

АНАЛИЗ ПРОБ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ КРОВИ, ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ТАУПАТИИ
ИЛИ АМИЛОИДОГЕННОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ

5

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0001] Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, представленный в электронном виде в формате ASCII и в полном объеме включенный в настоящий документ путем ссылки. Копия указанного перечня в формате ASCII, созданная 10 30 июня 2021 г., называется JAB7064WOPCT_SL.txt и имеет размер 20 602 байта.

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА СМЕЖНЫЕ ЗАЯВКИ

[0002] Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/705,759, поданной 14 июля 2020 г., и предварительной заявке на патент США № 63/200,399, поданной 4 марта 2021 г., содержание которых в полном 15 объеме включено в настоящий документ путем ссылки.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Настоящая заявка относится к способам обнаружения таупатии и/или 20 амилоидогенного заболевания. В частности, изобретение настоящей заявки относится к способам измерения количества фосфорилированных по одному или нескольким сайтам видов p217+тау-белка в пробах, полученных из крови, и их применениям.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] Болезнь Альцгеймера (БА) представляет собой дегенеративное расстройство 25 головного 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 прогрессирующих нарушений умственных способностей (деменции) у пожилых людей. 30 В Соединенных Штатах Америки более 5 миллионов людей живут с БА, и это число растет по мере старения популяции. Действительно, БА имеется у 10 % людей в возрасте старше 65 лет, и это 5-я из основных причин смерти в данной популяции. В целом в Соединенных Штатах Америки БА является 6-й из основных причин смерти (1

из 3 пожилых людей умирает от БА или другого вида деменции), и, по подсчетам, в 2020 году это обошлось в 305 миллиардов долларов США. БА наблюдается также в различных этнических группах по всему миру и является сегодня и останется в будущем одной из основных проблем здравоохранения.

5 **[0005]** 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
10 парных спиральных филаментов, в нескольких областях мозга человека, важных для памяти и когнитивных функций.

[0006] Нейрофибриллярные клубки главным образом состоят из агрегатов гиперфосфорилированного тау-белка. Главной физиологической функцией тау-белка является полимеризация и стабилизация микротрубочек. Связывание тау-белка с
15 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-
20 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).

25 **[0007]** 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).
30 Считается, что таупатия может распространяться подобно прионам от одной области головного мозга к другой. Этот процесс распространения может включать в себя экстернализацию агрегатов тау-белка, которые могут захватываться близлежащими нейронами и могут индуцировать дальнейшую таупатию.

[0008] Многочисленные биохимические изменения могут быть обнаружены в период до 20 лет до появления симптомов. Рамочная программа научных исследований Национального института старения США и Ассоциации по борьбе с болезнью Альцгеймера (NIA-AA) предлагает механизм для диагностики болезни Альцгеймера (БА) на основе измерений показателей, которые связаны с лежащими в основе болезни патологическими процессами, β -амилоидом (A), патологическими формами тау-белка (T) и нейродегенерацией (N). Для измерения у пациентов показателей тау-патологии с нейрофибриллярными клубками (NFT) применяют позитронно-эмиссионную томографию с тау-специфичными радиоактивными индикаторами (тау-ПЭТ). Однако тау-ПЭТ — это дорогостоящая и трудоемкая процедура, а доступность тау-специфичных радиоактивных индикаторов может быть ограниченной.

[0009] Фрагменты тау-белка в нейрофибриллярных клубках попадают в спинномозговую жидкость (CSF), откуда их можно отбирать и измерять с помощью чувствительных анализов. Таким образом, наличие неврологического заболевания можно определять с помощью анализов, которые распознают производные от тау-белка фрагменты в CSF. Однако для получения CSF пациенты должны быть подвергнуты инвазивным процедурам люмбальной пункции, во время которых врач вводит иглу в спинномозговой канал для взятия проб CSF для применения в анализе. Такие процедуры вызывают дискомфорт и неприятны для пациента, поэтому их нежелательно часто повторять, и они неприемлемы для регулярного контроля течения заболевания у пациентов.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0010] Один пример осуществления настоящей заявки относится к аналитическому способу обнаружения p217+тау-пептидов у субъекта. При этом способ включает приведение пробы плазмы в контакт с захватным антителом, направленным на p217+тау-эпитоп, для связывания захватного антитела с p217+тау-пептидами в плазме с образованием комплексов антитело-пептид; и промывание комплексов антитело-пептид. Далее способ включает приведение комплексов антитело-пептид в контакт с детекторным антителом для связывания детекторного антитела с комплексами антитело-пептид. Затем способ включает обнаружение детекторного антитела для определения количества p217+тау-пептидов в пробе плазмы.

[0011] Также предложен способ обнаружения таупатии у субъекта. Способ включает получение пробы плазмы у субъекта и обнаружение некоторого количества

p217+тау-пептидов, присутствующих в пробе плазмы, аналитическим способом. В анализе применяют захватное антитело, направленное на p217+тау-эпитоп, для связывания захватного антитела с p217+тау-пептидами в плазме с образованием комплексов антитело-пептид и детекторное антитело для связывания детекторного антитела с комплексами антитело-пептид. Способ дополнительно включает стадию определения наличия у субъекта таупатии или подверженности субъекта риску развития таупатии, когда количество p217+тау-пептидов выше заданного порогового значения. При этом заданное пороговое значение превышает нижний предел количественного определения (LLOQ) анализа.

5
10 **[0012]** Также предложен способ обнаружения амилоидогенного заболевания у субъекта. Способ включает получение пробы плазмы у субъекта и обнаружение некоторого количества p217+тау-пептидов, присутствующих в пробе плазмы, аналитическим способом. В анализе применяют захватное антитело, направленное на p217+тау-эпитоп, для связывания захватного антитела с p217+тау-пептидами в плазме с образованием комплексов антитело-пептид и детекторное антитело для связывания детекторного антитела с комплексами антитело-пептид. Способ дополнительно включает стадию определения наличия у субъекта амилоидогенного заболевания или подверженности субъекта риску развития амилоидогенного заболевания, когда количество p217+тау-пептидов выше заданного порогового значения. При этом заданное пороговое значение превышает нижний предел количественного определения (LLOQ) анализа.

15
20 **[0013]** В другом аспекте настоящей заявки предложен способ обнаружения или прогнозирования таупатии у субъекта. Способ включает обнаружение некоторого количества p217+тау-пептидов в пробе плазмы посредством приведения пробы плазмы в контакт с захватным антителом, направленным на p217+тау-эпитоп, для связывания захватного антитела с p217+тау-пептидами в плазме с образованием комплексов антитело-пептид, приведение по отдельности комплексов антитело-пептид в контакт с детекторным антителом для связывания детекторного антитела с комплексами антитело-пептид и генерирование данных по тау-белку, соответствующих количеству обнаруженных p217+тау-пептидов. Способ также включает получение данных по биомаркерам, соответствующих по меньшей мере одному биомаркеру, определенному у пациента, причем биомаркер выбирают из группы, содержащей NFL, адипонектин и лептин. Способ дополнительно включает сравнение данных по тау-белку и дополнительных данных по биомаркерам с набором эталонных данных с применением

модуля машинного обучения для определения или прогнозирования наличия у субъекта таупатии или подверженности субъекта риску развития таупатии.

5 [0014] Эти и другие аспекты изобретения станут очевидны специалистам в данной области после прочтения приведенного ниже подробного описания изобретения, включая фигуры и приложенную формулу изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0015] На Фиг. 1а приведены данные определения p217+тау-белка в плазме при разведении 1 : 4, полученные с применением описанного выше анализа.

10 [0016] На Фиг. 1б приведены данные определения p217+тау-белка в плазме при разведении 1 : 16, полученные с применением описанного выше анализа.

[0017] На Фиг. 1в приведены данные определения p217+тау-белка в полуденатурированных пробах плазмы, полученные с применением описанного выше анализа.

15 [0018] На Фиг. 1г приведены данные определения p217+тау-белка в иммунопреципитированных пробах плазмы, полученные с применением описанного выше анализа.

[0019] На Фиг. 2а приведены данные, демонстрирующие корреляцию между показателями p217+тау-белка в спинномозговой жидкости (CSF), полученными с применением описанного выше анализа, и показателями p217+тау-белка в CSF, полученными с применением примера анализа настоящей заявки.

20 [0020] На Фиг. 2б приведены данные сравнения определенных в сыворотке уровней p217+тау-белка, полученных с применением описанного выше анализа, и определенных в сыворотке уровней p217+тау-белка, полученных с применением примера анализа настоящей заявки.

[0021] На Фиг. 3а приведены данные, демонстрирующие корреляцию между показателями p217+тау-белка в CSF, полученными с применением двух различных детекторных антител в соответствии с примерами осуществления настоящей заявки.

25 [0022] На Фиг. 3б приведены данные, демонстрирующие корреляцию между показателями p217+тау-белка в сыворотке, полученными с применением двух различных детекторных антител в соответствии с примерами осуществления настоящей заявки.

[0023] На Фиг. 3в приведены данные, демонстрирующие корреляцию между показателями p217+тау-белка в плазме, полученными с применением двух различных детекторных антител в соответствии с примерами осуществления настоящей заявки.

5 [0024] На Фиг. 4а приведены данные сравнения влияния различных разбавителей проб на агрегацию гранул в примерах осуществления настоящей заявки.

[0025] На Фиг. 4б приведены данные сравнения влияния различных разбавителей проб на уровни p217+тау-белка, определенные в соответствии с примерами осуществления настоящей заявки.

10 [0026] На Фиг. 5а приведены данные по обнаруженному в сыворотке p217+тау-белку, полученные в соответствии с примером осуществления настоящей заявки.

[0027] На Фиг. 5б приведены данные по обнаруженному в плазме p217+тау-белку, полученные в соответствии с примером осуществления настоящей заявки.

15 [0028] На Фиг. 5в приведены данные, демонстрирующие корреляцию между p217+тау-белком, обнаруженным в сыворотке, как показано на Фиг. 5б, и p217+тау-белком, обнаруженным в плазме, как показано на Фиг. 5в.

[0029] На Фиг. 5г приведены данные, демонстрирующие корреляцию между p217+тау-белком, обнаруженным в плазме, как показано на Фиг. 5в, и p217+тау-белком, обнаруженным в сыворотке, как показано на Фиг. 5б.

20 [0030] На Фиг. 6а приведены примеры калибровочных кривых, сгенерированных с применением калибровочного пептида для примера осуществления анализа настоящей заявки.

[0031] На Фиг. 6б приведены данные, демонстрирующие линейность при разведении в примере анализа настоящей заявки в сыворотке и плазме.

25 [0032] На Фиг. 7а приведены данные, демонстрирующие прецизионность в одном анализе в примере анализа настоящей заявки в плазме.

[0033] На Фиг. 7б приведены данные, демонстрирующие прецизионность в разных анализах в примере анализа настоящей заявки в плазме.

[0034] На Фиг. 7в приведены дополнительные данные, демонстрирующие прецизионность в одном анализе в примере анализа настоящей заявки в плазме.

30 [0035] На Фиг. 8а приведены данные, демонстрирующие корреляцию p217+тау-белка, обнаруженного в CSF, и p217+тау-белка, обнаруженного в плазме с применением примера анализа настоящей заявки у субъектов с БА.

[0036] На Фиг. 8б приведены дополнительные данные, демонстрирующие корреляцию p217+тау-белка, обнаруженного в CSF, и p217+тау-белка, обнаруженного в плазме с применением примера анализа настоящей заявки у субъектов с БА.

5 [0037] На Фиг. 9а приведены дополнительные данные, демонстрирующие корреляцию p217+тау-белка, обнаруженного в CSF, и p217+тау-белка, обнаруженного в плазме с применением примера анализа настоящей заявки в когорте валидации.

10 [0038] На Фиг. 9б приведена характеристическая кривая обнаружения (ROC) для данных, показанных на Фиг. 7б, демонстрирующая чувствительность измерений в плазме, полученных с применением примера анализа настоящей заявки, при выявлении патологий головного мозга, обусловленных таупатией.

[0039] На Фиг. 10а представлены данные, демонстрирующие корреляцию p217+тау-белка, обнаруженного в CSF, с накоплением тау-белка в ткани головного мозга, обнаруженной посредством визуализации с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ).

15 [0040] На Фиг. 10б приведена ROC-кривая для данных, показанных на Фиг. 7б, демонстрирующая чувствительность измерений p217+тау-белка в CSF при выявлении патологий головного мозга, обусловленных таупатией.

20 [0041] На Фиг. 11а приведены дополнительные данные, демонстрирующие корреляцию p217+тау-белка, обнаруженного в CSF, и p217+тау-белка, обнаруженного в плазме с применением примера анализа настоящей заявки в когорте валидации.

[0042] На Фиг. 11б приведена подгруппа данных с Фиг. 11а для пациентов, положительных по амилоиду и имеющих соотношение $A\beta_{42}/40$ в CSF $\leq 0,089$.

[0043] На Фиг. 11в приведена подгруппа данных с Фиг. 11а для пациентов, отрицательных по амилоиду и имеющих соотношение $A\beta_{42}/40$ в CSF $> 0,089$.

25 [0044] На Фиг. 12а приведены данные, демонстрирующие корреляцию p181-тау-белка, обнаруженного в CSF, и p217+тау-белка, обнаруженного в плазме с применением примера анализа настоящей заявки.

30 [0045] На Фиг. 12б приведена ROC-кривая для данных, показанных на Фиг. 12в, демонстрирующая чувствительность измерений p217+тау-белка в плазме при выявлении уровней p217+тау-белка в CSF.

[0046] На Фиг. 12в приведены данные, показанные на Фиг. 11а, с пороговыми значениями для p217+тау-белка в плазме и p217+тау-белка в CSF для выявления пациентов, имеющих таупатию или подверженных риску развития таупатии, в отличие от пациентов, которые не подвержены риску развития таупатии.

- [0047] На Фиг. 12г приведена ROC-кривая для данных, показанных на Фиг. 12д, демонстрирующая чувствительность измерений p217+тау-белка в плазме при выявлении уровней p217+тау-белка в CSF.
- 5 [0048] На Фиг. 12д приведена подгруппа данных, показанных на Фиг. 12в, для субъектов с нормальными когнитивными функциями.
- [0049] На Фиг. 12е приведена ROC-кривая для данных, показанных на Фиг. 12ж, демонстрирующая чувствительность измерений p217+тау-белка в плазме при выявлении аномальных уровней p217+тау-белок в CSF.
- 10 [0050] На Фиг. 12ж приведена подгруппа данных, показанных на Фиг. 12в, для субъектов с деменцией легкой или умеренной степени.
- [0051] На Фиг. 13а приведена ROC-кривая для данных, показанных на Фиг. 13б, демонстрирующая чувствительность измерений p217+тау-белка в плазме при выявлении аномальных соотношений A β 42/40 в CSF.
- 15 [0052] На Фиг. 13б приведены данные, демонстрирующие корреляцию соотношения A β 42/40 в CSF и p217+тау-белка, обнаруженного в плазме с применением примера анализа настоящей заявки.
- [0053] На Фиг. 13в приведена ROC-кривая для данных, показанных на Фиг. 13г, демонстрирующая чувствительность измерений p217+тау-белка в плазме при выявлении аномальных соотношений A β 42/40 в CSF.
- 20 [0054] На Фиг. 13г приведена подгруппа данных, показанных на Фиг. 13а, для субъектов с нормальными когнитивными функциями.
- [0055] На Фиг. 13д приведена ROC-кривая для данных, показанных на Фиг. 13е, демонстрирующая чувствительность измерений p217+тау-белка в плазме при выявлении аномальных соотношений A β 42/40 в CSF.
- 25 [0056] На Фиг. 13е приведена подгруппа данных, показанных на Фиг. 13а, для субъектов с деменцией легкой или умеренной степени.
- [0057] На Фиг. 14а приведены данные, демонстрирующие корреляцию p217+тау-белка, обнаруженного в CSF, и p217+тау-белка, обнаруженного в неочищенной плазме с применением примера анализа настоящей заявки.
- 30 [0058] На Фиг. 14б приведены данные, демонстрирующие корреляцию p217+тау-белка, обнаруженного в CSF, и p217+тау-белка, обнаруженного в химически экстрагированной плазме с применением примера анализа настоящей заявки.

[0059] На Фиг. 14в приведены данные, демонстрирующие корреляцию p217+тау-белка, обнаруженного в CSF, и p217+тау-белка, обнаруженного в полуденатурированной плазме с применением примера анализа настоящей заявки.

5 **[0060]** На Фиг. 15а приведены данные по обнаруженному в полуденатурированных пробах плазмы p217+тау-белка, полученные в соответствии с примером осуществления анализа настоящей заявки.

[0061] На Фиг. 15б приведены примеры калибровочных кривых, сгенерированных с применением калибровочного пептида для еще одного примера осуществления анализа настоящей заявки, в котором пробы полуденатурируют перед измерением.

10 **[0062]** На Фиг. 15в приведены данные, демонстрирующие прецизионность в одном анализе в примере анализа, показанного на Фиг. 9б, в котором пробы полуденатурируют перед измерением.

[0063] На Фиг. 16а приведена ROC-кривая для способа машинного обучения для выявления патологий головного мозга, обусловленных таупатией, с применением сывороточных уровней p217+тау-белка в качестве биомаркерного элемента в соответствии с примером осуществления настоящей заявки.

15 **[0064]** На Фиг. 16б приведена ROC-кривая для способа машинного обучения для выявления патологий головного мозга, обусловленных таупатией, с применением сывороточных уровней p217+тау-белка и данных по легкой цепи нейрофиламентов (NFL) в качестве биомаркерных элементов в соответствии с примером осуществления настоящей заявки.

20 **[0065]** На Фиг. 16в приведена ROC-кривая для способа машинного обучения для выявления патологий головного мозга, обусловленных таупатией, с применением сывороточных уровней p217+тау-белка, данных по NFL и адипонектину в качестве биомаркерных элементов в соответствии с примером осуществления настоящей заявки.

25 **[0066]** На Фиг. 16г приведена ROC-кривая для способа машинного обучения для выявления патологий головного мозга, обусловленных таупатией, с применением сывороточных уровней p217+тау-белка, данных по NFL, адипонектину и лептину в качестве биомаркерных элементов в соответствии с примером осуществления настоящей заявки.

30 **[0067]** На Фиг. 16д приведена ROC-кривая для способа машинного обучения для выявления патологий головного мозга, обусловленных таупатией, с применением данных по NFL, адипонектину и лептину в качестве биомаркерных элементов в соответствии с примером осуществления настоящей заявки.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0068] Все технические и научные термины в настоящем документе, если не
указано иное, имеют общепринятое значение, понятное любому специалисту в области,
5 к которой относится данное изобретение. В ином случае определенные термины в
настоящем документе имеют значения, установленные в описании. Все патенты,
опубликованные заявки на патенты и публикации, процитированные в настоящем
документе, включены в него путем ссылки, как если бы они были полностью изложены
в настоящем документе. Следует отметить, что в рамках настоящего документа и
10 прилагаемой формулы изобретения использование формы единственного числа
включает объекты во множественном числе, если из контекста явно не следует иное.

[0069] 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
15 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% (масс./об.) включает от 0,9% (масс./об.) до 11%
(масс./об.). В настоящем документе применение числового диапазона явным образом
включает все возможные поддиапазоны, все отдельные числовые значения в пределах
20 этого диапазона, включая целые числа в пределах таких диапазонов и дробные
значения, если из контекста явно не следует иное.

[0070] При использовании в настоящем документе термин «антитело» или
«иммуноглобулин» означает специфический белок, способный связываться с
антигеном или его частью. Эти термины используются в настоящем документе в
25 широком смысле и включают в себя молекулы иммуноглобулинов или антител,
включая поликлональные антитела, моноклональные антитела (включая мышинные,
человеческие, адаптированные для человека, гуманизированные и химерные
моноклональные антитела) и фрагменты антител.

[0071] В целом антитела представляют собой белки или пептидные цепи, которые
30 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 изоформы IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Соответственно,

антитела настоящей заявки могут быть из любого из пяти основных классов или соответствующих подклассов. Антитела настоящей заявки 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 настоящей заявки могут содержать константный домен легкой цепи каппа или лямбда. В соответствии с конкретными вариантами осуществления антитела настоящей заявки включают константные области тяжелой и/или легкой цепи мышиных антител или человеческих антител.

10 **[0072]** 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.

15 (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));

20 (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).

25 (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 T-клеточных рецепторов. В международной базе данных ImMunoGeneTics (IMGT) (<http://www.imgt.org>) представлены стандартизированная нумерация и определение этих областей.

30

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.

[0073] Термины «каркас» или «каркасные последовательности» представляют собой оставшиеся последовательности варибельной 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 варибельных доменов. Каждый из варибельных доменов нативной тяжелой и легкой цепей содержит четыре FR (соответственно FR1, FR2, FR3 и FR4), которые по существу принимают конфигурацию бета-листов, соединенных тремя гиперварибельными петлями. Гиперварибельные петли в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости при помощи FR и, вместе с гиперварибельными петлями из другой цепи, способствуют образованию антигенсвязывающего сайта антител. Структурный анализ антител выявил взаимосвязь между последовательностью и формой сайта 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 варибельность 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.

[0074] При использовании в настоящем документе термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к фрагменту антитела, такому как, например, диатело, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv-фрагмент, стабилизированный дисульфидными связями Fv-фрагмент (dsFv), (dsFv)₂, биспецифический dsFv (dsFv-dsFv'), стабилизированное дисульфидными связями диатело (ds-диатело), одноцепочечная молекула антитела (scFv), однодоменное

антитело (sdab), scFv-димер (двухвалентное антитело), биспецифическое или 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
5 связывается с антигеном, но не содержит полной структуры 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
10 соответствии с другими конкретными вариантами осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит Fab и F(ab').

[0075] При использовании в настоящем документе термин «эпитоп» относится к сайту на антигене, с которым специфически связывается иммуноглобулин, антитело
15 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
20 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 2-мерный ядерный магнитный резонанс. См., например, Epitope
25 Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996).

[0076] 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
30 441 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. При использовании 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.

[0077] 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.

[0078] При использовании в настоящем документе термины «p217+тау-пептиды», «p217+тау» или «p217+тау-белок» означают человеческий тау-белок или тау-фрагмент, который фосфорилирован по остатку 217 (pT217) тау-белка и может быть или может не быть дополнительно фосфорилирован по добавочным остаткам, таким как, например, остаток 212 (pT212) тау-белка, причем нумерация положений соответствует нумерации в SEQ ID NO: 1.

[0079] 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 остатку 217 и может быть или может не быть дополнительно фосфорилирован по добавочным остаткам, таким, например, как остаток 212, причем нумерация положений соответствует нумерации в SEQ ID NO: 1.

[0080] При использовании в настоящем документе каждый из терминов «длинные p217+тау-пептиды», «длинный p217+тау-белок», «длинная форма p217+тау-пептидов» или «длинный фрагмент p217+тау-пептидов» имеет одно и то же значение и обозначает p217+тау-пептиды, которые содержат эпитоп p217+тау-белка и эпитоп, содержащий аминокислотные остатки 7–20 тау-белка. «Длинные p217+тау-пептиды» в соответствии с вариантами осуществления настоящей заявки могут иметь разную длину. Например, N-конец «длинного фрагмента p217+тау-пептидов» может представлять собой 1-й, 2-й, 3-й, 4-й, 5-й, 6-й или 7-й аминокислотный остаток тау-белка. В одном примере

«длинные p217+тау-пептиды» могут содержать аминокислотные остатки 7–220 p217+тау-белка.

[0081] При использовании в настоящем документе каждый из терминов «короткие p217+тау-пептиды», «короткий p217+тау-белок», «короткая форма p217+тау-пептидов» или «короткий фрагмент p217+тау-пептидов» имеет одно и то же значение и обозначает p217+тау-пептиды, которые содержат эпитоп p217+тау-белка и эпитоп, содержащий аминокислотные остатки 119–126 тау-белка, но не содержат эпитоп, содержащий аминокислотные остатки 7–20 тау-белка. «Короткие p217+тау-пептиды» в соответствии с вариантами осуществления настоящей заявки могут иметь разную длину. Например, N-конец «коротких p217+тау-пептидов» может представлять собой любой из аминокислотных остатков, которые расположены между эпитопом, содержащим аминокислотные остатки 7–20 тау-белка, и эпитопом, содержащим аминокислотные остатки 119–126 тау-белка. В одном примере «короткие p217+тау-пептиды» могут содержать аминокислотные остатки 119–220 p217+тау-белка.

[0082] 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 настоящей заявки могут иметь разную длину. Например, N-конец «длинного фрагмента тау-пептидов» может представлять собой 1-й, 2-й, 3-й, 4-й, 5-й, 6-й или 7-й аминокислотный остаток тау-белка.

[0083] 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 настоящей заявки могут иметь разную длину. Например, N-конец «короткого тау-пептида» может представлять собой любой из аминокислотных остатков, которые расположены между эпитопом, содержащим аминокислотные

остатки 7–20 тау-белка, и эпитопом, содержащим аминокислотные остатки 119–126 тау-белка.

[0084] 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 или парамагнитные гранулы. Примеры захватных антител включают, без ограничений, моноклональное антитело, которое связывается с эпитопом p217+тау-белка.

[0085] В соответствии с вариантами осуществления настоящей заявки захватное антитело может представлять собой моноклональное антитело, содержащее области HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 23, 24 и 25, и области LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 26, 27 и 28. 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 вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 19 и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 20. В одном варианте осуществления моноклональное антитело pT3 экспрессируется мышинной гибридомой. В другом варианте осуществления захватное антитело представляет собой гуманизированное антитело, имеющее аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 21 и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 22.

[0086] В соответствии с другими вариантами осуществления настоящей заявки 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).

[0087] При использовании в настоящем документе термин «детекторное антитело» относится к антителу, которое связывается с интересующим антигеном и имеет детектируемую метку или связано 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.

[0088] В соответствии с вариантами осуществления настоящей заявки детекторное антитело может представлять собой моноклональное антитело, содержащее области HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 10, 11 и 12, и области LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 13, 14 и 15. 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: 16 и аминокислотную последовательность вариательной области легкой цепи SEQ ID NO: 17.

[0089] В соответствии с еще одним вариантом осуществления детекторное антитело может представлять собой моноклональное антитело, содержащее области HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно

полипептидные последовательности SEQ ID NO: 2, 3 и 4, и области LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 5, 6 и 7. В другом конкретном варианте осуществления детекторное антитело представляет собой рТ82. При использовании в настоящем документе термин «рТ82» относится к моноклональному антителу, которое связывается с эпитопом, содержащим аминокислоты 119–126, предпочтительно 117–127, 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: 8 и последовательность аминокислот вариательной области легкой цепи SEQ ID NO: 9.

[0090] При использовании в настоящем документе термин «анализ на основе рТ3» относится к анализу, в котором в качестве захватного антитела применяют антитело рТ3. При использовании в настоящем документе термин «рТ3хhТ43» относится к анализу, в котором в качестве захватного антитела применяют антитело рТ3, а в качестве детекторного антитела применяют антитело hТ43. При использовании в настоящем документе термин «рТ3хрТ82» относится к анализу, в котором в качестве захватного антитела применяют антитело рТ3, а в качестве детекторного антитела применяют антитело рТ82.

[0091] При использовании в настоящем документе термин «анализ на основе hТ7» относится к анализам, в которых в качестве захватного антитела применяют антитело hТ7. При использовании в настоящем документе термин «hТ7хрТ82» относится к анализам, в которых в качестве захватного антитела применяют антитело hТ7, а в качестве детекторного антитела применяют антитело рТ82.

[0092] Используемый в данном документе термин «субъект» относится к животному, предпочтительно к млекопитающему. В соответствии с конкретными вариантами осуществления субъект 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 субъект представляет собой человека.

[0093] При применении в настоящем документе термин «таупатия» охватывает любые нейродегенеративные заболевания, которые связаны с патологической агрегацией тау-белка в мозге. Наряду с наследственной и спорадической БА к другим примерам таупатии относятся лобно-височная деменция с паркинсонизмом, связанная с

хромосомой 17 (FTDP-17), прогрессирующий надъядерный паралич, кортикобазальная дегенерация, болезнь Пика, прогрессирующий субкортикальный глиоз, деменция с преобладанием нейрофибриллярных клубков, диффузные нейрофибриллярные клубки с кальцификацией, деменция с аргирофильными зернами, комплекс амиотрофического бокового склероза-паркинсонизма-деменции, синдром Дауна, болезнь Герстманна — Штреусслера — Шейнкера, болезнь Галлервордена — Шпатца, миозит с тельцами включения, болезнь Крейтцфельда — Якоба, множественная системная атрофия, болезнь Ниманна — Пика типа С, церебральная амилоидная ангиопатия с прионными белками, 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] При использовании в настоящем документе термин «амилоидогенное заболевание» включает в себя любое заболевание, связанное с (или вызванное) образованием или отложением нерастворимых амилоидных фибрилл. Примеры амилоидогенных заболеваний включают, без ограничений, системный амилоидоз, болезнь Альцгеймера, диабет зрелого типа, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, лобно-височную деменцию и связанные с прионами трансмиссивные губчатые энцефалопатии (куру и болезнь Крейтцфельда — Якоба у человека, скрейпи и губчатая энцефалопатия крупного рогатого скота (BSE) у овец и крупного рогатого скота соответственно). Различные амилоидогенные заболевания определяются или характеризуются по природе полипептидного компонента откладывающихся фибрилл. Например, у субъектов или пациентов с болезнью Альцгеймера характеризующим полипептидным компонентом амилоидных отложений является β -амилоидный белок (например, β -амилоидный белок дикого типа, его вариант или усеченный β -амилоидный белок). Соответственно, болезнь Альцгеймера представляет собой пример «заболевания, характеризующегося отложениями $A\beta$ » или «заболевания, связанного с отложениями $A\beta$ », например, в головном мозге субъекта или пациента. Термины « β -амилоидный белок», « β -амилоидный пептид», « β -амилоид», « $A\beta$ » и « $A\beta$ -пептид» используются в настоящем документе как взаимозаменяемые.

[0095] 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.

[0096] При использовании в настоящем документе термин «диагностика» означает обнаружение заболевания или расстройства или определение стадии или степени заболевания или расстройства, такого как таупатия или амилоидогенное заболевание. 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 p217+тау-белка. 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 к p217+тау-белку, или прогнозирование характера ответа на лекарственную терапию, например терапию антителом к p217+тау-белку. 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.

[0097] 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
5 может быть статистически значимой, если измеренный уровень биомаркера находится за пределами около 1,0 среднеквадратичного отклонения, около 1,5 стандартного отклонения, около 2,0 стандартного отклонения или около 2,5 стандартного отклонения от среднего значения любой группы контрольного образца или эталона. Эталон или контрольный образец может представлять собой, например, пробу от здорового
10 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.

[0098] При использовании в настоящем документе термин «выделенный» означает, что биологический компонент (например, нуклеиновая кислота, пептид или белок) был
15 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»
20 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 посредством рекомбинантной экспрессии в клетке-хозяине, а также химически синтезированные нуклеиновые кислоты.

[0099] 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
25 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-
30 белку может иметь перекрестную реактивность с другими родственными антигенами, например антигенами видов (например, видовыми гомологами тау-белка).

[0100] При использовании в настоящем документе термин «специфически связывается» или «специфическое связывание» относится к способности антитела к

тау-белку настоящей заявки связываться с предварительно заданной мишенью с константой диссоциации (K_D) около 1×10^{-6} М или прочнее, например около 1×10^{-7} М или менее, около 1×10^{-8} М или менее, около 1×10^{-9} М или менее, около 1×10^{-10} М или менее, около 1×10^{-11} М или менее, около 1×10^{-12} М или менее или около 1×10^{-13} М или менее. K_D представляет собой отношение K_d к K_a (т. е. K_d/K_a) и выражается в единицах молярной концентрации (М). Значения K_D для антител можно определять с применением 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 (BioRad), прибора KinExA (Sapidyne), 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 в по меньшей мере десять раз меньше его K_D для неспецифической мишени по результатам измерения методом поверхностного плазмонного резонанса с применением, например, прибора Proteon (BioRad). Однако антитела к тау-белку, которые специфически связываются с тау-белком, могут обладать перекрестной реактивностью с другим родственными мишенями, например с той же предварительно заданной мишенью, но от другого биологического вида (гомологи), например от мыши, крысы, игрунки, собаки или свиньи.

20 **[0101]** В настоящем документе термин «полинуклеотид», который является синонимом термина «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.

25 «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, слитые молекулы, содержащие ДНК и РНК, которые могут быть одноцепочечными или, как правило, двухцепочечными или представлять собой

30 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 метаболитически модифицированные формы полинуклеотидов, как правило, 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.

[0102] При использовании в настоящем документе термины «модулирование, облегчение или лечение» или «лечение» включают в себя профилактику физического и/или психического состояния, либо облегчение или избавление от развившегося физического и/или психического состояния после его выявления, либо облегчение характерных симптомов такого состояния.

[0103] При использовании в настоящем документе термин «точность» относится к степени близости полученного значения к истинному значению анализа.

[0104] При использовании в настоящем документе термин «прецизионность» относится к степени близости совпадения среди ряда значений измерения, полученных при многократном взятии проб из одного и того же однородного образца для анализа.

[0105] При использовании в настоящем документе термин «чувствительность» относится к самой низкой концентрации аналита в пробе, которая может быть измерена с помощью анализа с приемлемой точностью и прецизионностью.

[0106] В настоящей заявке предложены анализы и способы для обнаружения фосфорилированных по одному или нескольким сайтам p217+tau-пептидов в пробах, полученных из крови, в частности в плазме. Взятие проб крови выполняется быстро и легко и обеспечивает пониженный риск инфекции или других осложнений по сравнению с люмбальной пункцией, применяемой для взятия CSF. Анализы и способы настоящей заявки позволяют измерять p217+tau-пептиды в пробах, полученных из крови, с существенной чувствительностью, прецизионностью и точностью. Таким образом, в настоящей заявке предложен улучшенный способ измерения и/или контроля уровней p217+tau-белка у субъектов по сравнению с анализами на основе CSF, минимизирующий нагрузку на субъектов при взятии проб и тем самым позволяющий чаще проводить анализ и контроль изменений уровней p217+tau-белка, что, в частности, требуется для контроля и оценки ответа на лечение. Проба, применяемая в анализах и способах настоящей заявки, может представлять собой пробу крови, сыворотки или плазмы. Проба предпочтительно представляет собой пробу плазмы.

Более предпочтительно проба плазмы не подвергалась иммунопреципитации для концентрирования содержащихся в ней p217+тау-пептидов. В одном варианте осуществления проба представляет собой неочищенную пробу плазмы.

[0107] Анализы и способы настоящей заявки относятся к измерению p217+тау-пептидов в пробах, полученных из крови, с применением захватного антитела, которое связывается с p217+тау-пептидами в пробе. Захватное антитело предпочтительно иммобилизовано на твердой фазе таким образом, что захватное антитело избирательно связывается с p217+тау-пептидами, присутствующими в пробе, и иммобилизует их на твердой фазе. На отдельной стадии захваченные p217+тау-пептиды приводят в контакт с детекторным антителом к тау, которое помечено репортерным элементом, который позволяет обнаруживать захваченные молекулы p217+тау-белка. Анализы и способы, описанные в настоящем документе, могут применяться для различных диагностических целей, например для диагностики БА, других таупатий, других заболеваний, характеризующихся отложениями А β , или других амилоидогенных заболеваний у субъекта, контроля эффективности лечения, выявления субъекта, для которого приемлемо лечение антителами к p217+тау-белку, предварительного скрининга субъектов для визуализации методом ПЭТ и анализов CSF для дальнейшего обнаружения БА, других таупатий, других заболеваний, характеризующихся отложениями А β , или других амилоидогенных заболеваний, выявления субъектов для включения в клинические исследования, связанные с БА, другими таупатиями, другими заболеваниями, характеризующимися отложениями А β , или другими амилоидогенными заболеваниями и т. п.

[0108] В одном примере осуществления анализы и способы настоящей заявки включают стадии приведения пробы, полученной из крови, в контакт с захватным антителом, направленным на p217+тау-эпитоп, для связывания захватного антитела с p217+тау-пептидами в пробе с образованием комплексов антитело-пептид; и затем промывания комплексов антитело-пептид. Комплексы антитело-пептид можно промывать любым приемлемым раствором, который не блокирует анализ, таким, например, как буферный раствор (например, фосфатно-солевой буферный раствор (PBS)). Затем промытые комплексы антитело-пептид могут быть приведены в контакт с детекторным антителом для связывания детекторного антитела с комплексами антитело-пептид. Затем проводят обнаружение детекторного антитела для определения количества p217+тау-пептидов в пробе.

[0109] В патенте США № 10,591,492, принадлежащем Kolb et al. (далее в настоящем документе — «патент Kolb ‘492»), который в полном объеме включен в настоящий документ путем ссылки, описан анализ для измерения p217+тау-пептидов в биологических пробах. Биологические пробы могут включать в себя спинномозговую жидкость (CSF), кровь или гомогенат тканей головного мозга. В патенте Kolb ‘492 было отмечено, что измерения тау-белка в неочищенной сыворотке или плазме не демонстрируют идеальной диагностической эффективности, и в этом случае может страдать чувствительность и могут наблюдаться помехи со стороны матрикса. Как продемонстрировано ниже, измерения в неочищенной сыворотке показали, что анализ, описанный в патенте Kolb ‘492, не мог обеспечить достаточную чувствительность, так как большая часть измерений была ниже нижнего предела количественного определения (LLOQ) для этого анализа, который относится к наименьшему количеству аналита, которое может быть количественно определено с приемлемыми прецизионностью и точностью, и было показано, что обнаружение аналита было возможно только после того как пробы были иммунопреципитированы с последующей денатурацией элюента нагреванием. Пример 3, приведенный ниже, демонстрирует, что анализ pT3xpT82, описанный в патенте Kolb ‘492, в котором пробу объединяют и с захватным антителом, и с детекторным антителом на одной стадии в составе одной и той же смеси, не обладает чувствительностью и линейностью при разведении, когда его применяют для измерения p217+тау-пептидов в плазме.

[0110] В противоположность этому, хотя уровни p217+тау-пептидов в пробах, полученных из крови, существенно ниже, чем в CSF, анализы и способы настоящей заявки неожиданно оказались способны измерять p217+тау-пептиды в пробах сыворотки и/или плазмы человека с улучшенной чувствительностью без первоначального концентрирования p217+тау-пептидов в пробах посредством иммунопреципитации перед измерением. Иммунопреципитация — трудоемкий и неточный процесс. Таким образом, в настоящей заявке предложены усовершенствованные анализы и способы, которые обладают улучшенной чувствительностью измерения p217+тау-пептидов без обременительной предварительной обработки проб иммунопреципитацией перед измерением. В частности, неожиданно было обнаружено, что отдельные стадии (1) связывания захватного антитела с p217+тау-пептидами, присутствующими в пробах сыворотки и/или плазмы, с образованием комплексов антитело-пептид и (2) связывания комплексов антитело-пептид с детекторным антителом могут успешно снижать помехи

со стороны других компонентов (например, вырабатываемых эндогенно или вводимых экзогенно мешающих антител) в пробе таким образом, что анализ является достаточно чувствительным для обнаружения p217+тау-пептидов в сыворотке и/или плазме. В одном варианте осуществления проба может быть сначала приведена в контакт с захватным антителом для связывания захватного антитела с p217+тау-пептидами в пробе, а потом подвергнута промывке для удаления всех несвязанных компонентов, которые могут мешать анализу. После промывки захваченные p217+тау-пептиды приводят в контакт с детекторным антителом для связывания детекторного антитела с захваченными p217+тау-пептидами. Пример 4, приведенный ниже, дополнительно демонстрирует, что когда анализ, описанный в патенте Kolb '492, в котором пробу объединяют и с захватным антителом, и с детекторным антителом на одной стадии в составе одной и той же смеси, применяют для измерения p217+тау-пептидов в сыворотке, наблюдается артефактный сигнал, соответствующий мешающим компонентам, который отсутствует в случае CSF. Однако данный артефактный сигнал отсутствует в измерениях p217+тау-белка, полученных с применением примера способа, включающего отдельные стадии связывания захватного антитела и детекторного антитела с p217+тау-пептидами, как описано в настоящей заявке.

[0111] Кроме того, также неожиданно было обнаружено, что анализы и способы настоящей заявки неожиданно оказались более чувствительными при измерении p217+тау-пептидов в пробах плазмы человека по сравнению с измерениями в пробах сыворотки человека благодаря неожиданно повышенному уровню p217+тау-белка, определяемому в плазме, как дополнительно показано ниже в примере 7. Анализы и способы настоящей заявки позволяют измерять p217+тау-пептиды и обеспечивают точные и прецизионные результаты количественного определения как у здоровых субъектов, так и у субъектов, имеющих таупатию или подверженных риску развития таупатии, а более конкретно — БА. Анализы и способы настоящей заявки также позволяют измерять p217+тау-пептиды и обеспечивают точные и прецизионные результаты количественного определения у здоровых субъектов и субъектов, имеющих амилоидогенное заболевание или подверженных риску развития амилоидогенного заболевания, в частности субъектов с деменцией (например, деменцией легкой или умеренной степени). В частности, данные анализы и способы позволяют измерять p217+тау-пептиды в пробах плазмы от обеих групп субъектов на уровнях выше LLOQ анализов настоящей заявки, что свидетельствует о приемлемом и надежном уровне чувствительности. LLOQ анализов может находиться в пределах 15–25% от

коэффициента вариации (CV) анализа, в пределах 15–20% от CV или предпочтительно в пределах 20% от CV. Дополнительно, измерения p217+тау-белка, полученные согласно анализам и способам настоящей заявки в пробах плазмы от здоровых субъектов, численно отличимы от аналогичных измерений, проведенных у субъектов с БА. Таким образом, анализы и способы настоящей заявки обеспечивают точные и прецизионные измерения, которые могут применяться для отличия здоровых субъектов от субъектов с БА.

[0112] В одном варианте осуществления анализы и способы настоящей заявки позволяют измерять p217+тау-белок в пробе плазмы от субъекта и впоследствии определять, что субъект имеет таупатию и/или амилоидогенное заболевание или подвержен риску развития таупатии и/или амилоидогенного заболевания, когда количество p217+тау-белка, определенное в пробе плазмы, выше заданного порогового значения. Заданное пороговое значение может быть любым приемлемым пороговым значением для отличия тех субъектов, которые имеют таупатию и/или амилоидогенное заболевание или подвержены риску развития таупатии и/или амилоидогенного заболевания, от тех субъектов, которые здоровы и не подвержены риску развития таупатии и/или амилоидогенного заболевания. Заданное пороговое значение может быть определено как концентрация p217+тау-белка в плазме для: отличия тех пациентов, у которых уровень тау-белка в головном мозге или областях головного мозга, измеренный ПЭТ-визуализацией, выше, от тех, у кого он ниже; отличия тех пациентов, у которых уровень тау (например, фосфорилированного тау-белка, такого как p181 или p217+тау-белок) в CSF выше, от тех, у кого он ниже; отличия тех пациентов, у которых уровень β -амилоида (например, A β 40 или A β 42) выше, например, в CSF или в плазме; отличия тех пациентов, у которых отношение A β 42 к A β 40 выше, например, в CSF или в плазме, от тех, у кого оно ниже; и отличия пациентов с нормальными когнитивными функциями от тех, у кого имеется деменция. Из-за неожиданно более высокой чувствительности анализов и способов настоящей заявки в случае применения плазмы человека заданное пороговое значение выше LLOQ анализа, что обеспечивает чувствительное, поддающееся количественной оценке пороговое значение уровня для выявления тех субъектов, которые имеют таупатию и/или амилоидогенное заболевание или подвержены риску развития таупатии и/или амилоидогенного заболевания, и их отделения от здоровых субъектов. В частности, заданное пороговое значение выше LLOQ и/или нижнего предела обнаружения (LLOD) анализа, который является самым малым количеством аналита, которое можно надежно

определить. Например, заданное пороговое значение может в по меньшей мере 3, 4, 5, 7 или 10 раз превышать LLOQ анализа и/или в по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 или 120 раз превышать LLOD анализа.

[0113] Субъекты, у которых определено наличие таупатии и/или амилоидогенного заболевания или подверженность риску развития таупатии и/или амилоидогенного заболевания, могут быть направлены для прохождения дополнительных клинических тестов, таких как, например, взятие проб CSF и/или ПЭТ-визуализация, для дополнительной оценки патологий головного мозга у этих субъектов. В еще одном варианте осуществления субъектам, у которых определено наличие таупатии и/или амилоидогенного заболевания или подверженность риску развития таупатии и/или амилоидогенного заболевания, может быть введен активный агент для лечения снижения когнитивной функции, или таупатии, и/или амилоидогенного заболевания, например БА. Активные агенты для лечения таупатии могут включать в себя антитела к тау-белку, антитела к p217+тау-белку, малые интерферирующие РНК (siРНК) к человеческому тау-белку, siРНК к p217+тау-белка, ингибиторы холинэстеразы, антагонисты рецепторов N-метил D-аспартата (NMDA) и т. п. Активные агенты для лечения амилоидогенного заболевания могут включать в себя антитела к амилоиду, ингибиторы бета-секретазы, ингибиторы гамма-секретазы, малые интерферирующие РНК (siРНК) к человеческому β -амилоиду, ингибиторы холинэстеразы, антагонисты рецепторов N-метил D-аспартата (NMDA) и т. п.

[0114] В некоторых вариантах осуществления заданное пороговое значение может соответствовать исходному значению или значению, которое значительно превышает 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 превышающее» значение может быть на по меньшей мере около 1%, 2%, 5% или 10% выше, чем значение у здоровых добровольцев, при значении p менее 0,05, 0,04, 0,03, 0,01, 0,005, 0,001 и т. д. Исходное значение может соответствовать среднему уровню в популяции здоровых субъектов. Исходное значение может также соответствовать среднему значению предшествующих уровней, определенных у того же субъекта.

[0115] В одном варианте осуществления захватное антитело представляет собой моноклональное антитело, направленное на p217+тау-эпитоп, а детекторное антитело представляет собой моноклональное антитело, направленное на эпитоп, содержащий аминокислотные остатки 7–20 тау-белка. В другом варианте осуществления захватное

антитело представляет собой моноклональное антитело, направленное на p217+тау-эпитоп, а детекторное антитело представляет собой моноклональное антитело, направленное на эпитоп, содержащий аминокислотные остатки 119–126, предпочтительно 116–127 человеческого тау-белка. В одном примере осуществления захватное антитело представляет собой моноклональное антитело, содержащее области HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 23, 24 и 25, и области LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 26, 27 и 28, а детекторное антитело представляет собой моноклональное антитело, содержащее области HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 10, 11 и 12, и области LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие соответственно полипептидные последовательности SEQ ID NO: 13, 14 и 15. Более конкретно захватное антитело представляет собой pT3, и/или детекторное антитело представляет собой hT43.

[0116] В соответствии с вариантом осуществления настоящей заявки p217+тау-пептиды в интересующей пробе захватываются захватным антителом, направленным на p217+тау-эпитоп. Захваченные p217+тау-пептиды, каждый из которых содержит p217+тау-эпитоп, могут иметь разную длину, которая может быть определена при помощи детекторных антител, связывающихся с разными эпитопами. Например, детекторное антитело, направленное на эпитоп, содержащий 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 на эпитоп, содержащий аминокислотные остатки 119–126 тау-белка, может обнаруживать не только длинные p217+тау-пептиды, но также и короткие p217+тау-пептиды. Захваченные p217+тау-пептиды могут быть приведены в контакт с детекторным антителом, направленным на эпитоп, содержащий аминокислотные остатки 7–20 или 116–127 тау-белка, и таким образом можно обнаруживать и измерять количество длинных p217+тау-пептидов или p217+тау-пептидов (длинных и коротких p217+тау-пептидов) в пробе. Количество коротких p217+тау-пептидов в пробе вычисляют путем вычитания количества длинных p217+тау-пептидов из количества p217+тау-пептидов.

[0117] В связи с неожиданно улучшенными значениями чувствительности, наблюдаемыми при обнаружении p217+тау-пептидов в плазме с применением анализов

и способов настоящей заявки, считается, что улучшенные значения чувствительности в равной степени применимы к обнаружению коротких p217+тау-пептидов и/или длинных p217+тау-пептидов, описанных выше. Таким образом, в еще одном варианте осуществления настоящей заявки анализы и способы настоящей заявки включают измерение коротких p217+тау-пептидов и/или длинных p217+тау-пептидов в пробах сыворотки и/или плазмы. В частности, анализы и способы настоящей заявки могут позволять измерить короткие p217+тау-пептиды и/или длинные p217+тау-пептиды в человеческой плазме с повышенной чувствительностью. В дополнительном варианте осуществления анализы и способы настоящей заявки позволяют измерять короткие p217+тау-пептиды и/или длинные p217+тау-пептиды в пробе плазмы от субъекта и впоследствии определять, что субъект имеет таупатию или подвержен риску развития таупатии, причем количество коротких p217+тау-пептидов и/или длинных p217+тау-пептидов, определенное в пробе плазмы, выше заданного (-ых) порогового (-ых) значения (-ий). Заданное (-ые) пороговое (-ые) значение (-я) превышает (-ют) LLOQ анализов.

[0118] В соответствии с другим вариантом осуществления настоящей заявки 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 на эпитоп между аминокислотами 150 и 250 тау-белка, предпочтительно эпитоп, содержащий 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.

[0119] В соответствии с вариантами осуществления настоящей заявки для одной или более диагностических целей можно применять 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 общему количеству коротких тау-фрагментов, отношение количества длинных p217+тау-пептидов к общему количеству длинных тау-фрагментов и т. п. В одном варианте осуществления определяют, что субъект страдает таупатией, если отношение, основанное на p217+тау-пептидах, например отношение количества коротких p217+тау-пептидов к количеству длинных p217+тау-пептидов, значительно превышает соответствующее исходное отношение, и измеренное количество p217+тау-пептидов, коротких p217+тау-пептидов и/или длинных p217+тау-пептидов превышает LLOQ анализов.

[0120] В одном варианте осуществления способ настоящей заявки включает (i) приведение пробы, полученной из крови, предпочтительно пробы плазмы, в контакт с захватным антителом, направленным на эпитоп, содержащий фосфорилированный p217+тау-белок, для захвата p217+тау-пептидов в пробе, (ii) отдельно приведение захваченных p217+тау-пептидов в контакт с детекторным антителом, направленным на эпитоп, содержащий аминокислотные остатки 7–20, предпочтительно после промывки захваченного p217+тау-пептида с измерением таким образом количества длинных p217+тау-пептидов и/или с детекторным антителом, направленным на эпитоп, содержащий аминокислотные остатки 119–126 тау-белка, предпочтительно после промывки захваченного p217+тау-пептида 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 или нет, на основе 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 субъекта, с соответствующими заданными пороговыми уровнями. Диагностика также может быть выполнена путем сравнения отношения количества коротких p217+тау-пептидов к количеству длинных p217+тау-пептидов в пробе от субъекта с соответствующими исходными отношениями, причем количества коротких p217+тау-пептидов и длинных p217+тау-пептидов превышают LLOQ соответствующих анализов.

[0121] В еще одном варианте осуществления способ настоящей заявки включает (i) приведение пробы, полученной из крови, предпочтительно пробы плазмы, в контакт с захватным антителом, направленным на p217+тау-эпитоп, для захвата p217+тау-пептидов в пробе и/или с не зависящим от фосфорилирования захватным антителом,

направленным на тау-эпитоп между аминокислотами 150 и 250 тау-белка, для захвата общих тау-пептидов в пробе, (ii) отдельно приведение захваченных p217+тау-пептидов или захваченных общих тау-пептидов в контакт с детекторным антителом, направленным на эпитоп, содержащий аминокислотные остатки 116–127 тау-белка, предпочтительно после промывки захваченных p217+тау-пептидов или захваченных общих тау-пептидов 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 или нет, на основе отношения количества коротких p217+тау-пептидов к количеству общих коротких тау-пептидов в пробе. Диагностика может быть выполнена путем сравнения отношения количества коротких p217+тау-пептидов к количеству общих коротких тау-пептидов, содержащих ту же область тау-белка, что распознается антителом pT3, т. е. аминокислоты 211–221 тау-белка, в пробе, взятой у субъекта, с соответствующими исходными значениями, причем количество коротких p217+тау-пептидов превышает LLOQ анализа.

[0122] В еще одном варианте осуществления способ настоящей заявки включает (i) приведение пробы, полученной из крови, предпочтительно пробы плазмы, в контакт с захватным антителом, направленным на эпитоп p217+тау, для захвата p217+тау-пептидов в пробе, (ii) отдельно приведение захваченных p217+тау-пептидов в контакт с детекторным антителом, направленным на эпитоп, содержащий аминокислотные остатки 7–20, предпочтительно после промывки захваченных p217+тау-пептидов с измерением таким образом количества длинных p217+тау-пептидов и/или с детекторным антителом, направленным на эпитоп, содержащий аминокислотные остатки 116–127 тау-белка, предпочтительно после промывки захваченных p217+тау-пептидов с измерением таким образом количества длинных и коротких p217+тау-пептидов в пробе и (iii) определение эффективности лечения субъекта на основании количества p217+тау-пептидов или отношения количества коротких p217+тау-пептидов к количеству длинных p217+тау-пептидов, причем измеренные количества p217+тау-пептидов, коротких p217+тау-пептидов и/или длинных p217+тау-пептидов превышают LLOQ соответствующих анализов.

[0123] В еще одном варианте осуществления способ настоящей заявки включает (i) приведение пробы, полученной из крови, предпочтительно пробы плазмы, в контакт с захватным антителом, направленным на p217+тау-эпитоп, для захвата p217+тау-пептидов в пробе и/или с не зависящим от фосфорилирования захватным антителом,

направленным на эпитоп тау-белка между аминокислотами 150 и 250 тау-белка, для захвата общих тау-пептидов в пробе, (ii) отдельно приведение захваченных p217+тау-пептидов или захваченных общих тау-пептидов в контакт с детекторным антителом, направленным на эпитоп, содержащий аминокислотные остатки 116–127 тау-белка, предпочтительно после промывки захваченных p217+тау-пептидов или захваченных общих тау-пептидов с измерением таким образом количества длинных и коротких p217+тау-пептидов или количества общих коротких тау-пептидов в пробе и (iii) определение эффективности лечения у субъекта на основе количества или отношения количества коротких p217+тау-пептидов к количеству общих коротких тау-пептидов в биологической пробе, причем измеренное количество коротких p217+тау-пептидов превышает LLOQ анализа.

[0124] В еще одном варианте осуществления эффективность лечения у субъекта определяют путем контроля 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, причем количество p217+тау-пептидов, коротких p217+тау-пептидов и/или длинных p217+тау-пептидов превышает LLOQ соответствующих анализов. Уменьшение значений по сравнению с базовыми значениями указывает на положительный ответ на лечение. Значения также могут временно повышаться в биологических текучих средах по мере увеличения периода полувыведения патологических форм тау-белка из кровообращения и/или при выведении патологических форм тау-белка из головного мозга.

[0125] В соответствии с конкретным аспектом таупатия включает в себя, без ограничений, одно или более состояний, выбранных из группы, состоящей из болезни Альцгеймера (включая наследственную болезнь Альцгеймера и спорадическую болезнь Альцгеймера), лобно-височной деменции с паркинсонизмом, связанной с хромосомой 17 (FTDP-17), прогрессирующего надъядерного паралича, 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).

5 **[0126]** Таупатия предпочтительно представляет собой болезнь Альцгеймера (включая наследственную болезнь Альцгеймера и спорадическую болезнь Альцгеймера), FTDP-17 и прогрессирующий надъядерный паралич.

10 **[0127]** Наиболее предпочтительно таупатия представляет собой болезнь Альцгеймера (включая наследственную болезнь Альцгеймера и спорадическую болезнь Альцгеймера).

15 **[0128]** В соответствии с одним вариантом осуществления способ настоящей заявки включает (i) приведение пробы, полученной из крови, предпочтительно пробы плазмы, в контакт с захватным антителом, направленным на p217+тау-эпитоп, для захвата p217+тау-пептидов в пробе, (ii) отдельно приведение захваченных p217+тау-пептидов в
20 контакт с детекторным антителом, направленным на эпитоп, содержащий аминокислотные остатки 7–20, предпочтительно после промывки захваченных p217+тау-пептидов с измерением таким образом количества длинных p217+тау-пептидов и/или с детекторным антителом, направленным на эпитоп, содержащий аминокислотные остатки 116–127 тау-белка, предпочтительно после промывки
25 захваченных p217+тау-пептидов с измерением таким образом количества длинных и коротких p217+тау-пептидов в пробе и (iii) определение, подходит ли субъект для лечения антителом к p217+тау-белку или нет, на основе количества p217+тау-пептидов или отношения количества коротких p217+тау-пептидов к количеству длинных p217+тау-пептидов, причем количество p217+тау-пептидов, коротких p217+тау-пептидов и/или длинных p217+тау-пептидов выше LLOQ соответствующих анализов.

30 **[0129]** В соответствии с конкретным аспектом определяют, что субъекта подходит для лечения антителом к p217+тау-белку, если количество p217+тау-пептидов в пробе, полученной из крови, в частности в пробе плазмы, или отношение количества коротких p217+тау-пептидов к количеству длинных p217+тау-пептидов в пробе, полученной из крови, или пробе плазмы значительно превышает соответствующее исходное значение, причем соответствующее исходное значение выше LLOQ анализов для измерения p217+тау-пептидов, коротких p217+тау-пептидов и/или длинных p217+тау-пептидов, или количество p217+тау-пептидов, коротких p217+тау-пептидов и/или длинных p217+тау-пептидов выше LLOQ соответствующих анализов.

[0130] В соответствии с еще одним конкретным аспектом способ настоящей заявки включает (i) приведение пробы, полученной из крови, предпочтительно пробы плазмы, в контакт с захватным антителом, направленным на p217+тау-эпитоп, для захвата p217+тау-пептидов в пробе или с не зависящим от фосфорилирования захватным антителом, направленным на эпитоп тау-белка между аминокислотами 150 и 250 тау-белка, для захвата общих тау-пептидов в пробе, (ii) отдельно приведение захваченных p217+тау-пептидов или захваченных общих тау-пептидов в контакт с детекторным антителом, направленным на эпитоп, содержащий аминокислотные остатки 116–127 тау-белка, предпочтительно после промывки захваченных p217+тау-пептидов или захваченных общих тау-пептидов с измерением таким образом количества длинных и коротких p217+тау-пептидов или количества общих коротких тау-пептидов в пробе и (iii) определение, подходит ли субъект для лечения антителом к p217+тау-белку или нет, на основе отношения количества коротких p217+тау-пептидов к количеству общих коротких тау-пептидов в биологической пробе, причем количество коротких p217+тау-пептидов превышает LLOQ анализа.

[0131] В соответствии с одним вариантом осуществления определено, что субъект подходит для лечения антителом к p217+тау-белку, если отношение количества коротких p217+тау-пептидов к количеству общих коротких тау-пептидов значительно превышает соответствующее исходное значение, причем количество коротких p217+тау-пептидов выше LLOQ анализа.

[0132] В одном варианте осуществления способ настоящей заявки включает (i) приведение пробы, полученной из крови, предпочтительно пробы плазмы, в контакт с захватным антителом, направленным на эпитоп, содержащий фосфорилированный p217+тау-белок, для захвата p217+тау-пептидов в пробе, (ii) отдельно приведение захваченных p217+тау-пептидов в контакт с детекторным антителом, направленным на эпитоп, содержащий аминокислотные остатки 7–20, предпочтительно после промывки захваченного p217+тау-пептида с измерением таким образом количества длинных p217+тау-пептидов и/или с детекторным антителом, направленным на эпитоп, содержащий аминокислотные остатки 119–126 тау-белка, предпочтительно после промывки захваченного p217+тау-пептида 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 или нет, на основе количества p217+тау-пептидов. Диагностика может быть выполнена путем сравнения количества или концентрации p217+тау-пептидов в пробе, взятой у субъекта, с соответствующими

заданными пороговыми уровнями, причем количество или концентрация p217+тау-пептидов выше LLOQ анализа, применяемого на стадиях (i) и (ii).

[0133] Настоящая заявка также относится к измерению количества p217+тау-белка, который находится в комплексе с антителом в пробе, полученной из крови, 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. p217+тау-белок отделяют от антитела с помощью системы офВЭЖХ и измеряют с применением способов настоящей заявки, что позволяет проводить количественную оценку связанного с антителом p217+тау-белка.

[0134] В соответствии с общим аспектом изобретение относится к способу контроля лечения антителом к p217+тау-белку у субъекта, при этом способ включает в себя этапы, на которых: настоящая заявка относится к способу контроля лечения антителом к p217+тау-белку у субъекта, при этом способ включает в себя этапы, на которых: (i) получают пробу, полученную из крови, в частности пробу плазмы, от субъекта, (ii) получают полуденатурированную пробу из пробы, полученной из крови, содержащей общий p217+тау-белок, (iii) приводят полуденатурированную пробу в контакт с захватным антителом, направленным на p217+тау-эпитоп, для захвата p217+тау-пептидов в полуденатурированной пробе и (iv) отдельно приводят захваченные p217+тау-пептиды в контакт с детекторным антителом, направленным на эпитоп, содержащий аминокислотные остатки 7–20, предпочтительно после промывки захваченного p217+тау-пептида с измерением таким образом количества длинных p217+тау-пептидов и/или с детекторным антителом, направленным на эпитоп, содержащий аминокислотные остатки 119–126 тау-белка, предпочтительно после промывки захваченного p217+тау-пептида с измерением таким образом количества длинных и коротких p217+тау-пептидов в полуденатурированной пробе, причем измеренные количества p217+тау-пептидов, коротких p217+тау-пептидов и/или длинных p217+тау-пептидов выше LLOQ соответствующих анализов.

[0135] Полуденатурированную пробу получают из пробы, полученной из крови, содержащей p217+тау-пептиды, посредством разрушения антител и/или других компонентов крови, которые блокируют связывание захватного антитела или детекторного антитела с p217+тау-пептидами или блокируют обнаружение детекторного антитела, связанного с p217+тау-пептидами, при этом p217+тау-пептиды,

присутствующие в пробе, полученной из крови, разрушению не подвергаются. В одном варианте осуществления полуденатурированную пробу получают посредством нагревания пробы, полученной из крови, при заранее заданной температуре, при которой происходит денатурация антител, в течение предварительно заданного времени. Предварительно заданная температура может составлять от 75 °С до 100 °С, от 80 °С до 90 °С или 85 °С. Предварительно заданное время может составлять от 0,1 до 30 минут, от 1 до 15 минут, от 2 до 10 минут, от 3 до 9 минут или 7 минут. После денатурации нагреванием проба может быть необязательно охлаждена до температуры, которая является приемлемо стабильной для p217+тау-пептида (например, при 4 °С или ниже), для остановки дальнейшего разложения белков в полуденатурированной пробе. В одном примере осуществления полуденатурированную пробу получают посредством нагревания пробы, полученной из крови, при 85 °С в течение 7 минут и последующего охлаждения в ледяной бане при 4 °С в течение 10 минут.

[0136] В соответствии с другим общим аспектом настоящая заявка относится к способу контроля лечения антителом к p217+тау-белку у субъекта, при этом способ включает в себя этапы, на которых: (i) получают пробу, полученную из крови, в частности пробу плазмы, от субъекта, (ii) получают полуденатурированную пробу из пробы, полученной из крови, содержащей общий p217+тау-белок, причем полуденатурированную пробу нагревают для денатурации антител в пробе, (iii) приводят полуденатурированную пробу в контакт с захватным антителом, направленным на p217+тау-эпитоп, для захвата p217+тау-пептидов в полуденатурированной пробе, (iv) отдельно приводят захваченные p217+тау-пептиды в контакт с детекторным антителом, направленным на эпитоп, содержащий аминокислотные остатки 7–20, предпочтительно после промывки захваченных p217+тау-пептидов с измерением таким образом количества длинных p217+тау-пептидов или с детекторным антителом, направленным на эпитоп, содержащий аминокислотные остатки 116–127 тау-белка, предпочтительно после промывки захваченных p217+тау-пептидов с измерением таким образом количества длинных и коротких p217+тау-пептидов в полуденатурированной пробе, (v) вычисляют количество связанного с антителом p217+тау-белка в пробе, вычитая количество не связанного с антителом p217+тау-белка из количества общего p217+тау-белка, (vi) вычисляют отношение связанного с антителом p217+тау-белка к количеству не связанного с антителом p217+тау-белка и (vii) проводят контроль лечения антителом к p217+тау-белку у субъекта на основе вычисленного отношения, при этом измеренные

количества p217+тау-пептидов, коротких p217+тау-пептидов и/или длинных p217+тау-пептидов выше LLOQ соответствующих анализов.

[0137] В соответствии с конкретным аспектом эффективность лечения субъекта определяют путем контроля 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 сигнализируют о положительном ответе на лечение. Значения не связанных с антителом p217+тау-белков также могут временно повышаться в текучих средах, полученных из крови, таких как плазма, по мере увеличения периода полувыведения патологических форм тау-белка из кровообращения и/или при выведении патологических форм тау-белка из головного мозга.

[0138] В дополнительном аспекте настоящей заявки анализы и способы могут применяться для отслеживания уровней p217+тау-белка у пациента, проходящего любое лечение таупатии, включая, без ограничений, введение экзогенных антител к тау-белку, более конкретно, антител к p217+тау-белку, или любое лечение амилоидогенного заболевания. Обнаружение уровней p217+тау-белка в пробах, полученных из крови, в частности в пробах плазмы, может применяться для множества различных целей, включая применение в качестве инструмента принятия решений при определении, следует ли увеличивать или уменьшать уровень дозы или интервал между дозами, чтобы обеспечить достижение или поддержание эффективных или безопасных уровней лекарственного средства; применение в качестве вспомогательного инструмента при начале медикаментозного лечения антителами к тау, обеспечивающего доказательство достижения минимальных уровней pK; и применение в качестве инструмента, указывающего, что пациента следует исключить из клинического исследования или включить в клиническое исследование, и в качестве вспомогательного инструмента при последующем контроле соблюдения пациентом требований по применению лекарственного средства в рамках клинического исследования.

[0139] В соответствии с некоторыми аспектами захватное антитело в способе настоящей заявки сначала связывают с твердой подложкой перед приведением в

контакт с пробой. Захватное антитело может быть предоставлено в диагностическом наборе для измерения p217+тау-белка в пробе, полученной из крови (в частности, в пробе плазмы), предварительно связанное с твердой фазой, такой как лунки микротитровального планшета или магнитные гранулы. Детекторное антитело может
5 содержать любую обнаруживаемую метку (например, флуоресцентную молекулу, биотин и т. п.), обнаруживаемую непосредственно или обнаруживаемую посредством вторичной реакции (например, реакции со стрептавидином), или быть прикреплено к ней. В альтернативном варианте осуществления можно использовать второй реагент, содержащий обнаруживаемую метку, причем второй реагент имеет специфичность
10 связывания с первичным антителом. В конкретных вариантах осуществления детекторное антитело биотинилировано.

[0140] В соответствии с некоторыми аспектами количество p217+тау-пептидов, измеренное в способах настоящей заявки, можно определять с применением любых приемлемых способов, известных в данной области, включая твердофазный ИФА и
15 платформу с одномолекулярными матрицами. В соответствии с определенными аспектами в способах настоящей заявки для измерения количества p217+тау-пептидов в пробе, полученной из крови (в частности, пробе плазмы), в которой концентрации p217+тау-пептидов более низкие, чем в CSF, применяют высокочувствительную матричную платформу, такую как Quanterix Simoa или MSD S-plex.

[0141] В дополнительном аспекте настоящей заявки анализы и способы настоящей заявки обеспечивают анализ на основе гранул для измерения p217+тау-пептидов в
20 пробах, полученных из крови (например, в крови, сыворотке и/или плазме), при этом для анализа характерно пониженное мешающее влияние применяемых для анализа реагентов, и, следовательно, он является более точным и прецизионным. Было обнаружено, что определенные применяемые для анализа реагенты при измерении
25 p217+тау-пептидов в пробах, полученных из крови, взаимодействуют таким образом, что создают помехи в измерениях, получаемых при анализе. В частности, обнаружено, что при анализе на основе гранул, где захватное антитело связывают с магнитной гранулой перед приведением в контакт с пробой, полученной из крови, разбавитель
30 проб, применяемый при получении пробы из крови, отрицательно влияет на точность и прецизионность анализа в пробах, полученных из крови. Например, как показано в примере 7 ниже, разбавитель проб из набора Simoa Homebrew Assay Starter Kit, кат. номер 101351 (предлагается к продаже компанией Quanterix), демонстрирует снижение количества гранул, что, как полагают, вызвано агрегацией магнитных гранул,

применяемых в качестве подложек для захватного антитела. Однако в анализах и способах настоящей заявки применяют разбавители проб, которые снижают мешающее влияние, вызванное агрегацией гранул. В частности, разбавители проб настоящей заявки включают в себя неионное поверхностно-активное вещество. Более конкретно, 5 неионное поверхностно-активное вещество включает в себя гидрофильную цепь полиэтиленоксида и/или липофильную или гидрофобную группу ароматического углеводорода. В частности, неионное поверхностно-активное вещество является Тритоном X-100. Разбавитель проб также может содержать трис(гидроксиметил)аминометан (трис), который, как было обнаружено, 10 дополнительно снижает мешающее влияние на анализ. Пример 7, подробно описанный ниже, демонстрирует, что разбавители проб, содержащие Тритон X-100, снижали наблюдаемое мешающее влияние, и что разбавители проб на основе трис-буферного раствора обеспечивали более выраженное снижение мешающего влияния по сравнению с разбавителями проб на основе фосфатного буферного раствора. Пример разбавителей 15 настоящей заявки может дополнительно включать в себя другие приемлемые компоненты, которые не создают помех для измерения p217+тау-белка в пробах, полученных из крови, такие как NaCl, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), гетерофильный блокатор и/или бычий сывороточный альбумин.

[0142] В другом общем аспекте настоящая заявка относится к набору для 20 обнаружения p217+тау-белка в пробах, полученных из крови (например, кровь, сыворотка, плазма), содержащему (а) захватное антитело, направленное на p217+тау-эпитоп, необязательно не зависящее от фосфорилирования захватное антитело, направленное на эпитоп тау-белка между аминокислотами 150 и 250 тау-белка, (b) магнитные гранулы для конъюгирования с ними захватного антитела, (c) разбавитель 25 проб, содержащий неионное поверхностно-активное вещество, и (d) по меньшей мере одно детекторное антитело, направленное на эпитоп тау-белка, содержащий аминокислотные остатки 7–20 или 116–127 тау-белка. Набор применяют для измерения количества p217+тау-пептидов, отношения количества коротких p217+тау-пептидов к количеству длинных p217+тау-пептидов и/или отношения количества коротких 30 p217+тау-пептидов к количеству общих коротких тау-пептидов в пробе.

[0143] В другом аспекте настоящей заявки измерения p217+тау-белка для проб, полученных из крови (например, кровь, сыворотка, плазма), полученные в соответствии с анализами и способами, описанными выше, дополнительно анализируют с помощью компьютерного устройства для обнаружения и/или

прогнозирования таупатии у субъекта. В частности, измерения p217+тау-белка для проб, полученных из крови, анализируют с помощью компьютерного устройства в комбинации с данными, соответствующими измерениям, полученным для других биомаркеров, которые также можно определить в пробах, полученных из крови, с получением дополнительно улучшенного способа обнаружения и/или прогнозирования таупатии у субъекта. Улучшенная способность обнаружения и/или прогнозирования таупатии, в частности БА, с применением биомаркера (-ов), который (-ые) можно надлежащим образом измерить в пробах, полученных из крови, можно применять для различных диагностических целей, например для диагностики БА или других таупатий у субъекта, контроля эффективности лечения, выявления субъекта, подходящего для лечения антителами к тау-белку или p217+тау-белку, предварительного скрининга субъектов для визуализации методом ПЭТ и/или анализов CSF с целью дальнейшего обнаружения БА или других таупатий, выявления субъектов для включения в клинические исследования, связанные с БА или другими таупатиями, и т. п.

[0144] В одном примере осуществления предложен способ обнаружения или прогнозирования таупатии у субъекта. Способ включает обнаружение некоторого количества p217+тау-пептидов в пробе, полученной из крови (например, кровь, сыворотка, плазма), аналитическим способом. Анализ может представлять собой любой из примеров анализа, описанных в настоящей заявке. В частности, анализ позволяет измерять количество p217+тау-пептидов в пробах, полученных из крови, в частности, в плазме, посредством приведения пробы в контакт с захватным антителом, которое связывается с p217+тау-пептидами в пробе, и на отдельной стадии посредством приведения захваченных p217+тау-пептидов в контакт с детекторным антителом к тау-белку, которое помечено репортерным элементом, который позволяет обнаруживать захваченные молекулы p217+тау-белка. В частности анализ позволяет определять количество p217+тау-пептидов в пробе плазмы посредством приведения пробы плазмы в контакт с захватным антителом, направленным на p217+тау-эпитоп, для связывания захватного антитела с p217+тау-пептидами в плазме с образованием комплексов антитело-пептид и отдельно посредством приведения комплексов антитело-пептид в контакт с детекторным антителом для связывания детекторного антитела с комплексами антитело-пептид.

[0145] Компьютерное устройство получает измерения p217+тау-белка, обнаруженного с применением анализа, для генерирования данных по тау-белку, соответствующих количеству p217+тау-пептидов. Данные по тау-белку могут

представлять количество p217+тау-пептидов, определенное посредством анализа. Альтернативно данные по тау-белку могут представлять бинарный статус (да/нет), указывающий, превышает ли это количество заданное пороговое значение. Анализ в достаточной мере чувствителен, как описано выше, так что заданное пороговое значение выше LLOQ способа анализа. Компьютерное устройство может также получать медицинские данные субъекта, такие как, например, демографическая информация (например, возраст, пол), анамнез, электронные медицинские карты (EMR), данные из аптек, соответствующие медицинским картам пациентов, и т. п. В частности, компьютерное устройство может получать данные по биомаркерам, соответствующие измерениям или бинарным статусам по меньшей мере по одному биомаркеру, определенному у пациента. Биомаркер может представлять собой приемлемый биомаркер таупатии. Предпочтительно, биомаркер возможно обнаружить в пробах, полученных из крови, в частности в пробах плазмы, у субъекта. Например, биомаркер может быть выбран из группы, состоящей из амилоида β ($A\beta$), легкой цепи нейрофиламента (NFL), адипонектина, лептина и других воспалительных или метаболических маркеров. Более конкретно, биомаркер выбран из NFL, адипонектина и лептина. Компьютерное устройство анализирует данные по тау-белку и данные по биомаркерам с применением модуля машинного обучения для определения или прогнозирования наличия у субъекта таупатии или подверженности субъекта риску развития таупатии. Модуль машинного обучения обучен с применением набора эталонных данных. Модуль машинного обучения сравнивает данные по тау-белку и данные по биомаркерам с набором эталонных данных для определения или прогнозирования того наличия у субъекта таупатии или подверженности субъекта риску развития таупатии. Набор эталонных данных включает в себя данные по тау-белку и данные по биомаркерам, а также данные, соответствующие патологии головного мозга — таупатии (например, стадия заболевания, количество p217+тау-белка, обнаруженного в CSF, измерения тау в ткани головного мозга с помощью ПЭТ и т. п.), для эталонной группы пациентов.

[0146] Модуль машинного обучения может представлять собой модуль машинного обучения с учителем и/или без учителя. Модуль машинного обучения может представлять собой классификатор машинного обучения для выявления набора данных как коррелирующего с одной или двумя категориями. Модуль машинного обучения может включать в себя машину опорных векторов, случайный лес, логистическую регрессию, модуль градиентного бустинга или их многопроцессорные модули. В одном

варианте осуществления модуль машинного обучения представляет собой многопроцессорный модуль, содержащий по меньшей мере одно из машины опорных векторов, случайного леса, логистической регрессии и/или модуля градиентного бустинга.

5 [0147] Специалистам в данной области будет понятно, что описанные в настоящем документе примеры осуществления, реализуемые на компьютере, могут быть реализованы любым количеством способов, включая отдельный программный модуль, комбинацию аппаратного обеспечения и программного обеспечения и т. п. Например, примеры способов могут представлять собой вариант осуществления в одной или более
10 программах, хранящихся на энергонезависимом носителе данных и содержащих строки кода, которые при компиляции могут выполняться одним или более ядрами процессора или отдельным процессором. Система в соответствии с одним вариантом осуществления содержит множество ядер процессоров и набор инструкций, исполняемых множеством ядер процессоров для осуществления описанных выше
15 примеров способов. Ядра процессора или отдельный процессор могут быть встроены в любое подходящее электронное устройство или могут обмениваться данными с ним, например, с внутренними узлами обработки в устройстве или с внешними по отношению к устройству узлами обработки, например, мобильным вычислительным устройством, смартфоном, вычислительным планшетом, вычислительным устройством
20 и т. п., которые могут обмениваться данными по меньшей мере с частью устройства.

ПРИМЕРЫ

[0148] Для дополнительной иллюстрации характера изобретения предложены следующие примеры. Следует понимать, что следующие примеры не ограничивают
25 изобретение и что объем изобретения определен прилагаемыми пунктами формулы изобретения.

Пример 1. Высокочувствительный анализ для обнаружения p217+tau-белка в плазме

30 [0149] В примере I приведен пример осуществления улучшенного анализа настоящей заявки. В примере осуществления согласно примеру I применяют иммуноферментный анализ (ИФА) на основе гранул для определения и/или количественной оценки присутствия p217+tau-пептидов в пробе. В частности, в примере I применяют цифровую систему для ИФА на основе гранул Single Molecule

Assay (SiMoA), приобретенную у компании Quanterix Corp. (Boston, MA). При анализе в системе SiMoA применяют матрицы с камерами для реакций в фемтолитровых объемах для цифрового подсчета отдельных иммунокомплексов. Специфичные для анализа реагенты получали как более подробно описано ниже и вносили в анализатор SiMoA для проведения реакции с p217+tau-пептидами и определения p217+tau-пептидов в пробах. Специфичные для анализа реагенты включают в себя: парамагнитные захватные гранулы с диаметром 2,7 мкм, буферы и реагенты из набора Simoa Homebrew Assay Starter Kit, кат. номер 101351 (предлагается к продаже компанией Quanterix), буфер для промывки 1 (предлагается к продаже компанией Quanterix), магнитные гранулы (предлагается к продаже в виде виалы Simoa Homebrew Helper Bead Vial (918), кат. номер 101732, компанией Quanterix), захватное антитело и детекторное антитело. Захватное антитело в примере 1 представляет собой мышинное моноклональное антитело (mAt) pT3. Детекторное антитело в примере 1 представляет собой mAt hT43.

[0150] Каждая проба, анализируемая в примере I, разведена разбавителем проб. Примеры разбавителей проб, применяемых а примере I, включают в себя 50 мМ трис-буфера, 100 мМ NaCl, 5 мМ ЭДТА, 2% (об./об.) бычьего сывороточного альбумина и 0,5% (об./об.) Тритона X-100, гетерофильный блокирующий агент HBR-9 (предлагается к продаже под кат. номером 3КС564 компанией Scantibodies Laboratory, Santee, CA). Разбавитель проб имеет рН 7,4.

[0151] Анализ в примере I был откалиброван с применением калибровочного пептида, приготовленного по индивидуальному заказу компанией New England Peptide. Калибровочный пептид представляет собой пептид, содержащий эпитопы hT43 и pT3, соединенные линкером PEG4, и имеет молекулярную массу 4357 г/моль. Калибровочный пептид имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

25 *Получение реагента*

[0152] На первой стадии парамагнитные захватные гранулы покрывали захватным антителом в концентрации 0,3 мг/мл, которым в примере I является mAt pT3; при этом следуя протоколу, приведенному в руководстве компании Quanterix по прикреплению захватного антитела к гранулам. Захватные гранулы с покрытием разводили в буфере разбавителя гранул из набора Simoa Homebrew Assay Starter Kit до 100 000 гранул/мл и добавили 300 000 гранул/мл вспомогательных гранул так, чтобы общая концентрация гранул составляла 400 000 гранул/мл.

[0153] Детекторное антитело, которым в примере I является mAt hT43, биотинилировали при 60х, следуя протоколу, приведенному в руководстве компании

Quanterix, и разводили в разбавителе проб, описанном выше, таким образом, чтобы детекторный раствор имел концентрацию детекторного антитела 0,9 мкг/мл.

[0154] Концентрат стрептавидин- β -D-галактозидазы (SBG) разводили до 200 пМ в разбавителе SBG из набора Simoa Homebrew Assay Starter Kit.

5 **[0155]** Калибровочный пептид восстанавливали 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 эти разведенные растворы дополнительно разводили в соотношении 1 : 1000
10 разбавителем проб таким образом, чтобы конечная концентрация пептидов составляла 5000 пг/мл. Анализ в примере I был откалиброван с применением различных концентраций калибровочного пептида с построением стандартной кривой в следующем диапазоне концентраций: 30, 10, 3,33, 1,11, 0,37, 0,186, 0,093, 0,046, 0,023, 0,012, 0,006 и 0 пг/мл.

15 **[0156]** Пробы плазмы, анализируемые в примере I, были разведены в разбавителе проб в соотношении 1 : 2.

Анализ в системе SiMoA

[0157] Был создан индивидуальный анализ в системе SiMoA, включающий
20 трехстадийный протокол. Этот трехстадийный протокол включает в себя следующие стадии: приведение анализируемой пробы в контакт с мАт рТЗ, прикрепленным к захватным гранулам, полученным как описано выше, с анализируемой пробой в течение 35 минут, последующей промывкой захватных гранул раствором Твин-20 в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS), в частности буфером для промывки 1,
25 разработанным для прибора Simoa HD-1 (предлагается к продаже компанией Quanterix), затем инкубацию захватных гранул с детекторным антителом в течение 5 минут, последующую промывку захватных гранул буфером для промывки 1 во второй раз, инкубацию захватных гранул с SBG в течение 5 минут, снова промывку захватных гранул раствором на основе PBS, в частности, буфером для промывки 1, и
30 наконец добавление 25 мкл из 100 мкМ резорифин- β -D-галактопиранозида (RGP) перед внесением на измерительные диски для визуализации и измерения на приборе SiMoA HD-1. Каждая реакция выполнялась в кюветах Simoa и содержала 25 мкл раствора гранул, содержащего мАт рТЗ, прикрепленные к парамагнитным гранулам, и вспомогательные гранулы, полученного как описано выше, 172 мкл разведенной пробы

или калибровочной пробы, 100 мкл раствора для обнаружения, содержащего биотинилированное детекторное антитело, полученного как описано выше, 100 мкл раствора SBG и 25 мкл 100 мкМ RGP.

5 [0158] Для обнаружения на матрицах с камерами для реакций в фемтолитровых объемах той фракции гранул, чье флуоресцентное излучение соответствует фракции гранул, связанных с по меньшей мере одним ферментом, и интенсивности флуоресценции в каждой реакционной камере в анализаторе SiMoA применяется флуоресцентная визуализация высокого разрешения. На основе этих измерений анализатор SiMoA генерирует выходной сигнал, отражающий среднее число ферментов
10 на гранулу (АЕВ).

Пример 2. Обнаружение конкурирующих с анализом антител, присутствующих в плазме

15 [0159] При условии проведения дополнительных предварительных манипуляций с пробами высокочувствительный анализ из примера 1 можно применять для измерения уровней р217+тау-белка даже в присутствии конкурирующих с анализом антител, которые конкурируют с реагентами для анализа в примере 1, таких как, например, те конкурирующие с анализом антитела, которые вырабатываются у субъекта эндогенно, или экзогенно введенные субъекту конкурирующие с анализом антитела. Способ,
20 описанный в настоящем документе в примере 2, можно применять для анализа фармакодинамики при изучении терапевтических антител к р217+тау-белку, таких как гуманизированное мАт рТ3, присутствующих в плазме. Например, способ в примере 2 можно применять для измерения влияния активного агента для лечения таупатии, в частности моноклонального антитела к р217+тау-белку (например, гуманизированного
25 мАт рТ3), на периферические уровни тау, присутствующего в пробе плазмы, полученной от человеческого индивида.

30 [0160] Аликвоту пробы плазмы сначала разводили в соотношении 1:3 в 0,1 М NaOAc, а затем нагревали при 85 °С в течение 7 минут с последующим охлаждением на ледяной бане (4 °С) в течение 10 минут. Нагретую и затем охлажденную текучую среду пробы центрифугировали при 14 000 × g в течение 10 минут при 4 °С и отделяли супернатант от осадка. К супернатанту добавляли 1 М раствор трис-основания в количестве, составляющем 7% от объема, для достижения нейтрального значения рН супернатанта и получали пример полуденатурированной пробы. Одновременно с этим вторую алиkvоту пробы плазмы охлаждали на ледяной

бане в течение всего времени получения полуденатурированной текучей среды пробы. Вторая аликвота в примере 2 в настоящем документе также называется неденатурированной текучей средой пробы.

5 [0161] Выходной сигнал, генерируемый анализатором SiMoA для сигнала полуденатурированной текучей среды, соответствует общему количеству p217+тау-белка, присутствующему в пробе плазмы, тогда как выходной сигнал, генерируемый для неденатурированной текучей среды, соответствует несвязанному p217+тау-белку в пробе плазмы. Выходные сигналы соотносят со стандартной кривой, построенной с применением калибровочного пептида, для определения концентраций общего количества p217+тау-белка и несвязанного p217+тау-белка, присутствующих в пробе плазмы, соответственно. Вычитанием последнего значения из первого получают количественный показатель количества несвязанного p217+тау-белка, присутствующего в пробе плазмы.

15 [0162] Точные значения времени и температуры нагревания для примера 2 определяли с применением CSF и экзогенно добавляемых антител как комбинацию времени и температуры нагревания, достаточную для необратимой модификации любых создающих помехи антител в пробе таким образом, что они перестают мешать связыванию антител к p217+тау-белку при проведении анализа, при том, что влияние на сам сигнал от p217+тау-белка отсутствует. В частности, данные, полученные с применением CSF и экзогенно добавляемых антител, показали, что сигнал от p217+тау-белка устойчив при нагревании при 85 °C в течение по меньшей мере 10 минут, а антитела денатурируются уже после 2 минут нагревания при 85 °C. Таким образом, результаты, полученные с применением полуденатурированной текучей среды и неденатурированной текучей среды в примере 2, не позволяют напрямую измерять, 20 связаны ли захватные антитела с p217+тау-белком, а скорее демонстрируют, что в плазме присутствуют конкурирующие с анализом антитела, которые создают помехи для способности анализа p217+тау-белка определять количество p217+тау-белка.

30 **Пример 3. Способ анализа p217+тау-белка предшествующего уровня техники неприемлем для применения с плазмой**

[0163] Как обсуждалось выше, ранее в патенте Kolb '492 был описан анализ для измерения p217+тау-пептидов в биологических пробах. Однако в патенте Kolb '492 приведены какие-либо примеры количественного определения p217+тау-пептидов, присутствующих в сыворотке или плазме человека. Наоборот, в патенте Kolb '492

указано, что с неочищенными пробами сыворотки или плазмы возникают проблемы из-за помех, и в них невозможно провести измерение и количественное определение с достаточной чувствительностью без предварительной иммунопреципитации проб с последующей тепловой денатурацией элюата.

5 **[0164]** В примере 3 проводится оценка анализа, описанного в примере 1 патента Kolb '492, с применением набора проб плазмы человека, полученных от 5 здоровых добровольцев (ЗД) в качестве контрольных субъектов и 5 субъектов с
10 диагностированной болезнью Альцгеймера (БА). В этом примере в качестве захватного антитела применяют мАт рТ3 и в качестве детекторного антитела — мАт рТ82. Данные, полученные в соответствии с примером 3 и сгенерированные анализатором SiMoA, приведены на Фиг. 1а–1г в единицах АЕВ. Слева на каждом графике показаны
15 данные, соответствующие субъектам с БА, а справа на каждом графике показаны данные, соответствующие ЗД. Для каждой категории субъектов среднее значение показано в виде более длинной горизонтальной линии с \pm среднеквадратичным отклонением (СО) набора данных, показанным в виде более коротких линий выше и
ниже линии среднего значения.

[0165] Каждую из этих проб плазмы разводили в соответствии с патентом Kolb '492 с получением двух различных разведений — 1 : 4 и 1 : 16. Результаты, полученные с применением обоих разведений проб плазмы, приведены на Фиг. 1а и 1б
20 соответственно. Данные, приведенные на Фиг. 1а, демонстрируют, что при разведении 1 : 4 показатели 40% проб плазмы находились ниже LLOQ анализа, описанного в примере 1 патента Kolb '492, тогда как 20% имели показатели на уровне LLOQ и еще 40% имели показатели значительно выше, чем у всех остальных проб. В частности, при разведении 1 : 4 показатели 6/10 проб из примера 3 были на уровне или ниже LLOQ
25 (АЕВ = сигнал = 0,035 = сигнал/шум (S/N) > 2 и CV < 20%), а остальные 4 пробы имели заметно более высокий сигнал (в 11–745х выше LLOQ). Как показано на Фиг. 1б, при разведении 1 : 16 у всех проб плазмы, включая те 40%, у которых при разведении 1 : 4 показатели были существенно выше, измеренные показатели были ниже LLOQ анализа, описанного в примере 1 патента Kolb '492. Более конкретно, при разведении
30 1 : 16 показатели всех проб в примере 3 были ниже LLOQ, что свидетельствует о том, что высокий сигнал при разведении 1 : 4 у 4/10 субъектов в примере 3, упомянутый выше, был в существенной степени нелинейным и, таким образом, может рассматриваться как артефакт от матрикса плазмы. Данные, приведенные на Фиг. 1а и 1б, демонстрируют отсутствие у анализа чувствительности и линейности при

разведении в случае обнаружения p217+тау-пептидов в плазме с применением анализа, описанного в примере 1 патента Kolb '492, и, следовательно, такой анализ неприемлем для определения количества p217+тау-пептидов, присутствующих в плазме.

5 [0166] Набор проб плазмы от тех же 5 ЗД и 5 субъектов с БА денатурировали в соответствии с примером 2 выше для получения 10 различных полуденатурированных текучих сред проб. Способ получения полуденатурированных текучих сред проб, описанный в примере 2, модифицирует создающие помехи антитела таким образом, что они перестают мешать связыванию антител к p217+тау-белку с p217+тау-пептидами в 10 пробе, не ослабляя сигнал от p217+тау-белка, обнаруженного антителами к p217+тау-белку. Каждую из полуденатурированных текучих сред проб разводят в соотношении 1 : 6 и измеряют с применением анализа, описанного в примере 1 патента Kolb '492. Результаты представлены на Фиг. 1в. Как можно видеть на Фиг. 1в, способ получения полуденатурированных текучих сред проб позволил устранить все поддающиеся измерению сигналы в 40% проб, которые ранее имели показатели существенно выше 15 LLOQ при разведении 1 : 4 без стадии денатурации (см. Фиг. 1б). Способ получения полуденатурированных текучих сред проб, описанный в примере 2, не приводит к ослаблению сигнала от p217+тау-белка, обнаруженного антителами к p217+тау-белку. Таким образом, данные, приведенные на Фиг. 1в, свидетельствуют, что сигнал, определенный в плазме и представленный на Фиг. 1а, может быть загрязнен помехами и/или артефактами со стороны других компонентов, отличных от p217+тау-пептидов. В 20 частности, высокий сигнал от p217+тау-белка в 4/10 проб плазмы, представленный на Фиг. 1а, исчез после денатурации, что указывает на то, что этот сигнал не является истинным сигналом от тау. Данные для неочищенной плазмы в разведении 1 : 16, приведенные на Фиг. 1а и 1в, показывают более высокий сигнал у субъектов с БА по сравнению с ЗД, демонстрируя, что стадии устранения помех со стороны матрикса могут приводить к высвобождению сигнала от p217+тау-белка, имеющего отношение к биомаркерам в плазме. Однако низкая чувствительность не позволяет применять анализ, описанный в примере 1 патента Kolb '492, в качестве приемлемого способа измерения p217+тау-белка в пробах плазмы.

30 [0167] В патенте Kolb '492 признается, что при анализе неочищенных сыворотки или плазмы возможно снижение чувствительности и помехи со стороны структур матрикса, и описывается, что для получения измерений патологических форм тау-белков в пробах, полученных из крови, в комбинации с анализом, описанным в примере 1 патента Kolb '492, можно применять стратегию обогащения с помощью

иммунопреципитации. Далее продемонстрировано, что иммунопреципитация в комбинации с анализом, описанным в примере 1 патента Kolb '492, обеспечивает улучшение чувствительности и позволяет отличать ЗД от субъектов с БА.

5 [0168] Набор проб плазмы от тех же 5 ЗД и 5 субъектов с БА иммунопреципитировали для получения сигнала от p217+тау-белка, применяя антитела рТ3, перед проведением измерения в соответствии с анализом, описанным в примере 1 патента Kolb '492. Иммунопреципитированные пробы разводили разбавителем проб в соотношении 1 : 4. Результаты, полученные для этих иммунопреципитированных проб в разведении 1 : 4, приведены на Фиг. 1г. Сравнение результатов, представленных на 10 Фиг. 1г, с результатами на Фиг. 1а, которые были получены при разведении с тем же соотношением, но без первоначальной иммунопреципитации антителами рТ3, показывает, что стадии иммунопреципитации привели к улучшению чувствительности анализа таким образом, что все показатели проб плазмы от субъектов с БА находятся в линейном диапазоне и явно отличаются от проб ЗД. На Фиг. 1г показано, что 15 количество p217+тау-пептидов, присутствующих в плазме, полученной из проб ЗД, немного выше LLOQ анализа, описанного в примере 1 патента Kolb '492, но не позволяет получить результаты, превышающие LLOQ анализа (например, LLOQ находится внутри диапазона среднеквадратичного отклонения для проб ЗД), для надежного количественного определения. Эти результаты указывают, что очистка и 20 концентрирование сигнала p217+тау-белка в плазме могут позволить получить полезный способ анализа p217+тау-белка в плазме. Однако иммунопреципитация — это трудоемкий и неточный способ, неоправданно обременительный и способный вносить дополнительную неточность в анализ. Анализы и способы настоящей заявки не требуют проведения отдельной стадии иммунопреципитации для концентрирования 25 сигнала от p217+тау-белка с целью получения результатов, имеющих достаточную чувствительность для обнаружения p217+тау-пептидов в пробах плазмы человека.

Пример 4. Сравнение предыдущего анализа с высокочувствительным анализом настоящей заявки для обнаружения p217+тау-пептидов

30 [0169] Анализы и способы настоящей заявки включают отдельные стадии для приведения пробы плазмы в контакт с захватным антителом для связывания захватного антитела с p217+тау-пептидами в плазме с образованием комплексов антитело-пептид и для приведения комплексов антитело-пептид в контакт с детекторным антителом для связывания детекторного антитела с комплексами антитело-пептид после промывки,

как объясняется в примере 1. Первая стадия приведения пробы плазмы в контакт с захватным антителом и последующая промывка комплексов антитело-пептид перед приведением в контакт с детекторным антителом позволяет отделять сигнал от р217+тау-белка от влияния создающих помехи компонентов в пробе плазмы. В частности, р217+тау-пептиды в пробе связаны с захватным антителом, тогда как создающие помехи компоненты пробы вымываются перед добавлением детекторного антитела к комплексам антитело-пептид. Анализы и способы, включающие эти отдельные стадии, также называются в настоящем документе «3-стадийными» анализами. В противоположность этому, в анализе, описанном в примере 1 патента Kolb '492, биологическую пробу объединяют и с захватным антителом, и с детекторным антителом, позволяя обоим антителам связаться с биологической пробой перед стадией промывки. Анализ, описанный в примере 1 патента Kolb '492, также называется в настоящем документе «2-стадийными» анализами. В этом примере также увеличили время инкубации и вносимый объем пробы на первой стадии «3-стадийного» анализа по сравнению с «2-стадийным» анализом, чтоб обеспечить максимальный захват сигнала. Как дополнительно демонстрируется в примере 4 ниже, неожиданно было обнаружено, что «3-стадийный» анализ настоящей заявки обеспечивает улучшенную чувствительность по сравнению с «2-стадийным» анализом при измерении р217+тау-пептидов в сыворотке, что не наблюдается при проведении измерений в CSF.

[0170] В примере 4 сравнивается «3-стадийный» анализ настоящей заявки с «2-стадийным» анализом при измерении р217+тау-пептидов в CSF и сыворотке. Измерения для набора проб CSF от множества субъектов с различными статусами когнитивной функции проводили с применением как «2-стадийного», так и «3-стадийного» анализов. В частности, для 96 проб CSF от 21 субъекта с деменцией легкой или умеренной степени в клиническом исследовании были проведены измерения с применением как «2-стадийного», так и «3-стадийного» анализов. На Фиг. 2а для каждой пробы результаты (в пг/мл обнаруженного р217+тау-белка), полученные с применением «2-стадийного» анализа (отложены на оси X), нанесены на график относительно результата, полученного с применением «3-стадийного» анализа (отложены на оси Y). Кроме того, для набора проб сыворотки от тех же 5 ЗД и 5 субъектов с БА, что и в примере 3, были проведены измерения с применением как «2-стадийного», так и «3-стадийного» анализов. Полученные результаты (в пг/мл обнаруженного р217+тау-белка) представлены на столбчатой диаграмме на Фиг. 2б, где

левый столбик для каждой пробы соответствует результату, полученному с применением «2-стадийного» анализа, а правый столбик соответствует результату, полученному с применением «3-стадийного» анализа.

[0171] Как видно на Фиг. 2а, «2-стадийный» и «3-стадийный» анализы продемонстрировали высокую степень корреляции ($r^2 = 0,94$) при измерении р217+тау-пептидов в пробе CSF. Однако на Фиг. 2б показано, что подобная корреляция не наблюдается при применении анализов для измерения р217+тау-пептидов в пробах сыворотки. Кроме того, хотя на Фиг. 1а показана подгруппа проб с измеренными показателями, которые намного выше, чем в остальных пробах, если для измерения р217+тау-пептидов в плазме применяют «2-стадийный» анализ, на Фиг. 2б показано, что высокие сигналы этих выбросов значительно снижаются, если для измерения р217+тау-пептидов в сыворотке применяют «3-стадийный» анализ. Данные Фиг. 2б показывают, что выбросы с высокими сигналами от р217+тау-белка, наблюдаемые при «2-стадийном» анализе, не наблюдаются аналогичным образом при проведении измерения в тех же пробах с применением «3-стадийного» анализа. Таким образом, данные Фиг. 2б демонстрируют, что выбросы с высокими сигналами от р217+тау-белка, наблюдаемые при «2-стадийном» анализе, обусловлены помехами и/или артефактами анализа и не являются точными показателями количества р217+тау-пептидов, присутствующих в плазме. Эти данные показывают, что существуют пренебрежимо малые помехи со стороны матрикса в CSF, но значительные положительные помехи в продуктах, полученных из крови.

Пример 5. Сравнение детекторных антител с применением высокочувствительного анализа настоящей заявки для обнаружения р217+тау-пептидов

[0172] В примере 5 оценивают соответствие и относительную фрагментацию в трех типах биологических текучих сред, т.е. CSF, сыворотке и плазме, с применением двух разных детекторных антител и примера анализа, описанного в примере 1. В частности, в примере 5 сравнивают различие между hT43 и pT82 в качестве детекторных антител, применяемых в анализе из примера I (за исключением того, что применяются разные детекторные антитела, как указано в примере 5). В обоих примерах осуществления захватное антитело представляет собой pT3. Таким образом, два примера анализов, сравниваемые в примере 5, представляют собой pT3xhT43 и pT3xpT82.

[0173] В CSF, сыворотке и плазме от 18 субъектов с БА (в частности, с деменцией легкой или умеренной степени) в клиническом исследовании проводили измерение с применением анализа из примера 1 и модифицированного анализа, схожего с описанным в примере 1, за исключением того, что детекторное антитело заменено на мАт hT43. Полученные результаты (в пг/мл обнаруженного p217+тау-белка) представлены на Фиг. 3а, 3б и 3в для CSF, сыворотки и плазмы соответственно. Для каждого типа биологических текучих сред результаты (в пг/мл обнаруженного p217+тау-белка), полученные с применением анализа с pT3xhT43 (отложены на оси X), нанесены на график относительно результата, полученного с применением анализа с pT3xpT82 (отложены на оси Y), на Фиг. 3а, 3б и 3в для CSF, сыворотки и плазмы соответственно. На каждой из Фиг. 3а–3в показаны линия линейной регрессии вместе со значением R^2 для этой линии линейной регрессии. Как показано на Фиг. 3а–3в, во всех трех типах проб результаты, полученные с применением детекторного антитела hT43 и антитела pT82, демонстрировали высокую степень соответствия ($R^2 = 0,82–0,95$). Углы наклона линий линейной регрессии, показанных на Фиг. 3а–3в, равнялись 2,83, 2,41 и 2,05 соответственно. Дополнительно результаты, полученные при анализе с pT3xpT82, были в ~2,5 раза выше, чем полученные при анализе с pT3xhT43 в CSF, сыворотке и плазме. Как обсуждалось выше, pT3 распознает эпитоп в положении аминокислот 210–220 человеческого тау-белка. Детекторное антитело hT43 распознает аминокислоты 7–20 человеческого тау-белка, а детекторное антитело pT82 распознает аминокислоты 116–127 человеческого тау-белка. Таким образом, pT82 распознает эпитоп, расположенный ближе к pT3, чем эпитоп, распознаваемый антителом hT43, что позволяет pT82 распознавать короткие фрагменты p217+тау-пептидов в дополнение к длинным фрагментам p217+тау-пептидов, по сравнению с hT43. Считается, что анализ с pT3xpT82 дает более высокие значения концентраций, чем анализ с pT3xhT43, так как известно, что тау-белок в CSF сильно фрагментирован, а pT82 способен обнаруживать более короткие (а значит, и в большем количестве) фрагменты p217+тау-пептидов, чем hT43. Интересно отметить, что аналогично более высокие уровни при анализе с pT3xpT82 наблюдаются также в сыворотке и плазме, что указывает на то, что характер фрагментации тау-белка в неочищенных пробах (между аминокислотами 20 и 116) в компонентах крови (например, сыворотке и плазме) может быть схожим с таковым в CSF, и что в продуктах крови отсутствует более высокая степень фрагментации между эпитопами hT43 и pT82. Так как показано, что анализы с pT3xhT43 и с pT3xpT82 дают в высокой степени совпадающие результаты для CSF, сыворотки и плазмы,

свидетельствующие о том, что уровень фрагментации p217+тау-белка отражает фрагментацию в CSF, считается, что два анализа, оцениваемые в примере 5, являются взаимозаменяемыми. Однако анализ с pT3xhT43 обеспечивает более высокую чувствительность по сравнению с анализом с pT3xhT43.

5

Пример 6. Сравнение различных разбавителей проб для применения в анализе для обнаружения p217+тау-пептидов

[0174] В примере 6 оценивают различные разбавители проб для применения в анализе из примера I (за исключением того, что применяются разные разбавители проб, как указано в примере 6) для определения того, какой разбавитель будет снижать агрегацию гранул и/или количество артефактов в сигнале от p217+тау-белка, полученном с помощью анализа. Влияние типа буфера (PBS в сравнении с трис), концентрации NaCl и присутствия гетерофильного блокатора (например, блокирующего взаимодействия человеческих антител с мышиными антителами) измеряли с точки зрения вклада в артефактный сигнал от p217+тау-белка в сыворотке и воздействия на количество гранул, определенных в конце осуществления способа ИФА. Различные разбавители проб, оцениваемые в примере 6, указаны ниже в таблице 1.

15

Таблица 1

Разбавитель проб	Композиция
1	Разбавитель проб из набора Simoa Homebrew Assay Starter Kit
2	50 мМ фосфатный буфер, 50 мМ NaCl и 0,5% (об./об.) Тритон X-100
3	50 мМ фосфатный буфер, 100 мМ NaCl и 0,5% (об./об.) Тритон X-100
4	50 мМ трис-буфер, 50 мМ NaCl и 0,5% (об./об.) Тритон X-100
5	50 мМ трис-буфер, 100 мМ NaCl и 0,5% (об./об.) Тритон X-100
6	50 мМ фосфатный буфер, 50 мМ NaCl, 0,5% (об./об.) Тритон X-100 и HBR-9
7	50 мМ фосфатный буфер, 100 мМ NaCl, 0,5% (об./об.) Тритон X-100 и HBR-9
8	50 мМ трис-буфер, 50 мМ NaCl, 0,5% (об./об.) Тритон X-100 и HBR-9
9	50 мМ трис-буфер, 100 мМ NaCl, 0,5% (об./об.) Тритон X-100 и HBR-9

20

[0175] Хотя это не указано в таблице 1, каждый разбавитель проб также содержит 5 мМ ЭДТА и 2% (об./об.) бычьего сывороточного альбумина.

[0176] Три объединенных пробы сыворотки, полученные от человеческих индивидуумов с высокими уровнями тау-белка, и раствор калибровочного пептида 1 пг/мл (в качестве отрицательного контроля) проанализировали с применением

25

модифицированного анализа, схожего с описанным в примере 1, с различными разбавителями проб, как описано в настоящем документе в примере 6. Анализатор SiMoA применяли для определения количества гранул, внесенных на диск SiMoA, и значения АЕВ для каждой комбинации пробы и разбавителя. На Фиг. 4а показано количество гранул, внесенных на диск SiMoA, для трех проб сыворотки и калибровочного пептида в каждом из 9 различных разбавителей проб. На Фиг. 4б показаны флуоресцентные сигналы, обнаруженные анализатором SiMoA, в единицах АЕВ для трех проб сыворотки и калибровочного пептида в каждом из 9 различных разбавителей проб. На Фиг. 4а и 4б данные представлены в виде столбчатых диаграмм для каждой пробы с измерением в различных разбавителях проб, которые показаны в том же порядке, в каком они перечислены в таблице 1.

[0177] Как можно видеть на Фиг. 4а, разбавитель проб 1, который представляет собой разбавитель проб из набора Simoa Homebrew Assay Starter Kit, обеспечивает значительно более низкое количество гранул во всех трех пробах сыворотки по сравнению с раствором калибровочного пептида (1688–2921 против 5378). В случае разбавителей проб 2–9 показатель количества гранул в сыворотке лучше, и значительно снижен артефактный сигнал, наблюдаемый в двух из проб, проанализированных с применением разбавителя Simoa Homebrew (разбавителя проб 1). Считается, что это наблюдаемое снижение количества гранул в сыворотке вызвано агрегацией парамагнитных гранул, применяемых в качестве подложек для захватных антител при анализе, когда такой анализ применяют для изучения проб сыворотки. Агрегация парамагнитных гранул нежелательна, так как она отрицательно влияет на точность и прецизионность анализа для обнаружения p217+тау-белка в сыворотке. Данные на Фиг. 4а демонстрируют, что разбавители проб 2–9, все из которых содержат детергент Тритон X-100, обеспечивают повышенное количество гранул и, следовательно, пониженную агрегацию гранул, которая в противном случае оказала бы отрицательное влияние на точность и прецизионность анализа. Кроме того, на Фиг. 4а показано, что разбавители проб на основе трис-буфера обеспечивали более высокое количество гранул, чем буферы на основе фосфата, и это демонстрирует, что буферы на основе трис полезны для снижения мешающего влияния на точность и прецизионность анализа, вызванного агрегацией гранул. Как можно видеть на Фиг. 4б, все разбавители проб обеспечивали схожие уровни флуоресцентных сигналов для раствора калибровочного пептида. Однако разбавитель проб 1 также приводил к обнаружению значительных уровней флуоресцентных сигналов, которые отсутствовали в случае

других разбавителей проб (хотя разбавители проб 2, 3 и 5 также позволяли обнаруживать некоторое количество флуоресцентных сигналов). Считается, что эти повышенные флуоресцентные сигналы, наблюдаемые в случае разбавителя проб 1, обусловлены помехами и/или артефактами анализа, аналогично тому, как это было продемонстрировано при «2-стадийном» анализе на Фиг. 2б, и не являются точной мерой р217+тау-пептидов, присутствующих в пробах сыворотки. На Фиг. 4б также показано, что добавление HBR-9, который представляет собой гетерофильный блокатор, разработанный для снижения связывания антител к мышинным IgG с реагентами анализа, дополнительно уменьшает блокировку и/или артефакты анализа. В частности, как видно на Фиг. 4б, разбавители проб 6–9 показали более низкие флуоресцентные сигналы, чем разбавители проб 2–5, в одной из проб сыворотки, и это указывает на то, что добавление HBR-9 обеспечивает дополнительное уменьшение помех и/или артефактов анализа. Данные на Фиг. 4а и 4б показывают, что из разбавителей проб, оцениваемых в примере 4, разбавитель проб 9, который представляет собой тот же разбавитель проб, что описан в примере 1, обеспечивал как минимальную агрегацию гранул, так и минимальный уровень артефактного сигнала. С учетом обсужденных выше данных, особое улучшение наблюдалось при применении трис-буфера, более низкой концентрации NaCl и гетерофильного блокатора.

20 **Пример 7. Сравнение обнаружения р217+тау-пептидов в сыворотке и плазме**

[0178] В примере 7 оценивают обнаружение р217+тау-пептидов в сыворотке и плазме с применением примера анализа, описанного в примере 1. В наборе проб сыворотки от 10 ЗД (также называемых в настоящем документе здоровыми добровольцами и здоровыми контрольными индивидуумами) и тех же 16 субъектов с БА, что и в примере 5, провели измерение с применением примера анализа, описанного в примере 1; результаты приведены на Фиг. 5а. Пробы от субъектов ЗД были получены от службы сбора крови, и предполагалось, что у доноров когнитивная функция была в норме. В наборе проб плазмы от подгруппы из 12 ЗД и 18 субъектов с БА из группы субъектов, представленных на Фиг. 5а, проводили измерение с применением примера анализа, описанного в примере 1; результаты приведены на Фиг. 5б. На Фиг. 5а и 5б слева на каждом графике показаны данные, соответствующие субъектам ЗД, а справа на каждом графике показаны данные, соответствующие субъектам с БА. Для каждой категории субъектов среднее значение показано в виде более длинной горизонтальной линии с \pm среднеквадратичным отклонением (СО) набора данных, показанным в виде

более коротких линий выше и ниже линии среднего значения. Также на каждой из Фиг. 5а и 5б проведена пунктирная линия, демонстрирующая LLOQ анализа для сыворотки и плазмы соответственно. Данные, полученные в соответствии с примером 7, показаны на Фиг. 5а и 5б в пг/мл. Дополнительно для каждого субъекта, для которого на Фиг. 5а и 5б представлены пробы как сыворотки, так и плазмы (т. е. 10 ЗД и 16 субъектов с БА), на Фиг. 5в и 5г результаты (в пг/мл обнаруженного p217+тау-белка), полученные с применением плазмы от субъекта, нанесены на график относительно результатов, полученных с применением сыворотки от того же самого субъекта. Как можно видеть на Фиг. 5а и 5б, показатели в пробах как сыворотки, так и плазмы, полученных от субъектов с БА, значительно превышают показатели в пробах сыворотки и плазмы, полученных от субъектов ЗД. Эти данные свидетельствуют, что и сыворотка, и плазма могут применяться для диагностических целей. Неожиданно было обнаружено, что показатели концентрации, полученные для плазмы, были в ~ 2–3 раза (в частности, в 2,3 раза) выше, чем показатели, полученные для сыворотки, что было определено посредством вычисления средних значений отношений показателей p217+тау-белка в плазме к показателям p217+тау-белка в сыворотке, определенных для всех субъектов. Однако, как показано на Фиг. 5г, построенная по данным линия линейной регрессии демонстрирует угол наклона 1,9, и это указывает на то, что показатели, полученные для плазмы, в 1,9 раза выше, чем показатели, полученные для сыворотки. Так как в сыворотке поддающийся обнаружению уровень аналита p217+тау-белка низкий, показатели во многих пробах сыворотки, полученных от субъектов ЗД, были ниже LLOQ анализа. Однако в связи с тем, что обнаружение p217+тау-белка в плазме выше, показатели всех проб плазмы, полученных от ЗД и пациентов с БА, были на уровне или выше LLOQ анализа. Следовательно, пример анализа, описанный в примере 1, можно применять для обнаружения и количественного определения p217+тау-пептидов в плазме как ЗД, так и субъектов с БА. Дополнительно, как можно видеть на Фиг. 5б, диапазон p217+тау-пептидов, обнаруженных у субъектов ЗД, не перекрывается с существенной частью диапазона p217+тау-пептидов, обнаруженных у субъектов с БА. Показатели всех проб сыворотки, полученных от пациентов ЗД, были ниже LLOQ анализа (показано на Фиг. 5а), но показатели большинства (11 из 12) образцов плазмы, полученных от тех же самых пациентов ЗД, были выше LLOQ анализа и находились в линейном диапазоне (показано на Фиг. 5б). Показатели концентрации p217+тау-белка в плазме и сыворотке хорошо коррелировали ($r^2 = 0,82$), однако измерения в плазме были в среднем в

~ 1,9 раза выше, чем в сыворотке, как показано на Фиг. 5в. Таким образом, неожиданно было обнаружено, что анализ настоящей заявки обеспечивает получение количественных данных, которые могут применяться для отличия субъектов ЗД от субъектов с БА. В частности, может быть определено, что у субъекта имеется таупатия или он подвержен риску развития таупатии, в частности болезни Альцгеймера, когда количество p217+тау-пептидов, обнаруженное в плазме, выше заданного порогового значения (например, ~ 0,1 пг/мл на основе данных, показанных на Фиг. 5б).

Пример 8. Линейный диапазон анализа для обнаружения p217+тау-белка в плазме

Линейный диапазон по калибровочному материалу

[0179] Были получены калибровочные пептиды, описанные в примере 1. Калибровочные пептиды содержали коровые эпитопы для антител pT3 и hT43, разделенные линкером PEG4 и применялись для получения стандартных кривых, соответствующих отношению между выходными сигналами АЕВ от анализатора SiMoA и концентрациями калибровочных пептидов. Примеры стандартных кривых, полученных в 5 отдельных прогонах анализа различных разведений калибровочных пептидов, как описано в примере 1, показаны на Фиг. 6а. Для создания калибровочных кривых применяли метод предварительной обработки данных с аппроксимацией 4-параметрической кривой (4PL, взвешивание по $1/y^2$). Нижний предел обнаружения (LLOD) примера анализа из примера 1 определяли как рассчитанный калибровочный уровень, дающий значение АЕВ, равное среднему показателю нулевого калибратора + 2,5 среднеквадратичного отклонения (СО), включая 10% коэффициент вариации (CV). По этим критериям репрезентативные данные показали значение LLOD, равное ~ 0,002 пг/мл. Линейный диапазон анализа между LLOQ и верхним пределом количественного определения (ULOQ) определяли как отрезок между минимальной и максимальной точками стандартной кривой, достигающими значения CV < 20% и восстановления 80–120% от ожидаемого. При таких критериях линейный диапазон примера анализа из примера 1 составлял от 0,012 до 30 пг/мл. Калибровочные кривые для 5 отдельных прогонов хорошо совмещались (демонстрируя стабильный сигнал в широком динамическом диапазоне 5–30 000 фг/мл) и демонстрировали возрастающий сигнал по всему диапазону, но в некоторых случаях показывали насыщение в верхней точке, что свидетельствует о том, что динамический диапазон для примера анализа из примера 1 составляет 0,005–10 пг/мл. Среднее значение, СО, CV и отношение сигнала к фону для

каждого разведения в 5 отдельных прогонах, показанных на Фиг. 6а, приведены ниже в таблице 2.

Таблица 2

<i>пг/мл калибровочного пептида</i>	<i>Среднее АЕВ</i>	<i>СО</i>	<i>CV (%)</i>	<i>Сигнал/фон</i>
0	0,015	0,003	20,4	1
0,006	0,026	0,003	13,1	1,7
0,012	0,037	0,003	7,5	2,5
0,023	0,059	0,004	6,8	3,9
0,046	0,104	0,005	4,7	6,9
0,093	0,188	0,017	9,0	12,5
0,186	0,344	0,030	8,7	22,8
0,37	0,662	0,044	6,7	43,9
1,11	1,968	0,200	10,2	130,4
3,33	5,515	0,387	7,0	365,5
10	14,228	1,440	10,1	942,8
30	23,524	0,187	0,8	1558,7

LLOD = фон + 2,5 СО = 0,15 + (2,5 × 0,003) = 0,0228 АЕВ, что, по расчетам, соответствует теоретической концентрации 0,002 пг/мл. LLOQ = первая точка на калибровочной кривой с CV < 20% и отношением сигнал/шум (S/N) > 2 = 0,012 пг/мл.

5

Линейность при разведении для плазмы

[0180] Чтобы оценить линейность при разведении и определить минимально необходимое разведение (MRD) для испытания проб сыворотки и плазмы, набор из 3 объединенных проб сыворотки от субъектов с БА, имеющих высокие уровни тау-белка, и 1 объединенной пробы плазмы от субъектов с БА, имеющих высокие уровни тау-белка, титровали по разведениям от 1 : 2 до 1 : 6 (т. е. разведения 1 : 2, 1 : 3, 1 : 4, 1 : 5 и 1 : 6) в разбавителе проб и проводили измерения в соответствии с анализом из примера 1. Затем количество p217+тау-белка, обнаруженное при каждом разведении, пересчитывали с получением расчетной концентрации p217+тау-белка, присутствующих в неразведенной пробе сыворотки или плазмы, и сравнивали это значение с расчетной концентрацией p217+тау-белка, рассчитанной по данным, определенным в пробе сыворотки или плазмы при разведении 1 : 3. Полученные данные представлены на Фиг. 6б для каждой из проб в виде % от расчетной концентрации p217+тау-белка по данным пробы с разведением 1 : 3. Результаты, полученные для каждой из 3 проб сыворотки, представлены на Фиг. 6б в виде кружков (●), квадратов (■) и треугольников (▲). Результаты, полученные для пробы плазмы, представлены на Фиг. 6б в виде перевернутого треугольника (▼). Как можно видеть на

20

Фиг. 6б, результаты каждого из разведений проб находились в пределах 20% от данных других разведений для всех показанных проб сыворотки и плазмы. Эти данные демонстрируют приемлемую линейность при разведении в диапазоне разведений от 1 : 2 до 1 : 6. Так как пробы сыворотки и плазмы содержат низкие количества р217+тау-белка, предпочтительным может быть разведение 1 : 2.

Пример 9а. Проверка соответствия техническим требованиям анализа для обнаружения р217+тау-белка в плазме

Прецизионность

10 **[0181]** Для оценки прецизионности повторных измерений р217+тау-белка в плазме проводили измерения в когорте из 232 проб плазмы (включающих пробы как ЗД, так и субъектов с БА) в соответствии с примером анализа из примера 1 в четырех повторностях. На основе стандартной кривой для калибровочных пептидов, было определено, что LLOQ анализа составляет 10 фг/мл. С учетом разведения проб 1 : 2 значение LLOQ было скорректировано до 20 фг/мл. Однако данные указывают, что 15 непрецизионность возрастает, начиная с уровня ниже ~ 40 фг/мл (Фиг. 7а), на основе графика зависимости % CV для каждого набора измерений с четырьмя повторностями от среднего количества р217+тау-белка, определенного (в фг/мл) в каждой пробе. Данные на Фиг. 7а показывают, что показатели 93% проб (216/232) были выше LLOQ анализа (концентрация, при которой $CV < 20\% = 40$ фг/мл в этом примере; показано пунктирными линиями). Более того, во всех пробах, кроме 4, показатели находились в приемлемых пределах, равных 20% CV, для анализа только для научных исследований (RUO). Средняя прецизионность в одном анализе для всех 232 проб плазмы составляла 20 7,1% CV, а средняя прецизионность в одном анализе для всех проб, находящихся выше LLOQ, равнялась 6,7% CV.

25 **[0182]** Для оценки прецизионности в разных анализах в анализе из примера 1 готовили панель из 3 проб для контроля качества (QC), содержащих низкую, среднюю и высокую концентрации калибровочного пептида в разбавителе проб, а также объединенную пробу плазмы от субъектов с БА, имеющих высокие уровни тау-белка, и объединенную пробу сыворотки от субъектов с БА, имеющих высокие уровни тау-белка. Затем в этих пробах проводили измерения в соответствии с примером анализа из примера 1 в 5 отдельных прогонах. Скорректированные с учетом разведения количества р217+тау-белка, обнаруженные в этих пробах, показаны на Фиг. 7б. Для 30 каждой пробы среднее значение показано в виде более длинной горизонтальной линии

с \pm среднеквадратичным отклонением (СО) набора данных, показанным в виде более коротких линий выше и ниже линии среднего значения. Для этих 5 проб прецизионность в разных анализах была определена на уровне 5–15% CV.

5 *Переносимость между лабораториями*

[0183] Для оценки прецизионности анализов для определения p217+тау-белка при проведении анализа на разных испытательных площадках можно провести испытание набора проб плазмы, полученных от ЗД и субъектов с БА, с применением одной и той же партии реагентов на двух отдельных площадках. Если показатели для этих проб на 10 обеих испытательных площадках в высокой степени схожи, это подтверждает, что пример анализа можно переносить между лабораториями.

Стабильность аналита

[0184] Стабильность эндогенного p217+тау-эпитопа в плазме можно оценить при 15 различных температурах, сделав аликвоты объединенной плазмы, полученной от субъектов с БА, и подвергнув каждую аликвоту хранению при 4 °С, 22 °С или 37 °С в течение 1, 2 или 4 ч. Кроме того, поднабор аликвот можно подвергнуть замораживанию-оттаиванию (от -80 °С до 22 °С) 1, 2, 3 или 4 раза. Если при хранении в 20 этих различных условиях не произойдет значительных изменений сигнала, это будет указывать на то, что молекулы тау (и, в частности, эпитопы), распознаваемые в примере анализа из примера 1, в достаточной степени стабильны, чтобы можно было осуществлять стандартные процедуры хранения/проведения испытаний.

25 **Пример 9в. Проверка соответствия техническим требованиям анализа для обнаружения p217+тау-белка в плазме**

Прецизионность

[0185] Дополнительно результаты анализа для 227 проб плазмы (157 субъектов с легкой или умеренной степенью тяжести, 70 субъектов с нормальными когнитивными функциями) из примера 9а также были проанализированы для оценки прецизионности 30 повторных измерений p217+тау-белка в плазме; результаты показаны на Фиг. 7в. Во всех пробах, показанных на Фиг. 7в, удалось провести обнаружение (они показывали сигнал > LLOD) с приемлемой прецизионностью (< 25% CV, средний CV = 7,1%). Действительно, 223 из 227 проб (98,2%) показали CV < 20%. Чтобы установить более надежный нижний предел количественного определения (LLOQ), задавали

пограничное значение 37 фг/мл на основе точки, ниже которой измерения в плазме с большей вероятностью демонстрировали > 20% CV. Как показано на Фиг. 7в, 94,7% всех проб имели показатели выше этого LLOQ.

5 **Пример 10. Клиническая проверка анализа для обнаружения p217+тау-белка в плазме в сравнении с p217+тау-белком в CSF и тау-ПЭТ**

[0186] Для оценки пригодности примера анализа из примера 1 для диагностики и определения стадий БА были получены три когорты проб плазмы для измерения p217+тау-белка с применением этого анализа. Результаты этих измерений

10 проанализировали на наличие корреляции с уровнями p217+тау-белка в CSF и/или SUVR при тау-ПЭТ, что подробно объяснено ниже в обсуждении когорты 3.

Когорта 1. Корреляция p217+тау-белка в плазме с p217+тау-белком в CSF в когорте с БА

15 [0187] В когорте 1 оценивают корреляцию p217+тау-пептидов, обнаруженных в плазме, с p217+тау-пептидами, обнаруженными в соответствующей CSF от того же самого субъекта с БА. В пробах люмбальной текучей среды (LF) CSF от каждого из 16 субъектов с БА (которые имели клинически подтвержденный диагноз деменции легкой или умеренной степени тяжести, с оценкой по Клинической рейтинговой шкале деменции 1+) в клиническом исследовании проводили измерение с применением анализа с pT3xhT43, описанного в примере 1 патента Kolb '492. В пробах плазмы от тех же самых 16 субъектов с БА проводили измерение в соответствии с примером анализа из примера 1, описанным выше. Для каждого субъекта количество p217+тау-белка (в пг/мл), обнаруженное в соответствующей пробе CSF (отложено на оси X), нанесено на график относительно количества p217+тау-белка, обнаруженного в соответствующей пробе плазмы (отложено на оси Y) на Фиг. 8а и Фиг. 8б, которая демонстрирует данные с Фиг. 8а в логарифмических координатах. Линия линейной регрессии ($R^2 = 0,43$, угловой коэффициент = 0,007, $p = 0,006$) вместе со значением R^2 для линии линейной регрессии показаны на Фиг. 8а. Концентрации p217+тау-белка в плазме составляли 25 1,95 +/- 0,23% (среднее +/- SEM) от концентраций p217+тау-белка в CSF.

30

Когорта 2. Корреляция p217+тау-белка в плазме с p217+тау-белком в CSF в когорте валидации

[0188] В когорте 2 оценивают корреляцию p217+тау-пептидов, обнаруженных в плазме, с p217+тау-пептидами, обнаруженными в CSF, в более большой когорте 5 субъектов, у которых диагностирована деменция легкой или умеренной степени (оценка по Клинической рейтинговой шкале деменции 1+) в клиническом исследовании (n = 159), в дополнение к когорте субъектов, у которых отсутствуют симптомы, из другого клинического исследования (n = 70). В пробах LF CSF из когорты 2, которая состоит из 229 субъектов, проводили определение с применением анализа с pT3хhT43, описанного в примере 1 патента Kolb '492. В пробах плазмы от тех же самых 229 субъектов проводили измерение в соответствии с примером анализа из примера 1. Для каждого субъекта количество p217+тау-белка (в пг/мл), обнаруженное в соответствующей пробе CSF (отложено на оси X), нанесено на график относительно количества p217+тау-белка (в фг/мл), обнаруженного в соответствующей пробе плазмы (отложено на оси Y) на Фиг. 9а. Параметры линейной регрессии (не показано): 15 $R^2 = 0,35$, угловой коэффициент = 6 и $p < 0,0001$.

[0189] На Фиг. 9а также приведена вертикальная пунктирная линия, представляющая первое пороговое значение (6,6 пг/мл), выше которого пробы CSF будут указывать, что у субъекта имеется таупатия или он подвержен риску развития таупатии (например, как продемонстрировано повышенными уровнями p217+тау-белка в CSF и/или повышенным SUVR при тау-ПЭТ, что подробнее объясняется ниже в обсуждении когорты 3), и соответствующая горизонтальная пунктирная линия, представляющая второе пороговое значение (104 фг/мл), выше которого пробы плазмы будут указывать, что у субъекта имеется таупатия или он подвержен риску развития таупатии. Правый верхний квадрант, отмеченный как «Истина+», соответствует субъектам, у которых показатели в обеих пробах — CSF и плазме — выше первого и второго пороговых значений, что указывает на то, что измерения как в CSF, так и в плазме свидетельствуют о наличии у субъекта таупатии или подверженности субъекта риску развития таупатии. Нижний левый квадрант, отмеченный как «Истина-», 25 соответствует субъектам, у которых показатели в обеих пробах — CSF и плазме — ниже первого и второго пороговых значений, что указывает на то, что измерения как в CSF, так и в плазме согласованно идентифицируют субъекта как не подверженного риску развития таупатии. Верхний левый квадрант, отмеченный как «Ложь+», 30 соответствует субъектам, у которых показатели в пробах CSF выше первого порогового

значения, но показатели в пробах плазмы ниже второго порогового значения, что указывает на то, что измерения в плазме свидетельствуют о наличии у таких субъектов таупатии или подверженности таких субъектов риску развития таупатии, а измерения в CSF нет. Нижний правый квадрант, отмеченный как «Ложь-», соответствует субъектам, у которых показатели в пробах CSF ниже первого порогового значения, но показатели в пробах плазмы выше второго порогового значения, что указывает на то, что измерения в CSF свидетельствуют о наличии у таких субъектов таупатии или подверженности таких субъектов риску развития таупатии, а измерения в плазме нет. Количество субъектов, идентифицированных в каждом квадранте на Фиг. 9а, приведено ниже в таблице 3.

Таблица 3

	<i>Истина+</i>	<i>Истина-</i>	<i>Ложь+</i>	<i>Ложь-</i>
<i>Кол-во субъектов</i>	133	74	10	12
<i>% субъектов</i>	58	32	4	5

[0190] Данные с Фиг. 9а и из таблицы 3 применяли для создания характеристической кривой обнаружения (ROC), показанной на Фиг. 9б и демонстрирующей способность измерений в плазме отличать пациентов, имеющих измерения в CSF выше второго порогового значения, что указывает на наличие у субъекта таупатию или подверженность субъекта риску развития таупатии, или ниже второго порогового значения, что указывает на то, что субъект здоров или не подвержен риску развития таупатии. Анализ плазмы из примера 1 продемонстрировал хорошие специфичность и чувствительность с $AUC = 0,943$ (95% ДИ: 90,9; 97,8).

[0191] В патенте Kolb '492 сообщалось, что описанный в нем «2-стадийный» анализ позволял отличать пробы CSF от субъектов, имеющих биоптаты головного мозга с показателем «биопсия+», от проб CSF от субъектов, имеющих биоптаты головного мозга с показателем «биопсия-», что указывает на то, что измерения p217+тау-белка в CSF могут указывать на наличие у пациента клинической патологии таупатии, в частности БА. Исходя из данных, представленных на Фиг. 9а и 9б и в таблице 3 в настоящем документе, измерения в плазме в соответствии с анализами и способами настоящей заявки также могут указывать на наличие у пациента клинической патологии таупатии, соответствуют повышению уровней p217+тау-белка в CSF и могут применяться в качестве предикативных биомаркеров для обнаружения таупатии у пациентов.

Когорта 3. Корреляция p217+тау-белка в CSF с показателями ПЭТ для тау-белка

- [0192]** В когорте 3 оценивают корреляцию p217+тау-пептидов, обнаруженных в CSF, с удержанием индикатора ^{18}F -T807 (^{18}F -AV-1451) в ткани головного мозга, измеренным по снимкам, полученным с помощью ПЭТ. Измерения удержания индикатора ^{18}F -T807 с помощью ПЭТ (измерения тау-ПЭТ) соответствуют накоплению тау-белка в ткани головного мозга, что является основным индикатором для отличия субъектов, имеющих таупатию или подверженных риску развития таупатии, от здоровых субъектов, не подверженных риску развития таупатии.
- [0193]** Когорта 3 включает в себя 178 субъектов с различными статусами когнитивной функции (контроли без нарушения когнитивной функции, легкое нарушение когнитивной функции, деменция при БА и некоторые другие нейродегенеративные заболевания). Измерения тау-ПЭТ были проведены в интересующих областях (ROI) головного мозга со стадией I–IV по Брааку у каждого субъекта в когорте 3. В пробах LF CSF, взятых у этих субъектов одновременно или параллельно, проводили определение с применением анализа с pT3xhT43, описанного в примере 1 патента Kolb '492. Для каждого субъекта количество p217+тау-белка (в пг/мл), обнаруженное в пробе CSF (отложено на оси X), нанесено на график относительно отношения стандартизированных уровней накопления (SUVR) для F^{18} -меченного индикатора T807 у соответствующего субъекта на Фиг. 10а. У субъектов когорты 3 было продемонстрировано, что показателям тау-ПЭТ соответствовал определенный диапазон SUVR для F^{18} -меченного индикатора T807, как показано на оси Y на Фиг. 10а. Параметры линейной регрессии (не показано): $R^2 = 0,722$ и $p < 0,0001$.
- [0194]** Субъектов когорты 3 также можно разделить на две разные подгруппы: тех субъектов, для которых была обнаружена корреляция с повышением или отсутствием повышения отложений амилоида- β ($\text{A}\beta$) в ткани головного мозга согласно измерениям с помощью ПЭТ. Те, у кого были повышенные количества $\text{A}\beta$, называются в примере 10 « $\text{A}\beta+$ », а те, у кого не было, называются ниже « $\text{A}\beta-$ ». На Фиг. 10а субъекты, являющиеся $\text{A}\beta+$, показаны более темными значками, тогда как субъекты $\text{A}\beta-$, наиболее представленные в нижнем левом квадранте фигуры, показаны более светлыми значками. Параметры линейной регрессии (не показано) для графика зависимости SUVR для F^{18} -меченного индикатора T807 от измерений p217+тау-белка в CSF составляли для подгруппы $\text{A}\beta+$: $R^2 = 0,740$ и $p < 0,0001$. Параметры линейной регрессии

(не показано) для графика зависимости SUVR для F¹⁸-меченного индикатора T807 от измерений p217+тау-белка в CSF составляли для подгруппы Aβ+: R² = 0,091 и p = 0,532. Данные с Фиг. 10а применяли для создания ROC-кривой, демонстрирующей способность измерений в CSF отличать пациентов, имеющих SUVR для F¹⁸-меченного индикатора T807 выше порогового значения (например, 1,25), что указывает на наличие у субъекта таупатии или подверженность субъекта риску развития таупатии, или ниже порогового значения, что указывает на то, что субъект был здоров или не подвержен риску развития таупатии. Измерения в CSF, полученные с применением анализа с pT3xhT43, описанного в примере 1 патента Kolb '492, показали хорошую специфичность и чувствительность при прогнозировании этого высокого T807 SUVR с AUC = 0,905 (95% ДИ: 86; 94,9), а также позволили определить 6,6 пг/мл в качестве требуемого порогового значения, выше которого показатели p217+тау-белка в CSF будут указывать на то, что у субъекта имеется таупатия или он подвержен риску развития таупатии. Таким образом, это требуемое пороговое значение применяли при анализе данных, полученных в когорте 2, как обсуждалось выше, для анализа корреляции между показателями p217+тау-белка в плазме и данными тау-ПЭТ. Следовательно, данные, представленные на Фиг. 10а и 10б, рассматриваемые в комбинации с данными, полученными в когорте 2, дополнительно демонстрируют, что измерения в плазме, полученные в соответствии с анализами и способами настоящей заявки, могут указывать на наличие у пациента клинической патологии таупатии, соответствуют повышенному накоплению тау-белка в ткани головного мозга и могут применяться в качестве предикативных биомаркеров для обнаружения таупатии у пациентов.

Пример 11. Клиническая проверка анализа для обнаружения p217+тау-белка в плазме в сравнении с p217+тау-белком в CSF и p181-тау-белком в CSF

[0195] Для оценки пригодности примера анализа из примера 1 для диагностики и определения стадий БА были получены пробы плазмы для измерения p217+тау-белка с применением этого анализа. Результаты этих измерений были проанализированы на наличие корреляции с уровнями p217+тау-белка в CSF и/или уровнями p181-тау-белка в CSF. Уровень p181-тау-белка в CSF соответствует количеству обнаруженного в CSF человеческого тау-белка или тау-фрагмента, которые фосфорилированы по остатку 181 тау-белка.

Корреляция p217+тау-белка в плазме с p217+тау-белком в CSF в когорте валидации

[0196] Ту же самую когорту, что применялась в примере 9б, применяли для оценки корреляции p217+тау-пептидов, определенных в плазме, с p217+тау-белком, обнаруженным в CSF. В пробах LF CSF из этой когорты, которая состоит из 227 субъектов, проводили определение с применением анализа с pT3xhT43, описанного в примере 1 патента Kolb '492. В пробах плазмы от тех же самых 227 субъектов проводили измерение в соответствии с примером анализа из примера 1, описанным выше. Для каждого субъекта количество p217+тау-белка (в пг/мл), обнаруженное в соответствующей пробе CSF (отложено на оси X), нанесено на график относительно количества p217+тау-белка (в фг/мл), обнаруженного в соответствующей пробе плазмы (отложено на оси Y) на Фиг. 11а. Параметры линейной регрессии (не показано): $R^2 = 0,35$. Концентрации p217+тау-белка в плазме составляли $1,87 \pm 0,11\%$ (среднее \pm SEM) от концентраций p217+тау-белка в CSF.

[0197] На Фиг. 11б и 11в приведены данные с Фиг 11а, разделенные согласно статусу амилоида (например, А+ или А-) у пациентов. А+ указывает пациентов, которые признаны амилоид-положительными, имеющих соотношение $A\beta_{42}/40$ в CSF $\leq 0,089$. А- указывает пациентов, которые признаны амилоид- отрицательными, имеющих соотношение $A\beta_{42}/40$ в CSF $> 0,089$. Отмечается, что 17 субъектов с Фиг. 11а не включены ни на Фиг. 11б, ни на Фиг. 11в, так как для этих пациентов не были доступны данные по амилоиду в CSF. На Фиг. 11б представлены данные для подгруппы пациентов, которые являются А+ (n = 160), а на Фиг. 11в представлены данные для подгруппы пациентов, которые являются А- (n = 50). Параметры линейной регрессии (не показано) для Фиг. 11б: $R^2 = 0,27$. Параметры линейной регрессии (не показано) для Фиг. 11в: $R^2 = 0,01$. Концентрации p217+тау-белка в плазме у А+ пациентов составляли $1,63 \pm 0,08\%$ (среднее \pm SEM) от концентраций p217+тау-белка в CSF. Концентрации p217+тау-белка в плазме у А- пациентов составляли $2,73 \pm 0,39\%$ (среднее \pm SEM) от концентраций p217+тау-белка в CSF. Как показывают приведенные выше данные, отношение p217+тау-белка в плазме к p217+тау-белку в CSF было немного, но существенно ниже в амилоид-положительной когорте ($p < 0,0001$ при применении непарного t-критерия).

Корреляция p217+тау-белка в CSF с p181-тау-белком в CSF

[0198] Была проведена оценка корреляции p217+тау-пептидов, обнаруженных в CSF с уровнями p181, обнаруженных в CSF. В пробах CSF от субъектов с деменцией легкой или умеренной степени (n = 286; 89% А+) проводили измерения с применением

анализа с рТ3хТ43, описанного в примере 1 патента Kolb '492, и анализа Innostest p181tau для определения концентраций p217+тау-белка и p181 соответственно в пробах CSF. Для каждого субъекта количество p181-тау-белка (в пг/мл), обнаруженное в пробе CSF (отложено на оси X), нанесено на график относительно количества p217+тау-белка (в пг/мл), обнаруженного в пробе CSF (отложено на оси Y) у соответствующего субъекта, на Фиг. 12а. Те пациенты, у которых уровень p181тау в CSF повышен, могут быть идентифицированы как T+, что указывает на то, что у пациентов имеется таупатия или они подвержены риску таупатии. Те пациенты, у которых уровень p181 в CSF находится ниже определенного порогового значения, могут быть идентифицированы как T-, что указывает на то, что пациенты здоровы или не подвержены риску развития таупатии. В этом примере концентрация p181-тау-белка в CSF ≥ 52 пг/мл идентифицируется как T+, тогда как концентрация p181-тау-белка в CSF < 52 пг/мл обозначается как T-. Линейную регрессию данных, приведенных на Фиг. 12а, применяют для соотнесения этой пороговой концентрации p181-тау-белка в CSF с концентрацией p217+тау-белка в CSF. На основании этих данных, пороговое значение p181-тау-белка в CSF, равное 52 пг/мл, соотносится с 11,4 пг/мл p217+тау-белка в CSF. Следовательно, концентрация p217+тау-белка в CSF $\geq 11,4$ пг/мл может быть применена для выявления тех пациентов, которые являются T+, тогда как концентрация p217+тау-белка в CSF $< 11,4$ пг/мл может быть применена для выявления тех пациентов, которые являются T-.

[0199] Данные с Фиг. 11а применяли для построения ROC-кривой (Фиг. 12б), демонстрирующей способность измерений p217+тау-белка в CSF отличать пациентов T+ от пациентов T-. Измерения в CSF, полученные с применением анализа с рТ3хТ43, описанного в примере 1 патента Kolb '492, показали высокую точность прогнозирования того, будет ли пациент являться T+ или T-, с AUC = 0,9469. Анализ ROC-кривой с применением индекса Юдена позволил определить пороговое значение p217+тау-белка в плазме для отличия пациентов T+ от пациентов T-, которое составило 124,6 фг/мл.

[0200] Данные с Фиг. 11а также показаны на Фиг. 12в, где вертикальная пунктирная линия представляет первое пороговое значение (как определено выше, равное 11,4 пг/мл), выше которого пробы CSF будут указывать, что они получены от пациента T+, а соответствующая горизонтальная пунктирная линия представляет второе пороговое значение (как определено выше, равное 124,6 фг/мл), выше которого пробы плазмы будут указывать, что они получены от пациента T-. Правый верхний

квадрант, отмеченный как «Истина+», соответствует субъектам, у которых показатели в обеих пробах — CSF и плазме — выше как первого, так и второго пороговых значений, что указывает на то, что измерения как в CSF, так и в плазме свидетельствуют о наличии у субъекта таупатии или подверженности субъекта риску развития таупатии. Нижний левый квадрант, отмеченный как «Истина-», соответствует субъектам, у которых показатели в обеих пробах — CSF и плазме — ниже первого и второго пороговых значений, что указывает на то, что измерения как в CSF, так и в плазме согласованно идентифицируют субъекта как не подверженного риску развития таупатии. Верхний левый квадрант, отмеченный как «Ложь+», соответствует субъектам, у которых показатели в пробах CSF выше первого порогового значения, но показатели в пробах плазмы ниже второго порогового значения, что указывает на то, что измерения в плазме свидетельствуют о наличии у таких субъектов таупатии или подверженности таким субъектам риску развития таупатии, а измерения в CSF нет. Нижний правый квадрант, отмеченный как «Ложь-», соответствует субъектам, у которых показатели в пробах CSF ниже первого порогового значения, но показатели в пробах плазмы выше второго порогового значения, что указывает на то, что измерения в CSF свидетельствуют о наличии у таких субъектов таупатии или подверженности таким субъектам риску развития таупатии, а измерения в плазме нет. На Фиг. 12в показаны низкие частоты случаев «ложь +/-» — 10 и 2% соответственно. Количество субъектов, идентифицированных в каждом квадранте на Фиг. 12в, приведено ниже в таблице 4.

Таблица 4

	<i>Истина+</i>	<i>Истина-</i>	<i>Ложь+</i>	<i>Ложь-</i>
<i>Кол-во субъектов</i>	108	91	24	4
<i>% субъектов</i>	48	40	10	2

[0201] На Фиг. 12д и 12ж приведены данные с Фиг. 12в, разделенные по пациентам с нормальными когнитивными функциями и пациентам с деменцией легкой или умеренной степени. На Фиг. 12д приведены данные для подгруппы пациентов с нормальными когнитивными функциями, и на Фиг. 12ж приведены данные подгруппы пациентов с деменцией легкой или умеренной степени.

[0202] Данные с Фиг. 12д применяли для построения ROC-кривой (Фиг. 12г), демонстрирующей способность измерений p217+тау-белка в CSF отличать пациентов T+ от пациентов T- в подгруппе пациентов с нормальными когнитивными функциями

(n = 70). Измерения в CSF в подгруппе пациентов с нормальными когнитивными функциями показали схожий уровень точности с AUC = 0,9045. Анализ ROC-кривой с применением индекса Юдена применяли для определения порогового значения p217+тау-белка в плазме для отличия пациентов T+ от пациентов T-.

5 [0203] На Фиг. 12д также показаны вертикальная пунктирная линия, представляющая первое пороговое значение (как определено выше, равное 11,4 пг/мл), выше которого пробы CSF будут указывать, что они получены от пациента T+, и соответствующая горизонтальная пунктирная линия, представляющая второе пороговое значение (определенное по ROC-кривой с Фиг. 12г), выше которого пробы
10 плазмы будут указывать, что они получены от пациента T-. Правый верхний квадрант, отмеченный как «Истина+», соответствует субъектам, у которых показатели в обеих пробах — CSF и плазме — выше как первого, так и второго пороговых значений. Нижний левый квадрант, отмеченный как «Истина-», соответствует субъектам, у которых показатели в обеих пробах — CSF и плазме — ниже первого и второго
15 пороговых значений. Верхний левый квадрант, отмеченный как «Ложь+», соответствует субъектам, у которых показатели в пробах CSF выше первого порогового значения, но показатели в пробах плазмы ниже второго порогового значения. Верхний левый квадрант, отмеченный как «Ложь-», соответствует субъектам, у которых показатели в пробах CSF ниже первого порогового значения, но показатели в пробах
20 плазмы выше второго порогового значения. На Фиг. 12д показаны низкие частоты случаев «ложь +/-» — 23 и 0% соответственно. Количество субъектов, идентифицированных в каждом квадранте на Фиг. 12д, приведено ниже в таблице 5.

Таблица 5

	<i>Истина+</i>	<i>Истина-</i>	<i>Ложь+</i>	<i>Ложь-</i>
<i>Кол-во субъектов</i>	5	49	16	0
<i>% субъектов</i>	7	70	23	0

25 [0204] Данные с Фиг. 12ж применяли для построения ROC-кривой (Фиг. 12е), демонстрирующей способность измерений p217+тау-белка в CSF отличать пациентов T+ от пациентов T- в подгруппе пациентов с деменцией легкой или умеренной степени (n = 157). Измерения в CSF в подгруппе пациентов с деменцией легкой или умеренной степени показали схожий уровень точности с AUC = 0,9254. Анализ ROC-кривой с
30 применением индекса Юдена применяли для определения порогового значения p217+тау-белка в плазме для отличия пациентов T+ от пациентов T-.

[0205] На Фиг. 12ж также показаны вертикальная пунктирная линия, представляющая первое пороговое значение (как определено выше, равное 11,4 пг/мл), выше которого пробы CSF будут указывать, что они получены от пациента T+, и соответствующая горизонтальная пунктирная линия, представляющая второе пороговое значение (определенное по ROC-кривой с Фиг. 12е), выше которого пробы плазмы будут указывать, что они получены от пациента T-. Правый верхний квадрант, отмеченный как «Истина+», соответствует субъектам, у которых показатели в обоих пробах — CSF и плазме — выше как первого, так и второго пороговых значений. Нижний левый квадрант, отмеченный как «Истина-», соответствует субъектам, у которых показатели в обоих пробах — CSF и плазме — ниже первого и второго пороговых значений. Верхний левый квадрант, отмеченный как «Ложь+», соответствует субъектам, у которых показатели в пробах CSF выше первого порогового значения, но показатели в пробах плазмы ниже второго порогового значения. Верхний левый квадрант, отмеченный как «Ложь-», соответствует субъектам, у которых показатели в пробах CSF ниже первого порогового значения, но показатели в пробах плазмы выше второго порогового значения. На Фиг. 12ж показаны низкие частоты случаев «ложь +/-» — 9 и 4% соответственно. Количество субъектов, идентифицированных в каждом квадранте на Фиг. 12ж, приведено ниже в таблице 6.

Таблица 6

	<i>Истина+</i>	<i>Истина-</i>	<i>Ложь+</i>	<i>Ложь-</i>
<i>Кол-во субъектов</i>	100	36	14	7
<i>% субъектов</i>	64	23	9	4

20

[0206] Данные, приведенные на Фиг. 12д и 12ж, показывают, что измерения в плазме в соответствии с анализами и способами настоящей заявки обеспечивают схожую прогнозирующую способность в каждой из подгрупп: с нормальными когнитивными функциями и с деменцией легкой или умеренной степени.

25

Пример 12. Клиническая проверка анализа для обнаружения p217+тау-белка в плазме в сравнении с β -амилоидом в CSF

[0207] Для оценки пригодности примера анализа из примера 1 для диагностики и определения стадий БА были получены пробы плазмы для измерения p217+тау-белка с применением этого анализа. Эти измерения анализировали на наличие корреляции с уровнями β -амилоида в CSF.

30

Корреляция p217+тау-белка в плазме с уровнями β-амилоида в CSF

[0208] Когорту из 210 пациентов применяли для оценки корреляции p217+тау-пептидов, обнаруженных в плазме, с уровнями β-амилоида в CSF. В пробах CSF, полученных от этой когорты, проводили измерение для определения количества Aβ42 и количества Aβ40, присутствующих в пробах. В пробах плазмы от тех же самых 227 субъектов проводили измерение в соответствии с примером анализа из примера 1, описанным выше. Соотношение определенного количества Aβ42 и количества Aβ40 является основным индикатором для отличия субъектов, имеющих амилоидогенное заболевание или подверженных риску развития амилоидогенного заболевания, от здоровых субъектов, не подверженных риску развития амилоидогенного заболевания. Для каждого субъекта соотношение обнаруженного количества Aβ42 и количества Aβ40 (соотношение Aβ42/40) в соответствующей пробе CSF (отложено на оси X) нанесено на график относительно количества p217+тау-белка (в фг/мл), обнаруженного в соответствующей пробе плазмы (отложено на оси Y), на Фиг. 13а. Пациенты, имеющие пониженное соотношение Aβ42/40, могут быть идентифицированы как A+, что указывает на то, что у пациентов имеется амилоидогенное заболевание или они подвержены риску амилоидогенного заболевания. Пациенты, имеющие повышенное соотношение Aβ42/40, могут быть идентифицированы как A-, что указывает на то, что пациенты здоровы или не подвержены риску развития амилоидогенного заболевания. В этом примере соотношение $A\beta42/40 \leq 0,089$ идентифицируется как A+, тогда как соотношение $A\beta42/40 > 0,089$ обозначается как A-.

[0209] Данные с Фиг. 13б применяли для построения ROC-кривой (Фиг. 13а), демонстрирующей способность измерений p217+тау-белка в плазме отличать пациентов, имеющих T+, от пациентов, имеющих T-. p217+тау-белок в плазме показал высокую точность при прогнозировании того, будет ли пациент A+ или A-, с $AUC = 0,8964$. Анализ ROC-кривой с применением индекса Юдена позволил определить пороговое значение p217+тау-белка в плазме для отличия пациентов A+ от пациентов A-, которое составило 103,9 фг/мл.

[0210] На Фиг. 13б также показаны вертикальная пунктирная линия, представляющая первое пороговое значение (как определено выше, равное 0,089), ниже которого соотношение Aβ42/40 будет указывать, что оно относится к пациенту A+, и соответствующая горизонтальная пунктирная линия, представляющая второе пороговое значение (как определено выше, равное 103,9 фг/мл), ниже которого уровни

p217+тау-белка в плазме будут указывать, что они относятся к пациенту А-. В верхнем левом квадранте, отмеченном как «Истина+», соотношение $A\beta_{42}/40$ ниже первого порогового значения и уровни p217+тау-белка в плазме выше второго порогового значения, что указывает на то, что как соотношение $A\beta_{42}/40$, так и уровни p217+тау-белка в плазме свидетельствуют о наличии у субъекта амилоидогенного заболевания или подверженности субъекта риску развития амилоидогенного заболевания. Нижний правый квадрант, отмеченный как «Истина-», соответствует субъектам, у которых и соотношение $A\beta_{42}/40$ выше первого порогового значения, и уровни p217+тау-белка в плазме ниже второго порогового значения, что указывает на то, что как соотношение $A\beta_{42}/40$, так и уровни p217+тау-белка в плазме согласованно идентифицируют субъекта как не подверженного риску развития амилоидогенного заболевания. Верхний правый квадрант, отмеченный как «Ложь+», соответствует субъектам, у которых соотношение $A\beta_{42}/40$ и уровни p217+тау-белка в плазме выше первого и второго пороговых значений соответственно, что указывает на то, что уровни p217+тау-белка в плазме свидетельствуют о наличии у таких субъектов амилоидогенного заболевания или подверженности таких субъектов риску развития амилоидогенного заболевания, тогда как соотношение $A\beta_{42}/40$ нет. Нижний левый квадрант, отмеченный как «Ложь-», соответствует субъектам, у которых соотношение $A\beta_{42}/40$ ниже первого порогового значения и измеренные уровни p217+тау-белка в плазме ниже второго порогового значения, что указывает на то, что соотношение $A\beta_{42}/40$ свидетельствует о наличии у таких субъектов амилоидогенного заболевания или подверженности таких субъектов риску развития амилоидогенного заболевания, тогда как уровни p217+тау-белка в плазме нет. На Фиг. 13б показаны низкие частоты случаев «ложь +/-» — 1 и 18% соответственно. Количество субъектов, идентифицированных в каждом квадранте на Фиг. 13б, приведено ниже в таблице 7.

Таблица 7

	<i>Истина+</i>	<i>Истина-</i>	<i>Ложь+</i>	<i>Ложь-</i>
<i>Кол-во субъектов</i>	123	48	2	37
<i>% субъектов</i>	58	23	1	18

[0211] На Фиг. 13г и 13е приведены данные с Фиг. 13б, разделенные по пациентам с нормальными когнитивными функциями и пациентам с деменцией легкой или умеренной степени. На Фиг. 13г приведены данные для подгруппы пациентов с

нормальными когнитивными функциями, и на Фиг. 13е приведены данные подгруппы пациентов с деменцией легкой или умеренной степени.

[0212] Данные с Фиг. 13г применяли для построения ROC-кривой (Фиг. 13в), демонстрирующей способность измерений p217+тау-белка в плазме отличать 5 пациентов, имеющих А+, от пациентов, имеющих А-, в подгруппе пациентов с нормальными когнитивными функциями (n = 70). ROC-кривая для измерений p217+тау-белка в плазме в подгруппе пациентов с нормальными когнитивными функциями имеет AUC = 0,6554. Анализ ROC-кривой с применением индекса Юдена применяли для определения порогового значения p217+тау-белка в плазме для 10 отличия пациентов А+ от пациентов А-.

[0213] На Фиг. 13г также показаны вертикальная пунктирная линия, представляющая первое пороговое значение (как определено выше, равное 0,089), ниже которого соотношение Аβ42/40 будет указывать, что оно относится к пациенту А+, и соответствующая горизонтальная пунктирная линия, представляющая второе 15 пороговое значение (определенное по ROC-кривой с Фиг. 13в), ниже которого уровни p217+тау-белка в плазме будут указывать, что они относятся к пациенту А-. В верхнем левом квадранте, отмеченном как «Истина+», соотношение Аβ42/40 ниже первого порогового значения и уровни p217+тау-белка в плазме выше второго порогового значения. Нижний правый квадрант, отмеченный как «Истина-», соответствует 20 субъектам, у которых как соотношение Аβ42/40 выше первого порогового значения, так и уровни p217+тау-белка в плазме ниже второго порогового значения. Верхний правый квадрант, отмеченный как «Ложь+», соответствует субъектам, у которых соотношение Аβ42/40 и уровни p217+тау-белка в плазме выше первого и второго пороговых значений соответственно. Нижний левый квадрант, отмеченный как «Ложь-», 25 соответствует субъектам, у которых соотношение Аβ42/40 ниже первого порогового значения и измеренные уровни p217+тау-белка в плазме ниже второго порогового значения. На Фиг. 13г показаны частоты случаев «ложь +/-» — 10 и 24% соответственно. Количество субъектов, идентифицированных в каждом квадранте на Фиг. 13г, приведено ниже в таблице 8.

30

Таблица 8

	<i>Истина+</i>	<i>Истина-</i>	<i>Ложь+</i>	<i>Ложь-</i>
<i>Кол-во субъектов</i>	21	25	7	17
<i>% субъектов</i>	30	36	10	24

[0214] Данные с Фиг. 13е применяли для построения ROC-кривой (Фиг. 13д), демонстрирующей способность измерений p217+тау-белка в плазме отличать пациентов, имеющих A+, от пациентов, имеющих A-, в подгруппе пациентов с деменцией легкой или умеренной степени (n = 140). Измерения p217+тау-белка в плазме обеспечивали высокую точность в подгруппе пациентов с деменцией легкой или умеренной степени с AUC = 0,9832. Анализ ROC-кривой с применением индекса Юдена применяли для определения порогового значения p217+тау-белка в плазме для отличия пациентов A+ от пациентов A-.

[0215] На Фиг. 13е также показаны вертикальная пунктирная линия, представляющая первое пороговое значение (как определено выше, равное 0,089), ниже которого соотношение A β 42/40 будет указывать, что оно относится к пациенту A+, и соответствующая горизонтальная пунктирная линия, представляющая второе пороговое значение (определенное по ROC-кривой с Фиг. 13д), ниже которого уровни p217+тау-белка в плазме будут указывать, что они относятся к пациенту A-. В верхнем левом квадранте, отмеченном как «Истина+», соотношение A β 42/40 ниже первого порогового значения и уровни p217+тау-белка в плазме выше второго порогового значения. Нижний правый квадрант, отмеченный как «Истина-», соответствует субъектам, у которых как соотношение A β 42/40 выше первого порогового значения, так и уровни p217+тау-белка в плазме ниже второго порогового значения. Верхний правый квадрант, отмеченный как «Ложь+», соответствует субъектам, у которых соотношение A β 42/40 и уровни p217+тау-белка в плазме выше первого и второго пороговых значений соответственно. Нижний левый квадрант, отмеченный как «Ложь-», соответствует субъектам, у которых соотношение A β 42/40 ниже первого порогового значения и измеренные уровни p217+тау-белка в плазме ниже второго порогового значения. На Фиг. 13е показаны частоты случаев «ложь +/-» — 0 и 6% соответственно. Количество субъектов, идентифицированных в каждом квадранте на Фиг. 13е, приведено ниже в таблице 9.

Таблица 9

	<i>Истина+</i>	<i>Истина-</i>	<i>Ложь+</i>	<i>Ложь-</i>
<i>Кол-во субъектов</i>	113	18	0	9
<i>% субъектов</i>	81	13	0	6

[0216] Данные, приведенные на Фиг. 13г и 13е, показывают, что измерения в плазме в соответствии с анализами и способами настоящей заявки обеспечивают

улучшение точности прогноза в подгруппе пациентов с деменцией легкой или умеренной степени.

Пример 13. Корреляция p217+тау-белка в плазме с p217+тау-белком в CSF с биохимической очисткой

5 [0217] Дополнительную когорту из 36 пациентов протестировали для оценки корреляции p217+тау-пептидов, обнаруженных в плазме, с p217+тау-белком, обнаруженным в CSF. В пробах CSF из этой когорты проводили определение с применением анализа с pT3xhT43, описанного в примере 1 патента Kolb '492. В пробах плазмы от тех же самых субъектов проводили измерения тремя различными способами.

10 Во-первых, в неочищенных пробах плазмы проводят измерение в соответствии с примером анализа из примера 1. Во-вторых, тау-пептиды экстрагируют химическим способом из проб плазмы и проводят измерение в соответствии с примером анализа из примера 1. В-третьих, пробы плазмы полуденатурируют в соответствии с примером 2 таким образом, что создающие помехи белки денатурируются нагреванием. Для

15 каждого субъекта количество p217+тау-белка (в пг/мл), обнаруженное в соответствующей пробе CSF (отложено на оси X), нанесено на график относительно количества p217+тау-белка (в фг/мл), обнаруженного в соответствующей неочищенной пробе плазмы (отложено на оси Y), на Фиг. 14а. Параметры линейной регрессии (не показано) для Фиг. 14а: $R^2 = 0,6418$. Количество p217+тау-белка (в пг/мл) в пробе CSF

20 (отложено на оси X) нанесено на график относительно количества p217+тау-белка (в фг/мл), обнаруженного в соответствующей пробе плазмы после химической экстракции (отложено на оси Y), на Фиг. 14б. Параметры линейной регрессии (не показано) для Фиг. 14б: $R^2 = 0,6748$. Количество p217+тау-белка (в пг/мл) в пробе CSF (отложено на оси X) нанесено на график относительно количества p217+тау-белка (в фг/мл),

25 обнаруженного в соответствующей полуденатурированной пробе плазмы (отложено на оси Y), на Фиг. 14в. Параметры линейной регрессии (не показано) для Фиг. 14в: $R^2 = 0,5484$.

Пример 14. Количественное определение общего p217+тау-белка у субъектов, получающих лечение экзогенными антителами к тау-белку

30 [0218] Анализы и способы настоящей заявки могут применяться для определения общего p217+тау-белка в пробах плазмы, полученных от субъектов, получающих лечение антителом к тау-белку, в частности, антителом к p217+тау-белку. Однако при обнаружении p217+тау-белка в пробах плазмы субъектов, получающих лечение

антителом к тау-белку, возможны помехи и/или артефакты, вызванные присутствием
лечебного антитела в пробах плазмы. Следовательно, стадии для получения
полуденатурированной текучей среды пробы, описанные в примере 2, могут
5 применяться для обработки пробы плазмы, полученной от субъектов, проходящих
лечение антителом к тау-белку, для уменьшения помех со стороны лечебного антитела
при сохранении сигнала от p217+тау-белка в полуденатурированной текучей среде
пробы.

[0219] Пример 14 модифицирует пример анализа из примера 1 с помощью стадий
для денатурации проб тем же способом, который описан для получения
10 полуденатурированных текучих сред проб в соответствии с примером 2.
Модифицированный пример анализа оценивают с применением проб плазмы от ЗД и
субъектов с БА. Эти пробы плазмы нагревали и проводили в них измерения в
соответствии с примером анализа из примера 10; результаты (в пг/мл обнаруженного
p217+тау-белка) показаны на Фиг. 15а. Слева на Фиг. 15а показаны данные,
15 соответствующие субъектам ЗД, а справа на каждом графике показаны данные,
соответствующие субъектам с БА. Для каждой категории субъектов среднее значение
показано в виде более длинной горизонтальной линии с \pm среднеквадратичным
отклонением (СО) набора данных, показанным в виде более коротких линий выше и
ниже линии среднего значения. Как можно видеть на Фиг. 15а, показатели в
20 полуденатурированных пробах плазмы от субъектов с БА значительно превышают
таковые в пробах, полученных от субъектов ЗД, отражая результаты, наблюдаемые для
проб неочищенной плазмы при анализе проб неочищенной плазмы, как описано в
примере 1.

[0220] Чтобы изучить и оценить чувствительность и прецизионность, применяли
25 модифицированный пример анализа из примера 14 для проведения измерения на
панели из 585 проб плазмы из клинического исследования фазы 1 лечения антителом к
p217+тау-белку. Примеры стандартных кривых были получены в 8 отдельных прогонах
полуденатурированных текучих сред проб, полученных при различных разведениях
калибровочного пептида, как указано в примере 1, и показаны на Фиг. 15б. Линейный
30 диапазон между LLOQ и ULOQ для анализа полуденатурированных проб, как
описано в примере 14, был определен как отрезок между минимальной и максимальной
точками стандартной кривой, достигающими значения $CV < 20\%$ и восстановления 80–
120% от ожидаемого, с последующей коррекцией с учетом разведения проб 1 : 6. При
таких критериях линейный диапазон модифицированного примера анализа из

примера 10 составлял от $\sim 0,24$ до 180 пг/мл. Однако для оценки прецизионности модифицированного примера анализа из примера 14 при анализе реальных проб среднее количество p217+тау-белка (в фг/мл), обнаруженного в каждой полуденатурированной пробе плазмы, было нанесено на график относительно % CV для каждой пробы (Фиг. 15в). Данные на Фиг. 15в показывают, что CV находится в диапазоне 0–141% со средним значением 14%. Более того, 82% проб, показанных на Фиг. 15в, имеют $CV < 20\%$, и 66% проб находятся в линейном диапазоне. Вертикальная пунктирная линия представляет концентрацию в полуденатурированных пробах, при которой непрецизионность, по-видимому, возрастает, и, следовательно, эта линия является определенным для проб LLOQ, равным $\sim 0,2$ пг/мл, при применении способа из примера 14.

[0221] С учетом этих данных, дополнительно предполагается, что анализы и способы настоящей заявки могут быть скомбинированы с преаналитической манипуляцией с пробами плазмы для измерения уровней p217+тау-белка в пробах плазмы, полученных от субъектов, имеющих экзогенно введенные антитела к тау-белку, для отслеживания фармакологических эффектов лечения антителами к тау-белку на уровни p217+тау-белка в плазме.

Пример 15. Реализованный на компьютере способ обнаружения и/или прогнозирования таупатии

[0222] В примере 15 описан пример реализованного на компьютере способа анализа измерений биомаркеров таупатии, присутствующих в крови, для улучшенного обнаружения и/или прогнозирования таупатии у субъекта. В частности, одно из измерений биомаркеров, применяемых в примере 15, представляет собой уровни p217+тау-белка, анализируемые в пробах сыворотки. Однако предполагается, что способ, описанный в примере 15, в равной степени применим к уровням p217+тау-белка, измеренным в плазме, таким как измерения, полученные с применением примера анализа из примера 1.

[0223] В примере 15 панель из 23 биомаркеров, присутствующих в крови, анализировали в пробах плазмы и сыворотки, полученных от 199 субъектов с БА легкой или умеренной степени тяжести, в клиническом исследовании III фазы. Двадцать три (23) биомаркера, присутствующие в крови, включали в себя p217+тау-белок, NFL, адипонектин, лептин и другие воспалительные и метаболические маркеры. Кроме того, у каждого из этих пациентов также измеряли уровни p217+тау-белка в

CSF, применяя анализ с рТ3хhТ43, описанный в примере 1 патента Kolb '492. Субъекта определяли как «Т-положительного», если количество р217+тау-пептидов, измеренное в CSF субъекта, превышало 21 пг/мл; эта концентрация соответствует стандартно применяемому пограничному значению 70 пг/мл при анализе Innostest p181-tau для определения «Т»-статуса. Затем данные, соответствующие 23 измерениям биомаркеров и измерениям р217+тау-белка в CSF, вместе с демографическими данными пациентов (например, возраст и пол) для всех 199 субъектов разделяли на два отдельных набора данных: обучающие данные (n = 150) и отложенные данные (n = 49). Обучающие данные анализировали для выбора элементов, которые имеют более высокую степень корреляции с повышенным уровнем в CSF у тех субъектов, которые были идентифицированы как «Т-положительные». Выбранные элементы включали в себя измерения в пробах, полученных из крови, для р217+тау-белка, NFL, адипонектина и лептина. Проводили обучение множества модулей машинного обучения с применением этих обучающих данных. В частности, с применением этих обучающих данных проводили обучение модуля машины опорных векторов, модуля случайных лесов, модуля логистической регрессии, модуля градиентного бустинга. Ансамбль всех этих обученных модулей машинного обучения применяли для генерирования результата.

[0224] Для оценки чувствительности и точности результатов, сгенерированных модулем ансамблевого машинного обучения, отложенные данные анализировали посредством модуля ансамблевого машинного обучения для генерирования решения о том, соответствуют ли данные каждого субъекта из отложенных данных статусу «Т-положительного» субъекта. Решения, сгенерированные модулем ансамблевого машинного обучения, затем сравнивают с фактическим статусом «Т-положительный» у субъекта в отложенных данных для оценки чувствительности и точности модуля ансамблевого машинного обучения. Модуль ансамблевого машинного обучения оценивали таким образом с применением различных подгрупп биомаркеров, как показано ниже в таблице 10.

Таблица 10

<i>Подгруппы данных</i>	<i>Элементы биомаркеров</i>
Контроль	Без биомаркера, в анализе применяют возраст и пол субъекта
1	р217+тау-белок в сыворотке
2	р217+тау-белок в сыворотке и NFL
3	р217+тау-белок в сыворотке, NFL и адипонектин

<i>Подгруппы данных</i>	<i>Элементы биомаркеров</i>
4	p217+тау-белок в сыворотке, NFL, адипонектин и лептин
5	NFL, адипонектин и лептин

[0225] Подгруппа контрольных данных включает в себя данные из отложенных данных, за исключением любых данных по биомаркерам. В частности, подгруппа контрольных данных была проанализирована модулем ансамблевого машинного обучения с применением не связанных с биомаркерами элементов — возраста и пола — каждого субъекта. Результаты анализа, сгенерированные модулем ансамблевого машинного обучения для подгруппы контрольных данных, применяли для построения ROC-кривой, демонстрирующей способность модуля ансамблевого машинного обучения различать «Т-положительный» статус субъектов в отложенных данных без какой-либо информации о биомаркерах, что показано пунктирными линиями на Фиг. 16а–16д. Величина AUC ROC-кривой для модуля ансамблевого машинного обучения, анализирующего подгруппу контрольных данных без какой-либо информации о биомаркерах, составляет 0,59.

[0226] Каждая из подгрупп данных 1–5 включает в себя подгруппу контрольных данных и данные из отложенных данных, соответствующие биомаркерам, указанным выше в таблице 10. Результаты анализа, сгенерированные модулем ансамблевого машинного обучения для каждой из подгрупп данных 1–5, приведены ниже в таблицах 5–9. В таблицах 5–9 субъекты, имеющие измерения p217+тау-белка в CSF выше 21 пг/мл, перечислены как «Наблюдаемые+», а те, у кого эти измерения ниже, перечислены как «Наблюдаемые-». В таблицах 5–9 субъекты, идентифицированные модулем ансамблевого машинного обучения как соответствующие статусу «Т-положительный», перечислены как «Прогнозируемые+», а те, кто не идентифицирован как соответствующие статусу «Т-положительный», перечислены как «Прогнозируемые-».

[0227] Результаты анализа подгруппы данных 1, в которой в качестве элемента применяются измерения p217+тау-белка в сыворотке, приведены в таблице 11. Данные из таблицы 11 применяли для построения ROC-кривой, демонстрирующей способность модуля ансамблевого машинного обучения различать «Т-положительный» статус субъектов в отложенных данных по измерениям p217+тау-белка в сыворотке, что показано сплошной линией на Фиг. 16а. Величина AUC ROC-кривой равна 0,87.

Таблица 11

	<i>Прогнозируемые+</i>	<i>Прогнозируемые-</i>
<i>Наблюдаемые+</i>	9	9
<i>Наблюдаемые-</i>	0	31

[0228] Результаты анализа подгруппы данных 2, в которой в качестве элементов применяются измерения p217+тау-белка в сыворотке и данные по NFL, приведены в таблице 12. Данные из таблицы 12 применяли для построения ROC-кривой, демонстрирующей способность модуля ансамблевого машинного обучения различать «Т-положительный» статус субъектов в отложенных данных по измерениям p217+тау-белка в сыворотке и данным по NFL, что показано сплошной линией на Фиг. 16б. Величина AUC ROC-кривой равна 0,89.

10

Таблица 12

	<i>Прогнозируемые+</i>	<i>Прогнозируемые-</i>
<i>Наблюдаемые+</i>	14	4
<i>Наблюдаемые-</i>	1	30

[0229] Результаты анализа подгруппы данных 3, в которой в качестве элементов применяются измерения p217+тау-белка в сыворотке и данные по NFL и адипонектину, приведены в таблице 13. Данные из таблицы 13 применяли для построения ROC-кривой, демонстрирующей способность модуля ансамблевого машинного обучения различать «Т-положительный» статус субъектов в отложенных данных по измерениям p217+тау-белка в сыворотке и данным по NFL и адипонектину, что показано сплошной линией на Фиг. 16в. Величина AUC ROC-кривой равна 0,92.

15

Таблица 13

	<i>Прогнозируемые+</i>	<i>Прогнозируемые-</i>
<i>Наблюдаемые+</i>	11	7
<i>Наблюдаемые-</i>	0	31

20

[0230] Результаты анализа подгруппы данных 4, в которой в качестве элементов применяются измерения p217+тау-белка в сыворотке и данные по NFL, адипонектину и лептину, приведены в таблице 14. Данные из таблицы 14 применяли для построения ROC-кривой, демонстрирующей способность модуля ансамблевого машинного

обучения различать «Т-положительный» статус субъектов в отложенных данных по измерениям p217+тау-белка в сыворотке и данным по NFL, адипонектину и лептину, что показано сплошной линией на Фиг. 16г. Величина AUC ROC-кривой равна 0,96.

Таблица 14

	<i>Прогнозируемые+</i>	<i>Прогнозируемые-</i>
<i>Наблюдаемые+</i>	11	7
<i>Наблюдаемые-</i>	1	30

5

[0231] Результаты анализа подгруппы данных 5, в которой в качестве элементов применяются данные по NFL, адипонектину и лептину, приведены в таблице 15. Данные из таблицы 15 применяли для построения ROC-кривой, демонстрирующей способность модуля ансамблевого машинного обучения различать «Т-положительный» статус субъектов в отложенных данных по данным по NFL, адипонектину и лептину, но не по измерениям p217+тау-белка в сыворотке, что показано сплошной линией на Фиг. 16д. Величина AUC ROC-кривой равна 0,78.

10

Таблица 15

	<i>Прогнозируемые+</i>	<i>Прогнозируемые-</i>
<i>Наблюдаемые+</i>	8	10
<i>Наблюдаемые-</i>	4	27

15

[0232] Набор элементов биомаркеров, применяемый в примере 15, состоял из p217+тау-белка в сыворотке, NFL, адипонектина и лептина, каждый из которых демонстрирует корреляцию с уровнями p127+тау-белка в CSF с коэффициентом корреляции Спирмена 0,47, 0,37, 0,16, -0,23 соответственно. Анализ с машинным обучением, в котором в качестве элементов применяются p217+тау-белка в сыворотке, возраст и пол, позволил улучшить результативность, демонстрируя величину AUC 0,87, по сравнению с 0,59 в подгруппе контрольных данных. Повышение сложности анализа с машинным обучением посредством последовательного добавления в качестве элементов NFL, адипонектина и лептина с каждым шагом повышало результативность, демонстрируя величины AUC 0,89, 0,92 и 0,96 соответственно. Когда анализ с машинным обучением включал в себя в качестве элементов все 4 биомаркера (измерения p217+тау-белка в сыворотке и данные по NFL, адипонектину и лептину), точность равнялась 0,84, что значительно превышает частоту при отсутствии

20

25

информации (NIR) ($p < 0,005$). При исключении измерений p217+тау-белка в сыворотке, выступающих в качестве элемента, величина AUC снижалась до 0,78; таким образом, это свидетельствует о том, что измерения p217+тау-белка являются значимым биомаркером для прогнозирования «Т-положительного» статуса.

5 [0233] При применении всех 4 биомаркеров точность составляла 0,84, что значительно превышает частоту при отсутствии информации ($p < 0,005$). Исключение тау в сыворотке из полной модели снижало величину AUC до 0,78.

10 [0234] Таким образом, биомаркеры, присутствующие в крови, можно применять для выявления тау-положительных субъектов. p217+тау-белка в сыворотке был лучшим единственным анализом для прогнозирования таупатии или патологии головного мозга вследствие таупатии (например, количество p217+тау-белка, обнаруженное в CSF) у субъектов с БА легкой или умеренной степени тяжести.

15 [0235] Изобретение, описанное и заявленное в настоящем документе, не должно ограничиваться конкретными вариантами осуществления, описанными в настоящем документе, поскольку эти варианты осуществления предназначены для иллюстрации нескольких аспектов настоящего изобретения. Предполагается, что любые эквивалентные варианты осуществления входят в объем данного изобретения. Действительно специалистам в данной области из предшествующего описания будут очевидны различные модификации изобретения помимо показанных и описанных
20 модификаций в настоящем документе. Предполагается, что такие модификации также включены в объем прилагаемой формулы изобретения. Все процитированные в настоящем документе публикации полностью включены в настоящий документ путем ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Аналитический способ обнаружения p217+тау-пептидов у субъекта, при этом способ включает в себя этапы, на которых:
 - 5 получают пробу плазмы от субъекта;
 - приводят пробу плазмы в контакт с захватным антителом, направленным на p217+тау-эпитоп, для связывания захватного антитела с p217+тау-пептидами в пробе плазмы с образованием комплексов антитело-пептид;
 - 10 промывают комплексы антитело-пептид;
 - приводят комплексы антитело-пептид в контакт с детекторным антителом для связывания детекторного антитела с комплексами антитело-пептид; и
 - обнаруживают детекторное антитело для определения количества p217+тау-пептидов в пробе плазмы.
- 15 2. Способ по п. 1, в котором захватное антитело иммобилизовано на твердой фазе.
3. Способ по п. 2, в котором твердая фаза представляет собой магнитную гранулу.
4. Способ по п. 1, в котором захватное антитело связывается с эпитопом,
 - 20 содержащим аминокислоты 210–220 человеческого тау-белка.
5. Способ по п. 1, в котором детекторное антитело связывается с эпитопом, содержащим аминокислоты 7–20 или 116–127 человеческого тау-белка.
- 25 6. Способ по п. 4, в котором захватное антитело представляет собой pT3.
7. Способ по п. 5, в котором детекторное антитело представляет собой pT82.
8. Способ по п. 3, в котором пробу плазмы разводят разбавителем проб перед
 - 30 приведением в контакт с захватным антителом, причем разбавитель проб содержит по меньшей мере одно из неионного поверхностно-активного вещества и трис(гидроксиметил)аминометана.

9. Способ обнаружения таупатии у субъекта, при этом способ включает в себя этапы, на которых:
- получают пробу плазмы от субъекта;
 - обнаруживают некоторое количество p217+тау-пептидов в пробе плазмы
- 5 аналитическим способом, причем при анализе применяют захватное антитело, направленное на p217+тау-эпитоп, для связывания захватного антитела с p217+тау-пептидами в пробе плазмы с образованием комплексов антитело-пептид и детекторное антитело для связывания детекторного антитела с комплексами антитело-пептид; и
- 10 определяют наличие у субъекта таупатии или подверженность субъекта риску развития таупатии, когда количество p217+тау-пептидов выше заданного порогового значения, причем заданное пороговое значение превышает нижний предел количественного определения (LLOQ) анализа.
10. Способ по п. 9, в котором при анализе не концентрируют p217+тау-пептиды из
- 15 пробы плазмы посредством иммунопреципитации перед измерением количества присутствующих p217+тау-пептидов.
11. Способ по п. 9, в котором проба плазмы представляет собой неочищенную
- 20 плазму.
12. Способ по п. 9, в котором LLOQ соответствует коэффициенту вариации (CV) анализа 15–25%.
13. Способ по п. 12, в котором LLOQ соответствует CV анализа 20%.
- 25
14. Способ по п. 9, в котором заданное пороговое значение в по меньшей мере 3 раза превышает LLOQ.
15. Способ по п. 9, в котором заданное пороговое значение в по меньшей мере
- 30 10 раз превышает нижний предел обнаружения анализа.
16. Способ по п. 9, в котором таупатию выбирают из группы, состоящей из наследственной болезни Альцгеймера, спорадической болезни Альцгеймера, лобно-височной деменции с паркинсонизмом, связанной с хромосомой 17 (FTDP-17),

прогрессирующего надъядерного паралича, 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, церебральной амилоидной ангиопатии с прионными белками, подострого склерозирующего панэнцефалита, миотонической дистрофии, негуамской болезни двигательных нейронов с нейрофибриллярными клубками, постэнцефалитного паркинсонизма, хронической травматической энцефалопатии и *dementia pugilistica* (деменции боксеров).

17. Способ по п. 16, в котором таупатия представляет собой болезнь Альцгеймера.
18. Способ по п. 16, в котором таупатия представляет собой прогрессирующий надъядерный паралич.
19. Способ обнаружения амилоидогенного заболевания у субъекта, при этом способ включает в себя этапы, на которых:
- получают пробу плазмы от субъекта;
 - обнаруживают некоторое количество p217+тау-пептидов в пробе плазмы аналитическим способом, причем при анализе применяют захватное антитело, направленное на p217+тау-эпитоп, для связывания захватного антитела с p217+тау-пептидами в пробе плазмы с образованием комплексов антитело-пептид и детекторное антитело для связывания детекторного антитела с комплексами антитело-пептид; и
 - определяют наличие у субъекта амилоидогенного заболевания или подверженность субъекта риску развития амилоидогенного заболевания, когда количество p217+тау-пептидов выше заданного порогового значения, причем заданное пороговое значение превышает нижний предел количественного определения (LLOQ) анализа.

20. Способ по п. 19, в котором при анализе не концентрируют p217+тау-пептиды из пробы плазмы посредством иммунопреципитации перед измерением количества присутствующих p217+тау-пептидов.
- 5 21. Способ по п. 19, в котором проба плазмы представляет собой неочищенную плазму.
22. Способ по п. 19, в котором LLOQ соответствует коэффициенту вариации (CV) анализа 15–25%.
- 10 23. Способ по п. 22, в котором LLOQ соответствует CV анализа 20%.
24. Способ по п. 19, в котором заданное пороговое значение в по меньшей мере 3 раза превышает LLOQ.
- 15 25. Способ по п. 19, в котором заданное пороговое значение в по меньшей мере 10 раз превосходит нижний предел количественного определения анализа.
- 20 26. Способ по п. 19, в котором амилоидогенное заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера.
27. Способ обнаружения или прогнозирования таупатии у субъекта, при этом способ включает в себя этапы, на которых:
- 25 обнаруживают некоторое количество p217+тау-пептидов в пробе плазмы посредством приведения пробы плазмы в контакт с захватным антителом, направленным на p217+тау-эпитоп, для связывания захватного антитела с p217+тау-пептидами в пробе плазмы с образованием комплексов антитело-пептид и отдельно приведения комплексов антитело-пептид в контакт с детекторным антителом для связывания детекторного антитела с комплексами антитело-пептид;
- 30 генерируют данные по тау-белку, соответствующие количеству обнаруженных p217+тау-пептидов;
- получают данные по биомаркерам, соответствующие по меньшей мере одному биомаркеру, определенному у субъекта, причем биомаркер выбран из группы, содержащей легкую цепь нейрофиламентов (NFL), адипонектин и лептин; и

сравнивают данные по тау-белку и дополнительные данные по биомаркерам с набором эталонных данных с применением модуля машинного обучения для определения или прогнозирования наличия у субъекта таупатии или подверженности субъекта риску развития таупатии.

5

28. Способ по п. 27, в котором модуль машинного обучения содержит по меньшей мере одно из модуля машины опорных векторов, модуля случайных лесов, модуля логистической регрессии и модуля градиентного бустинга.

10

29. Способ по п. 27, в котором таупатию выбирают из группы, состоящей из наследственной болезни Альцгеймера, спорадической болезни Альцгеймера, лобно-височной деменции с паркинсонизмом, связанной с хромосомой 17 (FTDP-17), прогрессирующего надъядерного паралича, кортикобазальной дегенерации, болезни Пика, прогрессирующего субкортикального глиоза, деменции с преобладанием

15

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, церебральной амилоидной ангиопатии с прионными белками, подострого склерозирующего панэнцефалита, миотонической дистрофии, негуамской болезни двигательных нейронов с нейрофибриллярными клубками, постэнцефалитного паркинсонизма, хронической травматической энцефалопатии и dementia pugilistica (деменции боксеров).

25

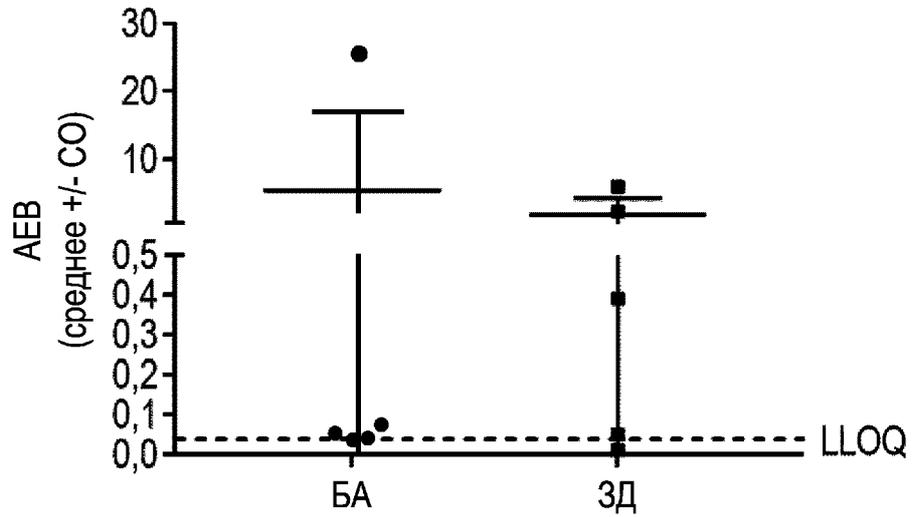
30. Способ по п. 27, в котором таупатия представляет собой болезнь Альцгеймера.

31. Способ по п. 27, в котором таупатия представляет собой прогрессирующий надъядерный паралич.

30

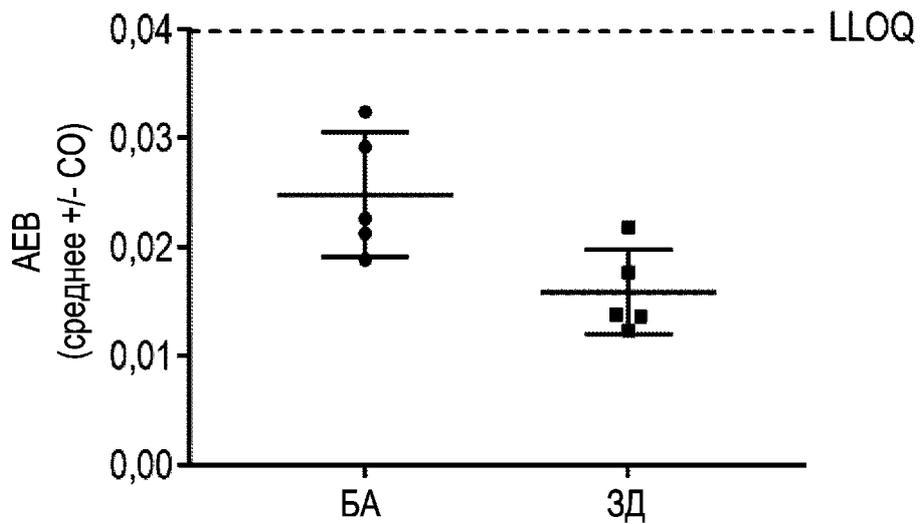
ФИГ. 1А

рТ3хрТ82_неочищ.
разведение 1 : 4_AEB



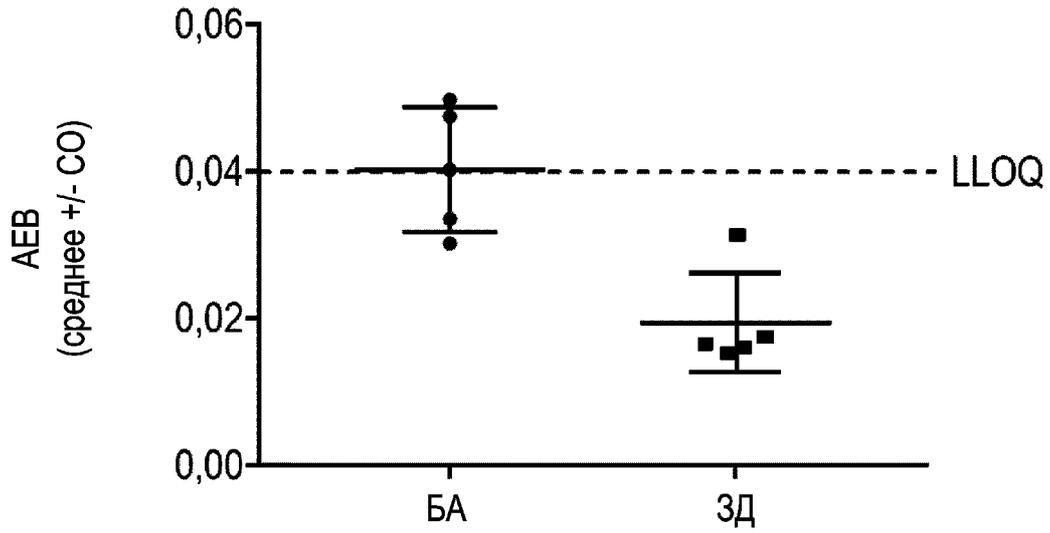
ФИГ. 1Б

рТ3хрТ82_неочищ.
разведение 1 : 16_AEB



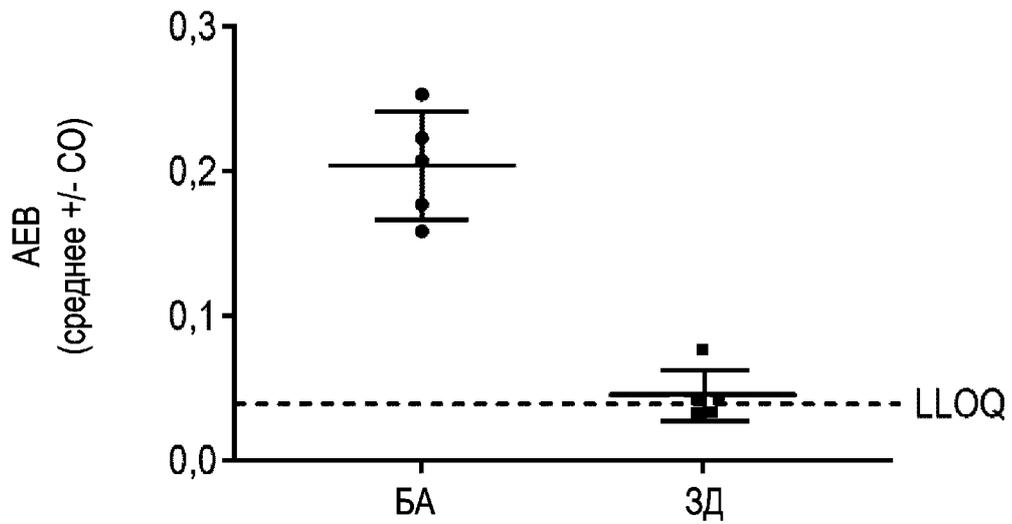
ФИГ. 1В

рТ3хрТ82_кипяч.
разведение 1 : 16_АЕВ



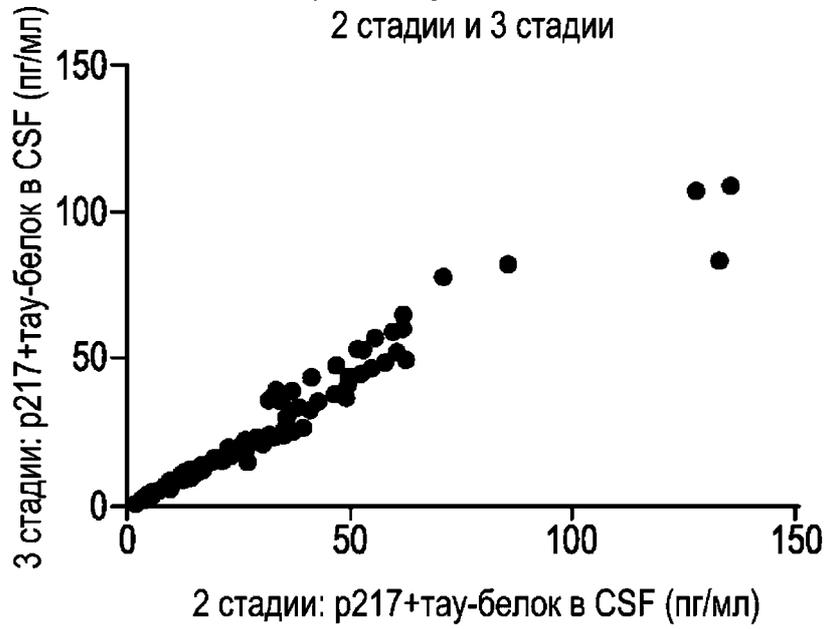
ФИГ. 1Г

рТ3 IP
Затем рТ3хрТ82 Simoa при разведении 1 : 4



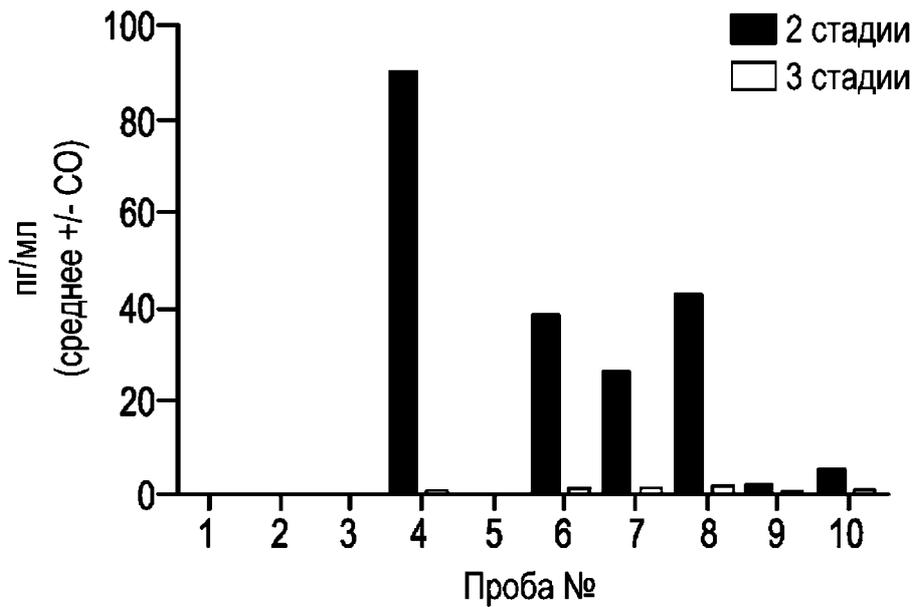
ФИГ. 2А

р217+тау-белок в CSF
2 стадии и 3 стадии



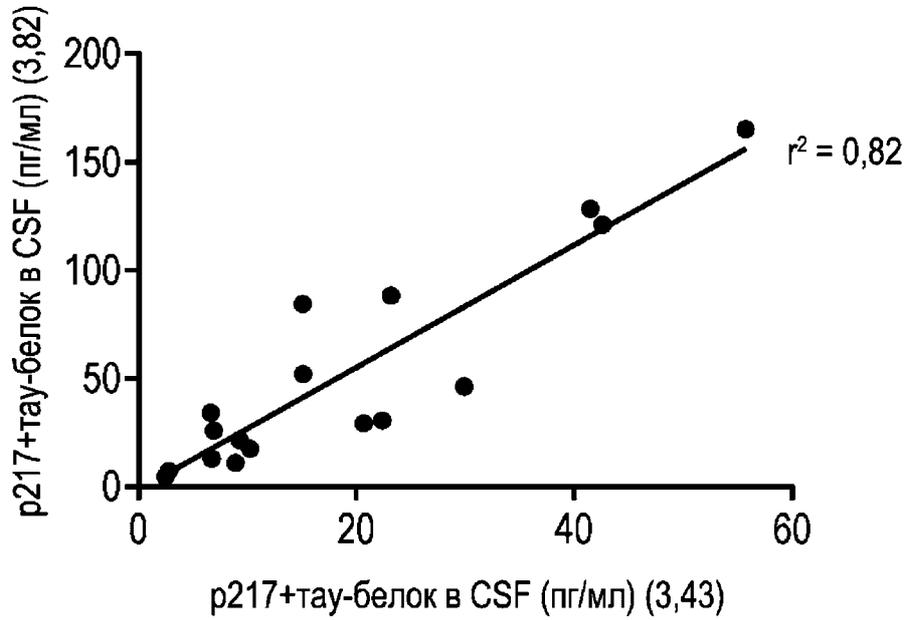
ФИГ. 2Б

р217+тау-белок в сыворотке
2 стадии и 3 стадии



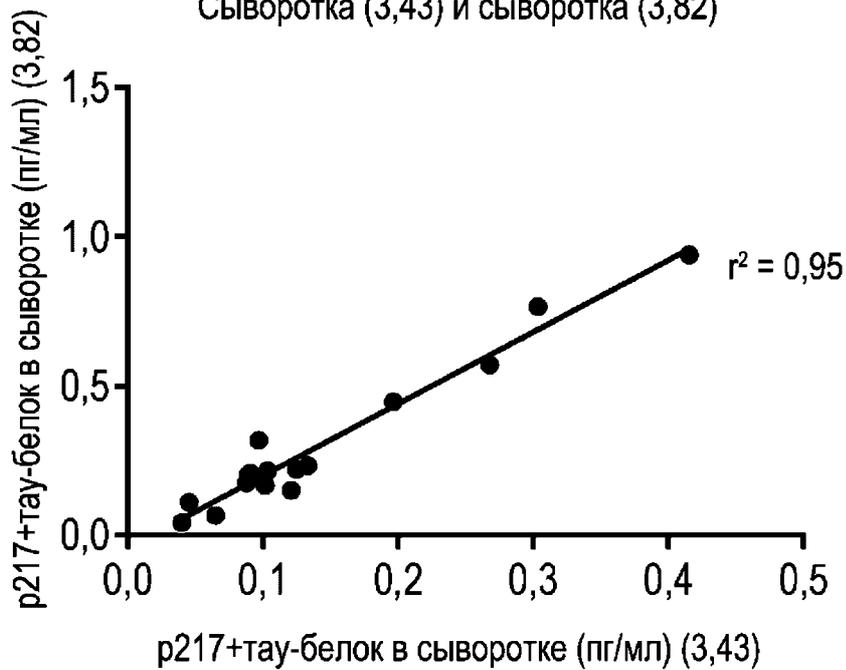
ФИГ. 3А

Неочищенный, 3 стадии
CSF (3,43) и CSF (3,82)



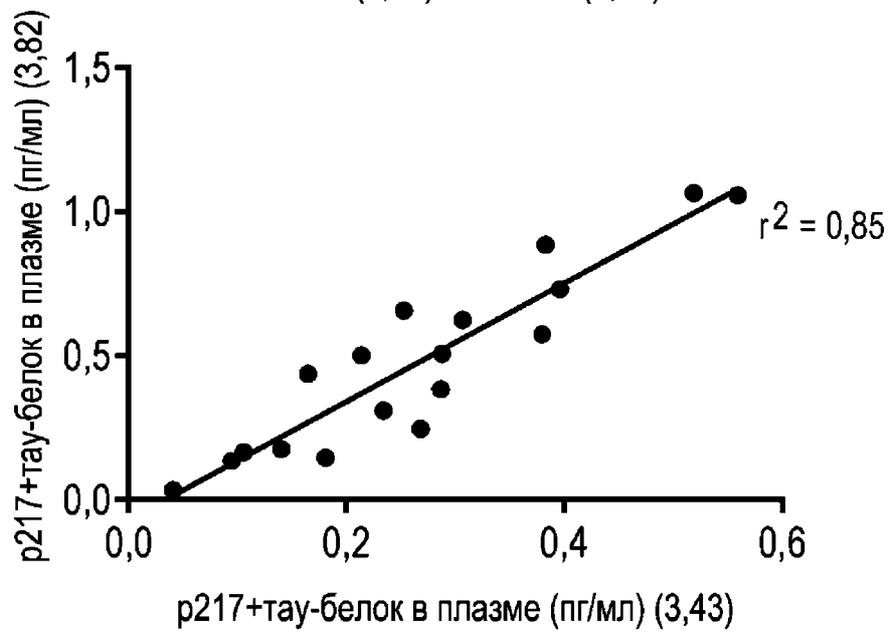
ФИГ. 3Б

Неочищенный, 3 стадии
Сыворотка (3,43) и сыворотка (3,82)



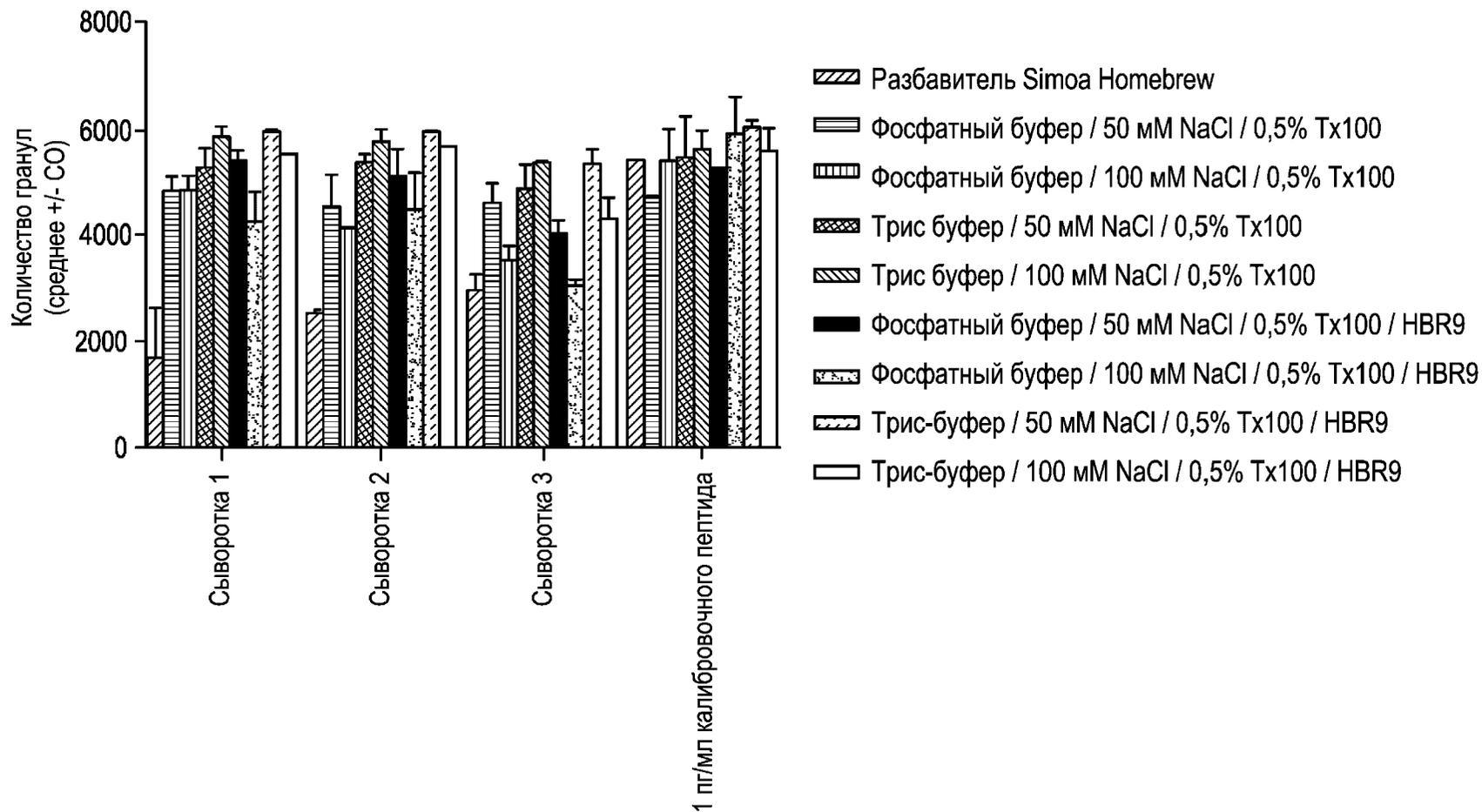
ФИГ. 3В

Неочищенный, 3 стадии
Плазма (3,43) и плазма (3,82)

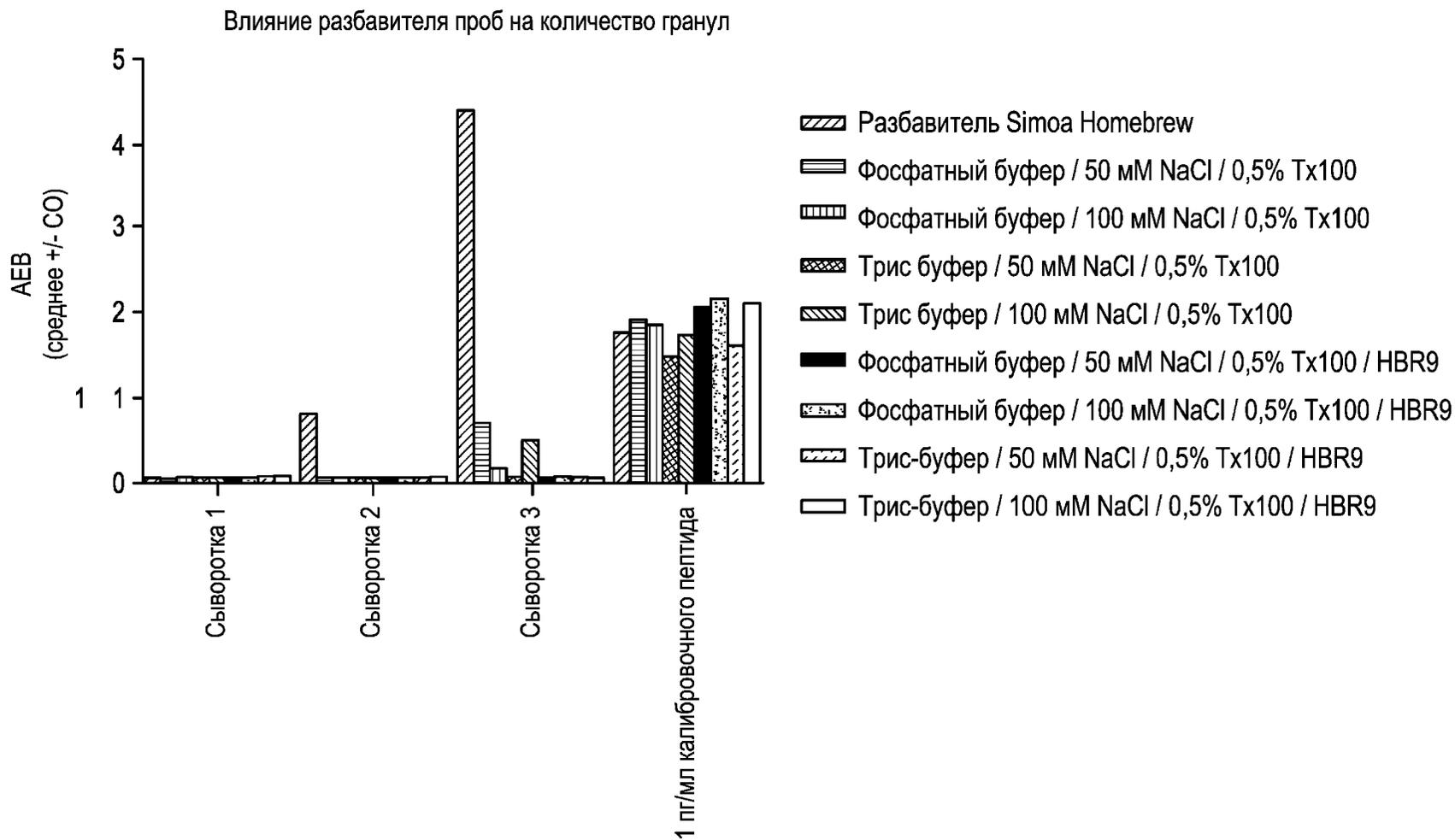


ФИГ. 4А

Влияние разбавителя проб на количество гранул

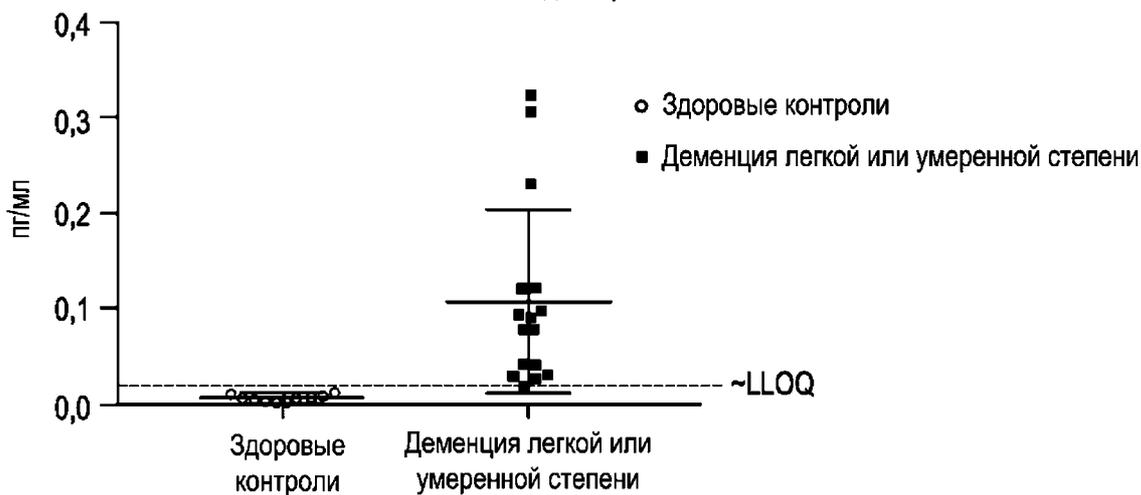


ФИГ. 4Б



ФИГ. 5А

p217+тау-белок в сыворотке
Измененный анализ: 02 декабря 2019 г.



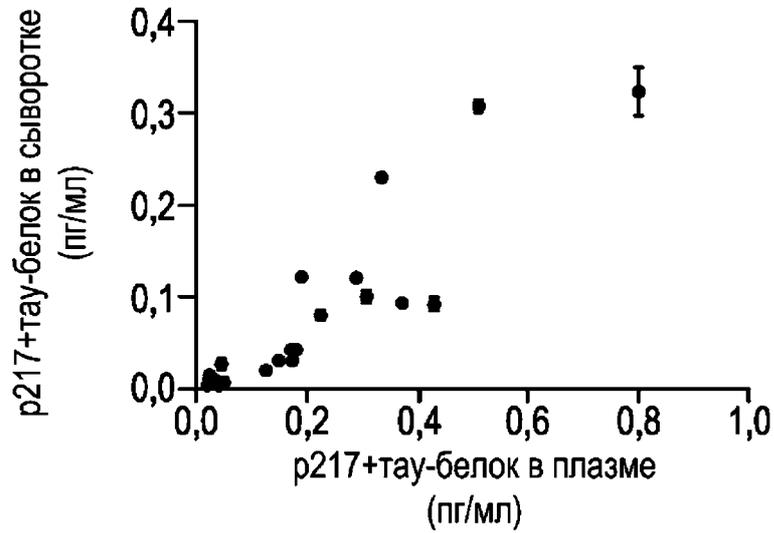
ФИГ. 5Б

p219+тау-белок в плазме
Измененный анализ: 02 декабря 2019 г.



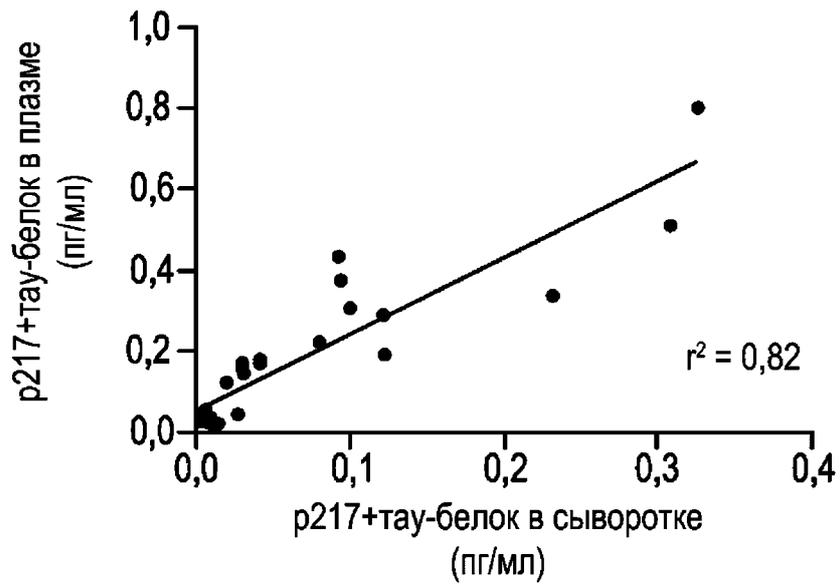
ФИГ. 5В

Плазма и сыворотка



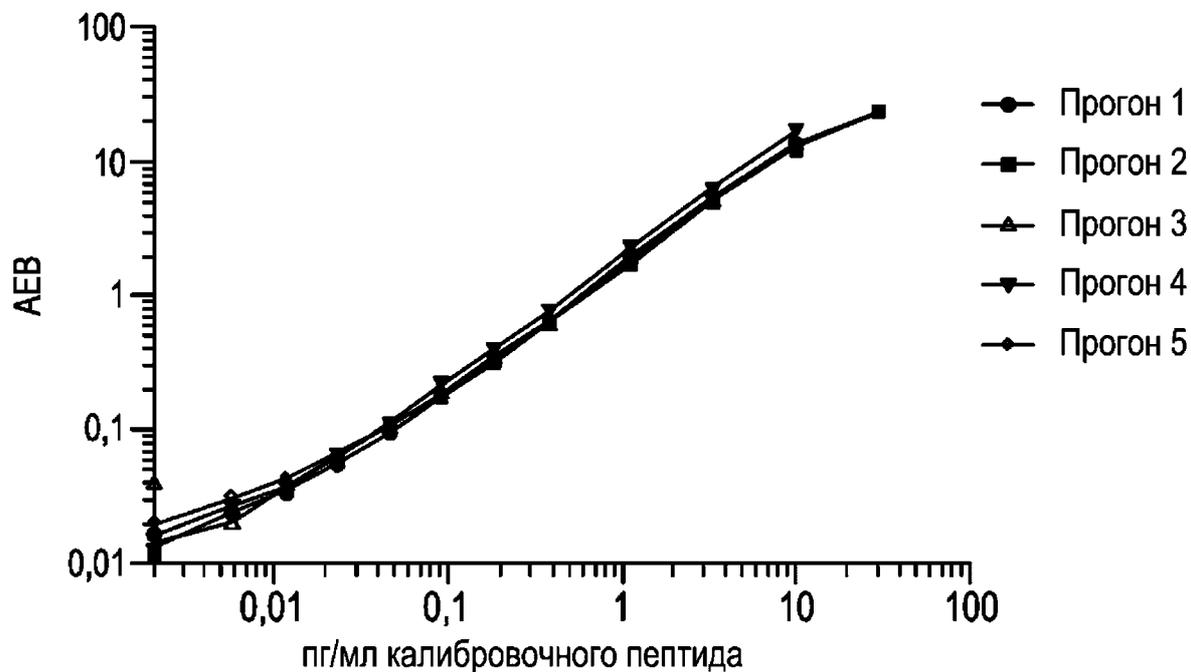
ФИГ. 5Г

Плазма и сыворотка



ФИГ. 6А

Калибровочные кривые

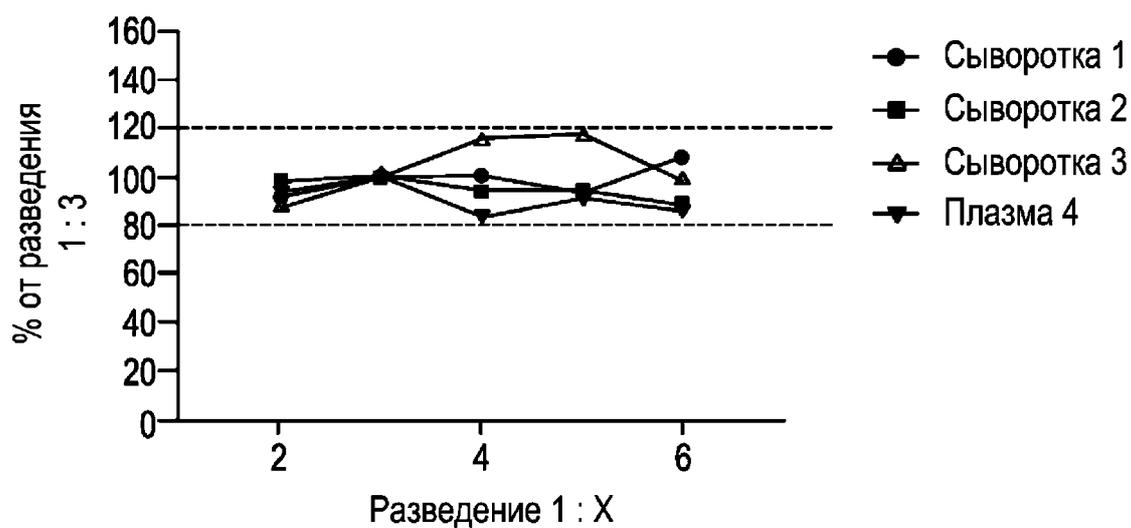


ФИГ. 6Б

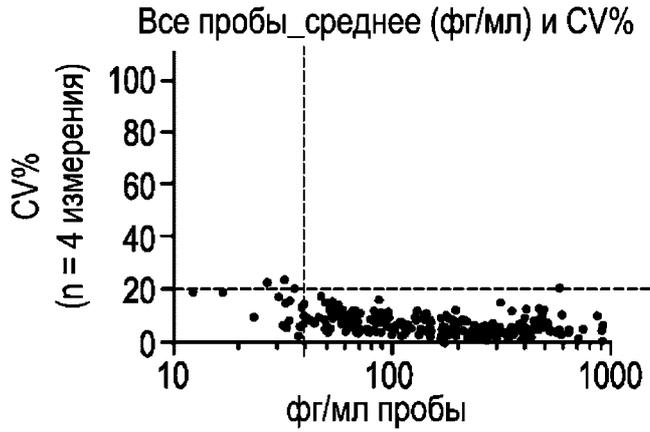
Линейность при разведении

Прогон № 3

Неочищенная сыворотка

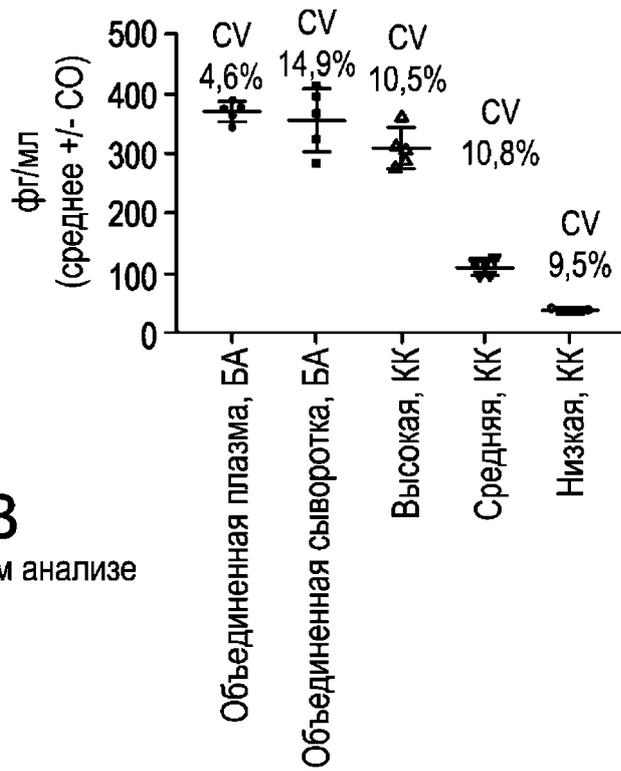


ФИГ. 7А



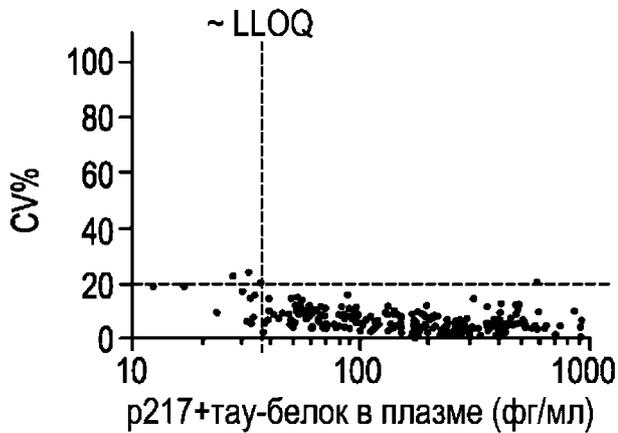
ФИГ. 7Б

Прецизионность в разных анализах

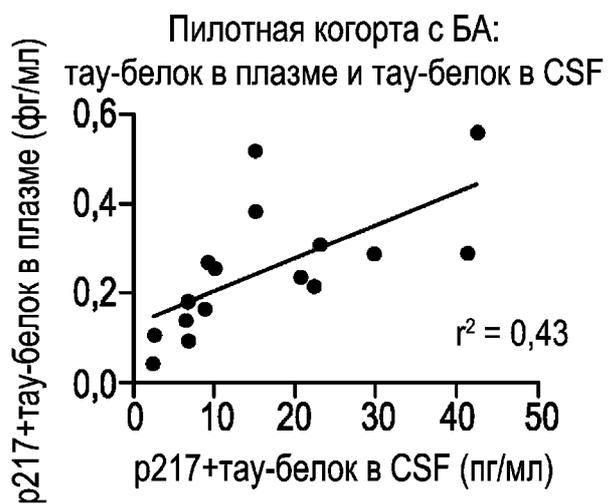


ФИГ. 7В

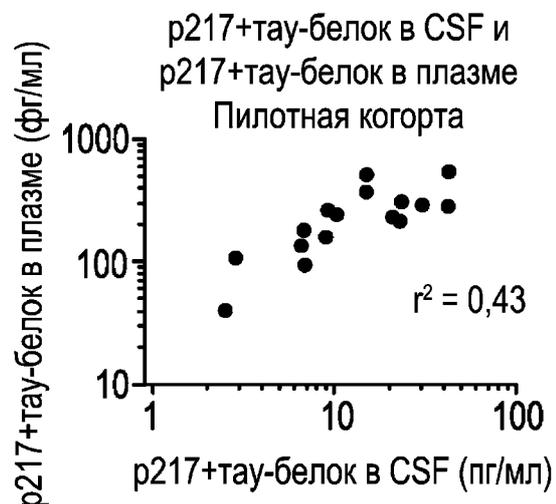
Прецизионность в одном анализе



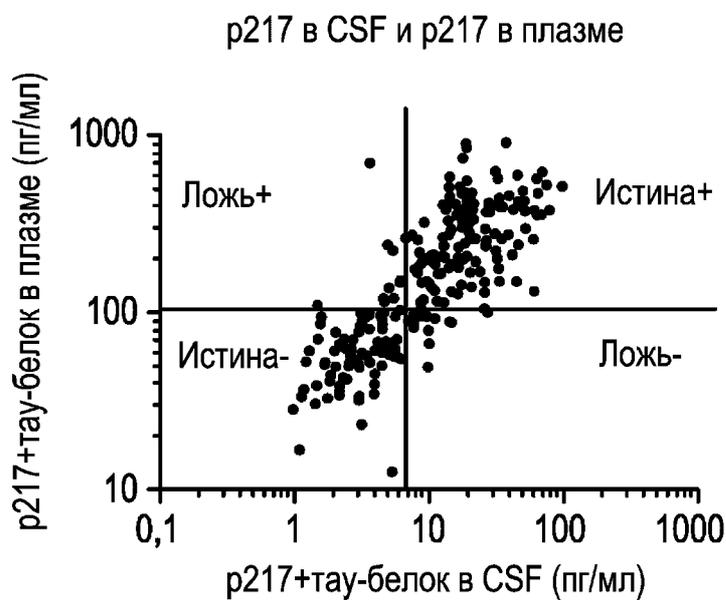
ФИГ. 8А



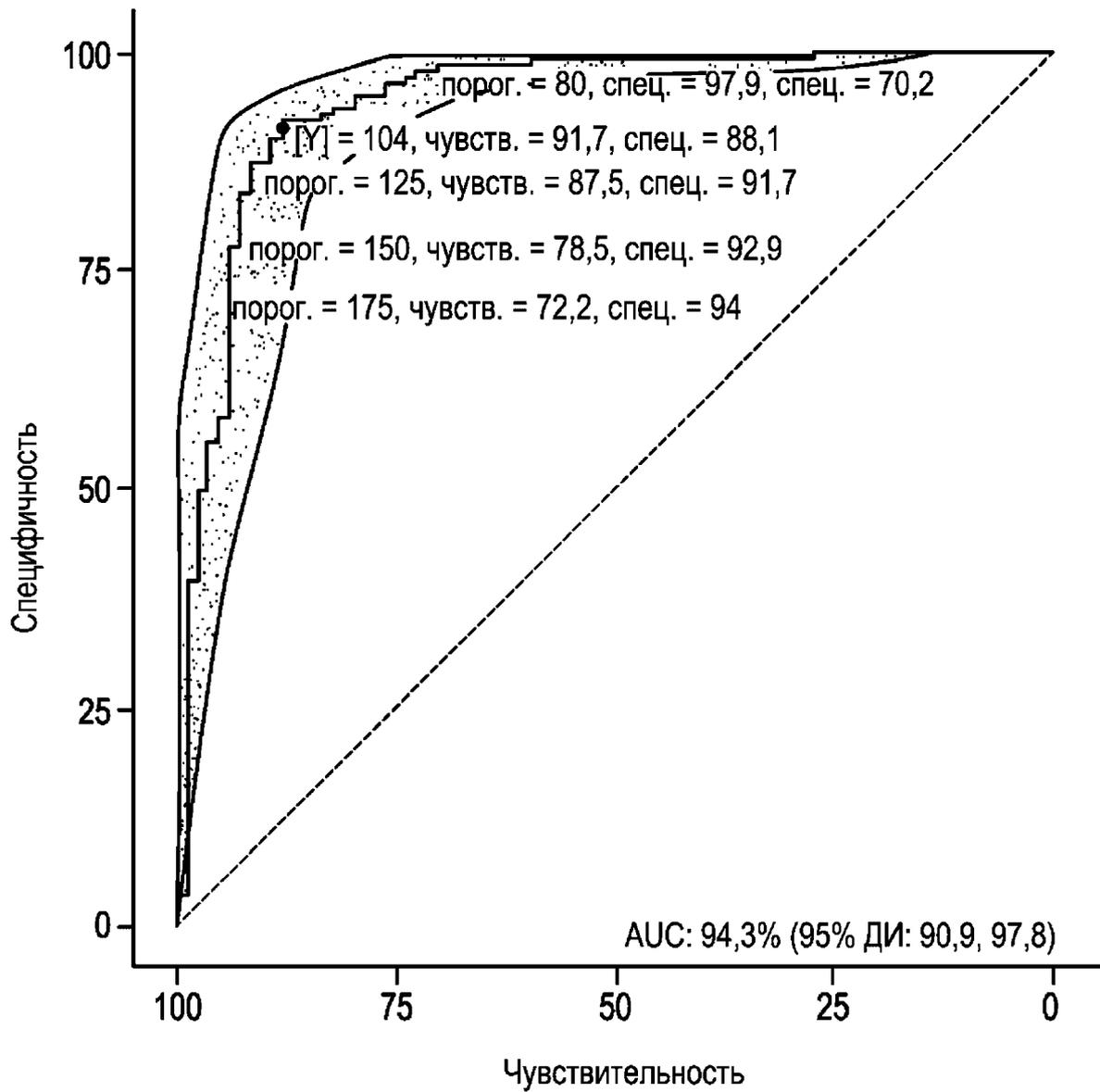
ФИГ. 8Б



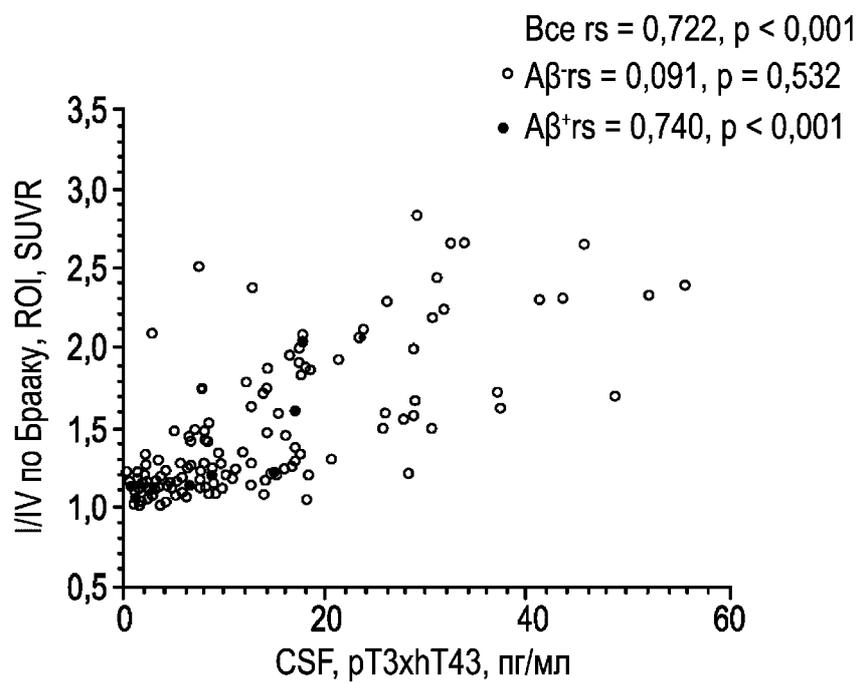
ФИГ. 9А



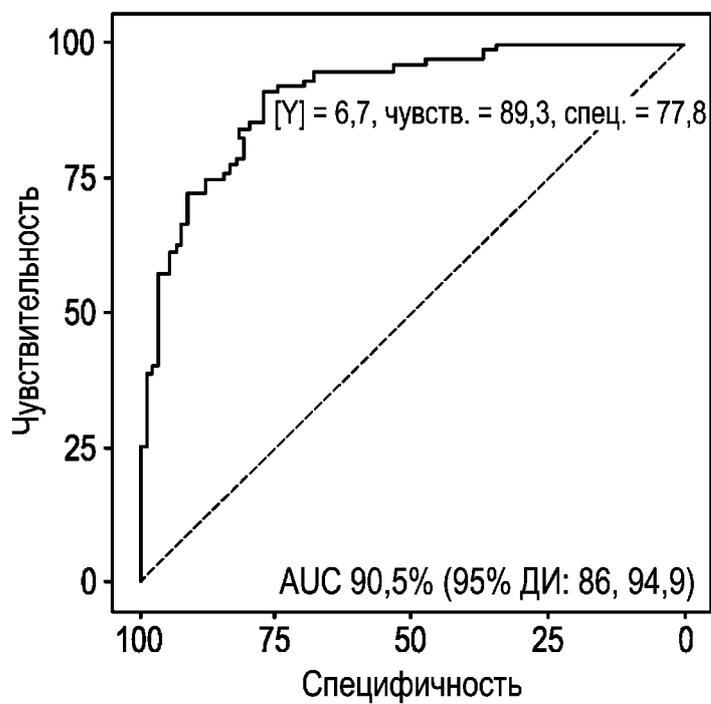
ФИГ. 9Б



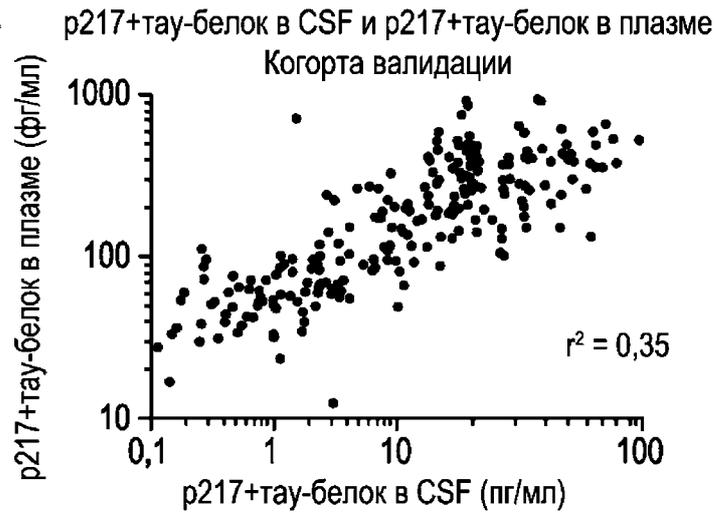
ФИГ. 10А



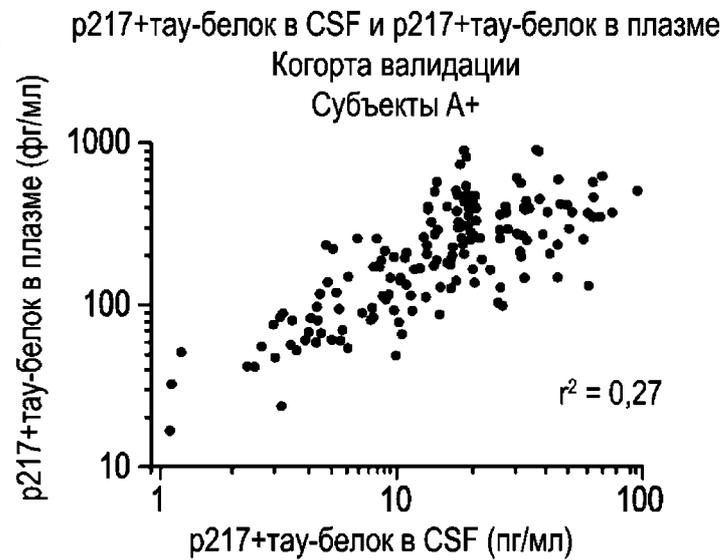
ФИГ. 10Б



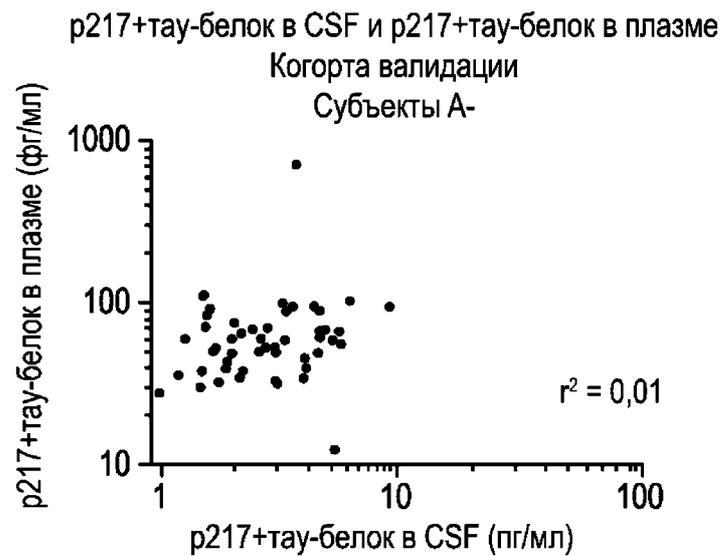
ФИГ. 11А



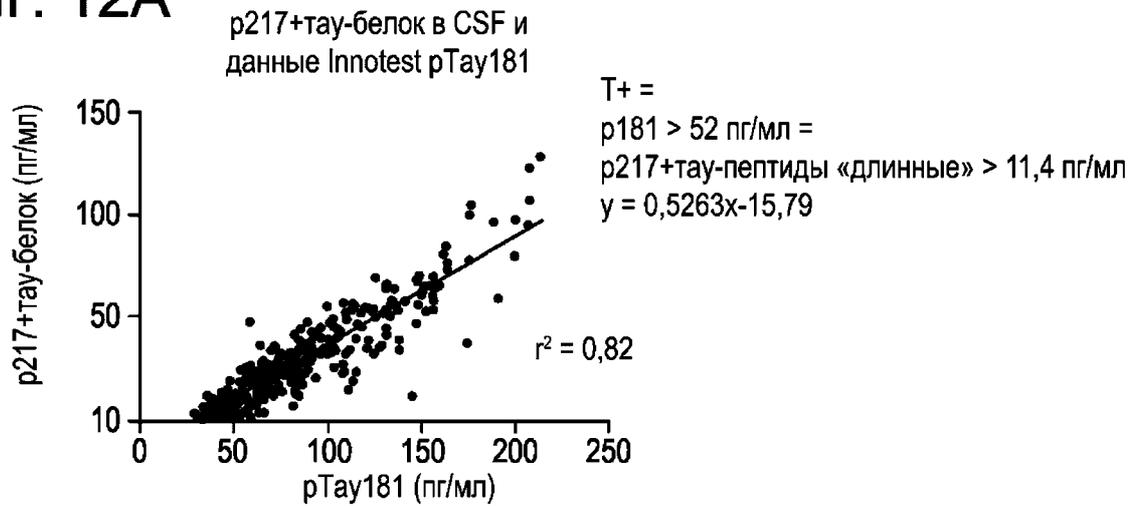
ФИГ. 11Б



ФИГ. 11В

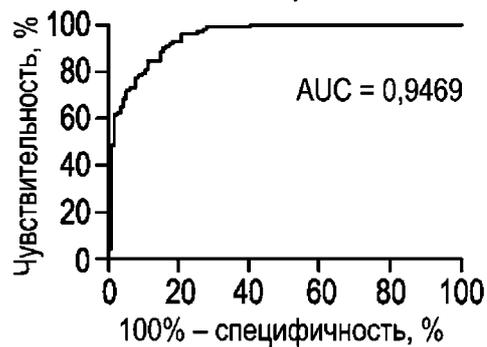


ФИГ. 12А



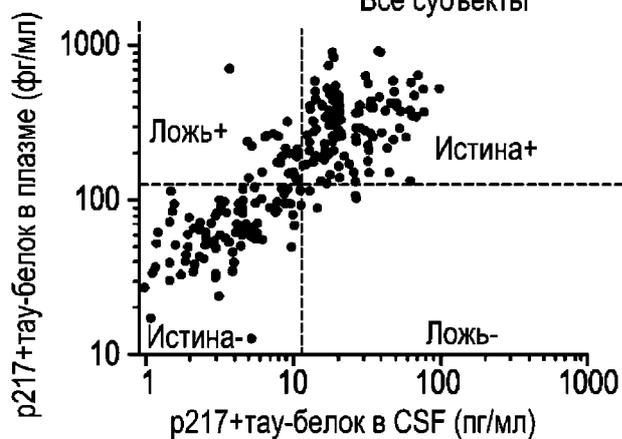
ФИГ. 12Б

ROC-кривая: р217+тау-белок в плазме,
 диагностическая сила для прогнозирования
 тау-положительности в CSF
 Все субъекты



ФИГ. 12В

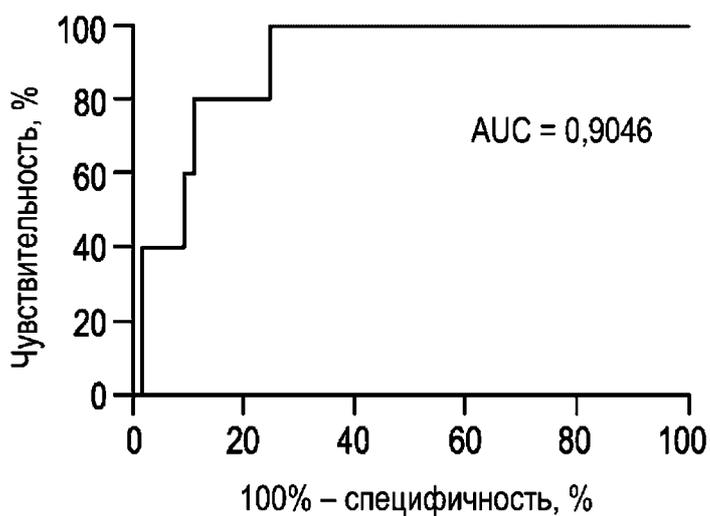
р217+тау-белок в CSF и р217+тау-белок в плазме
 Все субъекты



ФИГ. 12Г

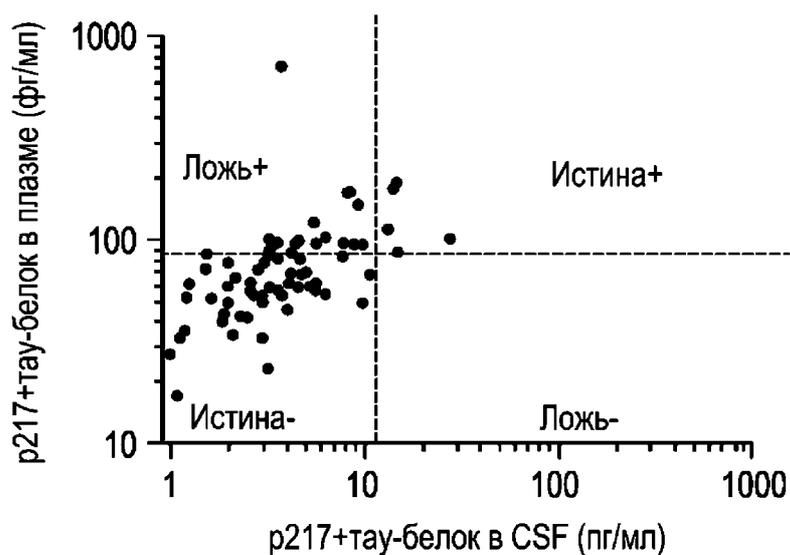
ROC-кривая:

p217+тау-белок в плазме, диагностическая сила
для прогнозирования тау-положительности в CSF
Субъекты с нормальными когнитивными функциями



ФИГ. 12Д

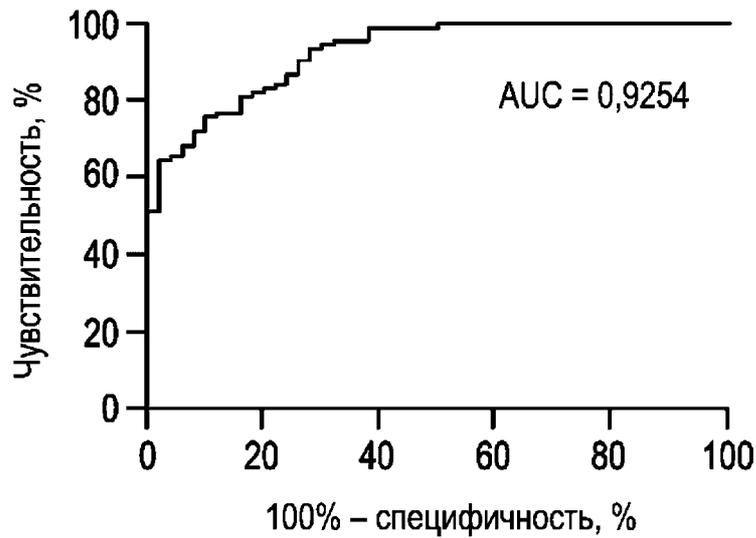
p217+тау-белок в CSF и p217+тау-белок в плазме
Субъекты с нормальными когнитивными функциями



ФИГ. 12Е

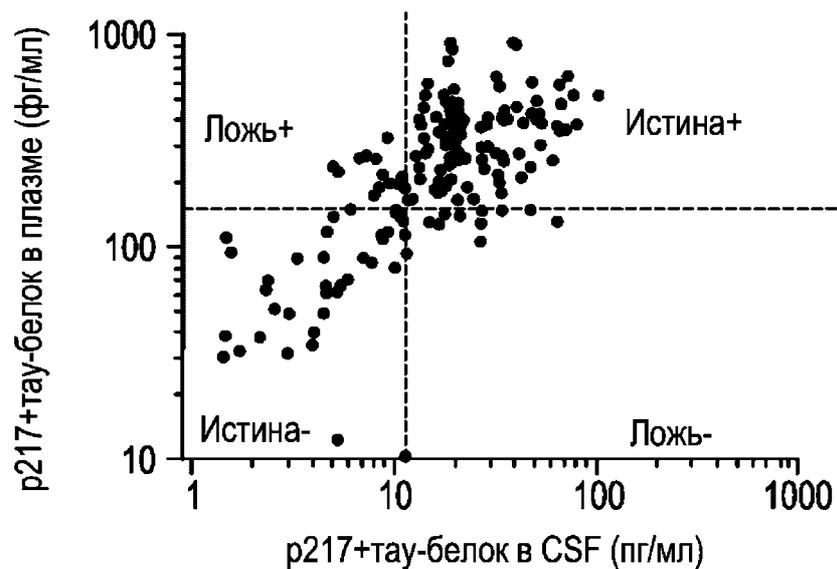
ROC-кривая:

p217+тау-белок в плазме, диагностическая сила
для прогнозирования тау-положительности в CSF
Субъекты с деменцией легкой или умеренной степени



ФИГ. 12Ж

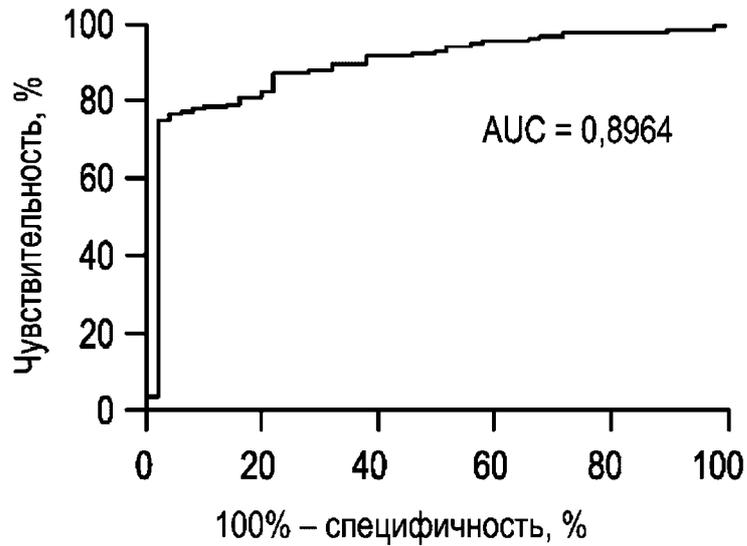
p217+тау-белок в CSF и p217+тау-белок в плазме
Субъекты с деменцией легкой или умеренной степени



ФИГ. 13А

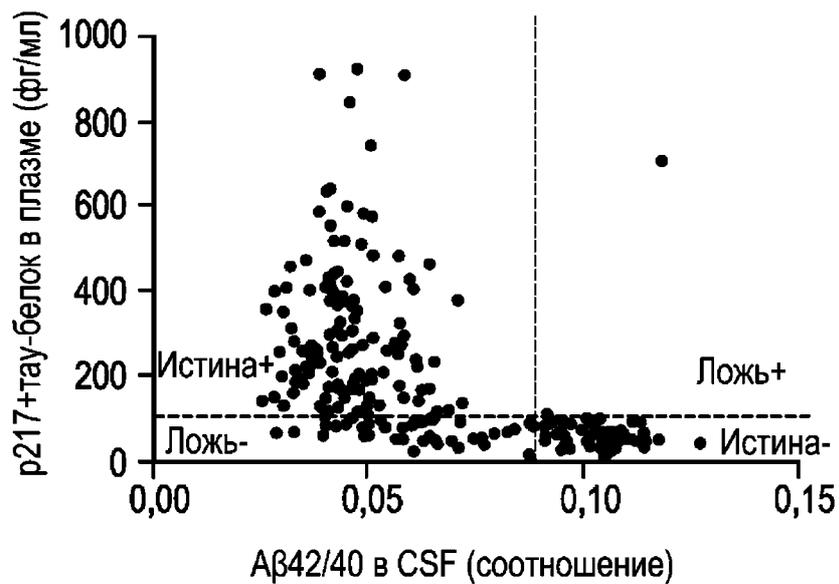
ROC-кривая:

p217+тау-белок в плазме, диагностическая сила для
прогнозирования положительности по амилоиду в CSF
Все субъекты



ФИГ. 13Б

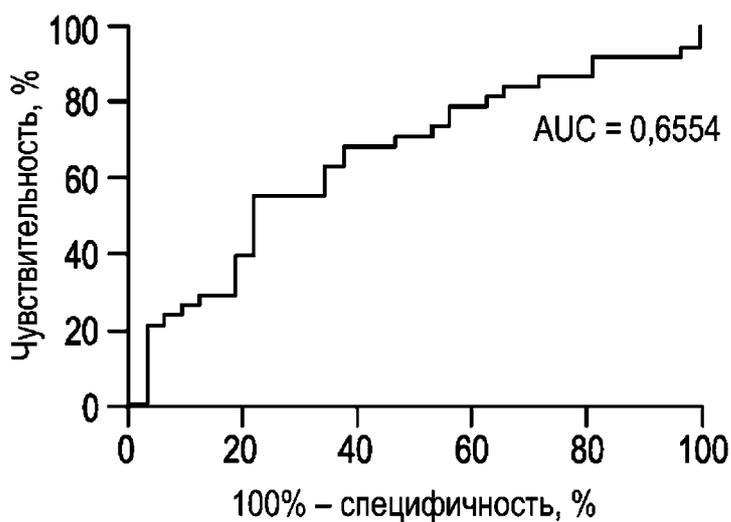
Соотношение A β 42/40 в CSF и p217+тау-белок в плазме
Все субъекты



ФИГ. 13В

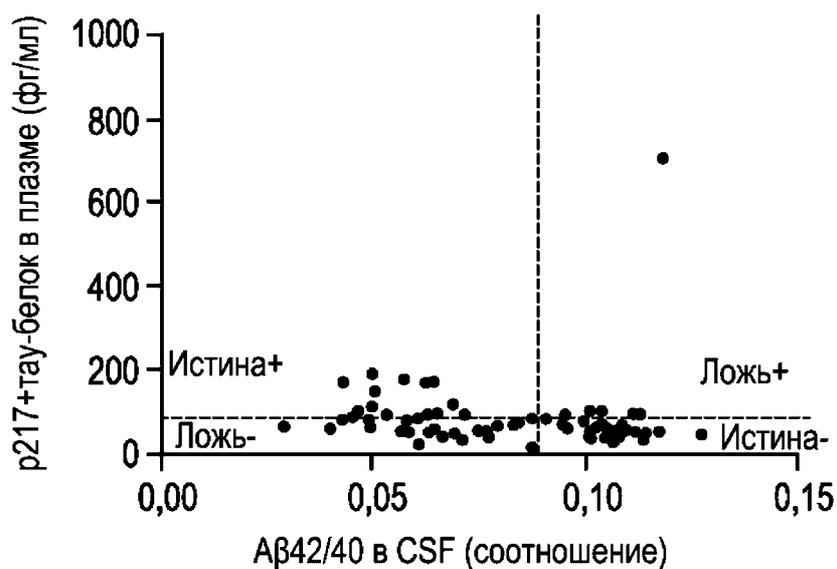
ROC-кривая:

p217+тау-белок в плазме, диагностическая сила для прогнозирования положительности по амилоиду в CSF
Субъекты с нормальными когнитивными функциями



ФИГ. 13Г

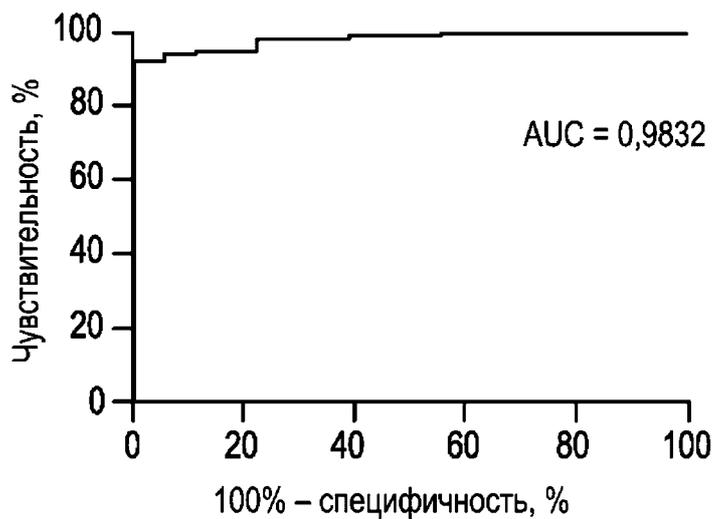
Соотношение A β 42/40 в CSF и p217 в плазме
Субъекты с нормальными когнитивными функциями



ФИГ. 13Д

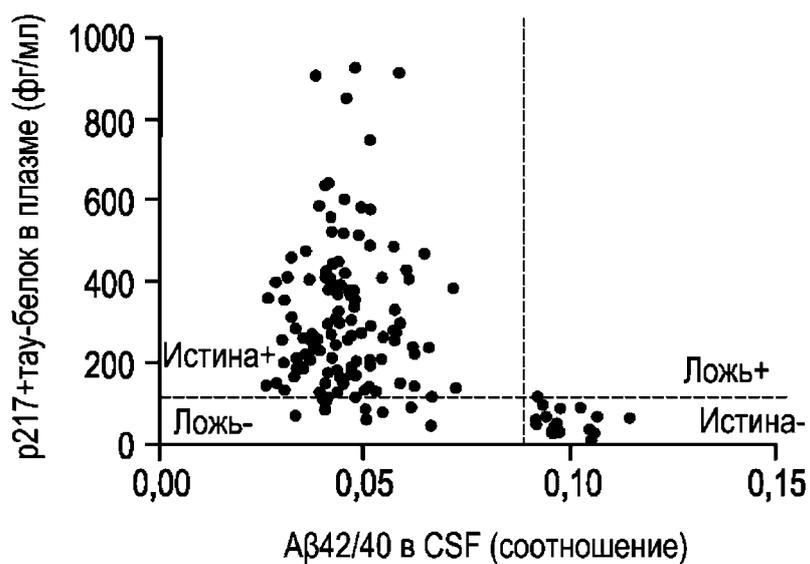
ROC-кривая:

p217+тау-белок в плазме, диагностическая сила для прогнозирования положительности по амилоиду в CSF
Субъекты с деменцией легкой или умеренной степени

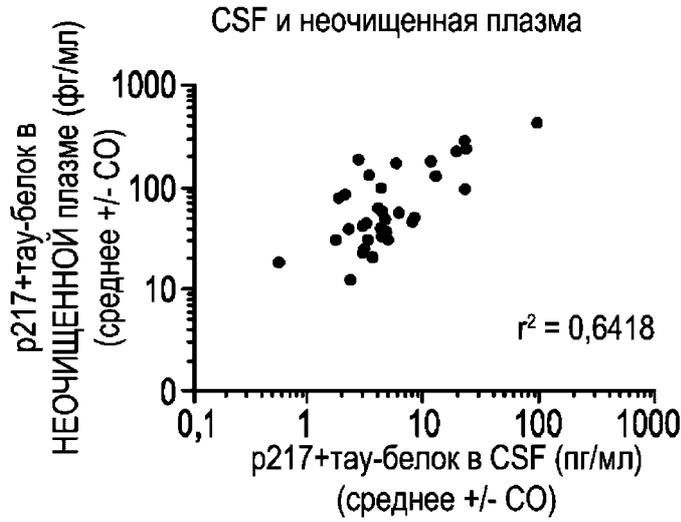


ФИГ. 13Е

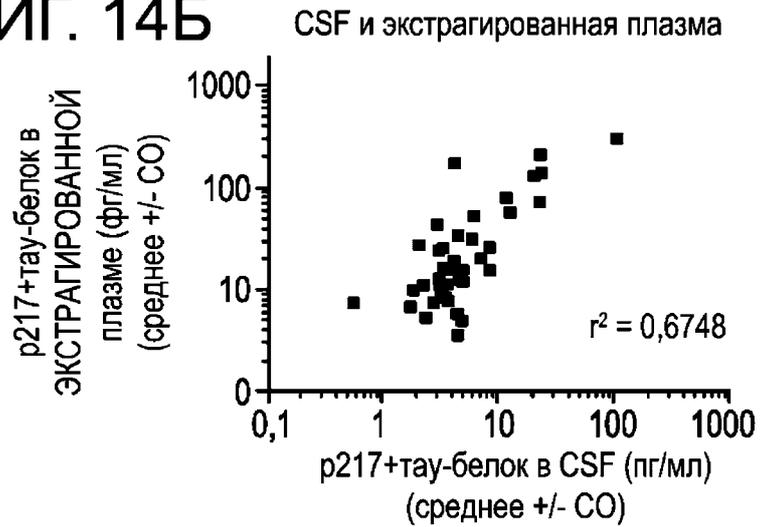
Соотношение A β 42/40 в CSF и p217 в плазме
Субъекты с деменцией легкой или умеренной степени



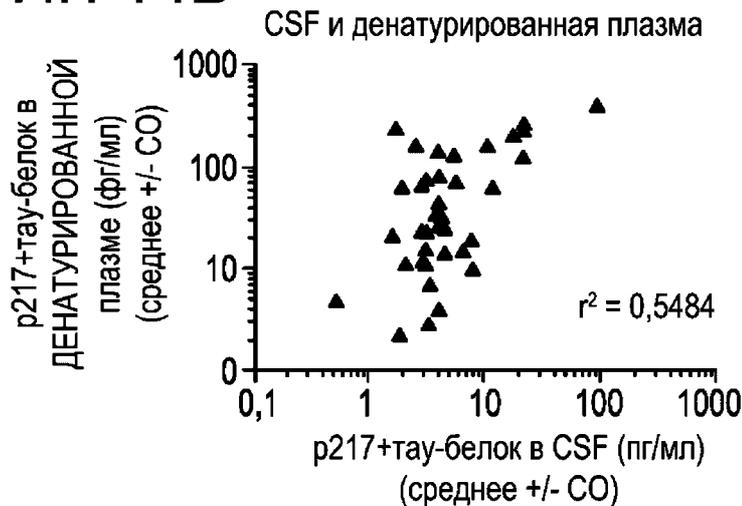
ФИГ. 14А



ФИГ. 14Б

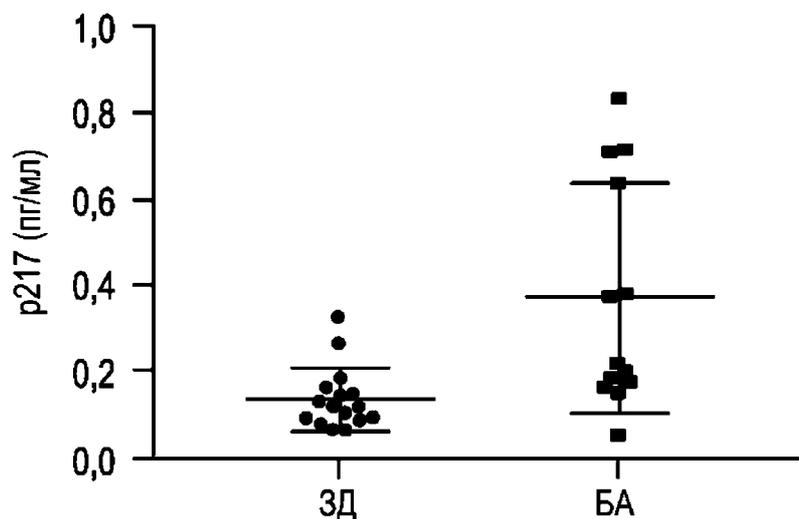


ФИГ. 14В



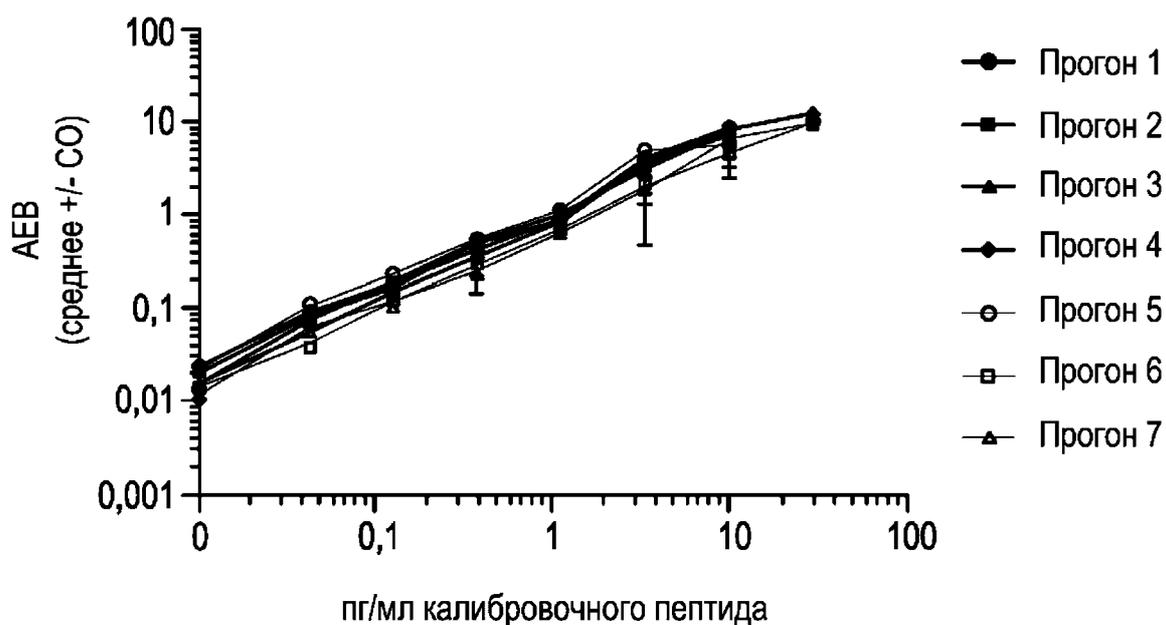
ФИГ. 15А

ОБЩИЙ p217+тау-белок в плазме
63733657EDI1001 MAD Субъекты,
исходный уровень



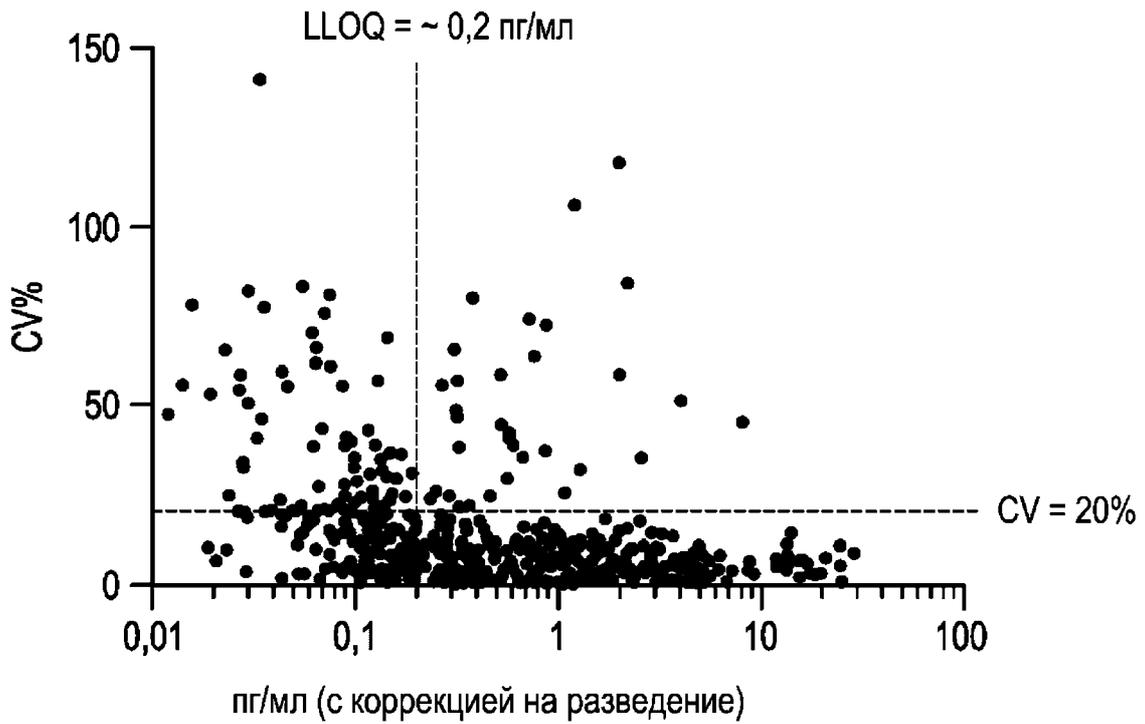
ФИГ. 15Б

калибр. кривые, pT3хhT43



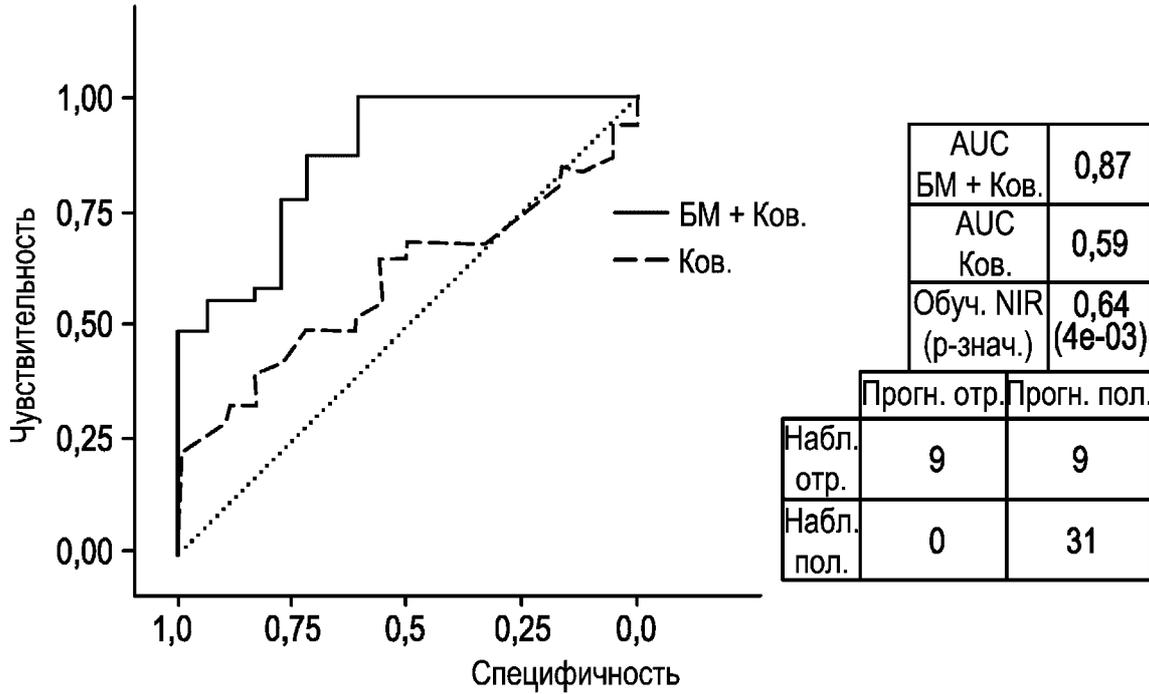
ФИГ. 15В

ОБЩИЙ р217+тау-белок в плазме
Прецизионность и чувствительность



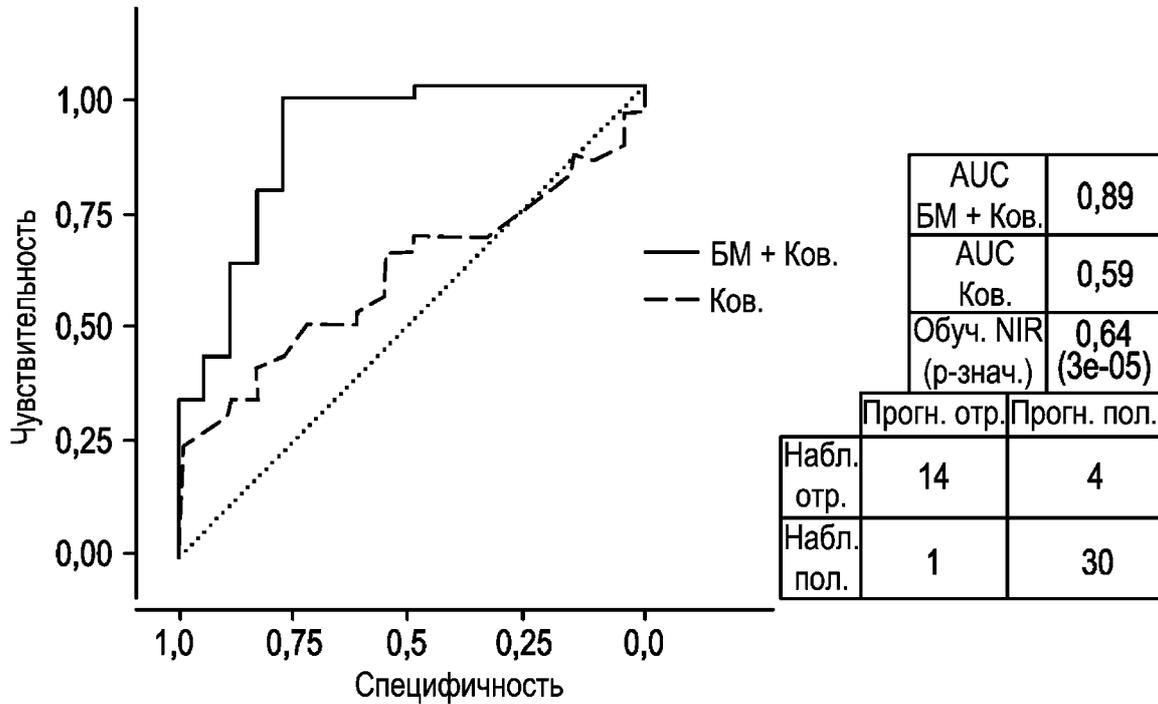
ФИГ. 16А

Тау-белок в сыворотке, ВОЗРАСТ, ПОЛ



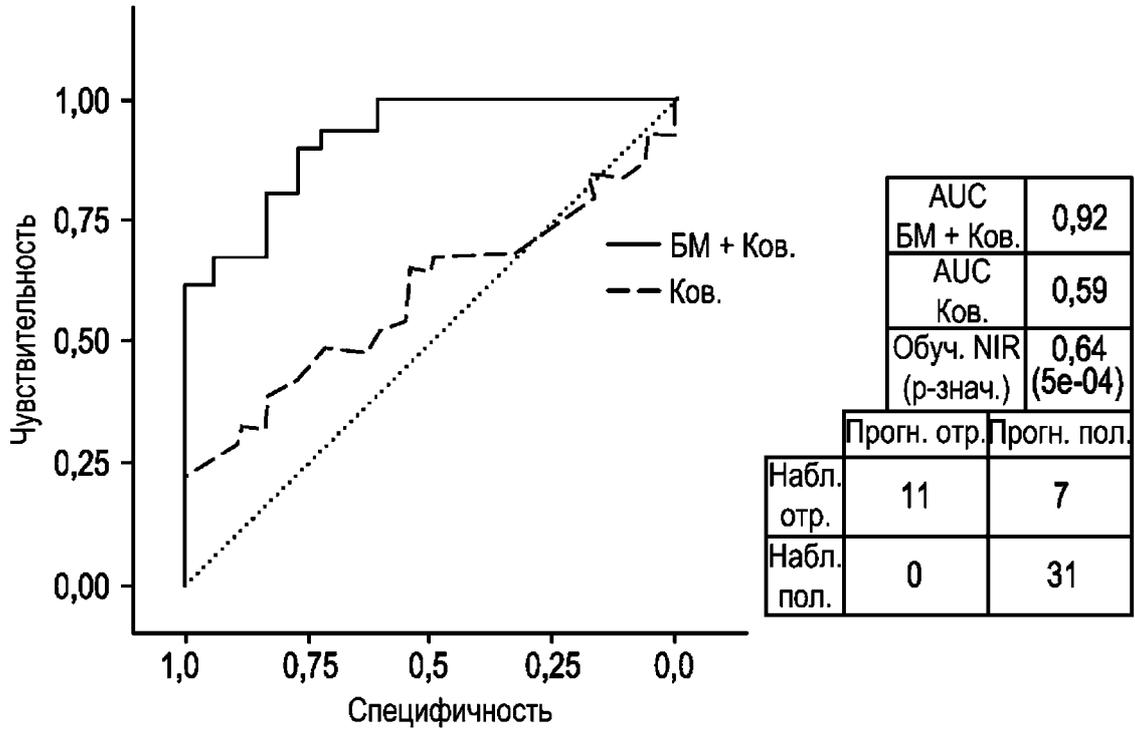
ФИГ. 16Б

Тау-белок в сыворотке, NFL, ВОЗРАСТ, ПОЛ



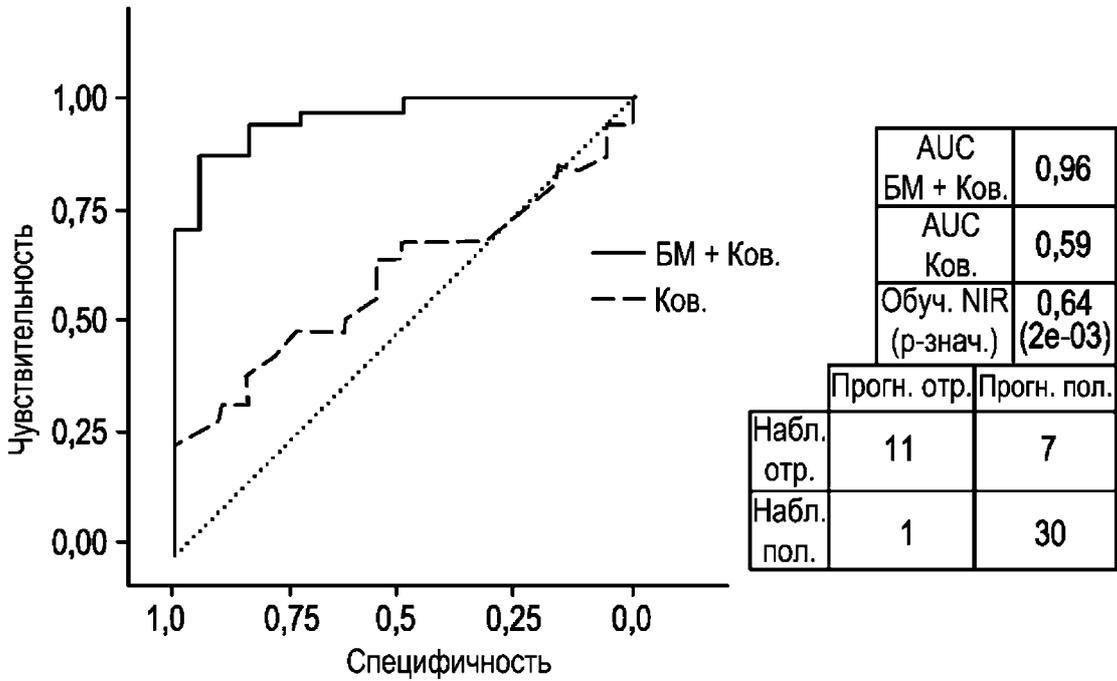
ФИГ. 16В

Тау-белок в сыворотке, NFL, адипонектин, ВОЗРАСТ, ПОЛ



ФИГ. 16Г

Тау-белок в сыворотке, NFL, адипонектин, ВОЗРАСТ, ПОЛ



ФИГ. 16Д

Адипонектин, лептин, NFL, ВОЗРАСТ, ПОЛ

