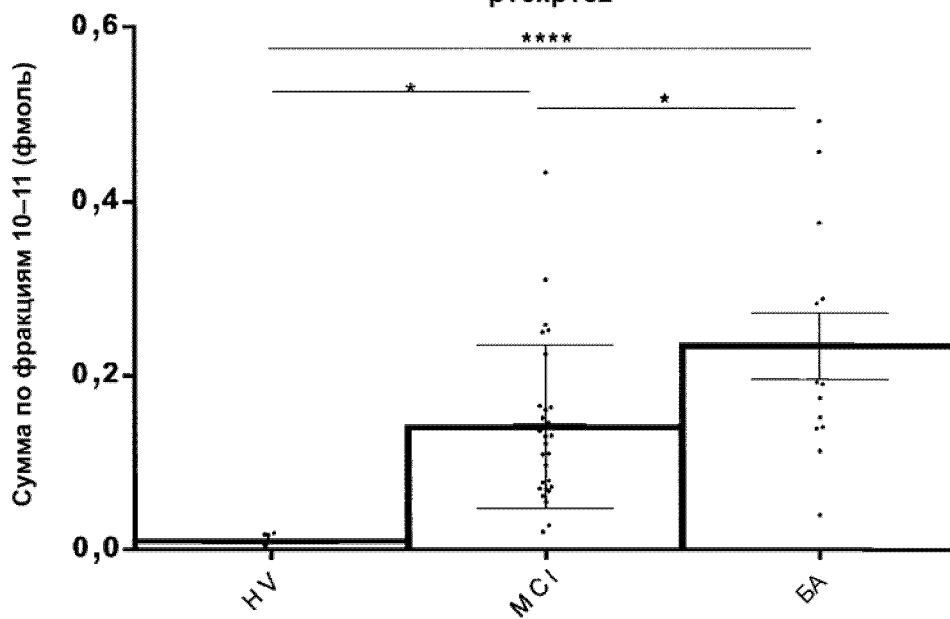


**ФИГ. 170**

Группа из Антверпена  
СУММА ранн. пик  
pT3xpT82

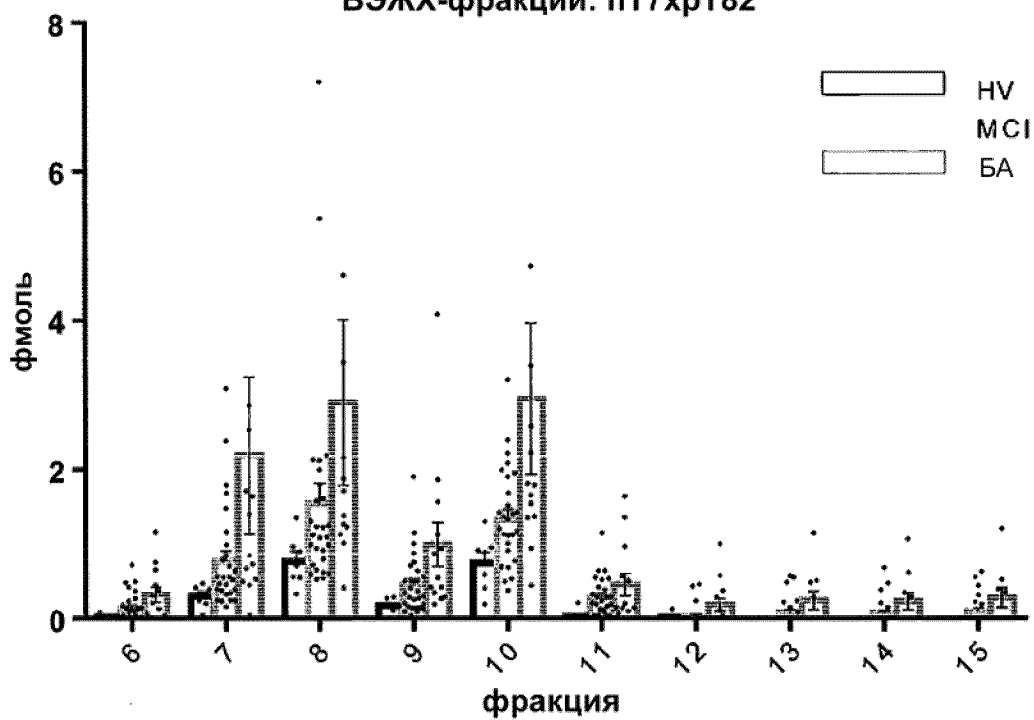
**ФИГ. 17P**

Группа из Антверпена  
СУММА поздн. пик  
pT3xpT82

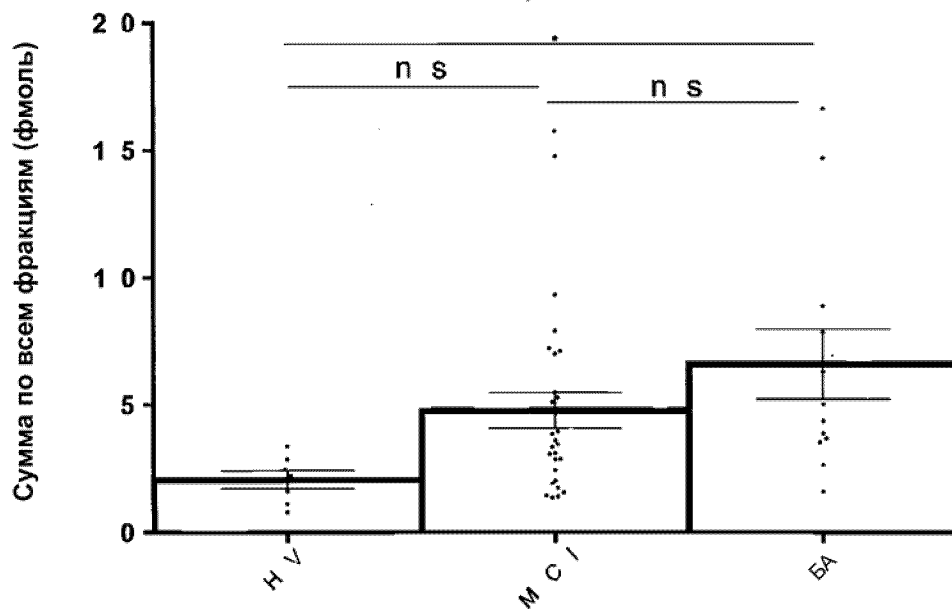


**ФИГ. 17Q**

Группа из Антверпена  
ВЭЖХ-фракции: hT7xpT82

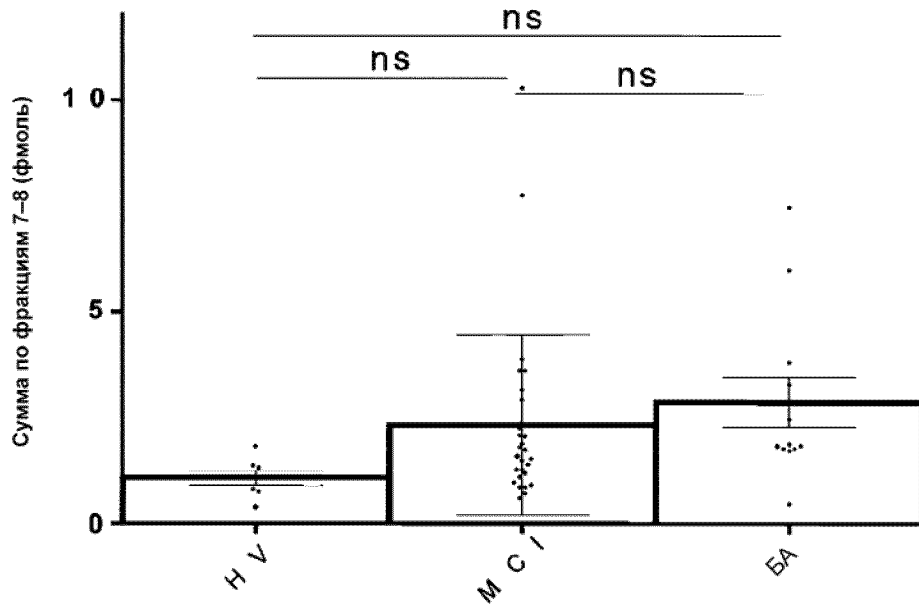
**ФИГ. 17R**

Группа из Антверпена  
СУММА по всем фракциям ВЭЖХ  
hT7xpT82

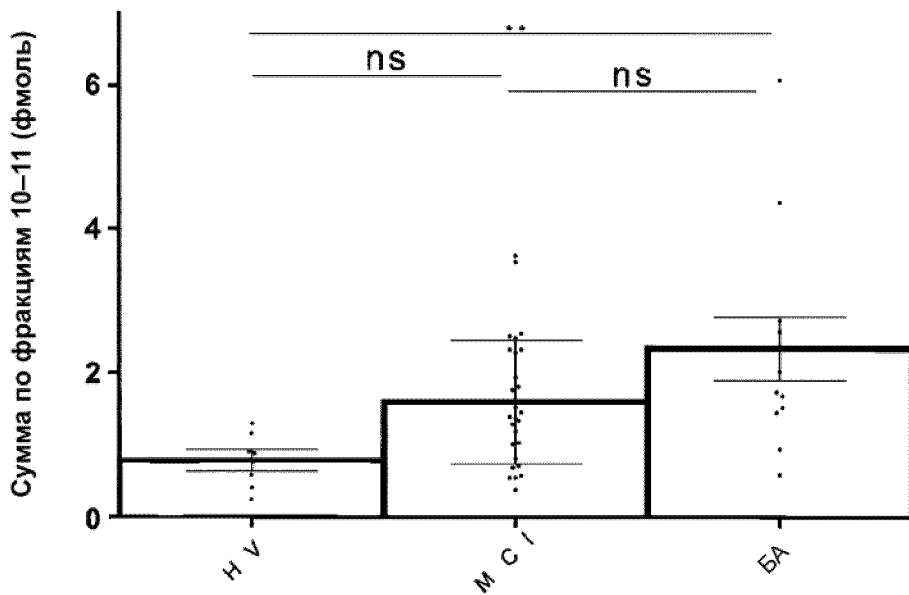


**ФИГ. 17S**

Группа из Антверпена  
СУММА ранн. пик  
hT7xpT82

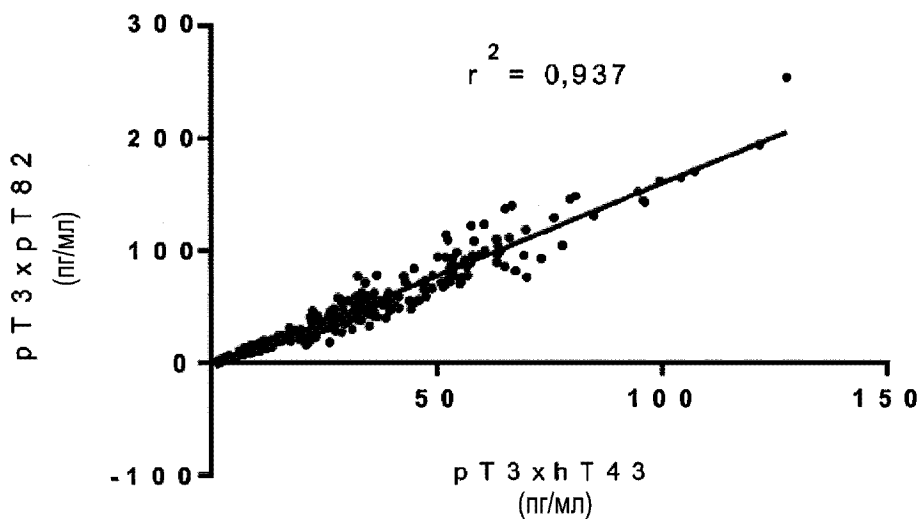
**ФИГ. 17T**

Группа из Антверпена  
СУММА поздн. пик  
hT7xpT82



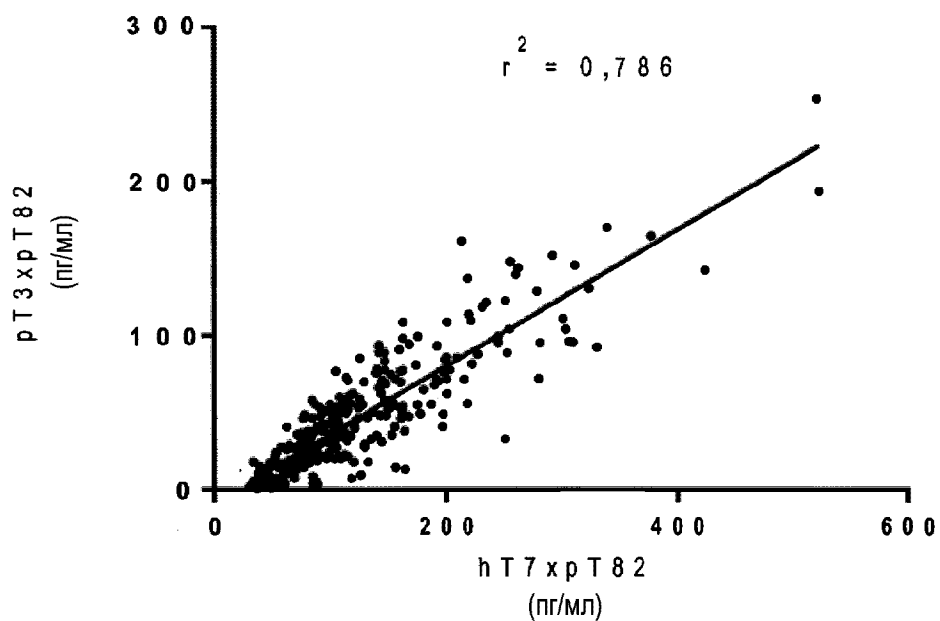
### ФИГ. 18А

CSF 3,43 и CSF 3,82



### ФИГ. 18В

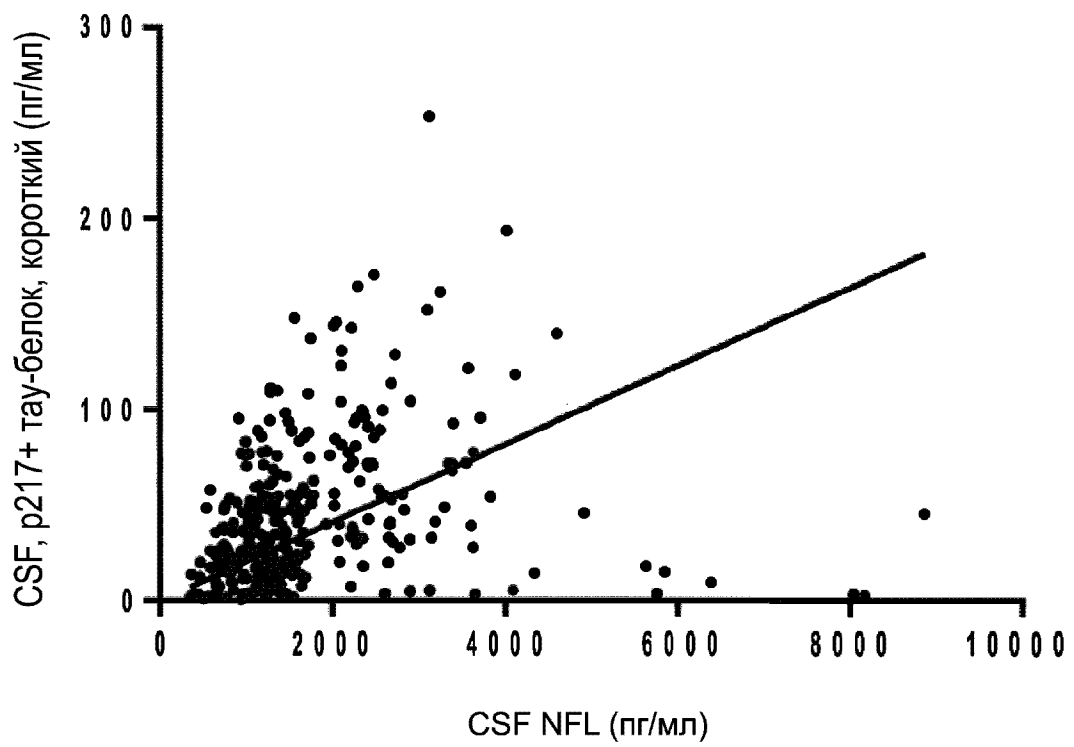
CSF 7,82 и CSF 3,82





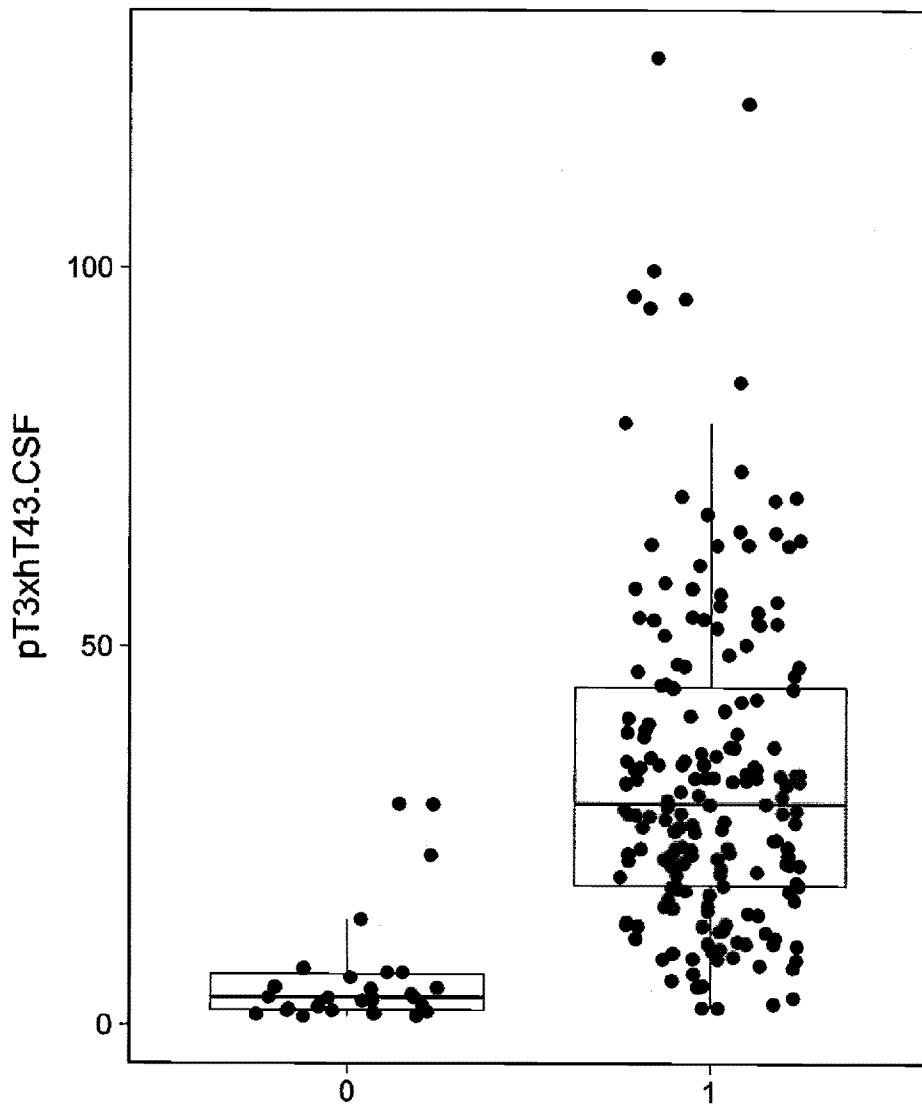
### ФИГ. 18С

NFL и p217+ тау-белок  
CSF Simoa NFL и CSF pT3xpT82



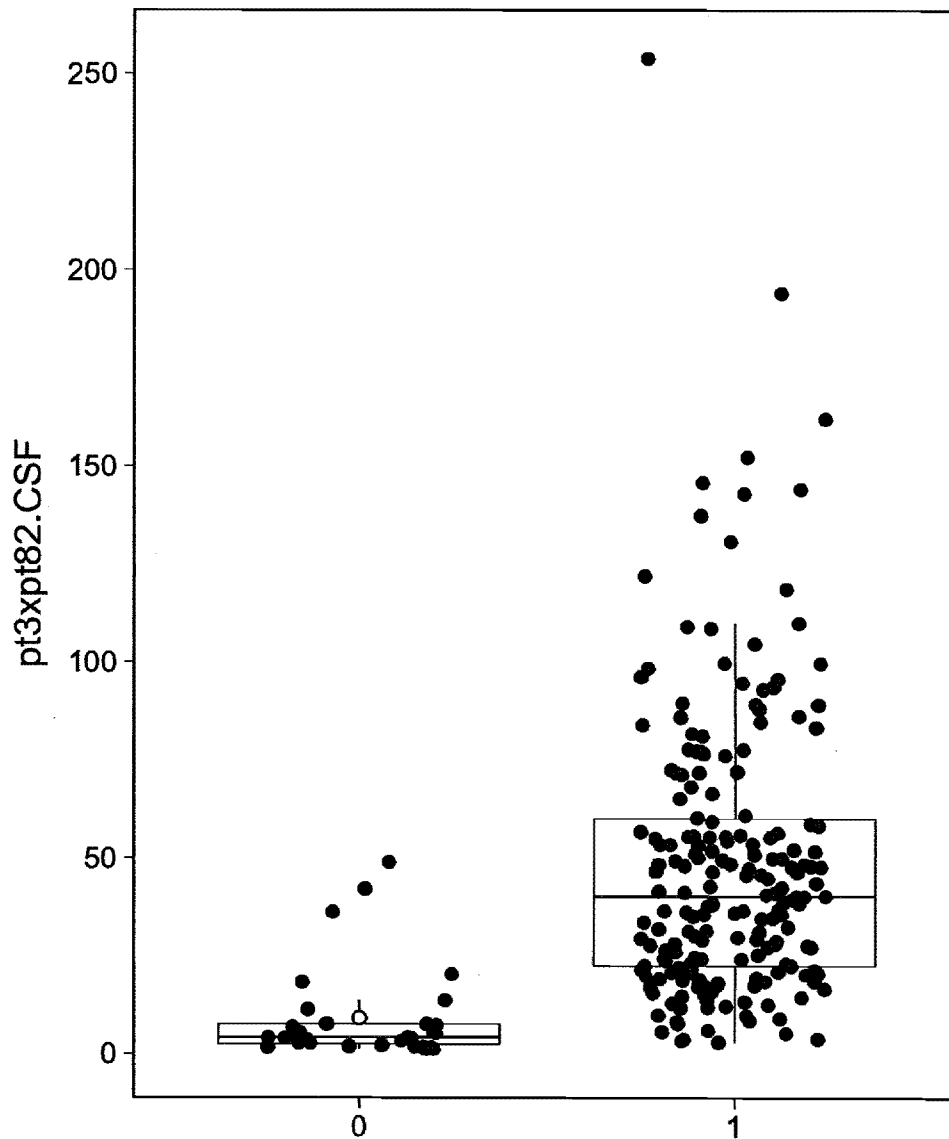
**FIG. 18D**

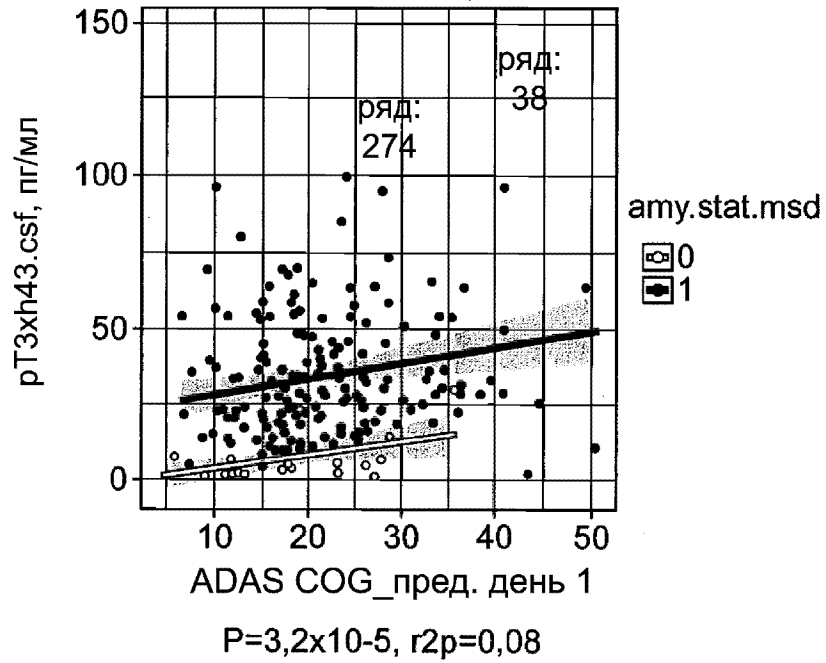
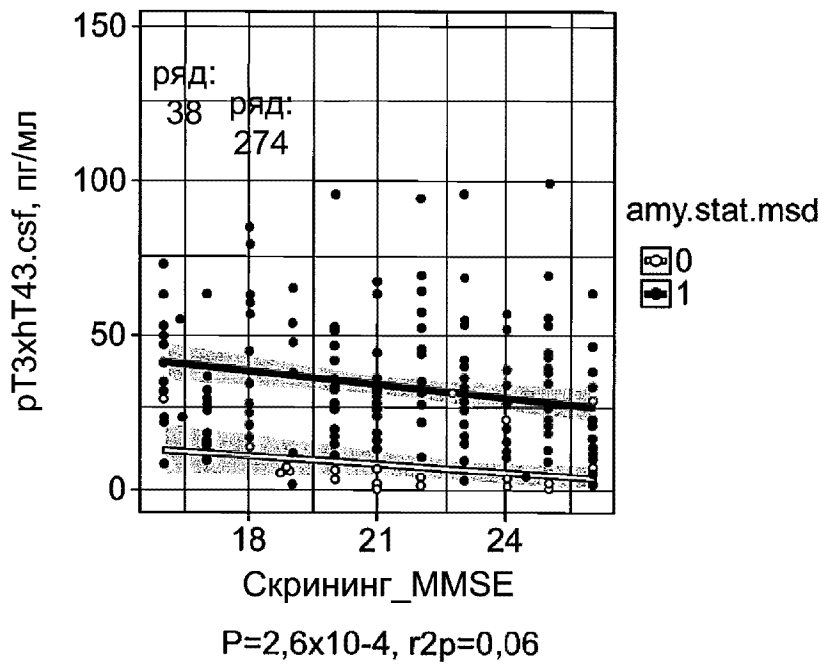
pT3xhT43.CSF(V2CSF:1-0), p 0.000000

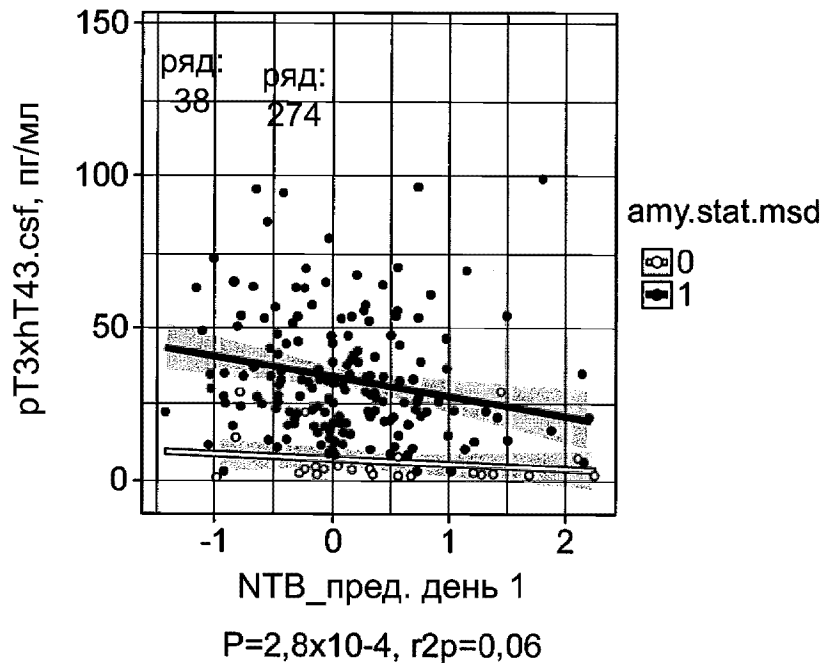
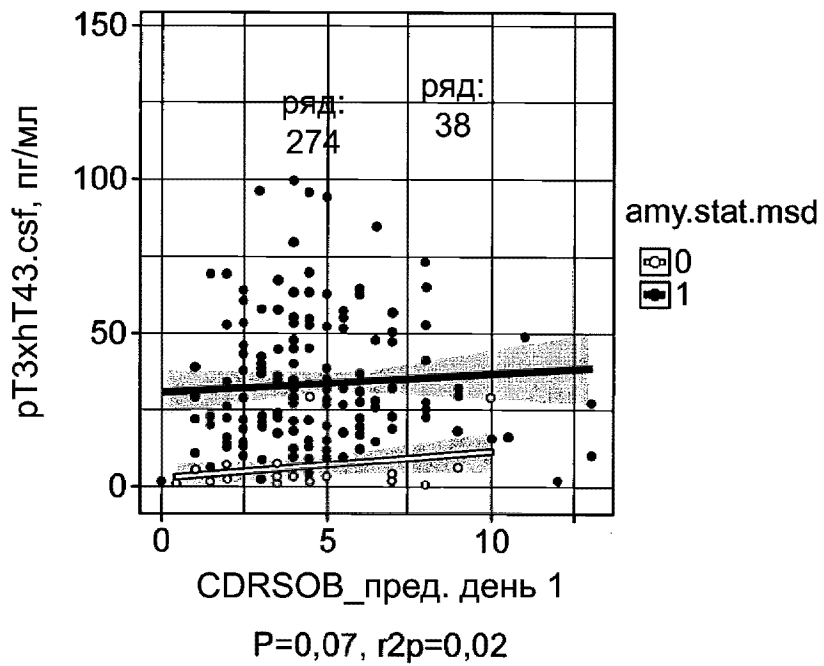


**FIG. 18E**

pt3xpt82.CSF(V2CSF:1-0), p 0.000000

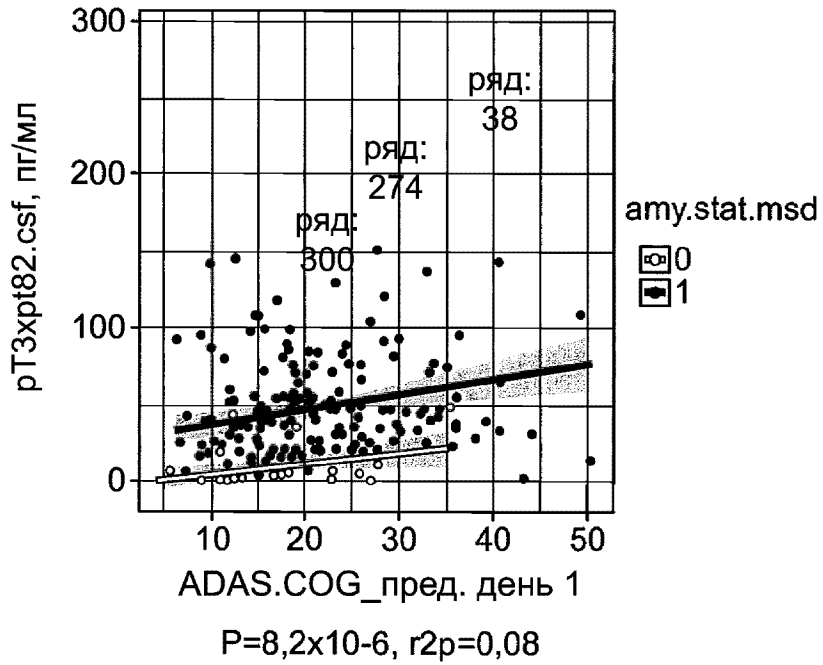


**ФИГ. 18F****ФИГ. 18G**

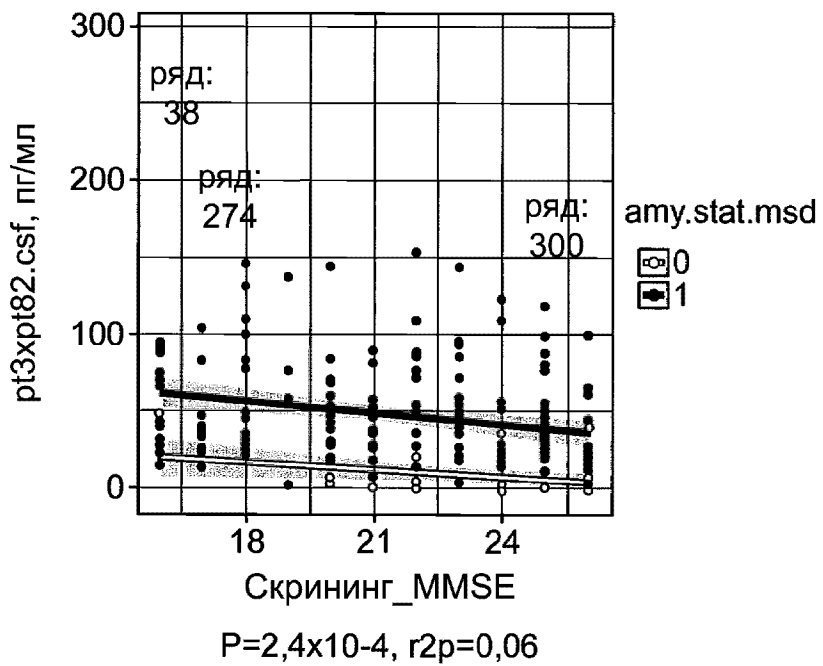
**ФИГ. 18Н****ФИГ. 18I**

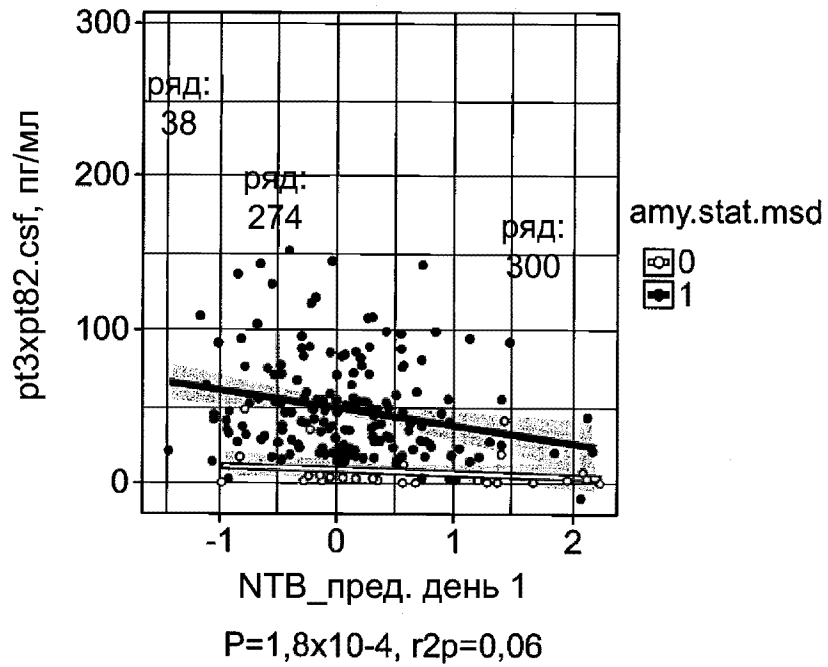
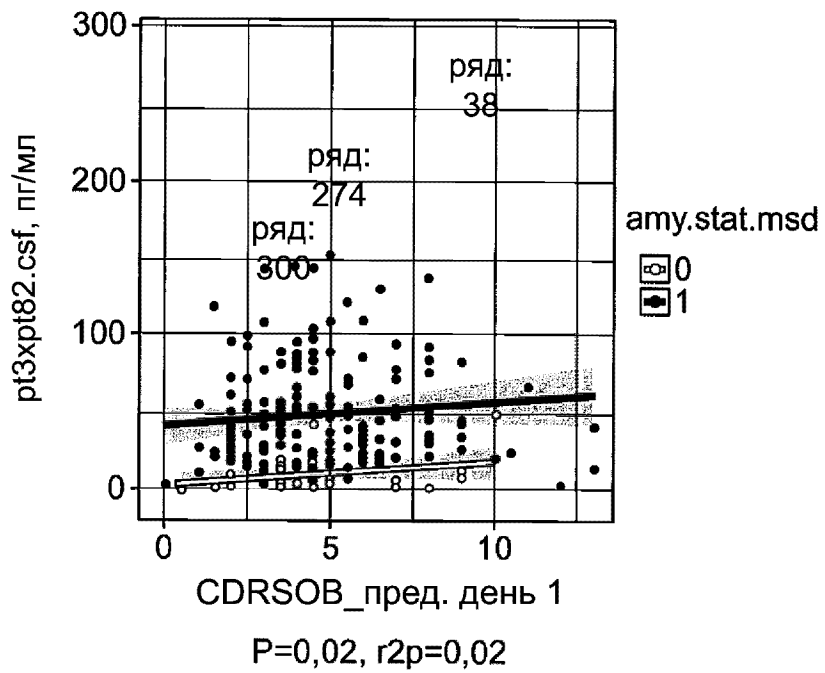
57/73

**ФИГ. 18J**



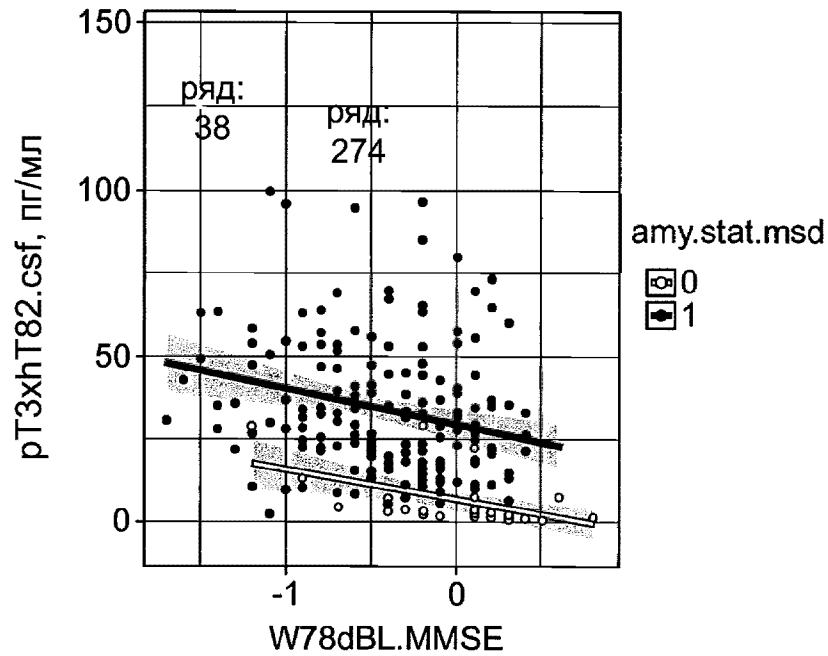
**ФИГ. 18K**



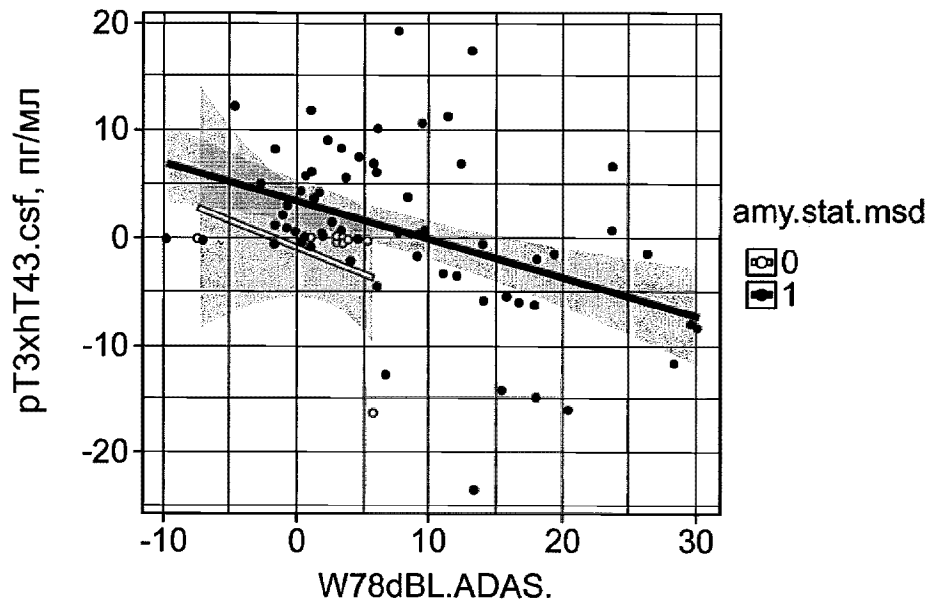
**ФИГ. 18L****ФИГ. 18M**

**ФИГ. 18N**

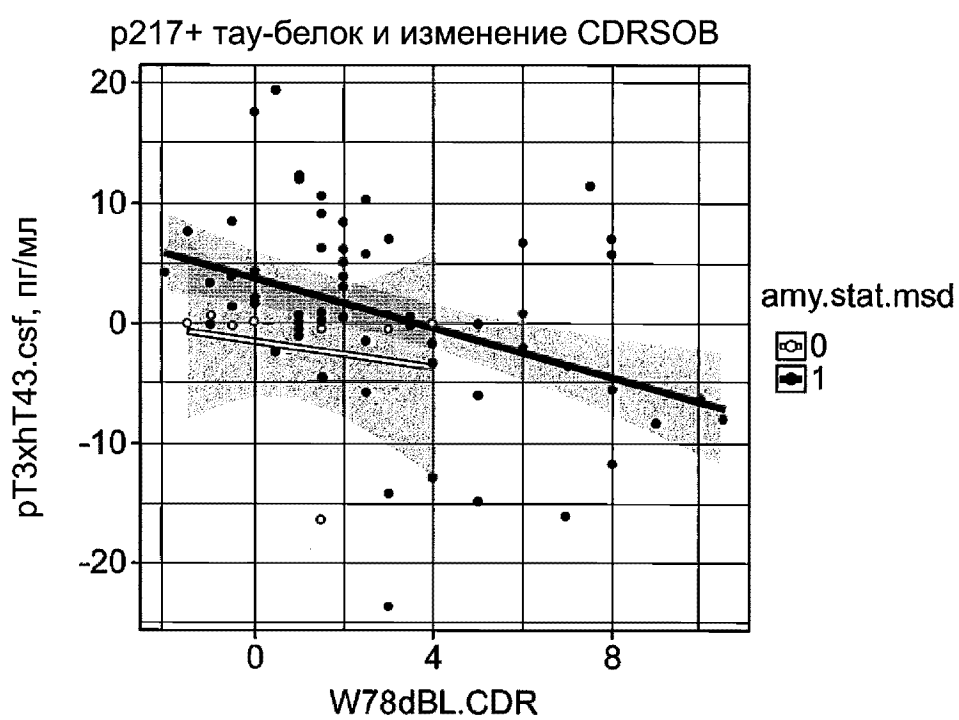
p217+ тау-белок и изменения MMSE

**ФИГ. 18O**

p217+ тау-белок и изменение ADAS-COG

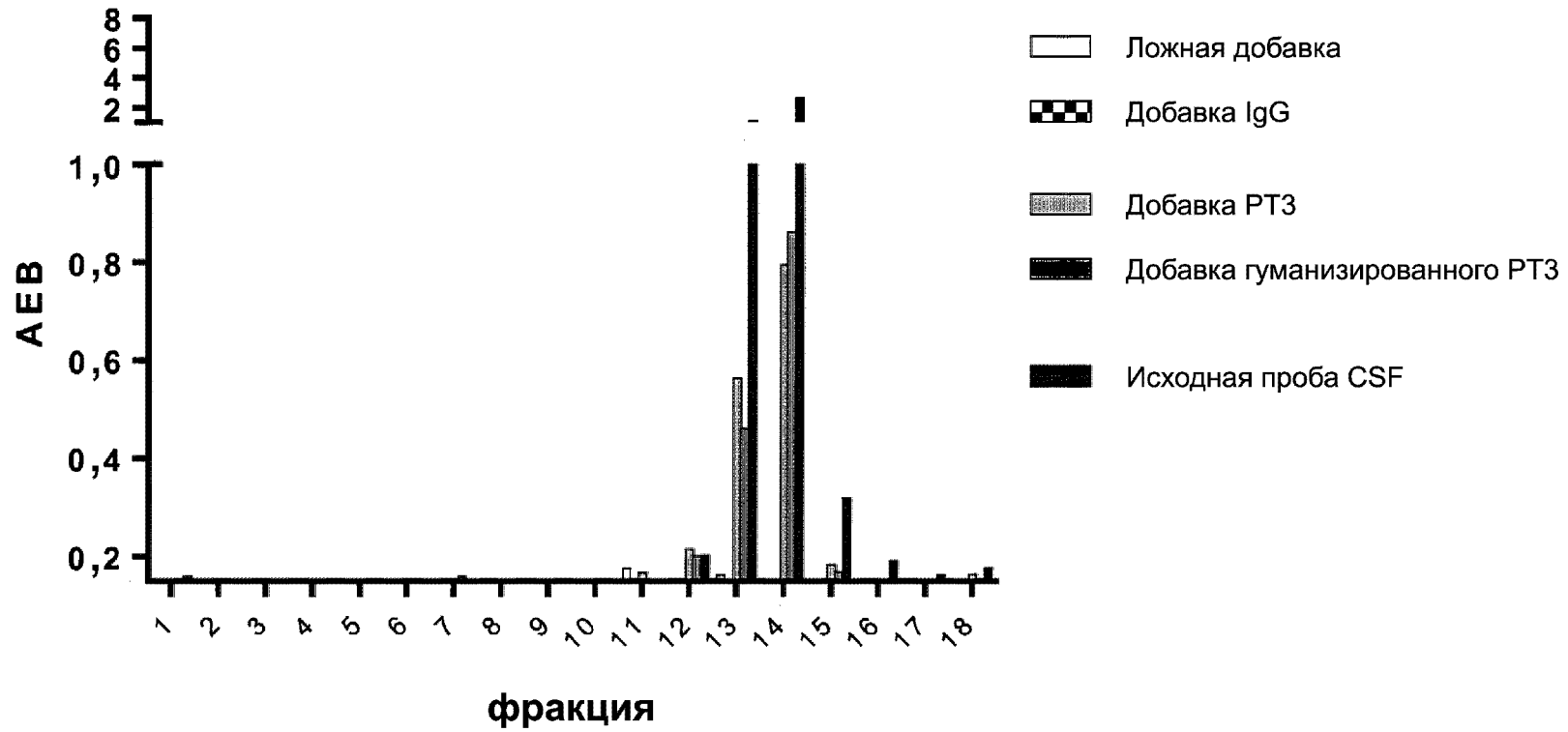




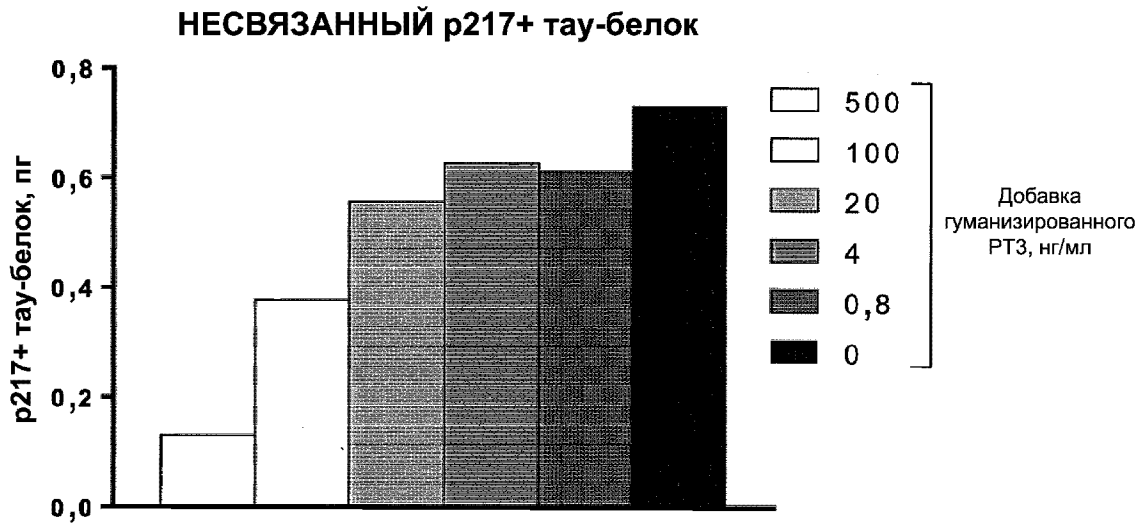
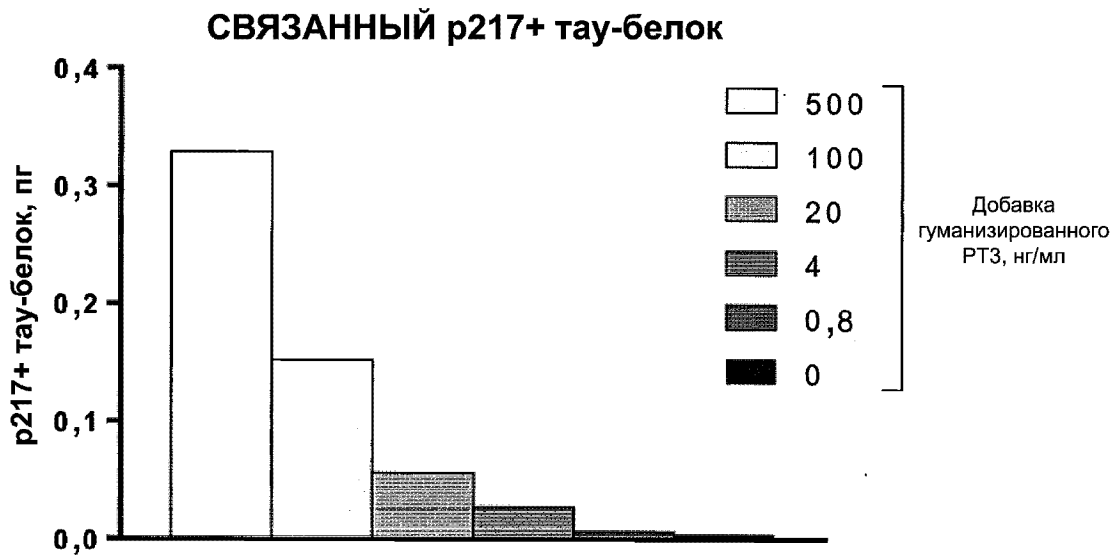
**ФИГ. 18Р**

**ФИГ. 19**

**Специфичность СВЯЗАННОГО p217+ тау-белка**

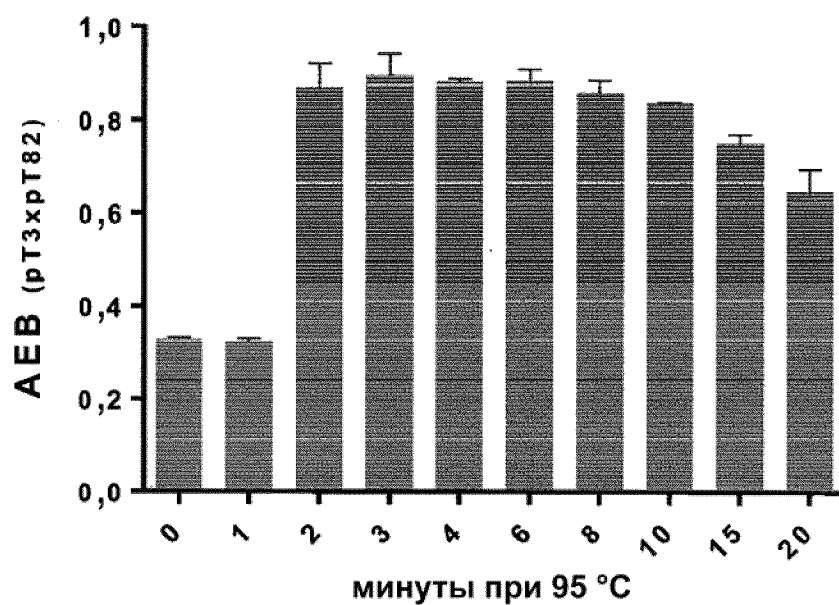


61/73

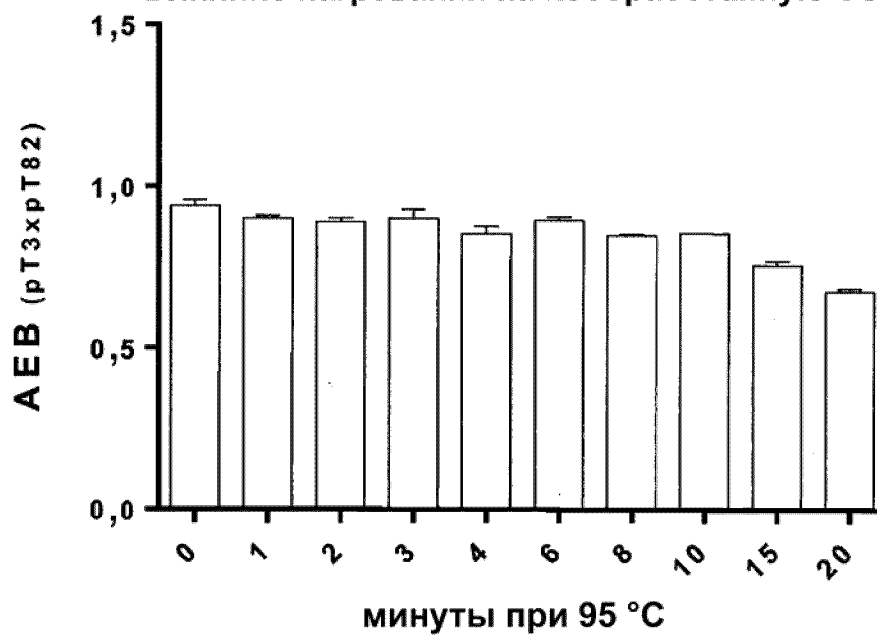
**ФИГ. 20А****ФИГ. 20В**

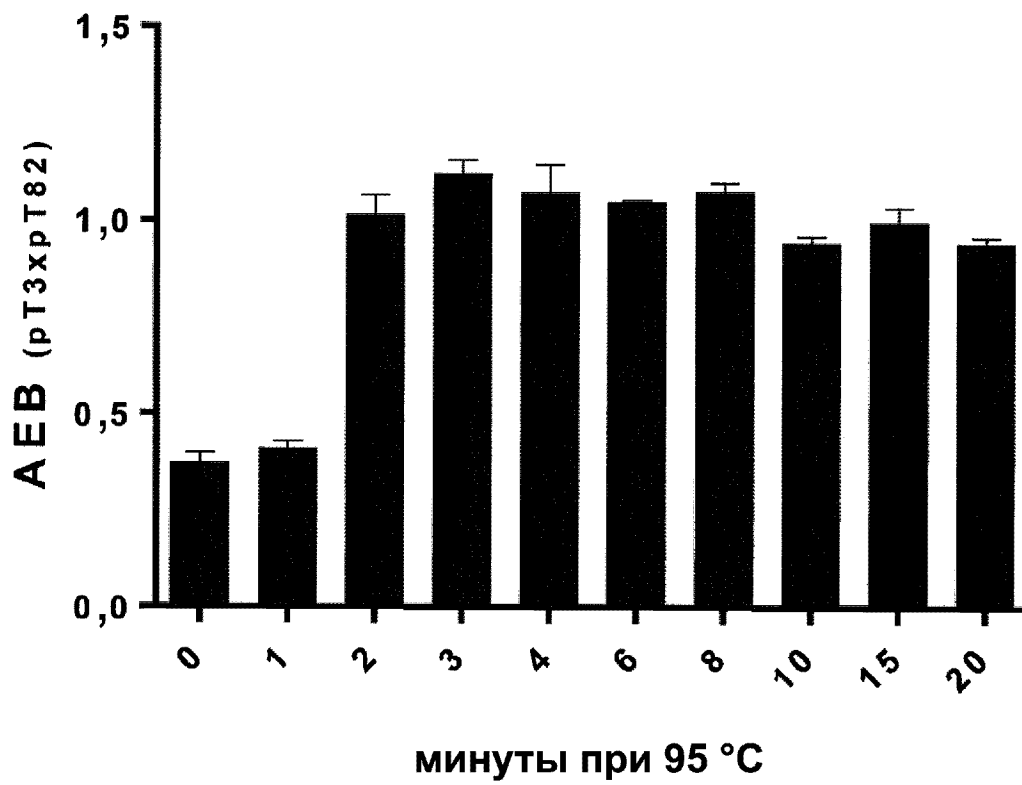
**ФИГ. 21А**

Влияние нагревания на смесь гуманизированного РТЗ/CSF

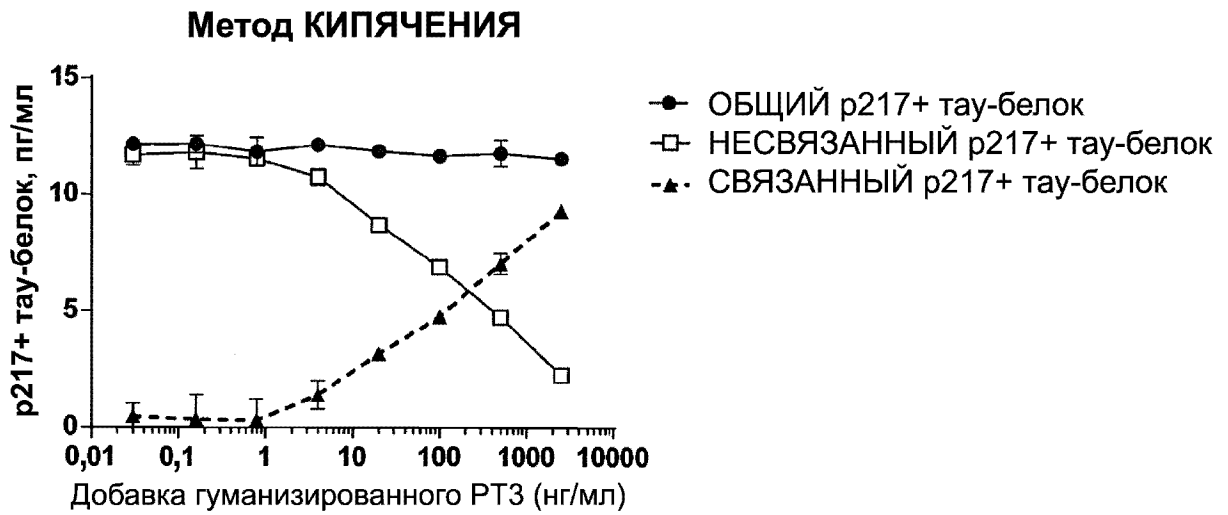
**ФИГ. 21В**

Влияние нагревания на необработанную CSF

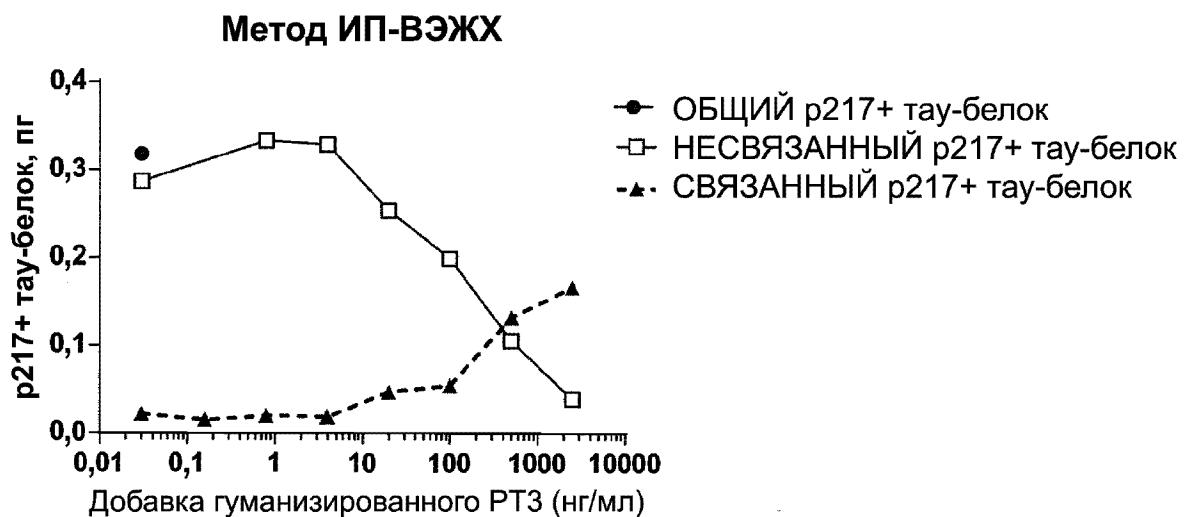


**ФИГ. 21С****Влияние нагрева на гуманизированное РТЗ**

ФИГ. 22А

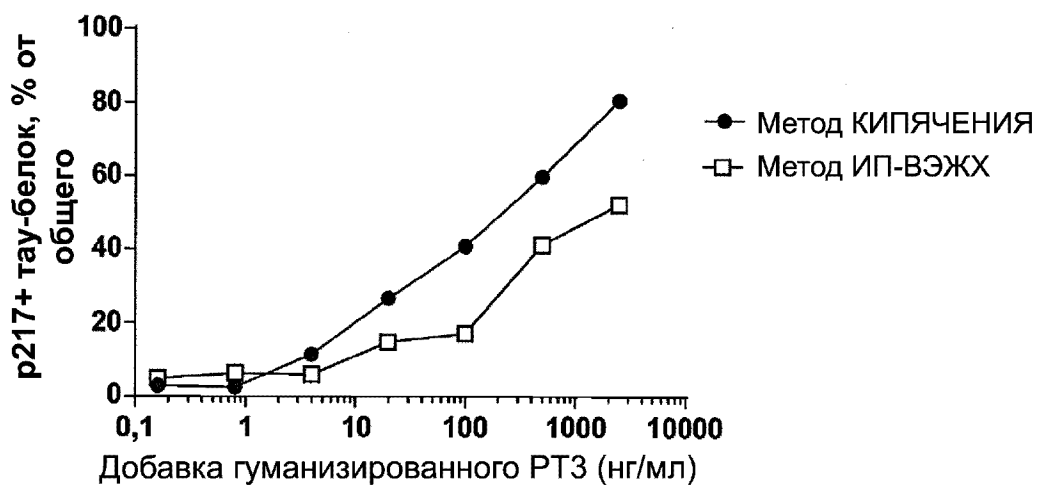


ФИГ. 22В



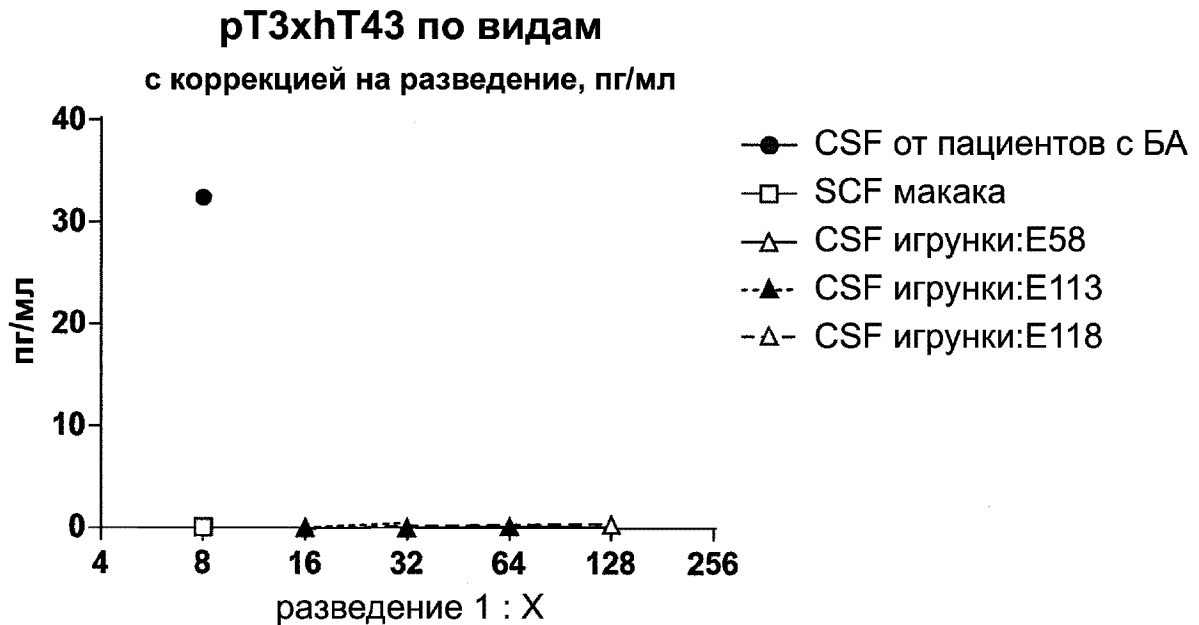
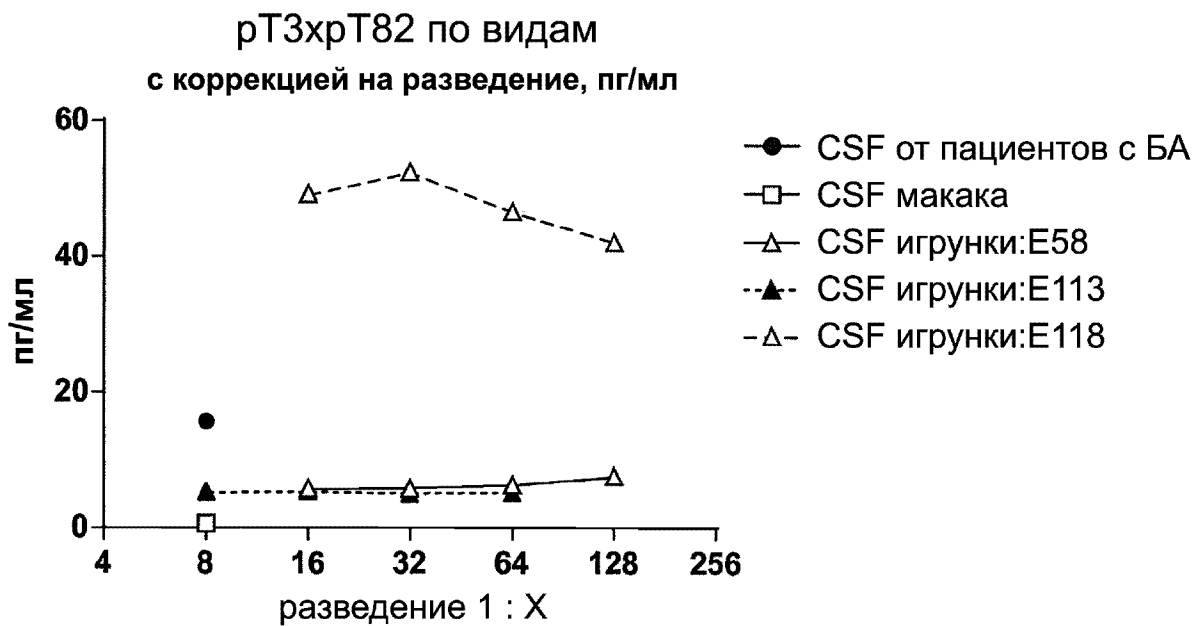
**ФИГ. 22С**

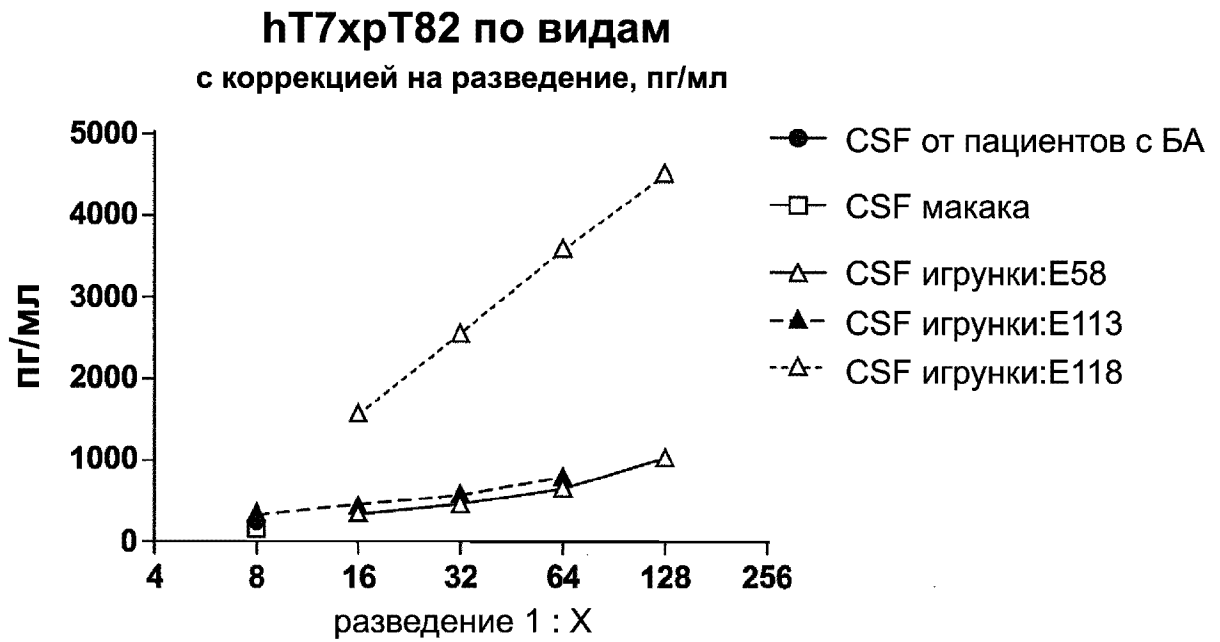
**Сравнение методов КИПЯЧЕНИЯ и ИП-ВЭЖХ:  
% СВЯЗАННОГО тау-белка**

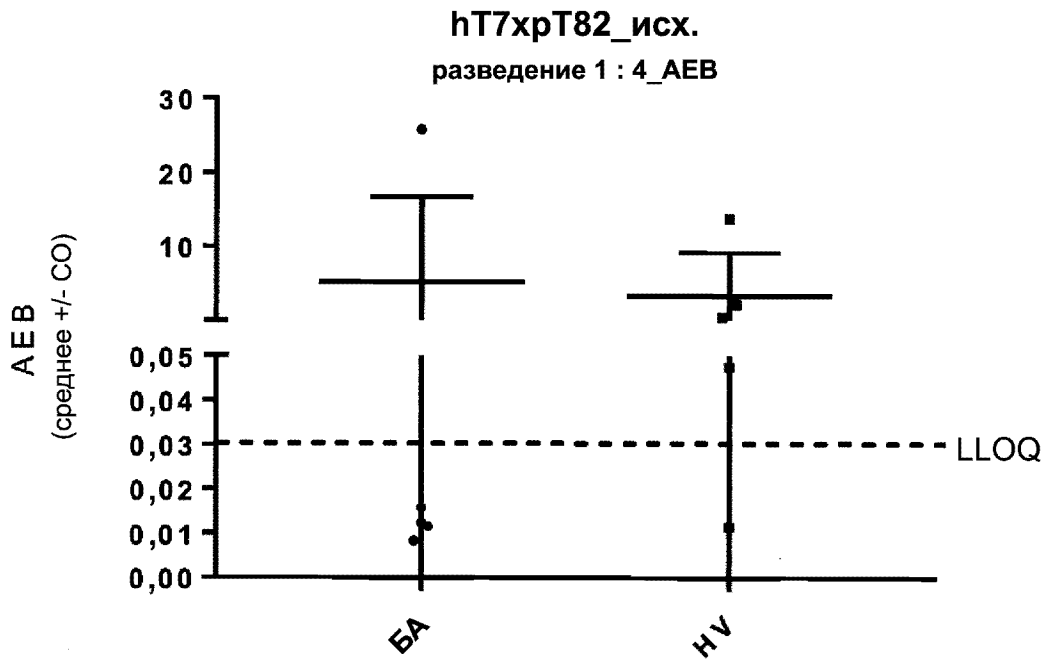
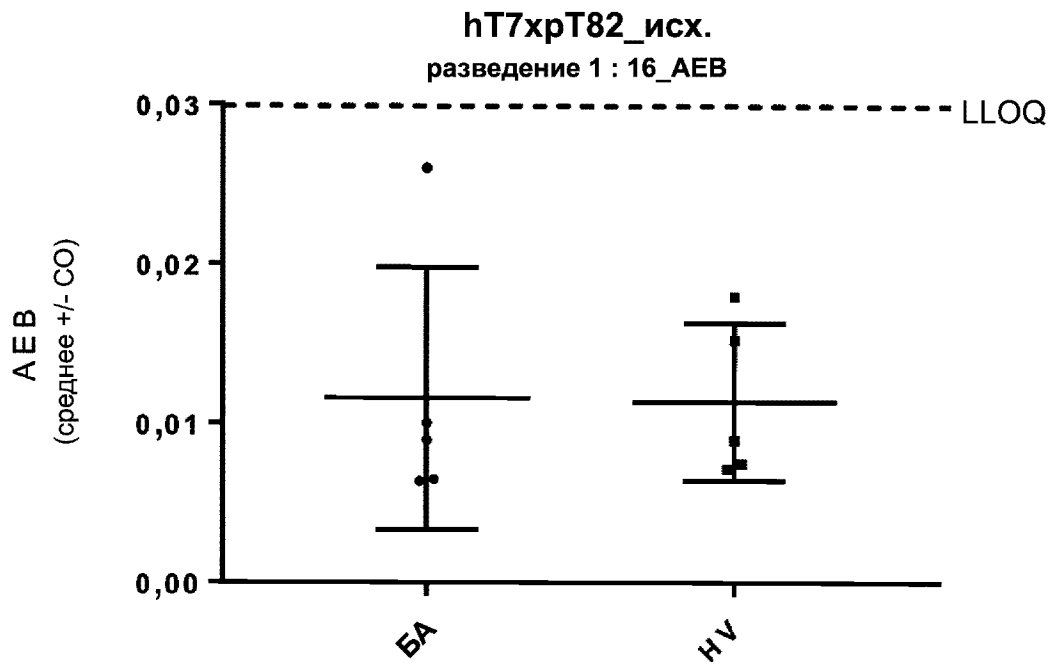






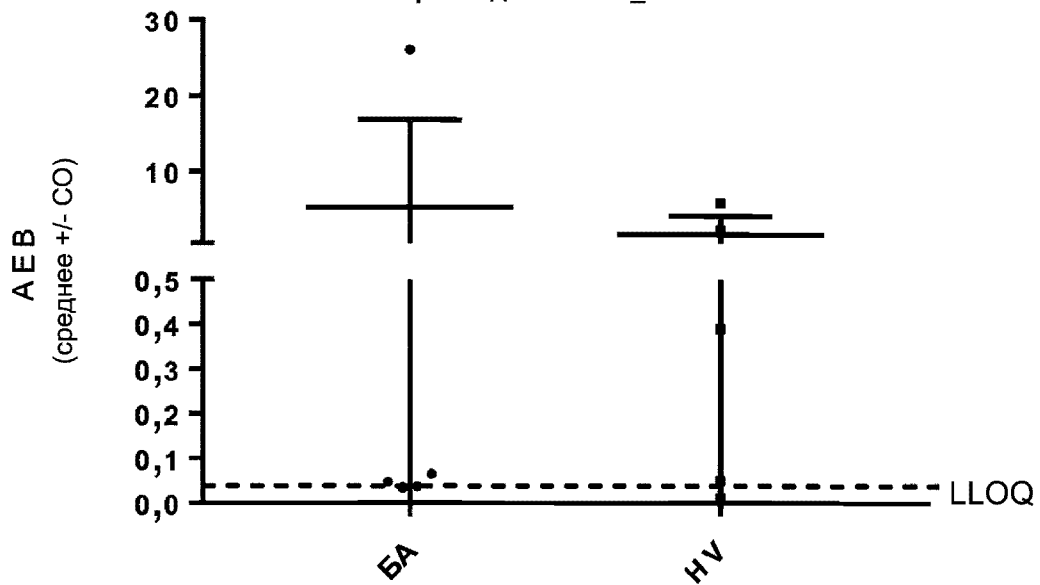
**ФИГ. 24А****ФИГ. 24В**

**ФИГ. 24С**

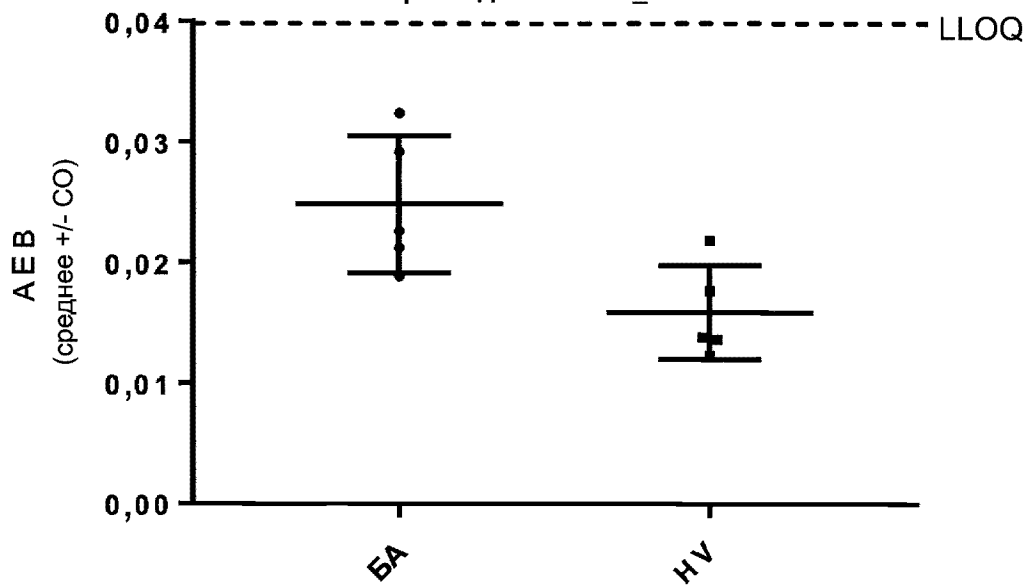
**ФИГ. 25А****ФИГ. 25В**

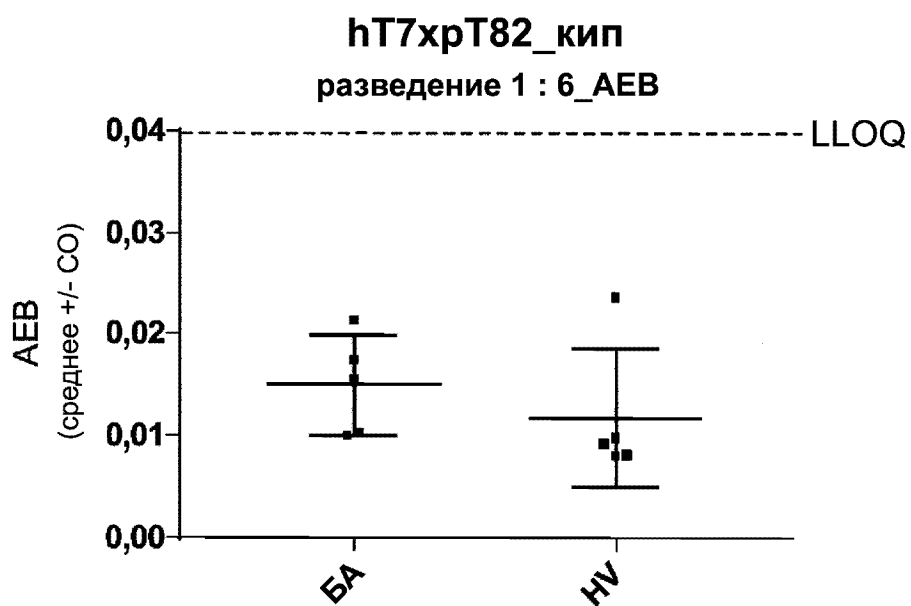
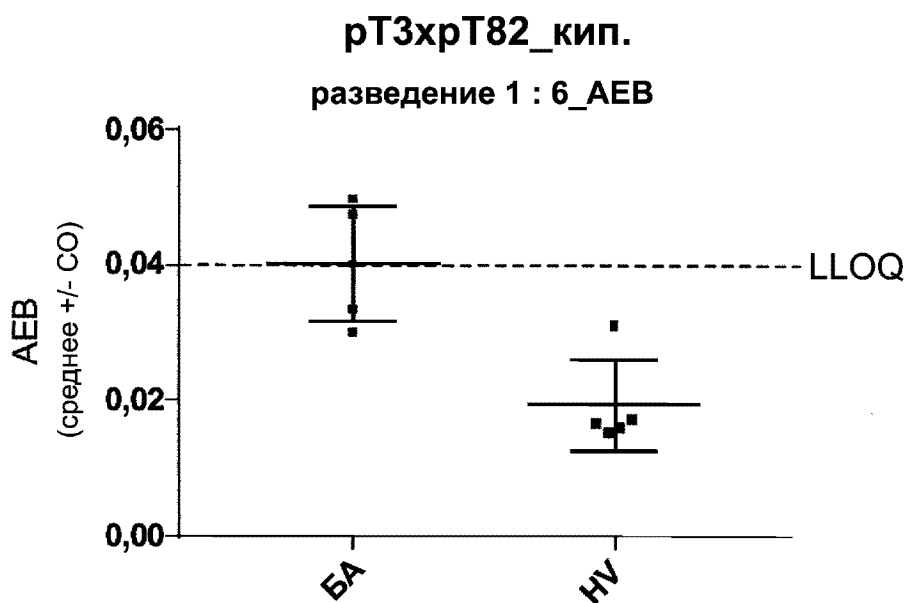
**ФИГ. 25С**

рТ3хрТ82\_исх.  
разведение 1 : 4\_АЕВ

**ФИГ. 25D**

рТ3хрТ82\_исх.  
разведение 1 : 16\_АЕВ



**ФИГ. 26А****ФИГ. 26В**

ФИГ. 27

