



УКРАЇНА

(19) **UA**(11) **123390**(13) **C2**

(51) МПК

C07K 16/18 (2006.01)**A61K 39/395** (2006.01)**G01N 33/53** (2006.01)**A61P 25/28** (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2017 06478	(72) Винахідник(и):	Новак Міхал (SK), Контсекова Єва (SK), Ковачех Браніслав (SK), Жилка Норберт (SK)
(22) Дата подання заявки:	14.09.2012	(73) Володілець (володільці):	АКСОН НЬЮРОСАЙЕНС СЕ, 4, Arch. Makariou & Kalogreon, NICOLAIDES SEA VIEW CITY, 5th floor, office 506, 6016 Larnaka, Cyprus (CY)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	01.04.2021	(74) Представник:	Бочаров Максим Анатолійович, реєстр. №367
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/536,339, 61/653,115	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2004007547 A2, 22.01.2004 WO 0118546 A2, 15.03.2001
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	19.09.2011, 30.05.2012		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US, US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	27.11.2017, Бюл.№ 22		
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	31.03.2021, Бюл.№ 13		
(62) Номер та дата подання попередньої заявки, з якої виділено заявку, позначену кодом (21):	а201404170, 14.09.2012		

(54) ТЕРАПІЯ І ДІАГНОСТИКА НА ОСНОВІ БІЛКІВ ТАУ-ОПОСЕРЕДКОВУВАНОЇ ПАТОЛОГІЇ ПРИ ХВОРОБІ АЛЬЦГЕЙМЕРА**(57) Реферат:**

Винахід стосується синтетичного пептиду для застосування в лікуванні хвороби Альцгеймера або іншої таупатії, що включає імуногенний фрагмент білка тау 2N4R, що включає амінокислотну послідовність KDNKHVPGGGS (SEQ ID NO: 108) або CKDNKHVPGGGS (SEQ ID NO: 218) або її сіль.

UA 123390 C2

Для даної заявки вимагається пріоритет по попередніх заявках США 61/536339, поданої 19 вересня 2011 року, і 61/653115, поданої 30 травня 2012 року, зміст обох з яких включено в даний опис як посилання.

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

5 Дана заявка містить список послідовностей, наданий в форматі ASCII через EFS-Web і, таким чином, включений як посилання в повному обсязі. Вказана копія ASCII, створена 13 вересня 2012 року, названа SEQUENCE_LISTING.txt і має розмір 155400 байт.

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ

10 Даний винахід стосується способів і засобів на основі білків (наприклад антитіла, пептиди) для перешкоджання продукції і виведення певних форм тау-білка, які залучені до стимуляції і/або розвитку патологічних агрегатів тау-тау при хворобі Альцгеймера, а також способів одержання антитіл проти білка тау, які придатні для діагностики і лікування хвороби Альцгеймера. Крім цього, винахід стосується способів і засобів для діагностики хвороби Альцгеймера, включаючи способи визначення стадії і оцінки ходу лікування.

15 РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Хвороба Альцгеймера (AD) являє собою прогресуючий нейродегенеративний розлад, який руйнує вищі структури головного мозку, такі як структури, залучені до пам'яті і пізнання. Захворювання приводить до дефіциту когнітивної функції і відхилень в пам'яті, здатності до навчання, мовлення і в здатності виконувати навмисні і цілеспрямовані рухи. AD також супроводжується супутнім поведінковим, емоційним, міжособистісним і соціальним виснаженням. Ці когнітивні і поведінкові розлади ускладнюють життя (Burns et al., 2002). Пацієнти з AD на пізній стадії часто не здатні говорити, розуміти мову і здійснювати основний догляд за собою, що в кінцевому результаті вимагає постійного догляду і спостереження, і вони часто залежать від членів сімей і будинків інвалідів. AD є основною причиною сенільної деменції і, згідно з прогнозами, її поширеність буде збільшуватися у міру зростання частки літніх людей в популяції. Згідно з прогнозами, загальна кількість людей з AD збільшиться щонайменше в три рази лише між 2000 і 2050 роками, що робить AD загальносвітовою проблемою охорони здоров'я (Sloane et al., 2002). Клінічне керування перебігом AD залишається здебільшого підтримуючим. Іншими словами, пацієнтам проводять лікування, націлене на попередження, контроль або пом'якшення ускладнень і побічних ефектів AD і на підвищення їх комфорту і якості життя. Все ще існує незадоволена потреба в способах лікування, які прямо націлені на прогресування захворювання і мають модифікуючі захворювання ефекти.

AD гістологічно характеризується наявністю екстранейрональних бляшок і внутрішньоклітинних і позаклітинних нейрофібрилярних вузликів в головному мозку. Бляшки в основному складаються з β -амілоїду (A β), в той час як вузлики містять патологічні форми білка тау, такі як патологічні конформери білка тау і їх агрегати. Взаємозв'язок між бляшками і вузликами і процесом захворювання залишається неясним, хоч дослідження наводять на думку про зв'язок між патогенезом, що обумовлюється амілоїдом і білком тау [Hardy et al., 1998; Oddo et al., 2004; Rapoport et al., 2002; Roberson, et al., 2007; Shipton et al., 2011]. Припущення про центральну роль для A β в патології AD спочатку було зроблене в гіпотезі, званій "A β -каскадом", згідно з якою після відкладення A β іде фосфорилювання білка тау і утворення вузликів, а потім нейрональна загибель [Hardy and Allsop, 1991; Hardy and Selkoe, 2002; для огляду див. Walsh and Selkoe, 2004; також див. Seabrook et al., 2007]. Таким чином, первинні терапевтичні підходи для AD були сфокусовані, головним чином, на націлюванні на A β . Однак є документально підтверджена відсутність кореляції між мірою A β -патології головного мозку у пацієнтів з AD і клінічним прогресуванням захворювання (Braak and Braak, 1991). Крім цього, у безсимптомних індивідуумів при розтині виявляють велике, часто дифузне, відкладення амілоїду (Braak and Braak, 1991), і вже при AD ранньої стадії втрата нейронів і відкладення амілоїду зустрічаються в різних областях головного мозку (Carter and Lippa, 2001). Таким чином, націлювання тільки на A β не може вистачати для зміни процесу захворювання у яких-небудь або всіх пацієнтів. Проте, найбільш передовими, націленими на захворювання, способами терапії, які проходять клінічні випробування у пацієнтів з AD, залишаються способи терапії, націлені на продукцію і виведення A β . Ці способи терапії включають пасивну імунотерапію, наприклад бапінейзумаб, соланейзумаб і понезумаб, а також низькомолекулярний інгібітор гамма-секретази семагастат (для огляду див. Citron et al., 2010).

Загально визнана роль білка тау в патології AD була продемонстрована в численних дослідженнях. Наприклад, Braak продемонстрував, що найбільшу кореляцію з нейродегенерацією при AD має присутність вузликів білка тау, а не амілоїдних бляшок (Braak and Braak, 1991). У іншому дослідженні було виявлено, що нейротоксичність A β в

культивованих нейронах залежить від білка тау (Rapoport et al., 2002). У нещодавніх дослідженнях, зниження рівня ендogenous білка тау перешкоджало розладу поведінки у трансгенних мишей, яким експресували білок-попередник амілоїду людини, без зміни у них високих рівнів A β (Roberson et al., 2007). Зниження рівня білка тау також захищало як

трансгенних, так і нетрансгенних мишей від ексайтотоксичності. Там же, Santacruz et al. продемонстрували, що зниження кількості білка тау відновлювало функцію пам'яті в моделі таупатії (Santacruz et al., 2005).

Таким чином, терапія, націлена на зниження рівня тау, може являти собою ефективну стратегію лікування AD і інших пов'язаних з білком тау хворобливих станів.

Білок тау належить до сімейства білків з внутрішньою невпорядкованістю, що характеризуються відсутністю жорсткої тривимірної структури в їх фізіологічному навколишньому середовищі (Zilka et al., 2008). Однак укорочення і гіперфосфорилування білка тау може викликати патологічні трансформації зі стану внутрішньої невпорядкованості у множинні розчинні і нерозчинні неправильно неупорядковані структури, включаючи парні спіральні філаменти (PHF) і інші агрегати [Wischik et al., 1988a; Wischik et al., 1988b; Novak et al., 1993; Skrabana et al., 2006; Zilka et al., 2008; Kovacech et al., 2010]. Ці структурні зміни приводять до токсичного збільшення функції, до втрати фізіологічної функції нативного білка або до обох з них [Zilka et al., 2008; Kovacech et al., 2010].

Фізіологічна функція білка тау полягає в опосередковуванні збирання мономерів тубуліну в мікротрубочки, які складають мережу нейрональних мікротрубочок (Buee et al., 2000). Білок тау зв'язується з мікротрубочками через повторювані області, розташовані в С-кінцевій частині білка. Там же. Ці повторювані домени (R1-R4) не ідентичні один одному, але містять 31-32 висококонсервативні амінокислоти (Taniguchi et al., 2005b). У головному мозку людини існує шість унікальних ізоформ білка тау, які відрізняються одна від одної присутністю або відсутністю певних амінокислот в N-кінцевій частині білка тау, в комбінації або з трьома (R1, R3 і R4), або з чотирма (R1-R4) повторюваними доменами, на С-кінці білка. Також див. фіг. 1, на якій показано шість ізоформ людини (2N4R, 1N4R, 2N3R, 0N4R, 1N3R і 0N3R). Було передбачено, що найбільш ефективною частиною білка тау, що індукуює полімеризацію мікротрубочок, є область 274-KVQIINKK-281 (SEQ ID NO: 113), що перекриває R1-R2. Там же. Крім цього, на патологічні і фізіологічні функції білка тау, мабуть, впливає конкретна структурна конформація і внутрішня невпорядкована структура, що приймаються повнорозмірними ізоформами білка і їх фрагментами. Наприклад, Kontseikova et al. описали конформаційну область (що охоплює залишки 297-IKHVPGGGSVQIVYKPVDSLKSVTSKCGSL-325 (SEQ ID NO: 114)) в певних укорочених молекулах білка тау, яка мала значний взаємозв'язок з функцією цих укорочених молекул білка тау відносно збирання мікротрубочок (WO 2004/007547).

Вважають, що на доповнення до їх фізіологічної ролі повтори білка тау беруть участь в утворенні патологічних агрегатів білка тау і інших структур. Таким чином, існує потреба в націлених на білок тау терапевтичних і діагностичних підходах, які здатні розрізняти фізіологічну і патологічну опосередковану повторами активність. Наприклад, стійка до пронази центральна частина патологічних парних спіральних філаментів (PHF) складається із зв'язуючих мікротрубочки областей ізоформ білка тау з 3 і 4 повторами [Jakes et al., 1991; Wischik, et al. 1988a; Wischik, et al. 1988b]. Крім цього, Novak et al. продемонстрували, що стійка до протеаз центральна частина PHF, яка має довжину 93-95 амінокислот, обмежена трьома тандемними повторами (Novak et al., 1993). Von Bergen et al. визначили мінімальний пептид тау/мотив взаємодії (306-VQIVYK-311; SEQ ID NO: 115), а також другу ділянку на білку тау (275-VQIINK-280) (SEQ ID NO: 116), які утворюють бета-шари і описані як потенційно відповідальні за ініціацію утворення PHF - патологічного агрегату білка тау [Von Bergen et al., 2000; EP 1214598; WO 2001/18546]. Див. фіг. 2 для функціональної карти білка тау. Отже, сучасні стратегії націлені на створення лікарських засобів проти агрегації, які не порушують внутрішньоклітинну роль білка тау в стабілізації мікротрубочок.

Більше того, хоч в фізіологічних обставинах білок тау розглядається як внутрішньоклітинний цитоплазматичний білок, внутрішньоклітинний білок тау може вивільнятися у позаклітинний простір і брати участь в нейродегенерації (Gomez-Ramos et al., 2006). Дійсно, втрата нейронів пов'язана з топографічним розподілом нейрофібрилярних вузликів (утворених білком тау) в головному мозку при AD [West et al., 1994; Gomez-Isla et al., 1996, 1997]. Крім цього, рівні загального білка тау і фосфорилуваного білка тау збільшені в цереброспінальній рідині (CSF) пацієнтів з AD (Hampel et al., 2010), і позаклітинний білок тау описують як "вузлики-привиди" в головному мозку (Frost and Diamond, 2009), що вказує на те, що внутрішньоклітинний білок тау вивільняється у позаклітинний простір. Крім цього, внутрішньоклітинні агрегати білка тау можуть проникати в клітини і стимулювати фібрилізацію внутрішньоклітинного білка тау, далі формуючи

мономер для утворення патологічних агрегатів білка тау (Frost et al., 2009). Такі дослідження показали, що позаклітинний нерозчинний білок тау може діяти як поширюваний агент, розподіляючи патологію, пов'язану з білком тау, по всьому головному мозку подібно пріонам (Frost et al., 2009; Frost and Diamond, 2009). Виведення позаклітинних вузликів білка тау може знизити зумовлену білком тау позаклітинну і внутрішньоклітинну патологію. Див., наприклад, Asuni et al., 2007. Таким чином, існує потреба в способах лікування, здатних знижувати внутрішньоклітинний рівень білка тау, шляхом перешкоджання його утворенню, шляхом стимуляції його виведення, або обома з цих способів, а також в способах лікування, які знижують внутрішньоклітинний рівень обумовлюючого захворювання білка тау.

Загалом, білок тау, мабуть, грає патологічну роль в клінічних виявах AD, розробка лікарських засобів, які діють проти білка тау, протікає повільно, частково внаслідок значення білка тау для фізіологічної динаміки мікротрубочок і внаслідок його комплексної біології (Dickey and Petrucelli, 2006). Однак, поліпшене розуміння молекулярних механізмів, що лежать в основі патологічних трансформацій білка тау, відкрило можливість специфічного націлювання на патологічні модифікації білка тау для терапевтичних цілей. В результаті з'явився ряд терапевтичних підходів, які прямо або посередньо націлені на каскад білка тау [для оглядових статей, див., наприклад, Dickey and Petrucelli, 2006; Schneider and Mandelkow, 2008; Zilka et al., 2008], включаючи сполуки, які запобігають або обертають назад агрегацію білка тау [Wischik et al., 1996; Necula et al. 2005; Pickhardt et al., 2005; Taniguchi et al., 2005a; Larbig et al., 2007], низькомолекулярні лікарські засоби, які інгібують кінази білка тау або активують фосфатази білка тау [Iqbal and Grundke-Iqbal, 2004; Noble et al., 2005; Iqbal and Grundke-Iqbal, 2007], стабілізуючі мікротрубочки лікарські засоби (Zhang et al., 2005), лікарські засоби, які сприяють протеолітичній деградації неправильно згорнутих білків тау [Dickey et al., 2005, Dickey et al. 2006; Dickey and Petrucelli, 2006], і імунотерапевтичні лікарські засоби (Zilka et al., 2008), а також імунотерапевтичні стратегії, що включають активну і пасивну імунізацію [Schneider and Mandelkow et al., 2008; Zilka et al., 2008; Tabira, T. Immunization Therapy for Alzheimer Disease: A Comprehensive Review of Active Immunization Strategies. *Tohoku J. Exp. Med.*, 220: 95-106 (2010)].

У більш загальному значенні, нові моноклональні антитіла (mAb) входять в фазу клінічних випробувань з частотою більше 40 на рік з 2007 року. Наприкінці 2010 року щонайменше 25 mAb і п'ять злитих білків Fc знаходилися на фазі 2/3 або фазі 3 клінічних випробувань в США (Reichert, 2011). Ця тенденція демонструє, що пасивна імунотерапія є розширюваним підходом при лікуванні порушень у людини, включаючи AD. Див., наприклад, Citron et al., 2010. Насправді, хоч проблемою способів лікування AD є подолання гематоенцефалічного бар'єра (ГЕБ), зростаюча кількість доклінічних і клінічних випробувань повідомляють, що опосередковувані антитілами способи терапії можуть виводити агрегати AD з головного мозку, і пропонують множинну механізмів дії, таких як (i) захоплення антитілом в головний мозок через змінену проникність ГЕБ при AD, або просочення через ГЕБ; (ii) антитіла, діючі як "периферичні стоки" для розчинних типів амілоїду, що утворюють бляшки; (iii) проникнення секретуючих антитіла клітин з периферії в головний мозок, що доставляють антитіла локально; і (iv) транспорт IgG в межах і через клітини. Див., наприклад, Citron et al., 2010, і Asuni et al., 2007, для огляду. Таким чином, терапевтичні антитіла, націлені на пов'язані із захворюванням форми білка тау, являють собою перспективний підхід для лікування і/або діагностики AD і інших таупатій (WO 2004/007547, US 2008/0050383).

Один з підходів імунотерапії для націлювання на патологію білка тау оснований на принципі, що антитіла проти білка тау можуть перешкоджати агрегації білка тау, виводити агрегати білка тау, або на обох з них. Хоч в дослідженнях описані антитіла, які зв'язуються з послідовностями білка тау, і деякі з цих антитіл, згідно з повідомленнями, перешкоджають агрегації і виведенню білка тау (Asuni et al., 2007), на даний час все ще немає моноклонального антитіла проти білка тау, що проходить доклінічні або клінічні випробування при AD. Дійсно, було передбачено, що mAb має три ділянки зв'язування в домені, зв'язуючому мікротрубочки білка тау миші (а саме в R3, R4 і, можливо, R1), однак воно не блокувало зв'язування мікротрубочок (Dingus et al., 1991). Dingus не описали ролі цього антитіла в агрегації білка тау, і, таким чином, немає причин вважати, що антитіло Dingus блокує агрегацію білка тау. Згідно з іншими повідомленнями, були одержані mAb, які розрізняють ізоформи білка тау, але знову відсутнє припущення про те, що вони мають ефект на агрегацію білка тау [DeSilva et al., 2003; Ueno et al., 2007]. Taniguchi et al. продемонстрували, що певні mAb проти білка тау, направлені проти R1 або R2, інгібували агрегацію білка тау в PHF *in vitro*, одночасно стимулюючи індуковане білком тау збирання тубуліну (Taniguchi et al., 2005b). Антитіла RTA-1 і RTA-2 Taniguchi зв'язувалися специфічно з R1 і R2, відповідно. Жодне з антитіл не зв'язувало більше одного повтору білка тау і жодне з антитіл, згідно з повідомленнями, не було досліджено відносно ефектів *in vivo* як на агрегацію

білка тау, так і на виведення. Незважаючи на існування щонайменше трьох антитіл проти амілоїду в клінічних випробуваннях терапії AD на основі пасивної імунізації (тобто терапія, в якій антитіла вводять пацієнту), на даний час не доступно звітів про клінічні випробування пасивної імунотерапії AD на основі білка тау.

У декількох дослідженнях AD на трансгенних по APP мишах було виявлено, що підхід активної імунізації (тобто підхід, в якому організм пацієнта сам індукує імунітет проти мішені) є ефективним відносно виведення відкладень A β і обертання назад нейропатологічних осередків пошкодження [див., наприклад, Schenk et al., 1999; Janus et al., 2000; Morgan et al., 2000; Sigurdsson et al., 2001]. Нещодавно, в моделях патології, пов'язаної з вузликами білка тау, на мишах активна імунотерапія фосфорилуваним епітопом білка тау (тау 379-408 [P-Ser 396, 404]) знижувала рівень агрегованого білка тау в головному мозку і уповільнювала прогресування поведінкового фенотипу [Asuni et al., 2007; Boutajangout et al. 2010; US 2008/0050383; US/2010/00316564]. Тварини, яким проводили введення, продукували антитіла проти білка тау, які виявлялися в головному мозку і локалізувалися спільно з антитілами, які розпізнавали патологічний білок тау (Asuni et al., 2007). Цей імунотерапевтичний підхід був суттєво більш ефективним на ранніх стадіях функціональних порушень у тварин (5 місяців), ніж на більш пізніх стадіях (8 місяців), що вказує на те, що виведення патологічного білка тау на ранній стадії може мати терапевтичну користь (Asuni et al., 2007; Zilka et al., 2008). Дійсно, існує інформація, що не весь білок тау є піддатливим або, можливо, навіть придатним для руйнування або виведення. Деякі передбачили, що руйнування агрегатів білка тау може збільшувати рівень токсичних проміжних сполук, в той час як інші передбачили, що агрегати білка тау, які піддаються виявленню, не обов'язково є токсичними і навіть можуть грати захисну роль (Lee et al., 2005). Таким чином, хоч імунотерапевтичні підходи для націлювання на білок тау мають доклінічні перспективи, все ще існує потреба в терапевтичних засобах, які специфічно націлені на ранні аберантні форми білка тау, усунення яких забезпечує збільшену тривалу користь. Проте, також все ще існує потреба в ідентифікації тих видів білка тау, які є придатними мішенями для імунотерапії.

У зв'язку з цим, іншим фактором, враховуваним при розробці mAb проти білка тау, є ідентифікація і охарактеризація різних структурних форм білка тау (фізіологічна, форма раннього захворювання, форма пізнього захворювання) і стадій патології білка тау, на які здійснюють націлювання. Oddo et al. виявили, що, хоч імунотерапія A β виводила бляшки A β і усувала ранню патологію білка тау в моделі AD на трансгенних мишах, зрілі агрегати білка тау залишалися незміненими (Oddo et al., 2004). Аналогічно, генетичне (не імунотерапевтичне) зниження експресії білка тау в моделі таупатії P301L tau поліпшувало пам'ять, навіть незважаючи на те, що нейрофібрилярні вузлики продовжували накопичуватися (Santacruz et al., 2005).

Незважаючи на її поширеність, AD залишається найбільшою незадоволеною медичною потребою в неврології (Citron, 2010). Найбільш поширеним медичним підходом є надання симптоматичної терапії, яка не є ефективною навіть після лікування протягом декількох років. Необхідно, щоб нові терапевтичні підходи і стратегії для AD вийшли за межі лікування симптомів, запобігаючи зниженню когнітивних здатностей і протидіючи фундаментальним патологічним процесам захворювання. Зокрема, існує потреба в розробці молекул, які, або окремо, або в комбінації з іншими націленими на AD лікарськими засобами, перешкоджають щонайменше деяким з найбільш ранніх стадій захворювання. Такі молекули можуть забезпечити нові переважні можливості для ранньої діагностики (яка сама по собі може поліпшити результати лікування), профілактики і лікування AD.

СУТЬ ВІНАХОДУ

У одному варіанті здійснення, винахід стосується виділеного антитіла, де антитіло зв'язується з одним або декількома епітопами білка тау і здатне до двох або більше з наступного:

- а) виявляти більш високу афінність відносно патологічного білка тау в порівнянні з фізіологічним білком тау;
- б) інгібувати агрегацію тау-тау; і
- с) опосередковувати захоплення і деградацію патологічного білка тау мікроглією; і де кожний епітоп білка тау містить стимулюючу агрегацію область білка тау.

У одному варіанті здійснення, це виділене антитіло є таким, що кожний з одного або декількох епітопів незалежно вибраний з епітопів в:

- i) положенні 267-273 або залишках KHPGGG (SEQ ID NO: 98) відносно тау⁴⁴¹;
- ii) положенні 298-304 або залишках KHPGGG (SEQ ID NO: 99) відносно тау⁴⁴¹;
- iii) положенні 329-335 або залишках HHPGGG (SEQ ID NO: 100) відносно тау⁴⁴¹;

iv) положенні 361-367 або залишках THVPGGG (SEQ ID NO: 101) відносно тау⁴⁴¹.

У певних варіантах здійснення, виділене антитіло, що має властивості, описані у варіантах здійснення попередніх абзаців, здатне зв'язуватися з однією або декількома формами патологічного білка тау, вибраними з розупорядкованого білка тау, неправильно

невпорядкованого білка тау, нерозчинного в саркозилі білка тау, нейрофібрилярних вузликів, нейропільних ниток і нейритичних бляшок, в біоптаті головного мозку пацієнта-людини з хворобою Альцгеймера, в зразку головного мозку в моделі хвороби Альцгеймера на тваринах або в обох з цих випадків. У певних варіантах здійснення, виділене антитіло є таким, що щонайменше один з епітопів, які воно розпізнає, є конформаційним епітопом.

У одному варіанті здійснення, винахід стосується виділеного антитіла, де антитіло зв'язується з одним або декількома епітопами білка тау і здатне до двох або більше з наступного:

а) виявляти більш високу афінність відносно патологічного білка тау в порівнянні з фізіологічним білком тау;

б) інгібувати агрегацію тау-тау; і

с) опосередковувати захоплення і деградацію патологічного білка тау мікроглією;

і де кожний епітоп білка тау містить стимулюючу агрегацію область білка тау.

У одному варіанті здійснення, це виділене антитіло є таким, що кожний з одного або декількох епітопів незалежно вибраний з епітопів в:

i) положенні 268-273 або залишках HQPGGG (SEQ ID NO: 223) відносно тау⁴⁴¹;

ii) положенні 299-304 або залишках HVPGGG (SEQ ID NO: 154) відносно тау⁴⁴¹;

iii) положенні 330-335 або залишках HKPGGG (SEQ ID NO: 224) відносно тау⁴⁴¹;

iv) положенні 362-367 або залишках HVPGGG (SEQ ID NO: 154) відносно тау⁴⁴¹.

У одному варіанті здійснення, це виділене антитіло є таким, що кожний з одного або декількох епітопів, з якими воно зв'язується, незалежно вибраний з епітопів в:

i) положенні 268-273 або залишках HQPGGG (SEQ ID NO: 223) відносно тау⁴⁴¹;

ii) положенні 299-304 або залишках HVPGGG (SEQ ID NO: 154) відносно тау⁴⁴¹;

iii) положенні 330-335 або залишках HKPGGG (SEQ ID NO: 224) відносно тау⁴⁴¹;

iv) положенні 362-367 або залишках HVPGGG (SEQ ID NO: 154) відносно тау⁴⁴¹;

і антитіло містить:

а) варіабельну область легкого ланцюга антитіла, що містить:

i) QSLNSRTRKNY (SEQ ID NO: 117) або SEQ ID NO: 247 для CDR1;

ii) WAS (SEQ ID NO: 118) або SEQ ID NO: 253 для CDR2; і

iii) KQSFYLRT (SEQ ID NO: 119) або будь-яку з SEQ ID NO: 255, 257, 258, 259 і 260 для CDR3; і

б) варіабельну область важкого ланцюга антитіла, що містить:

iv) GYIFTDYVIS (SEQ ID NO: 120), SEQ ID NO: 261 або SEQ ID NO: 262 для CDR1;

v) IFPRSGST (SEQ ID NO: 121), SEQ ID NO: 264 або SEQ ID NO: 265 для CDR2; і

vi) ARDYYGTSFAMDY (SEQ ID NO: 122), SEQ ID NO: 266, SEQ ID NO: 267 або SEQ ID NO: 269 для CDR3.

Також винахід стосується виділеного антитіла, яке зв'язує один або декілька епітопів на білку тау конформаційно-специфічним чином, де:

а) кожний з одного або декількох епітопів незалежно вибраний з епітопів в:

i) положенні 267-273 або залишках KHQPGGG (SEQ ID NO: 98) відносно тау⁴⁴¹;

ii) положенні 298-304 або залишках KHVPGGG (SEQ ID NO: 99) відносно тау⁴⁴¹;

iii) положенні 329-335 або залишках HHKPGGG (SEQ ID NO: 100) відносно тау⁴⁴¹; і

iv) положенні 361-367 або залишках THVPGGG (SEQ ID NO: 101), відносно тау⁴⁴¹;

б) нуль, один, два або три з епітопів являють собою лінійні епітопи; і

с) один, два, три або чотири з епітопів являють собою конформаційні епітопи.

Винахід також стосується виділеного антитіла, яке зв'язує один або декілька епітопів на білку тау конформаційно-специфічним чином, де:

а) кожний з одного або декількох епітопів незалежно вибраний з епітопів в:

i) положенні 268-273 або залишках HQPGGG (SEQ ID NO: 223) відносно тау⁴⁴¹;

ii) положенні 299-304 або залишках HVPGGG (SEQ ID NO: 154) відносно тау⁴⁴¹;

iii) положенні 330-335 або залишках HKPGGG (SEQ ID NO: 224) відносно тау⁴⁴¹;

iv) положенні 362-367 або залишках HVPGGG (SEQ ID NO: 154) відносно тау⁴⁴¹;

б) нуль, один, два або три з епітопів являють собою лінійні епітопи; і

с) один, два, три або чотири з епітопів являють собою конформаційні епітопи.

У одному варіанті здійснення, це антитіло являє собою DC8E8, де DC8E8 являє собою антитіло, продуковане гібридомою, депонованою як запатентований депозит American Type Culture Collection no. PTA-11994.

У певних варіантах здійснення, виділене антитіло зв'язується з одним або декількома з тих же епітопів на білку тау, з якими зв'язується DC8E8. У одному варіанті здійснення, виділене антитіло конкурує з моноклональним антитілом DC8E8 за зв'язування з білком тау.

Винахід також стосується виділеного антитіла, що містить в його зв'язуючому епітоп домені одну або декілька послідовностей областей, що визначають комплементарність (CDR), вибраних з:

- i) QSLNLSRTRKNY (SEQ ID NO: 117);
- ii) WAS (SEQ ID NO: 118);
- iii) KQSFYLRT (SEQ ID NO: 119);
- iv) GYIFTDYVIS (SEQ ID NO: 120);
- v) IFPRSGST (SEQ ID NO: 121); i
- vi) ARDYGTSTFAMDY (SEQ ID NO: 122).

Винахід також стосується того, що будь-які з антитіл, розкритих в будь-якому з варіантів здійснення, описаних в попередніх абзацах, можуть бути такими, що виділене антитіло містить:

- a) варіабельну область легкого ланцюга антитіла, що містить:
 - i) QSLNLSRTRKNY (SEQ ID NO: 117) для CDR1;
 - ii) WAS (SEQ ID NO: 118) для CDR2; i
 - iii) KQSFYLRT (SEQ ID NO: 119) для CDR3; i
- b) варіабельну область важкого ланцюга антитіла, що містить:
 - iv) GYIFTDYVIS (SEQ ID NO: 120) для CDR1;
 - v) IFPRSGST (SEQ ID NO: 121) для CDR2; i
 - vi) ARDYGTSTFAMDY (SEQ ID NO: 122) для CDR3.

Винахід також стосується того, що будь-які з антитіл, описаних в попередніх варіантах здійснення, можуть бути такими, що виділене антитіло містить:

- a) одну або декілька послідовностей CDR легкого ланцюга з моноклонального антитіла DC8E8 або одну або декілька послідовностей, що мають щонайменше 80 %, 90 % або 95 % ідентичність після оптимального вирівнювання з однією з цих CDR легкого ланцюга; i
- b) одну або декілька послідовностей CDR важкого ланцюга з моноклонального антитіла DC8E8 або одну або декілька послідовностей, що мають щонайменше 80 %, 90 % або 95 % ідентичність після оптимального вирівнювання з однією з цих CDR важкого ланцюга; i де:
 - i) CDR легкого ланцюга містять послідовність, вибрану з QSLNLSRTRKNY (SEQ ID NO: 117), WAS (SEQ ID NO: 118) і KQSFYLRT (SEQ ID NO: 119); i
 - ii) CDR важкого ланцюга містять послідовність, вибрану з GYIFTDYVIS (SEQ ID NO: 120), IFPRSGST (SEQ ID NO: 121) і ARDYGTSTFAMDY (SEQ ID NO: 122).

Винахід також стосується того, що будь-які з антитіл, описаних для попередніх варіантів здійснення, можуть складатися з або містити Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc, Fv-фрагмент, будь-який інший антигензв'язувальний фрагмент або антигензв'язувальну частину антитіла, що мають одну або декілька з наступних імунологічних характеристик зв'язування:

- 1) антитіло зв'язує один або декілька епітопів білка тау конформаційно-специфічним чином, де: a) кожний з одного або декількох епітопів білка тау незалежно вибраний з епітопів в:
 - i) положенні 267-273 або залишках KHQPGGG (SEQ ID NO: 98) відносно тау₄₄₁;
 - ii) положенні 298-304 або залишках KHVPGGG (SEQ ID NO: 99) відносно тау₄₄₁;
 - iii) положенні 329-335 або залишках HHKPGGG (SEQ ID NO: 100) відносно тау₄₄₁; i
 - iv) положенні 361-367 або залишках THVPGGG (SEQ ID NO: 101) відносно тау₄₄₁;
- b) нуль, один, два або три з епітопів являють собою лінійні епітопи;
- c) один, два, три або чотири з епітопів являють собою конформаційні епітопи;
- 2) антитіло зв'язує два або більше епітопів білка тау і здатне виявляти більш високу афінність зв'язування з патологічним білком тау відносно фізіологічного білка тау, де два епітопи тау вибрані з епітопів в:
 - v) положенні 267-273 або залишках KHQPGGG (SEQ ID NO: 98) відносно тау₄₄₁;
 - vi) положенні 298-304 або залишках KHVPGGG (SEQ ID NO: 99) відносно тау₄₄₁;
 - vii) положенні 329-335 або залишках HHKPGGG (SEQ ID NO: 100) відносно тау₄₄₁; i
 - viii) положенні 361-367 або залишках THVPGGG (SEQ ID NO: 101) відносно тау₄₄₁.

Винахід також стосується того, що будь-які з антитіл, описаних для попередніх варіантів здійснення, можуть складатися з або містити Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc, Fv-фрагмент, будь-який інший антигензв'язувальний фрагмент або антигензв'язувальну частину антитіла, що мають одну або декілька з наступних імунологічних характеристик зв'язування:

1) антитіло зв'язує один або декілька епітопів білка тау конформаційно-специфічним чином, де:

а) кожний з одного або декількох епітопів білка тау незалежно вибраний з епітопів в:

- i) положенні 268-273 або залишках HQPGGG (SEQ ID NO: 223) відносно тау⁴⁴¹;
- ii) положенні 299-304 або залишках HVPGGG (SEQ ID NO: 154) відносно тау⁴⁴¹;
- iii) положенні 330-335 або залишках HKPGGG (SEQ ID NO: 224) відносно тау⁴⁴¹;
- iv) положенні 362-367 або залишках HVPGGG (SEQ ID NO: 154) відносно тау⁴⁴¹;
- b) нуль, один, два або три з епітопів являють собою лінійні епітопи;
- c) один, два, три або чотири з епітопів являють собою конформаційні епітопи;

2) антитіло зв'язує два або більше епітопів білка тау і здатне виявляти більш високу афінність відносно патологічного білка тау, ніж відносно фізіологічного білка тау, де два епітопи білка тау вибрані з епітопів в:

- i) положенні 268-273 або залишках HQPGGG (SEQ ID NO: 223) відносно тау⁴⁴¹;
- ii) положенні 299-304 або залишках HVPGGG (SEQ ID NO: 154) відносно тау⁴⁴¹;
- iii) положенні 330-335 або залишках HKPGGG (SEQ ID NO: 224) відносно тау⁴⁴¹;
- iv) положенні 362-367 або залишках HVPGGG (SEQ ID NO: 154) відносно тау⁴⁴¹.

Винахід також стосується будь-якого виділеного антитіла, яке конкурентно зв'язує білок тау відносно антитіл, описаних для попередніх варіантів здійснення. У одному варіанті здійснення, виділене антитіло конкурентно зв'язується з білком тау при дослідженні проти виділеного DC8E8 відносно зв'язування з білком тау.

У деяких варіантах здійснення, антитіло містить легкий ланцюг, що містить SEQ ID NO: 141. У деяких варіантах здійснення, антитіло містить легкий ланцюг, що містить SEQ ID NO: 138. У деяких варіантах здійснення, антитіло містить легкий ланцюг, що містить SEQ ID NO: 141, і легкий ланцюг, що містить SEQ ID NO: 138.

Винахід стосується того, що антитіла, передбачувані винаходом, можуть бути вибрані з:

- a) моноклонального антитіла;
- b) поліклонального антитіла;
- c) рекомбінантного антитіла;
- d) химерного антитіла;
- e) гуманізованого антитіла;
- f) антитіла людини; і
- g) антигензв'язувального фрагмента або антигензв'язувальної частини будь-якого з (a)-(f).

Будь-які з виділених антитіл, передбачуваних винаходом, можуть бути індуковані у ссавця. У певних варіантах здійснення, виділене антитіло продукується рекомбінантною твариною або рекомбінантною клітиною-хазяїном.

Винахід стосується того, що будь-які з виділених антитіл проти білка тау, передбачуваних в рамках даного винаходу, можуть бути такими, що вони є міченими виявлюваним чином одним або декількома агентами для мічення. У певних варіантах здійснення, щонайменше один агент для мічення вибраний з ферменту, радіоізотопу, флуорофору, маркера ядерно-магнітного резонансу і важкого металу.

У деяких варіантах здійснення, антитіло містить щонайменше один лікарський засіб (комбінований засіб), приєднаний до молекули антитіла.

Винахід також стосується виділених нуклеїнових кислот, що кодують щонайменше одну CDR або щонайменше зв'язувальний домен або варіабельну область ланцюга імунoglobуліну будь-яких з антитіл проти білка тау, описаних в попередніх варіантах здійснення. Також передбачаються виділені вектори, що містять будь-яку з цих нуклеїнових кислот. У деяких варіантах здійснення, винахід стосується виділеної клітини-хазяїна, що містить одну або декілька з цих виділених нуклеїнових кислот і векторів.

У певних варіантах здійснення, винахід стосується виділеної клітинної лінії, експресуючої будь-які з антитіл проти білка тау, описаних в попередніх варіантах здійснення. У одному варіанті здійснення, виділена клітинна лінія являє собою гібридому. У одному варіанті здійснення, виділена клітинна лінія являє собою гібридому, яка продукує моноклональне антитіло DC8E8, і ця клітинна лінія була депонована в American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA, 13 липня 2011 року, з позначенням запатентованого депозиту ATCC PTA-11994.

Винахід стосується застосування будь-якого з антитіл проти білка тау, нуклеїнових кислот і клітин, передбачуваних в рамках даного винаходу, як лікарського засобу або для виготовлення лікарського засобу для діагностики, профілактики або лікування хвороби Альцгеймера або спорідненої таупатії.

У деяких варіантах здійснення, антитіла містяться в фармацевтичній композиції, яка, крім того, містить фармацевтично прийнятний носій і/або розріджувач. У одному варіанті здійснення, фармацевтична композиція містить комбінацію антитіл і фармацевтично прийнятного носія і/або розріджувача, де комбінація включає щонайменше два різних антитіл, і де кожне з антитіл незалежно вибране з антитіл, описаних для попередніх варіантів здійснення. У одному варіанті здійснення, щонайменше одне з антитіл являє собою DC8E8 або людську версію DC8E8, або гуманізовану версію DC8E8.

У деяких варіантах здійснення, антитіла містяться в композиції, яка, крім того, містить розріджувач і/або носій. Композиція може являти собою фармацевтичну композицію, діагностичну композицію або будь-яку іншу композицію. У деяких варіантах здійснення, композиція, крім того, може містити щонайменше одну сполуку або засіб, вибрані з мітки, що піддається виявленню, гемоціаніну лімфи равлика, правцевого токсоїду або токсоїду, що походить з інших патогенних бактерій, сироваткових альбумінів, бичачого сироваткового альбуміну, молекули імуноглобуліну або її фрагмента, тиреоглобуліну, овоглобуліну, універсального Т-клітинного епітопа, цитокіну, хемокіну, інтерлейкіну 1-альфа (IL-1 α), IL-1 β , IL-2, IL-10, інтерферону-гамма (IFN- γ), гранулоцитарно-макрофагального колонієстимулюючого фактора (GM-CSF), макрофагального запального білка 1-альфа (MIP1 α), MIP1 β і RANTES (білок, регульований при активації, експресований і секретований нормальними Т-клітинами).

Винахід також стосується виробу (наприклад набору) для фармацевтичного або діагностичного застосування, який містить пакувальний матеріал і контейнер, що містить розчин ліофілізованої форми будь-якого одного або декількох з антитіл проти білка тау, описаних в даному документі. У певних варіантах здійснення, контейнер являє собою компонент пристрою або системи для доставки антитіла індивідууму.

У деяких варіантах здійснення, винахід стосується медичного пристрою, який містить антитіло проти білка тау, описане в даному документі (див. вище), де пристрій придатний для контактування або введення антитіла щонайменше одним шляхом, вибраним з парентерального, підшкірного, внутрішньом'язового, внутрішньовенного, внутрішньосуглобового, внутрішньобронхіального, внутрішньочеревного, внутрішньокапсулярного, внутрішньохрящового, внутрішньопорожнинного, здійснюваного всередину черевної порожнини, внутрішньомозочкового, інтрацеребровентрикулярного, інтратекального, внутрішньотовстокишкового, інтрацервікального, внутрішньошлункового, внутрішньопечінкового, інтраміокардіального, внутрішньокишкового, внутрішньотазового, внутрішньоперикардіального, внутрішньоочеревинного, внутрішньоплеврального, внутрішньопростатичного, внутрішньолегенового, внутрішньоректального, внутрішньониркового, інтраретинального, внутрішньохребтового, інтрасиновіального, внутрішньогрудного, внутрішньоматкового, внутрішньоміхурового, внутрішньоосередкового, болюсного, вагінального, ректального, букального, сублінгвального, інтраназального і трансдермального.

У одному варіанті здійснення, винахід стосується способу лікування або профілактики хвороби Альцгеймера або спорідненої таупатії у індивідуума, причому спосіб включає введення вказаному індивідууму ефективної кількості щонайменше одного з антитіл проти білка тау, описаних в даному документі. У деяких варіантах здійснення, спосіб здатний зменшувати рухові порушення, поліпшувати рухову функцію, зменшувати когнітивні порушення, поліпшувати когнітивну функцію або здійснювати їх комбінацію.

У певних варіантах здійснення, винахід стосується способу пом'якшення щонайменше одного з симптомів, асоційованих з хворобою Альцгеймера або спорідненою таупатією у індивідуума, причому спосіб включає введення вказаному індивідууму ефективної кількості щонайменше одного з антитіл проти білка тау, описаних в даному документі.

У іншому варіанті здійснення, винахід стосується способу діагностики або скринінгу індивідуума на наявність хвороби Альцгеймера або спорідненої таупатії у індивідуума або визначення ризику розвитку у індивідуума хвороби Альцгеймера або спорідненої таупатії, причому спосіб включає:

а) контактування індивідуума або клітини, тканини, органа, рідини або будь-якого іншого зразка від індивідуума з ефективною кількістю щонайменше одного антитіла проти білка тау, описаного в даному документі; і

б) визначення присутності комплексу, що містить патологічний білок тау і антитіло, де присутність комплексу є діагностичним критерієм хвороби Альцгеймера або спорідненої таупатії, зумовленої присутністю патологічного білка тау.

У спорідненому варіанті здійснення, винахід стосується способу моніторингу у індивідуума наявності, прогресування, регресії або стабілізації хвороби Альцгеймера або спорідненої

таупатії у індивідуума або визначення стадії хвороби Альцгеймера або спорідненої таупатії у індивідуума, причому спосіб включає:

а) контактування індивідуума або клітини, тканини, органа, рідини або будь-якого іншого зразка від індивідуума з ефективною кількістю щонайменше одного з антитіл проти білка тау, описаних в даному документі; і

б) визначення присутності і/або характеристик комплексу, що містить патологічний білок і антитіло, де присутність комплексу є діагностичним критерієм хвороби Альцгеймера або спорідненої таупатії, зумовленої присутністю патологічного білка тау.

У деяких варіантах здійснення, антитіло вводять внутрішньовенно, внутрішньом'язово, підшкірно, внутрішньоочеревинно, інтраназально, інтрацеребровентрикулярно, інтратекально або у вигляді аерозолі.

У деяких варіантах здійснення, способів лікування або профілактики прогресування хвороби Альцгеймера або спорідненої таупатії у індивідуума, і способів пом'якшення щонайменше одного з симптомів, асоційованих з хворобою Альцгеймера або спорідненою таупатією у індивідуума, ефективна кількість кожного антитіла складає щонайменше 1 мг/кг маси тіла індивідуума на дозу. У деяких варіантах здійснення, ефективна кількість кожного антитіла складає щонайменше 10 мг/кг маси тіла індивідуума на дозу. У деяких варіантах здійснення, щонайменше одне з антитіл вводять у множині дозувань протягом періоду щонайменше шести місяців. У деяких варіантах здійснення, антитіло вводять периферично індивідууму-людині для досягнення його сприятливих ефектів. У деяких варіантах здійснення, антитіло, при введенні периферично індивідууму-людині, зв'язується з розчинним білком тау, нерозчинним в саркозилі білком або з обома з них. У деяких варіантах здійснення, антитіло, при введенні периферично індивідууму-людині, зв'язується з білком тау, де білок тау знаходиться в одній або декількох патологічних формах з розупорядкованого білка тау, неправильно невпорядкованого білка тау, нерозчинного в саркозилі білка тау, нейрофібрилярних вузликів, нейропільних ниток і нейритичних бляшок в біоптаті головного мозку пацієнта-людини з хворобою Альцгеймера, в зразку головного мозку в моделі хвороби Альцгеймера на тваринах. У деяких варіантах здійснення, антитіло, при введенні периферично індивідууму-людині, досягає одного або декількох опосередковуваних ефекторною функцією сприятливих ефектів у індивідуума. У деяких варіантах здійснення, антитіло доставляють на периферію шляхом ін'єкції/імплантації експресуючої антитіло клітини в головний мозок індивідуума. У деяких варіантах здійснення, експресуюча антитіло клітина являє собою клітину гібридами. У деяких варіантах здійснення, клітина гібридами являє собою гібридому, експресуючу DC8E8.

У певних споріднених варіантах здійснення, винахід стосується виділеного пептиду, де:

а) виділений пептид являє собою фрагмент білка тау, який має довжину щонайменше 6 амінокислотних залишків, щонайменше 7 амінокислотних залишків, щонайменше 9 амінокислотних залишків, щонайменше 10 амінокислотних залишків, щонайменше 12 амінокислотних залишків або 30 амінокислотних залишків; і

б) виділений пептид містить терапевтичний епітоп білка тау.

У деяких споріднених варіантах здійснення, терапевтичний епітоп включає терапевтичний епітоп, вибраний з епітопів в:

- i) положенні 267-273 або залишках KHPGGG (SEQ ID NO: 98) відносно тау₄₄₁;
- ii) положенні 298-304 або залишках KHVPGGG (SEQ ID NO: 99) відносно тау₄₄₁;
- iii) положенні 329-335 або залишках HHKPGGG (SEQ ID NO: 100) відносно тау₄₄₁;
- iv) положенні 361-367 або залишках THVPGGG (SEQ ID NO: 101) відносно тау₄₄₁.

У певних споріднених варіантах здійснення, винахід стосується виділеного пептиду, де:

а) виділений пептид являє собою фрагмент білка тау, який має довжину щонайменше 6 амінокислотних залишків, щонайменше 7 амінокислотних залишків, щонайменше 9 амінокислотних залишків, щонайменше 10 амінокислотних залишків, щонайменше 12 амінокислотних залишків або 30 амінокислотних залишків; і

б) виділений пептид містить терапевтичний епітоп білка тау.

У деяких споріднених варіантах здійснення, терапевтичний епітоп включає терапевтичний епітоп, вибраний з епітопів в:

- i) положенні 268-273 або залишках HHPGGG (SEQ ID NO: 223) відносно тау₄₄₁;
- ii) положенні 299-304 або залишках HVPGGG (SEQ ID NO: 154) відносно тау₄₄₁;
- iii) положенні 330-335 або залишках HKPGGG (SEQ ID NO: 224) відносно тау₄₄₁;
- iv) положенні 362-367 або залишках HVPGGG (SEQ ID NO: 154) відносно тау₄₄₁.

У деяких споріднених варіантах здійснення, терапевтичний епітоп вибраний з:

- i) положення 268-273 або залишків HHPGGG (SEQ ID NO: 223) відносно тау₄₄₁;
- ii) положення 299-304 або залишків HVPGGG (SEQ ID NO: 154) відносно тау₄₄₁;

iii) положення 330-335 або залишків HKPGGG (SEQ ID NO: 224) відносно тау₄₄₁;

iv) положення 362-367 або залишків HVPGGG (SEQ ID NO: 154) відносно тау₄₄₁.

У інших варіантах здійснення, виділений пептид являє собою послідовність, вибрану з SEQ ID NO: 1-4, SEQ ID NO: 9-101 і SEQ ID NO: 108-112, NIKAVPGGGG (SEQ ID NO: 200), NIKHVPGGGS (SEQ ID NO: 201), IKHVPGGGS (SEQ ID NO: 202), KHVPGGGSV (SEQ ID NO: 203), HVPGGGSVQ (SEQ ID NO: 204), VPGGGSVQ (SEQ ID NO: 205), GWSIHSPGGGSC (SEQ ID NO: 250), SVFQHLPGGGSC (SEQ ID NO: 251), ANIKHVPGGGS (SEQ ID NO: 144), DAIKHVPGGGS (SEQ ID NO: 146), DNAKHVPGGGS (SEQ ID NO: 149), DNIAHVPGGGS (SEQ ID NO: 151), DNIKAVPGGGG (SEQ ID NO: 159), DNIKHAPGGGS (SEQ ID NO: 161) і DNIKHVPGGGS (SEQ ID NO: 171).

У інших варіантах здійснення, виділений пептид являє собою послідовність, вибрану з SEQ ID NO: 270 (TENLKHQPGGGK); SEQ ID NO: 271 (KHQPGGG), SEQ ID NO: 272 (HQPGGG); SEQ ID NO: 275 (ENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGS), SEQ ID NO: 276 (KHVPGGG), SEQ ID NO: 277 (HVPGGG), SEQ ID NO: 280 (DNIKHVPGGGSVQIVYKPV), SEQ ID NO: 281 (HNKPGGG), SEQ ID NO: 282 (HKPGGG) і SEQ ID NO: 283 (THVPGGG).

У інших варіантах здійснення, виділений пептид являє собою послідовність, вибрану з SEQ ID NO: 270 (TENLKHQPGGGK), SEQ ID NO: 271 (KHQPGGG), SEQ ID NO: 272 (HQPGGG), SEQ ID NO: 275 (ENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGS), SEQ ID NO: 276 (KHVPGGG), SEQ ID NO: 277 (HVPGGG), SEQ ID NO: 280 (DNIKHVPGGGSVQIVYKPV), SEQ ID NO: 281 (HNKPGGG), SEQ ID NO: 282 (HKPGGG) і SEQ ID NO: 283 (THVPGGG); і терапевтичний епітоп вибраний з:

i) положення 268-273 або залишків HQPGGG (SEQ ID NO: 223) відносно тау₄₄₁;

ii) положення 299-304 або залишків HVPGGG (SEQ ID NO: 154) відносно тау₄₄₁;

iii) положення 330-335 або залишків HKPGGG (SEQ ID NO: 224) відносно тау₄₄₁;

iv) положення 362-367 або залишків HVPGGG (SEQ ID NO: 154) відносно тау₄₄₁.

У інших варіантах здійснення, виділений пептид являє собою послідовність, вибрану з SEQ ID NO: 272 (HQPGGG) і SEQ ID NO: 277 (HVPGGG).

У певних варіантах здійснення, виділений пептид є активним щонайменше в одному аналізі, вибраному з аналізів, які визначають для пептиду:

a) здатність конкурувати з білком тау за зв'язування з моноклональним антитілом DC8E8;

b) здатність знижувати рівень нерозчинного в саркозилі білка тау *in vivo*;

c) здатність стимулювати виведення білка тау з головного мозку *in vivo*;

d) здатність знижувати рівень щонайменше одного біохімічного маркера AD *in vivo*;

e) здатність знижувати навантаження нейрофібрилярними вузликами (NFT) *in vivo*;

f) здатність поліпшувати щонайменше один нейроповедінковий параметр *in vivo*;

g) здатність сприятливим чином модифікувати перебіг AD у індивідуума;

h) здатність знижувати рівень білка тау в головному мозку, в цереброспінальній рідині або в обох з них; і/або

i) здатність служити як імуноген для одержання антитіла, здатного конкурувати з моноклональним DC8E8 за зв'язування з білком тау.

Винахід також стосується сполук, що містять будь-який з виділених пептидів, описаних в даному документі, і частину. У певних варіантах здійснення, частина є N-кінцевою, C-кінцевою або зв'язаною з внутрішньою амінокислотою пептиду, і де частина вибрана з одного або декількох із залишку цистеїну, фосфогрупи, гемоціаніну лімфи равлика, правцевого токсоду або токсоду, що походить з інших патогенних бактерій, сироваткових альбумінів, бичачого сироваткового альбуміну, молекули імуноглобуліну або її фрагмента, тиреоглобуліну, овоглобуліну, універсального Т-клітинного епітопа, цитокіну, хемокіну, інтерлейкіну 1-альфа (IL-1α), IL-1β, IL-2, IL-10, інтерферону-гамма (IFN-γ), гранулоцитарно-макрофагального колонієстимулюючого фактора (GM-CSF), макрофагального запального білка 1-альфа (MIP1α), MIP1β і RANTES (білок, регульований при активації, експресований і секретований нормальними Т-клітинами).

Також передбачаються фармацевтичні композиції, які містять один або декілька з виділених пептидів і/або сполук, передбачуваних винаходом, і фармацевтично прийнятний носій і/або розріджувач, і/або ад'ювант. У деяких варіантах здійснення, фармацевтична композиція адаптована так, що вона забезпечує дозування пептиду або сполуки від 1 нг до 10 мг. У певних варіантах здійснення, фармацевтична композиція адаптована так, що вона забезпечує дозування пептиду або сполуки, яка перевищує 10 мікрограмів.

Винахід також стосується виробу (наприклад набору) для фармацевтичного або діагностичного застосування, який містить пакувальний матеріал і контейнер, що містить розчин ліофілізованої форми пептиду і/або сполуки, передбачуваних винаходом. У деяких варіантах

здійснення, контейнер являє собою компонент пристрою або системи для доставки пептиду або сполуки індивідууму.

Також передбачаються медичні пристрої, які містять пептид, сполуку і/або композицію пептиду/сполуки, передбачувані винаходом, де пристрій придатний для контактування або введення антитіла щонайменше одним шляхом, вибраним з парентерального, підшкірного, внутрішньом'язового, внутрішньовенного, внутрішньосуглобового, внутрішньобронхіального, внутрішньочеревного, внутрішньокапсулярного, внутрішньохрящового, внутрішньопорожнинного, здійснюваного всередину черевної порожнини, внутрішньомозочкового, інтрацеребровентрикулярного, інтратекального, внутрішньотовстокишкового, інтрацервікального, внутрішньошлункового, внутрішньопечінкового, інтраміокардіального, внутрішньокисткового, внутрішньотазового, внутрішньоперикардіального, внутрішньоочеревинного, внутрішньоплеврального, внутрішньопростатичного, внутрішньолегеневого, внутрішньоректального, внутрішньониркового, інtrarетинального, внутрішньохребтового, інтрасиновіального, внутрішньогрудного, внутрішньоматкового, внутрішньоміхурового, внутрішньоосередкового, болусного, вагінального, ректального, букального, сублінгвального, інтраназального і трансдермального.

У споріднених варіантах здійснення, винахід стосується способу лікування або профілактики прогресування хвороби Альцгеймера або споріднених таупатій у індивідуума, причому спосіб включає введення вказаному індивідууму ефективної кількості щонайменше одного пептиду і/або щонайменше однієї сполуки, передбачуваних винаходом. У деяких варіантах здійснення, спосіб здатний зменшувати рухові порушення, поліпшувати рухову функцію, зменшувати когнітивні порушення, поліпшувати когнітивну функцію або здійснювати їх комбінацію.

У споріднених варіантах здійснення, винахід стосується способу пом'якшення щонайменше одного з симптомів, асоційованих з хворобою Альцгеймера або спорідненими таупатіями у індивідуума, причому спосіб включає введення вказаному індивідууму ефективної кількості щонайменше одного пептиду і/або щонайменше однієї сполуки, передбачуваних винаходом.

У деяких з цих способів лікування, профілактики або пом'якшення щонайменше одного з симптомів, асоційованих зі способом пом'якшення щонайменше одного з симптомів, асоційованих з хворобою Альцгеймера або спорідненою таупатією, у індивідуума, спосіб включає введення пацієнту-людині пептиду і/або сполуки, передбачуваних винаходом, і/або ад'юванту, який посилює імунну відповідь, причому спосіб забезпечує імунну відповідь, що включає антитіла проти патологічного білка тау, тим самим здійснюючи лікування, профілактику прогресування або пом'якшення щонайменше одного з симптомів, асоційованих з AD, у пацієнта-людини.

Винахід також стосується способу продукування антитіла, яке здатне конкурувати з DC8E8 за зв'язування з білком тау, причому спосіб включає імунізацію індивідуума щонайменше одним пептидом і/або щонайменше однією сполукою, передбачуваними винаходом. У деяких варіантах здійснення, щонайменше один пептид вибраний з будь-якої з SEQ ID NO: 1-4, SEQ ID NO: 9-101 і SEQ ID NO: 108-112, NIKHVPGGGS (SEQ ID NO: 201), IKHVPGGGS (SEQ ID NO: 202), KHVPGGGSV (SEQ ID NO: 203), HVPGGGSVQ (SEQ ID NO: 204), VPGGGSVQ (SEQ ID NO: 205), GWSIHSPGGGSC (SEQ ID NO: 250), SVFQHLPGGGSC (SEQ ID NO: 251), ANIKHVPGGGS (SEQ ID NO: 144), DAIKHVPGGGS (SEQ ID NO: 146), DNAKHVPGGGS (SEQ ID NO: 149), DNIAHVPGGGS (SEQ ID NO: 151), DNIKAVPGGGGS (SEQ ID NO: 159), DNIKHAPGGGS (SEQ ID NO: 161) і DNIKHVPGGGS (SEQ ID NO: 171). У одному варіанті здійснення, пептид вибраний з SEQ ID NO: 1-4. В іншому варіанті здійснення, пептид являє собою SEQ ID NO: 108. У одному варіанті здійснення, пептид являє собою GWSIHSPGGGSC (SEQ ID NO: 250). У певних варіантах здійснення, пептид являє собою SVFQHLPGGGSC (SEQ ID NO: 251). У певних варіантах здійснення, пептид вибраний з SEQ ID NO: 270 (TENLKHQPGGGK), SEQ ID NO: 271 (KHQPGGG), SEQ ID NO: 272 (HQPGGG), SEQ ID NO: 275 (ENLKHQPGGGKVQIINKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGS), SEQ ID NO: 276 (KHVPGGG), SEQ ID NO: 277 (HVPGGG), SEQ ID NO: 280 (DNIKHVPGGGSVQIVYKPV), SEQ ID NO: 281 (HNKPGGG), SEQ ID NO: 282 (HKPGGG) і SEQ ID NO: 283 (THVPGGG). У інших варіантах здійснення, пептид вибраний з SEQ ID NO: 272 (HQPGGG) і SEQ ID NO: 277 (HVPGGG).

Також передбачається спосіб виділення DC8E8 або виділення антитіла, яке здатне конкурувати з DC8E8 за зв'язування з білком тау, причому спосіб включає контактування DC8E8 або антитіла з пептидом і/або із сполукою, передбачуваними винаходом.

У споріднених варіантах здійснення, винахід стосується способу діагностики або скринінгу індивідуума відносно наявності хвороби Альцгеймера або споріднених таупатій у індивідуума,

або відносно визначення ризику розвитку у індивідуума хвороби Альцгеймера або споріднених таупатій, причому спосіб включає:

а) контактування індивідуума або клітини, тканини, органа, рідини або будь-якого іншого зразка від індивідуума з ефективною кількістю щонайменше одного антитіла, передбачуваного винаходом; і

б) визначення присутності комплексу, що містить патологічний білок тау і антитіло, де присутність комплексу є діагностичним критерієм хвороби Альцгеймера або споріднених таупатій, асоційованих з присутністю патологічного білка тау.

У певних варіантах здійснення, винахід стосується способу моніторингу наявності, прогресування, регресії або стабілізації у індивідуума хвороби Альцгеймера або споріднених таупатій або визначення стадії хвороби Альцгеймера або споріднених таупатій у індивідуума, причому спосіб включає:

а) контактування (наприклад введення) індивідуума або клітини, тканини, органа, рідини або будь-якого іншого зразка індивідуума з ефективною кількістю щонайменше одного антитіла, передбачуваного щонайменше одним варіантом здійснення винаходу; і

б) визначення наявності і/або характеристик комплексу, що містить патологічний білок тау і антитіло, де присутність комплексу є діагностичним критерієм хвороби Альцгеймера або споріднених таупатій, асоційованих з присутністю патологічного білка тау.

У деяких варіантах здійснення, способу моніторингу наявності, прогресування, регресії або стабілізації у індивідуума хвороби Альцгеймера або споріднених таупатій, або визначення стадії хвороби Альцгеймера або споріднених таупатій у індивідуума антитіло, пептид і/або сполуку вводять внутрішньовенно, внутрішньом'язово, підшкірно, внутрішньоочеревинно, інтраназально, інтрацеребровентрикулярно, інтратекально або у вигляді аерозолі. У деяких варіантах здійснення, ефективна кількість кожного пептиду і/або сполуки складає щонайменше 1 мкг на дозу, щонайменше 10 мкг на дозу, щонайменше 100 мкг на дозу. У деяких варіантах здійснення, ефективна кількість кожного пептиду і/або сполуки складає щонайменше 10 мкг на дозу в присутності ад'юванта і щонайменше 100 мкг на дозу за відсутності ад'юванту. У деяких варіантах здійснення, щонайменше один пептид або сполуку вводять у множині дозувань протягом періоду щонайменше шести місяців.

Відповідно до спорідненого варіанта здійснення, винахід стосується способу лікування або профілактики прогресування хвороби Альцгеймера або споріднених таупатій у індивідуума, причому спосіб включає введення вказаному індивідууму ефективної кількості щонайменше одного антитіла і/або щонайменше одного пептиду, і/або щонайменше однієї сполуки, передбачуваних винаходом, в комбінації щонайменше з одним комбінованим засобом, вибраним з інгібіторів ацетилхолінестерази, антагоністів рецептора N-метил-D-аспартату (NMDA), хелаторів перехідних металів, факторів росту, гормонів, нестероїдних протизапальних лікарських засобів (NSAID), антиоксидантів, засобів, що знижують рівень ліпідів, селективних інгібіторів фосфодіестерази, інгібіторів агрегації білка тау, інгібіторів протеїнкіназ, інгібіторів білків теплового шоку, пасивної і активної імунізації проти амілоїду, інгібіторів агрегації амілоїду і інгібіторів секретаз. У деяких варіантах здійснення, спосіб здатний зменшувати рухові порушення, поліпшувати рухову функцію, зменшувати когнітивне порушення, поліпшувати когнітивну функцію або здійснювати їх комбінацію.

У споріднених варіантах здійснення, винахід стосується способу пом'якшення щонайменше одного з симптомів, асоційованих з хворобою Альцгеймера або спорідненими таупатіями, у індивідуума, причому спосіб включає введення вказаному індивідууму ефективної кількості щонайменше одного антитіла, щонайменше одного пептиду і/або щонайменше однієї сполуки, передбачуваних винаходом, в комбінації щонайменше з одним комбінованим засобом, вибраним з інгібіторів ацетилхолінестерази, антагоністів рецептора NMDA, хелаторів перехідних металів, факторів росту, гормонів, нестероїдних протизапальних лікарських засобів (NSAID), антиоксидантів, засобів, що знижують рівень ліпідів, селективних інгібіторів фосфодіестерази, інгібіторів агрегації білка тау, інгібіторів протеїнкіназ, інгібіторів білків теплового шоку, реагентів для пасивної і активної імунізації проти амілоїду, інгібіторів агрегації амілоїду і інгібіторів секретаз.

У деяких варіантах здійснення, способів лікування, профілактики або пом'якшення щонайменше одного з симптомів, асоційованих з хворобою Альцгеймера або спорідненими таупатіями, у індивідуума, спосіб включає введення пацієнту-людині ефективної кількості щонайменше одного антитіла, щонайменше одного пептиду і/або щонайменше однієї сполуки, передбачуваних винаходом, і/або ад'юванту, який посилює імунну відповідь, в комбінації щонайменше з одним комбінованим засобом, вибраним з інгібіторів ацетилхолінестерази, антагоністів рецептора NMDA, хелаторів перехідних металів, факторів росту, гормонів,

нестероїдних протизапальних лікарських засобів (NSAID), антиоксидантів, засобів, що знижують рівень ліпідів, селективних інгібіторів фосфодіестерази, інгібіторів агрегації білка тау, інгібіторів протеїнкаінази, інгібіторів білків теплового шоку, пасивної і активної імунізації проти амілоїду, інгібіторів агрегації амілоїду і інгібіторів секретази; де спосіб забезпечує імунну відповідь, що

5 включає антитіла проти патологічного білка тау, тим самим здійснюючи лікування, профілактику прогресування або пом'якшення щонайменше одного з симптомів, асоційованих з AD, у пацієнта-людини.

У деяких варіантах здійснення, способів лікування, профілактики або пом'якшення щонайменше одного з симптомів, асоційованих з хворобою Альцгеймера або спорідненими таупатіями, у індивідуума комбінований засіб вводять до, одночасно або після введення антитіла, пептиду і/або сполуки, передбачуваних винаходом.

У споріднених варіантах здійснення, винахід також стосується фармацевтичної композиції, яка містить фармацевтично прийнятний носій і/або розріджувач; і

а) антитіло, передбачуване винаходом; і/або

15 b) пептид, передбачуваний винаходом; і/або

с) сполуку, передбачувану винаходом;

в комбінації щонайменше з одним комбінованим засобом, вибраним з інгібіторів ацетилхолінестерази, антагоністів рецептора NMDA, хелаторів перехідних металів, факторів росту, гормонів, нестероїдних протизапальних лікарських засобів (NSAID), антиоксидантів,

20 засобів, що знижують рівень ліпідів, селективних інгібіторів фосфодіестерази, інгібіторів агрегації білка тау, інгібіторів протеїнкаінази, інгібіторів білків теплового шоку, реагентів для пасивної і активної імунізації проти амілоїду, інгібіторів агрегації амілоїду і інгібіторів секретази. У деяких варіантах здійснення, антитіло являє собою DC8E8. У певних варіантах здійснення, антитіло містить щонайменше одну CDR з DC8E8. У деяких варіантах здійснення, антитіло

25 містить щонайменше один варіабельний ланцюг (легкий або важкий) з DC8E8. У певних варіантах здійснення, можна використовувати гуманізовану або людську версію DC8E8. У деяких варіантах здійснення, щонайменше один пептид вибраний з будь-якої з SEQ ID NO: 1-4, SEQ ID NO: 9-101 і SEQ ID NO: 108-112, NIKHVPGGGS (SEQ ID NO: 201), IKHVPGGGS (SEQ ID NO: 202), KHVPGGGSV (SEQ ID NO: 203), HVPGGGSVQ (SEQ ID NO: 204), VPGGGSVQ (SEQ ID NO: 205), GWSIHSPGGGSC (SEQ ID NO: 250), SVFQHLPGGGSC (SEQ ID NO: 251), ANIKHVPGGGS (SEQ ID NO: 144), DAIKHVPGGGS (SEQ ID NO: 146), DNAKHVPGGGS (SEQ ID NO: 149), DNIAHVPGGGS (SEQ ID NO: 151), DNIKAVPGGGGS (SEQ ID NO: 159), DNIKHAPGGGS (SEQ ID NO: 161) і DNIKHVPGGGS (SEQ ID NO: 171). У одному варіанті здійснення, пептид вибраний з SEQ ID NO: 1-4. В іншому варіанті здійснення, пептид являє собою SEQ ID NO: 108.

30 У одному варіанті здійснення, пептид являє собою GWSIHSPGGGSC (SEQ ID NO: 250). У певних варіантах здійснення, пептид являє собою SVFQHLPGGGSC (SEQ ID NO: 251). У певних варіантах здійснення, пептид вибраний з SEQ ID NO: 270 (TENLKHQPGGGK), SEQ ID NO: 271 (KHQPGGG), SEQ ID NO: 272 (HQPGGG), SEQ ID NO: 275 (ENLKHQPGGGKVQIINKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGS), SEQ ID NO: 276 (KHVPGGG), SEQ ID NO: 277 (HVPGGG), SEQ ID NO: 280 (DNIKHVPGGGSVQIVYKPV), SEQ ID NO: 281 (HNKPGGG), SEQ ID NO: 282 (HKPGGG) і SEQ ID NO: 283 (THVPGGG). У інших варіантах здійснення, пептид вибраний з SEQ ID NO: 272 (HQPGGG) і SEQ ID NO: 277 (HVPGGG).

Додаткові задачі і переваги варіантів здійснення вказані частково в описі, який наведений нижче, і частково будуть очевидні з опису, або вони можуть бути встановлені при здійсненні на практиці варіантів здійснення. Задачі і переваги варіантів здійснення будуть реалізовуватися і досягатися за допомогою елементів і комбінацій, зокрема, вказаних в прикладеній формулі винаходу.

Потрібно розуміти, що як представлений вище загальний опис, так і представлений нижче докладний опис є тільки ілюстративними і пояснювальними і не обмежують заявлені варіанти здійснення.

Прикладені креслення, які включені і складають частину даного опису, ілюструють декілька варіантів здійснення і разом з описом служать для пояснення принципів варіантів здійснення. Публікації, розглянуті в даному описі, надані тільки для їх розкриття до дати подачі даної заявки. Вони включені як посилання в повному обсязі для будь-яких цілей. Ніщо в даному описі

55 не треба тлумачити як допущення того, що даний винахід не дає право на зіставлення факту створення винаходу з більш раннім пріоритетом. Крім цього, надані дати публікації можуть відрізнятися від фактичних дат публікації і вони вимагають незалежного підтвердження.

КОРОТКИЙ ОПИС КРЕСЛЕНЬ

Фіг. 1. Схематичне представлення шести ізоформ білка тау людини.

Фіг. 2. Схематичне представлення функціональної карти білка тау людини (2N4R). На "фіг. 2 "VQIINK" і "VQIVYK" представлені як SEQ ID NO: 116 і 115, відповідно.

Фіг. 3. Нуклеотидні і амінокислотні послідовності варіабельних областей DC8E8 і їх вирівнювання з найбільш схожими послідовностями миші ембріонального типу. На фіг. 5 представлені нуклеотидна послідовність (SEQ ID NO: 165) (A) і амінокислотна послідовність (SEQ ID NO: 141 (для варіабельної області легкого ланцюга) і 117-119 (для кожної з її CDR, згідно з IMGT), відповідно, по порядку); (B) послідовності варіабельної області легкого ланцюга (VL) DC8E8 (вирівнювання розкриває SEQ ID NO: 166 і 168, відповідно, по порядку); і (C) вирівнювання V-гена варіабельної області легкого ланцюга DC8E8 з найбільш схожою послідовністю миші ембріонального типу IGKV8-21*01 (вирівнювання розкриває SEQ ID NO: 166 і 167, відповідно, по порядку) з подальшим вирівнюванням J-гена VL DC8E8 (SEQ ID NO: 168) з найбільш схожим J-геном миші, IGKJ1*01 (SEQ ID NO: 169). На фіг. представлена нуклеотидна (SEQ ID NO: 170) (в D) і амінокислотна послідовність варіабельної області важкого ланцюга DC8E8 і її три CRD (SEQ ID NO: 171 і 120-122, відповідно, по порядку). На (F) представлені наступні вирівнювання для DC8E8: по-перше, V-ген варіабельної області важкого ланцюга (VH) DC8E8 (SEQ ID NO 172) з найбільш схожою послідовністю миші ембріонального типу IGHV1-81*01 (SEQ ID NO 172); по-друге, D-ген варіабельної області важкого ланцюга (VH) DC8E8 (SEQ ID NO 174) з найбільш схожою послідовністю миші ембріонального типу IGHD2-14*01 (SEQ ID NO 175), і, нарешті, J-ген варіабельної області важкого ланцюга (VH) DC8E8 (SEQ ID NO 176) з найбільш схожою послідовністю миші ембріонального типу IGHJ4*01 (SEQ ID NO 177). Також представлені послідовність константної області легкого ланцюга каппа DC8E8 (SEQ ID NO: 178) (G) і послідовність константної області важкого ланцюга (SEQ ID NO: 179) (H). Області, що визначають комплементарність (CDR), підкреслені в послідовності білка (B) і (E) і вони ідентифіковані відповідно до системи нумерації IMGT.

Фіг. 4. Вирівнювання послідовності варіабельної області легкого ланцюга (VL) DC8E8 (SEQ ID NO: 166 (V-ген) і 168 (J-ген), відповідно), з найбільш схожим геном VL людини ембріонального типу (SEQ ID NO: 180-181, відповідно, по порядку).

Фіг. 5. Вирівнювання послідовності варіабельної області важкого ланцюга (VH) DC8E8 (SEQ ID NO: 172, 174 і 176, для генів V, D і J, відповідно) з найбільш схожим геном VH людини ембріонального типу (SEQ ID NO: 182-183 і 185, відповідно, по порядку).

Фіг. 6. Картування епітопа DC8E8 за допомогою делеційних мутантів білка тау з використанням ELISA. (A) Схематичне представлення білків тау, використаних для картування епітопа DC8E8, і (B) їх амінокислотна послідовність (SEQ ID NO: 186-197, 102, 104 і 198-199, відповідно, по порядку). (C) Дані ELISA. DC8E8 розпізнає наступні білки тау: Δ358-441, Δ421-441, Δ134-168, Δ1-220, Δ1-126, 2N4R, 2N3R, Δ(1-296; 392-441) і Δ(1-150; 392-441)/4R. DC8E8 не розпізнає наступні білки тау: Δ222-427, Δ306-400, Δ228-441, Δ300-312, Δ257-400, Δ137-441, Δ283-441.

Фіг. 7. (A) і (B) Схематичне представлення синтетичних пептидів (SEQ ID NO: 206, 207, 208, 2, 210, 211, 212, 3, 214, 215, 4, 217, 26, 219, 36, 221, 222, 109 і 88, відповідно, по порядку) для картування епітопа, і їх послідовність, відповідно. (C) Картування епітопа DC8E8 за допомогою синтетичного пептиду способом ELISA. (D) Схематичне представлення епітопів DC8E8, які здатні зв'язуватись в білку тау. DC8E8 здатне зв'язуватися з будь-якою з чотирьох окремих зв'язувальних областей, кожна з яких являє собою окремий епітоп, званий епітопами з 1 по 4. Кожний з цих чотирьох епітопів розташований окремо в 1-ому (епітоп #1), 2-ому (епітоп #2), 3-ому (епітоп #3) і 4-ому (епітоп #4) повторюваних доменах білка тау. Як показано, кожний з чотирьох епітопів DC8E8, відповідно, охоплюється однією з наступних амінокислотних послідовностей: 267-KHQPGGG-273 (SEQ ID NO: 98) (в 1-ому повторюваному домені білка тау), 298-KHVPGGG-304 (SEQ ID NO: 99) (у 2-ому повторюваному домені білка тау), 329-HHKPGGG-335 (SEQ ID NO: 100) (в 3-ому повторюваному домені білка тау) і 361-THVPGGG-367 (SEQ ID NO: 101) (в 4-ому повторюваному домені білка тау), відповідно.

Фіг. 8. (A) Вирівнювання амінокислотної послідовності білка тау людини (SEQ ID NO: 225) з послідовністю білка тау з іншого виду (SEQ ID NO: 226-245, відповідно, по порядку). Для вирівнювання використовували повнорозмірний білок тау людини; представлені тільки амінокислоти 265-368 білка тау людини після вирівнювання. Області, що містять чотири окремих епітопи DC8E8 на білку тау людини, і вирівняні послідовності взяті в рамку і показані напівжирним шрифтом. (B) Конкурентний ELISA, що демонструє здатність шести пептидів білка тау (SEQ ID NO: 201-205 і 200, відповідно, по порядку) конкурувати з тауΔ(1-150; 392-441)/4R (SEQ ID NO: 199) за зв'язування з антитілом DC8E8, здатним розпізнавати щонайменше один з епітопів білка тау, залучених в агрегацію тау-тау. (C) Конкурентний ELISA, що демонструє здатність семи тау-пептидів (SEQ ID NO: 144, 146, 149, 151, 159, 161 і 171) конкурувати з

тау Δ (1-150; 392-441)/4R за зв'язування з антитілом DC8E8, здатним розпізнавати щонайменше один з епітопів білка тау, залучених в агрегацію тау-тау.

Фіг. 9. (A) Поверхневий плазмонний резонанс (SPR) для охарактеризації зв'язування DC8E8 з тау Δ (1-150; 392-441)/4R і 2N4R. (B) Поверхневий плазмонний резонанс (SPR) для охарактеризації зв'язування DC8E8 з тау Δ (1-150; 392-441)/3R і 2N3R.

Фіг. 10. (A) Константи асоціації і дисоціації для зв'язування DC8E8 з тау Δ (1-150; 392-441)/4R і з тау 2N4R, при визначенні за допомогою SPR. (B) Константи асоціації і дисоціації для зв'язування DC8E8 з тау Δ (1-150; 392-441)/3R і з тау 2N3R, при визначенні за допомогою SPR. Концентрації, використані у вимірюваннях, вказані на графіках, пунктирні лінії були інтерпольовані комп'ютерною програмою BIA evaluation software 4.1 (Biacore AB) з вимірних даних для обчислення кінетичних параметрів.

Фіг. 11. Моноклональне антитіло DC8E8 здатне розрізняти доклінічну AD, AD, що клінічно починається, і повністю розгорнену AD кінцевої стадії. DC8E8 виявляє забарвлення ранніх стадій (мономер, димери білка тау) патологічного білка тау при доклінічній AD у людини - стадія I Браака. (A) Антитіло розпізнає стадію олігомерів патологічного білка тау (стрілки) і стадію полімерів патологічного білка тау (вузликів) (кінці стрілок). (B) При повністю розгорненій хворобі Альцгеймера (кінцева стадія - стадія VI Браака), DC8E8 розпізнає в основному полімери патологічного білка тау в формах нейрофібрилярних вузликів (кінці стрілок), нейритичних бляшок (всередині кола) і нейритичних ниток (всередині п'ятикутника). (C) Масштабна мітка: 100 мкм. Моноклональне антитіло DC8E8 розпізнає всі стадії розвитку утворення вузликів при хворобі Альцгеймера. (D) DC8E8 розпізнає ранні стадії розвитку утворення вузликів - мономерну, димерну і ранню олігомерну стадію (D1), і пізню олігомерну довузликову стадію (D2), а також пізні стадії розвитку полімерів патологічного білка тау - внутрішньоклітинні (D3) і позаклітинні нейрофібрилярні вузлики (D4). Кінець стрілки вказує на невеликі олігомерні агрегати білка тау всередині пірамідальних гіпокампальних нейронів (D1). Масштабна мітка: 10 мкм.

Фіг. 12. (A) Моноклональне антитіло DC8E8 розпізнає нейрофібрилярну дегенерацію у трансгенних щурів SHR72. DC8E8 розпізнає стадію олігомерного білка тау (стрілки) і стадію вузликів (кінці стрілок) при нейродегенерації білка тау. Більше того, антитіло взаємодіє з неправильно згорненим білком тау, який розташовується в аксональних волокнах (всередині прямокутника). (B) У головному мозку співпадаючих за віком контрольних щурів антитіло не демонструє інтранейронального забарвлення. Масштабна мітка: 20 мкм. DC8E8 також розпізнає всі стадії розвитку утворення вузликів в головному мозку трансгенних щурів (SHR72), як і при хворобі Альцгеймера у людини. DC8E8 розпізнає ранні стадії розвитку утворення вузликів - мономерну, димерну і ранню олігомерну стадію (C) і пізню олігомерну довузликову стадію (D), а також пізні стадії розвитку полімерів патологічного білка тау - внутрішньоклітинні (E) і позаклітинні нейрофібрилярні вузлики (відсутнє ядро) (F). Кінець стрілки в (C) вказує на невеликі олігомерні агрегати білка тау всередині нейронів (A). Масштабна мітка: 10 мкм.

Фіг. 13. (A) Забарвлення за допомогою DC8E8 нейрофібрилярних вузликів в корі трансгенних щурів SHR24, які експресують тау Δ (1-150; 392-441)/3R. (B) DC8E8 розпізнавало нейрофібрилярні вузлики в стовбурі головного мозку трансгенних щурів SHR72, які експресують тау Δ (1-150; 392-441)/4R. Зрізи тканин контрастно забарвлювали метиловим зеленим. Стрілки - нейрофібрилярні вузлики. Масштабна мітка: 50 мкм.

Фіг. 14. Моноклональне антитіло DC8E8 розпізнає як розчинний (A), так і нерозчинний білок тау (B) в зразках головного мозку, виділених з трансгенних щурів в моделі SHR24 (ізокортекс) і від пацієнтів з хворобою Альцгеймера (тканина алокортекса, що включає гіпокамп, ентормінальну і темпоральну кору). Кінець стрілки - укорочений білок тау людини, стрілка - ендогенний білок тау щура. Для розчинних фракцій білка тау наносили 15 мкг білка на доріжку. Для нерозчинних фракцій білка тау осад розчиняли в 1× буфері для нанесення зразків з додецилсульфатом натрію (SDS) в 1/50 об'єму 1S, наносили той же об'єм, як і у випадку розчинних фракцій. Моноклональне антитіло DC8E8 розпізнає як розчинні, так і нерозчинні білки тау в зразках головного мозку, виділених у пацієнтів з хворобою Альцгеймера (тканина алокортекса, що включає гіпокамп, ентормінальну і темпоральну кору) (C) і з трансгенних щурів в моделі SHR72 (стовбур головного мозку) (D). Стрілка - фізіологічні білки тау людини (A) і ендогенний білок тау щура (B), кінець стрілки - укорочений тау людини (тау Δ (1-150; 392-441)/4R), експресований як трансген в нейронах щурів SHR72 (D). Для розчинних фракцій білка тау наносили 15 мкг загального білка на доріжку. Для нерозчинних фракцій білка тау осад розчиняли в 1× буфері для нанесення зразків з додецилсульфатом натрію (SDS) в 1/50 об'єму 1S, наносили той же об'єм, як і у випадку розчинних фракцій.

Фіг. 15. DC8E8 інгібує патологічну взаємодію тау-тау у флуоресцентному аналізі фібрилізації білка тау. За допомогою гепарину здійснювали індукцію конформаційних змін і фібрилізації тауΔ(1-150; 392-441)/4R (фіг. 15A) або тауΔ(1-296; 392-441)/4R (фіг. 15B) при вимірюванні по флуоресценції тіофлавіну T; mAb DC8E8, Rab50 і DC11 досліджували відносно їх здатності попереджати патологічну зміну конформації.

Фіг. 16. Аналіз інгібіторного потенціалу DC8E8 відносно запобігання утворенню димерів, тримерів і олігомерів білка тау для укороченого білка тауΔ(1-296;392-441)/4R за допомогою імуноблотингу з використанням кон'югованого з HRP mAb DC25.

Фіг. 17. Захоплення і деградація тауΔ(1-150; 392-441)/4R клітинами мікроглії BV2. ТауΔ(1-150; 392-441)/4R додавали до клітин BV2 миші або окремо (1 мкМ), або в комплексі з моноклональним антитілом DC8E8 (1 мкМ тауΔ(1-150; 392-441)/4R+1 мкМ DC8E8). Після інкубації протягом різних періодів часу (2, 4, 6 і 12 годин), клітини BV2 промивали кислотою, екстрагували клітинні білки і аналізували рівні інтерналізованого білка тау вестерн-блотингом із загальним антитілом проти тау DC25. ТауΔ(1-150; 392-441)/4R мітили імунною міткою в клітинних лізатах (внутрішньоклітинний білок тау) (A) і в середовищі для культивування клітин (позаклітинний білок тау) (B). Антитіло DC8E8 візуалізували за допомогою кон'югованого з HRP антитіла проти антитіл миші. На доріжку наносили 20 г білка.

Фіг. 18. Стабільність (термін зберігання) DC8E8 при 37 °C, при дослідженні за допомогою ELISA. Антитіло розпізнавало тауΔ(1-150; 392-441)/4R після зберігання протягом декількох місяців (1, 2, 3 і 4 місяці). Планки відповідають серійним розведенням антитіла, як показано. Вимірювання проводили в трьох екземплярах.

Фіг. 19. DC8E8 розпізнає і націлене на неправильно згорнений (що обумовлює захворювання) білок тау в тканинах головного мозку при хворобі Альцгеймера у людини. (A) Аналіз з використанням вестерн-блотингу із загальним антитілом проти білків тау DC25:

4) біохімічна екстракція патологічного білка тау з тканин головного мозку при хворобі Альцгеймера людини (Greenberg and Davies, 1989);

5) імітуюче антитіло (Rab50) не розпізнає білок тау;

6) DC8E8 розпізнає і націлене на неправильно згорнений (що обумовлює захворювання) білок тау в тканинах головного мозку при хворобі Альцгеймера людини.

(B) Забарвлення понсо S: 2), 3) контроль кількості антитіла (Rab50 і DC8E8), використаної в експерименті.

Фіг. 20. DC8E8 розпізнає і націлене на неправильно згорнений (пов'язаний із захворюванням) білок тау в тканинах головного мозку в моделі AD на щурах SHR72. (A) Аналіз з використанням вестерн-блотингу із загальним антитілом проти білка тау DC25:

1) біохімічна екстракція патологічного білка тау з тканин головного мозку при хворобі Альцгеймера людини (Greenberg and Davies, 1989);

2) імітуюче антитіло (Rab50) не розпізнає білок тау;

3) DC8E8 розпізнає і націлене на неправильно згорнений (що обумовлює захворювання) білок тау в тканинах головного мозку при хворобі Альцгеймера людини.

(B) Забарвлення понсо S: 2), 3) контроль кількості антитіла (Rab50 і DC8E8), використаної в експерименті.

Фіг. 21. In vivo, DC8E8 націлене на патологічні форми білка тау в головному мозку трансгенних щурів (SHR72) і транспортує патологічний білок тау з головного мозку в периферичну кров. (A) Концентрація антитіла DC8E8 в сироватці тварин, яким вводили DC8E8, досягала 466, 200 і 273 пг/мл, відповідно. Спостерігали (B) транспорт in vivo комплексів DC8E8-тау з головного мозку в периферичну кров. Патологічний білок тау досягав середньої концентрації 350 пг/мл сироватки. Активний транспорт білка тау за допомогою DC8E8 усуває патологічні білки тау з головного мозку. З іншого боку, не було виявлено білків тау в сироватці тварин, яким вводили імітуюче антитіло (Rab50), яке розпізнає вірус сказу (Masikova et al., 1992). Концентрацію білка тау в сироватці тварин, яким проводили введення, визначали за допомогою Innotest hTAU ELISA (Innogenetics, Belgium). На графіку представлені середні значення зі стандартними помилками середнього значення (SEM). Кожна з 8 планок для щурів А-С вказує на відмінне послідовне розведення сироватки (від розведення в 100 разів до розведення в 12800 разів, зліва направо).

Фіг. 22. Моноклональне антитіло DC8E8 усуває патологічний білок тау з головного мозку трансгенних щурів (SHR72). (A) Внутрішньомозкове застосування DC8E8 (ліва панель) усуває (стрілки) патологічний білок тау з нейронів в порівнянні з тваринами, яким проводили імітуюче введення (права панель). (B) Кількісне визначення патологічного білка тау в нейронах тварин з імітуючим введенням і введенням DC8E8 продемонструвало значне зменшення кількості патологічного білка тау у тварин, яким вводили DC8E8 ($p < 0,0001$).

Фіг. 23. Реконбінантний фрагмент scFv (scDC8E8v) моноклонального антитіла DC8E8, експресованого в бактеріях, розпізнає патологічний неправильно невпорядкований тау Δ (1-150; 392-441)/4R. (A) Забарвлення кумасі діамантовим блакитним неочищених лізатів контрольних бактерій BL21 і бактерій, що містять експресуючу плазмиду scDC8E8v, розділених за допомогою 10 % SDS-PAGE: доріжка 1, неочищений лізат контрольних бактерій BL21; доріжка 2, неочищений лізат бактерій BL21, експресуючих scDC8E8v; і доріжка M, маркер молекулярної маси білка (Page Ruler Prestained Protein Ladder #SM0672, Fermentas). (B) Забарвлена понсо S нітроцелюлозна мембрана, що містить білки тау: доріжка 1, тау Δ (1-150; 392-441)/4R, 500 нг; доріжка 2, тау Δ (1-150; 392-441)/4R, 250 нг; доріжка 3, тау Δ (1-150; 392-441)/4R, 125 нг; доріжка 4, тау Δ 228-441, 50 нг; і доріжка M, маркер молекулярної маси білка. (C) Вестерн-блот/нітроцелюлозна мембрана, що містять білки тау, нанесені згідно з (B), досліджені за допомогою лізату бактерій, експресуючих scDC8E8v. (D) Вестерн-блот/нітроцелюлозна мембрана, що містить білки тау, нанесені згідно з (B), досліджені за допомогою негативного контрольного бактеріального лізату.

Фіг. 24. Реконбінантний фрагмент scFv моноклонального антитіла DC8E8 (scDC8E8v) виявляє властивості зв'язування білка тау, схожі з антитілом DC8E8 - селективно розпізнає тау Δ (1-150; 392-441)/4R. (A) Кінетичне визначення афінності за допомогою SPR для зв'язування scDC8E8v з тау Δ (1-150; 392-441)/4R при AD. (B) Кінетичне визначення афінності за допомогою SPR для зв'язування scDC8E8v з тау 2N4R. (C) Константи швидкостей (k_{on} і k_{off}) і рівноважна константа асоціації для зв'язування scDC8E8v.

Фіг. 25. Ідентифікація залишків в активному центрі scDC8E8v, які впливають на розпізнавання scDC8E8v/DC8E8 неправильно невпорядкованого білка тау. (A) Забарвлення кумасі діамантовим блакитним поліакриламідних гелів після розділення білків з неочищеного лізату бактерій BL21, що містять експресуючу плазмиду scDC8E8v (wt) і її мутантні форми. Кожна пронумерована доріжка відповідає відповідному номеру клону (наприклад доріжка 2 відповідає 2-VL-R33A). Експресовані одноланцюжкові білки вказані зірочками. Контрольні бактеріальні культури не експресують одноланцюжкові білки. (B) Забарвлена понсо S нітроцелюлозна мембрана, що містить білки тау: доріжка 1, тау Δ (1-150; 392-441)/4R, 500 нг; доріжка 2, тау Δ (1-150; 392-441)/4R, 250 нг; доріжка 3, тау Δ (1-150; 392-441)/4R, 125 нг. (C) Вестерн-блотинг на нітроцелюлозних мембранах, що містять білки тау, нанесені згідно з (B), які досліджували за допомогою лізатів бактерій, експресуючих або scDC8E8v (гель wt), або одну з мутантних форм (блоти з 1-VL-N31A по 22-VH-G102A).

Фіг. 26. (A) Схематичне представлення тау 2N4R (SEQ ID NO: 102) з чотирма епітопами DC8E8, показаними за допомогою заштрихованих рамок в збільшеній області між залишками 261 і 373 (SEQ ID NO: 246), SEQ ID NO: 98-101, відповідно. (1) Схематичне представлення перекривання пептидних імуногенів, що походять з білка тау, які містять щонайменше одну з чотирьох областей білка тау, розпізнаваних антитілом DC8E8, для застосування як активних вакцин або для очищення антитіл DC8E8 і т. п.; (2) загальна можливість для інших модифікованих або сконструйованих пептидів і сполук, з необов'язковими частинами. (B) Узагальнення аналізу за допомогою імуноблотингу нерозчинних білків тау, одержаних зі стовбура головного мозку трансгенних щурів (SHR72, експресуючі тау Δ (1-150; 392-441)/4R), яким вводили пептиди SEQ ID NO: 1-8 і 108. Аналіз за допомогою імуноблотингу проводили з різними mAb для визначення зниження кількості нерозчинного білка тау по наступних епітопах, що мають значення при AD: mAb DC25 (тау 347-353), mAb DC217 (тау pThr217), mAb DC209 (тау pThr231), mAb AT8 (тау pSer202/pThr205) і mAb AT270 (тау pThr181). (C) Денситометричний аналіз за допомогою імуноблотингу нерозчинних білків тау, одержаних зі стовбура головного мозку щурів, яким вводили 251-PDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINK-280 (SEQ ID NO: 1) в комбінації з ад'ювантом, і з контрольних щурів, яким вводили тільки ад'ювант. Середні величини представлені зі стандартною помилкою середнього значення.

Фіг. 27. Нейроповедінкова оцінка трансгенних щурів (SHR72) в моделі AD, яким вводили тау 251-PDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINK-280 (SEQ ID NO:1). Через десять діб після 5-ї дози імуногена трансгенних щурів використовували для поведінкового дослідження. На діаграмах представлено середнє значення $\pm$ SEM. Всі статистичні дані одержували з використанням непараметричного U-критерію Манна-Уїтні. (A) Випробування ходіння по перекладині (перекладина 3,5 см). (B) Число зісковзувань задніх кінцівок (перекладина 3,5 см). (C) NeuroScale.

Фіг. 28. Вакцинація трансгенних щурів SHR72 тау-пептидом SEQ ID NO: 1 забезпечила 49 % зниження навантаження нейрофібрилярними вузликами (NFT). Для оцінки NFT в тканинах головного мозку трансгенних щурів SHR72 використовували антитіло AT8.

Фіг. 29. Кількісний аналіз за допомогою імуноблотингу нерозчинних білків тау, одержаних зі стовбура головного мозку трансгенних щурів (SHR72), яким вводили тау 256-VKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLS-285 (SEQ ID NO: 2) з ад'ювантом, або контрольних щурів, яким вводили тільки ад'ювант. Середні значення представлені зі стандартною помилкою середнього значення.

Фіг. 30. Нейроповедінкова оцінка трансгенних щурів (SHR72), яким вводили 256-VKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLS-285 (SEQ ID NO: 2). Всі статистичні дані одержували з використанням непараметричного U-критерію Манна-Уїтні. (А) Випробування ходіння по перекладині (перекладина 3,5 см). (В) Число зісковзувань задніх кінцівок (перекладина 3,5 см). (С) NeuroScale.

Фіг. 31. Вакцинація трансгенних щурів SHR72 тау-пептидом SEQ ID NO: 2 забезпечила 60 % зниження навантаження нейрофібрилярними вузликами (NFT). Для оцінки NFT в тканинах головного мозку трансгенних щурів SHR72 використовували антитіло AT8.

Фіг. 32. Кількісний аналіз за допомогою імуноблотингу нерозчинних білків тау, одержаних зі стовбура головного мозку трансгенних щурів (SHR72), яким вводили 256-VKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLS-285 з фосфорилованим Ser262 (SEQ ID NO: 2) з ад'ювантом, або контрольних щурів, яким вводили тільки ад'ювант. Середні значення представлені зі стандартною помилкою середнього значення.

Фіг. 33. Вакцинація трансгенних щурів SHR72 тау-пептидом SEQ ID NO: 2/фосфо забезпечувала 77 % зниження навантаження нейрофібрилярними вузликами (NFT). Для оцінки NFT в тканинах головного мозку трансгенних щурів SHR72 використовували антитіло AT8.

Фіг. 34. Кількісний аналіз за допомогою імуноблотингу нерозчинних білків тау, одержаних зі стовбура головного мозку трансгенних щурів (SHR72), яким вводили тау 259-KIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQ-288 (SEQ ID NO: 3) з ад'ювантом, або контрольних щурів, яким вводили тільки ад'ювант. Середні значення представлені зі стандартною помилкою середнього значення.

Фіг. 35. Нейроповедінкова оцінка трансгенних щурів (SHR72), яким вводили тау 259-KIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQ-288 (SEQ ID NO: 3). Всі статистичні дані одержували з використанням непараметричного U-критерію Манна-Уїтні. (А) Випробування ходіння по перекладині (перекладина 3,5 см). (В) Число зісковзувань задніх кінцівок (перекладина 3,5 см). (С) NeuroScale.

Фіг. 36. Вакцинація трансгенних щурів SHR72 тау-пептидом SEQ ID NO: 3 забезпечила 58 % зниження навантаження нейрофібрилярними вузликами (NFT). Для оцінки NFT в тканинах головного мозку трансгенних щурів SHR72 використовували антитіло AT8.

Фіг. 37. Кількісний аналіз за допомогою імуноблотингу нерозчинних білків тау, одержаних зі стовбура головного мозку трансгенних щурів (SHR72), яким вводили тау 275-VQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGG-304 (SEQ ID NO: 4), або контрольних щурів, яким вводили тільки ад'ювант. Середні значення представлені зі стандартною помилкою середнього значення.

Фіг. 38. Вакцинація трансгенних щурів SHR72 тау-пептидом SEQ ID NO: 4 продемонструвала помірне поліпшення нейроповедінкових параметрів. (А) Випробування ходіння по перекладині (перекладина 3,5 см). (В) Число зісковзувань задніх кінцівок (перекладина 3,5 см). (С) NeuroScale. Дані представлені як середні значення зі стандартною помилкою середнього значення.

Фіг. 39. Вакцинація трансгенних щурів SHR72 тау-пептидом SEQ ID NO: 4 забезпечила 66 % зниження навантаження нейрофібрилярними вузликами (NFT). Для оцінки NFT в тканинах головного мозку трансгенних щурів SHR72 використовували антитіло AT8.

Фіг. 40. Аналіз за допомогою імуноблотингу нерозчинних білків тау, одержаних зі стовбура головного мозку трансгенних щурів (SHR72), які імунізовані 201-GSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREPCKVAVVR-230, що містять фосфорилований треонін в положенні 217 (SEQ ID NO: 5) з ад'ювантом, або контрольних щурів, яким вводили тільки ад'ювант. Середні значення представлені зі стандартною помилкою середнього значення.

Фіг. 41. Нейроповедінкова оцінка трансгенних щурів (SHR72), яким вводили тау 201-GSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREPCKVAVVR-230/вміщуючий фосфорилований треонін в положенні 217 (SEQ ID NO: 5). Всі статистичні дані одержували з використанням непараметричного U-критерію Манна-Уїтні. (А) Випробування ходіння по перекладині (перекладина 3,5 см). (В) Число зісковзувань задніх кінцівок (перекладина 3,5 см). (С) NeuroScale.

Фіг. 42. Вакцинація трансгенних щурів SHR72 тау-пептидом SEQ ID NO: 5 не продемонструвала ефекту на навантаження нейрофібрилярними вузликами (NFT). Для оцінки NFT в тканинах головного мозку трансгенних щурів SHR72 використовували антитіло AT8.

5 Фіг. 43. Аналіз за допомогою імуноблотингу нерозчинних білків тау, одержаних зі стовбура головного мозку трансгенних щурів (SHR72), імунізованих тау 379-RENAKAKTDHGAEIVYKSPWSGDTSPRHL-408, що містить фосфориловані залишки серину в положеннях 396 і 404 (SEQ ID NO: 6), з ад'ювантом, або контрольних щурів, яким вводили тільки ад'ювант. Середні значення представлені зі стандартною помилкою середнього значення.

10 Фіг. 44. Нейроповедінкова оцінка трансгенних щурів (SHR72), яким вводили білок тау SEQ ID NO: 6, фосфорилований по Ser396/Ser404. Всі статистичні дані одержували з використанням непараметричного U-критерію Манна-Уїтні. (A) Випробування ходіння по перекладині (перекладина 3,5 см). (B) Число зісковзувань задніх кінцівок (перекладина 3,5 см). (C) NeuroScale.

15 Фіг. 45. Вакцинація трансгенних щурів SHR72 тау-пептидом SEQ ID NO: 6 продемонструвала відсутність зниження навантаження нейрофібрилярними вузликами (NFT). Для оцінки NFT в тканинах головного мозку трансгенних щурів SHR72 використовували антитіло AT8.

20 Фіг. 46. Аналіз за допомогою імуноблотингу нерозчинних білків тау, одержаних зі стовбура головного мозку щурів (SHR72), імунізованих тау 181-TPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSR-210, що містить фосфорилований залишок серину в положенні 202 і залишок треоніну в положенні 205 (SEQ ID NO: 7), з ад'ювантом, або контрольних щурів, яким вводили тільки ад'ювант. Середні значення представлені зі стандартною помилкою середнього значення.

25 Фіг. 47. Нейроповедінкова оцінка щурів SHR72, яким вводили тау 181-TPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSR-210, що містить фосфорилований залишок серину в положенні 202 і залишок треоніну в положенні 205 (SEQ ID NO: 7). Всі статистичні дані одержували з використанням непараметричного U-критерію Манна-Уїтні. (A) Випробування ходіння по перекладині (перекладина 3,5 см). (B) Число зісковзувань задніх кінцівок (перекладина 3,5 см). (C) NeuroScale.

30 Фіг. 48. Вакцинація трансгенних щурів SHR72 тау-пептидом SEQ ID NO: 7 продемонструвала відсутність ефекту на навантаження нейрофібрилярними вузликами (NFT). Для оцінки NFT в тканинах головного мозку трансгенних щурів SHR72 використовували антитіло AT8.

35 Фіг. 49. Аналіз за допомогою імуноблотингу нерозчинних білків тау, одержаних зі стовбура головного мозку щурів (SHR72), імунізованих тау 300-VPGGGSVQIVYKPVDSLK-317 (SEQ ID NO: 8) з ад'ювантом, або контрольних щурів, яким вводили тільки ад'ювант. Середні значення представлені зі стандартною помилкою середнього значення.

40 Фіг. 50. Нейроповедінкова оцінка трансгенних щурів з AD (SHR72), яким вводили тау 300-VPGGGSVQIVYKPVDSLK-317 (SEQ ID NO: 8). Всі статистичні дані одержували з використанням непараметричного U-критерію Манна-Уїтні. (A) Випробування ходіння по перекладині (перекладина 3,5 см). (B) Число зісковзувань задніх кінцівок (перекладина 3,5 см). (C) NeuroScale.

Фіг. 51. Вакцинація трансгенних щурів SHR72 тау-пептидом SEQ ID NO: 8 продемонструвала відсутність зниження навантаження нейрофібрилярними вузликами (NFT). Для оцінки NFT в тканинах головного мозку трансгенних щурів SHR72 використовували антитіло AT8.

45 Фіг. 52. Вакцинація трансгенних щурів SHR72 тау-пептидом (SEQ ID NO: 108) статистично значущо знижувала рівень нерозчинного патологічного білка тау ($p < 0,001$). Патологічний нерозчинний білок тау екскретувався з головного мозку трансгенних щурів SHR72, імунізованих тау-пептидом і аналізованих за допомогою імуноблотингу. Середні значення представлені зі стандартною помилкою середнього значення.

50 Фіг. 53. Вакцинація трансгенних щурів SHR72 тау-пептидом (SEQ ID NO: 108) статистично значущо поліпшувала нейроповедінкові параметри ($p < 0,05$). (A) Випробування ходіння по перекладині (перекладина 3,5 см). (B) Число зісковзувань задніх кінцівок (перекладина 3,5 см). (C) NeuroScale. Дані представлені як середні значення зі стандартною помилкою середнього значення.

55 Фіг. 54. Вакцинація трансгенних щурів SHR72 тау-пептидом (SEQ ID NO: 108) забезпечила 60 % зниження навантаження нейрофібрилярними вузликами (NFT). Для оцінки NFT в тканинах головного мозку трансгенних щурів SHR72 використовували антитіло AT8.

Фіг. 55. ELISA антисироватки, одержаної імунізацією трансгенних щурів (SHR72) тау-пептидом 275-VQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNKHVPGGG-304 (SEQ ID NO: 4), демонструє

відмінність зв'язування антисироваток з патологічним тау Δ (1-150; 392-441)/4R людини і фізіологічним білком тау людини 2N4R.

Фіг. 56. Вакцинація трансгенних щурів SHR72 тау-пептидом SEQ ID NO: 108 індукувала утворення антитіл, що переважно зв'язуються з патологічним білком тау. Геометричні середні титри антитіл, виміряні за допомогою ELISA, демонструють, що антитіла, індуковані вакцинацією тау-пептидом SEQ ID NO: 108, мали найбільш високу активність зв'язування з імуногеном (пептид SEQ ID NO: 108) і з патологічним тау Δ (1-150; 392-441)/4R. Фізіологічний білок тау (тау 2N4R), який використовували як контроль, розпізнавався слабкіше.

Фіг. 57. Вакцинація трансгенних щурів SHR72 тау-пептидом SEQ ID NO: 108 переважно індукувала утворення ізотипів IgG-антитіл, специфічних до патологічного білка тау. Представлений профіль ізотипів антитіл, індукованих тау-пептидом SEQ ID NO: 108. Сироватки окремих щурів розбавляли 1:800 і активність зв'язування з патологічним білком тау Δ (1-150; 392-441)/4R аналізували за допомогою ELISA.

Фіг. 58. Визначення за допомогою SPR афінності антисироваток, одержаних імунізацією щурів SHR72 тау-пептидом 275-VQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGG-304 (SEQ ID NO: 4), відносно зв'язування з тау Δ (1-150; 392-441)/4R людини і тау 2N4R людини.

Фіг. 59. Імуногістохімічне забарвлення головного мозку пацієнта-людини з AD антитілами щура, одержаними імунізацією трансгенних щурів (SHR72) тау 275-VQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGG-304 (SEQ ID NO: 4). (A) Антисироватки розпізнавали нейрофібрилярні осередки в головному мозку при хворобі Альцгеймера, в гіпокампі. (B) Більш високе збільшення продемонструвало нейрофібрилярні вузлики. Масштабні мітки: 100 мкм (A), 10 мкм (B).

Фіг. 60. Вакцинація трансгенних щурів SHR72 тау-пептидом SEQ ID NO: 108 індукувала антитіла, що розпізнають патологічні білки тау в зрізах тканин головного мозку людини при хворобі Альцгеймера. Репрезентативне імунне забарвлення сироватки щура № 3 (A), 5 (B), 6 (C), 7 (D) і 8 (E) демонструє, що всі досліджені антитіла сироватки щура розпізнавали нейрофібрилярні вузлики в шарі пре- α енторинальної кори пацієнта з хворобою Альцгеймера. Об'єднані сироватки щурів, імунізованих тільки ад'ювантом, використовували як негативний контроль (F). Використовували серійні зрізи тканин головного мозку з енторинальної кори. Масштабна мітка: 50 мкм.

Фіг. 61. Вакцинація трансгенних щурів SHR72 пептидом SEQ ID NO: 108 індукувала специфічні антитіла, що розпізнають патологічні білки в головному мозку людини при хворобі Альцгеймера, а також в головному мозку трансгенних щурів SHR72. Патологічний білок тау екстрагували з тканин головного мозку людини і щура і аналізували за допомогою імуноблотингу з об'єднаними сироватками від імунізованих пептидом SEQ ID NO: 108 трансгенних щурів SHR72. Сироваткові антитіла розпізнавали мономерний (доріжка № 1, 2 і 3) і олігомерний (доріжка № 2 і 3) патологічний білок тау, включаючи характерний для AD патологічний білок тау A β 8.

Фіг. 62. Імунізація мишей тау-пептидом SEQ ID NO: 109 індукувала антитіла зі статистично значущо більш високою активністю зв'язування з патологічним білком тау Δ (1-150; 392-441)/4R, ніж з фізіологічним білком тау 2N4R ($p=0,0115$). На графіку представлена статистична оцінка результатів ELISA для окремих сироваток, розбавлених 1:800. Середні значення представлені зі стандартною помилкою середнього значення.

Фіг. 63. Імунізація мишей тау-пептидом SEQ ID NO: 110 індукувала антитіла, що мають статистично значущо більш високу активність зв'язування з патологічним білком тау Δ (1-150; 392-441)/4R, ніж з фізіологічним білком тау 2N4R ($p=0,0029$). На графіку представлена статистична оцінка результатів ELISA для окремих сироваток, розбавлених 1:800. Середні значення представлені зі стандартною помилкою середнього значення.

Фіг. 64. Імунізація мишей тау-пептидом SEQ ID NO: 111 індукувала антитіла, що мають статистично значущо більш високу активність зв'язування з патологічним білком тау Δ (1-150; 392-441)/4R, ніж з фізіологічним білком тау 2N4R ($p=0,0007$). На графіку представлена статистична оцінка результатів ELISA для окремих сироваток, розбавлених 1:800. Середні значення представлені зі стандартною помилкою середнього значення.

Фіг. 65. Імунізація мишей тау-пептидом SEQ ID NO: 112 індукувала антитіла, що мають статистично значущо більш високу активність зв'язування з патологічним білком тау Δ (1-150; 392-441)/4R, ніж з фізіологічним білком тау 2N4R ($p<0,001$). На графіку представлена статистична оцінка результатів ELISA для окремих сироваток, розбавлених 1:800. Середні значення представлені зі стандартною помилкою середнього значення.

Фіг. 66. Сконструйовані терапевтичні епітопи GWSIHSPGGGSC (SEQ ID NO: 250) і SVFQHLPGGGSC (SEQ ID NO: 251) конкурували з патологічним тау Δ (1-150; 392-441)/4R за зв'язування з антитілом DC8E8.

5 Фіг. 67. Сконструйовані терапевтичні епітопи GWSIHSPGGGSC (SEQ ID NO: 250) і SVFQHLPGGGSC (SEQ ID NO: 251) індукували продукцію антитіл, які статистично значущо розрізнявали патологічний тау Δ (1-150; 392-441)/4R і фізіологічний білок тау 2N4R, при аналізі за допомогою ELISA. Сироватки (в розведенні 1:3200) мишей, імунізованих одним з пептидів 250 і 251, досліджували відносно антитіл, специфічних до білків тау: патологічний білок тау Δ (1-150; 392-441)/4R і фізіологічний білок тау 2N4R, за допомогою ELISA.

10 Фіг. 68. Імунізація сконструйованими терапевтичними епітопами GWSIHSPGGGSC (SEQ ID NO: 250) і SVFQHLPGGGSC (SEQ ID NO: 251) індукувала найбільш стійку продукцію антитіл ізотипу IgG1.

15 Фіг. 69. Вимірювання за допомогою кількісного SPR (поверхневий плазмонний резонанс) демонструють, що антитіла, індуковані сконструйованим терапевтичним епітопом 1 (GWSIHSPGGGSC, SEQ ID NO: 250) (фіг. 69A) і сконструйованим терапевтичним епітопом 2 (SVFQHLPGGGSC, SEQ ID NO: 251) (фіг. 69B), статистично значущо ($p < 0,001$ і $p < 0,01$, відповідно) розрізнявали патологічний білок тау Δ (1-150; 392-441)/4R і фізіологічний білок тау 2N4R.

20 Фіг. 70. Імуногістохімічне забарвлення тканин головного мозку людини із захворюванням AD сироватками проти сконструйованого терапевтичного епітопа 1 (GWSIHSPGGGSC, SEQ ID NO: 250) і сконструйованого терапевтичного епітопа 2 (SVFQHLPGGGSC, SEQ ID NO: 251). (A) Антисироватки проти сконструйованого терапевтичного епітопа 1 розпізнавали нейрофібрилярну патологію в головному мозку пацієнта з AD. (C) Високе збільшення нейрофібрилярного вузлика і нейропільних ниток (стрілки). (B) Антисироватки проти сконструйованого терапевтичного епітопа 2 розпізнавали нейрофібрилярну патологію в головному мозку пацієнта з AD. (D) Високе збільшення забарвленого нейрофібрилярного вузлика і нейропільних ниток (стрілки). Антисироватки проти сконструйованого терапевтичного епітопа 1 і сконструйованого терапевтичного епітопа 2 не розпізнавали нормальний білок тау в контрольному головному мозку людини (E, F). Масштабна мітка: 50 мкм (A, B, E, F), 20 мкм (C, D). (G) Сироватка, одержана проти сконструйованого терапевтичного епітопа 2 (SVFQHLPGGGSC, SEQ ID NO: 251), розпізнає нейрофібрилярні осередки у трансгенних щурів SHR72. (H) У головному мозку співпадаючих за віком контрольних щурів антитіло не демонструє інтранейронального забарвлення. Сироватка розпізнає олігомерну довузликову стадію (I), а також внутрішньоклітинну (J). Масштабна мітка: 20 мкм (A, B), 10 мкм (C, D).

35 Фіг. 71. Антитіла, індуковані сконструйованим терапевтичним епітопом 1 (GWSIHSPGGGSC, SEQ ID NO: 250) і сконструйованим терапевтичним епітопом 2 (SVFQHLPGGGSC, SEQ ID NO: 251), розпізнавали розчинний і нерозчинний в саркозилі патологічний білок тау, виділений з тканин головного мозку людини при хворобі Альцгеймера.

40 Фіг. 72. Антитіла, індуковані сконструйованим терапевтичним епітопом 1 (GWSIHSPGGGSC, SEQ ID NO: 250) і сконструйованим терапевтичним епітопом 2 (SVFQHLPGGGSC, SEQ ID NO: 251), розпізнавали розчинний (доріжка 1, 3, 5) і нерозчинний (доріжка 2, 4, 6) патологічний білок тау, виділений з головного мозку в моделі хвороби Альцгеймера на щурах (SHR72).

45 Фіг. 73. Імуноterapia сконструйованим терапевтичним епітопом 2 (SVFQHLPGGGSC, SEQ ID NO: 251) продемонструвала значне поліпшення нейроповедінкових параметрів (NeuroScale) у щурів SHR72, яким проводили введення. (A) Випробування ходіння по перекладині. (B) Число зісковзувань задніх кінцівок ($p < 0,05$). (C) NeuroScale. Щури, яким вводили сконструйований терапевтичний епітоп 2 (SEQ ID NO: 251), продемонстрували: а) зниження латентності виходу на 27 % у випробуванні ходіння по перекладині, б) зниження кількості зісковзувань задніх кінцівок на 44 % ($p < 0,05$), і с) зниження показника NeuroScale на 26 % в порівнянні з трансгенними контрольними щурами, яким вводили тільки ад'ювант. Всі статистичні дані одержували з використанням непараметричного U-критерію Манна-Уїтні.

50 Фіг. 74. Імуноterapia сконструйованим терапевтичним епітопом 2 (SVFQHLPGGGSC, SEQ ID NO: 251) продемонструвала статистично значуще зниження рівня патологічного білка тау в головному мозку імунізованих трансгенних щурів SHR72 з хворобою Альцгеймера. Імуноterapia статистично значущо ($p < 0,05$) знижувала кількість патологічного нерозчинного білка тау у імунізованих тварин в порівнянні з контрольними трансгенними щурами, яким вводили тільки ад'ювант. Зниження патологічного нерозчинного тау спостерігали для всіх проаналізованих епітопів білка тау ($P < 0,05$).

Фіг. 75. (А) Схематичне представлення синтетичних пептидів, використаних для подальшої оцінки мінімального епітопа DC8E8 (терапевтичний центральний елемент) і визначення імуногенного потенціалу; і (В) їх амінокислотні послідовності.

Фіг. 76. Визначення мінімального епітопа DC8E8 (терапевтичний центральний елемент) з використанням синтетичних пептидів за допомогою конкурентного ELISA. Десять тау-пептидів (SEQ ID NO: 270, 271, 272, 275, 276, 277, 280, 281, 282 і 283), які містять щонайменше 6 амінокислот послідовності розпізнавання DC8E8, здатні конкурувати з патологічним тауΔ(1-150; 392-441)/4R за зв'язування з антитілом DC8E8. Тау-пептиди, що містять тільки 5 амінокислот послідовності розпізнавання DC8E8 (SEQ ID NO: 273, 274, 278 і 279), не конкурують з тауΔ(1-150; 392-441)/4R (SEQ ID NO: 199) за зв'язування з антитілом DC8E8.

Фіг. 77. Індукція специфічних до білка тау антитіл після імунізації мишей C57BL тау-пептидами. (А) 12-мерні, 7-мерні і 6-мерні пептиди (SEQ ID NO: 270, 271 і 272, відповідно) є імуногенними. Антитіла, індуковані імунізацією, виявляють статистично значущо більш високу активність зв'язування з патологічним тауΔ(1-150; 392-441)/4R, ніж з фізіологічним білком тау 2N4R ($p < 0,0079$; $p < 0,0052$; $p < 0,0079$, відповідно). 5-мерні пептиди SEQ ID NO: 273 і 274 не є імуногенними. (В) 42-мерні, 19-мерні, 7-мерні і 6-мерні пептиди (SEQ ID NO: 275, 280, 276 і 277, відповідно) є імуногенними. Антитіла, індуковані цими пептидами, статистично значущо ($p < 0,0079$, $p < 0,0159$, $p < 0,0079$ і $p < 0,0379$, відповідно) розрізнявали патологічний тауΔ(1-150; 392-441)/4R і фізіологічний білок тау 2N4R. 5-мерні пептиди SEQ ID NO: 278 і 279 не є імуногенними. (С) 7-мерні пептиди (SEQ ID NO: 281 і 283) є імуногенними. Антисироватки проти цих пептидів статистично значущо ($p < 0,0379$ і $p < 0,0286$, відповідно) розрізнявали патологічний тауΔ(1-150; 392-441)/4R і фізіологічний білок тау 2N4R. Рівні антитіл до патологічного білка тау і фізіологічного білка тау, індукованих 6-мерним пептидом SEQ ID NO: 282, були дуже низькими. На графіках представлена статистична оцінка результатів ELISA для окремих сироваток, розбавлених 1:800. Середні значення представлені зі стандартною помилкою середнього значення.

Фіг. 78. Геометричні середні титри антитіл, специфічних до білка тау антитіл після імунізації мишей C57BL тау-пептидами. Вакцинація мишей C57BL тау-пептидом SEQ ID NO: 270, 271, 272, 275, 276, 277, 280, 281 і 283 індукувала утворення специфічних до білка тау антитіл. Геометричні середні титри антитіл, виміряні за допомогою ELISA, демонструють, що антитіла, індуковані вакцинацією тау-пептидом SEQ ID NO: 270, 271, 272, 275, 276, 277, 280, 281 і 283, виявляли більш високу активність зв'язування з патологічним тауΔ(1-150; 392-441)/4R, ніж з фізіологічним білком тау 2N4R. Після імунізації мишей тау-пептидами SEQ ID NO: 273, 274, 278, 279 і 282 були виявлені більш низькі титри специфічних до білка тау антитіл.

Фіг. 79А і 79В. Представлений профіль ізотипів антитіл, індукованих тау-пептидами. Імунізація мишей C57/BL тау-пептидами, що містять мінімальний епітоп DC8E8, переважно індукувала утворення антитіл ізотипів IgG1 і IgG2b, специфічних до патологічного білка тау. Об'єднані сироватки окремих мишей розбавляли 1:800 і активність зв'язування з патологічним білком тауΔ(1-150; 392-441)/4R аналізували за допомогою ELISA.

Фіг. 80. Кількісна оцінка зв'язувальної здатності антитіл, які індукували у мишей C57BL, імунізованих тау-пептидами, з тауΔ(1-150; 392-441)/4R і 2N4R. Вимірювання за допомогою поверхневого плазмонного резонансу (SPR) продемонструвало, що антитіла проти тау-пептидів SEQ ID NO: 270, 271, 272, 275, 276, 277, 280, 281 і 283 статистично значущо (**... $p < 0,001$ і *... $p < 0,01$) розрізнявали патологічний тауΔ(1-150; 392-441)/4R і фізіологічний білок тау 2N4R. K_d - рівноважна константа асоціації для зв'язування.

Фіг. 81. Антитіла, індуковані у мишей, імунізованих тау-пептидами, розпізнають патологічні форми білка тау при вестерн-блотингу. Вакцинація мишей C57BL тау-пептидами SEQ ID NO: 270, 271, 272, 275, 276, 277, 280, 281 і 283 індукувала специфічні антитіла, які розпізнають патологічні білки тау, виділені з тканини головного мозку людини з хворобою Альцгеймера, а також зі стовбура головного мозку трансгенних щурів SHR72. Антисироватки після імунізації мишей пептидами SEQ ID NO: 273, 274, 278, 279 і 282 не розпізнавали патологічні форми білка тау.

Фіг. 82А-С. Нейрофібрилярні вузлики, що розпізнаються індукованими тау-пептидом антитілами, в тканинах головного мозку людини при AD. Вакцинація мишей C57BL тау-пептидами SEQ ID NO: 270, 271, 272, 275, 276, 277, 280, 281 і 283 індукувала антитіла, що розпізнають нейрофібрилярні осередки в гіпокампі головного мозку при хворобі Альцгеймера. Сироватки від мишей, імунізованих тільки ад'ювантом, використовували як негативний контроль. Використовували зрізи тканини головного мозку з гіпокампа CA1. Масштабна мітка: 100 мкм.

Фіг. 83. Узагальнення даних імуногістохімічного забарвлення (і відповідної відносної інтенсивності) тканин головного мозку від пацієнта-людини з AD за допомогою сироваткових антитіл, одержаних імунізацією мишей C57BL тау-пептидами SEQ ID NO: 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282 і 283.

5 ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Термін "антитіло" стосується імуноглобуліну, одержаного способами генетичної інженерії, природного або повністю, або частково синтетично, або рекомбінантно продукованого. Всі його похідні, частини і фрагменти, які зберігають антигензв'язувальні властивості і щонайменше одну з обумовлюваних білком тау характерних властивостей, згідно з винаходом, включені в цей термін. Також термін охоплює будь-який білок, що має зв'язувальний домен, який є гомологічним або більшою мірою гомологічним зв'язувальному домену імуноглобуліну. Ці білки можуть походити з природних джерел або вони можуть бути частково або повністю синтетично або рекомбінантно продукованими. Антитіло може бути моноклональним або поліклональним. Антитіло може бути представником будь-якого класу імуноглобулінів, включаючи будь-який з класів імуноглобулінів людини: IgG, IgM, IgA, IgD і IgE. Похідні класу IgG є переважними в деяких варіантах здійснення даного винаходу.

Терміни "виділене антитіло" і "виділений пептид" стосуються білка або пептиду, продукованих з кДНК, рекомбінантної РНК або будь-якого іншого синтетичного джерела, або деякої їх комбінації; а також білків і пептидів, які за їх походженням або джерелом одержання, або (1) не асоційовані з білками, що зустрічаються в природі, або (2) вільні від інших білків з того ж джерела, наприклад вільні від білків миші, або (3) експресуються клітиною відмінного виду, або (4) не зустрічаються в природі.

Антитіла, згідно з винаходом, включають, крім того, такі антитіла, які мають "консервативні модифікації послідовності" - модифікації нуклеотидної і амінокислотної послідовності, які не впливають або не змінюють згадані вище характеристики антитіла за винаходом. Модифікації можна вносити стандартними способами, відомими в даній галузі, такими як сайт-направлений мутагенез і ПЛР-опосередковуваний мутагенез. Консервативні амінокислотні заміни включають заміни, в яких амінокислотний залишок замінений амінокислотним залишком, що має схожий бічний ланцюг. Сімейства амінокислотних залишків, що мають схожі бічні ланцюги, визначені в даній галузі. Ці сімейства включають амінокислоти з основними бічними ланцюгами (наприклад лізин, аргінін, гістидин), кислотними бічними ланцюгами (наприклад аспарагінова кислота, глутамінова кислота), незарядженими полярними бічними ланцюгами (наприклад гліцин, аспарагін, глутамін, серин, треонін, тирозин, цистеїн, триптофан), неполярними бічними ланцюгами (наприклад аланін, валін, лейцин, ізолейцин, пролін, фенілаланін, метіонін), бета-розгалуженими бічними ланцюгами (наприклад треонін, валін, ізолейцин) і ароматичними бічними ланцюгами (наприклад тирозин, фенілаланін, триптофан, гістидин). Таким чином, передбачений несуттєвий амінокислотний залишок в антитілі проти білка тау може бути замінений іншим амінокислотним залишком з того ж сімейства бічних ланцюгів.

"Фрагменти антитіл" і "частини антитіл" включають частину повнорозмірного антитіла, як правило щонайменше його антигензв'язувальну частину/домен або варіабельну область. Приклади фрагментів антитіл включають діантитіла, одноланцюжкові молекули антитіл, імунотоксини і поліспецифічні антитіла, утворені з фрагментів антитіл. Крім цього, фрагменти антитіл включають одноланцюжкові поліпептиди, що мають характеристики зв'язування VH-ланцюга з патологічним білком тау, а саме здатні збиратися разом з VL-ланцюгом, або зв'язування VL-ланцюга з патологічним білком тау, а саме здатні збиратися разом з VH-ланцюгом, формуючи функціональний антигензв'язувальний карман і, тим самим, забезпечуючи властивість зв'язування з патологічним білком тау. Терміни також включають фрагменти, які самі по собі не здатні забезпечувати ефекторні функції (наприклад ADCC/CDC), але забезпечують цю функцію після комбінування з відповідним константним доменом(ами) антитіла.

Термін "химерне антитіло" стосується моноклонального антитіла, що містить варіабельну область, тобто зв'язувальну область, з одного джерела або виду, і щонайменше частину константної області, що походить з відмінного джерела або виду, звичайно одержуваного способами рекомбінантних ДНК. Особливо переважними є химерні антитіла, що містять варіабельну область миші і константну область людини. Такі химерні антитіла миші/людини є продуктом експресованих генів імуноглобулінів, які містять сегменти ДНК, що кодують варіабельні області імуноглобулінів миші, і сегменти ДНК, що кодують константні області імуноглобулінів людини. Інші форми "химерних антитіл", охоплювані даним винаходом, являють собою форми, в яких клас або підклас модифікований або змінений відносно вихідного антитіла. Такі "химерні" антитіла також називають "антитілами з переключеним класом". Способи

одержання химерних антитіл залучають загальноприйняті способи рекомбінантних ДНК і способи трансфекції генів, на даний час відомі в даній галузі. Див., наприклад, Morrison S.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984), 6851-6855; патенти США №№ 5202238 і 5204244.

Термін "гуманізоване антитіло" стосується антитіл, в яких каркасні області (FR) і/або області, що визначають комплементарність (CDR), модифіковані так, щоб вони містили CDR імунoglobуліну відмінної специфічності в порівнянні з вихідним імунoglobуліном. У одному варіанті здійснення, CDR миші трансплантують в каркасну область антитіла людини з одержанням "гуманізованого антитіла". Див., наприклад, Riechmann L. et al., Nature, 332 (1988), 323-327; і Neuberger M. S. et al., Nature, 314 (1985), 268-270. Особливо переважні CDR відповідають CDR, відповідним послідовностям, що розпізнають антигени і епітопи, описані в даному документі як "терапевтичні епітопи" на білку тау.

Термін "антитіло людини", який використовують в рамках винаходу, включає антитіла, які мають варіабельні і константні області, що походять з послідовностей імунoglobулінів людини ембріонального типу. Константні області антитіла можуть являти собою, наприклад, константні області IgG1-типу людини. Такі області можуть бути алотипічними і описані, наприклад, Johnson G. і Wu T.T., Nucleic Acids Res. 28 (2000), 214-218, і в базах даних, згаданих у вказаному документі, і переважно вони придатні для деяких варіантів здійснення, за умови, що зберігаються властивості індукції ADCC і наприклад CDC, згідно з винаходом.

Термін "рекомбінантне антитіло людини", як використовують в рамках винаходу, включає всі антитіла людини, які одержують, експресують, створюють або виділяють рекомбінантними способами, такі як антитіла, виділені з клітини-хазяїна, такої як клітина NSO або CHO, або з тварини (наприклад миша, така як XENOMOUSE - генетично модифікована миша, яка продукує антитіла, що мають амінокислотні послідовності антитіл людини, наприклад амінокислотні послідовності каркасної області людини (FR) і константної області людини), які є трансгенними по генах імунoglobулінів людини, або антитіла, експресовані з використанням рекомбінантного експресуючого вектора, трансфікованого в клітину-хазяїна. Такі рекомбінантні антитіла людини мають варіабельні і константні області, що походять з послідовностей імунoglobулінів людини ембріонального типу в перевпорядкованій формі. Рекомбінантні антитіла людини, згідно з винаходом, піддають соматичній гіпермутації in vivo. Таким чином, амінокислотні послідовності областей VH і VL рекомбінантних антитіл являють собою послідовності, які, хоч і походять з і є спорідненими з послідовностями VH і VL людини ембріонального типу, не можуть існувати в природі в репертуарі антитіл людини ембріонального типу in vivo.

Термін "ефекторні функції" включає, але не обмежується ними, зв'язування C1q; комплементзалежну цитотоксичність (CDC); зв'язування Fc-рецептора; антитілозалежну клітинно-опосередковану цитотоксичність (ADCC); фагоцитоз і пригнічення рецепторів клітинної поверхні (наприклад B-клітинний рецептор; BCR).

Термін "епітоп" використовують в даному описі для позначення ділянок зв'язування, розпізнаваних зв'язувальним білком або антитілом. Епітопи можуть являти собою будь-яку молекулу або їх групу, включаючи, але не обмежуючись ними, амінокислоти, бічні ланцюги амінокислот, цукри і ліпіди, і можуть мати конкретну тривимірну структуру або конформацію. Таким чином, епітоп може містити будь-яку частину молекули пептиду/білка тау, яка включає первинну, вторинну, третинну або четвертинну структуру, як ці терміни загальновідомі в даній галузі. "Лінійний епітоп" складений з послідовності послідовно розташованих амінокислотних залишків. Лінійний епітоп являє собою епітоп, який присутній на фізіологічному білку тау (наприклад присутній на тау 2N/4R). "Конформаційний епітоп" являє собою епітоп, з яким зв'язується антитіло або зв'язувальний білок конформаційно-специфічним чином. У випадку епітопів на основі білка, зв'язування може залежати від вторинної, третинної або четвертинної структури білка, яка містить епітоп. Іншими словами, антитіло зв'язується специфічним для структури чином, специфічним для третинної структури чином або специфічним для четвертинної структури чином. Конформаційний епітоп являє собою епітоп, який присутній в патологічному білку тау (наприклад присутній в тауΔ(1-150; 392-441)/4R).

Термін "терапевтичний епітоп" стосується областей в білку тау, які вказані в даному описі і які, як було виявлено, стимулюють агрегацію тау-тау, коли вони знаходяться в певних конформаціях (розпізнаваних антитілом DC8E8). Антитіла (і інші зв'язувальні білки), які зв'язуються з однією або декількома з цих областей, інгібують ранні і пізні стадії агрегації білка тау, включаючи перетворення мономера білка тау в димер і перетворення в більш високі форми агрегатів, тобто антитіла інгібують перетворення фізіологічного білка тау в патологічний білок тау. Ці області в білку тау можуть бути залучені до стимуляції фібрилізації білка тау в парні спіральні філаменти (PHF), шляхом стимуляції утворення бета-шарів в сусідніх областях білка тау. Терапевтичні епітопи містяться в 267-KHQPGGG-273 (в 1-ому повторюваному домені білка

тау), 298-KHVPGGG-304 (у 2-ому повторюваному домені білка тау), 329-HHKPGGG-335 (в 3-ому повторюваному домені білка тау) і 361-THVPGGG-367 (в 4-ому повторюваному домені білка тау). У деяких варіантах здійснення, кожний з терапевтичних епітопів міститься в 268-HQPGGG-273 (в 1-ому повторюваному домені білка тау), 299-HVPGGG-304 (у 2-ому повторюваному домені білка тау), 330-HKPGGG-335 (в 3-ому повторюваному домені білка тау) і 362-HVPGGG-367, відповідно.

Термін "вияв більш високої афінності відносно патологічного білка тау, ніж відносно фізіологічного білка тау", стосується більш високої міри взаємодії між антитілом і щонайменше однією формою патологічного білка тау, ніж між антитілом і щонайменше однією формою фізіологічного білка тау. Взаємодію можна вимірювати, наприклад, за допомогою ELISA або поверхневого плазмонного резонансу (SPR), як описано в розділі "Приклади" нижче.

Терміни "специфічно зв'язується", "зв'язується специфічно" і "специфічний до" є взаємозамінними і означають, що антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент (або інший зв'язувальний білок) утворюють комплекс з антигеном або епітопом, який є відносно стабільним в фізіологічних умовах. Специфічне зв'язування може характеризуватися константою дисоціації приблизно 1×10^{-6} М або менше, наприклад менше ніж приблизно 100 нМ і, наприклад, менше 10 нМ. Способи визначення того, чи зв'язуються специфічно дві молекули, відомі в даній галузі і включають, наприклад, рівноважний діаліз, поверхневий плазмонний резонанс і т. п. Як правило, антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, передбачувані винаходом, являє собою молекулу, яка зв'язує антиген або епітоп з такою константою дисоціації, що складає щонайменше приблизно 1×10^{-6} М або менше, але не зв'язує інші молекули з такою константою дисоціації.

"Переважно зв'язується" стосується зв'язування з більш високою афінністю з патологічним білком тау, ніж з фізіологічним білком тау, наприклад зв'язування з більш високою афінністю з тау Δ (1-150; 392-441)/4R, ніж з 2N4R.

"Універсальний Т-клітинний епітоп" являє собою послідовність, вибрану з гемаглютиніну вірусу грипу: HA307-319 (PKYVKQNTLKLAT) (SEQ ID NO: 123); PADRE (AKXVAAWTLKAAA) (SEQ ID NO: 124); малярійного CS: епітоп T3 (EKKIAKMEKASSVFNV) (SEQ ID NO: 125); поверхневого антигена вірусу гепатиту В: HBsA919_28 (FFLLTRILT) (SEQ ID NO: 126); білка теплового шоку 65: hsp65153_171 (DQSIGDLIAEAMDKVGNEG) (SEQ ID NO: 127); бацили Кальметта-Герена (QVHFQPLPPAWKL) (SEQ ID NO: 128); правцевого токсоду: T1830-844 (QYIKANSKFIGITEL) (SEQ ID NO: 129); правцевого токсоду: T1947-967 (FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE) (SEQ ID NO: 130) і T1 gp120 ВІЛ (KQIINMWQEVGKAMYA) (SEQ ID NO: 131).

Термін "внутрішньо неупорядкований білок тау" стосується нормальної/фізіологічної форми білка тау, яка позбавлена якої-небудь певної 3D-структури. Вона існує в здоровому головному мозку (Kovacs et al., 2010).

"Неправильно неупорядкований білок тау" стосується форм білка тау, які конформаційно відрізняються від нормального/фізіологічного внутрішньо неупорядкованого білка тау і не мають жорсткої/визначеної 3D-структури. Неправильно неупорядкований укорочений білок тау здатний індукувати нейрофібрилярну дегенерацію *in vivo*. Він не існує в здоровому головному мозку (Kovacs et al., 2010). "Розупорядкований білок тау" стосується структурованої патологічної форми білка тау, зібраної в полімери PHF, які утворюють NFT. Розупорядкований білок тау не існує в здоровому головному мозку (Kovacs et al., 2010).

"SHR24" стосується лінії трансгенних щурів, які експресують білок тау типу IIB (151-391/R3). У трансгенних щурів розвивається прогресуюча залежна від віку нейрофібрилярна дегенерація в кортикальних областях головного мозку. Нейрофібрилярні вузлики (NFT) у щурів SHR24 задовольняють декілька ключових гістологічних критеріїв, використовуваних для ідентифікації нейрофібрилярної дегенерації при хворобі Альцгеймера у людини, включаючи аргірофілію, двопротенезаломлення конго червоного і реактивність відносно тіофлавіну S. Ці критерії можна використовувати для аналізу нейрофібрилярної дегенерації у індивідуумів, яким здійснюють введення будь-якого з варіантів здійснення винаходу. Нейрофібрилярні вузлики також були ідентифіковані за допомогою антитіл, використовуваних для виявлення патологічного білка тау в головному мозку людини, в тому числі DC11, що розпізнає аномальну конформацію тау, і антитіл, які специфічні до гіперфосфорилованих форм білка тау. Більше того, нейрофібрилярна дегенерація характеризується широким утворенням нерозчинних в саркозилі комплексів білка тау, що складаються з ендогенних і укорочених типів білка тау щура (Filipcik et al., 2010).

"SHR72" стосується трансгенних щурів, які експресують укорочений тау Δ (1-150; 392-441)/4R людини, згідно з міжнародною патентною заявкою PCT WO 2004/007547, в декількох областях

головного мозку і в спинному мозку. Одержання цієї лінії щурів описане Zilka et al., 2006, і патологія білка тау описана в Koson et al., 2008.

"Тип білка тау IA" стосується білка тау з подвійним укороченням на N- і C-кінцях, який має укорочення щонайменше на перші 236 N-кінцевих амінокислот і щонайменше на останні 45 C-кінцевих амінокислот тау43, що містить 4 повтори. Молекули виявляються в тканині головного мозку при хворобі Альцгеймера, в той час як молекули не виявляються в нормальній здоровій тканині головного мозку (WO 2004/007547 A2).

"Тип білка тау IB" стосується білка тау з подвійним укороченням на N- і C-кінцях, який має укорочення щонайменше на перші 236 N-кінцевих амінокислот і щонайменше на останні 45 C-кінцевих амінокислот тау44, що містить 3 повтори. Молекули виявляються в тканині головного мозку при хворобі Альцгеймера, в той час як молекули не виявляються в нормальній здоровій тканині головного мозку (WO 2004/007547 A2).

"Тип білка тау IIA" стосується білка тау з подвійним укороченням на N- і C-кінцях, який має укорочення щонайменше на перші 68 N-кінцевих амінокислот і щонайменше на останні 40 C-кінцевих амінокислот тау43, що містить 4 повтори. Молекули виявляються в тканині головного мозку при хворобі Альцгеймера, в той час як молекули не виявляються в нормальній здоровій тканині головного мозку (WO 2004/007547 A2).

"Тип білка тау IIB" стосується білка тау з подвійним укороченням на N- і C-кінцях, який має укорочення щонайменше на перші 68 N-кінцевих амінокислот і щонайменше на останні 20 C-кінцевих амінокислот тау44, що містить 3 повтори. Молекули виявляються в тканині головного мозку при хворобі Альцгеймера, в той час як молекули не виявляються в нормальній здоровій тканині головного мозку (WO 2004/007547 A2).

Використовувані в рамках винаходу терміни "лікування", "здійснення лікування" і т. п. стосуються досягнення бажаного фармакологічного і/або психологічного ефекту. Ефект може бути профілактичним з точки зору повного або часткового попередження захворювання або його симптому і/або він може бути терапевтичним з точки зору часткового або повного лікування від захворювання і/або несприятливого явища, властивого захворюванню. "Лікування", як використовують в рамках винаходу, також охоплює будь-яке лікування AD або споріднених таупатій у ссавця, зокрема у людини, і включає: (а) профілактику виникнення захворювання у індивідуума, який може бути схильним до захворювання або має ризик набуття захворювання, але у якого ще не діагностована його наявність; (б) інгібування захворювання, тобто зупинення його розвитку; і (с) пом'якшення захворювання, тобто забезпечення регресії захворювання. Переважні варіанти здійснення "лікування" додатково розглянуті нижче. У деяких варіантах здійснення, "лікування" стосується введення лікарського засобу пацієнту, передбачувано страждаючому або вже страждаючому на AD або іншу таупатію. Також воно може стосуватися зниження, усунення або щонайменше часткового зупинення, а також досягнення будь-якого сприятливого ефекту, відносно одного або декількох симптомів захворювання і/або симптомів, асоційованих із захворюванням, і/або їх ускладнень.

"Профілактика" стосується введення пацієнту, який схильний до конкретного захворювання або має інший його ризик. Будь-хто в загальній популяції має ризик AD. Деякі індивідууми мають збільшений генетичний ризик AD. Профілактика може усувати або знижувати ризик або відстрочувати виникнення захворювання. Відстрочення виникнення або прогресування захворювання можна вимірювати на основі стандартного часу прогресування захворювання в схожих популяціях або у схожих індивідуумів.

"Таупатія" стосується захворювання, зумовленого утворенням патологічного білка тау.

"Фізіологічний білок тау" стосується будь-якої з 6 ізоформ нормального білка тау людини, а саме:

2N4R (SEQ ID NO: 102),
1N4R (SEQ ID NO: 103),
2N3R (SEQ ID NO: 104),
0N4R (SEQ ID NO: 105),
1N3R (SEQ ID NO: 106),
0N3R (SEQ ID NO: 107).

Виключенням з цього визначення є ті ізоформи, які мають будь-який з типів фосфорилювання, асоційованих з хворобою Альцгеймера і іншими таупатіями.

"Патологічний білок тау" включає патологічні конформери і структури білка тау і охоплює всі з наступних: тип білка тау IA, IB, IIA і IIB, розупорядкований, неправильно невпорядкований білок тау (мономер, димер, тример, олігомер), неправильно невпорядкований розчинний білок тау, нерозчинний в саркозилі білок тау, позаклітинні депозити білка тау, агрегати білка тау, парні спіральні філаменти, нейрофібрилярна патологія, включаючи нейрофібрилярні осередки,

вузлики, нитки, фібрили, аксональні сфероїди, високофосфорилованні форми укороченого білка тау і повнорозмірного білка або будь-яка інша форма білка тау, асоційована з AD або іншою таупатією.

5 "Зв'язаний" стосується приєднання частини до пептиду, антитіла або сполуки. Частина може бути зв'язана або може утворювати комплекс, або може бути ковалентно або нековалентно приєднана. Частина може бути хімічно зшита або експресована, або синтезована як злита молекула з пептидом або антитілом.

10 "Частина" стосується будь-якої сполуки, органічної сполуки, пептиду, білка, нуклеїнової кислоти, носія, ад'юванту, які можуть бути приєднані до пептиду, антитіла або зв'язувального білка, але які не є самим заявленим пептидом, антитілом або зв'язувальним білком.

"Імуногенний" стосується чого-небудь, що може індукувати імунну відповідь. Імунна відповідь може бути антитіло-опосередковуваною або клітинно-опосередковуваною, або опосередковуваною і тим, і іншим.

15 "Ад'ювант" стосується речовини, яка здатна збільшувати, посилювати або модулювати імунну відповідь на супроводжуючий її пептид.

"Інша терапія" стосується додаткових способів терапії, які можуть проводитися у пацієнтів, що розглядаються.

20 "Виведення" стосується зниження рівнів або виявлення патологічного білка тау і/або патологічної структури білка тау. Виведення не повинно являти собою повне зникнення патологічного білка тау, тобто воно може являти собою часткове зникнення.

Термін "стимуляція" охоплює індукцію, посилення або збільшення.

"Тканина головного мозку" стосується будь-якої нейрональної тканини, наприклад з головного мозку, стовбура головного мозку і спинного мозку.

25 Терміни "специфічне зв'язування" і "висока афінність", відповідно, стосуються антитіла, що зв'язується із заданим антигеном, тобто епітопом білка тау, визначеним вище. Як правило, антитіло зв'язується з константою дисоціації (K_D) 10^{-6} М або менше і зв'язується із заданим антигеном з K_D , яка щонайменше в два рази менше, ніж його K_D для зв'язування з неспецифічним антигеном (наприклад BSA, казеїн або будь-який інший стандартний поліпептид), відмінним від заданого антигена. Вирази "антитіло, що розпізнає антиген", і 30 "антитіло, специфічне відносно антигена", використовують в даному описі взаємозамінно з терміном "антитіло, яке специфічно зв'язується з антигеном". В рамках винаходу використовують "високоспецифічне" зв'язування, яке означає, що відносна K_D антитіла відносно неправильно неупорядкованого білка тау щонайменше в 4 рази менше, ніж K_D для зв'язування антитіла з іншими лігандами або з нормальним повнорозмірним білком тау.

35 Термін "прокаріотичний" включає всі бактерії, які можуть бути трансформовані або трансфіковані молекулою ДНК або РНК для експресії антитіла за винаходом або одного, або декількох відповідних ланцюгів імуноглобулінів. Прокаріотичні хазяїни можуть включати грамнегативні, а також грампозитивні бактерії, такі як, наприклад, *E. coli*, *S. typhimurium*, *Serratia marcescens* і *Bacillus subtilis*. Термін "еукаріотичний" включає клітини дріжджів, вищих рослин, 40 комах і наприклад ссавців, наприклад клітини HEK 293, NSO і CHO.

Термін "хімічне похідне" описує молекулу, яка містить додаткові хімічні частини, які звичайно не є частиною основної молекули. Такі частини можуть підвищувати розчинність, час напівжиття, всмоктування і т. д. основної молекули. Альтернативно частини можуть ослаблювати небажані побічні ефекти основної молекули або знижувати токсичність основної молекули.

45 Терміни "нуклеїнова кислота", "нуклеотидна послідовність", "послідовність нуклеїнової кислоти", "полінуклеотид", "олігонуклеотид", "полінуклеотидна послідовність" і "нуклеотидна послідовність" використовують в даному описі взаємозамінно, і вони стосуються точної послідовності нуклеотидів, модифікованої або не модифікованої, що визначає фрагмент або область нуклеїнової кислоти, яка містить неприродні нуклеотиди або не містить їх і є або 50 дволанцюжковою ДНК, або одностанцюжковою ДНК, або продуктами транскрипції вказаних ДНК.

Терміни "виділений полінуклеотид" або "виділена нуклеїнова кислота", які використовують в рамках винаходу, означають полінуклеотид геномного походження, з кДНК, або синтетичного походження, або деяку їх комбінацію, який за походженням або (1) не асоційований зі всім або частиною полінуклеотиду, в якому "виділений полінуклеотид" зустрічається в природі, або (2) 55 функціонально зв'язаний з полінуклеотидом, з яким він не зв'язаний з природі, або (3) не зустрічається в природі як частина більш великої послідовності.

Антитіла для діагностики, пасивної імунізації, доставки лікарських засобів і терапії AD.

У даному документі описані нові виділені антитіла, специфічні до одного або декількох епітопів білка тау, які мають патологічні форми білка тау. Ці епітопи розташовані в областях білка тау, яким уперше приписується роль в патологічній агрегації білка тау, а саме в: 267-

KNQPGGG-273 (SEQ ID NO: 98) (тобто епітоп #1 розташований в 267-KNQPGGG-273, який знаходиться в 1-ому повторюваному домені білка тау), 298-KHVPGGG-304 (SEQ ID NO: 99) (епітоп #2, у 2-ому повторюваному домені білка тау), 329-HHKPGGG-335 (SEQ ID NO: 100) (епітоп #3, в 3-ому повторюваному домені білка тау) і 361-THVPGGG-367 (SEQ ID NO: 101) (епітоп #4, в 4-ому повторюваному домені білка тау). Ці антитіла здатні розпізнавати розупорядкований і неправильно невпорядкований тау в головному мозку людини при AD, а також в моделях AD і споріднених таупатій на трансгенних щурах, експресуючих неправильно невпорядкований укорочений тау Δ (1-150; 392-441)/3R або тау Δ (1-150; 392-441)/4R людини. Виділені антитіла також здатні перешкоджати одному або декільком з множини опосередковуваних білком тау видів активності, що беруть участь в патології AD, включаючи: (i) перехід або з розупорядкованого, або з фізіологічного білка тау в неправильно невпорядкований білок тау; (ii) утворення мономерів, димерів, тримерів "патологічного білка тау" і інших мультимерів; (iii) утворення нерозчинних агрегатів білка тау; і (iv) стимуляцію виведення позаклітинного білка тау.

Описаний винахід оснований частково на відкритті, що антитіла, які специфічно зв'язуються з однією з чотирьох раніше неідентифікованих функціональних областей білка тау, вибраних з 267-KNQPGGG-273 (SEQ ID NO: 98) (в 1-ому повторюваному домені білка тау), 298-KHVPGGG-304 (SEQ ID NO: 99) (у 2-ому повторюваному домені білка тау), 329-HHKPGGG-335 (SEQ ID NO: 100) (в 3-ому повторюваному домені білка тау) і 361-THVPGGG-367 (SEQ ID NO: 101) (в 4-ому повторюваному домені білка тау), здатні інгібувати утворення патологічних агрегатів білка тау і виявляти різні патологічні форми білка тау, деякі з яких найбільш рано утворюються при захворюванні (наприклад патологічні момери). Гібридами, одержані проти неправильно невпорядкованого білка тау II людини (151-391/4R), який також позначають в даній заявці як тау Δ (1-150; 392-441)/4R, піддавали скринінгу відносно продукції моноклональних антитіл, специфічних до PHF людини, як за допомогою імуногістохімії (IHC), так і за допомогою ферментних імуноаналізів (ELISA). Одержаний набір включав моноклональне антитіло (mAb) миші DC8E8, яке являє собою антитіло підкласу IgG1. Картування епітопів DC8E8 показало, що воно зв'язується з чотирма раніше неідентифікованими епітопами на білку тау людини. Більше того, подальший функціональний аналіз DC8E8 показав, що кожний епітоп являє собою відмінну функціональну область в білку тау. Ці області, які в даному описі можуть бути описані як нові мішені для діагностики і терапії AD і, таким чином, позначаються як "терапевтичні епітопи", містяться в 267-KNQPGGG-273 (SEQ ID NO: 98) (в 1-ому повторюваному домені білка тау), 298-KHVPGGG-304 (SEQ ID NO: 99) (у 2-ому повторюваному домені білка тау), 329-HHKPGGG-335 (SEQ ID NO: 100) (в 3-ому повторюваному домені білка тау) і 361-THVPGGG-367 (SEQ ID NO: 101) (в 4-ому повторюваному домені білка тау). У деяких варіантах здійснення, один або декілька з терапевтичних епітопів містяться в 268-HQPGGG-273 (SEQ ID NO: 223) (в 1-ому повторюваному домені білка тау), 299-HVPGGG-304 (SEQ ID NO: 154) (у 2-ому повторюваному домені білка тау), 330-HKPGGG-335 (SEQ ID NO: 224) (в 3-ому повторюваному домені білка тау) і 362-HVPGGG-367 (SEQ ID NO: 154) (в 4-ому повторюваному домені білка тау). У деяких варіантах здійснення, щонайменше один з терапевтичних епітопів міститься в 299-HVPGGG-304 (SEQ ID NO: 154) (у 2-ому повторюваному домені білка тау). У деяких варіантах здійснення, один або декілька з терапевтичних епітопів являють собою 299-HVPGGG-304 (SEQ ID NO: 154).

Дійсно, DC8E8 здатне розрізняти патологічні і нормальні білки тау, що вказує на те, що щонайменше один з цих чотирьох епітопів є конформаційним. Іншими словами, DC8E8 виявило, що щонайменше одна з областей, охоплених кожним з чотирьох терапевтичних епітопів, демонструє конформацію в патологічному білку тау, яка відрізняється від форми (форм), яку він приймає у внутрішньо невпорядкованому білку тау (нормальний білок тау). DC8E8 здатне визначати або виявляти цю зміну, оскільки воно зв'язується з патологічним білком тау з більш високою афінністю, ніж з фізіологічним білком тау. Більше того, зв'язування DC8E8 з білком тау здатне інгібувати взаємодії тау-тау, що приводить до утворення патологічних агрегатів білка тау, при вимірюванні по здатності DC8E8 інгібувати утворення нерозчинних агрегатів білка тау *in vitro*. Наприклад, зв'язування DC8E8 з нормальним білком тау здатне перешкоджати одній або декільком із змін конформації/форми, розглянутих вище, для областей, що охоплюють терапевтичні епітопи.

Крім цього, зв'язування DC8E8 з нормальним білком тау в одній або декількох з цих областей або терапевтичними епітопами перешкоджає деяким іншим конформаційним змінам де-небудь в молекулі, які необхідні для утворення патологічного білка тау. Без зв'язку з яким-небудь конкретним механізмом, передбачається, що один або декілька з цих епітопів/областей в білку тау, які розпізнаються DC8E8, функціонують в тау як стимулятори агрегації тау-тау.

Наприклад, структура/форма/конформація одного або декількох з цих епітопів впливає на структуру сусідніх областей, так що фіксація його форми в молекулі білка тау шляхом зв'язування з нею DC8E8 перешкоджає здатності або тенденціям сусідньої області (наприклад 274-281) до утворення бета-шарів, де утворення бета-шару необхідне для агрегації тау-тау.

Таким чином, передбачається, що зв'язування DC8E8 з однією з цих чотирьох областей в нормальному білку тау здатне перешкоджати одній з найбільш ранніх патологічних змін в білку тау, ідентифікованих на сьогоднішній день: зміна, яка необхідна для стимуляції або яка сама стимулює або забезпечує утворення бета-шарів в білку тау. Більше того, також передбачається, що зв'язування DC8E8 з однією з цих чотирьох областей в неправильно невпорядкованому/патологічному білку тау, тобто після того, як одна або декілька з чотирьох областей змінилися на патологічну конформацію, все ще здатне інгібувати патологічну агрегацію тау-тау, оскільки воно все ще інгібує утворення бета-шару, блокує фізичну взаємодію тау-тау або здійснює обидві з цих дій.

Таким чином, з використанням DC8E8 як інструмента для ідентифікації нових мішеней або функціональних областей в білку тау, чотирьом конкретним ділянкам зв'язування DC8E8 на білку тау була приписана роль в хворобі Альцгеймера. Це було здійснене шляхом розуміння, що одна або декілька цих ділянок білка тау залучені до утворення мономерів і мультимерів патологічного білка тау, оскільки зв'язування DC8E8 з одним або декількома з них здатне інгібувати ці процеси. Більше того, антитіла (наприклад DC8E8), які зв'язуються з одним або декількома з цих терапевтичних епітопів, здатні стимулювати виведення патологічного білка тау з позаклітинного середовища, оскільки вони здатні опосередковувати захоплення і деградацію патологічного білка тау мікроглією *in vitro*; зниження позаклітинного і внутрішньоклітинного білка тау в головному мозку *in vivo*; або здійснювати обидві з цих дій. Іншими словами, ці антитіла мають здатність допомагати знижувати пошкодження, яке такі патологічні форми білка тау викликають в головному мозку.

Таким чином, в даному описі розкриті антитіла, які специфічно зв'язуються з одним або декількома терапевтичними епітопами на білку тау, де кожен з терапевтичних епітопів окремо розташований в амінокислотних залишках 267-KHQPGGG-273 (SEQ ID NO: 98) (епітоп #1, в 1-ому повторюваному домені білка тау), 298-KHVPGGG-304 (SEQ ID NO: 99) (епітоп #2, у 2-ому повторюваному домені білка тау), 329-HHKPGGG-335 (SEQ ID NO: 100) (епітоп #3, в 3-ому повторюваному домені білка тау) і 361-THVPGGG-367 (SEQ ID NO: 101) (епітоп #4, в 4-ому повторюваному домені білка тау). У деяких варіантах здійснення, терапевтичні епітопи #1-4 містяться в 268-HQPGGG-273 (SEQ ID NO: 223) (в 1-ому повторюваному домені білка тау), 299-HVPGGG-304 (SEQ ID NO: 154) (у 2-ому повторюваному домені білка тау), 330-HKPGGG-335 (SEQ ID NO: 224) (в 3-ому повторюваному домені білка тау) і 362-HVPGGG-367 (SEQ ID NO: 154) (в 4-ому повторюваному домені білка тау). Антитіла можуть бути моноклональними або поліклональними. Також включені антигензв'язувальні частини антитіл, фрагменти антитіла, варіанти антитіл, сконструйовані способами інженерії білки і полімерні каркаси. Вони включають будь-який білок або молекулу, що містить пептид, які містять щонайменше частину молекули імуноглобуліну, таку як, але не обмежуючись ними, щонайменше одна область, що визначає комплементарність (CDR), важкого або легкого ланцюга або її зв'язуючу ліганд частину, варіабельну область важкого ланцюга або легкого ланцюга, константну область важкого ланцюга або легкого ланцюга, каркасну область або будь-яку їх частину.

Як необмежувальний приклад придатне антитіло, частина антитіла, фрагмент або варіант, передбачувані даним винаходом, можуть зв'язуватися щонайменше з одним з описаних терапевтичних епітопів. Термін "антитіло" також включає фрагменти розщеплення антитіл, конкретні частини антитіл і їх варіанти, включаючи міметики антитіл або частини антитіл, які імітують структуру і/або функцію антитіла або його вказаного фрагмента або частини, включаючи одноланцюжкові антитіла і їх фрагменти. Функціональні фрагменти включають антигензв'язувальні фрагменти, які зв'язуються з одним або декількома терапевтичними епітопами. Наприклад, фрагменти антитіл, здатні зв'язуватися з терапевтичним епітопом, включають, але не обмежуються ними, фрагменти Fab (наприклад шляхом розщеплення папаїном), Fab' (наприклад шляхом розщеплення пепсином і часткового відновлення) і F(ab')₂ (наприклад шляхом розщеплення пепсином), fab' (наприклад шляхом розщеплення плазміном), rFc' (наприклад шляхом розщеплення пепсином або плазміном), Fd (наприклад шляхом розщеплення пепсином, часткового відновлення і повторної агрегації), Fv або scFv (наприклад способами молекулярної біології) і передбачаються даним винаходом. Див. також, William E. Paul (ed.) *Fundamental Immunology*, 6th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, NY (2008), включену в даний опис в повному обсязі. Певні фрагменти можна одержувати шляхом ферментативного розщеплення способами синтезу або рекомбінантними способами, як загальновідомо в даній

галузі або як описано в даному документі. Антитіла також можна одержувати в різних укорочених формах з використанням генів антитіл, в яких один або декілька стоп-кодонів внесені вище природної стоп-ділянки. Наприклад, може бути сконструйований комбінований ген, що кодує частину F(ab')₂ важкого ланцюга, так, щоб він включав послідовності ДНК, що кодують домен СН1 і/або шарнірну область важкого ланцюга. Різні частини антитіл можна зв'язувати одну з одною хімічно загальноприйнятими способами або можна одержувати як безперервний білок з використанням загальноприйнятих способів генетичної інженерії.

Відомо, що основний структурний елемент антитіла містить тетрамер. Кожний тетрамер складається з двох ідентичних пар поліпептидних ланцюгів, причому кожна пара має один "легкий" (приблизно 25 кДа) і один "важкий" (приблизно 50-70 кДа) ланцюг. N-кінцева частина кожного ланцюга включає варіабельну область з приблизно 100-110 або більше амінокислот, головним чином, відповідальних за розпізнавання антигена. С-кінцева частина кожного ланцюга визначає константну область, головним чином, відповідальну за ефекторну функцію. Легкі ланцюги людини класифікують як легкі ланцюги каппа і лямбда. Важкі ланцюги класифікують як мю, дельта, гамма, альфа або епсилон і визначають ізотип антитіла як IgM, IgD, IgA і IgE, відповідно. У легких і важких ланцюгах варіабельні і константні області зв'язані областю "J" приблизно з 12 або більше амінокислот з важким ланцюгом, що також включає область "D" приблизно з 10 або більше амінокислот. Див., головним чином, *Fundamental Immunology* Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)) (включену як посилання в повному обсязі для будь-яких цілей). Варіабельні області кожної пари легкий/важкий ланцюг формують ділянку зв'язування антитіла. Таким чином, незмінене антитіло має дві ділянки зв'язування. За винятком біфункціональних або біспецифічних антитіл, дві ділянки зв'язування є однаковими. Всі ланцюги виявляють однакову загальну структуру з відносно консервативних каркасних областей (FR), сполучених трьома гіперваріабельними областями, також званими областями, що визначають комплементарність, або CDR. CDR з двох ланцюгів кожної пари поєднуються каркасними областями, що забезпечують зв'язування з конкретним епітопом. Від N-кінця до С-кінця, як легкі, так і важкі ланцюги містять домени FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 і FR4. Віднесення амінокислот до кожного з доменів проводять згідно з визначеннями IMGT. Також фахівцю в даній галузі відомі альтернативні визначення. Див., наприклад, Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* [National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)], або Chothia & Lesk J. *Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia et al. *Nature*, 342:878-883 (1989).

У деяких варіантах здійснення, антитіло, що розглядається, містить легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше приблизно 80 %, щонайменше приблизно 85 %, щонайменше приблизно 90 %, щонайменше приблизно 95 %, щонайменше приблизно 98 % або щонайменше приблизно 99 % ідентичність амінокислотної послідовності з будь-якою з SEQ ID NO: 141, 143, 152 і 153. У деяких варіантах здійснення, антитіло, що розглядається, містить легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, яка відрізняється від будь-якої з SEQ ID NO: 141, 143, 152 і 153 тільки на одну, дві, три, чотири, п'ять, шість, сім, вісім, дев'ять або десять амінокислот. Фахівці в даній галузі можуть визначити, які амінокислоти у варіабельній області легкого ланцюга можуть бути змінені. Наприклад, шляхом порівняння амінокислотних послідовностей варіабельних областей легкого ланцюга антитіл з однаковою специфічністю, фахівці в даній галузі можуть визначити, які амінокислоти можуть бути змінені без зміни специфічності. Див. розділ "Приклади" для порівняння амінокислотних послідовностей CDR ілюстративного легкого ланцюга антитіла DC8E8. Більше того, визначення того, чи змінена специфічність, можна проводити з використанням аналізу зв'язування антигена. У деяких варіантах здійснення, антитіло, що розглядається, містить легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, як указано в будь-якій з SEQ ID NO: 141, 143, 152 і 153.

У деяких варіантах здійснення, антитіло, що розглядається, містить важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше приблизно 80 %, щонайменше приблизно 85 %, щонайменше приблизно 90 %, щонайменше приблизно 95 %, щонайменше приблизно 98 % або щонайменше приблизно 99 % ідентичність амінокислотної послідовності з будь-якою з SEQ ID NO: 138, 140, 147 і 148. У деяких варіантах здійснення, антитіло, що розглядається, містить важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, яка відрізняється від будь-якої з SEQ ID NO: 138, 140, 147 і 148 тільки на одну, дві, три, чотири, п'ять, шість, сім, вісім, дев'ять або десять амінокислот. Фахівці в даній галузі можуть визначити, які амінокислоти у варіабельній області важкого ланцюга можуть бути змінені. Наприклад, шляхом порівняння амінокислотних послідовностей варіабельних областей важкого ланцюга антитіл з однаковою специфічністю, фахівці в даній галузі можуть визначити, які амінокислоти можуть бути змінені без зміни специфічності. Див., наприклад, фіг. 3Е і 25В для порівняння

амінокислотних послідовностей CDR ілюстративного важкого ланцюга антитіла DC8E8. Більше того, визначення того, чи змінюється специфічність, можна проводити з використанням аналізу зв'язування антигена. У деяких варіантах здійснення, антитіло, що розглядається, містить важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, як вказано в будь-якій з SEQ ID NO: 138, 140, 147 і 148.

[illegible]

У деяких варіантах здійснення, антитіло, що розглядається, містить варіабельну область легкого ланцюга, що містить щонайменше одну, щонайменше дві або три CDR, вибрані з SEQ ID NO: 117-119. В деяких варіантах здійснення, антитіло, що розглядається, містить варіабельну область важкого ланцюга, що містить щонайменше одну, щонайменше дві або три CDR, вибрані з SEQ ID NO: 120-122. Також передбачаються варіанти здійснення, в яких будь-яка з цих трьох CDR змінена, як описано в прикладі 14. У деяких варіантах здійснення, щонайменше одна із змінених CDR в легкому ланцюзі вибрана з SEQ ID NO: 247 для CDR1, SEQ ID NO: 253 для CDR2 і будь-якої з SEQ ID NO: 255, 257, 258, 259 і 260 для CDR3. У деяких варіантах здійснення, щонайменше одна із змінених CDR у важкому ланцюзі вибрана з SEQ ID NO: 261 або SEQ ID NO: 262 для CDR1, SEQ ID NO: 264 або SEQ ID NO: 265 для CDR2 і SEQ ID NO: 266, SEQ ID NO: 267 або SEQ ID NO: 269 для CDR3.

Біспецифічне або біфункціональне антитіло являє собою штучне гібридне антитіло, яке має дві різні пари важкий/легкий ланцюг і дві різних ділянки зв'язування. Біспецифічні антитіла

можна одержувати різними способами, включаючи злиття гібридом або зв'язування Fab'-фрагментів. Див., наприклад, Songsivilai & Lachmann Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321 (1990), Kostelny et al. J. Immunol. 148:1547-1553 (1992). Одержання біспецифічних антитіл може бути відносно трудомістким процесом в порівнянні з одержанням загальноприйнятих антитіл і вихід і міра чистоти для біспецифічних антитіл звичайно є більш низькими. Біспецифічні антитіла не існують у формі фрагментів, що мають одну ділянку зв'язування (наприклад, Fab, Fab' і Fv).

Винахід не стосується антитіл в природній формі, тобто вони не взяті з їх природного оточення, а виділені і одержані шляхом очищення з природних джерел або одержані способами генетичної рекомбінації або хімічного синтезу, і, таким чином, вони можуть містити неприродні амінокислоти. Таким чином, двадцять загальноприйнятих амінокислот і їх скорочені позначення, що використовують в рамках винаходу, відповідають загальноприйнятому використанню. Див. Immunology-A Synthesis [2nd Edition, E.S. Golub and D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)], яка включена в даний опис як посилання. Стереоізомери (наприклад, D-амінокислоти, Nle, Nva, Cha, Orn, Hle, Chg, Hch або Har) двадцяти загальноприйнятих амінокислот, неприродні амінокислоти, такі як альфа, альфа-дизаміщені амінокислоти, N-алкіламінокислоти, молочна кислота і інші нетрадиційні амінокислоти також можуть бути придатними компонентами для поліпептидів за даним винаходом. Приклади нетрадиційних амінокислот включають (тобто не обмежуються ними): 4-гідроксипролін, гамма-карбоксиглутамат, епсилон-N, N, N-триметиллізин, епсилон-N-ацетиллізин, О-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формілметіонін, 3-метилгістидин, 5-гідроксилізин, сигма-N-метиларгінін і інші схожі амінокислоти і імінокислоти (наприклад, 4-гідроксипролін). У позначенні поліпептидів, використовуваному в даному описі, напрямок ліворуч являє собою напрямок до N-кінця, і напрямок праворуч являє собою напрямок до C-кінця, згідно зі стандартним використанням і умовним позначенням.

Аналогічно, даний винахід не стосується нуклеотидних послідовностей в їх природному хромосомному оточенні, тобто в природному стані. Послідовності за даним винаходом є виділеними і очищеними, тобто їх зразки є одержаними, прямо або посередньо, наприклад шляхом копіювання, причому їх навколишнє середовище щонайменше частково модифіковане. Також передбачаються виділені нуклеїнові кислоти, одержані за допомогою рекомбінантної генетики, за допомогою, наприклад, клітин-хазяїнів, або одержані хімічним синтезом.

Відносно даного опису, "процентна ідентичність" між двома послідовностями нуклеїнових кислот або амінокислот означає процент ідентичних нуклеотидів або амінокислотних залишків між двома послідовностями, що підлягають порівнянню, одержаними після оптимального вирівнювання, цей процент є виключно статистичним і відмінності між двома послідовностями розподілені випадковим чином вздовж їх довжини. Порівняння двох послідовностей нуклеїнових кислот або амінокислотних послідовностей традиційно проводять шляхом порівняння послідовностей після їх оптимального вирівнювання, причому вказане порівняння можливо проводити по сегменту або з використанням "вікна вирівнювання". Оптимальне вирівнювання послідовностей для порівняння можна проводити, на доповнення до порівняння вручну, за допомогою алгоритму локальної гомології Smith and Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2:482], за допомогою алгоритму локальної гомології Needleman and Wunsch (1970) [J. Mol. Biol. 48:443], за допомогою способу пошуку схожості Pearson and Lipman (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:2444] або за допомогою комп'ютерного програмного забезпечення з використанням цих алгоритмів (GAP, BESTFIT, FASTA і TFASTA в Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, або за допомогою програмного забезпечення для порівняння BLAST NR або BLAST P).

Процентну ідентичність між двома послідовностями нуклеїнових кислот або амінокислотними послідовностями визначають шляхом порівняння двох оптимально вирівняних послідовностей, де послідовність нуклеїнової кислоти або амінокислотна послідовність, що підлягає порівнянню, може мати вставки або делеції в порівнянні з еталонною послідовністю для оптимального вирівнювання між двома послідовностями. Процентну ідентичність обчислюють шляхом визначення кількості положень, в яких нуклеотид або амінокислотний залишок ідентичний між двома послідовностями, наприклад між двома повними послідовностями, ділення кількості ідентичних положень на загальну кількість положень у вікні вирівнювання і множення результату на 100 з одержанням процентної ідентичності між двома послідовностями.

Наприклад, можна використовувати програму BLAST, "BLAST 2 sequence" [Tatusova et al., "Blast 2 sequence - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol., 1999, Lett. 174:247-250], доступну на сайті <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>, з параметрами за умовчанням (зокрема для параметрів "штраф за внесення пропуску": 5, і

"штраф за продовження пропуску": 2; вибрана матриця являє собою наприклад матрицю "BLOSUM 62", пропонувану програмою); процентну ідентичність між двома послідовностями для порівняння обчислюють прямо за допомогою програми.

Для амінокислотної послідовності, що виявляє щонайменше 80 %, наприклад 85 %, 90 %, 95 % і 98 %, ідентичність з еталонною амінокислотою послідовністю, переважні приклади включають послідовності, що містять еталонну послідовність, певні модифікації, зокрема делецію, вставку або заміну щонайменше однієї амінокислоти, укорочення або подовження. У випадку заміни однієї або декількох послідовно розташованих або не послідовно розташованих амінокислот, переважними є заміни, в яких заміщені амінокислоти замінені "еквівалентними" амінокислотами. У даному описі, вираз "еквівалентні амінокислоти" вказує на будь-які амінокислоти, що ймовірно замінюють одну зі структурних амінокислот, однак без модифікації біологічної активності відповідних антитіл і конкретних прикладів, визначених нижче.

Еквівалентні амінокислоти можна визначати або по їх структурній гомології з амінокислотами, які вони замінюють, або на основі результатів порівняльних досліджень біологічної активності між різними антитілами, які, ймовірно, будуть одержані. Як необмежувальний приклад, в таблиці нижче узагальнено представлені можливі заміни, які, ймовірно, будуть здійснені без значної модифікації біологічної активності відповідного модифікованого антитіла; зворотні заміни, природно, є можливими в тих же умовах.

Оригінальний залишок	Заміна(и)
Ala (A)	Val, Gly, Pro
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Ala
His(H)	Arg
Ile (I)	Leu
Leu (L)	Ile, Val, Met
Lys (K)	Arg
Met (M)	Leu
Phe (F)	Tyr
Pro (P)	Ala
Ser(S)	Thr, Cys
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Phe, Trp
Val (V)	Leu, Ala

Винахід стосується антитіла, продукованого клітинною лінією гібридами миші, депонованою в American Type Culture Collection (ATCC, 10801 University Blvd, Manassas, VA, USA) 13 липня 2011 року, з позначенням запатентованого депозиту ATCC PTA-11994 (оформленого 29 липня 2011 року), як описано в прикладах 1-2. Інші придатні антитіла можуть продукуватися клітинною лінією, змішаною клітинною лінією, іморталізованою клітиною або клональною популяцією іморталізованих клітин, як відомо в даній галузі. Див., наприклад, Ausubel et al. (Ed.), Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Inc., New York, NY (1987-2001)); Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition (Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)); i Sambrook et al., Molecular Cloning-A Laboratory Manual (3rd Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 2000 (в сукупності, "Sambrook"); Harlow and Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)); Colligan, et al. (Eds.), Current Protocols in Immunology (John Wiley & Sons, Inc., N.Y. (1994-2001)); Colligan et al., Current Protocols in Protein Science (John Wiley & Sons, NY, N.Y. (1997-2001)), кожна з яких повністю включена в даний опис як посилання.

У одному підході для одержання антитіл, передбачуваних винаходом, одержують гібридому шляхом злиття придатної іморталізованої клітинної лінії (наприклад, мієломної клітинної лінії) з будь-якою з різних продукуючих антитіло клітин. Придатні іморталізовані клітинні лінії включають, але не обмежуються ними, Sp2/0, Sp2/0-AG14, P3/NS1/Ag4-1, NSO, P3 × 63Ag8.653,

MCP-11, S-194, гетеромієломи, їх продукти злиття або будь-яку клітину або зливу клітину, що походить з них, або будь-яку іншу придатну клітинну лінію, відому в даній галузі і/або комерційно доступну для цієї мети (наприклад ATCC). Придатні продукуючі антитіло клітини включають, але не обмежуються ними, виділені або клоновані клітини селезінки, периферичної крові, лімфи, мигдалеподібної залози або інші імунні клітини або клітини, що містять В-клітини, або будь-які інші клітини, експресуючі константні або варіабельні, або каркасні послідовності, або послідовності CDR важкого або легкого ланцюга, або як ендегенну, або як гетерологічну нуклеїнову кислоту, як рекомбінантну або ендегенну, вірусну, бактеріальну, що походить з водоростей, прокаріотичну, що походить із земноводних, комах, плазунів, риб, ссавців, тварин сімейства гризунів, тварин сімейства кінських, тварин сімейства овець, кіз, овець, приматів, еукаріотичну, геномну ДНК, кДНК, рДНК, мітохондріальну ДНК або РНК, хлоропластну ДНК або РНК, гяРНК, мРНК, тРНК, що є одноланцюжковими, дволанцюжковими або триланцюжковими, гібридизованими, і т. п. або будь-якої їх комбінації. Див., наприклад, Ausubel, вище, і Colligan, Immunology, вище, Chapter 2, повністю включені в даний опис як посилання.

Інші підходи для продукції антитіл, згідно з різними варіантами здійснення, описаними вище, включають, але не обмежуються ними, способи, які здійснюють відбір рекомбінантних антитіл з бібліотек пептидів або білків, включаючи бібліотеки, комерційно доступні від Cambridge antibody Technologies, Cambridgeshire, UK; MorphoSys, Martinsreid/Planegg, Del.; Biovation, Aberdeen, Scotland, UK; BioInvent, Lund, Sweden; Dyax Corp., Enzon, Affymax/Biosite; Xoma, Berkeley, Calif.; Ixsys; Applied Molecular Evolution; і т. п.; способи, які ґрунтуються на імунізації трансгенних тварин, що здатні продукувати вибрані набори антитіл людини (як правило, ці миші містять щонайменше один трансген, що містить ДНК з щонайменше одного локусу імуноглобулінів людини, який функціонально реаранжований або який може піддаватися функціональному реаранжуванню; ендегенні локуси імуноглобулінів у таких мишей можуть бути зруйновані або видалені для усунення здатності тварини продукувати антитіла, що кодуються ендегенними генами); способи селекції, включаючи рибосомний дисплей, технології продукування антитіл одиничними клітинами (наприклад, спосіб селекції антитіл лімфоцитів ("SLAM")) і В-клітинну селекцію; субтрактивну імунізацію з використанням обробки циклофосфамідом; а також будь-які інші способи, загальновідомі в даній галузі, включаючи, але не обмежуючись ними, способи, описані в опублікованій заявці США № 2005/0142609, яка повністю включена як посилання.

У деяких варіантах здійснення, антитіла являють собою оптимізовані повнорозмірні антитіла, химерні або гуманізовані, які можна одержувати будь-яким або комбінацією відомих способів, як указано і проілюстровано, наприклад, в розділах 3, 4 і 5 "Business Insights, Preclinical Development of Monoclonal Antibodies and Related Biologicals-Emerging technologies and new therapeutic candidates, James Shirvill, 2010", повний зміст якої включений як посилання, таких як: пересадка CDR, така як технологія SLAM UBC, технологія SMART PDL, супергуманізація Arana Therapeutics plc, коректування каркасних областей, способи одержання складених антитіл людини, платформа ATLab BioAtla LLC, технологія Humaneering, керовані мутаційною лінією (MLG) стратегії, стратегії деімунізації, стратегії Humanation, інженерія антитіл людини (наприклад технологія HE XOMA), FcX, система LEX Biolex Therapeutics Inc (Pittsboro, NC, США), підходи Potelligent (наприклад BioWa), технологія Compelgent, BestMAb, ImmunoBody, EB66, Synageva Expression Platforms, Xencor Inc. XmAb, антитіла з модифікованим цукром (наприклад, Seattle Genetics Inc (Bothell, WA, США)), антитіла "Wox" (з окисленим триптофаном) (наприклад InNexus Biotechnology Inc (Vancouver, BC, Канада)) і т. п. В деяких варіантах здійснення, антитіла являють собою повністю людські моноклональні антитіла і їх можна одержувати за допомогою однієї або комбінації технологічних платформ, як указано і проілюстровано, наприклад, в розділі 4 "Business Insights, Preclinical Development of Monoclonal Antibodies and Related Biologicals-Emerging technologies and new therapeutic candidates, James Shirvill, 2010", і включаючи, але не обмежуючись ними: фаговий дисплей (наприклад PDL, Dyax Corp; Cambridge, MA, США); скринінг антитіл на основі молекул (MBAS) (наприклад Affitech A/S, описаний, наприклад, в EP 0547201 і US 6730483); платформи клітинної селекції антитіл (CBAS); комбінаторні бібліотеки антитіл людини (HuCAL; наприклад MorphoSys AG); платформи MAbstract (наприклад Crucell NV), включаючи платформи з клітинною лінією PER.C6; платформи Adimab; XenoMouse; платформи UltiMAb; платформи SEBVI; платформи VelocImmune, платформи Open Monoclonal Technology, платформи Xenex; платформи Cloning the Human Response (наприклад IQ Therapeutics) і "Instant Immunity Antibodies"; платформи Viventia (наприклад Fusogenics, UnLock, ImmunoMine); платформи "Natural Human Antibodies" (наприклад OncoMab, Patrys, Acceptys); MabIgX (наприклад Kenta Biotech); платформи Reverse Translational Medicine (наприклад NeuImmune Therapeutics); I-STAR (наприклад Theraclone Sciences); CellSpot (наприклад Trellis Bioscience); iBioLaunch (наприклад iBio Inc.) і т. п.

У деяких варіантах здійснення, антитіла модифіковані шляхом зв'язування їх з антитілами, що не є агентами, з використанням однієї або декількох технологічних платформ і способів, як описано в розділі 5 "Business Insights, Preclinical Development of Monoclonal Antibodies and Related Biologicals-Emerging technologies and new therapeutic candidates, James Shirvill, 2010", включаючи: кон'югат антитіло-лікарський засіб (наприклад ADC, Seattle Genetics); направлене навантаження антитіл (TAP; Immunogen Inc.); Probody (наприклад CytomX Therapeutics); маскування антитіл (наприклад, BioTransformations); направлену фотодинамічну терапію (наприклад PhotoBiotics); AlbuDAb (наприклад GSK); huFc (наприклад Genexine); лігандні пастки (наприклад BioLogix); CovX-Body (наприклад CovX); динамічне зшивання (наприклад InNexus Biotechnology); технологію LEC (наприклад Pivotal Biosciences, Morphotek) і т. п.

У деяких варіантах здійснення, антитіло або кодуючі його кДНК можна додатково модифікувати. Таким чином, в наступному варіанті здійснення, винахід стосується способів одержання антитіл, згідно з різними варіантами здійснення, де способи включають будь-яку стадію(і) одержання химерного антитіла, гуманізованого антитіла або аналога будь-якого з них. У деяких варіантах здійснення, одержання химерних антитіл є таким, як описано в міжнародній заявці WO 89/09622. Способи одержання гуманізованих антитіл описані, наприклад, в патенті США № 6548640 або патенті Канади № 1340879 (пересадка CDR).

Крім цього, можна додатково модифікувати антитіло або кодуючу його кДНК. Таким чином, в наступному варіанті здійснення, винахід стосується способів, які включають будь-яку стадію(і) одержання однокланового антитіла, Fab-фрагмента, біспецифічного антитіла, злитого антитіла, міченого антитіла або аналога будь-якого з них. Як розглянуто вище, антитіло за винаходом може існувати в різних формах, крім повних антитіл, включаючи, наприклад, Fv, Fab і F(ab)₂, а також у вигляді одиничних ланцюгів. Див. наприклад міжнародну заявку WO 88/09344. Більше того, фахівцю в даній галузі добре відомі діантиліла і зв'язувальні молекули з V-подібним доменом; див., наприклад, патент США № 7166697.

У деяких варіантах здійснення, антитіла (наприклад DC8E8) модифіковані і служать як основа для одержання зв'язувальних молекул з однією або декількома властивостями зв'язування антигена, описаними для антитіла DC8E8. Ці зв'язувальні білки можна одержувати одним або декількома способами, наведеними і проілюстрованими, наприклад, в розділі 6 "Business Insights, Preclinical Development of Monoclonal Antibodies and Related Biologicals-Emerging technologies and new therapeutic candidates, James Shirvill, 2010", включаючи: Fab, TetraMAB (наприклад Galileo Oncologics); scFv; Immuna (наприклад ESBA Tech AG); [scFv]₂, включаючи зв'язувальні молекули, які зв'язують будь-які два з чотирьох терапевтичних епітопів DC8E8; BiTE (Affitech, Micromet AG); Avibody (наприклад Aviper Pty); TandAb (наприклад Affimed Therapeutics); Flexibody (наприклад Affirmed); V-NAR (наприклад AdAlta); Nanobody (Abllynx NV); доменні антитіла (наприклад Diversys Ltd. GSK, патент США № 6248516 і EP 0368684); гетерополімер (наприклад Elusys Therapeutics Inc.); Unibody (наприклад GenMab AS); антитіла із заміною доменів (наприклад Calmune Corporation, Science. 2003 Jun 27; 300(5628):2065-71); імунопрепарати на основі модульного білка з малим розміром молекул (SMIP) і молекули SCORPION (наприклад Trubion Pharmaceuticals); імуноглобулін з подвійним варіабельним доменом DVD-Ig (Abbott Laboratories) і т. п.

Антитіла за даним винаходом або їх відповідний ланцюг(и) імуноглобуліну можна додатково модифікувати з використанням загальноприйнятих способів, відомих в даній галузі, наприклад з використанням делеції(ій), інсерції(ій), заміни (замін), вставки (вставок) і/або рекомбінації(ій), і/або будь-якої іншої модифікації(ій) амінокислот, відомої в даній галузі, або окремо, або в комбінації. Див., наприклад, розділ "Приклади", наданий нижче. Способи внесення таких модифікацій в послідовність ДНК, що лежить в основі амінокислотної послідовності ланцюга імуноглобуліну, відомі фахівцю в даній галузі. Див., наприклад, Sambrook (вище) і Ausubel (вище).

Модифікації антитіла за винаходом включають хімічне і/або ферментативне перетворення однієї або декількох амінокислот, що його складають, включаючи модифікації бічного ланцюга, модифікації основного ланцюга і N- і C-кінцеві модифікації, що включають ацетилювання, гідроксилювання, метилювання, амідування і приєднання або видалення вуглеводних або ліпідних частин, кофакторів і т. п. Аналогічно, даний винахід охоплює одержання химерних білків, які містять описане антитіло або його деякий фрагмент на N-кінці, злиті з гетерологічною молекулою, такою як імуностимулюючий ліганд на C-кінці. Див., наприклад, міжнародну заявку WO 00/30680 для відповідних технічних деталей, включену в даний опис як посилання в повному обсязі.

У одному варіанті здійснення, винахід стосується способу одержання антитіла або його зв'язувального фрагмента, або їх ланцюга(ів) імуноглобуліну, причому спосіб включає:

(a) культивування клітини, як описано вище; і

(b) виділення вказаного антитіла або зв'язувального фрагмента, або їх ланцюга(ів) імуноглобуліну з культури.

У деяких варіантах здійснення, виділення включає контактування зразка, що містить антитіло, з одним з пептидів, передбачуваних винаходом, з якими зв'язується антитіло.

Трансформованих хазяїнів можна вирощувати в ферментерах і культивувати, згідно зі способами, відомими в даній галузі, для досягнення оптимального росту клітин. Після експресії цілі антитіла, їх димери, окремі легкі і важкі ланцюги або інші форми імуноглобулінів за даним винаходом можна очищати, згідно зі стандартними в даній галузі методиками, включаючи преципітацію з сульфатом амонію, афінні колонки, колонкову хроматографію, гель-електрофорез і т. п.; див., Scopes, "Protein Purification", Springer Verlag, N.Y. (1982). Потім антитіло або його відповідний ланцюг(и) імуноглобуліну можна виділяти з середовища для росту, клітинних лізатів або клітинних мембранних фракцій. Виділення і очищення, наприклад рекомбінантно експресованих антитіл або ланцюгів імуноглобулінів, передбачуваних винаходом, можна проводити будь-якими загальноприйнятими способами, наприклад, такими як препаративне хроматографічне розділення і імунологічне розділення, подібні тим, що включають використання моноклональних або поліклональних антитіл, направлених проти константної області антитіла за винаходом.

Для фармакологічних застосувань переважними є по суті чисті імуноглобуліни з гомогенністю щонайменше приблизно 90-95 %, і найбільш переважною є гомогенність 98-99 % або більше. Після очищення, частково або до бажаної гомогенності, антитіла можна використовувати терапевтично (в тому числі екстракорпорально) або в розробці або виконанні методик аналізу.

Винахід також стосується антитіл, зв'язаних з іншими частинами для таких цілей, як націлювання лікарського засобу і застосування для візуалізації. Таке приєднання можна проводити хімічно після експресії антитіла до ділянки приєднання, або зв'язаний продукт можна вбудовувати способами інженерії в антитіло за винаходом на рівні ДНК. Потім ДНК експресуються у придатній системі хазяїна, і експресовані білки за необхідності збирають і ренатурують.

Даний винахід також включає спосіб одержання клітин, здатних експресувати антитіло за винаходом або його відповідний ланцюг(и) імуноглобуліну, який включає модифікацію способами генної інженерії клітин полінуклеотидом або вектором за винаходом. Клітини, одержувані способом за винаходом, можна використовувати, наприклад, для дослідження взаємодії антитіла за винаходом з його антигеном.

Винахід також стосується продукуючих антитіла клітинних ліній і рекомбінантних клітин як джерела антитіл, передбачуваних даним винаходом. Даний винахід, крім того, стосується діагностичних аналізів і наборів, які містять антитіла, передбачувані винаходом, або еквівалентну зв'язувальну молекулу, і терапевтичних способів на їх основі.

Винахід також стосується способів одержання антитіл, які здатні конкурувати з DC8E8 і також здатні інгібувати патологічні взаємодії тау-тау. Ці антитіла можна піддавати скринінгу по їх здатності достатньою мірою конкурувати з DC8E8 за зв'язування з білком тау і зв'язування з одним, двома, трьома або всіма чотирма з "терапевтичних епітопів", описаних в даному документі.

Даний винахід також стосується полінуклеотидів, що кодують один або декілька засобів на основі антитіл, передбачуваних винаходом. У певних випадках нуклеотид, наприклад, кодує щонайменше зв'язувальний домен або варіабельну область ланцюга імуноглобуліну антитіл, описаних вище. Як правило, вказана варіабельна область, кодована полінуклеотидом, містить щонайменше одну область, що визначає комплементарність (CDR), VH і/або VL варіабельної області вказаного антитіла. Фахівцю в даній галузі відомо, що кожний варіабельний домен (VH важкого ланцюга і VL легкого ланцюга) антитіла містить три гіперваріабельних області, іноді звані областями, що визначають комплементарність, або "CDR", фланкованими чотирма відносно консервативними каркасними областями або "FR", і стосується амінокислотних залишків антитіла, які відповідальні за зв'язування антигена. Відповідно до системи нумерації Kabat, гіперваріабельні області або CDR субтипу IgG людини в антитілі містять амінокислотні залишки із залишків 24-34 (L1), 50-56 (L2) і 89-97 (L3) у варіабельному домені легкого ланцюга і 31-35 (H1), 50-65 (H2) і 95-102 (H3) у варіабельному домені важкого ланцюга, як описано Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), і/або залишки з гіперваріабельної петлі, тобто залишки 26-32 (L1), 50-52 (L2) і 91-96 (L3) у варіабельному домені легкого ланцюга і 26-32 (H1), 53-55 (H2) і 96-101 (H3) у варіабельному домені важкого ланцюга, як описано Chothia et al., J. Mol. Biol.

196 (1987), 901-917. В унікальній системі нумерації IMGT консервативні амінокислоти завжди мають одне і те ж положення, наприклад цистеїн 23 (1-ий CYS), триптофан 41 (консервативний TRP), гідрофобна амінокислота 89, цистеїн 104 (2-ий CYS), фенілаланін або триптофан 118 (J-PHE або J-TRP). Див., наприклад, Lefranc M.-P., *Immunology Today* 18, 509 (1997); Lefranc M.-P., *The Immunologist*, 7, 132-136 (1999); Lefranc M.-P., Pommie C., Ruiz M., Giudicelli V., Foulquier E., Truong L., Thouvenin-Contet V. and Lefranc M.-P., *Dev. Comp. Immunol.*, 27, 55-77 (2003). Унікальна нумерація IMGT забезпечує стандартизоване визначення границь каркасних областей (FR1-IMGT: положення 1-26, FR2-IMGT: 39-55, FR3-IMGT: 66-104 і FR4-IMGT: 118-128), і областей, що визначають комплементарність: CDR1-IMGT: 27-38, CDR2-IMGT: 56-65 і CDR3-IMGT: 105-117. Унікальну нумерацію IMGT використовують в 2D-графічних представленнях, позначуваних як IMGT Colliers de Perles. Див., наприклад, Ruiz M. and Lefranc M.-P., *Immunogenetics*, 53, 857-883 (2002); Kaas Q. and Lefranc M.-P., *Current Bioinformatics*, 2, 21-30 (2007). Також її використовують для представлення 3D-структур. Див., наприклад, IMGT/3Dstructure-DB Kaas Q., Ruiz M. and Lefranc M.-P., T-cell receptor and MHC structural data. *Nucl. Acids. Res.*, 32, D208-D210 (2004). Каркасні залишки або залишки FR являють собою залишки варіабельного домену, які відмінні від гіперваріабельних областей і обмежують їх.

Таким чином, винахід також стосується виділеної нуклеїнової кислоти, відмінної тим, що вона вибрана з наступних нуклеїнових кислот (включаючи будь-який вироджений генетичний код):

а) нуклеїнова кислота, ДНК або РНК, що кодує антитіло за винаходом;
 б) нуклеїнова кислота, комплементарна нуклеїновій кислоті, як визначено в а);
 в) нуклеїнова кислота щонайменше з 18 нуклеотидів, здатна гібридизуватися в умовах високої жорсткості щонайменше з однією з CDR, вибраних з SEQ ID NO: 117-122 і SEQ ID NO: 247, 253, 255, 257-259, 122, 261, 262, 264, 265-267 і 269; і

д) нуклеїнова кислота щонайменше з 18 нуклеотидів, здатна гібридизуватися в умовах високої жорсткості щонайменше з послідовністю нуклеїнової кислоти легкого ланцюга SEQ ID NO: 165 і/або послідовністю нуклеїнової кислоти важкого ланцюга SEQ ID NO: 170, або послідовністю щонайменше з 80 %, наприклад 85 %, 90 %, 95 % і 98 %, ідентичністю після оптимального вирівнювання з послідовностями SEQ ID NO: 165 і/або SEQ ID NO: 170, наприклад щонайменше з однією з CDR з них відповідно до нумерації IMGT.

Нуклеотидні послідовності, що мають процентну ідентичність щонайменше 80 %, наприклад 85 %, 90 %, 95 % і 98 %, після оптимального вирівнювання з переважною послідовністю, означають нуклеотидні послідовності, які мають, відносно еталонної нуклеотидної послідовності, визначені модифікації, такі як, зокрема, делеція, укорочення, подовження, химерне злиття і/або заміна, переважно точкові. У деяких варіантах здійснення, вони являють собою послідовності, які кодують ті ж амінокислотні послідовності, що і еталонна послідовність, це пов'язано з виродженістю генетичного коду, або комплементарні ним послідовності, які, ймовірно, будуть специфічно гібридизуватися з еталонними послідовностями, наприклад в умовах високої жорсткості, зокрема в умовах, описаних нижче.

Гібридизація в умовах високої жорсткості означає, що умови, які стосуються температури і іонної сили, вибирають так, щоб забезпечити збереження гібридизації між двома комплементарними фрагментами ДНК. Виключно в ілюстративних цілях, в умовах високої жорсткості стадії гібридизації для визначення полінуклеотидних фрагментів, описаних вище, переважно є наступними.

Гібридизацію ДНК-ДНК або ДНК-РНК здійснюють на двох стадіях: (1) прегібридизація при 42 °C протягом трьох годин в фосфатному буфері (20 mM, pH 7,5), що містить 5X SSC (1X SSC відповідає розчину 0,15M NaCl+0,015M цитрат натрію), 50 % формамід, 7 % додецилсульфат натрію (SDS), 10X розчин Денхардта, 5 % сульфат декстрану і 1 % ДНК сперми лосося; (2) первинна гібридизація протягом 20 годин при температурі, що залежить від довжини зонда (тобто: 42 °C для зонда довжиною >100 нуклеотидів), потім два промивання протягом 20 хвилин при 20 °C в 2X SSC+2 % SDS, одне промивання протягом 20 хвилин при 20 °C в 0,1X SSC+0,1 % SDS. Останнє промивання проводять в 0,1X SSC+0,1 % SDS протягом 30 хвилин при 60 °C для зонда довжиною >100 нуклеотидів. Умови гібридизації високої жорсткості, описані вище для полінуклеотиду певного розміру, можуть бути адаптовані фахівцем в даній галузі для більш довгих або більш коротких олігонуклеотидів, відповідно до методик, описаних в Sambrook, et al. (*Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory; 3rd edition, 2001).

Афінність або авидність антитіла до антигена можна визначати експериментально з використанням будь-якого придатного способу; див., наприклад, Pope M.E., Soste M.V., Eyford B.A., Anderson N.L., Pearson T.W. (2009), *J Immunol Methods*. 341 (1-2):86-96, і способи, описані у

вказаному джерелі. Виміряна афінність конкретної взаємодії антитіло-антиген може варіювати при вимірюванні в різних умовах, наприклад концентрації солі, pH. Таким чином, вимірювання афінності і інших параметрів зв'язування антигена, наприклад K_D , IC_{50} , проводять, наприклад, в стандартизованих розчинах антитіла і антигена і в стандартизованому буфері.

Винахід також стосується того, що варіабельний домен антитіла, який має описаний вище варіабельний домен, можна використовувати для конструювання інших поліпептидів або антитіл з бажаною специфічністю і біологічною функцією. Таким чином, даний винахід також охоплює поліпептиди і антитіла, які містять щонайменше одну CDR описаного вище варіабельного домену і які переважно мають по суті такі ж або схожі властивості зв'язування, як і антитіло, описане в прикладених прикладах. Фахівцю в даній галузі буде зрозуміло, що з використанням варіабельних доменів або CDR, описаних в даному документі, антитіла можна конструювати згідно зі способами, відомими в даній галузі, наприклад, як описано в заявках на патент Європи EP 0451216 A1 і EP 0549581 A1. Більше того, фахівцю в даній галузі відомо, що афінність зв'язування можна підвищувати шляхом внесення амінокислотних замінів в CDR або в гіперваріабельні петлі [Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196 (1987), 901-917], які частково перекриваються з CDR, як визначено Kabat. Таким чином, даний винахід також стосується антитіл, де одна або декілька із згаданих CDR містять одну або декілька, наприклад не більше двох, амінокислотних замінів. У деяких варіантах здійснення, антитіло за винаходом містить в одному або обох з його ланцюгів імуноглобуліну дві або три CDR варіабельних областей, як вказано на фіг. 3В і 3Е. У деяких варіантах здійснення, антитіло за винаходом містить в одному або декількох його ланцюгах імуноглобуліну дві або всі три CDR, як вказано на фіг. 25В.

Полінуклеотиди або нуклеїнові кислоти, що кодують описані вище антитіла, можуть являти собою, наприклад, ДНК, кДНК, РНК або синтетично продуковані ДНК або РНК або рекомбінантно продуковану химерну молекулу нуклеїнової кислоти, що містить будь-який з цих полінуклеотидів, або окремо, або в комбінації. У деяких варіантах здійснення, полінуклеотид є частиною вектора. Такі вектори можуть містити додаткові гени, такі як маркерні гени, які дозволяють селекцію вказаного вектора у придатній клітині-хазяїні і у придатних умовах.

У деяких варіантах здійснення, полінуклеотид функціонально зв'язаний з однією або декількома послідовностями контролю експресії, що забезпечують експресію в прокариотичних або еукаріотичних клітинах. Експресія вказаного полінуклеотиду включає транскрипцію полінуклеотиду в трансльовану мРНК. Регуляторні елементи, що забезпечують експресію в еукаріотичних клітинах, наприклад клітинах ссавців, відомі фахівцям в даній галузі. Вони звичайно містять регуляторні послідовності, що забезпечують ініціацію транскрипції і необов'язково сигнали полі-А, що забезпечують термінацію транскрипції і стабілізацію транскрипту. Додаткові регуляторні елементи можуть включати енхансери транскрипції, а також трансляції, і/або природним чином асоційовані або гетерологічні промоторні області.

У цьому відношенні, фахівцю в даній галузі буде зрозуміло, що полінуклеотиди, що кодують щонайменше варіабельний домен легкого і/або важкого ланцюга, можуть кодувати варіабельні домени обох ланцюгів імуноглобулінів або тільки одного. Аналогічно, вказані полінуклеотиди можуть знаходитися під контролем того ж промотору або їх експресія може контролюватися окремо. Можливі регуляторні елементи, що забезпечують експресію в прокариотичних клітинах-хазяїнах, включають, наприклад, промотори PL, lac, trp або tac в E. coli, і прикладами регуляторних елементів, що забезпечують експресію в еукаріотичних клітинах-хазяїнах, є промотори AOX1 або GAL1 в дріжджах або промотори CMV, SV40, RSV, енхансер CMV, енхансер SV40 або інтрон глобіну в клітинах ссавців і інших тварин.

Крім елементів, які відповідають за ініціацію транскрипції, такі регуляторні елементи також можуть містити сигнали термінації транскрипції, такі як ділянка полі-А SV40 або ділянка полі-А tk, нижче полінуклеотиду. Більше того, залежно від використовуваної експресуючої системи, до кодуючої послідовності полінуклеотидів можна приєднувати лідерні послідовності, здатні направляти поліпептид в клітинний компартмент або секретувати його в середовище. Лідерну послідовність(ості) приєднують у відповідній фазі з послідовностями трансляції, ініціації і термінації, і, необов'язково, лідерна послідовність здатна направляти секрецію трансльованого білка або його частини в периплазматичний простір або у позаклітинне середовище. У деяких варіантах здійснення, гетерологічна послідовність може кодувати злитий білок, який включає С- або N-кінцевий ідентифікаційний пептид, що забезпечує бажані характеристики, наприклад стабілізацію або полегшення очищення експресованого рекомбінантного продукту. У цьому контексті, придатні експресуючі вектори відомі в даній галузі і включають, але не обмежуються ними, експресуючий кДНК-вектор Okayama-Berg pcDV1 (Pharmacia), pCDM8, pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (Invitrogen) і pSPORT1 (GIBCO BRL).

У деяких варіантах здійснення, послідовності контролю експресії можуть являти собою еукаріотичні промоторні системи у векторах, здатних трансформувати або трансфікувати еукаріотичні клітини-хазяїни, однак також можна використовувати послідовності контролю для прокаріотичних хазяїнів. Після введення вектора у відповідного хазяїна, хазяїна підтримують в умовах, придатних для експресії на високому рівні нуклеотидних послідовностей, і, якщо бажано, після цього може іти збирання і очищення легких ланцюгів, важких ланцюгів, димерів легкий/важкий ланцюг імуноглобулінів або цілих антитіл, зв'язувальних фрагментів або інших форм імуноглобулінів. Див., наприклад, Beychok, Cells of Immunoglobulin Synthesis, Academic Press, N.Y. (1979).

Більше того, винахід стосується векторів, зокрема плазмід, космід, вірусів і бактеріофагів, звичайно використовуваних в генетичній інженерії, які містять полінуклеотид, що кодує варіабельний домен ланцюга імуноглобуліну в антитілі за винаходом; необов'язково в комбінації з полінуклеотидом за винаходом, який кодує варіабельний домен іншого ланцюга імуноглобуліну в антитілі за винаходом. У деяких варіантах здійснення, вказаний вектор являє собою експресуючий вектор і/або вектор для перенесення генів або вектор для націлювання. Експресуючі вектори, що походять з вірусів, таких як ретровіруси, вірус вісповакцини, аденоасоційований вірус, вірус герпесу або вірус папіломи великої рогатої худоби, можна використовувати для доставки полінуклеотидів або вектора за винаходом в задану клітинну популяцію. Для конструювання рекомбінантних вірусних векторів можна використовувати будь-які способи, які відомі фахівцям в даній галузі. Див., наприклад, способи, описані в Sambrook (вище) і Ausubel (вище). Альтернативно полінуклеотиди і вектори, передбачувані винаходом, можна поміщати в ліпосоми для доставки в клітини-мішені. Вектори, що містять полінуклеотиди, передбачувані винаходом (наприклад, послідовності, що кодують варіабельний домен(и) важкого і/або легкого ланцюга імуноглобуліну і послідовності контролю експресії) можна переносити в клітину-хазяїна відомими способами, які варіюють, залежно від типу клітини-хазяїна. Наприклад, для прокаріотичних клітин звичайно використовують трансфекцію з хлоридом кальцію, в той час для інших клітин-хазяїнів можна використовувати обробку фосфатом кальцію або електропорацію.

Більше того, даний винахід стосується клітин-хазяїнів, трансформованих полінуклеотидом або вектором, передбачуваним винаходом. Клітина-хазяїн може являти собою прокаріотичну або еукаріотичну клітину. Полінуклеотид або вектор, який присутній в клітині-хазяїні, може або вбудовуватися в геном клітини-хазяїна, або підтримуватися позахромосомно. Клітина-хазяїн може являти собою будь-яку прокаріотичну або еукаріотичну клітину, таку як клітина бактерій, комах, грибів, рослин, тварин або людини. Переважними клітинами грибів є, наприклад, клітини роду *Saccharomyces*, зокрема клітини виду *S. cerevisiae*. Залежно від хазяїна, використовуваного в методиці рекомбінантного продукування, антитіла або ланцюги імуноглобулінів, що кодуються полінуклеотидом за даним винаходом, можуть бути глікозилованими або можуть бути неглікозилованими. Певні антитіла, передбачувані винаходом, або відповідні ланцюги імуноглобулінів також можуть включати первинний амінокислотний залишок метіоніну. Полінуклеотид за винаходом можна використовувати для трансформації або трансфекції хазяїна з використанням будь-якого зі способів, загальновідомих середнім фахівцям в даній галузі. Більше того, способи одержання злитих функціонально зв'язаних генів і експресії їх, наприклад, в клітинах ссавців і бактерій, добре відомі в даній галузі. Див., наприклад, Sambrook. Генетичні конструкції і способи, описані у вказаному джерелі, можна використовувати для експресії антитіл, передбачуваних винаходом, або їх відповідних ланцюгів імуноглобулінів в еукаріотичних або прокаріотичних хазяїнах. Як правило, використовують експресуючі вектори, що містять промоторні послідовності, які сприяють ефективній транскрипції вбудованого полінуклеотиду, застосовно до даного хазяїна. Експресуючий вектор, як правило, містить ориджин реплікації, промотор і термінатор, а також конкретні гени, які здатні забезпечувати фенотипічну селекцію трансформованих клітин. Придатні клітини-джерела для послідовностей ДНК і клітини-хазяїни для експресії і секреції імуноглобулінів можуть бути одержані з ряду джерел, таких як American Type Culture Collection ("Catalogue of Cell Lines and Hybridomas", Fifth edition (1985) Manassas, VA, U.S.A., і інша доступна версія, включена в даний опис як посилання). Більше того, для великомасштабної продукції антитіла за винаходом можна використовувати трансгенних тварин, наприклад ссавців, що містять клітини за винаходом.

Крім цього, даний винахід охоплює невеликі пептиди, які включають пептиди, що містять зв'язувальну молекулу, як описано вище, наприклад, яка містить область CDR3 варіабельної області будь-якого із згаданих антитіл, зокрема CDR3 важкого ланцюга, оскільки для певних антитіл часто спостерігають, що CDR3 важкого ланцюга (HCDR3) являє собою область, що має

більш високу міру варіабельності і є переважним учасником взаємодії антиген-антитіло. Такі пептиди можна синтезувати або продукувати рекомбінантними способами для одержання зв'язувальної молекули, придатної згідно з винаходом. Такі способи відомі середнім фахівцям в даній галузі. Пептиди можна синтезувати, наприклад, з використанням автоматизованих пристроїв для синтезу пептидів, які є комерційно доступними. Пептиди також можна продукувати рекомбінантними способами шляхом включення ДНК, експресуючої пептид, в експресуючий вектор і трансформації клітин експресуючим вектором для продукування пептиду.

Описані вище злиті білки, крім того, можуть містити відщеплюваний лінкер або ділянку розщеплення протеазами, які можуть називатися спейсерними частинами. Ці спейсерні частини, в свою чергу, можуть бути або нерозчинними, або розчинними (Diener et al., Science, 231 (1986), 148) і можуть бути вибрані для забезпечення звільнення лікарського засобу від антитіла в заданій області. Прикладами лікарських засобів, які можуть бути приєднані до антитіла за даним винаходом для імунотерапії, є лікарські засоби, радіоізотопи, лектини і токсини. Лікарські засоби, які можуть бути кон'юговані з антитілами і антигенами за даним винаходом, включають сполуки, які звичайно називають лікарськими засобами, такі як мітоміцин С, даунорубіцин і вінбластин. При використанні кон'югованих з радіоізотопною міткою антитіл або антигенів за винаходом, наприклад для імунотерапії, визначені ізотопи можуть бути більш переважними, ніж інші, залежно від таких факторів, як розподіл в лейкоцитах, а також стабільність і випромінювання ізотопу. Залежно від аутоімунної відповіді, деякі емітери є переважними відносно інших. Як правило, для імунотерапії переважними є радіоізотопи, випромінюючи альфа- і бета-частинки. У певних переважних випадках радіоізотопи являють собою короткодійні високоенергетичні альфа-випромінювачі, такі як ^{212}Bi . Прикладами радіоізотопів, які можуть бути зв'язані з антитілами або антигенами за винаходом для терапевтичних цілей, є ^{125}I , ^{131}I , ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{212}Bi , ^{212}At , ^{211}Pb , ^{47}Sc , ^{109}Pd і ^{188}Re . У певних випадках радіоактивна мітка являє собою ^{64}Cu . Інші лікарські засоби, які можуть бути приєднані до антитіла або антигена за винаходом, а також терапевтичні протоколи *ex vivo* і *in vivo*, відомі або можуть бути встановлені фахівцями в даній галузі. При будь-яких обставинах фахівець в даній галузі може використовувати полінуклеотид за винаходом, що кодує (і є джерелом) будь-яке з описаних вище антитіл, антигенів, або відповідний вектор замість самого білкового матеріалу.

Винахід також стосується застосування зв'язувальної молекули або антитіла, передбачуваних в даному описі, для одержання композиції для застосування *in vivo* для пригнічення утворення або зниження іншим чином рівнів неправильно неупорядкованого і/або розупорядкованого білка тау у індивідуума або для екстракорпоральної екстракції патологічних сполук тау або їх попередників з рідин організму. Ці способи можна використовувати для поліпшення когнітивної здатності або уповільнення або обернення назад зниження когнітивних здатностей, асоційованого із захворюванням. Антитіло або зв'язувальну молекулу, передбачувані винаходом, або їх хімічні похідні можна вводити прямо в кров або CSF і витягувати на подальшій стадії шляхом афінного уловлювання з крові або CSF, тим самим витягуючи розупорядкований і неправильно неупорядкований білок тау разом із згаданою вище зв'язувальною молекулою. Таким чином, даний винахід також стосується способу лікування або профілактики виникнення або прогресування хвороби Альцгеймера або споріднених таупатій у індивідуума, який включає витягання крові або CSF з організму індивідуума, обробку крові і CSF і повернення індивідууму крові і CSF відповідно, одержаних таким чином.

Молекули і частинки з антитілом, пептидом або зв'язувальною молекулою/білком за винаходом також мають діагностичну застосовність. Винахід стосується антитіл, які розпізнають і розрізняють різні форми білка тау, які присутні на різних стадіях хвороби Альцгеймера. Ці антитіла здатні виявляти білок тау (і його різні конформаційні зміни), як *in vitro*, так і *in vivo*. Антитіла можуть розрізняти фізіологічний і патологічний білок тау в різних аналізах, включаючи біохімічний аналіз, імунопреципітацію, ELISA, вестерн-блотинг і імуногістохімічний аналіз (наприклад, свіжого, фіксованого, замороженого, поміщеного в парафін зразка), а також візуалізацію *in vivo* з використанням, наприклад, радіоактивно міченого DC8E8 (включаючи фрагменти DC8E8, такі як одноланцюжкове DC8E8), яке відрізняє фізіологічний від патологічного білка тау (див. приклади). Також вони здатні здійснювати це як в твердих, так і рідких зразках і біоптатах (наприклад кров, плазма, CSF, гомогенати) тварини (наприклад гризуни, людина). Деякі з цих аналізів для виявлення описані в розділі "Приклади". Інші загальноприйняті способи виявлення білків відомі фахівцям в даній галузі, і, таким чином, їх можна стандартним чином адаптувати для антитіл, пептидів і зв'язуючих білок тау молекул, передбачуваних винаходом. Антитіла за даним винаходом можуть бути міченими (наприклад флуоресцентна, радіоактивна, ферментна, ядерно-магнітна мітка, важкий метал) і можуть бути використані для виявлення конкретних мішеней *in vivo* або *in vitro*, включаючи подібні

імунохімічні аналізи *in vitro* (див., наприклад, приклади, описані нижче). Також, *in vivo*, їх можна використовувати аналогічним чином для способів візуалізації ядерної медицини для виявлення тканин, клітин або іншого матеріалу, що має неправильно невпорядкований білок тау і його відкладення. Націлювання на внутрішньоклітинний і позаклітинний неправильно невпорядкований білок тау і нейрофібрилярні осередки за допомогою діагностичних візуалізуючих зондів, виявлюваних за допомогою MRI або PET, можуть забезпечити біологічний маркер для більш точного досмертного діагнозу AD, а також засоби для моніторингу ефективності терапії, націленої на білок тау. Таким чином, винахід стосується застосування антитіл, описаних в даному документі, для одержання композиції і в способах для виявлення білка тау і/або націлювання діагностичного засобу на патологічний білок тау і нейрофібрилярні осередки в головному мозку для діагностики AD. Ці композиції і способи можна використовувати як частину протоколу лікування AD і споріднених таупатій.

Винахід стосується антитіл, придатних для застосування в імуноаналізах, в яких вони можуть бути використані в рідкій фазі або можуть бути зв'язані з твердофазним носієм. Прикладами імуноаналізів, в яких можна використовувати антитіла за винаходом, є конкурентні і неконкурентні імуноаналізи або в прямому, або в непрямому форматі. Прикладами таких імуноаналізів є радіоімунний аналіз (RIA), сендвіч-аналіз (імунометричний аналіз), проточна цитометрія і аналіз з використанням вестерн-блотингу. Антитіла за винаходом можуть бути зв'язані з одним з множини різних носіїв і можуть бути використані для виділення клітин, що специфічно зв'язуються з ними. Приклади відомих носіїв включають скло, полістирол, полівінілхлорид, поліпропілен, поліетилен, полікарбонат, декстран, нейлон, амілози, природні і модифіковані целюлози, поліакриламід, агарози і магнетит. Для цілей винаходу носій може бути або розчинним, або нерозчинним. Існує множина різних міток і способів мічення, відомих середнім фахівцям в даній галузі.

Приклади типів міток, які можна використовувати в рамках даного винаходу, включають ферменти, радіоізотопи і радіонукліди, колоїдні метали, флуоресцентні сполуки, хемілюмінесцентні сполуки, біотинільні групи, задані поліпептидні епітопи, розпізнавані вторинним репортером (наприклад, послідовності пари лейцинової блискавки, ділянки зв'язування для вторинних антитіл, зв'язуючі метали домени, епітопні мітки), і хемі/електрохемі/біолюмінесцентні сполуки. Ферменти включають пероксидазу (наприклад HRP), люциферазу, лужну фосфатазу, α -D-галактозидазу, глюкозооксидазу, глюкозоамілазу, карбоангідразу, ацетилхолінестеразу, лізоцим, малатдегідрогеназу або глюкозо-6-фосфатдегідрогеназу. Альтернативно мітка являє собою біотин, дигоксигенін або 5-бромдезоксіуридин. Також з антитілами і тау-зв'язувальними білками, передбачуваними винаходом, можна комбінувати флуоресцентні мітки, включаючи родамін, люмінофори на основі комплексів лантанідів, флуоресцеїн і його похідні, флуорохроми, родамін і його похідні, зелений флуоресцентний білок (GFP), червоний флуоресцентний білок (RFP) і інші, дансил, умбеліферон. У таких кон'югатах антитіла/зв'язувальні білки за винаходом можна одержувати способами, відовими фахівцю в даній галузі. Потім їх можна зв'язувати з ферментами або флуоресцентними мітками прямо, через спейсерну групу або через лінкерну групу, таку як поліальдегід, глутаральдегід, етилендіамінтетраоцтова кислота (EDTA) або діетилентриамінпентаоцтова кислота (DPTA), або в присутності інших зв'язувальних агентів, таких як зв'язувальні агенти, загальновідомі в даній галузі. Кон'югати, що містять флуоресцеїнові мітки, можна одержувати наприклад шляхом реакції з ізотіоціанатом. У певних випадках мітка або маркер також можуть бути терапевтичними.

Інші кон'югати можуть включати хемілюмінесцентні мітки, такі як люмінол і діоксетан, біолюмінесцентні мітки, такі як люцифераза і люциферин, або радіоактивні мітки, такі як йод¹²³, йод¹²⁵, йод¹²⁶, йод¹³³, бром⁷⁷, технецій^{99m}, індій¹¹¹, індій^{113m}, галій⁶⁷, галій⁶⁸, рутеній⁹⁵, рутеній⁹⁷, рутеній¹⁰³, рутеній¹⁰⁵, ртуть¹⁰⁷, ртуть²⁰³, реній^{99m}, реній¹⁰¹, реній¹⁰⁵, скандій⁴⁷, телур^{121m}, телур^{122m}, телур^{125m}, тулій¹⁶⁵, тулій¹⁶⁷, тулій¹⁶⁸, фтор¹⁸, ітрій⁹⁹ і йод¹³¹. Можна використовувати існуючі способи, відомі фахівцю в даній галузі, для мічення антитіл радіоізотопами, або прямо, або через хелатуючий агент, такий як EDTA або DTPA, згаданий вище, як діагностичними радіоізотопами. Див., наприклад, мічення [¹²⁵I]Na способом з хлораміном-Т [Hunter W.M. і Greenwood F.C. (1962), *Nature*, 194:495]; мічення технецієм, як описано Crockford et al. (патент США № 4424200); і зв'язування через DTPA, як описано Hnatowich (патент США № 4479930).

Винахід також стосується антитіл і інших тау-зв'язувальних молекул, які також можна використовувати в способі діагностики порушення у індивідуума, шляхом одержання зразка рідини організму від індивідуума, який може являти собою зразок крові, зразок лімфи або зразок будь-якої іншої рідини організму, і контактування зразка рідини організму з антитілом за даним винаходом в умовах, що забезпечують утворення комплексів антитіло-антиген. Потім

визначають присутність і/або кількість таких комплексів способами, відомими в даній галузі, причому рівень, що значно перевищує рівень, утворений в контрольному зразку, вказує на присутність захворювання у досліджуваного індивідуума. Таким чином, даний винахід стосується імуноаналізу *in vitro*, що включає антитіло за винаходом.

Більше того, даний винахід стосується способів візуалізації *in vivo* з використанням будь-якої із зв'язуючих білок тау молекул за даним винаходом. Наприклад, спосіб медичної візуалізації позитронна емісійна томографія (PET), який дає на виході тривимірне зображення частин організму, оснований на виявленні випромінювання внаслідок емісії позитронів. Як правило, біомолекула є радіоактивно міченою, наприклад вона включає радіоактивний ізотопний індикатор. При введенні міченої біомолекули індивідууму, як правило, шляхом ін'єкції в кровотік, радіоактивно мічена біомолекула концентрується в тканинах, що представляють інтерес. Потім індивідуума поміщають у візуалізуючий сканер, який виявляє емісію позитронів. У одному варіанті здійснення, мічену, наприклад мічену ^{64}Cu , зв'язувальну молекулу, таку як антитіло, вводять індивідууму і проводять виявлення зв'язувальної молекули і, таким чином, неправильно неупорядкованого або розупорядкованого білка тау, шляхом поміщення індивідуума у візуалізуючий сканер і виявлення емісії позитронів, що, тим самим, вказує на наявність неврологічного порушення у випадку виявлення емісії. Даний винахід, таким чином, охоплює спосіб візуалізації PET, який включає стадію введення міченої ^{64}Cu або еквівалентно міченої зв'язувальної молекули за даним винаходом індивідууму.

Даний винахід також стосується виробу, такого як фармацевтичні і діагностичні упаковки або набори, що містить один або декілька контейнерів, заповнених одним або декількома з описаних вище інгредієнтів, тобто зв'язувальну молекулу, антитіло або їх зв'язувальний фрагмент, полінуклеотид, вектор або клітину, передбачувані винаходом. До такого контейнера(ів) може додаватися повідомлення у формі, що призначається урядовою установою, регулюючою виготовлення, застосування або продаж фармацевтичних або біологічних продуктів, в якому відображене схвалення установою виготовлення, застосування або продажу для введення людині. Додатково або альтернативно, набір містить реагенти і/або інструкції по застосуванню відповідних діагностичних аналізів. Композиція або набір за даним винаходом придатні для діагностики, профілактики і лікування хвороби Альцгеймера і споріднених таупатій.

Біологічна активність зв'язувальних молекул, наприклад антитіл, передбачуваних винаходом, вказує на те, що вони мають достатню афінність, щоб стати кандидатами для локалізації лікарського засобу/доставки лікарського засобу в клітини або тканини. Націлювання на відкладення неправильно неупорядкованого білка тау і зв'язування з ними може бути корисним для доставки терапевтично або діагностично активних засобів і генної терапії/доставки генів. Таким чином, винахід стосується застосування антитіл, описаних в даному документі, для одержання композиції і в способах для виявлення і/або націлювання терапевтичного або діагностичного засобу на патологічний білок тау і нейрофібрилярні осередки в головному мозку. Ці композиції і способи можна використовувати як частину протоколу лікування AD і споріднених таупатій.

Таким чином, даний винахід стосується композицій, що містять одну або декілька із згаданих вище сполук, включаючи зв'язувальні молекули, антитіла, зв'язувальні фрагменти, їх хімічні похідні, полінуклеотиди, вектори і клітини. Певні композиції, крім того, можуть містити один або декілька фармацевтично прийнятних носіїв і один або декілька фармацевтично прийнятних розріджувачів. Певні хімічні похідні містять хімічні частини, які звичайно не є частиною основної молекули або клітини (наприклад антитіла, зв'язувальної молекули, полінуклеотидів, векторів і клітин), але зв'язані з ним загальноприйнятими способами. Такі частини можуть функціонувати, наприклад, поліпшуючи розчинність, час напівжиття, візуалізацію, можливість виявлення і/або всмоктування основної молекули або клітини. Альтернативно частини можуть знижувати небажані побічні ефекти основної молекули або знижувати токсичність основної молекули.

Винахід також стосується фармацевтичних композицій, які містять комбінації антитіл, передбачуваних винаходом, з додатковими засобами, такими як інтерлейкіни або інтерферони, залежно від передбачуваного застосування фармацевтичної композиції. Наприклад, для застосування при лікуванні хвороби Альцгеймера додатковий засіб може бути вибраний з групи, що складається з низькомолекулярних органічних молекул, антитіл проти білка тау, антитіл проти бета-амілоїду і їх комбінацій. Інші засоби включають, але не обмежуються ними, інгібітори ацетилхолінестерази, антагоністи рецепторів NMDA, хелатори перехідних металів, фактори росту, гормони, нестероїдні протизапальні лікарські засоби (NSAID), антиоксиданти, засоби, що знижують рівень ліпідів, селективні інгібітори фосфодіестерази, інгібітори агрегації білка тау, інгібітори протеїнази, інгібітори білків теплового шоку, реагенти для пасивної і активної

імунізації проти амілоїду, інгібітори агрегації амілоїду і інгібітори секретази. Таким чином, в одному варіанті здійснення, даний винахід стосується застосування зв'язувальної молекули, антитіла або зв'язувального фрагмента за даним винаходом або зв'язувальної молекули, що має по суті таку ж специфічність зв'язування, як і будь-які з них, полінуклеотиду, вектора або клітини за даним винаходом для одержання фармацевтичної або діагностичної композиції для лікування або профілактики прогресування хвороби Альцгеймера або споріднених таупатій; для пом'якшення симптомів, асоційованих з хворобою Альцгеймера або спорідненими таупатіями; для діагностики або скринінгу індивідуума відносно наявності хвороби Альцгеймера або споріднених таупатій і для визначення ризику розвитку у індивідуума хвороби Альцгеймера або споріднених таупатій.

Пептиди для діагностики, активної імунізації і терапії AD

Даний винахід оснований частково на відкритті, що певні фрагменти білка тау є активними відносно індукції імунної відповіді на патологічний білок тау при ін'єктуванні в моделях AD на щурах і можна очікувати, що вони будуть активними подібним чином у людини. Було виявлено, що ці імуногенні фрагменти білка тау, які містять одну або декілька з областей білка тау, ідентифікованих, як описано вище, за допомогою DC8E8, як прискорювачі або щонайменше учасники розвитку і прогресування AD, здатні (i) прискорювати виведення позаклітинного відкладення білка тау в головному мозку при AD (моделі на щурах); (ii) індукувати продукцію захисних антитіл проти AD в моделі на тваринах; і/або (iii) уповільнювати прогресування AD у реципієнтних індивідуумів, при вимірюванні за допомогою одного або декількох біохімічних і неврологічних аналізів, в моделі на тваринах. Вони також можуть прямо фізично перешкоджати здатності білка тау здійснювати патологічні взаємодії тау-тау вздовж цих областей.

Винахід стосується імуногенів або імуногенних пептидів, що походять із знову ідентифікованих областей білка тау, які є важливими для утворення центральної частини PHF і стимулюють збирання PHF *in vitro*. Стратегічне націлювання на ці області ("терапевтичні епітопи") може забезпечити успішне лікування AD і споріднених таупатій. Імуногени можна піддавати скринінгу відносно терапевтичної ефективності в моделі на тваринах, такий як моделі на трансгенних щурах, описані нижче.

У одному варіанті здійснення даного винаходу, тау-пептиди наприклад охоплюють одну з наступних амінокислотних послідовностей, в кожній з яких по окремоті міститься кожний з чотирьох терапевтичних епітопів: а) SEQ ID NO: 98, тау 267-KHQPGGG-273, b) SEQ ID NO: 99, тау 298-KHVPGGG-304, c) SEQ ID NO: 100, тау 329-HHKPGGG-335, і d) SEQ ID NO: 101, тау 361-THVPGGG-367 (нумерація згідно з найбільш довгою ізоформою білка тау людини 2N4R довжиною 441 залишок, див. SEQ ID NO: 102). У іншому варіанті здійснення, тау-пептиди містять щонайменше один терапевтичний епітоп, де терапевтичний епітоп вибраний з тау 268-HQPGGG-273 SEQ ID NO: 223, тау 299-HVPGGG-304 SEQ ID NO: 154, тау 330-HKPGGG-335 SEQ ID NO: 224 і тау 362-HVPGGG-367 SEQ ID NO: 154.

Винахід стосується імуногенів довжиною 30 амінокислот, таких як будь-яка з SEQ ID NO, представлених в таблиці 1. Кожний з імуногенів, включених в таблицю 1, являє собою відособлений фрагмент білка тау, який містить один з терапевтичних епітопів, розташованих в SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100 і SEQ ID NO: 101.

Таблиця 1

30-мерні пептиди білка тау, кожний з яких містить один терапевтичний епітоп

<u>SEQ ID NO</u>	<u>Імуноген</u>	<u>Послідовності</u>
SEQ ID NO:1	Tay251-280	PDLKNVSKIGS TENLKHQPGGGKVQIINK
SEQ ID NO:2	Tay256-285	VKSKIGSTENLKHQP GGGKVQIINK KLDLS
SEQ ID NO:3	Tay259-288	KIGSTENLKHQP GGGKVQIINK KLDLSNVQ
SEQ ID NO:4	Tay275-304	VQIINKKLDL SNVQSKCGSK DNIKHVPGGG
SEQ ID NO:9	Tay244-273	QTAPVPMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGG
SEQ ID NO:10	Tay245-274	TAPVPMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGK
SEQ ID NO:11	Tay246-275	APVPMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKV
SEQ ID NO:12	Tay247-276	PVPMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQ
SEQ ID NO:13	Tay248-277	VPMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQI
SEQ ID NO:14	Tay 249-278	PMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQII
SEQ ID NO:15	Tay 250-279	MPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIIN
SEQ ID NO:16	Tay252-281	DLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKK
SEQ ID NO:17	Tay253-282	LKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKL
SEQ ID NO:18	Tay254-283	KNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLD
SEQ ID NO:19	Tay255-284	NVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDL
SEQ ID NO:20	Tay 257-286	KSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSN
SEQ ID NO:21	Tay258-287	SKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNV
SEQ ID NO:22	Tay260-289	IGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQS
SEQ ID NO:23	Tay261-290	GSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSK
SEQ ID NO:24	Tay262-291	STENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKC
SEQ ID NO:25	Tay263-292	TENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCG
SEQ ID NO:26	Tay264-293	ENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGS
SEQ ID NO:27	Tay 265-294	NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSK
SEQ ID NO:28	Tay 266-295	LKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKD
SEQ ID NO:29	Tay267-296	KHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDN
SEQ ID NO:30	Tay 276-305	QIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGS

SEQ ID NO:31	Tay 277-306	IINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSV
SEQ ID NO:32	Tay 278-307	INKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQ
SEQ ID NO:33	Tay 279-308	NKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQI
SEQ ID NO:34	Tay 280-309	KKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIV
SEQ ID NO:35	Tay 281-310	KLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVY
SEQ ID NO:36	Tay 282-311	LDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYK
SEQ ID NO:37	Tay 283-312	DLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKP
SEQ ID NO:38	Tay 284-313	LSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV
SEQ ID NO:39	Tay 285-314	SNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYK PVD
SEQ ID NO:40	Tay 286-315	NVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYK PVDL
SEQ ID NO:41	Tay 287-316	VQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYK PVDLS
SEQ ID NO:42	Tay 288-317	QSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYK PVDLSK
SEQ ID NO:43	Tay 289-318	SKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYK PVDLSKV
SEQ ID NO:44	Tay 290-319	KCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYK PVDLSKVT
SEQ ID NO:45	Tay 292-321	GSKDNIKHVPGGGSVQIVYK PVDLSKVT SK
SEQ ID NO:46	Tay 293-322	SKDNIKHVPGGGSVQIVYK PVDLSKVT SKC
SEQ ID NO:47	Tay 294-323	KDNIKHVPGGGSVQIVYK PVDLSKVT SKCG
SEQ ID NO:48	Tay 295-324	DNIKHVPGGGSVQIVYK PVDLSKVT SKCGS
SEQ ID NO:49	Tay 296-325	NIKHVPGGGSVQIVYK PVDLSKVT SKCGSL
SEQ ID NO:50	Tay 297-326	IKHVPGGGSVQIVYK PVDLSKVT SKCGSLG
SEQ ID NO:51	Tay 298-327	KHVPGGGSVQIVYK PVDLSKVT SKCGSLGN
SEQ ID NO:52	Tay 307-336	QIVYK PVDLSKVT SKCGSLGNIHHKPGGGQ
SEQ ID NO:53	Tay 308-337	IVYK PVDLSKVT SKCGSLGNIHHKPGGGQV
SEQ ID NO:54	Tay 309-338	VYK PVDLSKVT SKCGSLGNIHHKPGGGQVE
SEQ ID NO:55	Tay 310-339	YK PVDLSKVT SKCGSLGNIHHKPGGGQVEV
SEQ ID NO:56	Tay 311-340	KPVDLSKVT SKCGSLGNIHHKPGGGQVEVK
SEQ ID NO:57	Tay 312-341	PVDLSKVT SKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKS
SEQ ID NO:58	Tay 313-342	VDLSKVT SKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSE
SEQ ID NO:59	Tay 314-343	DLSKVT SKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEK
SEQ ID NO:60	Tay 315-344	LSKVT SKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKL
SEQ ID NO:61	Tay 316-345	SKVT SKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLD
SEQ ID NO:62	Tay 317-346	KVT SKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDF
SEQ ID NO:63	Tay 318-347	VT SKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFK

SEQ ID NO:64	Tay 319-348	TSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKD
SEQ ID NO:65	Tay 320-349	SKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDR
SEQ ID NO:66	Tay 321-350	KCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRV
SEQ ID NO:67	Tay 322-351	CGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQ
SEQ ID NO:68	Tay 323-352	GSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQS
SEQ ID NO:69	Tay 324-353	SLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSK
SEQ ID NO:70	Tay 325-354	LGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKI
SEQ ID NO:71	Tay 326-355	GNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIG
SEQ ID NO:72	Tay 327-356	NIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGS
SEQ ID NO:73	Tay 328-357	IHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSL
SEQ ID NO:74	Tay 329-358	HHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLD
SEQ ID NO:75	Tay 339-368	VKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGN
SEQ ID NO:76	Tay 340-369	KSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNK
SEQ ID NO:77	Tay 341-370	SEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKK
SEQ ID NO:78	Tay342-371	EKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKI
SEQ ID NO:79	Tay343-372	KLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIE
SEQ ID NO:80	Tay344-373	LDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIET
SEQ ID NO:81	Tay345-374	DFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETH
SEQ ID NO:82	Tay346-375	FKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHK
SEQ ID NO:83	Tay 347-376	KDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKL
SEQ ID NO:84	Tay 348-377	DRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLT
SEQ ID NO:85	Tay 349-378	RVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTF
SEQ ID NO:86	Tay 350-379	VQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFR
SEQ ID NO:87	Tay351-380	QSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRE
SEQ ID NO:110	Tay352-381	SKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFREN
SEQ ID NO:89	Tay353-382	KIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENA
SEQ ID NO:90	Tay354-383	IGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAK
SEQ ID NO:91	Tay355-384	GSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKA
SEQ ID NO:92	Tay356-385	SLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAK
SEQ ID NO:93	Tay357-386	LDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKT
SEQ ID NO:94	Tay358-387	DNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTD
SEQ ID NO:95	Tay359-388	NITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDH
SEQ ID NO:96	Tay 360-389	ITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHG
SEQ ID NO:97	Tay361-390	THVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGA

У деяких варіантах здійснення, імуногенний пептид вибраний з SEQ ID NO: 1, тау 251-PDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINK-280; SEQ ID NO: 2, тау 256-VKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLS-285; SEQ ID NO: 3, тау 259-KIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQ-288; і SEQ ID NO: 4, тау 275-VQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGG-304.

Винахід також стосується більш коротких і більш довгих імуногенних пептидів для застосування в рамках даного винаходу, які містять одну або декілька з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO: 98 267-KHQPGGG-273, або амінокислот SEQ ID NO: 99 298-KHVPGGG-304, або амінокислот SEQ ID NO: 100 329-HHKPGGG-335, або амінокислот SEQ ID NO: 101 361-THVPGGG-367, які можуть походити з будь-якої з шести ізоформ білка тау людини. У одному варіанті здійснення, імуногенний пептид містить щонайменше один терапевтичний епітоп, де терапевтичний епітоп вибраний з тау 268-HQPGGG-273 SEQ ID NO: 223, тау 299-HVPGGG-304 SEQ ID NO: 154, тау 330-HKPGGG-335 SEQ ID NO: 224 і тау 362-HVPGGG-367 SEQ ID NO: 154. У одному варіанті здійснення, імуногенний пептид містить послідовність, вибрану з SEQ ID NO: 109, тау 314-DLSKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSE-342; SEQ ID NO: 110, тау 352-SKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFR-380; SEQ ID NO: 111, тау 325-LGNIHHKPGGGGQ-336; SEQ ID NO: 112, тау 357-LDNITHVPGGGN-368; SEQ ID NO: 108, тау 294-305 KDNIKHVPGGGG. У деяких варіантах здійснення, щонайменше один імуногенний пептид вибраний з будь-якої з SEQ ID NO: 1-4, SEQ ID NO: 9-101 і SEQ ID NO: 108-112, NIKAVPGGGG (SEQ ID NO: 200), NIKHVPGGGG (SEQ ID NO: 201), IKHVPGGGG (SEQ ID NO: 202), KHVPGGGGSV (SEQ ID NO: 203), HVPGGGGSVQ (SEQ ID NO: 204), VPGGGGSVQ (SEQ ID NO: 205), GWSIHSPGGGSC (SEQ ID NO: 250) і SVFQHLPGGGSC (SEQ ID NO: 251), ANIKHVPGGGG (SEQ ID NO: 144), DAIKHVPGGGGS (SEQ ID NO: 146), DNAKHVPGGGGS (SEQ ID NO: 149), DNIAHVPGGGG (SEQ ID NO: 151), DNIKAVPGGGG (SEQ ID NO: 159), DNIKHAVPGGGG (SEQ ID NO: 161) і DNIKHVPGGGG (SEQ ID NO: 171).

Амінокислотні послідовності, відповідні ізоформам білка тау людини, наведені в SEQ ID NO: 102-107

SEQ ID NO: 102 (2N4R):

MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
 SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTIEPEG TTAEEAGIGD TPSLEDEAAG
 HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKQGQANATR IPAKTPPAPK
 TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSR S RTPSLPTPTP REPKKVAVR TPPKSPSSAK
 SRLQTAPVPM PDLKNVSKI GSTENLKHQP GGGKVQIINK KLDLSNVQSK CGSKDNIKHV
 PGGGGSVQIVY KPVDSLKVT KCGSLGNIHH KPGGGQVEVK SEKLDKDRV QSKIGSLDNI
 THVPGGGNKK IETHKLTFR NAKAKTDHGA EIVYKSPVVS GDTSPRHLSN VSSTGSIDMV
 DSPQLATLAD EVSASLAKQ L;

SEQ ID NO: 103 (1N4R):

MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
 SETSDAKSTP TAEAEAGIG DTPSLEDEAA GHVTQARMVS KSKDGTGSDD KAKGADGKT
 KIATPRGAAP PGQKQGQANAT RIPAKTPPAP KTPPSSGEPP KSGDRSGYSS PGSPGTPGSR
 SRTPSLPTPP TREPKKVAVV RTPPKSPSSA KSRLQTAPVP MPDLKNVSK IGSTENLKHQ
 PGGGKVQIIN KLDLSNVQS KCGSKDNIH VPGGGSVQIV YKPVDSLKVT SKCGSLGNIH
 HKPGGGQVEV KSEKLDKDRV VQSKIGSLDN ITHVPGGGNK KIETHKLTFR ENAKAKTDHG
 AEIVYKSPW SGDTSPRHLS NVSSTGSIDM VDSPQLATLA DEVSASLAKQ GL;

SEQ ID NO: 104 (2N3R):

MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
 SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTIEPEG TTAEEAGIGD TPSLEDEAAG
 HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKQGQANATR IPAKTPPAPK
 TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSR S RTPSLPTPTP REPKKVAVR TPPKSPSSAK
 SRLQTAPVPM PDLKNVSKI GSTENLKHQP GGGKVQIVYK PVDLSKVT SKCGSLGNIHHK
 PGGGQVEVKS EKLDKDRVQ SKIGSLDNIT HVPGGGNKKI ETHKLTFR ENAKAKTDHGA
 EIVYKSPWSG DTSPRHLSN VSSTGSIDMV SPQLATLA DEVSASLAKQGL;

SEQ ID NO: 105 (0N4R):

MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKAEAGI GDTPSLEDEA
 AGHVTQARMV SKSKDGTGSD DKKAKGADGK TKIATPRGAA PPGQKQGQANA TRIPAKTPPA
 PKTPPSSGEP PKSGDRSGYS SPGSPGTPGS RSRTPLPTP PTREPKKVAV VRTPPKSPSS
 AKSRLQTAPV PMPDLKNVKS KIGSTENLKH QPGGGKVQII NKKLDLSNVQ SKCGSKDNIH
 HVPGGGSVQI VYKPVDSLKV TSKCGSLGNI HHKPGGGQVE VKSEKLDKFD RVQSKIGSLD
 NITHVPGGGN KKIETHKLTFR RENAKAKTDH GAEIVYKSPV VSGDTSPRHL SNVSSTGSID
 MVDSPQLATL ADEVASLAK QGL;

SEQ ID NO: 106 (1N3R):

MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
SETSDAKSTP TAEAEAGIG DTPSLEDEAA GHVTQARMVS KSKDGTGSD KAKAGADGKT
KIATPRGAAP PGQKGQANAT RPAKTPPAP KTPSSGEPP KSGDRSGYSS PGSPGTPGSR
5 SRTPSLPTPP TREPKKVAVV RTPPKSPSSA KSRLQTAPVP MPDLKNVSK IGSTENLKHQ
PGGGKVQIVY KPVDSLKVT KCGSLGNIH KPGGGQVEVK SEKLDKDRV QSKIGSLDNI
THVPGGGNKK IETHKLTFR NAKAKTDHGA EIVYKSPVVS GDTSPRHLSN VSSTGSIDMV
DSPQLATLAD EVSASLAKQ L;

SEQ ID NO: 107 (0N3R):

10 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKAEAGI GDTPSLEDEA
AGHVTQARMV SKSKDGTGSD DKKAKGADGK TKIATPRGAA PPGQKGQANA TRIPAKTPPA
PKTPSSGEP PKSGDRSGYS SPGSPGTPGS RSRTPSLPTP PTREPKKVAV VRTPPKSPSS
AKSRRLQTAPV PMPDLKNVKS KIGSTENLKH QPGGGKVQIV YKPVDSLKVT SKCGSLGNIH
HKPGGGQVEV KSEKLDKDR VQSKIGSLDN ITHVPGGGNK KIETHKLTFR ENAKAKTDHG
15 AEIVYKSPW SGTSPRHLS NVSSTGSIDM VDSPQLATLA DEVSASLAKQ GL.

Застосування вакцин на основі пептидів для індукції імунної відповіді при захворюваннях, проти яких ще не доступні загальноприйняті вакцини, є перспективним (Brown, 1994; BenYedidia, et al., 1997). Однак в багатьох випадках невеликі пептиди є поганими імуногенами, оскільки вони діють як гаптени, які позбавлені необхідних епітопів Th-клітин і/або які захоплюються антигенпредставляючими клітинами (APC) з низькою ефективністю. У одному варіанті здійснення, даного винаходу імуногенні епітопи можуть бути більш довгими поліпептидами, які включають захисний епітоп тау-пептиду, або аналог разом з іншими амінокислотами.

Деякі з засобів, описаних в даному документі для індукції імунної відповіді, містять придатний епітоп для індукції імунної відповіді проти патологічного білка тау і відкладення тау, але є дуже малими, щоб бути імуногенними. У цьому випадку, пептидний імуноген може бути зв'язаний з придатним носієм, який допомагає індукувати імунну відповідь. У певних варіантах здійснення, придатні носії включають сироваткові альбуміни, гемоціанін лімфи равлика, молекули імуноглобулінів, тиреоглобулін, овальбумін, правцевий токсин або токсин з інших патогенних бактерій, такий як дифтерійний, E. coli, холерний або H. pylori, або ослаблене похідне токсину. Інші носії для стимуляції або посилення імунної відповіді включають цитокіни, такі як IL-1, пептиди IL-1 α і β , IL-2, γ INF, IL-10, GM-CSF і хемокіни, такі як MIP1 α і β і RANTES. Імуногенні агенти також можуть бути зв'язані з пептидами, які посилюють транспорт через тканини, як описано в O'Mahony, WO 97/17613 і WO 97/17614.

Імуногенні агенти можуть бути зв'язані з носієм шляхом хімічного зшивання. Способи зв'язування імуногена з носієм включають утворення дисульфідних зв'язків з використанням N-сукцинімідил-3-(2-піридилтіо)пропіонату (SPDP) і сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил)циклогексан-1-карбоксилату (SMCC) (якщо пептид позбавлений сульфгідрильної групи, це може бути забезпечено приєднанням залишку цистеїну). Ці реагенти створюють дисульфідний зв'язок між ними самими і залишками цистеїну в пептиді на одному білку і амідний зв'язок через епсилон-аміногрупу на лізині або іншу вільну аміногрупу в інших амінокислотах. Множина таких утворюючих дисульфід/амід агентів описана в Immun. Rev. 62, 185 (1982). Інші біфункціональні зв'язувальні агенти утворюють тіоефірний, а не дисульфідний зв'язок. Багато які з цих утворюючих тіоефір агентів є комерційно доступними і включають реакційноздатні складні ефіри 6-малеїмідокапроєвої кислоти, 2-бромоцтової кислоти і 2-йодоцтової кислоти, 4-(N-малеїмідометил)циклогексан-1-карбонової кислоти. Карбоксильні групи можуть бути активовані шляхом комбінування їх з сукцинімідом або 1-гідроксил-2-нітро-4-сульфоною кислотою, сіль натрію.

Імуногенні пептиди також можуть експресуватися як злиті білки з носіями. Імуногенний пептид може бути зв'язаний з носієм на N-кінці, C-кінці або в ділянці будь-де в пептиді (внутрішньо). У деяких варіантах здійснення, в злитому білку може бути присутня множина повторів імуногенного пептиду.

Наприклад, також передбачаються імуногени, які включають злиті білки, які містять тау-пептид, що містить захисний B-клітинний епітоп, зв'язаний з випадковим неприродним загальним по DR епітопом Th-клітин, який індукує B-клітинну відповідь проти захисного епітопа. У наступній альтернативі винахід стосується імуногенів, які можуть бути сконструйовані як полімери (Jackson et al., 1997), множинні системи антигенних пептидів (MAP) (Tam and Recent, 1996), імуностимулюючі комплекси (ISCOM) (Barr I. G. and Mitchell, 1996) і, можливо, інші розгалужені амфотерні поліпептиди (Wilkinson et al., 1998) або химерні пептиди, одержувані шляхом колінеаризації епітопів (Marussig et al., 1997).

У певних варіантах здійснення, терапевтичні пептиди можна використовувати окремо або в комбінації, зв'язаними або не зв'язаними з фармацевтично прийнятним носієм, включаючи KLH, правцевий токсод, зв'язуючий альбумін білок, бичачий сироватковий альбумін, дендример (MAP; *Biol. Chem.* 358: 581), а також ад'ювантними речовинами або їх комбінаціями, описаними, наприклад, в O'Hagan et al. (2003) (зокрема, ендogenous імуностимулюючі сполуки і системи розподілу, описані в даному документі) і в Wilson-Welder et al. (2009) (зокрема, з тими з них, які представлені в таблиці 2 і 3 вказаного документа), або їх сумішами.

У певних варіантах здійснення, імуногенний агент за даним винаходом може бути зв'язаний або приєднаний до придатного носія хімічним зшиванням для посилення імунної відповіді проти патологічного білка тау, в тому числі відкладення білка тау. У певних варіантах здійснення, зв'язаний або приєднаний фармацевтично прийнятний носій являє собою гемоціанін лімфи равлика (KLH), правцевий токсод, бичачий сироватковий альбумін (BSA), молекулу імуноглобуліну (Ig), тиреоглобулін або овоглобулін. Інші носії для стимуляції імунної відповіді включають цитокіни (такі як IL-1, IL-2, IL-10, IFN γ , GM-CSF) і хемокіни (такі як MIP1 α і β).

Пептиди або аналоги білка тау можна синтезувати за допомогою твердофазного синтезу пептидів або рекомбінантної експресії, або їх можна одержувати з природних джерел. Автоматичні пристрої для синтезу пептидів є комерційно доступними від численних постачальників, таких як Applied Biosystems, EZBiolab або Antagene. Рекомбінантні експресуючі системи включають бактерії, такі як *E. coli*, дріжджі, клітини комах або клітини ссавців. Методи для маніпулювання ДНК і одержання конструкцій ДНК для рекомбінантної експресії описані Sambrook et al. (1989), способи одержання рекомбінантних білків детально описані в *Current Protocols in Protein Science* (розділ 5 "Production of Recombinant Proteins", UNITS 5.1-5.24, DOI: 10.1002/0471 140864, також доступна на onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/0471 140864/toc).

Імуногенні агенти за даним винаходом можуть експресуватися вірусом або бактерією як вектор або носій. Нуклеїнову кислоту, що кодує імуногенний пептид, вбудовують в геном або епісому вірусу або бактерії. У результаті, імуногенні пептиди можуть експресуватися як секретований білок або як злитий білок з білком зовнішньої поверхні вірусу, або вони можуть експонуватися як трансмембранний білок бактерій. Віруси або бактерії, використовувані в таких способах, звичайно є непатогенними або ослабленими. Придатні віруси включають аденовірус, HSV, вірус венесуельського енцефаліту коней і інші альфа-віруси, вірус везикулярного стоматиту і інші рабдовіруси, віруси вісповакцини і віспи птахів. Придатні бактерії включають *Salmonella* і *Shigella*. Альтернативно є придатним злиття імуногенного пептиду з HBsAg HBV.

Наступний аспект даного винаходу стосується лікарського засобу або імуногена, які також можуть бути аналогами різних пептидів, описаних в різних варіантах здійснення (наприклад SEQ ID NO: 1-4; 9-97), або їх фрагментами.

Даний винахід також оснований на відкритті нових пептидів, позначуваних в даній заявці як сконструйовані терапевтичні епітопи. Незважаючи на наявність первинної послідовності, яка відрізняється від первинної послідовності білка тау і фрагментів білка тау, даний винахід стосується сконструйованих терапевтичних епітопів, які здатні мати форму (наприклад внутрішньо нерегульована структура, третинна структура, конформація), яка імітує цей один або декілька з "терапевтичних епітопів" білка тау, описаних вище. Шляхом імітації однієї або декількох з цих областей, ці сконструйовані терапевтичні епітопи можуть бути придатні для одержання антитіл проти них, таких як антитіла, які конкурують з DC8E8. Ці пептиди здатні конкурувати з білком тау або фрагментами білка тау за зв'язування з антитілом DC8E8, описаним вище.

Також включені імуногенні сконструйовані терапевтичні епітопи, які здатні індукувати імунну відповідь на патологічний білок тау при ін'єктуванні в моделях AD на щурах і які, як можна очікувати, будуть здійснювати те ж саме у людини. Крім цього, також описані антитіла/антисироватки миші, продукуючі у відповідь на імунізацію одним або декількома сконструйованими терапевтичними епітопами і здатні (i) розпізнавати один або декілька епітопів, які являють собою або імітують епітопи DC8E8; (ii) розрізнявати патологічний білок тау і нормальний білок тау; i/або (iii) розпізнавати нейрофібрилярні осередки в головному мозку людини при AD i/або в моделях AD на трансгенних щурах.

Винахід також стосується композицій для попередження, лікування i/або діагностики хвороби Альцгеймера, де композиція містить (i) засіб для лікування хвороби Альцгеймера у індивідуума шляхом інгібування агрегації тау-тау; і (2) фармацевтично прийнятний носій i/або розріджувач. Винахід також стосується композицій для попередження, лікування i/або діагностики хвороби Альцгеймера, де композиція містить (i) засіб для лікування хвороби Альцгеймера у індивідуума шляхом зв'язування з одним або декількома "терапевтичними епітопами" в патологічному білку тау; і (2) фармацевтично прийнятний носій i/або розріджувачі.

Винахід також стосується композицій для попередження, лікування і/або діагностики хвороби Альцгеймера, де композиція містить (і) засіб для зниження агрегації тау-тау шляхом зв'язування з одним або декількома "терапевтичними епітопами" в патологічному білку тау; і (2) фармацевтично прийнятний носій і/або розріджувачі.

5 Склади

Засоби за винаходом можна вводити як фармацевтичні склади, що містять лікарський засіб (наприклад антитіло або пептид, як описано вище) і один або декілька інших фармацевтично прийнятних компонентів. Див. Remington's Pharmaceutical Science (15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1980). Ці склади включають, наприклад, порошки, пасту, мазі, желе, 10 воски, масла, ліпіди, везикули, що містять ліпіди (катіонні або аніонні) (такі як LIPOFECTIN), кон'югати ДНК, безводні абсорбційні пасту, емульсії типу "масло-в-воді" і "вода-в-маслі", емульсії карбовакс (поліетиленгліколі з різною молекулярною масою), напівтверді гелі і напівтверді суміші, що містять карбовакс. Будь-яка з вказаних вище сумішей може бути придатна для способів лікування і терапії відповідно до даного винаходу, за умови, що активний 15 інгредієнт в складі не інактивується складом і склад є фізіологічно сумісним і переносимим при даному шляху введення. Див. також Baldrick P. "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance." Regul. Toxicol. Pharmacol. 32(2):210-8 (2000), Wang W. "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals". Int. J. Pharm. 203(1-2):1-60 (2000), Charman W.N. "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts". J. Pharm Sci. 89(8):967-78 (2000), Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations". PDA J Pharm Sci Technol. 52:238-31 1 (1998), і цитати в них, для додаткової інформації, що стосується складів, екципієнтів і носіїв, відомих фармацевтичним хімікам.

Широка множина фармацевтично прийнятних екципієнтів відома в даній галузі і не потребує детального обговорення в даному описі. Фармацевтично прийнятні екципієнти 25 докладно описані в різних публікаціях, що включають, наприклад, Gennaro A. (2000) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 20th edition, Lippincott, Williams, & Wilkins; Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (1999) H.C. Ansel et al., eds., 7th ed., Lippincott, Williams, & Wilkins; і Handbook of Pharmaceutical Excipients (2000) A.H. Kibbe et al., eds., 3 ed. Amer. Pharmaceutical Assoc.

Вибраний склад залежить від передбачуваного шляху введення і терапевтичного застосування. Склади також можуть включати фармацевтично прийнятні нетоксичні носії або розріджувачі, які визначають як носії, широко використовувані для складання фармацевтичних композицій для введення тварині або людині. Розріджувач вибирають так, щоб він не впливав на біологічну активність комбінації. Прикладами таких розріджувачів є дистильована вода, 35 фізіологічний фосфатно-сольовий буфер, розчини Рінгера, розчин декстрази і розчин Хенкса. Фармацевтична композиція або склад також можуть включати інші носії, ад'юванти або нетоксичні, нетерапевтичні, неімунотоксичні стабілізатори і т. п. Однак, деякі реагенти, придатні для введення тваринам, такі як повний ад'ювант Фрейнда, як правило, не включають в композиції для застосування у людини.

40 Приклади придатних фармацевтичних носіїв відомі в даній галузі і включають фосфатно-сольові буфери, воду, емульсії, такі як емульсії масло/вода, різні типи змочувальних речовин, стерильні розчини і т. д. Композиції, що містять такі носії, можна складати відомими загальноприйнятими способами. Більш детально носії описані нижче.

Ад'юванти

45 Терапевтичні засоби, імуногени, за винаходом можна вводити в комбінації з ад'ювантами, тобто речовинами, які самі по собі не викликають адаптивну імунну відповідь, але посилюють або модулюють відповідь на супутній антиген. У комбінації з терапевтичними пептидами і антитілами за даним винаходом можна використовувати різні ад'юванти, для індукції імунної відповіді. Переважний ад'ювант(и) посилює природну відповідь на імуноген, не викликаючи 50 конформаційні зміни імуногена, які вплинули б на якісну форму відповіді.

У певних варіантах здійснення, ад'ювант являє собою сіль алюмінію (галун), таку як гідроксид алюмінію, фосфат алюмінію і сульфат алюмінію (Hunter, 2002). Такі ад'юванти можна використовувати з іншими конкретними імуностимулюючими засобами, такими як 3-де-О-ацильований монофосфорилліпід А (MPL) або 3-DMP, полімерні або мономерні амінокислоти, 55 такі як поліглутамінова кислота або полілізін, або без них. Такі ад'юванти можна використовувати з іншими конкретними імуностимулюючими засобами, такими як мурамілпептиди (наприклад N-ацетилмураміл-L-треоніл-D-ізоглутамін (thr-MDP), N-ацетилнормураміл-L-аланіл-D-ізоглутамін (nor-MDP), N-ацетилмураміл-L-аланіл-D-ізоглутамініл-L-аланін-2-(1'-2'-дипальмітоїл-sn-гліцеро-3-гідроксифосфорилокси)етиламін (MTP-PE), N-ацетилглюкозамініл-N-ацетилмураміл-L-Al-D-ізо-glu-L-Ala-дипальмітоксипропіламід (DTP-DPP) 60

theramide™) або інші компоненти клітинної стінки бактерій, або без них. Інші ад'юванти являють собою емульсії типу "масло-в-воді" і включають (a) MF59 (WO 90/14837, Van Nest et al., яка включена в даний опис як посилання в повному обсязі), що містить 5 % сквален, 0,5 % Tween 80 і 0,5 % Span 85 (що необов'язково містить різні кількості MTP-PE), складений у вигляді субмікронних частинок з використанням мікрофлуїдизатора, такого як мікрофлуїдизатор Model 110Y (Microfluidics, Newton Mass.), (b) SAF, що містить 10 % сквален, 0,4 % Tween 80, 5 % pluronic-блокований полімер L121, і thr-MDP, або мікрофлуїдизований в субмікронну емульсію, або перемішаний струшуванням для одержання емульсії з більш великим розміром частинок, і (c) ад'ювантну систему Ribi.TM. (RAS) (Ribi InunoChem, Hamilton, Mont.), що містить 2 % сквален, 0,2 % Tween 80, і один або декілька компонентів клітинної стінки бактерій з групи, яка складається з монофосфорилліпиду A (MPL), диміколату трегалози (TDM) і скелета клітинної стінки (CWS), наприклад MPL+CWS (Detox.TM.). У деяких варіантах здійснення, ад'ювант являє собою сапонін, такий як Stimulon™ (QS21, Aquila, Worcester, Mass.), або частинки, сформовані з нього, такі як ISCOM (імуностимулюючі комплекси) і ISCOMATRIX. Інші ад'юванти включають повний ад'ювант Фрейнда (CFA) і неповний ад'ювант Фрейнда (IFA), цитокіни, такі як інтерлейкіни (IL-1, IL-2 і IL-12), макрофагальний колонієстимулюючий фактор (M-CSF) і фактор некрозу пухлини (TNF).

Альтернативно тау-пептиди і їх імуногенні аналоги можна зв'язувати з ад'ювантом. Наприклад, ліпопептидну версію тау-пептиду "A" можна одержувати шляхом приєднання пальмітинової кислоти або інших ліпідів безпосередньо до N-кінця "A", як описано для вакцинації антигеном гепатиту B [Livingston, J. Immunol. 159, 1383-1392 (1997)]. Однак таке приєднання по суті не повинно змінювати конформацію тау-пептиду "A" настільки, щоб вплинути на природу імунної відповіді на нього.

Ад'ювант можна вводити з імуногеном як єдину композицію або його можна вводити до, одночасно або після введення імуногена. Імуноген і ад'ювант можуть бути упаковані і надані в одній і тій же місткості або вони можуть бути упаковані в окремі місткості і їх змішують перед застосуванням. Імуноген і ад'ювант, як правило, упаковані з ярликом, на якому указано передбачуване терапевтичне застосування. Якщо імуноген і ад'ювант упаковані по окремо, упаковка, як правило, включає інструкції по змішуванню перед застосуванням. Вибір ад'юванту і/або носія залежить від стабільності імуногенного складу, що містить ад'ювант, шляху введення, схеми дозування, ефективності ад'юванту для виду, що піддається вакцинації, і, у людини, фармацевтично прийнятний ад'ювант являє собою ад'ювант, який схвалений або може бути схвалений для введення у людини відповідними контролюючими органами. Наприклад, повний ад'ювант Фрейнда не придатний для введення у людини. Однак, для введення у людини придатний галун, MPL або неповний ад'ювант Фрейнда [Chang et al., Advanced Drug Delivery Reviews, 32:173-186 (1998)], яка включена в даний опис як посилання в повному обсязі) окремо або необов'язково в комбінації з будь-яким з галунів, QS21 і MPL і всі їх комбінації.

Фармацевтичні композиції також можуть включати великі повільно метаболізовані макромолекули, такі як білки, полісахариди, такі як хітозан, полімолочні кислоти, полігліколеві кислоти і співполімери (наприклад функціоналізована латексом сефароза, агароза, целюлоза і т. п.), полімерні амінокислоти, співполімери амінокислот і агрегати ліпідів (наприклад масляні краплі або ліпосоми). Крім цього, ці носії можуть виконувати функцію імуностимулюючих засобів (тобто ад'ювантів).

Комбінації

Винахід стосується композицій і способів для лікування, які поєднують в собі антитіла і пептиди, описані в даному документі, з іншими способами лікування AD і споріднених таупатій. Наприклад, на даний час пов'язані з тау терапевтичні стратегії, головним чином, сфокусовані на лікарських засобах, які інгібують кінази білка тау або активують фосфатази [Iqbal and Grundke-Iqbal, 2004, 2005, 2007; Noble et al. 2005], лікарських засобах, які стабілізують мікротрубочки (Zhang et al. 2005), лікарських засобах, які сприяють протеолітичній деградації неправильно згорненого білка тау [Dickey et al. 2005; Dickey and Petrucelli, 2006; Dickey et al. 2006], сполуках, які перешкоджають або обертають назад агрегацію білка тау [Wischik et al. 1996; Pickhardt et al. 2005; Taniguchi et al. 2005; Necula et al. 2005; Larbig et al. 2007] або опосередкованому вакциною виведенні агрегованого білка тау (Asuni et al. 2007). Таким чином, винахід стосується того, що множинне націлювання (наприклад націлювання як на білок тау, так і на бета-амілоїд) може суттєво збільшити ефективність лікування.

У випадку хвороби Альцгеймера і споріднених таупатій, при яких патологічний розчинний білок тау і нерозчинний білок тау (відкладення тау) з'являються в головному мозку, засіб за винаходом також можна вводити разом з іншими засобами, які збільшують проходження засобів за винаходом через гематоенцефалічний бар'єр.

Способи введення

Засоби для індукції імунної відповіді (пасивної або активної), для зниження рівня білка тау або для будь-яких зі способів попередження, лікування або діагностики (*in vivo*), описаних в даному документі, можна вводити парентеральним, місцевим, внутрішньошкірним, внутрішньовенним, пероральним, підшкірним, внутрішньоочеревинним, інтраназальним або внутрішньом'язовим шляхом для профілактичного і/або терапевтичного лікування. Типовим шляхом введення є підшкірний шлях, хоч інші шляхи можуть бути рівно ефективними. Іншим типовим шляхом є внутрішньом'язова ін'єкція. Цей тип ін'єкції, найчастіше, виконують в м'язи передпліччя або стегна. Внутрішньовенні ін'єкції, так само як і внутрішньоочеревинні ін'єкції, внутрішньоартеріальні, внутрішньочерепні або внутрішньошкірні ін'єкції, також є ефективними відносно індукції імунної відповіді. У деяких способах засоби ін'єктують прямо в конкретну тканину, де скупчилося відкладення.

Аерозольні склади, такі як склади назального спрею, включають очищені водні або інші розчини активної речовини з консервантами і ізотонічними засобами. Такі склади наприклад доведені до рН і ізотонічного стану, сумісних зі слизовими оболонками носа. Склади для ректального або вагінального введення можуть бути надані як супозиторії з придатним носієм.

Для парентерального введення терапевтичні пептиди за даним винаходом можна вводити як ін'єктовані дозування розчину або суспензії речовини в фізіологічно прийнятному розріджувачі з фармацевтичним носієм, який може являти собою стерильну рідину, таку як вода, масло, сольовий розчин, гліцерин або еанол. Крім цього, в композиціях можуть бути присутніми допоміжні речовини, такі як змочувальні речовини або емульгатори, поверхнево-активні речовини, рН-буферні речовини і т. п. Інші компоненти фармацевтичних композицій являють собою компоненти нафтового, тваринного, рослинного або синтетичного походження. Всі з арахісової олії, соєвої олії і мінерального масла є прикладами придатних матеріалів. Як правило, гліколі, такі як пропіленгліколь або поліетиленгліколь, є переважними рідкими носіями, зокрема, для ін'єктованих розчинів. Засоби за винаходом також можна вводити у формі депо-ін'єкції або імплантованого препарату, який може бути складений таким чином, щоб забезпечити уповільнене вивільнення активного інгредієнта. Ілюстративна композиція містить моноклональне антитіло в кількості 5 мг/мл, складене у водному буфері, що складається з 50 мМ L-гістидину, 150 мМ NaCl, доведеному до рН 6,0 за допомогою HCl.

Препарати для парентерального введення включають стерильні водні або неводні розчини, суспензії і емульсії. Прикладами неводних розчинників є пропіленгліколь, поліетиленгліколь, рослинні олії, такі як оливкова олія, і ін'єктовані органічні складні ефіри, такі як етилолеат. Водні носії включають воду, спиртові/водні розчини, емульсії або суспензії, включаючи сольовий розчин і буферні середовища. Парентеральні носії включають розчин хлориду натрію, розчин декстрази Рінгера, розчин декстрази і хлориду натрію, лактований розчин Рінгера або жирні масла. Внутрішньовенні носії включають засоби, що поповнюють рідину і поживні речовини, засоби, що поповнюють електроліти (такі як засоби на основі розчину декстрази Рінгера), і т. п. Також можуть бути присутніми консерванти і інші добавки, наприклад, такі як протимікробні засоби, антиоксиданти, хелатуючі агенти і інертні гази, і т. п.

Як правило, композиції одержують як ін'єктовані препарати, або як рідкі розчини, або як суспензії; також можна одержувати тверді форми, придатні для розчинення або суспендування в рідких носіях перед ін'єкцією. Препарат також може бути емульгований або інкапсульований в ліпосоми або мікрочастинки, такі як на основі полілактиду, полігліколіду або співполімеру, для посилення ад'ювантного ефекту, як розглянуто вище [див. Langer, Science, 249, 1527 (1990), і Hanes, Advanced Drug Delivery Reviews 28, 97-119 (1997)]. Засоби за даним винаходом можна вводити у формі депо-ін'єкції і імплантованого препарату, які можуть бути складені так, щоб забезпечити безперервне або імпульсне вивільнення активного інгредієнта.

Додаткові склади, придатні для інших шляхів введення, включають пероральні, інтраназальні і легеневі склади, супозиторії і склади для черезшкірного застосування.

Для супозиторіїв зв'язувальні речовини і носії включають наприклад поліалкіленгліколі або тригліцериди; такі супозиторії можуть бути утворені з сумішей, що містять активний інгредієнт в діапазоні від 0,5 до 10 %, наприклад 1-2 %. Пероральні склади включають ексципієнти, такі як маніт, лактоза, крохмаль, стеарат магнію, сахарин натрію, целюлоза і карбонат магнію фармацевтичної категорії. Ці композиції мають форму розчинів, суспензій, таблеток, пілюль, капсул, складів з уповільненим вивільненням або порошоків і містять 10-95 % активного інгредієнта, наприклад 25-70 %.

Місцеве застосування може забезпечити черезшкірну або внутрішньошкірну доставку. Місцевому введенню може сприяти спільне введення засобу з холерним токсином або його детоксифікованими похідними або субодиницями, або іншими схожими бактеріальними

токсинами [див. Glenn et al., *Nature*, 391, 851 (1998)]. Спільного введення можна досягати з використанням компонентів як суміші або як зв'язаних молекул, одержаних шляхом хімічного зшивання або експресії як злитого білка.

Альтернативно черезшкірну доставку можна забезпечувати з використанням трансдермального пластиру або з використанням трансферосом [Paul et al., *Eur. J. Immunol.* 25, 3521-24 (1995); Cevc et al., *Biochem. Biophys. Acta* 1368, 201-15 (1998)]. Підшкірне введення антитіла, пептиду або сполуки, що розглядаються, здійснюють з використанням стандартних способів і пристроїв, наприклад голки і шприца, системи підшкірної доставки через отвір для ін'єкції і т. п. Внутрішньом'язове введення здійснюють за допомогою стандартних засобів, наприклад голки і шприца, системи для безперервної доставки і т. д. В деяких варіантах здійснення, антитіло, пептид і/або сполуку, що розглядаються, доставляють за допомогою системи для безперервної доставки. Термін "система для безперервної доставки" використовують в даному описі взаємозамінно з терміном "система для контрольованої доставки", і він охоплює медичні пристрої (наприклад насоси) для безперервної (наприклад контрольованої) доставки в комбінації з катетерами, пристроями для ін'єкцій і т. п., широка множина яких відома в даній галузі. Також для застосування в рамках даного винаходу можуть бути придатні механічні або електромеханічні інфузійні насоси. Приклади таких пристроїв включають пристрої, описані, наприклад, в патентах США №№ 4692147; 4360019; 4487603; 4360019; 4725852; 5820589; 5643207; 6198966 і т. п. Як правило, способи доставки лікарських засобів за даним винаходом можна виконувати з використанням будь-яких з множини насосних систем, що заправляються. Насоси забезпечують постійне контрольоване вивільнення з перебігом часу.

Засоби також можна вводити за допомогою стандартної на даний час методики просвердлювання невеликого отвору в черепі для введення лікарського засобу. У переважному аспекті зв'язувальна молекула, особливо антитіло або лікарський засіб на основі антитіла за даним винаходом, може проходити через гематоенцефалічний бар'єр, що дозволяє здійснювати внутрішньовенне або пероральне введення.

У фармацевтичних дозованих формах засоби (антитіла, пептиди, сполуки, передбачувані винаходом) можна вводити у формі їх фармацевтично прийнятних солей або їх також можна використовувати окремо або у відповідній асоціації, а також в комбінації з іншими фармацевтично активними сполуками. Способи і ексципієнти, описані в даному документі, є тільки ілюстративними і ніяким чином не обмежувальними. Антитіло, пептид або сполуку, що розглядаються, можна складати у вигляді препаратів для ін'єкції шляхом розчинення, суспендування або емульгації їх у водному або неводному розчиннику, такому як рослинні або інші схожі олії, синтетичні аліфатичні кислоти гліцериди, складні ефіри вищих аліфатичних кислот або пропіленгліколю; і, якщо бажано, із загальноприйнятими добавками, такими як солюбілізатори, ізотонічні засоби, суспендуючі речовини, емульгатори, стабілізатори і консерванти. Одиничні дозовані форми для ін'єкції або внутрішньовенного введення можуть містити активну речовину в композиції як розчин в стерильній воді, нормальному сольовому розчині або іншому фармацевтично прийнятному носії. Термін "одинична дозована форма" або "доза", який використовують в рамках винаходу, стосується фізично дискретних одиниць, придатних як одиничні дозування для людини і тварин, причому кожна одиниця містить задану кількість антитіла, що розглядається, обчислену в кількості, достатній для забезпечення бажаного ефекту, в асоціації з фармацевтично прийнятним розріджувачем, носієм або наповнювачем. Характеристики одиничних дозованих форм за даним винаходом залежать від конкретної використовуваної сполуки і від ефекту, якого мають намір досягнути, і фармакодинаміки, асоційованої з кожною сполукою, у хазяїна.

Імунні відповіді проти патологічних білків тау і відкладень тау також можуть бути індуковані шляхом введення нуклеїнових кислот, що кодують терапевтичні тау-пептиди. Такі нуклеїнові кислоти можуть являти собою ДНК або РНК. Сегмент нуклеїнової кислоти, що кодує імуноген, зв'язаний з регуляторними елементами, такими як промотор і енхансер, які забезпечують експресію такого сегмента ДНК в передбачуваних клітинах-мішенях пацієнта. Звичайно промоторні і енхансерні елементи з генів імуноглобулінів (легкого або важкого ланцюга) або головний передранній промотор і енхансер CMV придатні для спрямування експресії в клітинах крові, які є бажаною мішенню для індукції імунної відповіді. Зв'язані регуляторні елементи і кодуючі послідовності часто клонують у вектор.

Доступний ряд систем вірусних векторів, включаючи ретровірусні системи (див., наприклад, Lawrie et al., *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3:102-109 (1993), яка включена в даний опис як посилання в повному обсязі); аденовірусні вектори (Bett et al., *J. Virol.* 67:5911 (1993), яка включена в даний опис як посилання в повному обсязі); вектори на основі аденоасоційованого

вірусу (Zhou et al., J. Exp. Med. 179:1867 (1994), яка включена в даний опис як посилання в повному обсязі), вірусні вектори з сімейства покс-вірусів, включаючи вірус вісповакцини і віруси віспи птахів, вірусні вектори з роду альфа-вірусів, такі як вектори, що походять з вірусу Синдбіс і вірус лісу Семліки (Dubensky et al., J. Virol 70:508-519 (1996), яка включена в даний опис як посилання в повному обсязі), вірус венесуельського енцефаліту коней (див. патент США № 5643576, Johnston et al., який включений в даний опис як посилання в повному обсязі) і рабдовіруси, такі як вірус везикулярного стоматиту (див. WO 96/34625, Rose, яка включена в даний опис як посилання в повному обсязі) і віруси папіломи (Ohe et al., Human Gene Therapy 6:325-333 (1995); WO 94/12629, Woo et al.; і Xiao & Brandsma, Nucleic Acids. Res. 24:2630-2622 (1996), які включені в даний опис як посилання в повному обсязі).

ДНК, що кодує імуноген, або вектор, що її містить, можуть бути поміщені в ліпосоми. Придатні ліпіди і споріднені аналоги описані в патентах США №№ 5208036, 5264618, 5279833 і 5283185. Вектори і ДНК, що кодують імуноген, також можуть бути адсорбовані або зв'язані з носіями у формі частинок, приклади яких включають поліметилметакрилатні полімери і полілактиди і співполімери лактидів і гліколідів, див., наприклад, McGee et al., J. Micro Encap. (1996).

Вектори для генної терапії або оголену ДНК можна доставляти *in vivo* шляхом введення конкретному пацієнту, як правило, шляхом системного введення (наприклад внутрішньовенна, внутрішньоочеревинна, назальна, шлункова, внутрішньошкірна, внутрішньом'язова, підшкірна або внутрішньочерепна інфузія) або місцевого застосування (див., наприклад, патент США № 5399346). ДНК також можна вводити з використанням генної гармати (див. патент США № 6436709). У даній заявці ДНК, що кодує імуноген, преципітують на поверхню мікроскопічних металевих гранул. Мікроснаряди прискорюють за допомогою ударної хвилі або розширюваного газоподібного гелію, і вони проникають в тканини на глибину декількох клітинних шарів (розглянуто в Haynes et al., 1996). Наприклад, є придатними пристрій для доставки генів Accel™, що виготовляється Agacetis, Inc. (Middleton, WI), або генна гармата Helios, що виготовляється Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA). Для терапевтичних цілей ДНК також можна доставляти шляхом електропорації (наприклад, як описано в Trollet et al., 2008, і посиланнях у вказаному джерелі). Альтернативно оголена ДНК може проходити через шкіру в кровотік просто при точковому нанесенні ДНК на шкіру разом з хімічним або механічним подразненням (див. WO 95/05853) або шляхом татуювання (наприклад, як описано van den Berg et al., 2009).

У іншому варіанті здійснення, ДНК або вектори, що кодують імуногени, можна доставляти в клітини *ex vivo*, такі як клітини, експлантовані з конкретного пацієнта (наприклад лімфоцити, одержані шляхом аспірації матеріал кісткового мозку, біоптат тканини) або гемопоетичні стовбурові клітини від універсального донора, з подальшою реімплантацією клітин пацієнту, наприклад, після підтвердження експресії імуногена, і звичайно після селекції клітин, які включили вектор.

Іншим перспективним, хоч і більш ризикованим, підходом для лікування людини є трансфекція дендритних клітин (DC, шляхом прямої доставки ДНК або з використанням вірусних стратегій) для продукції самого антигена (Xing et al., 2005), таким чином забезпечуючи безперервне надання незміненого антигена, що представляється через MHC I.

Індивідууми, що підлягають лікуванню

Індивідууми, що підлягають лікуванню, включають індивідуумів, які мають ризик хвороби Альцгеймера або споріднених таупатій, але не мають симптомів, а також пацієнтів, що вже мають симптоми. У випадку хвороби Альцгеймера, практично кожен має ризик хвороби Альцгеймера, якщо він або вона живе досить довго. Таким чином, способи лікування або терапії за даним винаходом можна проводити навіть профілактично у загальної популяції без якої-небудь оцінки ризику у конкретного пацієнта. Вакцини, описані в даному патенті, можуть бути особливо придатними для індивідуумів, які мають відомий генетичний ризик хвороби Альцгеймера. Такі індивідууми включають індивідуумів, що мають родичів, які страждають на це захворювання, і індивідуумів, у яких ризик визначається присутністю генетичних або біохімічних маркерів. Генетичні маркери ризику сімейної хвороби Альцгеймера з раннім початком включають мутації в гені APP, генах пресеніліну PS1 і PS2, і маркери хвороби Альцгеймера з пізнім початком включають мутації в гені ApoE4 (нещодавно розглянуто Bertram and Tanzi, 2008). Додаткові фактори ризику включають AD в сімейному анамнезі, гіперхолестеринемію або атеросклероз.

Індивідуумів, які на даний момент страждають на хворобу Альцгеймера, можна розпізнати по характерній деменції, а також по наявності факторів ризику, описаних вище. Крім цього, доступний ряд діагностичних тестів для ідентифікації індивідуумів, які мають AD. Вони

включають кількісне визначення рівнів загального білка тау, фосфо-тау і амілоїду $\beta(1-42)$ в CSF. Підвищені рівні білка тау і/або фосфо-тау і знижені рівні амілоїду $\beta(1-42)$ вказують на наявність AD. Індивідууми, які страждають на хворобу Альцгеймера, також можуть бути діагностовані по MMSE, ADRDA або інших критеріях.

5 У безсимптомних пацієнтів лікування може бути почате в будь-якому віці (наприклад 10, 20, 30). Однак, може не бути необхідним починати лікування доти, поки пацієнт не досягне 40, 50, 60 або 70. Лікування може залучати множину дозувань протягом деякого періоду часу. Моніторинг лікування можна проводити шляхом оцінки відповідей антитіла або активованих Т-клітин або В-клітин на лікарський засіб (наприклад тау-пептид) з перебігом часу. Якщо відповідь
10 знижується, показано допоміжне дозування. У випадку потенційних пацієнтів з синдромом Дауна, які мають більш високий ризик AD або споріднених таупатій, лікування можна починати внутрішньоутробно, шляхом введення лікарського засобу матері, або незабаром після народження.

У деяких варіантах здійснення, DC8E8 (або його химерне, гуманізоване, людське або інше похідне/частина/фрагмент) являє собою антитіло або пасивну вакцину, призначену для застосування у літніх пацієнтів з хворобою Альцгеймера (AD) зі старіючою імунною системою, які демонструють значне зниження рівнів костимулюючої молекули CD28 на Т-клітинах. Зниження рівня костимулюючої молекули CD28 вказує на ослаблення імунної відповіді (Saurwein-Teissl et al., 2002). Клони CD8⁺CD28⁻ Т-клітин, які часто є CD45RA⁺ (імунофенотип: CD8⁺CD28⁻CD45RA⁺) продукують велику кількість прозапального цитокіну IFN- γ і незначні кількості IL-5. Ці клони накопичуються в процесі нормального старіння і індукують дисбаланс продукції Th1- і Th2-цитокінів. Таким чином, клони CD8⁺CD28⁻CD45RA⁺ Т-клітин, що накопичуються разом із зменшеною чисельністю популяції наївних В-клітин (Siegrist and Aspinall, 2009), є основними учасниками зниження імунних функцій, що уражує приблизно одну третину популяції літніх людей (Weng et al., 2009, Saurwein-Teissl et al., 2002).
25

Таким чином, пасивна імунотерапія (наприклад, за допомогою DC8E8 (або його химерного, гуманізованого, людського або іншого похідного/частини/фрагмента)) забезпечує засіб для того, щоб обійти ослаблення імунної системи великої популяції пацієнтів з AD і здійснити націлювання на патологічні білки тау, що викликають нейрофібрилярну дегенерацію.

30 У деяких варіантах здійснення, один з терапевтичних епітопів білка тау (або пептид, що містить один з терапевтичних епітопів білка тау, описаних в даному документі) використовують як активну вакцину, призначену для застосування у літніх імунокомпетентних пацієнтів з хворобою Альцгеймера. Імунофенотип імунокомпетентних пацієнтів являє собою CD8⁺CD28⁺CD45RA⁺. Таким чином, рівні костимулюючої молекули CD28 на CD8⁺ Т-клітинах можна визначати і використовувати як селективний маркер у пацієнтів для активної вакцинації.
35

Більше того, перед лікуванням CSF і кров, взяті від пацієнтів, можна дослідити на антитіла проти *Borrelia*, *Treponema*, *Chlamydia*, *Herpesvirus* і інших патогенів головного мозку для виключення індивідуумів з хронічними інфекціями і запальними порушеннями ЦНС, які можуть імітувати або посилювати симптоми AD [Balin et al., 2008; Itzhaki and Wozniak, 2008; Miklossy, 2008; Andreasen, 2010]. Інфекції ЦНС часто порушують функцію гематоенцефалічного бар'єра (BBB), особливо інфекції *Chlamydia* ендотеліальних клітин головного мозку, які можуть приводити до збільшеного припливу моноцитів в паренхіму головного мозку і, таким чином, можуть впливати на місцеву імунну відповідь (Balin et al., 2008). Було показано, що літні індивідууми з більш високими рівнями IgG до цитомегаловірусу (CMV) мали більш високі швидкості зниження когнітивних здатностей (Itzhaki and Wozniak, 2008). Таким чином, для запобігання несприятливим ефектам після імунізації одним з засобів, передбачуваних винаходом (наприклад неконтрольована імунна реакція на нормальний білок тау), пацієнтів з хворобою Альцгеймера з інфекціями ЦНС або пацієнтів з позитивними результатами дослідження на антитіла проти згаданих вище патогенів можна лікувати більш селективною вакциною.
50

Перед лікуванням CSF і кров, взяті від пацієнтів, можна дослідити на антитіла проти *Borrelia*, *Treponema*, *Chlamydia*, *Herpesvirus* і інших патогенів головного мозку з хронічними інфекційними і запальними порушеннями ЦНС, які можуть імітувати або посилювати симптоми AD [Balin et al., 2008; Itzhaki and Wozniak, 2008; Miklossy, 2008; Andreasen, 2010]. Для запобігання можливим несприятливим ефектам, забезпечуванням різними хронічними інфекціями, цю групу пацієнтів можна лікувати більш селективним антитілом або вакциною, що містить терапевтичний епітоп. У деяких випадках активна вакцина являє собою сконструйований епітоп (наприклад, див. приклади), що індукує продукцію суворо селективних антитіл, націлених на терапевтичний епітоп на патологічних білках тау. У деяких варіантах здійснення, вакцина не містить ніяку амінокислотну послідовність, що є спільною з нормальним/фізіологічним білком тау.
60

Режими лікування

У профілактичних застосуваннях фармацевтичні композиції або лікарські засоби вводять пацієнту, який схильний або має інший ризик конкретного захворювання, в кількості, достатній для усунення або зниження ризику або уповільнення виникнення захворювання. У терапевтичних застосуваннях композиції або лікарські засоби вводять пацієнту, який передбачувано страждає або вже страждає на таке захворювання, в кількості, достатній для лікування або щонайменше часткового зупинення симптомів захворювання і його ускладнень. Кількість, достатня для здійснення цього, визначається як терапевтично або фармацевтично ефективна доза. Як в профілактичному, так і в терапевтичному режимах засоби звичайно вводять декількома дозуваннями доти, поки не досягають достатньої імунної відповіді. Як правило, здійснюють моніторинг імунної відповіді і вводять повторні дозування, якщо імунна відповідь починає слабшати.

Ефективні дози композицій за даним винаходом для лікування описаних вище станів варіюють, залежно від множини факторів, включаючи шлях введення, задану область, фізіологічний стан пацієнта, те, чи є пацієнт людиною або твариною, інші лікарські засоби, що вводяться, і те, чи є лікування профілактичним або терапевтичним. Звичайно пацієнтом є людина. Дозування лікування необхідно титрувати для оптимізації безпеки і ефективності. Таким чином, лікування антитілом або білком, зв'язуючим білок тау, як правило, буде включати множину дозувань протягом деякого періоду часу. Для пасивної імунізації антитілом дозування знаходяться в діапазоні приблизно від 0,0001 до 100 мг/кг і більш часто від 0,01 до 5 мг/кг маси тіла хазяїна. У деяких застосуваннях антитіло або білок, зв'язуючий білок тау, можна вводити в дозуванні щонайменше 0,1 мг/кг маси тіла, в дозуванні щонайменше 0,5 мг/кг маси тіла, 1 мг/кг маси тіла або в будь-якій комбінації дозувань від 0,1 до 10 мг/кг маси тіла. У деяких способах антитіло або білок, зв'язуючий білок тау, можна вводити множиною дозувань (рівних або різних) протягом періоду щонайменше 1 місяць, щонайменше 3 місяці або щонайменше 6 місяців. Загальна кількість дозувань протягом будь-якого періоду лікування може складати, наприклад, від 4 до 6, хоч можна використовувати інші кількості, залежно від факторів, розглянутих вище. Моніторинг лікування можна проводити будь-якими способами, описаними нижче.

Кількість імуногена залежить від того, чи вводять також ад'ювант, причому за відсутності ад'юванту потрібні більш високі дозування. Кількість імуногена для введення іноді варіює в діапазоні 1-500 мкг на пацієнта і більш часто в діапазоні 5-500 мкг на ін'єкцію для введення людині. Іноді використовують більш високу дозу, що становить 1-2 мг на ін'єкцію. Як правило, для кожної ін'єкції людині використовують приблизно 10, 20, 50 або 100 мкг. Час ін'єкцій може значно варіювати від одного разу на добу до одного разу на рік і до одного разу на десять років. У будь-який даний день, коли вводять дозування, дозування перевищує 1 мкг/пацієнта і звичайно перевищує 10 мкг/пацієнта, якщо також вводять ад'ювант, і перевищує 10 мкг/пацієнта і звичайно перевищує 100 мкг/пацієнта за відсутності ад'юванту. Типовий режим складається з імунізації з подальшими допоміжними ін'єкціями з інтервалами 6 тижнів. Інший режим складається з імунізації з подальшими допоміжними ін'єкціями через 1, 2 і 12 місяців. Інший режим включає ін'єкцію кожні два місяці протягом всього життя. Альтернативно допоміжні ін'єкції можуть бути нерегулярними, залежно від результатів моніторингу імунної відповіді. У деяких варіантах здійснення, активну вакцину можна складати з придатним носієм, переважно KLN, і гідроксидом алюмінію як ад'ювантом. Переважно 100 мкг пептиду/дозу/пацієнта (але також 1 мкг, 10 мкг, 100 мкг і 1 мг будуть вводити в доклінічній фазі і 10 мкг, 100 мкг, 200 мкг в фазі I випробувань токсичності) будуть вводити один раз на 4 тижні, всього 5 доз.

Дози для нуклеїнових кислот, що кодують імуногени, знаходяться в діапазоні приблизно від 10 нг до 1 г, від 100 нг до 100 мг, від 1 мкг до 10 мг або 30-300 мкг ДНК на пацієнта. Дози для інфекційних вірусних векторів знаходяться в діапазоні 10^{-10} до 10^9 або більше віріонів на дозу. Моніторинг лікування можна проводити шляхом аналізу відповіді антитіл або відповідей активованих Т-клітин або В-клітин на лікарський засіб з перебігом часу. Якщо відповідь слабшає, може бути призначена допоміжна доза.

У кінцевому результаті, режим дозування буде визначатися лікуючим лікарем і клінічними факторами. Як відомо в галузі медицини, дозування для будь-якого пацієнта залежать від множини факторів, включаючи розмір пацієнта, площу поверхні тіла, вік, конкретну сполуку, що підлягає введенню, стать, час і шлях введення, загальний стан здоров'я і інші лікарські засоби, що вводяться одночасно. Типова доза може знаходитися, наприклад, в діапазоні від 0,001 до 1000 мг; однак передбачаються дози нижче або вище цього ілюстративного діапазону, особливо враховуючи згадані вище фактори. Як правило, режим як регулярне введення фармацевтичної композиції повинен знаходитися в діапазоні від 1 до 10 мг одиниць на добу. Якщо режим являє собою безперервну інфузію, він також повинен знаходитися в діапазоні від 1

до 10 мг на кілограм маси тіла на хвилину відповідно. Моніторинг прогресування можна здійснювати шляхом періодичної оцінки.

Крім цього, може бути бажаним спільне введення або послідовне введення інших засобів. У деяких варіантах здійснення, терапевтично ефективна доза або кількість належать до кількості активного інгредієнта, достатньої для пом'якшення симптомів або стану. Терапевтичну ефективність і токсичність таких сполук можна визначати за допомогою стандартних фармацевтичних методик в культурах клітин або у експериментальних тварин, наприклад ED50 (доза, терапевтично ефективна у 50 % популяції) і LD50 (доза, летальна для 50 % популяції). Співвідношення доз між терапевтичними і токсичними ефектами являє собою терапевтичний індекс, і його можна виражати як співвідношення LD50/ED50. У деяких варіантах здійснення, лікарський засіб в композиції присутній в кількості, достатній для відновлення нормальної поведінки і/або когнітивних властивостей у випадку хвороби Альцгеймера і споріднених таупатій.

Винахід стосується різних показників, на які можна покладатися при оцінці ефективності лікування за допомогою засобів, передбачуваних винаходом. Приклади включають, але не обмежуються ними, знижені рівні однієї або декількох патологічних форм білка тау (наприклад в головному мозку), збільшене виведення патологічного білка тау з головного мозку і/або CSF; показники поліпшення когнітивної діяльності, такі як когнітивні функції (досліджувані, наприклад, за допомогою клінічної оцінки деменції - CDR, шкали оцінки хвороби Альцгеймера - підшкала когнітивних здатностей - дослідження розумового стану ADAS-Cog Mini-MMSE); дослідження поліпшення рухової функції (наприклад випробування сили стиснення, випробування Timed Up & Go (TUG), ручний TUG, випробування розмовляючого під час ходьби, уніфікована шкала оцінки хвороби Паркінсона - UPDRS); дослідження поліпшення характеристик основних видів активності повсякденного життя (ADL) (наприклад гігієна, одягання, регуляція функції сечового міхура або кишечника, вживання їжі, приготування їжі, телефонні розмови, здійснення прогулянок, фінансові операції і кореспонденція; дослідження за оцінкою інвалідизації при деменції) і зниження тяжкості/міри порушення сили стиснення при AD, рухової активності і апраксії (які мають прямі кореляції з моделями на тваринах і аналізами, описаними нижче в прикладах), зниження пам'яті, афазію, агнозію, дизорієнтацію у часі і просторі і депресію.

Для оцінки ефективності лікування рівні і розподіл білка тау (в головному мозку і в рідинах організму) можна оцінювати будь-яким зі способів, описаних в даному документі, і/або будь-якими іншими способами, доступними для виявлення білка тау. Наприклад, рівні білка тау можна вимірювати *in vivo* (позитронна емісійна томографія) з використанням нового візуалізуючого радіоактивного індикатора 18F-THK523, який селективно зв'язує білок тау і з патологією тау *in vitro*, *ex vivo* (зрізи тканин) і *in vivo* (трансгенні миші) (Fodero-Tavoletti et al., 2011, Brain). Білок тау можна ідентифікувати в цереброспінальній рідині і в крові, а також з використанням наборів ELISA, що розпізнають або загальний білок тау, або фосфо-тау.

Дійсно, нейроповедінкове порушення у трансгенних щурів має паралелі з руховим порушенням у пацієнтів з хворобою Альцгеймера, що має наслідки для клінічних випробувань і протоколів лікування з будь-яким з лікарських засобів, передбачуваних в рамках даного винаходу (включаючи, але не обмежуючись ними, засоби для активної вакцинації). У людини, хвороба Альцгеймера клінічно характеризується прогресуючим погіршенням пам'яті і зниженням когнітивних здатностей, змінами поведінки і психологічними симптомами (розлади настрою, емоцій, апетиту, циклу сну і пробудження, сплутаність свідомості, тривожне збудження і депресія) і порушенням рухової функції (апраксія, міоклонус, порушення ходи, знижена сила м'язів, екстрапірамідальні ознаки, такі як брадикинезія, ригідність і тремор в стані спокою) (Goldman et al., 1999; Boyle et al., 2009). У багатьох дослідженнях було описано, що часто при хворобі Альцгеймера (AD) спостерігають рухові ознаки і вони стають більш вираженими у міру прогресування захворювання [Goldman et al., 1999; Wilson et al., 2003; Louis et al., 2004; Pettersson et al., 2005; Scarneas et al., 2004; Scarneas et al., 2005; Waite et al., 2005; Alfaro-Acha et al., 2006; Wang et al., 2006; Buchman et al., 2007a; Boyle et al., 2009]. Примітно, що рухові ознаки можуть передувати зниженню когнітивних здатностей і прогнозувати зниження когнітивних здатностей і функціональне погіршення, поміщення в лікувальну установу і смертність при хворобі Альцгеймера [Morris et al., 1989; Soininen et al., 1992; Kraemer et al., 1994; Chui et al., 1994; Scarneas et al., 2004; Scarneas et al., 2005]. Було показано, що зниження м'язової сили передує розвитку зниження когнітивних здатностей [Buchman et al., 2007b; Boyle et al., 2009].

Розвиток рухових ознак при AD асоційований з нейрональною дегенерацією і втратою нейронів в стовбурі головного мозку [Zarow et al. 2003; Burns et al. 2005; Grudzien et al. 2007; Simic et al., 2009; Wai et al., 2009; Braak and DelTredici, 2011]. Більше того, в декількох

дослідженнях було передбачено, що нейрофібрилярна дегенерація виникає в стовбурі головного мозку і передусь кортикальній нейродегенерації [Hertz, 1989; Simic et al., 2009; Braak and DelTredici, 2011].

Ці дані вказують на те, що рухові порушення є ключовою ознакою в патогенезі AD. Більше того, функціональне порушення деяких рухових доменів може передувати деменції і прогнозувати зниження когнітивних здатностей. Активна імунотерапія пептидами (включаючи терапевтичні епітопи), описаними в даному документі, може привести до поліпшення при руховому порушенні у трансгенних щурів, експресуючих патологічний білок тау людини. Таким чином, пряме націлювання на патологію стовбура головного мозку за допомогою активної імунотерапії може запобігати, уповільнювати або відстрочувати рухові порушення, а також зниження когнітивних здатностей у пацієнтів-людей з AD. Таким чином, дослідження рухових функцій може бути включене в набір досліджень, які можна використовувати для оцінки клінічної ефективності засобів (наприклад засоби для виведення білка тау, активні і пасивні вакцини), описаних в даному документі.

Також фахівцю в даній галузі відомо про точно встановлені кореляції між рівнями і розподілом патологічного білка тау (наприклад NFT в корі/гіпокампі) і прогресуванням захворювання. Густина патологічного білка тау (патологія NFT) корелює з когнітивним дефіцитом і тяжкістю хвороби Альцгеймера [Braak and Braak, 1991; Bierer et al., 1995; Berg et al., 1998; Duyckaerts et al., 1998; Giannakopoulos et al., 1998, 2003]. Патологічний білок тау (наприклад NFT, нейропільні нитки) в ентोरинальній корі і гіпокампі зворотно взаємопов'язані з лонгітудинальними змінами пам'яті (Reitz et al., 2009). Аналогічно, в стовбурі головного мозку патологічний білок тау (NFT) зустрічається в дорзальному ядрі шва на дуже ранній стадії; інші ядра шва уражуються пізніше. Ці осередки пошкодження пояснюють серотонінергічний дефіцит, що зустрічається при AD (Duyckaerts et al., 2009). Екстрапірамідальні симптоми корелюють з патологією білка тау в чорній субстанції (Liu et al., 1997). Таким чином, лікарський засіб, який може впливати на один або декілька з цих профілів розподілу при AD, ймовірно, буде мати сприятливий ефект при AD.

ПРИКЛАДИ

ПРИКЛАД 1: ОДЕРЖАННЯ РЕКОМБІНАНТНИХ БІЛКІВ ТАУ ЛЮДИНИ

Повнорозмірний білок тау людини (2N4R, 2N3R) і делеційні мутанти білка тау: рекомбінантні білки тау (фіг. 1 і 6) одержували з клону t40 (Goedert, 1989), який субклонували в експресуючу плазмиду pET-17b (Novagen) і експресували в бактеріях. Кожний делеційний мутант білка тау перевіряли секвенуванням ДНК. Всі делеційні мутанти білка тау і тау-пептиди пронумеровані згідно з найбільш довгою ізоформою білка тау людини 2N4R, довжина якої становить 441 амінокислот і яка, таким чином, також позначається як тау₄₄₁ (D'Souza, 2005). Делеційні мутанти і пептиди білка тау, що походять з ізоформи 2N3R, позначені за допомогою "3R" для указання на те, що другий зв'язуючий мікротрубочки повтор (амінокислоти 275-305 2N4R) відсутній. Одержання білків тау включало наступні стадії: а) експресія білка тау в бактеріях; б) очищення білка тау іонообмінною хроматографією; с) очищення білка тау гель-фільтрацією; d) концентрування і зберігання виділеного білка тау; і е) імуноафінне очищення (це є виключенням, прийнятим тільки для тау Δ (1-150; 392-441)/4R, який використовували в експерименті по захопленню мікроглією, див. приклад 10, фіг. 17).

(а) Бактеріальна експресія повнорозмірного білка тау людини (або 2N4R, або 2N3R) і рекомбінантних делеційних мутантів білка тау. Експресуючі плазмиди для білка тау людини (вище) трансформували в *Escherichia coli* (*E. coli*), що продукує штам BL21 (DE3). Бактеріальні клітини, що містили відповідну експресуючу плазмиду, культивували і індукували, як описано в "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Sambrook and Russell (2001). Одиначну колонію бактерій BL21 (DE3), трансформованих плазмидою pET-17b, що запускає експресію білка тау і його фрагмента, вирощували при 37 °C в 500 мл бульйонного середовища Лурія з 100 г/мл ампіциліну при 300 об./хв. і індукували додаванням ізопропіл- β -D-1-тіогалактопіранозиду (IPTG) до кінцевої концентрації 0,4 мМ. Після подальшої інкубації при 37 °C протягом 3 годин бактерії збирали центрифугуванням при 3000 $\times$ g протягом 15 хв. при 4 °C.

(б) Очищення за допомогою катіонообмінної хроматографії основних і нейтральних білків тау (повнорозмірні ізоформи білка тау, тау Δ 358-441, тау Δ 306-400, тау Δ 421-441, тау Δ 300-312, тау Δ 134-168, тау Δ 1-220, тау Δ 1-126, тау Δ (1-150; 392-441)/4R, тау Δ (1-150; 392-441)/3R і тау Δ (1-296; 392-441)/4R) проводили, по суті як описано раніше (Krajciova et al., 2008). Після експресії бактеріальний осад ресуспендували в 10 мл лізуючого буфера (50 мМ 1,4-піперазиндіетансульфонова кислота (PIPES), pH 6,9, 50 мМ хлорид натрію (NaCl), 1 мМ етилендіамінтетраоцтова кислота (EDTA), 5 мМ дитіотреїтол (DTT), 0,1 мМ фенілметилсульфонілфторид (PMSF), 5 % (об./об.) гліцерин), швидко заморожували в рідкому

азоті і зберігали при -80°C до використання для очищення білків тау. Для очищення білка тау заморожені суспензії бактерій швидко розморожували і поміщали на лід. Клітинні стінки бактерій руйнували обробкою ультразвуком на льоду з використанням Sonopuls HD 2200, наконечник TT-13 (Bandelin, Німеччина), встановленого на 50 % робочий цикл, вихідну потужність 50 Вт, 6 разів по 30 с з паузами 30 с. Лізати очищали центрифугуванням ($21000\times g$ протягом 15 хв. при 4°C) і супернатанти фільтрували через 0,45-мкм мембранний фільтр. Великомасштабне очищення рекомбінантних білків тау проводили при 6°C з використанням робочої станції ÄKTA-FPLC (Amersham Biosciences, Швеція). Фільтровані лізати наносили при швидкості потоку 3 мл/хв. на 5-мл колонку HiTrap SP HP (GE Healthcare, Uppsala, Швеція), зрівноважену лізуючим буфером, і промивали ретельно 60 мл лізуючого буфера доти, поки вихідний рівень при 280 нм не ставав стабільним. Білки тау, що зв'язалися, елюювали градієнтом (0-30 % в 15 мл) буфера В (лізуючий буфер, доповнений 1М NaCl). Окремі 1-мл фракції збирали і аналізували за допомогою електрофорезу на поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію (SDS-PAGE). Для видалення нуклеїнових кислот, які очищаються разом з позитивно зарядженими білками тау, фракції, що містили білок тау, об'єднували і очищали за допомогою другої стадії катіонообмінної хроматографії з використанням 5-мл колонки HiTrap SP HP (GE Healthcare, Uppsala, Швеція) з менш різким градієнтом буфера В (0-30 % в 45 мл).

(с) Очищення за допомогою аніонообмінної хроматографії кислотних білків тау (тау Δ 222-427, тау Δ 228-441, тау Δ 257-400, тау Δ 137-441, тау Δ 283-441) проводили, як описано раніше (Csokova et al. 2004). Після експресії бактеріальний осад ресуспендували в 10 мл гістидинового лізуючого буфера (20 мМ гістидин, рН 6,0, 50 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 5 мМ DTT, 0,1 мМ PMSF і 5 % (об./об.) гліцерин). Клітинні стінки бактерій руйнували обробкою ультразвуком на льоду з використанням Sonopuls HD 2200, наконечник TT-13 (Bandelin, Німеччина), встановленого на 50 % робочий цикл, вихідну потужність 50 Вт, 6 разів по 30 с з паузами 30 с. Лізати очищали центрифугуванням ($21000\times g$ протягом 15 хв. при 4°C). Бактеріальні лізати осаджували 1 % сульфатом стрептоміцину (Medexport, Росія), інкубували на льоду протягом 5 хв., очищали за допомогою центрифугування ($21000\times g$ протягом 15 хв. при 4°C) і фільтрували через 0,45-мкм мембранний фільтр. Фільтровані преципітовані стрептоміцином лізати наносили зі швидкістю потоку 3 мл/хв. на 5-мл колонку HiTrap QSepharose HP (Amersham Biosciences, Швеція) і ретельно промивали 30-50 мл гістидинового лізуючого буфера доти, поки вихідний рівень при A280 не ставав стабільним. Білки тау елюювали за допомогою двокрокового сольового градієнта (0,05-0,5М NaCl в 40 мл, а потім 0,5-1М NaCl в 20 мл) в гістидиновому лізуючому буфері.

(d) На кінцевій стадії очищення шляхом гель-фільтрації (однакова для всіх білків тау), об'єднані фракції білка тау, одержані іонообмінною хроматографією, інжектували в колонку для гель-фільтрації (колонка HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade column, GE Healthcare) при 3 мл/хв. або в гістидиновому лізуючому буфері для основних/нейтральних або кислотних білків тау, відповідно, доповненому 100 мМ NaCl. Елюйовані білки тау об'єднували.

(е) Для концентрування білка тау після очищення гель-фільтрацією, об'єднані фракції розбавляли 1,5 об'єму 2,5 % гліцерину і знову наносили на колонку HiTrap SP HP (основні і нейтральні білки тау) або на колонку HiTrap Q HP (кислотні білки тау). Потім концентрований рекомбінантний білок елюювали з колонки з покроковим градієнтом 1М NaCl. Нарешті, буфер замінювали на фосфатно-сольовий буфер (PBS, 8,09 мМ дифосфат натрію (Na_2HPO_4), 1,47 мМ дигідрофосфат калію (KH_2PO_4), 136,89 мМ NaCl, 2,7 мМ хлорид калію (KCl)), насичений аргонном, з використанням 5-мл колонки для знесолювання HiTrap Desalting column (GE Healthcare). Кількісне визначення білка в очищених зразках проводили з використанням наборів для кількісного визначення за допомогою біцинхонінової кислоти (BCA) (Pierce, США), з бичачим сироватковим альбуміном (BSA) як стандартом. Білки тау розділяли на робочі аліквоти, швидко заморожували в рідкому азоті і зберігали при -70°C .

(f) Для видалення можливих бактеріальних домішок з рекомбінантного тау Δ (1-150; 392-441)/4R, використаного для вимірювань захоплення білка тау мікроглією (приклад 10, фіг. 17), рекомбінантний білок тау очищали модифікованим способом таким чином. Після першої стадії катіонообмінної хроматографії, фракції, що містять білок тау, об'єднували і додавали 1/20 об'єму льодяного 5 % поліетиленіміну при перемішуванні. Перемішування продовжували протягом додаткових 30 хв. на льоду. Зразок центрифугували при $20000\times g$ протягом 15 хв. при 4°C . Супернатант збирали і інжектували в колонку HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade column (GE Healthcare) при 3 мл/хв. в лізуючому буфері PIPES, доповненому 100 мМ NaCl, але позбавленому DTT або будь-якого іншого відновника. Після гель-фільтрації фракції з білком тау об'єднували і наносили на імуноафінну колонку (при швидкості потоку 0,5 мл/хв.), що містила антитіло DC25 (епітоп 347-353 2N4R тау, Axon Neuroscience, Vienna, Австрія), іммобілізоване на

CNBr-активованій сефарозі. Колонку попередньо зрівноважували в 20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20 (TBS-Tween). Після зв'язування колонку промивали 5 об'ємами колонки TBS-Tween і білки тау, що зв'язалися, елюювали 0,1M гліцином, pH 2,7. Зібрані фракції нейтралізували додаванням 1/30 об'єму 1M Tris-HCl, pH 8,8, і об'єднували. Нарешті, буфер замінювали на PBS (насичений аргонном), з використанням колонки для знесолювання HiTrap Desalting column, 5 мл (GE Healthcare). Кількісне визначення білка в очищених зразках проводили з використанням наборів для кількісного визначення за допомогою біцинхонінової кислоти (BCA) (Pierce, США) з BSA як стандартом. Білки розділяли на робочі аліквоти, швидко заморожували в рідкому азоті і зберігали при -70 °C.

Очищене антитіло DC25 (Axon Neuroscience, Vienna, Австрія), використане для афіної колонки з DC25 (вище), приготувляли таким чином. Безсироватковий культуральний супернатант гібридоми DC25 доводили до pH 7,5 додаванням 0,2 об'єму PBS, попередньо очищали центрифугуванням при 20000×g протягом 10 хвилин при 4 °C, і супернатант фільтрували через 0,2-мкм фільтр. Попередньо очищений культуральний супернатант гібридоми DC25 наносили на попередньо зрівноважену PBS колонку HiTrap Protein G HP (5 мл, GE Healthcare) при 1 мл/хв. Після завершення нанесення колонку промивали 4 об'ємами колонки PBS, і антитіло, що зв'язалося, елюювали 100 mM гліцином, pH 2,7. Елюювані фракції нейтралізували 1M Tris-HCl, pH 9, об'єднували, і буфер замінювали на PBS з використанням колонки для знесолювання HiTrap Desalting column (5 мл, GE Healthcare). Очищене антитіло DC25 зберігали невеликими аліквотами при -70 °C.

ПРИКЛАД 2: ОДЕРЖАННЯ ГІБРИДОМНИХ КЛІТИННИХ ЛІНІЙ, ПРОДУКУЮЧИХ МОНОКЛОНАЛЬНІ АНТИТІЛА ПРОТИ БІЛКА ТАУΔ(1-150:392-441)/4R ЛЮДИНИ, СКРИНІНГ МОНОКЛОНАЛЬНИХ АНТИТІЛ ЗА ДОПОМОГОЮ ELISA І ПЕРВИННА ОХАРАКТЕРИЗАЦІЯ МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТІЛА DC8E8

Мишей Balb/c у віці шести тижнів піддавали первинній імунізації підшкірно за допомогою 50 мкг рекомбінантного тауΔ(1-150; 392-441)/4R (одержаного, як описано в прикладі 1) в повному ад'юванті Фрейнда (SIGMA) і проводили допоміжні імунізації п'ять разів з інтервалами п'ять тижнів за допомогою 50 мкг того ж антигена в неповному ад'юванті Фрейнда. За три доби до злиття мишам внутрішньовенно ін'єктували 50 мкг того ж антигена в PBS. Клітини селезінки від імунізованих мишей піддавали злиттю з клітинами міеломи NS/0 згідно зі способом Kontseikova et al. (1988). Спленоцити (10^8) змішували з 2×10^7 клітин міеломи NS/0 (співвідношення 5:1) і піддавали злиттю протягом 1 хвилини в 1 мл 50 % поліетиленгліколю (PEG) 1550 (Serva) в безсироватковому модифікованому способом Дюльбекко середовищі Ігла (DMEM), доповненому 10 % диметилсульфоксидом. Злиті клітини ресуспендували в DMEM, що містило 20 % сироватку коня, L-глутамін (2 mM), гіпоксантин (0,1 mM), аміноптерин (0,04 mM), тимідин (0,016 mM) і гентаміцин (40 Од/мл), при густині $2,5 \times 10^5$ клітин селезінки на ямку 96-ямкових планшетів. Клітини інкубували протягом 10 діб при 37 °C і зростаючі гібридоми піддавали скринінгу відносно продукції моноклональних антитіл, специфічних до тауΔ(1-150; 392-441)/4R, з використанням твердофазного імуоферментного аналізу (ELISA).

ELISA використовували для виявлення в супернатантах культур гібридом моноклональних антитіл, направлених проти тауΔ(1-150; 392-441)/4R (неправильно невпорядкована форма білка тау). Мікропланшети для титрування покривали протягом ночі тауΔ(1-150; 392-441)/4R (5 г/мл, 50 мкл/ямку) при 37 °C в PBS. Після блокування 1 % знежиреним сухим молоком для зниження неспецифічного зв'язування, планшети промивали PBS-0,05 % Tween 20 і інкубували з 50 мкл/ямку супернатанту культури гібридоми протягом 1 год. при 37 °C. Моноклональні антитіла, що зв'язалися, виявляли за допомогою антитіла вівці проти імуноглобулінів миші (Ig), кон'югованого з пероксидазою хрому (HRP, DAKO). Реакцію здійснювали за допомогою розчину ортофенілєндіаміну як субстрату пероксидази і зупиняли 50 мкл 2M H₂SO₄. Поглинання при 492 нм вимірювали з використанням пристрою для зчитування Multiscan MCC/340 ELISA reader (Labsystems). Дані зчитування з величиною поглинання, яка щонайменше в два рази перевищує негативні контролю (PBS), вважали позитивними. Позитивні культури гібридом далі досліджували за допомогою імуногістохімії (згідно зі способом Zilka et al., 2003) і субклонували в м'якому agarі відповідно до методики, описаної в Kontseikova et al. (1991).

Моноклональне антитіло DC8E8 (продуковане гібридомною клітинною лінією, депонованою в American Type Culture Collection 13 липня 2011 року з позначенням запатентованого депозиту ATCC PTA-11994) було ідентифіковане серед позитивних культур гібридом, одержаних і відібраних таким чином. DC8E8 далі охарактеризували, як описано нижче. Ізотип антитіла визначили як IgG1 миші за допомогою ELISA з використанням набору для ізотипування Ig миші (ISO-2, SIGMA).

ПРИКЛАД 3: СЕКВЕНУВАННЯ ВАРІАБЕЛЬНИХ ОБЛАСТЕЙ DC8E8 І ЙОГО ГУМАНІЗАЦІЯ ШЛЯХОМ ПЕРЕСАДКИ CDR

(а) Визначення нуклеотидних і амінокислотних послідовностей варіабельних областей легкого і важкого ланцюгів DC8E8 (фіг. 3). Нуклеотидну послідовність варіабельних областей DC8E8 (фіг. 3A і 3D) визначали ДНК-секвенуванням з використанням кДНК, синтезованої з використанням тотальної РНК, екстрагованої з гібридомної клітинної лінії миші РТА-11994 (АТСС), яка експресує моноклональне антитіло DC8E8. Тотальну РНК екстрагували з використанням реагенту TRIZOL® (Invitrogen, США). Синтез кДНК першого ланцюга проводили з використанням набору для зворотної транскрипції "кДНК High capacity cDNA reverse transcription" kit відповідно до протоколу виготовлювача (Applied Biosystems, США). Склад реагентів для 2× основної суміші для зворотної транскрипції був наступним (кількості на реакційну суміш об'ємом 20 мкл): 2 мкл 10× буфера RT; 0,8 мкл 25× суміші dNTP (100 mM); 2 мкл 10× випадкових праймерів RT (50 мкМ); 1 мкл зворотної транскриптази MultiScribe™ (50 Од/мкл); 4,2 мкл H₂O, що не містить нуклеаз. Для зворотної транскрипції 10 мкл 2× основної суміші для зворотної транскрипції змішували із зразком РНК (2 мкг, 10 мкл) і кДНК синтезували в наступних умовах: 10 хв. при 25 °C, 120 хв. при 37 °C, 5 хв. при 85 °C і кінцеве охолодження до 4 °C. Ампліфікацію генів, що кодують варіабельні області легкого і важкого ланцюгів, проводили за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням високоточної ДНК-полімерази Phusion® (Finnzymes, Фінляндія). Прямі праймери (8E8L-смысловий 5'-ACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCC-3' (SEQ ID NO: 132) і 8E8H-смысловий 5'-CTCCTCCAATTGCAGCAGTCTGG-3' (SEQ ID NO: 133)) конструювали відповідно до білкової послідовності N-кінців легкого (DIVMSQSPSS) (SEQ ID NO: 134) і важкого (QVQLQQSGPE) (SEQ ID NO: 135) ланцюгів DC8E8. N-кінцеві послідовності білка визначали з використанням розщеплення Едмана (легкий ланцюг) і MALDI з розпадом всередині джерела (важкий ланцюг). З використанням цієї інформації в Genbank були ідентифіковані найбільш схожі білки з легкими і важкими ланцюгами разом з їх відповідними нуклеотидними послідовностями. Потім ідентифікували найбільш імовірні нуклеотидні послідовності V-генів миші (легкий і важкий ланцюги) в базі даних IMGT/LIGM-DB (www.imgt.org). Ці гени використовували для конструювання прямих праймерів (корекцію проводили з використанням N-кінцевих білкових послідовностей DC8E8). Зворотні праймери для легкого і важкого ланцюгів (каппа-антисмысловий 5'-GGAATTCGTTGAAGCTCTTGACAATGGGTG-3' (SEQ ID NO: 136) і G1-антисмысловий 5'-GGAATTCACATATGCAAGGCTTACAACCAC-3' (SEQ ID NO: 137)) походили з константних областей ланцюгів каппа і IgG1, відповідно.

Продукти ПЛР секвенували і одержані послідовності ДНК варіабельних областей легкого і важкого ланцюгів DC8E8 представлені на фіг. 3A і 3D, відповідно. Вирівнювання DC8E8 з найбільш схожим легким ланцюгом IGKV8-21*01 і важким ланцюгомIGHV1-81*01 миші ембріонального типу представлене на фіг. 3C і 3F, відповідно. Области, що визначають комплементарність (CDR), підкреслені в білкових послідовностях легкого і важкого ланцюгів DC8E8 (фіг. 3B і 3E, відповідно). CDR і каркасні області (FR) були ідентифіковані відповідно до системи нумерації ImMunoGeneTics (IMGT) [див., наприклад, Lefranc M.-P. The IMGT unique numbering for immunoglobulins, T-cell receptors, and Ig-like domains. The Immunologist 7, 132-136, 1999 (1999)].

(b) Гуманізація DC8E8. Для ідентифікації придатного імуноглобуліну людини, що є кандидатом для одержання гуманізованого DC8E8 за допомогою пересадки областей, що визначають комплементарність (CDR), DC8E8, ген людини ембріонального типу з найбільш високою ідентичністю послідовності з DC8E8 визначали з використанням попарного вирівнювання ClustalX2 нуклеотидної послідовності DC8E8 проти вибраного набору генів імуноглобулінів людини, витягнутих з простого файла IMGT/LIGM-DB випуску 201112-6 (www.imgt.org). IgKv4-1*01 був ідентифікований як найбільш схожий ген людини ембріонального типу для легкого ланцюга DC8E8 (фіг. 4), і IgHV1-69*10 був ідентифікований як найбільш схожий ген ембріонального типу для важкого ланцюга DC8E8 (фіг. 5). Був розроблений наступний підхід (спосіб 1 і спосіб 2) і його можна використовувати для одержання однієї або декількох гуманізованих версій антитіла DC8E8. Після експресії у відповідній системі для експресії антитіл (наприклад експресуючі вектори ссавців, використовувані для експресії антитіл in vitro (наприклад клітини HEK293) або in vivo (трансгенні тварини)), одержані гуманізовані рекомбінантні антитіла можна дослідити відносно активності (наприклад біохімічна і терапевтична активність) відповідно до будь-яких способів, використовуваних для охарактеризації активності DC8E8.

Спосіб 1. Пересадка CDR і мутації в каркасній області (FR), якщо необхідні (CDR виділені напівжирним шрифтом і підкреслені, мутації FR виділені напівжирним шрифтом)

Варіабельна область важкого ланцюга (SEQ ID NO: 138-140, відповідно, по порядку):

DC8E8_важкий ланцюг
важкий ланцюг людини
ембріонального типу

QVQIQSGSPFELVKPGTSTVMPCKASG**YIF**TDYVISWVKQRTGQGLEWIG**EIF**PRSGSTYY
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASG**TF**SSYAISWVRQAPGQGLEWMGSIIPILGIANY
*** ***,*;* ***,***;***** *;*,*****;*,*****;*;* *;* *

SEQ ID No.140

QVQLVQSGSPFVKKPGSSVKVCKASG**YIF**TDYVISWVRQATGQGLEWMG**EIF**PRSGSTNY

DC8E8_важкий ланцюг
важкий ланцюг людини
ембріонального типу

NEKPKGRATLTADKSSNTAYMQLSEVTSSEDSAVYFC**ARDYYGTSFAMDY**WGQGTSTVTVSS
AQKFGGRVTITADKSTSTAYMELSRLSEDTAVYYCARENHCHYYGMDVWGQGTITVTVSS
;*;*;*;*****;*****;***;***;*****;) ;** *****;*****

SEQ ID No.140

AQKFGGRVTITADKSTSTAYMELSRLSEDTAVYYC**ARDYYGTSFAMDY**WGQGTITVTVSS

Варіабельна область легкого ланцюга (SEQ ID NO: 141-143, відповідно, по порядку):

DC8E8_легкий ланцюг
легкий ланцюг людини
ембріонального типу

DIVMSQSPSSSLAVSAGEKVTMSCKSSQ**SLNSRTRK**NYLAWYQOKPGQSPKLLIYWASTR
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQOKPGQSPKLLIYWASTR
;;***** **;*;*,*****;* * ,*****;*****;*****;*****

SEQ ID No.143

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQ**SLNSRTRK**NYLAWYQOKPGQSPKLLIYWASTR

DC8E8_легкий ланцюг
легкий ланцюг людини
ембріонального типу

ESGVFDRFTSGSGSTDFTLTISSVQAEDLAVYYC**QSFYLR**TFGGGTKLDIK
ESGVFDRFSGSGSTDFTLTISSLQAEDVAVYYC**QSYSTL**TFGGGTKVRIK
*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****

SEQ ID No.143

ESGVFDRFSGSGSTDFTLTISSLQAEDVAVYYC**QSFYLR**TFGGGTKVRIK

Спосіб 2. Були знайдені імуноглобуліни ембріонального типу миші (фіг. 3) і людини (фіг. 4 і 5) з найбільш високою ідентичністю послідовності з DC8E8 і вирівняні з білковою послідовністю DC8E8. Области CDR були ідентифіковані згідно з системою нумерації IMGT. Найбільш можливі контактуючі з антигеном залишки в активному центрі DC8E8 були ідентифіковані, виходячи з роботи MacCallum et al., J. Mol. Biol. 1996.

Різні амінокислоти-кандидати для мутації в гуманізованій версії DC8E8 були ідентифіковані за допомогою наступних сукупних критеріїв:

- i) їх присутність в CDR і можливість контакту з антигеном;
- ii) їх присутність в зоні Vernier;
- iii) незалежно від того, чи мутовані вони в послідовності миші ембріонального типу.

За допомогою вказаних вище критеріїв було ідентифіковано два рівні кандидатів для мутацій.

Залишки Х-типу (виділені напівжирним шрифтом):

- залишки, відмінні між DC8E8 і найбільш схожою послідовністю миші ембріонального типу, несхожі амінокислоти;

- залишки в CDR і контактуючі з антигеном (CDR представлені малими буквами напівжирним шрифтом і курсивом в послідовності DC8E8, представленій нижче).

Залишки Y-типу (виділені напівжирним шрифтом, підкреслені):

- залишки, ідентичні між DC8E8 і найбільш схожою послідовністю миші ембріонального типу, але відмінні в найбільш схожій послідовності людини ембріонального типу і розташовані в зоні Vernier (несхожа амінокислота);

- залишки, відмінні між DC8E8 і найбільш схожою послідовністю миші ембріонального типу (схожа/консервативна амінокислота).

Дві гуманізованих послідовності для кожного ланцюга були ідентифіковані з мутаціями, для яких було передбачено, що вони впливають на активність DC8E8:

SEQ ID NO: 147, 152: тільки залишки Х-типу є мутантними;

SEQ ID NO: 148, 153: залишки як Х, так і Y-типу є мутантними.

Варіабельна область важкого ланцюга (SEQ ID NO: 138, 145, 139, відповідно, по порядку):

[illegible]

SEQ ID No.147 QVQLVQSGQPEPLVKPGSSSVKMPCKASGYIPSDYAIISVNRQRTGGLEWMEIIFRSGSTHY
 SEQ ID No.148 QVQLVQSGQPEPLVKPGSSSVKMPCKASGYIPSDYAIISVNRQRTGGLEWMEIIFRSGSTYY

DC38E, **экзотический лангуст** NEKFFGKATLTADKSSNTAYMQLSSVTSEGS~~AVYFC~~*cardyygtsfandy*WGQGTSTVTVSS
 экзотический лангуст **малый амбрийский лангуст** NEKFFGKATLTADKSSSTAYMELBELTSEGS~~AVYFC~~CARDYYGTYYAMPDWGQGTSTVTVSS
 экзотический лангуст **луситанский амбрийский лангуст** NEKFFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLSRSESTAVYKCYARENHCYYGMDVWGQGTITVTVSS

SEQ ID No.147 AGRFQGRVTTITADKSTSTAYMELSSLRSEDATVYYCARDYYGTSYGMDFWQGQTTVTVSS
SEQ ID No.148 NGRFQGRVTTITADKSTNTAYMOLSELTSENTAVYYCARDYYGTSYGMDFWQGQTTVTVSS

Варіабельна область легкого ланцюга (SEQ ID NO: 141-143, відповідно, по порядку):

```

OX3EX_летный ланцог      DIVMSQSPSSSLAVSAGEKVTMSCESSqslInsrtrknyLAWYQQKPGQSPFKLLIYWaSTR
летный ланцог мимолетного эмбрионального типа  DIVMSQSPSSSLAVSAGEKVTMSCESSQSLINsrtrknyLAWYQQKPGQSPFKLLIYWaSTR
летный ланцог лозинг эмбрионального типа      DIVMTQSPFDGLAVSLGERATINCESSQSVLYGSNNKnyLAWYQQKPGQSPFKLLIYWaSTR
*****

```

SEQ ID No.152 DIVMTQSPDSLAVELGERATINCKSSQSQSVLNSRRNNKNYLAWYQOQKFGQPPKLLIYWASTE
SEQ ID No.153 DIVMTQSPDSLAVELGERATISCKSSQSQSVLNSRRNNKNYLAWYQOQKFGQSPKLLIYWASTE

```

DCCXEL_летный линкор      ESGVPERFTGGSGCTDPTLTISSVQAE DLAVYYCKqsfylrTFGGGTKLDIK
летный линкор миний эмбрионального типа ESGVPERFTGGSGCTDPTLTISSVQAE DLAVYYCKQSYNLRTFGGGTKLEIK
летный линкор лодии эмбрионального типа ESGVPERFEGSGSGCTDPTLTISSLQAE DLAVYYCQQYVSTLTFGGGTKVEIK
*****

```

SEQ ID No.152 ESGVDPDRFGSGSGSQTDFTLTISSLQARDVAVYYCKQSFLYLTFTGGSGTVEIK
SEQ ID No.153 ESGVDPDRFGSGSGSQTDFTLTISSLQARDVAVYYCKQSFLYLTFTGGSGTVEIK

5 ПРИКЛАД 4: КАРТУВАННЯ ЕПІТОПА DC8E8 З ВИКОРИСТАННЯМ РЕКОМБІНАНТНИХ ДЕЛЕЦІЙНИХ МУТАНТІВ БІЛКА TAU І ПЕПТИДІВ, ЩО ПОХОДЯТЬ З БІЛКА TAU

Делеційні мутанти білка тау 2N4R людини, а також пептиди, що походять з білка тау (Antagene, Inc. (Sunnyvale, CA) і EZBiolab (США)), використовували для картування епітопів DC8E8 з використанням ELISA (фіг. 6, 7 і 8). Рекombінантні ізоформи білка тау людини (2N4R; 2N3R) і делеційні мутанти білка тау (фіг. 6A, 6B) одержували, як описано в прикладі 1. Пептиди (фіг. 7A, 7B) були синтезовані в EZBiolabs (США) з чистотою більше 85 %.

Мікропланшети для титрування покривали протягом ночі при 37 °С або рекомбінантними білками тау, або тау-пептидами (5 мкг/мл в PBS, 50 мкл/ямку). Після блокування 1 % знежиреним молоком для зменшення неспецифічного зв'язування планшети промивали PBS-0,05 % Tween 20 і інкубували з 50 мкл/ямку супернатанту культури гібридами DC8E8 протягом 1 год. при 37 °С. Моноклональне антитіло, що зв'язалося, виявляли за допомогою антитіла вівці проти Ig миші, кон'югованого з HRP (DAKO). Реакцію здійснювали з розчином ортофенілєндіаміну як субстратом пероксидази і зупиняли 50 мкл 2M H₂SO₄. Поглинання вимірювали при 492 нм з використанням пристрою для зчитування Multiscan MCC/340 ELISA (Labsystems). Дані зчитування з величиною поглинання, яка щонайменше в два рази перевищує величину для негативних контролів (PBS), вважали позитивними.

DC8E8 розпізнавало наступні білки тау людини: Δ358-441, Δ421-441, Δ134-168, Δ1-220, Δ1-126, Δ(1-296; 392-441)/4R і Δ(1-150; 392-441)/4R, але не розпізнавало білки тау з делеціями Δ222-427, Δ306-400, Δ228-441, Δ300-312, Δ257-400, Δ137-441 і Δ283-441 (фіг. 6B, 6C). DC8E8 розпізнавало фізіологічні ізоформи білка тау 2N4R і 2N3R меншою мірою, ніж воно розпізнавало патологічний/неправильно невпорядкований тауΔ(1-296; 392-441)/4R, тауΔ(1-150; 392-441)/4R і делеційні мутанти (Δ358-441, Δ421-441, Δ134-168, Δ1-220, Δ1-126) білка тау 2N4R (фіг. 6C). Більш детальне картування епітопів з використанням тау-пептидів виявило, що DC8E8 не розпізнає тау-пептиди 240-270, 270-300 і 301-330 (фіг. 7A, 7B, 7C). Взяті разом, ці дані вказують на те, що DC8E8 має чотири ділянки зв'язування або епітопи на білку тау людини, кожна з яких розташована в області повторюваного домену білка тау, який зв'язується з мікротрубочками, і кожний з цих епітопів розташований окремо в одній з наступних послідовностей білка тау: 267-

KNQPGGG-273 (SEQ ID NO: 98) (1-ий повторюваний домен білка тау), 298-KHVPGGG-304 (SEQ ID NO: 99) (2-ий повторюваний домен білка тау), 329-HHKPGGG-335 (SEQ ID NO: 100) (3-ій повторюваний домен білка тау) і 361-THVPGGG-367 (SEQ ID NO: 101) (4-ий повторюваний домен білка тау) (фіг. 7D). Більше того, оскільки DC8E8 зв'язується з укороченими формами білка тау краще, ніж з повнорозмірним білком тау з 3 повторами і 4 повторами, ці результати також вказують на те, що DC8E8 зв'язується краще з пов'язаними із захворюванням формами білка тау, ніж з фізіологічним білком тау (тау39 (2N3R) і тау40 (2N4R)). Також, оскільки вважають, що білок тау змінює конформацію від фізіологічного білка тау (внутрішньо невпорядкованого) на пов'язаний із захворюванням білок (неправильно невпорядкований і розупорядкований, Kovacs et al., 2010), ці результати вказують на те, що одна або декілька ділянок зв'язування для DC8E8 (епітопи DC8E8) мають відмінну конформацію в фізіологічному білку тау, відносно пов'язаного із захворюванням білка тау, і що DC8E8 здатний виявляти цю конформаційну зміну.

Оскільки ці повторювані домени білка тау є консервативними серед видів (фіг. 8A), DC8E8, ймовірно, буде реагувати проти білків тау з таких різноманітних видів, як щур, миша, корова, шимпанзе, жаба і інші. Вирівнювання білків тау різних видів тварин проводили з використанням програмного забезпечення ClustalW2 (доступне, наприклад, на www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/). Білок тау людини представлений найбільш довгою ізоформою тау, експресованою в нейронах головного мозку людини (2N4R, 441 амінокислота). Білки тау інших видів вибрані із загальнодоступних баз даних. Послідовності, в яких розташований кожний з чотирьох епітопів, розпізнаваних антитілом DC8E8, взяті в рамку.

Додаткові точкові мутації і делеції вносили в певні пептиди, що походять з білка тау (8-мери, 9-мери і 10-мери), для подальшого визначення епітопів DC8E8, при оцінці по здатності кожного пептиду конкурувати з тауΔ(1-150; 392-441/4R) за зв'язування з DC8E8. Пептиди були синтезовані в EZBiolabs (США) з чистотою більше 85 %. Конкурентний ELISA проводили згідно з наступним стандартним протоколом. Планшети для ELISA (планшет з високим зв'язуванням IWAKI, #3801-096, Bertoni GmbH, Австрія) покривали протягом ночі при 4 °C за допомогою 100 мкл/ямку рекомбінантного очищеного тауΔ(1-150; 392-441/4R) в PBS в концентрації 5 мкг/мл. Планшети з високим зв'язуванням IWAKI промивали 4 рази PBS/Tween 20 (0,05 % об./об.) і блокували PBS/Tween 20 протягом 2 год. при 25 °C. Кожний з пептидів окремо розчиняли в PBS в кінцевій концентрації 5 мМ. Проводили серійні розведення (2-кратні) пептидів в PBS/Tween 20 в поліпропіленових планшетах з конічним дном ямок (Greiner, #651201) (діапазон концентрацій 80, 40, 20, 10, 5 і 2,5 мкМ). Додавали 100 мкл кожного розведення на ямку. Очищене моноклональне антитіло DC8E8 (очищення проводили, як описано нижче в прикладі 5) розбавляли до концентрації 2 мкг/мл в PBS/Tween 20 і 100 мкл цього розбавленого антитіла змішували з кожним серійним розведенням пептидів в сумішах об'ємом 200 мкл з 100 нг антитіла/100 мкл, що містять кожний відповідний досліджуваний пептид в концентрації 40, 20, 10, 5, 2,5 і 1,25 мкМ. Суміші антитіло/пептид інкубували протягом 1 год. при 25 °C на обертовій платформі, встановленій на 250 об./хв. Сто мікролітрів (100 мкл) сумішей антитіло/пептид переносили з поліпропіленових планшетів в покриті тауΔ(1-150; 392-441/4R) і блокувані PBS/Tween 20 планшети IWAKI з високим зв'язуванням і інкубували протягом 1 год. при 25 °C на обертовій платформі, встановленій на 250 об./хв. Планшети промивали 4× за допомогою PBS/Tween 20. Зразки (в планшетах) інкубували протягом 1 год. при 25 °C на обертовій платформі (встановленій на 250 об./хв.) з 100 мкл поліклонального антитіла кози проти імуноглобулінів миші/HRP (Dako, #P0447), розбавленого 1:4000 в PBS/Tween 20. Планшети промивали 4× за допомогою PBS/Tween. Потім зразки/планшети інкубували з 100 мкл розчину 1,5 мг/2 мл о-PDA (о-фенілендіамін, SIGMA, P1526) в 0,1M Na-ацетаті, pH 6,0 (Roth, #6779), доповненого в 1,5 мкл/2 мл 30 % H₂O₂ (SIGMA, H-0904), протягом 10 хвилин при 25 °C в темряві. Реакцію зупиняли додаванням 100 мкл 2M H₂SO₄ (Merck, 1.00731.1000). За перебігом реакції спостерігали за допомогою зчитування поглинання зразків/планшетів при 490 нм (наприклад з використанням пристрою Victor Multilabel Counter (Wallac)).

На фіг. 8B представлені результати конкурентного ELISA, проведеного для наступних шести пептидів: NIKAVPGGGS (SEQ ID NO: 200), NIKHVPGGGS (SEQ ID NO: 201), IKHVPGGGS (SEQ ID NO: 202), KHVPGGGSV (SEQ ID NO: 203), HVPGGGSVQ (SEQ ID NO: 204) і VPGGGSVQ (SEQ ID NO: 205). Пептиди KHVPGGGSV (SEQ ID NO: 203) і HVPGGGSVQ (SEQ ID NO: 204), що охоплюють терапевтичний епітоп #2 білка тау, конкурували щонайменше з одним з вихідних терапевтичних епітопів, присутніх на тауΔ(1-150; 392-441/4R). Видалення не підкресленого залишку гістидину з епітопа SEQ ID NO: 204 привело до втрати активності конкурування (див. пептид VPGGGSVQ, SEQ ID NO: 205). Точкова мутація, що замінює гістидин на аланін (у відповідному положенні білка тау 299, в "епітопі #2"), привела до втрати активності

конкурування (пептид NIKAVPGGGS, SEQ ID NO: 200). Пептиди, що містили 2 або 3 амінокислоти перед "гістидином 299" (в напрямку N-кінця), також конкурували з вихідним епітопом (пептиди IKHVPGGGS (SEQ ID NO: 202) і NIKHVPGGGS (SEQ ID NO: 201), відповідно). Ці результати вказують на те, що мінімальний епітоп DC8E8, що знаходиться у другому тау-повторі (епітоп #2), знаходиться в 6-мерній послідовності, а саме HVPGGG (SEQ ID NO: 154).

Згадані вище експерименти по картуванню указали на присутність амінокислотної послідовності PGGG в одному або декількох епітопах антитіла DC8E8. Більше того, ця амінокислотна послідовність присутня у всіх чотирьох епітопах на білку тау, що зв'язуються DC8E8 (див. SEQ ID NO: 98, 99, 100, 101). Для визначення залишків в N-кінцевій області епітопів DC8E8, проводили експерименти по скануванню аланіном на тау-пептиді 295-DNIKHVPGGGS-305, який містить епітоп DC8E8 (в 298-KHVPGGG-304, SEQ ID NO: 99), який знаходиться у 2-ому повторюваному домені білка тау.

Зв'язувальну здатність мутантних пептидів з DC8E8 оцінювали по здатності кожного пептиду конкурувати з тауΔ(1-150; 392-441/4R) за зв'язування з DC8E8. Сім пептидів було синтезовано EZBiolabs (США) з чистотою більше 85 %: ANIKHVPGGGS (SEQ ID NO: 144), DAIKHVPGGGS (SEQ ID NO: 146), DNAKHVPGGGS (SEQ ID NO: 149), DNIAHVPGGGS (SEQ ID NO: 151), DNIKAVPGGGS (SEQ ID NO: 159), DNIKHAPGGGS (SEQ ID NO: 161) і пептид з вихідною послідовністю DNIKHVPGGGS (SEQ ID NO: 171). Конкурентний ELISA проводили згідно з наступним стандартним протоколом. Планшет з високим зв'язуванням IWAKI (#3801-096, Bertoni GmbH, Австрія) покривали протягом ночі при 4 °C за допомогою 100 мкл/ямку рекомбінантного очищеного тауΔ(1-150; 392-441/4R) в PBS в концентрації 5 мкг/мл. Проводили серійні розведення (2-кратні) пептидів в PBS/Tween 20 в поліпропіленових планшетах з конічним дном ямок (Greiner, #651201) (діапазон концентрацій 320, 160, 80, 40, 20, 10, 5 і 2,5 мкМ). Додавали 100 мкл кожного розведення на ямку. Очищене моноклональне антитіло DC8E8 (очищення проводили, як описано нижче в прикладі 5) розбавляли до концентрації 2 мкг/мл в PBS/Tween 20 і 100 мкл цього розбавленого антитіла змішували з кожним серійним розведенням пептидів в сумішах об'ємом 200 мкл з 100 нг антитіла/100 мкл, що містять кожний відповідний досліджуваний пептид в концентрації 160, 80, 40, 20, 10, 5, 2,5 і 1,25 мкМ. Суміші антитіло/пептид інкубували протягом 1 год. при 25 °C на обертовій платформі, встановленій на 250 об./хв. Сто мікролітрів (100 мкл) сумішей антитіло/пептид переносили з поліпропіленових планшетів в покриті тауΔ(1-150; 392-441/4R) і блоковані PBS/Tween 20 планшети IWAKI з високим зв'язуванням і інкубували протягом 1 год. при 25 °C на обертовій платформі, встановленій на 250 об./хв. Планшети промивали 4× за допомогою PBS/Tween 20. Зразки (в планшетах) інкубували протягом 1 год. при 25 °C на обертовій платформі (встановленій на 250 об./хв.) з 100 мкл поліклонального антитіла кози проти імуноглобулінів миші/HRP (Dako, #P0447), розбавленого 1:4000 в PBS/Tween 20. Планшети промивали 4× за допомогою PBS/Tween. Потім зразки/планшети інкубували з 100 мкл розчину 1,5 мг/2 мл о-PDA (о-фенілендіамін, SIGMA, P1526) в 0,1M Na-ацетаті, pH 6,0 (Roth, #6779), доповненого в 1,5 мкл/2 мл 30 % H₂O₂ (SIGMA, H-0904), протягом 10 хвилин при 25 °C в темряві. Реакцію зупиняли додаванням 100 мкл 2M H₂SO₄ (Merck, 1.00731.1000). За перебігом реакції спостерігали за допомогою зчитування поглинання зразків/планшетів при 490 нм (наприклад з використанням пристрою Victor Multilabel Counter (Wallac)).

На фіг. 8C представлені результати конкурентного ELISA, проведеного для наступних семи пептидів: ANIKHVPGGGS (SEQ ID NO: 144), DAIKHVPGGGS (SEQ ID NO: 146), DNAKHVPGGGS (SEQ ID NO: 149), DNIAHVPGGGS (SEQ ID NO: 151), DNIKAVPGGGS (SEQ ID NO: 159), DNIKHAPGGGS (SEQ ID NO: 161) і DNIKHVPGGGS (SEQ ID NO: 171). Точкова мутація, що замінює гістидин на аланін (у відповідному положенні білка тау 299, в "епітопі #2"), приводила до повної втрати активності конкурування з тауΔ(1-150; 392-441/4R) за зв'язування з DC8E8 (пептид DNIKAVPGGGS, SEQ ID NO: 159). Мутації, які змінювали амінокислоти D, N, I, K і V на аланін, не усували активність конкурування відповідних мутантних пептидів (пептиди ANIKHVPGGGS (SEQ ID NO: 144), DAIKHVPGGGS (SEQ ID NO: 146), DNAKHVPGGGS (SEQ ID NO: 149), DNIAHVPGGGS (SEQ ID NO: 151), DNIKHAPGGGS (SEQ ID NO: 161)). Ці результати вказують на те, що мінімальний епітоп DC8E8, що знаходиться у другому повторі білка тау (епітоп #2), розташований в 6-мерній послідовності, а саме HVPGGG (SEQ ID NO: 154), і що DC8E8 зв'язується з HXPGGG (SEQ ID NO: 164).

ПРИКЛАД 5: DC8E8 РОЗПІЗНАЄ НЕПРАВИЛЬНО НЕВПОРЯДКОВАНИЙ ТАУΔ(1-150; 151-391)/4R ПРИ ОЦІНЦІ ПОВЕРХНЕВИМ ПЛАЗМОННИМ РЕЗОНАНСОМ

Поверхневий плазмонний резонанс (SPR) можна використовувати для виявлення зв'язування білка і для визначення термодинамічних параметрів білкових комплексів (наприклад комплекси антитіло-антиген) шляхом прямого моніторингу події зв'язування в реальному часі.

Цю технологію звичайно використовують для охарактеризації як діагностичних, так і терапевтичних антитіл [див., наприклад, Karlsson and Larsson, Affinity Measurement Using Surface Plasmon Resonance, Methods in Molecular Biology, Vol. 248: Antibody Engineering: Methods and Protocols. Edited by: B.K.C. Lo (c) Humana Press Inc., Totowa, NJ (2008)].

Для експериментів SPR, моноклональне антитіло DC8E8 (mAb) очищали з безсироваткового супернатанту гібридоми на афінній колонці з білком G, наступним чином. Супернатант гібридоми доводили до pH 7,5, розчин попередньо очищали центрифугуванням, фільтрували через 0,45-мкм мембранний фільтр, і наносили на 5-мл колонку з білком G-сефарозою. mAb DC8E8 елюювали з колонки за допомогою 0,1М гліцину-HCl, pH 2,7. Елюювані фракції відразу нейтралізували 1М Tris-HCl, pH 9,0. Об'єднані фракції піддавали діалізу проти PBS, концентрували ультрафільтрацією і зберігали при -70 °C. Концентрацію антитіла визначали шляхом вимірювання поглинання при 280 нм з використанням формули $c \text{ (мг/мл)} = A_{280\text{nm}}/1,43$.

Для аналізів з використанням SPR застосовували пристрій BIACORE3000 з сенсорним чипом CM5 (Biacore AB, Uppsala). Реагенти для зв'язування амінів (EDC, NHS, етаноламін, pH 8,5), детергент P20 і 10 мМ ацетат натрію, pH 5,0, були одержані від Biacore AB. Ці експерименти проводили при 25 °C в PBS, pH 7,4, з 0,005 % P20 (PBS-P) як рухомим буфером. Як правило, 5000 ОВ (одиниць відповіді) поліклонального антитіла проти антитіл миші (No. Z 0420; DakoCytomation, Glostrup, Данія) зв'язували при pH 5,0 через первинні аміни одночасно в двох проточних комірках, одну з яких використовували для еталонного вимірювання.

У кожному циклі аналізу очищений DC8E8 іммобілізували в аналітичній проточній комірці для досягнення рівня іммобілізації 230-250 ОВ. Для визначення K_A , а також для визначення кінетичних констант швидкості (K_{ON} і K_{OFF}), двократні серійні розведення або білка тау (проти якого досліджували афінність DC8E8), або PBS-P як контроль інжектували зі швидкістю потоку 50 мкл/хв. на сенсорний чип. Кінетичні дані про зв'язування піддавали подвійному порівнянню з еталоном згідно з Myszka, 1999, і апроксимували за допомогою програмного забезпечення для оцінки BIA evaluation software 4.1 (Biacore AB) до двофазної моделі реакції. Кінетичні константи швидкості піддавали глобальній апроксимації, максимальні відповіді апроксимували локально, і сукупна відповідь була встановлена на нуль.

Для кількісного визначення афінності DC8E8 відносно кожного з досліджуваних білків тау, визначали рівноважні константи асоціації (K_A) для зв'язування DC8E8 з ізоформою білка тау з чотирма повторами 2N4R, ізоформою білка тау з трьома повторами 2N3R, а також з неправильно невпорядкованим тау $\Delta(1-150; 392-441)/4R$ і неправильно невпорядкованим тау $\Delta(1-150; 392-441)/3R$. Всі білки тау, використані для SPR, одержували відповідно до прикладу 1. Афінність DC8E8 була найбільш високою для тау $\Delta(1-150; 392-441)/4R$ з чотирма повторами, за яким ішла повнорозмірна ізоформа білка тау з чотирма повторами 2N4R, а потім тау $\Delta(1-150; 392-441)/3R$ з трьома повторами і, нарешті, повнорозмірна ізоформа білка тау з трьома повторами 2N3R (фіг. 9A, B). Ці результати підтвердили: (1) специфічність DC8E8 відносно неправильно невпорядкованої форми білка тау, і (2) селективність DC8E8 відносно неправильно невпорядкованого білка тау (тобто пов'язаний із захворюванням або патологічний білок тау) відносно повнорозмірного білка тау (тобто нормальний або фізіологічний білок тау).

Моніторинг в реальному часі подій зв'язування з використанням SPR дозволив вимірювання кінетичної швидкості асоціації (K_{ON}) і дисоціації (K_{OFF}) між DC8E8 і декількома білками тау. Кінетика зв'язування DC8E8 продемонструвала змінену конформацію для неправильно невпорядкованого тау $\Delta(1-150; 392-441)/4R$ і тау $\Delta(1-150; 392-441)/3R$ в порівнянні з фізіологічним 2N4R тау, на що вказує більш легкодоступний епітоп(и) DC8E8 в неправильно невпорядкованих білках тау. Це відображується в більш швидкому зв'язуванні і більш високій K_{ON} для неправильно невпорядкованих білків тау в порівнянні з їх повнорозмірними аналогами. Більше того, присутність додаткової ділянки зв'язування для DC8E8 на типах білка тау з чотирма повторами привела до в 10 разів більш повільної дисоціації типів білка тау 4R з комплексу з DC8E8 і відповідної в 10 разів більш низької K_{OFF} (фіг. 10A, B; пунктирні лінії інтерпольовані з вимірюваних даних шляхом обчислень кінетичних параметрів з використанням комп'ютерної програми BIAEvaluation v4.1).

ПРИКЛАД 6: DC8E8 РОЗПІЗНАЄ ВСІ СТАДІЇ РОЗВИТКУ НЕЙРОФІБРИЛЯРНОЇ ДЕГЕНЕРАЦІЇ В ГОЛОВНОМУ МОЗКУ ЛЮДИНИ З ХВОРОБОЮ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Тканину головного мозку людини (на парафінових блоках) одержували з Netherlands Brain Bank. Блоки нарізали на мікротомі. Поміщені в парафін зрізи (8 мкм) гіпокампа-енторинальної кори з головного мозку при хворобі Альцгеймера (стадія Браака VI) і контролю без деменції (стадія Браака I і III) обробляли холодною (+4 °C) 99 % мурашиною кислотою протягом 1 хв. при кімнатній температурі (25 °C). Зрізи тканин інкубували в блокувальному розчині (5 % BSA, 0,3 % Triton X-100 в 50 нМ Tris-HCl), а потім протягом ночі з очищеним первинним антитілом DC8E8

(7,8 мг/мл; одержаним, як описано в прикладі 5), яке було розбавлене 1:2000 в блокувальному розчині. Потім зрізи інкубували з біотинільованим вторинним антитілом (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories) при кімнатній температурі протягом однієї години, а потім піддавали реакції з комплексом авідин-біотин-пероксидаза протягом 60 хвилин (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories), в обох випадках при кімнатній температурі (25 °C). Імунну реакцію візуалізували за допомогою набору субстрату пероксидази (Vector VIP, Vector laboratories, Ca, США) і контрастно забарвлювали метиловим зеленим (Vector Laboratories). Зрізи досліджували за допомогою мікроскопа Olympus BX71.

Моноклональне антитіло DC8E8 розрізняло доклінічну AD, AD, що клінічно починається, і повністю розгорнену кінцеву стадію AD. Імуногістохімічне дослідження показало, що DC8E8 виявляло ранні стадії (мономер, димери тау) патологічного білка тау при доклінічній AD у людини - на стадії Браака I (фіг. 11A). Головний мозок містить тільки обмежену кількість нейрофібрилярних вузликів (NFT) в енторинальній корі і не містить NFT в гіпокампі (стадія Браака I). У головному мозку з AD, що клінічно починається, де трохи NFT було виявлено в гіпокампі (стадія Браака III), mAb DC8E8 розпізнавало як стадію олігомерів патологічного білка тау (стрілки), так і стадію полімерів патологічного білка тау (вузлики) (фіг. 11B). У головному мозку при повністю розгорненій хворобі Альцгеймера, де присутня велика нейрофібрилярна дегенерація, DC8E8 розпізнає, головним чином, полімери патологічного білка тау у формі нейрофібрилярних вузликів, нейритичних бляшок і нейритичних ниток (фіг. 11C). Таким чином, mAb DC8E8 розпізнає всі стадії розвитку нейрофібрилярних осередків в тканині головного мозку людини з хворобою Альцгеймера, включаючи мономерну, димерну, ранню олігомерну стадію (фіг. 11D1) і пізню олігомерну довузликову стадію (фіг. 11D2), а також пізні стадії розвитку полімерів патологічного білка тау - внутрішньоклітинні (фіг. 11D3) і позаклітинні нейрофібрилярні вузлики (фіг. 11D4). Таким чином, ця реактивність mAb DC8E8 є придатною як для діагностичних, так і для терапевтичних застосувань цього антитіла.

ПРИКЛАД 7: DC8E8 РОЗПІЗНАЄ ВСІ СТАДІЇ РОЗВИТКУ НЕЙРОФІБРИЛЯРНОЇ ДЕГЕНЕРАЦІЇ В ГОЛОВНОМУ МОЗКУ ТРАНСГЕННИХ ЩУРІВ SHR72, ЩО СПОСТЕРІГАЮТЬСЯ ПРИ ХВОРОБІ АЛЬЦГЕЙМЕРА У ЛЮДИНИ

Лінія трансгенних щурів SHR24: ця лінія експресує тау Δ (1-150; 392-441)/3R - білок, описаний в міжнародній патентній заявці PCT WO 2004/007547. Одержання і охарактеризація цієї трансгенної лінії описані в Filipcik et al., 2010. У цих трансгенних щурів розвивається прогресуюча і залежна від віку нейрофібрилярна дегенерація в кортикальних областях головного мозку. Нейрофібрилярні вузлики (NFT) задовольняли декілька ключових гістологічних критеріїв, використовуваних для ідентифікації нейрофібрилярної дегенерації при хворобі Альцгеймера у людини, включаючи аргірофілію, двопротенезаломлення конго червоного і реактивність відносно тіофлавіну S. Нейрофібрилярні вузлики також ідентифікували за допомогою антитіл, використовуваних для виявлення патологічного білка тау в головному мозку людини, включаючи DC11, яке розпізнає пов'язану із захворюванням конформацію білка тау (Vechterova et al. 2003; Kovacech et al. 2010), і антитіла, які є специфічними до гіперфосфорилованих форм білка тау. Більше того, нейрофібрилярна дегенерація характеризувалася великим утворенням нерозчинних в саркозилі комплексів білка тау, що складаються з ендогенних типів білка тау щура і трансгенних укорочених типів білка тау (Filipcik et al., 2010). Найбільш вираженою гістопатологічною ознакою цих щурів є велика нейрофібрилярна патологія - нейрофібрилярні вузлики в корі. Середня тривалість життя трансгенних щурів становить 222,5 доби (SD=43,56) і найбільший період виживання досягає 475 днів (Filipcik et al., 2010).

Лінія трансгенних щурів SHR72: ці трансгенні щури експресують укорочений тау Δ (1-150; 392-441)/4R людини відповідно до міжнародної патентної заявки PCT WO 2004/007547 в декількох областях головного мозку і в спинному мозку. Одержання цієї лінії щурів описане Zilka et al., 2006, і патологія білка тау була описана Koson et al., 2008. Найбільш вираженою гістопатологічною ознакою цих щурів є велика нейрофібрилярна патологія, наприклад нейрофібрилярні вузлики. Поява NFT задовольняла декілька гістологічних критеріїв, використовуваних для ідентифікації нейрофібрилярної дегенерації при хворобі Альцгеймера у людини, включаючи аргірофілію, двопротенезаломлення конго червоного і реактивність відносно тіофлавіну S. NFT також ідентифікували за допомогою антитіл, використовуваних для виявлення патологічного білка тау в головному мозку людини, включаючи DC11, що розпізнає аномальну конформацію білка тау (див. патент США № 7446180), і антитіла, які є специфічними до гіперфосфорилованих форм білка тау. Більше того, нейрофібрилярна дегенерація характеризувалася великим утворенням нерозчинних в саркозилі комплексів білка тау, що складаються з ендогенних типів білка тау щура і трансгенних укорочених типів білка тау. У

гетерозиготній лінії цієї моделі найбільш велику нейрофібрилярну патологію спостерігали в стовбурі головного мозку і в спинному мозку (Zilka et al., 2006). Рівні експресії трансгена, навантаження NFT і тривалість життя щурів були визначені раніше. Середня тривалість життя для трансгенних щурів (лінія SHR72) становила 222,5 доби (SD=24,48) (Koson et al., 2008).

У лінії трансгенних щурів SHR24 (експресує тау Δ (1-150; 392-441)/3R) і SHR72 (експресує тау Δ (1-150; 392-441)/4R) розвивається велика нейрофібрилярна дегенерація в головному мозку і спинному мозку. Лінія трансгенних щурів SHR24 виявляє важку нейродегенерацію в ізокортексі, стовбурі головного мозку і спинному мозку, в той час як у трансгенних щурів SHR72 NFT розвиваються в основному в стовбурі головного мозку і в спинному мозку, але не в корі. Прогресування сенсорно-рухового і неврологічного погіршення є схожим в обох трансгенних лініях; однак трансгенні щури SHR72 мають більш коротку тривалість життя.

У дослідженнях на трансгенних щурах, описаних в даній заявці, використовували гемізиготних трансгенних щурів (SHR24 і SHR72). Всіх щурів утримували в стандартних лабораторних умовах з вільним доступом до води і корму і їх утримували при добових умовах освітлення (цикли 12 годин на світлі/в темряві з початком освітлення в 7:00). Були зроблені спроби мінімізувати використовувану кількість щурів і обмежити їх незручність, біль і страждання.

Імуногістохімія тканини головного мозку з DC8E8. Трансгенних щурів (у віці 7 місяців) піддавали транскардіальній перфузії PBS протягом 1 хв. під глибоким наркозом, а потім проводили перфузію 100 мл 4 % параформальдегіду (pH 7,4). Після перфузії голову відділяли і головний мозок швидко витягували. Головний мозок розрізали подовжньо на дві півкулі рівного розміру з використанням одноразових лез скальпеля. Тканини головного мозку піддавали постфіксації в 4 % параформальдегіді, поміщали в парафін і нарізали на зрізи на мікромомі. Імуногістохімічне і гістопатологічне дослідження проводили на 8-мкм поміщених в парафін зрізах тканин. Зрізи тканини попередньо обробляли протягом 20 хв. розчином, що виявляє антиген (Vector laboratories, CA, США), і протягом 1 хв. холодною (+4 °C) 90 % мурашиною кислотою (Applichem, Німеччина), при кімнатній температурі (25 °C). Після блокування зрізи інкубували протягом ночі з очищеним моноклональним антитілом DC8E8 (7,8 мг/мл), розбавленим 1:2000 в блокувальному розчині (5 % бичачий сироватковий альбумін, 0,3 % Triton X-100 в 50 mM Tris-HCl). Після промивання зрізи інкубували з біотинільованим вторинним антитілом (Vectastain Elite ABC Kit, Vector laboratories) при кімнатній температурі протягом однієї години, а потім піддавали реакції з розчином комплексу авідин-біотин-пероксидаза протягом 60 хвилин (Vectastain Elite ABC Kit, Vector laboratories), при кімнатній температурі (25 °C). Імунну реакцію візуалізували за допомогою набору субстрату для пероксидази (Vector VIP, Vector laboratories, CA, США), і зрізи контрастно забарвлювали метиловим зеленим (Vector laboratories). Зрізи досліджували за допомогою мікроскопа Olympus BX71.

У головному мозку трансгенних щурів (SHR72), mAb DC8E8 розпізнавало олігомери патологічного білка тау на стадії захворювання (стрілки) і полімери патологічного білка тау на стадії захворювання (вузлики) (фіг. 12A). Більше того, DC8E8 реагувало з неправильно згорненим білком тау, який розташований в аксональних волокнах. У співпадаючому за віком контрольному головному мозку щура антитіло не забарвлювало тіла нейронів або аксональні відростки (фіг. 12B).

Як і у випадку головного мозку людини з хворобою Альцгеймера (див. вище), mAb DC8E8 розпізнавало всі стадії розвитку нейрофібрилярних осередків в головному мозку трансгенних щурів SHR72, включаючи мономерну, димерну і ранню олігомерну стадію (фіг. 12C) і пізню олігомерну довузликову стадію білка тау (фіг. 12D), а також пізні стадії розвитку полімерів патологічного білка тау - внутрішньоклітинні (фіг. 12E) і позаклітинні нейрофібрилярні вузлики (фіг. 12F).

DC8E8 також розпізнавало нейрофібрилярні вузлики в головному мозку трансгенних щурів, експресуючих тау Δ (1-150; 392-441)/3R) (SHR24, фіг. 13A; SHR72, фіг. 13B).

ПРИКЛАД 8: DC8E8 РОЗПІЗНАЄ ЯК РОЗЧИННИЙ НЕПРАВИЛЬНО НЕВПОРЯДКОВАНИЙ ТИП БІЛКА ТАУ, ТАК І НЕРОЗЧИННІ ТИПИ БІЛКА ТАУ ПРИ ХВОРОБІ АЛЬЦГЕЙМЕРА У ЛЮДИНИ І В ГОЛОВНОМУ МОЗКУ ЩУРІВ З ТРАНСГЕННИМ БІЛКОМ ТАУ

Розчинний білок тау і нерозчинні комплекси білка тау виділяли з головного мозку людини з AD або з головного мозку щурів з трансгенним пов'язаним із захворюванням білком тау (лінії SHR24 і SHR72, описані в прикладі 7), з використанням способу з саркозилем (Greenberg and Davies, 1990). Для екстракції білка заморожені тканини головного мозку людини з AD (алокортекс, зразки стадій Браака V і VI, одержані з Netherlands Brain Bank) і тканини трансгенних щурів SHR24 (ізокортекс, вік 10, 12 і 14 місяців) і трансгенних щурів SHR72 (стовбур головного мозку, вік 7,5 місяця) гомогенізували в 10 об'ємах холодного буфера для

екстракції (10 mM Tris, pH 7,4, 0,8M NaCl, 1 mM EGTA і 10 % сахароза). Гомогенати центрифугували протягом 20 хв. при 20000×g і 50 мкл супернатанту використовували для аналізу розчинного білка тау.

Для одержання нерозчинного в саркозилі білка тау в супернатанти, що залишилися, додавали N-лауроїлсаркозин (SIGMA) до кінцевої концентрації 1 % і інкубували протягом 1 год. при кімнатній температурі, при струшуванні. Після центрифугування при 100000×g протягом 1 год., одержані супернатанти видаляли, і осад містив фракцію нерозчинного в саркозилі білка тау.

Фракції розчинного білка тау і нерозчинного в саркозилі білка тау аналізували з використанням імуноблотингу. Фракції розчинного білка тау розбавляли рівним об'ємом 2× буфера для нанесення зразка з SDS (з β-меркаптосоеанолом) (Laemmli, 1970) і наносили 15 мкг білків на доріжку. Для фракцій нерозчинного в саркозилі білка тау осад розчиняли в 1× буфері для нанесення зразка з SDS в 1/50 об'єму розчинної фракції, використовуюваної для одержання фракції нерозчинного білка тау. Потім рівні об'єми розчинного білка тау і нерозчинного в саркозилі білка тау використовували для аналізу з використанням імуноблотингу, що відповідало 15 мкг загального білка в розчинній фракції (див. Filipcik et al. 2010). Зразки нагрівали при 95 °C протягом 5 хв., наносили на поліакриламідні гелі з 5-20 % градієнтном SDS, і піддавали електрофорезу в буферній системі Tris-гліцин-SDS протягом 40 хвилин при 25 мА. Білки переносили на мембрану з полівініліденфториду (PVDF) (1 год. при 150 мА в 10 mM CAPS, pH 12). Після перенесення мембрани блокували в 5 % знежиреному сухому молоці в фосфатно-сольовому буфері (PBS; 136,89 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,09 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄) протягом 1 год. при кімнатній температурі, а потім інкубували протягом 1 год. з супернатантом культури гібридами DC8E8, розбавленим 1:1 за допомогою TBST-молоко (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20, 5 % знежирене сухе молоко), а потім проводили три промивання великими об'ємами PBS. Мембрани інкубували (1 год. при кімнатній температурі) з кон'югованим з HRP антитілом кози проти Ig миші (DAKO, Данія), розбавленим 1:4000 за допомогою PBS, як вторинним антитілом. Після цієї інкубації йшло промивання (три рази) 0,2 % Igepal CA-630 (SIGMA) в PBS. Блоти виявляли за допомогою хемілюмінесцентного субстрату SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, США), і сигнали білка виявляли з використанням візуалізуючої системи LAS3000 (FUJI Photo Film Co., Японія). Інтенсивність хемілюмінесцентного сигналу кількісно визначали з використанням програмного забезпечення AIDA (Advanced Image Data Analyzer, Raytest, Straubenhardt, Німеччина).

DC8E8 розпізнавало як розчинний тауΔ(1-150; 392-441)/3R людини, так і фізіологічні ізоформи білка тау щура у трансгенних щурів SHR24 (фіг. 14A). Більше того, DC8E8 розпізнавало тауΔ(1-150; 392-441)/3R і патологічні білки тау щура в нерозчинних в саркозилі фракціях білка тау з головного мозку щурів SHR24 (фіг. 14B). Важливо, що DC8E8 суворо розпізнавало білки тау людини у фракції нерозчинного в саркозилі білка тау в головному мозку людини з AD (стадії Браака V і VI, фіг. 14B і 14C). DC8E8 розпізнавало як розчинний тауΔ(1-150; 392-441)/4R людини, так і повнорозмірні (фізіологічні) ізоформи білка тау щура у трансгенних щурів SHR72 (фіг. 14D). Суттєво, що DC8E8 специфічно розпізнавало патологічний білок тауΔ(1-150; 392-441)/4R і патологічні форми білка тау щура у фракціях нерозчинного в саркозилі білка тау з головного мозку щурів SHR72 (фіг. 14D).

ПРИКЛАД 9: DC8E8 ІНГІБУЄ ПАТОЛОГІЧНІ ВЗАЄМОДІЇ ТАУ-ТАУ

Аналіз фібрилізації білка тау. Аналіз фібрилізації білка тау *in vitro* використовували для визначення того, чи має DC8E8 інгібіторний ефект на патологічні взаємодії тау-тау. Аналіз оснований на властивості, характерній білкам тау, а саме на їх здатності піддаватися конформаційним змінам при взаємодії з поліаніонами, такими як сульфатований глікозаміноглікан - гепарин. Ця змінена конформація на одній молекулі білка тау далі приводить до її патологічних взаємодій з іншою молекулою білка тау, стабілізації комплексу тау-тау через утворення поперечних структур β-шарів в зв'язуючих мікротрубочки областях взаємодіючих молекул білка тау, і, нарешті, формування парних спіральних філаментів (PHF), аналогічних структурам при хворобі Альцгеймера (Skrabana et al., 2006). Утворення структур, багатих β-шарами, можна виявляти за допомогою флуоресцентних барвників, таких як тіофлавін Т.

Аналіз для вимірювання ефекту DC8E8 на патологічні взаємодії тау-тау проводили в PBS (фільтрований через 0,2-мкм фільтр), що містив: 20 мкМ (кінцева концентрація) будь-якого з досліджуваних рекомбінантних білків тау (тауΔ(1-150; 392-441)/4R або тауΔ(1-296; 392-441)/4R), очищених, як описано в прикладі 1; 5 мкМ гепарин (натрієва сіль гепарину зі слизової оболонки кишечника свині, ≥150 МОд/мг, з розрахунку на суху масу, від SIGMA); і 12,5 мкМ (кінцева концентрація) тіофлавін Т. Кожну реакційну суміш (кінцевий об'єм 80 мкл) інкубували протягом 20 год. при 37 °C в закритих чорних твердих планшетах з полістиролу (384 ямки, Greiner

BioOne). Флуоресценцію тіофлавіну Т вимірювали з використанням пристрою для зчитування флуоресценції (Fluoroskan Ascent FL (LabSystems)), з довжиною хвилі збудження 450 нм, випромінювання при 510 нм, і часом вимірювання 200 мс. Для визначення інгібіторної активності mAb DC8E8 на патологічні взаємодії тау-тау, очищений DC8E8 (приклад 5) додавали в реакційну суміш при кінцевій концентрації 20 мкМ, перед інкубацією при 37 °C. Як контролю використовували два антитіла: DC51 (що розпізнає білок оболонки вірусу сказу; Masikova et al., 1992) і DC11 (що розпізнає певні укорочені конформаційно змінені форми білка тау, патент США № 7446180).

Кількість конформаційно зміненого і фібрілізованого білка тау вимірювали по флуоресценції тіофлавіну Т за відсутності ("контроль") і в присутності ("DC8E8") DC8E8 (фіг. 15A і 15B). MAb DC8E8, додане в кінцевій концентрації 20 мкМ, перешкоджало патологічній конформаційній зміні і фібрілізації обох неправильно неупорядкованих білків тау, знижуючи кількість фібрілізованих форм патологічного білка тау до менше ніж 5 % і 16 % для тау Δ (1-150; 392-441)/4R і тау Δ (1-296;392-441)/4R, відповідно. Ця інгібіторна активність DC8E8 була статистично значущою при аналізі за допомогою непараметричного t-критерію ("DC8E8", $p < 0,001$ і $p < 0,01$ на фіг. 15A і 15B, відповідно). Стороннє антитіло Rab50 (Masikova et al., 1992), яке не зв'язується з білком тау, не перешкоджало конформаційній зміні білка тау, що приводило до незміненої флуоресценції тіофлавіну Т ("Rab50"). Антитіло DC11, яке розпізнає певні патологічно змінені конформації білка тау (Vechterova et al., 2003, і патент США № 7446180), далі стимулювало утворення фібрілізованого білка тау; цей ефект може відображати стабілізацію патологічної конформації білка тау, необхідної для аномальної взаємодії тау-тау і утворення фібрил за допомогою DC11.

DC8E8 також інгібувало утворення димерів, тримерів і олігомерів білка тау неправильно неупорядкованим тау Δ (1-296; 392-441/4R) (фіг. 16). Рекомбінантний тау Δ (1-296; 392-441)/4R інкубували протягом 1, 4 і 20 год. або в присутності, або за відсутності DC8E8, як описано вище, для аналізу фібрілізації. У вказані моменти часу реакцію зупиняли додаванням буфера для нанесення зразка з SDS. Для аналізу білка 10 мкл кожної реакційної суміші для фібрілізації наносили на поліакриламідні гелі з 5-20 % градієнтном SDS, і піддавали електрофорезу в буферній системі Tris-гліцин-SDS протягом 40 хвилин при 25 мА. Після перенесення білка на мембрани з PVDF (1 год. при 150 мА в 10 мМ CAPS, pH 12), мембрани блокували в 5 % знежиреному сухому молоці в PBS протягом 1 год. при кімнатній температурі, а потім інкубували протягом 1 год. з кон'югованим з HRP DC25 (Skrabana et al. (2006)), розбавлене 1:1000 в PBS, а потім проводили три промивання великими об'ємами PBS. Блоти виявляли за допомогою хемілюмінесцентного субстрату SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, США), і хемілюмінесцентні сигнали виявляли з використанням візуалізуючої системи LAS3000 (FUJI Photo Film Co., Японія). Інтенсивність хемілюмінесцентного сигналу кількісно визначали з використанням програмного забезпечення AIDA (Advanced Image Data Analyzer, Raytest, Straubenhardt, Німеччина).

Ці результати показали, що одна або декілька з чотирьох ділянок зв'язування, які розпізнає/зв'язує DC8E8 на білку тау людини, залучені до конформаційних змін мономера білка тау, фібрілізації білка тау і до утворення агрегатів білка тау (димери, тримери і інші олігомери). Іншими словами, одна або декілька з чотирьох областей білка тау, охоплених залишками 267-KHQPGGG-273 (SEQ ID NO: 98) (1-ий повторюваний домен білка тау), 298-KHVPGGG-304 (SEQ ID NO: 99) (2-ий повторюваний домен білка тау), 329-HHKPGGG-335 (SEQ ID NO: 100) (3-ий повторюваний домен білка тау) і 361-THVPGGG-367 (SEQ ID NO: 101) (4-ий повторюваний домен білка тау) стимулюють і/або залучені до фібрілізації білка тау і утворення агрегатів білка тау (димери, тримери і інші олігомери).

ПРИКЛАД 10: DC8E8 ОПОСЕРЕДКОВУЄ ЗАХОПЛЕННЯ І ДЕГРАДАЦІЮ НЕПРАВИЛЬНО НЕУПОРЯДКОВАНОГО БІЛКА ТАУ

Клітини мікроглії миші BV2 обробляли в 6-ямкових планшетах протягом різних періодів часу або 1 мкМ рекомбінантним тау Δ (1-150; 392-441)/4R окремо, або сумішшю/комплексом тау Δ (1-150; 392-441)/4R і DC8E8. Середовище збирали і клітини промивали PBS, а потім протягом 1 хв. м'яким кислим промивальним розчином (0,5M NaCl, 0,2M оцтова кислота, pH 3). Потім промиті клітини лізували в буфері TTL (20 мМ Tris, pH 7,4, 150 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 1 мМ DTT, 0,5 % Triton X-100, 50 мМ NaF, 1 мМ Na₃VO₄, Roche - повний інгібітор протеаз) і швидко заморожували в рідкому азоті. Одержані клітинні екстракти аналізували на 12 % гелі SDS-PAGE і вестерн-блоті, як описано раніше (Koson et al., 2008). У короткому викладі, білки переносили на нітроцелюлозні мембрани (Millipore, Billerica, MA, США) і забарвлювали понсо S для підтвердження одноманітного перенесення білка, а потім мембрани досліджували за допомогою супернатанту культури гібридоми DC25, що розпізнає залишки білка тау 347-353 і зветься

загальним антитілом проти білків тау (Axon Neuroscience, Vienna, Австрія). Вестерн-блотинг з антитілом проти GADPH (1:1000, Abeam) використовували як контроль для нанесення білка. Після інкубації з первинним антитілом DC25 ішли промивання і інкубація з поліклональним вторинним антитілом кози проти IgG миші, кон'югованим з HRP (1:3000; Dako, Glostrup, Данія). Блоти виявляли за допомогою хемілюмінесцентного субстрату SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, США), і хемілюмінесцентні сигнали виявляли з використанням візуалізуючої системи LAS3000 (FUJI Photo Film Co., Японія).

ТауΔ(1-150; 392-441)/4R додавали до культур клітин BV2 миші в концентрації 1 мкМ або окремо, або з 1 мкМ mAb DC8E8, як описано в попередньому абзаці. Після інкубації протягом 2, 4, 6 і 12 годин клітинні білки екстрагували і рівні інтерналізованого білка тау аналізували вестерн-блотингом. Загальне антитіло проти білків DC25 показало присутність неправильно невпорядкованого білка тау всередині клітин мікроглії. Профіль вестерн-блотингу показав, що деградація неправильно невпорядкованого білка тау була більш швидкою в присутності DC8E8 (фіг. 17A).

Саме антитіло DC8E8 також було виявлене всередині клітин BV2 (фіг. 17A). Більше того, DC8E8 знижувало навантаження розчинного неправильно невпорядкованого білка тау в клітинному середовищі, що може відображати активацію позаклітинного протеолітичного апарату (фіг. 17B).

ПРИКЛАД 11: DC8E8 Є СТАБІЛЬНИМ ПРИ 37 °C

DC8E8 (очищене, як описано в прикладі 5), розбавляли до концентрації 2 мг/мл в PBS і аліквоти (100 мкл) інкубували при 37 °C. Через різні інтервали в 1 місяць аліквоти заморожували при -20 °C. Аліквоту DC8E8 (2 мг/мл), яку продовжували зберігати при -20 °C протягом експерименту, використовували як "контроль". Через 4 місяці (коли всі зразки були зібрані) проводили аналіз активності DC8E8 (зв'язування з рекомбінантним тауΔ(1-150; 392-441)/4R як тверда фаза) і, таким чином, стабільності при зберіганні при 37 °C, за допомогою ELISA, як описано в прикладі 2. Кожну аліквоту DC8E8 розбавляли в 2000 разів (тобто 2000× або 1:2000), 4000×, 8000×, 16000×, 32000×, 64000×, 128000×, 256000× і 512000×. DC8E8 було активним (при вимірюванні по його здатності зв'язувати тауΔ(1-150; 392-441)/4R) і, таким чином, стабільним навіть після інкубації протягом 4 місяців при 37 °C, в порівнянні з "контролем" (фіг. 18).

ПРИКЛАД 12: DC8E8 ЗДАТНЕ ЗВ'ЯЗУВАТИ І ІМУНОПРЕЦИПІТУВАТИ ЯК РОЗЧИННИЙ, ТАК І НЕРОЗЧИННИЙ БІЛОК ТАУ З ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЛЮДИНИ З AD І З ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ SHR72, В ПРИРОДНИХ УМОВАХ, ПОДІБНИХ УМОВАМ EX VIVO

Нерозчинні в саркозилі неправильно згорнені білки тау біохімічно виділяли або з головного мозку людини з AD, або з головного мозку щурів з трансгенним білком тау (лінія SHR72, описана в прикладі 7) з використанням способу з саркозилом (Greenberg and Davies, 1990). Для екстракції білка нефіксований заморожений головний мозок людини з AD (транскенторинальна кора, стадія Браака V, одержана з Netherlands Brain Bank, Нідерланди) і тканини трансгенного щура SHR72 (ізокортекс, тварини у віці 7,5 місяців) гомогенізували в 10 об'ємах льодяного буфера для екстракції [10 mM Tris, pH 7,4, 0,8M NaCl, 1 mM EGTA і 10 % сахароза (доповнений 50 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄ і коктейлем інгібіторів протеаз Complete® без EDTA від Roche)]. Гомогенати центрифугували протягом 20 хв. при 20000×g для видалення мембранного матеріалу. Для одержання фракцій нерозчинного в саркозилі білка тау в супернатанти додавали N-лауроїлсаркозин (SIGMA) до кінцевої концентрації 1 % і інкубували протягом 1 год. при кімнатній температурі, при струшуванні. Після центрифугування при 100000×g протягом 1 год., одержані супернатанти видаляли і осад промивали один раз 3 мл фосфатно-сольового буфера (PBS, 8,09 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, 136,89 mM NaCl, 2,7 mM (KCl)). Потім осад, який відповідає білковій фракції головного мозку, збагачений олігомерними і полімерними неправильно згорненими типами білка тау (тобто пов'язані із захворюванням білки тау), ресуспендували в 1 мл PBS (доповненому 50 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄ і коктейлем інгібіторів протеаз Complete® без EDTA (Roche)) шляхом обробки ультразвуком протягом 2 хвилин на льоду з використанням Bandelin Sonopuls HD2200/UW2200, обладнаного зондом MS72, з 20 % робочим циклом з потужністю, встановленою на 20 % (Bandelin Electronic, Німеччина).

Одержані суспензії (як з головного мозку людини з AD, так і з головного мозку в моделі AD на щурах), збагачені пов'язаними із захворюванням білками тау, розділяли на дві 500-мкл частини і в кожну частину додавали 25 мкг одного з двох очищених антитіл: або DC8E8, або контрольного антитіла Rab50 (що розпізнає білок оболонки вірусу сказу; Masikova et al., 1992). Суспензії інкубували з антитілами з обертанням вздовж вертикальної осі при 6 °C протягом 2 годин. Для виділення комплексів антитіло-пов'язаний із захворюванням білок тау, що утворилися, в кожну реакційну суспензію додавали 50 мкл 50 % суспензії гранул Protein G Mag Sepharose beads (GE Healthcare), зрівноважених в PBS, які далі інкубували при 6 °C протягом 1

години. Гранули з комплексами антитіло-білок тау, що зв'язалися з ними, збирали і промивали три рази PBS (доповнений 50 мМ NaF, 1 мМ Na₃VO₄, 0,02 % IGEPAL CA-630 (SIGMA) і коктейлем інгібіторів протеаз Complete® без EDTA (Roche)). Комплекси антитіла, що зв'язалися, елюювали з гранул шляхом трьох окремих інкубацій протягом 5 хв. в 100 мкл 200 мМ мурашиної кислоти, pH 2,7. Елюати об'ємом 100 мкл об'єднували, ліофілізували, білки розчиняли в буфері для нанесення зразка SDS-PAGE (Laemmli, 1970), розділяли на 12 % гелях SDS-PAGE, переносили на нітроцелюлозні мембрани, і білки тау виявляли шляхом інкубації із загальним антитілом проти білків тау DC25 (епітоп 347-353 2N4R тау, Axon Neuroscience, Vienna, Австрія), кон'югованим з HRP (Kementec, Данія), як описано вище. Після інкубації (1 год. при кімнатній температурі) ішло промивання (три рази) 0,2 % Igepal CA-630 (SIGMA) в PBS. Блоти виявляли за допомогою хемілюмінесцентної субстратної системи SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate system (Pierce, США) і сигнали виявляли з використанням візуалізуючої системи aLAS3000 (FUJI Photo Film Co., Японія).

DC8E8 розпізнає, націлюється і зв'язує всі форми пов'язаних із захворюванням білків тау: олігомерні і полімерні неправильно згорнені типи білка тау в головному мозку пацієнта з хворобою Альцгеймера (фіг. 19A). На доріжці 1 на фіг. 19A представлені біохімічно екстраговані типи патологічного білка тау з головного мозку людини з AD. На доріжці 3 представлені типи тау, які розпізнаються, зв'язуються DC8E8 і виділяються шляхом імунопреципітації з DC8E8. Профіль зв'язаних/імунопреципітованих за допомогою DC8E8 пов'язаних із захворюванням типів білка тау являв собою профіль біохімічно екстрагованих білків тау. Ці результати демонструють ефективне розпізнавання DC8E8 ex vivo патологічних типів білка тау в головному мозку людини, тобто в екстрактах, де білки знаходяться в подібній in vivo немодифікованій формі, демонструючи, що DC8E8 має корисні терапевтичні властивості, будучи здатним націлюватися на пов'язані із захворюванням типи білка тау in vivo. Контрольне антитіло Rab50 ("імітуюче антитіло", доріжка 2) не розпізнає ніякий з білків тау, присутніх в екстракті головного мозку, що підтверджує, що зв'язування DC8E8 з білками тау є специфічним.

На фіг. 19B представлена кількість імітуючого антитіла (Rab50) і DC8E8 (доріжки 2 і 3, відповідно), використаного для імунопреципітації білків тау. Положення важкого і легкого ланцюгів DC8E8 також позначені на доріжці 3 фіг. 19A. Присутність більш високої кількості ланцюгів антитіла спотворює профіль пов'язаного із захворюванням білка тау.

DC8E8 також розпізнає і націлюється на всі форми неправильно згорненого (пов'язаного із захворюванням) білка тау в головному мозку щурів SHR72 в моделі хвороби Альцгеймера. На фіг. 20A на доріжці 1 представлені біохімічно екстраговані пов'язані із захворюванням типи білка тау з головного мозку трансгенних щурів. Інкубація антитіла DC8E8 з екстрактом головного мозку трансгенних щурів забезпечила імунне очищення пов'язаних із захворюванням типів білка тау, присутніх в головному мозку (фіг. 20A, доріжка 3). Очищені за допомогою DC8E8 типи білка тау продемонстрували профіль, ідентичний профілю біохімічно виділених білків тау (фіг. 20A, доріжка 1), що підтверджує, що DC8E8 розпізнає і зв'язує всі патологічні типи білка тау, присутні в головному мозку трансгенного щура. Невелике спотворення профілю зв'язування білків тау викликане присутністю важкого і легкого ланцюгів антитіла DC8E8 (позначені на фіг. 20A, доріжка 3). Імітуюче антитіло Rab50 (фіг. 20A, доріжка 2) не зв'язувало ніякі з білків тау.

На фіг. 20B представлена кількість імітуючого антитіла (Rab50) і DC8E8 (доріжки 2 і 3, відповідно), використовуваного для імунного очищення білків тау з екстракту головного мозку щурів в трансгенній моделі хвороби Альцгеймера. Положення важкого і легкого ланцюгів DC8E8 також позначені на доріжці 3 фіг. 20A. Присутність більш високої кількості ланцюгів антитіла трохи спотворила профіль пов'язаного із захворюванням білка тау.

ПРИКЛАД 13: МОНОКЛОНАЛЬНЕ АНТИТІЛО DC8E8 УСУВАЄ ПАТОЛОГІЧНИЙ БІЛОК ТАУ З ГОЛОВНОГО МОЗКУ ТРАНСГЕННИХ ЩУРІВ SHR72

Гібридомні клітини, продукуючі або DC8E8, або Rab50 (негативне контрольне антитіло, що розпізнає вірус сказу) культивували в DMEM, що містило 10 % NHS і 1 % глутамін. Клітини підраховували в камері для підрахунку Burker. Суспензії клітин, що містили 500000 клітин на мілілітр, центрифугували при 100×g протягом 5 хв. і осад ресуспендували в 1 мл PBS. Суспензії клітин знову осаджували при 100×g протягом 5 хв., і осад ресуспендували в 5 мкл PBS.

Для цих експериментів використовували трансгенних щурів SHR72 (у віці 6 місяців) (3 щури на групу). Щонайменше за одну годину до хірургічної операції щурам підшкірно вводили імунодепресивний лікарський засіб - сандіmun (15 мг/кг). Трансгенних щурів піддавали анестезії сумішшю тилетамін-золазепам (100 мг/мл)/ксилазин (20 мг/мл) у співвідношенні 3:5, ін'єктованою внутрішньоочеревинно. Дозування анестетиків було наступним: золетил (30 мг/кг) і ксиларієм (10 мг/кг). Голови підданих анестезії щурів фіксували в стереотаксичному апараті (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, США) шляхом поміщення фіксуєчих важелів у вушні

канали кожної тварини. У голові кожної тварини просвердлювали отвір з використанням хірургічного дреля відповідно до вибраних стереотаксичних координат (латеральні 5 мм; передньозадні 4 мм; дорсовентральні -5 мм відносно брегми). Суспензії клітин гібридом, продукуючих або DC8E8 (10^5 клітин), або Rab50 (10^5 клітин), білатерально ін'єктували в бахромку гіпокампа головного мозку щурів. Незабаром після операції внутрішньом'язово вводили кетонал (5мг/кг). Сандіmun (15 мг/кг) вводили підшкірно протягом 8 діб після операції. Енроксил (20 мг/кг/24 год.) вводили з питною водою протягом 10 діб.

Через два тижні після хірургічної операції щурів піддавали анестезії сумішшю золетилю (30 мг/кг) і ксиларієму (10 мг/кг). Через 2-5 хвилин щурів поміщали на препарувальний столик, і їх черевну порожнину розтинали. Перед перфузією проводили взяття крові для аналізу рівнів білка тау і антитіла в сироватці крові. Голку для перфузії поміщали в лівий шлуночок серця, і щурів піддавали перфузії PBS протягом 2 хвилин з використанням перистальтичного насоса (тип pp1-05, Zalimp, швидкість - $10\times$, міра 7-22 мл/1 хв. перфузійної рідини). Кожного щура декапітували, її череп відкривали за допомогою Раean, і головний мозок (з частиною спинного мозку) обережно витягували. Головний мозок розрізали подовжно на дві частини; праву сторону фіксували в 4 % PFA (4 °C) протягом ночі. Ліву сторону розрізали і стовбур головного мозку і кортикальні області швидко заморожували в рідкому азоті.

Кількість антитіла DC8E8 в сироватці підданих введенню тварин визначали за допомогою ELISA, як описано нижче в прикладі 19, з використанням тау Δ (1-150; 392-441)/4R як твердої фази. Сироватку кожної тварини (A, B, C) піддавали серійному розведенню від $100\times$ до $12800\times$ (фіг. 21A). Концентрацію антитіла DC8E8 в сироватці визначали з використанням очищеного DC8E8 як стандарту. DC8E8 досягало концентрацій 466, 200 і 273 нг/мл у тварин, яким проводили введення (A, B, C, для групи введення DC8E8, відповідно).

Також визначали концентрацію білка в сироватках кожної підданої введенню тварини. Це здійснювали з використанням набору Innotest hTAU ELISA kit (Innogenetics, Бельгія), відповідно до протоколу виготовлювача. Введення DC8E8 забезпечувало транспорт комплексів антитіла-білок тау в кров, де білок тау досягав середньої концентрації 350 пг/мл. Цей ефект DC8E8 допомагає усунути патологічні білки тау з головного мозку. З іншого боку, не було виявлено білків тау в сироватці тварин, яким вводили імітуюче антитіло (Rab50), яке розпізнає білок оболонки вірусу сказу (Masikova et al., 1992). На графіку показані середні значення зі стандартними помилками середнього значення (SEM) (фіг. 21B).

Фіксовані тканини головного мозку занурювали в парафін і нарізали на мікротомі. Імуногістохімічне дослідження проводили на 8-мкм поміщених в парафін зрізах. Зрізи тканин обробляли протягом 20 хвилин киплячим розчином, що виявляє антиген (Vector laboratories, Burlingame, CA, США), і протягом 1 хвилини 85 % мурашиною кислотою (Applichem, Darmstadt, Німеччина). Після блокування зрізи тканин інкубували з mAb DC8E8 протягом ночі, а потім проводили промивання і інкубацію (протягом 1 години при кімнатній температурі) з біотинільованим вторинним антитілом (Vectastain Elite ABC Kit, Vector laboratories). Після промивання зрізи піддавали реакції з комплексом авідин-біотин-пероксидаза (Vectastain Elite ABC Kit, Vector laboratories) протягом 60 хвилин при кімнатній температурі. Імунну реакцію візуалізували за допомогою набору субстрату для пероксидази VIP (Vector VIP, Vector laboratories, Burlingame, CA, США). Для кількісного визначення внутрішньонейронального сигналу DC8E8 використовували верхній оливарний комплекс. Загальний сигнал кількісно визначали в індивідуальних рухових нейронах, щонайменше в 15 нейронах на зріз. Аналіз зображення проводили з використанням програмного забезпечення AIDA (Advanced Image Data Analyzer, Raytest, Straubenhardt, Німеччина). Підрахунок проводили на зрізах всіх підданих введенню тварин, а потім статистично оцінювали з використанням непараметричного критерію Манна-Уїтні.

Визначення (фіг. 22B) кількості патологічного білка тау у верхньому оливарному комплексі зрізів тварин з імітуючим введенням (фіг. 22A, права панель) і тварин, яким вводили DC8E8 (фіг. 22A, ліва панель) продемонструвало зниження кількості патологічного білка тау в досліджених областях головного мозку у всіх трьох тварин, яким вводили DC8E8, в порівнянні з тваринами з імітуючим введенням ($p < 0,0001$) (фіг. 22A і 22B).

ПРИКЛАД 14: КАРТУВАННЯ ЗАЛИШКІВ В АКТИВНОМУ ЦЕНТРІ DC8E8, ЯКІ ВПЛИВАЮТЬ НА РОЗПІЗНАВАННЯ DC8E8 ТЕРАПЕВТИЧНИХ ЕПІТОПІВ БІЛКА ТАУ

(а) Клонування одноланцюжкового антитіла DC8E8 і мутагенез активного центра антитіла. Щоб спростити картування амінокислотних залишків mAb DC8E8, необхідних для розпізнавання білків тау, одержували функціональну одноланцюжкову версію (scDC8E8v) повнорозмірного DC8E8 mAb. Це здійснювали з використанням кДНК легкого і важкого ланцюгів DC8E8, одержаних, як описано в прикладі 3.

Варіабельні області DC8E8 далі ампліфікували за допомогою ПЛР з використанням праймерів для клонування, що мають ділянки для ферментів рестрикції NcoI (прямий праймер: 5'-ATATTACCATGGACATTGTGATGTCACAG-3' (SEQ ID NO: 155)) і XhoI (зворотний праймер: 5'-ATATTATTCTCGAGGGAGACGGTGAAGT-3' (SEQ ID NO: 156)) і олігонуклеотидні лінкери

5 послідовності (VH-LINK-F:

5'-GGCGGCGGCGGCTCCGGTGGTGGTGGTTCATGCAGGTCCAATTGCAGCAG-3' (SEQ ID NO: 157); VL-LINK-R:

5'-GGAGCCGCGCGCCGAGAACCAACCACCAGAACCAACCACCACCCCGTTTG

10 ATGTCCAGCTTGGTGCC-3' (SEQ ID NO: 158)) які використовували для зв'язування варіабельних областей важкого і легкого ланцюгів (лінкерну послідовність конструювали згідно з Krebber et al., 1997). Після розщеплення виділених продуктів ПЛР (з використанням ферментів NcoI і XhoI) і очищення за допомогою агарозного гель-електрофорезу фрагменти клонували в розщеплену за допомогою NcoI і XhoI плазмиду рЕТ22b з використанням ДНК-лігази T4 (Fermentas, Німеччина). Бактеріальний штам DH5α використовували для ампліфікації одержаної плазмиди і правильне розташування вставки у вибраних клонах підтверджували за допомогою аналізу з ферментами рестрикції. Правильність послідовності одержаної одноланцюжкової конструкції DC8E8 (scDC8E8v) підтверджували секвенуванням ДНК з використанням аналізатора 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

20 (b) Ідентифікація за допомогою скануючого аланіном мутагенезу залишків в активному центрі DC8E8, які впливають на розпізнавання DC8E8 патологічного білка тау. Для ідентифікації залишків, які впливають на зв'язування DC8E8 з білком тау, проводили скануючий Ala мутагенез вибраних ділянок (виділених напівжирним шрифтом і підкреслених, див. нижче) scDC8E8v. Амінокислоти, вибрані для заміни на Ala, були ідентифіковані, виходячи з роботи MacCallum et al. (J. Mol. Biol. 1996). Мутагенез scDC8E8v проводили способом подовження з перекриванням з використанням мутантних олігонуклеотидів в ПЛР по стандартних методиках, описаних в "Molecular Cloning: A Laboratory manual", Sambrook and Russell (2001).

25 Мутантні окремі ланцюги наведені нижче відносно кожної вихідної послідовності DC8E8. Мутантні залишки виділені напівжирним шрифтом і підкреслені. Назви мутантних окремих ланцюгів складаються з номера конструкції, скороченого позначення важкого або легкого ланцюга (VH або VL), однобуквенного коду вихідної амінокислоти в DC8E8, за яким іде його положення в послідовності легкого і важкого ланцюгів SEQ ID NO: 141 і 138, відповідно, а потім А для кожного замінюючого аланіну. Наприклад, мутантний 1-VL-N31A відповідає одноланцюжковому мутанту номер 1, де у варіабельну область легкого ланцюга внесена мутація в положенні 31 (відносно DC8E8), шляхом заміни аспарагіну 31 (N31) аланіном (A).

35

Варіабельна область легкого ланцюга DC8E8 (CDR підкреслені):

1 10 20 30 40 50
DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLLSRTRKNYLAWYQQKPGQSPKLL

60 70 80 90 100
IYWASTRESGVDPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCKQSFYLRITFGGG

110
TKLDIK

Мутації в CDR1 [SEQ ID NO: 117] (мутантні залишки виділені напівжирним шрифтом і підкреслені): QSLLSRTRKNY (SEQ ID NO: 117) (вихідна послідовність CDR1 DC8E8)

40 1-VL-N31A [SEQ ID NO: 247],

2-VL-R33A [SEQ ID NO: 248],

3-VL-Y38A [SEQ ID NO: 249].

Мутація в каркасній області FR2, що передуює CDR2: LAWYQQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO: 160) (вихідна послідовність каркасної області FR2 DC8E8)

4-VL-Y55A [SEQ ID NO: 252].

45 Мутація в CDR2 [SEQ ID NO: 118]: WAS (SEQ ID NO: 118) (вихідна послідовність CDR2 DC8E8)

5-VL-W56A [SEQ ID NO: 253].

Мутації в CDR3 [SEQ ID NO: 119]: KQSFYLRIT (SEQ ID NO: 119) (вихідна послідовність CDR3 DC8E8)

50 6-VL-K95A [SEQ ID NO: 254],

7-VL-Q96A [SEQ ID NO: 255],
 8-VL-S97A [SEQ ID NO: 256],
 9-VL-F98A [SEQ ID NO: 257],
 10-VL-Y99A [SEQ ID NO: 258],
 11-VL-L100A [SEQ ID NO: 259],
 12-VL-R101A [SEQ ID NO: 260].

Варіабельна область важкого ланцюга DC8E8 (CDR підкреслені):

```

1      10      20      30      40      50
QVQLQQSGPELVKPGTSVKMPCKASGYIFTDYVISWVKQRTGQGLEWIGEIFP
      60      70      80      90      100
RSGSTYYNEKFKGKATLTADKSSNTAYMQLSSVTSEDSAVYFCARDYYGTSFA
110
MDYWGQGTSVTVSS

```

Мутації в CDR1 [SEQ ID NO: 120] (мутантні залишки виділені напівжирним шрифтом і підкреслені): GYIFTDYVIS (SEQ ID NO: 120) (вихідна послідовність CDR1 DC8E8)

14-VH-Y32A [SEQ ID NO: 261],

15-VH-V33A [SEQ ID NO: 262].

Мутація в каркасній області FR2, що передує CDR2: WVKQRTGQGLEWIGE (SEQ ID NO: 162) (вихідна послідовність каркасної області FR2 DC8E8)

16-VH-E50A [SEQ ID NO: 263].

Мутації CDR2 [SEQ ID NO: 121]: IFPRSGST (SEQ ID NO: 121) (вихідна послідовність CDR2 DC8E8)

17-VH-F52A [SEQ ID NO: 264],

18-VH-S57A [SEQ ID NO: 265].

Мутації в CDR3 [SEQ ID NO: 122]: ARDYYGTSFAMDY (SEQ ID NO: 122) (вихідна послідовність CDR3 DC8E8)

19-VH-D99A [SEQ ID NO: 266],

20-VH-Y100A [SEQ ID NO: 267],

21-VH-Y101A [SEQ ID NO: 268],

22-VH-G102A [SEQ ID NO: 269].

Аналітична і препаративна експресія рекомбінантних варіантів антитіла DC8E8. Конструкції ДНК pET22b-scDC8E8v антитіла дикого типу і його мутантів (всі з яких є His-міченими) трансформували в клітини E. coli продукуючого штаму BL21 (DE3). Для одержаних клонів спочатку підтверджували продукцію рекомбінантного scDC8E8v. Індивідуальні колонії, одержані після трансформації, инокулювали в 2 мл середовища LB, доповненого 100 мкг/мл ампіциліну, і вирощували при 37 °C протягом 5 годин при постійному струшуванні (Sambrook and Russell 2001). 100-мкл аліквоту кожної культури відбирали, змішували з 2/3 об'єму 100 % гліцерину і зберігали замороженою при -80 °C до подальшого застосування. Експресію рекомбінантного білка індукували додаванням ізопропіл-β-D-1-тіогалактопіранозиду (IPTG) до кінцевої концентрації 1 mM і інкубацію продовжували протягом додаткових 3 годин. Клітини збирали центрифугуванням в настільній центрифугі при 4 °C протягом 1 хв. при 10000×g, супернатант видаляли, клітинний осад ресуспендували в 1× буфері для зразка з SDS (Laemmli, 1970) і кип'ятили протягом 5 хвилин. Зразки центрифугували протягом 5 хвилин при 10000×g і супернатанти (бактеріальні лізати) аналізували за допомогою SDS-поліакриламідного геле-електрофорезу (SDS-PAGE). Розділені білки візуалізували шляхом забарвлення кумасі діамантовим синім R250 (SIGMA).

Для препаративної експресії кожного антитіла scDC8E8v (нативного і мутантного), бактеріальні клітини, що містять відповідні експресуючі плазміди, культивували і індукували, як описано в "Molecular Cloning: A Laboratory manual", Sambrook and Russell (2001). Трансформовані клітини вирощували при 37 °C в 100-500 мл середовища LB з 100 мкг/мл ампіциліну при 230 об./хв. Коли поглинання в культурі при 600 нм досягало 0,8-1,0, додавали IPTG до кінцевої концентрації 1 mM для індукції експресії scDC8E8v. Після подальшої інкубації при 37 °C протягом 3 годин, клітини збирали центрифугуванням при 3000×g протягом 15 хв. при 4 °C. Клітинний осад ресуспендували в 10 мл лізуючого буфера (50 mM PIPES, pH 6,9, 50 mM NaCl, 0,1 mM PMSF) і обробляли ультразвуком на льоду 6 разів протягом 30 с і з паузами 30 с, використовуючи наконечник TT-13 (робочий цикл 50 %, вихідна потужність 50 Вт, Sonopuls HD 2200, Bandelin, Німеччина). Лізат очищали центрифугуванням (21000×g протягом 15 хв. при

4 °C). Лізати фільтрували через 0,45-мкм мембранний фільтр і зберігали при -80 °C до застосування. Для дослідження успішної індукції і рівня експресії 1 мл індукованої культури збирали, клітини збирали центрифугуванням, як описано вище, ресуспендували в 100 мкл 1× буфера для зразка SDS, кип'ятили протягом 5 хвилин при 95 °C, а потім аналізували за допомогою SDS-PAGE (фіг. 23A). Цитоплазматичний лізат використовували для зв'язування/виявлення білків тау (аналізом з використанням вестерн-блотингу) і для визначення з використанням SPR афінності рекомбінантних антитіл відносно білка тау, обидва з яких є показниками активності нативних і мутантних антитіл scDC8E8v.

ПРИКЛАД 15: РЕКОМБІНАНТНИЙ ФРАГМЕНТ SCFV МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТІЛА DC8E8 (SCDC8E8V) РОЗПІЗНАЄ ПАТОЛОГІЧНИЙ БІЛОК ТАУ (ТАУΔ(1-150; 392-441)/4R)

Для визначення зв'язувальних властивостей scDC8E8v з патологічними формами білка тау, білковий лізат з бактерій, експресуючих scDC8E8v, розбавляли в 16 разів в буфері TBS-T (20 mM Tris, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20) і використовували для нанесення на нітроцелюлозну мембрану, що містить 500, 250 і 125 нг рекомбінантного укороченого білка тау (тауΔ(1-150; 392-441)/4R) і рекомбінантного укороченого на C-кінці білка тау (тауΔ228-441) (забарвлення білків понсо S, фіг. 23B). ScDC8E8v, що зв'язалося, виявляли за допомогою імуноблотингу з антитілом проти 6xhis-міткою (SEQ ID NO: 163) (№ A00174; GenScript, Piscataway, NJ, США) і візуалізували кон'югованим з HRP антитілом проти антитіл кролика (DAKO Cytomation, Данія) (фіг. 23C). Блоти виявляли за допомогою хемілюмінесцентного субстрату SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, США), що виявляється з використанням візуалізуючої системи LAS3000 (FUJI Photo Film Co., Японія).

Аналіз з використанням вестерн-блотингу продемонстрував, що рекомбінантне одноланцюжкове антитіло (scDC8E8v) виявляє укорочений білок тау [тауΔ(1-150; 392-441)/4R]. Зв'язування є специфічним, оскільки scDC8E8v не розпізнає контрольний укорочений білок тау (тауΔ228-441), який не містить жоден з чотирьох терапевтичних епітопів, розпізнаваних незмінним DC8E8 (фіг. 23C, доріжка 4). Дослідження нітроцелюлозної мембрани, що містить білки тау (нанесені, як показано на фіг. 23B) за допомогою лізату контрольних бактерій, не експресуючих scDC8E8v, не забезпечило ніякого сигналу (фіг. 23D).

ПРИКЛАД 16: РЕКОМБІНАНТНИЙ ФРАГМЕНТ SCFV МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТІЛА DC8E8 (SCDC8E8V) ВИЯВЛЯЄ ВЛАСТИВОСТІ ЗВ'ЯЗУВАННЯ БІЛКА ТАУ, СХОЖІ З АНТИТІЛОМ DC8E8 - СЕЛЕКТИВНО РОЗПІЗНАЄ ПАТОЛОГІЧНИЙ БІЛОК ТАУ (ТАУΔ(1-150; 392-441)/4R) І ЗНАЧНОЮ МІРОЮ ВІДРІЗНЯЄ ЙОГО ВІД ФІЗІОЛОГІЧНОГО НАТИВНОГО БІЛКА ТАУ (ТАУ2N4R)

Для кількісного визначення властивостей зв'язування білка тау у рекомбінантного одноланцюжкового антитіла scDC8E8v, проводили кінетичне визначення афінності з використанням SPR (Biacore 3000, Biacore, Швеція) для вимірювання зв'язування scDC8E8v з патологічним укороченим білком тау (тауΔ(1-150; 392-441)/4R) (фіг. 24A) і з нормальною ізоформою білка тау людини з чотирма повторами 2N4R (фіг. 24B). Для цього 11000 ОЕ поліклонального антитіла кролика проти His-мітки (№ A00174; GenScript, Piscataway, NJ, США) іммобілізували на сенсорному чипі CM5. Всі експерименти проводили при 25 °C в PBS, pH 7,4, з 0,005 % P20 (PBS-P) як рухомих буфером. Рекомбінантне His-мічене scDC8E8v іммобілізували в аналітичній проточній комірці для досягнення рівня іммобілізації 60 ОЕ, і відомі концентрації кожного білка тау або контрольного зразка PBS-P інжектували зі швидкістю потоку 100 мкл/хв. над сенсорним чипом. Кінетичні дані зв'язування піддавали подвійному порівнянню з еталоном і апроксимували за допомогою програмного забезпечення для оцінки BIA evaluation software 4.1 (Biacore AB) до моделі взаємодії 1:1. Кінетичні константи швидкості піддавали глобальній апроксимації, максимальні відповіді апроксимували локально, і сукупна відповідь була встановлена на нуль.

Кінетичні вимірювання показали більш високу константу швидкості асоціації і більш низьку константу швидкості дисоціації scDC8E8v відносно патологічного пов'язаного з AD тауΔ(1-150; 392-441)/4R, ніж відносно нормального тау 2N4R (фіг. 24C). Отже, афінність scDC8E8v відносно укороченого пов'язаного з AD білка тау є більш високою (більш високе зачення рівноважної константи асоціації K_A), ніж відносно повнорозмірної ізоформи білка тау 2N4R. Ці вимірювання підтвердили, що одноланцюжкова версія антитіла DC8E8 (scDC8E8v) демонструє перевагу зв'язування відносно конформаційно змінених патологічних білків тау, подібно вихідному повнорозмірному антитілу DC8E8. Таким чином, рекомбінантне scDC8E8v придатне для ідентифікації амінокислотних залишків в активному центрі антитіла DC8E8, відповідальних за його властивості зв'язування.

ПРИКЛАД 17: ІДЕНТИФІКАЦІЯ ЗАЛИШКІВ В АКТИВНОМУ ЦЕНТРІ SCDC8E8V, ЯКІ ВПЛИВАЮТЬ НА РОЗПІЗНАВАННЯ SCDC8E8V/DC8E8 ЕПІТОПІВ ПАТОЛОГІЧНОГО БІЛКА ТАУ

Декілька амінокислотних залишків, які впливають на взаємодію DC8E8-антиген, були визначені шляхом скануючого аланіном мутагенезу залишків активного центра scDC8E8v. Потенційні контактуючі з антигеном залишки в легкому і важкому ланцюгах ідентифікували, виходячи з роботи MacCallum et al. (J. Mol. Biol., 1996), і піддавали мутації на аланін, як описано в прикладі 14. Потім мутантні версії scDC8E8v експресували в штамі BL21 E. coli (фіг. 25A, односторонні білки вказані зірочками). Властивості зв'язування мутантного scDC8E8v аналізували вестерн-блотингом (фіг. 25B-C). На фіг. 25B представлено забарвлення понсо S нітроцелюлозних мембран, що містять різні кількості укороченого білка тауΔ(1-150; 392-441)/4R. Ідентичні мембрани використовували для виявлення укороченого білка тау різними мутантними односторонніми антитілами (фіг. 25C).

Виходячи з цих результатів, амінокислотні залишки у варіабельній області DC8E8 були поділені на три основних категорії наступним чином.

Категорія 1. Залишки, наведені в цій категорії (напівжирним шрифтом), додавали найбільший внесок в зв'язування scDC8E8v з патологічним укороченим пов'язаним з AD білком тау (тауΔ(1-150; 392-441)/4R). Мутація будь-якого з цих залишків на аланін найбільшою мірою перешкоджала розпізнаванню DC8E8 епітопів на білку тау.

Залишки категорії 1 в легкому ланцюзі DC8E8:

аспарагін в положенні 31 в CDRL1 [SEQ ID NO: 117],

тирозин в положенні 38 в CDRL1 [SEQ ID NO: 117],

серин в положенні 97 в CDRL3 [SEQ ID NO: 119].

Залишки категорії 1 у важкому ланцюзі DC8E8:

глутамінова кислота в положенні 50 в FRH2, що передуює CDRH2 [SEQ ID NO: 121],

тирозин в положенні 101 в CDRH3 [SEQ ID NO: 122].

Категорія 2. Залишки, наведені в цій категорії, додають внесок в зв'язування scDC8E8v з патологічним білком тау (тауΔ(1-150; 392-441)/4R). Мутація будь-якого з цих залишків на аланін знижує реактивність scDC8E8v відносно укороченого, пов'язаного з AD, білка тау (тауΔ(1-150; 392-441)/4R), але перешкоджає їй меншою мірою, ніж мутації залишків категорії 1.

Залишки категорії 2 в легкому ланцюзі DC8E8:

тирозин в положенні 55 в каркасній області FRL2, що передуює CDRL2 [SEQ ID NO: 118],

лізін в положенні 95 в CDRL3 [SEQ ID NO: 119].

Залишки категорії 2 у важкому ланцюзі DC8E8:

серин в положенні 57 в CDRH2 [SEQ ID NO: 121],

тирозин в положенні 100 в CDRH3 [SEQ ID NO: 122],

гліцин в положенні 102 в CDRH3 [SEQ ID NO: 122].

Категорія 3. Залишки, наведені в цій останній категорії, додають найменший внесок в зв'язування scDC8E8v з патологічним пов'язаним з AD білком тау (тауΔ(1-150; 392-441)/4R). Мутація цих залишків на аланін не змінює реактивності scDC8E8v відносно укороченого білка тау (тауΔ(1-150; 392-441)/4R).

Залишки категорії 3 в легкому ланцюзі:

аргінін в положенні 33 в CDRL1 [SEQ ID NO: 117],

триптофан в положенні 56 в CDRL2 [SEQ ID NO: 118],

глутамін в положенні 96 в CDRL3 [SEQ ID NO: 119],

фенілаланін в положенні 98 в CDRL3 [SEQ ID NO: 119],

тирозин в положенні 99 в CDRL3 [SEQ ID NO: 119],

лейцин в положенні 100 в CDRL3 [SEQ ID NO: 119],

аргінін в положенні 101 в CDRL3 [SEQ ID NO: 119].

Залишки категорії 3 у важкому ланцюзі:

тирозин в положенні 32 в CDRH1 [SEQ ID NO: 120],

валін в положенні 33 в CDRH1 [SEQ ID NO: 121],

фенілаланін в положенні 52 в CDRH2 [SEQ ID NO: 121],

аспарагінова кислота в положенні 99 в CDRH3 [SEQ ID NO: 122].

ПРИКЛАД 18: АКТИВНА ВАКЦИНАЦІЯ ТЕРАПЕВТИЧНИМИ ЕПІТОПАМИ БІЛКА ТАУ: ОДЕРЖАННЯ ІМУНОГЕНІВ ДЛЯ ВАКЦИН НА ОСНОВІ ОДНОГО ЗІ ЗВ'ЯЗУВАЛЬНИХ ЕПІТОПІВ DC8E8 НА БІЛКУ І ВВЕДЕННЯ ВАКЦИНИ

(а) Пептиди. Пептидні імуногени, що складаються з синтетичних фрагментів білка тау людини 2N4R, були синтезовані в Antagene, Inc. (Sunnyvale, CA) і EZBiolab, США, з чистотою більше 95 %. Кожну пептидну послідовність конструювали так, щоб вона охоплювала щонайменше одну з послідовностей, передбачувано залучених в і/або стимулюючих фібрілізацію/агрегацію білка тау (нові "терапевтичні епітопи"-мішені), і ці епітопи були ідентифіковані, як описано вище і за допомогою аналізів, описаних в прикладах 1-11, як ділянки

зв'язування для DC8E8 (див. фіг. 26A). Ці чотири послідовності також називають в даному описі "терапевтичними епітопами" (див. нижче). Ці епітопи відповідають мотивам взаємодії тау-тау (епітопи агрегації), які важливі для фібрилізації білка тау/збирання PHF. Таким чином, націлювання на ці стратегічні терапевтичні епітопи може приводити до успішного лікування AD і споріднених таупатій. Більше того, використання такої специфічної направленої проти білка тау терапії може виявитися безпечнішим, ніж широко націлені способи терапії, основані на випадковим чином вибраних епітопах на білках тау, оскільки вважають, що націлювання на деякі епітопи білка викликають аутоімунну відповідь і потенційно посилюють захворювання [Furlan et al., 2003; Gruden et al., 2004].

Таким чином, для подальшого визначення терапевтичного потенціалу імунотерапії на основі білків тау, було сконструйовано декілька наборів тау-пептидів для застосування як імуногенів. Всі із залишків належать до залишків повнорозмірного білка тау 2N4R, який має 441 амінокислотний залишок. Перший набір імуногенів складався з тау 251-PDLKNVKSIGSTENLKHQPGGGKVQIINK-280, SEQ ID NO: 1; тау 256-VKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKLDLS-285, SEQ ID NO: 2; тау 259-KIGSTENLKHQPGGGKVQIINKLDLSNVQ-288, SEQ ID NO: 3; тау 275-VQIINKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGG-304, SEQ ID NO: 4; тау 201-GSPGTPGSRSRTPSLPTPTREPKVAWR-230, SEQ ID NO: 5; тау 379-RENAKAKTDHGAEIVYKSPWSGDTSRHL-408, SEQ ID NO: 6; тау 181-TPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSGTPGSR-210, SEQ ID NO: 7; тау 300-VPGGGSVQIVYKPVDLSK-317, SEQ ID NO: 8; і тау 294-KDNIKHVPGGG-305, SEQ ID NO: 108. Деякі з цих послідовностей містять фосфориловані епітопи, що раніше зустрічалися при патології білка тау при AD. Таким чином, тау-пептид SEQ ID NO: 5 містить фосфорилований треонін в положенні 217, тау-пептид SEQ ID NO: 6 містить фосфориловані залишки серину в положеннях 396 і 404, і тау-пептид SEQ ID NO: 7 містить фосфорилований серин в положенні 202 і треонін в положенні 205. Тау-пептид SEQ ID NO: 2 синтезували в нефосфорилованій і фосфорилованій формі. Фосфорилована форма містить фосфорилований залишок серину в положенні 262.

У цьому наборі одна підгрупа імуногенів (тау-пептиди SEQ ID NO: 1-4 і 108) охоплює один з терапевтичних епітопів, відповідних або SEQ ID NO: 98 (тау 267-KHQPGGG-273), або SEQ ID NO: 99 (тау 298-KHVPGGG-304). Інша підгрупа тау-пептидів (SEQ ID NO: 5-7) охоплює фосфориловані ділянки, що зустрічаються при хворобі Альцгеймера і інших таупатіях. Тау-пептид SEQ ID NO: 8 не містить яких-небудь із згаданих епітопів і його використовували як контроль (фіг. 26).

Другий набір пептидів складався з SEQ ID NO: 9-97, що відображають послідовності, що перекриваються, які охоплюють залишки 244-390 білка тау людини 2N4R. Кожний з цих пептидів містить одну з послідовностей терапевтичних епітопів у відмінному оточенні, основаному на білку тау. Іншими словами, в кожній підгрупі кожний з епітопів з #1 по #4 оточений відмінними залишками білка тау на обох з його N- і C-кінців (фіг. 26).

(b) Кон'югація для застосування як вакцини. Тау-пептиди SEQ ID NO: 2, 4, 7 і 108 кон'югували з гемоціаніном лімфи равлика (KLH) через цистеїновий лінкер.

Для цього тау-пептиди SEQ ID NO: 2, 4, 7 і 108 синтезували як зв'язані з цистеїном пептиди з додатковим розташуванням на N-кінці залишком цистеїну з метою досягнення орієнтованого приєднання пептиду на поверхні білка KLH. Пептиди зв'язували з носієм KLH через біфункціональний зшивальний лінкер N-[γ-малеїмідобутирилокси]сукцинімідний складний ефір (GMBS). Для одержання реакційної суміші для кон'югації, 20 мг KLH (Calbiochem) розчиняли в буфері для кон'югації (PBS з 0,9M NaCl, 10 mM EDTA) до концентрації 10 мг/мл шляхом обережного перемішування протягом 10 хвилин. Для одержання активованого малеїнімідом KLH, 2 мг активного біфункціонального зшивального лінкера GMBS розчиняли в 50 мкл безводного диметилформаміду і змішували з 2 мл розчину KLH протягом 1 години при кімнатній температурі. Потім GMBS, що не вступив в реакцію, видаляли на 5-мл колонці для знесолювання HiTrap Desalting column (GE Healthcare), зрівноважений буфером для кон'югації. Кон'югацію проводили при співвідношенні пептиду до активованого малеїнімідом KLH 1:1 (мас./мас., 20 мг пептиду) протягом 2 год. при кімнатній температурі (25 °C). Одержані кон'югати піддавали діалізу проти 100-кратного надлишку PBS з чотирма замінами буфера для діалізу, щоб видалити некон'югований пептид. Після діалізу кон'югати центрифугували при 21000×g протягом 15 хв. при 2 °C. Завершеність кон'югації підтверджували по відсутності вільного пептиду в буфері для діалізу, що визначається з використанням LC-MS/MS. Кон'югати розділяли на аліквоти і зберігали при -20 °C до застосування.

(с) Одержання вакцини. Для одержання імунізуючих доз з ад'ювантом алюміній/галун AdjuPhos (Brenntag Biosector, Данія), 200 мкг кожного відповідного кон'югата тау-пептиду (розчиненого в 150 мкл PBS) емульгували у співвідношенні 1:1 (об./об.) з ад'ювантом AdjuPhos в кінцевому об'ємі дози 300 мкл. Кожну суспензію/емульсію інкубували при обертанні при 4 °C протягом ночі, щоб дозволити пептиду адсорбуватися на частинки фосфату алюмінію.

Для одержання імунізуючих доз з повним ад'ювантом Фрейнда, 200 мкг кожного відповідного кон'югата тау-пептиду (розчиненого в 150 мкл PBS) емульгували у співвідношенні 1:1 (об./об.) з повним ад'ювантом Фрейнда в кінцевому об'ємі дози 300 мкл. Для допоміжних доз імуноген одержували аналогічним чином, але емульгували в неповному ад'юванті Фрейнда.

(d) Введення вакцини. Одержані дози вакцин ін'єктували щурам з трансгенним білком тау, що має трансген укороченого білка тау людини (лінія SHR72, описана вище в прикладі 7, експресуюча тауΔ(1-150; 392-441)/4R (Zilka et al., 2006)). Щурам проводили першу підшкірну ін'єкцію 200 мкг імуногена в кінцевому об'ємі 300 мкл у віці 2 місяці, а потім проводили другу ін'єкцію через три тижні, а потім по схемі раз на місяць. Контрольним щурам вводили ад'ювант, змішаний 1:1 з PBS. Оцінка ефективності імунотерапії описана в прикладі 19.

Виділення і очищення ембріонального білка тау щурів для застосування як внутрішнього стандарту в кількісному аналізі нерозчинного білка тау у щурів, яким вводили вакцину. Очищення ембріонального білка тау щурів проводили, по суті, як описано в Ivanovova et al., 2008, з використанням 1 % перхлорної кислоти. Тканину головного мозку, одержану від дитинчат щурів у віці 1-7 діб, гомогенізували в льодяній 1 % перхлорній кислоті (1,5 г тканини на 5 мл перхлорної кислоти, PCA) і залишали стояти на льоду протягом 20 хв. Гомогенат центрифугували при 15000×g протягом 20 хв., і прозорий супернатант концентрували і одночасно замінювали буфер на промивальний буфер (20 mM Tris, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20) з використанням пристрою Amicon Ultra Centrifugal Filter device (Millipore). Фільтровані екстракти головного мозку PCA, що містили приблизно 10 мг тотальних білків, наносили при швидкості потоку 0,2 мл/хв. на колонку Poly-Prep C10/10 (GE Healthcare), заповнену сефарозою, що містить іммобілізоване загальне mAb проти білків тау DC25 (див. вище). Білки, що не зв'язалися, змивали 10-15 мл промивальним буфером доти, поки поглинання елюйованих фракцій (при 280 нм) не ставало стабільним. Ембріональний білок тау, що зв'язався з mAb DC25, елюювали за допомогою 0,1M гліцину, pH 2,6. Елюйовані 0,5-мл фракції відразу нейтралізували 50 мкл 1M Tris-HCl, pH 9, і аналізували за допомогою SDS-PAGE. Фракції, що містили ембріональний білок тау, концентрували з використанням пристрою Amicon Ultra Centrifugal Filter device (Millipore) при одночасній заміні буфера на PBS. Ембріональний білок тау, очищений афіною хроматографією, преципітували згідно з Chen et al. (2005), шляхом додавання чотирьох об'ємів льодяного ацетону, що містив 10 % трихлороцтової кислоти. Суміш інкубували при -20 °C протягом 2 годин і центрифугували при 15000×g протягом 20 хв. при 2 °C. Супернатант видаляли і осад ресуспендували в 1 мл льодяного ацетону, залишали стояти на льоду протягом 20 хв. і знову центрифугували, як описано вище. Одержаний осад сушили при кімнатній температурі і розчиняли в об'ємі PBS, що дорівнює об'єму до преципітації.

ПРИКЛАД 19: ЗАГАЛЬНІ СПОСОБИ ОЦІНКИ ВАКЦИН НА ОСНОВІ ТАУ-ПЕПТИДІВ В МОДЕЛЯХ ХВОРОБИ АЛЬЦГЕЙМЕРА НА ТРАНСГЕННИХ ЩУРАХ

Активні вакцини оцінювали за допомогою наступних підходів: (а) біохімічно, шляхом оцінки ефекту їх введення на рівні фосфорилованих форм нерозчинного білка тау з використанням імуноблотингу зразків головного мозку щура зі специфічними до фосфорилювання моноклональними антитілами AT270, DC209, DC217 і AT8, і загальної кількості нерозчинного білка тау з використанням загального моноклонального антитіла проти білків тау DC25; (b) нейроповедінковий підхід, з використанням оцінки NeuroScale; (c) імуногістохімічно, включаючи кількісне визначення NFT; і (d) шляхом аналізу індукованої антитільної відповіді. Пасивні вакцини також можна оцінювати доклінічно за допомогою одного або декількох з цих підходів, серед інших.

(а) Біохімічний аналіз. Фракції нерозчинних білків тау одержували з використанням способу з саркозилем (Greenberg and Davies, 1990) зі стовбура головного мозку трансгенних щурів (SHR72), імунізованих досліджуваними пептидами, а також щурів SHR72 з імітуючим введенням (яким ін'єктували тільки ад'ювант (контроль)), як описано в прикладі 8. Зразки нерозчинного в саркозилі білка тау аналізували імуноблотингом з використанням різних моноклональних антитіл, як описано нижче. Результати цього аналізу імуногенних пептидів SEQ ID NO: 1-8 і 108 узагальнено представлені на фіг. 26В. Було показано, що рівні нерозчинного білка тау корелюють з прогресуванням патології білка тау у трансгенних щурів SHR72. Koson et al., 2008.

Аналіз з використанням імуноблотингу. Зразки фракцій нерозчинного в саркозилі білка тау розчиняли в 1× буфері для нанесення зразка з додецилсульфатом натрію (SDS) (Laemmli, 1970)

в 1/50 об'єму розчинної фракції (див. Filipcik et al., 2010) і нагрівали при 95 °C протягом 5 хв. 6 мкл кожного зразка наносили на поліакриламідні гелі з 5-20 % градієнтом SDS і піддавали електрофорезу в буферній системі Tris-гліцин-SDS протягом 40 хвилин при 25 мА. Білки переносили на PVDF-мембрани (1 год. при 150 мА в 10 мМ CAPS, pH 12). Після перенесення мембрани блокували в 5 % знежиреному молоці в PBS протягом 1 год. при кімнатній температурі, а потім інкубували протягом 1 год. з первинними (тау-специфічними) моноклональними антитілами (див. нижче для більш докладного опису кожного антитіла), а потім проводили три промивання великим об'ємом PBS. Після промивання використовували кон'юговане з HRP антитіло кози проти Ig миші (DAKO, Данія), розбавлене 1:4000 PBS, як вторинне антитіло. Після інкубації (1 год. при кімнатній температурі) ішло промивання (три рази) 0,2 % Igepal в PBS. Блоти виявляли за допомогою хемілюмінесцентного субстрату SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, США) і сигнал виявляли з використанням візуалізуючої системи LAS3000 (FUJI Photo Film Co., Японія). Інтенсивність сигналу кількісно визначали з використанням програмного забезпечення AIDA (Advanced Image Data Analyzer, Raytest, Straubenhardt, Німеччина). Як внутрішній стандарт для кількісного аналізу використовували ембріональний білок тау (0,6 мкг/доріжку).

Моноклональні антитіла AT8 і AT270 придбавали від Innogenetics (Бельгія) і обидва з них використовували для аналізу з використанням імуноблотингу. AT8 також використовували для імуногістохімії. AT8 розпізнає фосфорилований серин 202 і треонін 205, розташовані в багатому проліном домені білка тау, який додає основний внесок в афінність зв'язування білка тау з мікротрубочками. AT270 розпізнає фосфорилований треонін 181, розташований також в багатому проліном домені. Обидва антитіла зв'язують розчинний і нерозчинний білок тау. Специфічні до фосфорилювання моноклональні антитіла DC209 (розпізнає pT231), DC217 (розпізнає pT217), використані в цьому дослідженні, були одержані від Axon Neuroscience, GmbH (Vienna, Австрія). Загальне антитіло проти білків тау DC25 (Axon Neuroscience, GmbH) розпізнає епітоп в четвертому зв'язуючому мікротрубочки повторі на C-кінці білка тау (347-353) у всіх формах розчинного і нерозчинного білка тау. Антитіло DC25 розпізнає білки тау, незалежно від їх рівня фосфорилювання.

(b) Нейроповедінкова оцінка. Нейроповедінкові відповіді у щурів оцінювали через 10 діб після останньої дози вакцини з використанням NeuroScale, що являє собою набір поведінкових досліджень, спочатку розроблених для трансгенних щурів, експресуючих укорочений білок тау людини (Korenova et al., 2009). NeuroScale складається з сенсорно-рухових (випробування ходіння по перекладині), нервово-м'язових (випробування м'язової тяги із захопленням) і неврологічних завдань (орієнтування в просторі, випрямлення, поза, вушні раковини, здригання і рефлекс втікання у вигляді розтягнення задніх кінцівок), доповнених основними оцінками спостереження.

Загальне спостереження залучало оцінку пози і функції кінцівок; неврологічна оцінка включала основні рефлекторні відповіді, всі з яких класифікували по 1-бальній шкалі (нормальна відповідь 0; уповільнена або неповна відповідь 1 бал). Оцінку рефлексу втікання у вигляді розтягнення задніх кінцівок оцінювали по 3-бальній шкалі (нормальна відповідь 0-1; дефіцит 2-3 бали).

Для випробування ходіння по перекладині використовували три типи сегментів для проходження (3×3 см, 4×2 см, і округла перекладина діаметром 3,5 см). Максимальна кількість балів становила 10 (5 балів для затримки + 5 балів для зісковзувань задніх кінцівок на одному типі перекладини). Чим нижче показник, одержаний у випробуванні ходіння по перекладині, тим краще здатність до сенсорно-рухової координації у досліджуваних тварини. Сума балів, якої можливо було досягнути, становила 30.

Для випробування м'язової тяги із захопленням щуру дозволяли схопити передніми кінцівками горизонтальний сталевий дріт (діаметром 3 мм), підвішений на 76 см вище поверхні з м'якою оббивкою. Вимірювали період до падіння з дроту. Максимальна присвоєвана кількість балів становила 5, що відображає важке порушення нервово-м'язової функціональності і м'язову слабкість. Чим більше період до падіння, тим нижче показник, одержаний в цьому завданні, що відображає м'язову силу передніх кінцівок і рухливість досліджуваних тварини.

Показник NeuroScale обчислювали з показників, одержаних в індивідуальних дослідженнях. Максимальний можливий загальний показник становив 49 балів при підсумовуванні внеску оцінки спостереження, неврологічного дослідження, трьох серій випробування ходіння по перекладині і випробування м'язової тяги із захопленням. Чим важче нейроповедінкове порушення, тим вище показник NeuroScale.

(c) Імуногістохімія. Для збирання зразків головного мозку щурів піддавали транскардіальній перфузії PBS протягом 2 хвилин під глибоким наркозом. Після перфузії головний мозок щурів

витягували і розрізали подовжньо на дві рівних по розміру півкулі. Стівбур головного мозку і мозочок правої півкулі витягували для біохімічних аналізів. Ліву півкулю фіксували 4 % параформальдегідом протягом ночі при 4 °C, а потім проводили обробку 25 % сахарозою протягом 48 годин для забезпечення кріопротекції. Потім матеріал заморожували в холодному 2-метилбутані (-42 °C) протягом 30 с і нарізали на зрізи на кріомікротомі. Подовжні зрізи (40 мкм) нарізали в кріостаті при -18 °C. Для імуногістохімічних досліджень використовували вільноплаваючі зрізи.

Імуногістохімічне забарвлення проводили на заморожених зрізах головного мозку щурів, яким проводили введення, і контрольних щурів. Koson et al., 2008, показали, що кількість NFT в головному мозку трансгенних щурів SHR72 корелює з часом смерті тварин (тобто, чим більше NFT, тим раніше смерть тварини). Для аналізу нейрофібрилярних змін в головному мозку щурів одержували подовжні зрізи головного мозку. Вільноплаваючі зрізи тканин обробляли холодною (+4 °C) 80 % мурашиною кислотою протягом 30 с при кімнатній температурі (25 °C). Зрізи головного мозку інкубували протягом 20 хвилин при кімнатній температурі в PBS, що містив 0,3 % Triton X-100 і 1 % H₂O₂, а потім проводили інкубацію протягом 30 хвилин в блокувальному розчині (PBS, що містить 0,3 % Triton X-100, 1 % сироватка коня), а потім проводили інкубацію протягом ночі при 4 °C або з очищеним антитілом AT8 (0,2 г/мл в блокувальному буфері), або з супернатантом культури гібридами DC217 (1:100 в блокувальному буфері). Обидва антитіла продемонстрували схожий профіль імунного забарвлення в стівбурі головного мозку трансгенних щурів. Після промивання зрізи піддавали імунному забарвленню з використанням стандартного способу з авідин-біотином-пероксидазою (ABC Elite, Vector laboratories, Burlingame, CA). Продукт реакції візуалізували з використанням системи авідин-біотин і Vector VIP як хромогена (Vector laboratories). Потім зрізи досліджували за допомогою мікроскопа Olympus BX51.

(d) Антитільна відповідь. Перед початком дослідження (тобто перед першою ін'єкцією) і через два тижні після останньої ін'єкції у трансгенних щурів проводили взяття крові. Антитільну відповідь на введений імуноген/вакцину визначали за допомогою ELISA з використанням серійно розведених зразків плазми. Пептидними імуногенами, рекомбінантним білком тауΔ(1-150; 392-441)/4R і рекомбінантною повнорозмірною ізоформою білка тау 2N4R по окремість покривали 96-ямкові планшети (IWAKI, Японія) в концентрації 10 мкг/мл в PBS протягом ночі при 37 °C. Після блокування 1 % знежиреним сухим молоком в PBS планшети промивали PBS-0,05 % Tween 20 і інкубували з 50 мкл/ямку серійних розведень плазми (1:200-1:128000 в блокувальному буфері) протягом 1 год. при 37 °C. Після інкубації і промивання кон'юговане з пероксидазою вторинне антитіло (антитіло кролика проти Ig щура, DAKO, Данія) розбавляли 1:1000 і наносили в ямки (50 мкл/ямку) протягом 1 год. при 37 °C. Реакцію виявляли за допомогою о-фенілєндіаміну в розчині субстрату пероксидази (0,1M фосфатний буфер) і зупиняли 50 мкл 2M H₂SO₄. Поглинання при 492 нм вимірювали з використанням пристрою для зчитування Multiscan MCC/340 ELISA (Labsystems). Дані поглинання, які щонайменше в два рази перевищують величину негативних контролів, вважали позитивними.

Вимірювання афінності проводили з використанням SPR, як описано вище в прикладі 5. В короткому викладі, експерименти проводили при 25 °C в фосфатно-сольовому буфері, pH 7,4, з 0,005 % P20 (PBS-P) як рухомим буфером. 3000 ОВ (одиниць відповіді) поліклонального антитіла проти антитіл миші (№ Z 0420; DakoCytomation, Glostrup, Данія) зв'язували в концентрації 5 мкг/мл (одержаній шляхом розведення в 40 разів вихідного розчину 200 мкг/мл 0,5× PBS в 10 mM натрій-ацетатному буфері, pH 4,5) через первинні аміни, одночасно з двома проточними комірками, одну з яких використовували при вимірюванні як еталон. У кожному циклі аналізу розбавлену в 1000 разів сироватку іммобілізували в аналітичній проточній комірці для досягнення рівня іммобілізації ~850 ОВ, який наближався до насичення. Для визначень K_d, а також для визначення кінетичних констант швидкості, 100 нМ розчину імуногенних тау-пептидів або білків тау інжектували зі швидкістю потоку 100 мкл/хв. на сенсорний чип. Інжекцію PBS-P використовували для віднімання фонового сигналу в методиці подвійного порівняння з еталоном (Myszka, J. Mol. Rec., 1999). Кінетичні дані апроксимували за допомогою програмного забезпечення для оцінки BIA evaluation software 4.1 (Biacore AB) до моделі реакції 1:1. Кінетичні константи швидкості піддавали глобальній апроксимації, максимальні відповіді апроксимували локально, і сукупна відповідь була встановлена на нуль.

ПРИКЛАД 20: ВАКЦИНИ НА ОСНОВІ ТАУ-ПЕПТИДІВ, ЯКІ МІСТЯТЬ ЩОНАЙМЕНШЕ ОДНУ З ЧОТИРЬОХ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ ТЕРАПЕВТИЧНИХ ЕПІТОПІВ, МАЮТЬ СПРИЯТЛИВІ ЕФЕКТИ У ТРАНСГЕННИХ ЩУРІВ, ЯКІ Є МОДЕЛЛЮ ХВОРОБИ АЛЬЦГЕЙМЕРА У ЛЮДИНИ

(a) SEQ ID NO: 1, тау 251-PDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINK-280. Трансгенних щурів (SHR72) імунізували тау-пептидом SEQ ID NO: 1, складеним з ад'ювантом AdjuPhos.

Перетворення білка тау з розчинних в нерозчинні в саркозилі патологічні форми вважають важливою стадією розвитку пов'язаної з білком тау патології і, мабуть, воно залежить від декількох факторів, таких як концентрація білка тау, укорочення білка тау і міра фосфорилювання білка тау (Alonso et al. 2001; Koson et al. 2008; Kovacech and Novak 2010).

Результати кількісного аналізу з використанням імуноблотингу нерозчинного білка тау в нерозчинних в саркозилі фракціях головного мозку, одержаних від групи щурів, імунізованих тау-пептидом SEQ ID NO: 1, і від контрольної групи, представлені на фіг. 26С. Вакцинація зменшувала кількість нерозчинного білка тау у щурів, імунізованих тау251-280 (SEQ ID NO: 1), в порівнянні з контрольними щурами, яким вводили тільки ад'ювант (фіг. 26С). Це зниження спостерігали як для загальних рівнів нерозчинного білка тау (при оцінці за допомогою загального антитіла проти білків тау DC25, що розпізнає залишки 347-353), так і для всіх інших досліджуваних епітопів білка тау, що мають значення при AD (замісні маркери AD), представлених на фіг. 26В і 26С і відомих тим, що вони присутні в нерозчинних в саркозилі фракціях. Дійсно, імунізація тау-пептидом SEQ ID NO: 1 індукувала статистично значуще ($p < 0,001$) зниження рівня нерозчинного білка тау, яке спостерігали на рівні загального нерозчинного білка тау (71 %) з використанням загального моноклонального антитіла проти білків тау DC25 (фіг. 26 В, С). Аналіз за допомогою DC217 (pThr217), AT270 (pThr181), показав тенденцію в напрямі зниження рівнів фосфорилювання Thr217 (42 %) і pThr181 (58 %) нерозчинного білка тау у імунізованих щурів в порівнянні з контрольними щурами. Більш слабкий ефект введення (11 %) спостерігали для фосфоепітопа pThr231 нерозчинного білка тау (фіг. 26В). Ці результати вказують на те, що вакцина активувала механізм, відповідальний за інгібування агрегації білка тау, і/або механізм, залучений до зниження рівнів білків тау, схильних до взаємодії тау-тау.

Для щурів, яким вводили імуноген у вигляді тау-пептиду SEQ ID NO: 1, було продемонстроване статистично значуще зниження латентності виходу у випробуванні ходіння по перекладині ($*p = 0,045$) в порівнянні з контрольними щурами (фіг. 27А). Аналогічно, число зісковзувань задніх кінцівок було знижене у вакцинованій групі в порівнянні з контролями; однак ця відмінність була статистично малозначимою ($p = 0,059$, фіг. 27В). Показник NeuroScale (описаний в прикладі 19, вище) обчислювали з величин, одержаних у випробуваннях ходіння по перекладині, випробуваннях м'язової тяги із захопленням і неврологічній оцінці (основні рефлекси, рефлекс втікання у вигляді розтягнення задніх кінцівок). Імунізація поліпшувала показник NeuroScale у щурів, яким вводили пептид SEQ ID NO: 1, в порівнянні з контрольною групою, однак це поліпшення не було статистично значущим ($p = 0,065$, фіг. 27С). Загальний показник NeuroScale підтвердив нейроповедінкове поліпшення у щурів, яким проводили введення, в порівнянні зі щурами без введення. Всі статистичні дані одержували з використанням непараметричного U-критерію Манна-Уїтні.

Нейроповедінкові параметри корелювали з рівнями нерозчинного білка тау в стовбурі головного мозку. Щури, яким проводили введення, з низькими рівнями нерозчинного білка тау, продемонстрували більш низьку латентність виходу і зісковзування задніх кінцівок в порівнянні з контролями. Ці дані вказують на те, що зниження рівня високонерозчинного неправильно згорненого білка тау приводить до функціонального поліпшення у імунізованих щурів, що може мати терапевтичну цінність. Імунотерапія тау-пептидом SEQ ID NO: 1 привела до поліпшення нейроповедінкових параметрів у щурів, яким проводили введення. Цей ефект супроводжувався зниженням рівнів нерозчинного білка тау в головному мозку імунізованих щурів. Ці дані вказують на те, що зниження рівнів нерозчинних білків тау має терапевтичну користь.

Ефективність імунотерапії тау-пептидом SEQ ID NO: 1 далі досліджували на імуногістохімічному рівні (фіг. 28). Нейрофібрилярні вузлики (NFT) аналізували з використанням антитіла проти білка тау AT8, DC217, які розпізнають фосфорилювані епітопи на патологічному білку тау, в стовбурі головного мозку трансгенних щурів SHR72, яким проводили введення, і контрольних трансгенних щурів SHR72 з імітуючим введенням, яким вводили тільки ад'ювант/PBS. Кількість NFT визначали з використанням напівкількісного способу. Було призначено три кількісних рівні: 1) немає або мало нейрофібрилярних вузликів (аж до 3 в стовбурі головного мозку); 2) помірний (багато NFT, в основному в ретикулярній формації стовбура головного мозку); і 3) важкий (багато NFT у всіх областях стовбура головного мозку). "Великий" означає стадію від помірної до важкої нейрофібрилярної нейродегенерації. Імуногістохімічний аналіз показав 50 % зниження навантаження нейрофібрилярними вузликами в групі трансгенних тварин, яким вводили вакцину.

Зниження рівнів нерозчинного білка тау, виміряних біохімічно, корелювало з результатами імуногістохімічного аналізу. Дані про імунізацію SEQ ID NO: 1 демонструють лікувальну здатність цього пептиду, що містить епітоп № 1 DC8E8.

(b) SEQ ID NO: 2, тау 256-VKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLS-285. Трансгенних щурів (SHR72) імунізували тау-пептидом SEQ ID NO: 2, кон'югованим з носієм KLH (як описано вище).

Аналіз з використанням імуноблотингу показав, що вакцина знижувала кількість нерозчинного білка тау у імунізованих щурів в порівнянні з контрольними щурами, яким вводили тільки ад'ювант. На фіг. 29 показане зниження всіх підданих моніторингу епітопів, присутніх в нерозчинному/агрегованому білку тау. Кількісний аналіз імунореактивності загального антитіла проти білків тау DC25 продемонстрував 41 % зниження рівня нерозчинного білка тау (статистично значуще, $p < 0,001$) у імунізованих щурів в порівнянні з контрольними щурами, яким вводили тільки ад'ювант (фіг. 26B). Аналогічно, імунореактивність інших антитіл, що розпізнають фосфориловані специфічні до AD епітопи на нерозчинному білку тау, була знижена (фіг. 26B і фіг. 29). Крім цього, введення не надавало впливу на рівень іншого фосфоепітопа білка тау, який був сформований двома фосфозалишками Ser202/Thr205 і який, як відомо, є маркером патології AD. Вакцина індукувала 80 % зниження рівня цього епітопа у імунізованих трансгенних щурів в порівнянні зі щурами, яким не проводили введення. Аналогічно, рівні фосфорилованих епітопів білка тау Thr217, Thr231 і Thr181, були знижені на 72 % ($p < 0,001$), 64 % і 74 % ($p < 0,01$), відповідно. Ці результати вказують на те, що вакцина індукувала механізм, відповідальний за інгібування агрегації білка тау, і/або механізм, що знижує рівні типів білка тау, схильних до патологічної взаємодії тау-тау.

Щурів піддавали поведінковим аналізам, і на фіг. 30 представлені результати, одержані у випробуванні ходіння по перекладині (фіг. 30A), випробуванні зісковзування задніх кінцівок (фіг. 30B) і в аналізі NeuroScale (фіг. 30C, $*p = 0,05$). Спостерігали позитивну тенденцію відносно латентності виходу при ходінні по перекладині ($p = 0,096$) в групі щурів, яким вводили тау-пептид SEQ ID NO: 2. Імунізація знижувала число зісковзувань задніх кінцівок у випробуванні ходіння по перекладині; однак відмінність не була статистично значущою ($p = 0,25$) в порівнянні з контрольною групою. Випробування рухових порушень разом з випробуванням м'язової тяги із захопленням і неврологічним дослідженням були узагальнені в показник NeuroScale. На фіг. 30 представлене статистично значуще поліпшення показника NeuroScale у щурів, яким вводили тау-пептид SEQ ID NO: 2, в порівнянні з контрольною групою ($*p = 0,036$). Як правило, імунізація тау-пептидом SEQ ID NO: 2 поліпшувала загальну рухову активність. Поліпшення на нейроповедінковому рівні корелювало зі зниженням кількості нерозчинного білка тау (матричний білок тау при AD) у імунізованих тварин в порівнянні з контролем. Ці дані вказують на те, що зниження рівнів нерозчинного білка тау може мати терапевтичну користь.

Ефективність імунотерапії тау-пептидом SEQ ID NO: 2 далі досліджували на імуногістохімічному рівні (фіг. 31). Для цієї мети використовували два різних антитіла проти білка тау (AT8, DC217), які розпізнають як фосфорилований розчинний, так і нерозчинний білок тау. Нейрофібрилярна патологія у цих щурів (SHR72) локалізується в основному в стовбурі мозку і в спинному мозку і частково в мозочку (дані не представлені). Кількість NFT визначали з використанням напівкількісного способу. Було призначено три кількісних рівні: 1) немає або мало нейрофібрилярних вузликів (аж до 3 в стовбурі головного мозку); 2) помірний (багато NFT, в основному в ретикулярній формації стовбура головного мозку); і 3) важкий (багато NFT у всіх областях стовбура головного мозку). "Великий" означає стадію від помірної до важкої нейрофібрилярної нейродегенерації. Імуноterapia пептидом SEQ ID NO: 2 знижувала кількість трансгенних щурів з великими NFT в стовбурі головного мозку практично на 60 % (фіг. 31).

Ці результати демонструють, що вакцинація тау-пептидом SEQ ID NO: 2 демонструє декілька бажаних результатів для вакцини: 1) зниження рівня нерозчинного білка тау в головному мозку імунізованих трансгенних щурів на біохімічному рівні; 2) пом'якшення сенсорно-рухових дефіцитів у імунізованих трансгенних щурів на поведінковому рівні; і 3) зменшення кількостей нейрофібрилярних осередків на імуногістохімічному рівні.

(c) SEQ ID NO: 2, тау 256-VKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLS-285 з фосфорилованим Ser262. SEQ ID NO: 2, що містить фосфорилований серин в положенні 262, кон'югували з KLH.

Імуноблотинг фракцій нерозчинного в саркозилі білка тау в головному мозку щура за допомогою антитіла DC25 показав, що вакцина статистично значущо знижувала загальну кількість нерозчинного білка тау на 46 % ($p < 0,01$) у імунізованих тварин в порівнянні з контрольними трансгенними щурами, яким вводили ад'ювант окремо (фіг. 32 і фіг. 26B, вимірювання на основі DC25 (дані "347-353")). Аналогічно, кількісне визначення сигналів DC209 (pThr231), DC217 (pThr217), AT8 (pSer202, pThr205) і AT270 (pT181) продемонструвало більш низькі рівні нерозчинного фосфорилизованого білка тау в імунізованій групі тварин в порівнянні з контролем (фіг. 26B). Однак зниження рівнів фосфорилизованого нерозчинного білка тау в положеннях pThr217 ($p < 0,001$; 73 %), pThr231 (84 %), pSer202/pThr205 (82 %) і pThr181 ($p < 0,01$; 82 %) було більш вираженим, ніж зниження, спостережуване для загального нерозчинного білка

тау. Ці зміни рівнів фосфоепітопів, залучених до каскаду неправильного згортання білка тау при AD, є корисним індикатором ефекту лікування. Зниження епітопів білка тау, що мають значення при AD, демонструє, що вакцина активувала механізм, відповідальний за інгібування агрегації білка тау, і/або механізм, що знижує рівні білка тау, схильного до патологічних взаємодій з ендogenousним білком тау.

Імуногістохімічний профіль (фіг. 33) демонструє, що імунотерапія фосфопептидом SEQ ID NO: 2 привела до зниження кількості трансгенних щурів з великим NFT в стовбурі головного мозку. У імунізованій групі спостерігали 78 % зниження кількості трансгенних щурів з великим NFT, в порівнянні з контрольною неімунізованою групою. Імунізація зупиняла розвиток патології білка тау в головному мозку імунізованих тварин. Схожий ефект був одержаний на біохімічному рівні, зі зниженням рівнів нерозчинного білка тау на основі проаналізованих епітопів, що мають значення при AD (фіг. 26B і 32).

Ці результати демонструють, що вакцинація тау-фосфопептидом SEQ ID NO: 2/pSer262 викликала: 1) зниження рівня нерозчинного білка тау в головному мозку імунізованих трансгенних щурів на біохімічному рівні; і 2) позитивний ефект введення на ряд нейрофібрилярних осередків на імуногістохімічному рівні.

(d) SEQ ID NO: 3, тау 259-KIGSTENLKHQPGGGKQIINKKLDLSNVQ-288. Трансгенних щурів (лінія SHR72) імунізували тау-пептидом SEQ ID NO: 3, складеним з ад'ювантом на основі галуну (AdjuPhos).

На фіг. 34 показано, що імунотерапія знижує рівень нерозчинного білка тау у імунізованих щурів в порівнянні з контрольними щурами, яким вводили ад'ювант. Зниження рівня нерозчинного білка тау було виявлене для всіх проаналізованих епітопів білка тау (тобто для антитіла 347-353/DC25, антитіла pT217/DC217, антитіла pT231/DC209, антитіла pS202/pT205/AT8 і антитіла pT181/AT270). Рівень загального нерозчинного білка тау був знижений на 40 %, як було виявлено за допомогою імунологічного аналізу за допомогою загального антитіла проти білків тау DC25. Аналогічно, вакцина індукувала 30 % зниження рівня білка тау, фосфорилованого по pT217, як показано на фіг. 26B і фіг. 34. Введення мало більший ефект на рівні нерозчинних форм білка тау, фосфорилованих в положеннях Thr231 (63 %), Thr181 (74 %) і Ser202/Thr205 (61 %), у імунізованих щурів в порівнянні з неімунізованими щурами (фіг. 26B і 34). Ці дані демонструють, що зниження рівня нерозчинного білка тау може приводити до додаткових змін рівнів білків тау, що приводять до патології, і, таким чином, може мати терапевтичне значення. Зниження епітопів білка тау, що мають значення при AD, демонструє, що вакцина активувала механізм, відповідальний за інгібування агрегації білка тау, і/або механізм, що знижує рівні білка тау, схильного до патологічних взаємодій з ендogenousним білком тау.

На фіг. 35A-C представлені результати, одержані шляхом нейроповедінкової оцінки. У групі щурів, яким вводили пептид SEQ ID NO: 3, спостерігали позитивну латентність виходу при ходінні по перекладині; однак без статистично значущої відмінності між щурами, яким вводили пептид, і щурами, яким не проводили введення/вводили контроль (фіг. 35A; $p=0,21$). Аналогічно, введення приводило до зниження числа зісковзувань задніх кінцівок в групі імунізованих щурів в порівнянні зі щурами без введення, однак цей ефект не був статистично значущим (фіг. 35B, $p=0,15$). Загальний показник NeuroScale підтвердив нейроповедінкове поліпшення у щурів, яким вводили тау-пептид SEQ ID NO: 3, в порівнянні зі щурами без введення ($p=0,11$ в обох випадках). Однак відмінність в показниках NeuroScale не була статистично значущою ($p=0,19$). Імунотерапія тау-пептидом SEQ ID NO: 3 приводила до кращої сенсорно-рухової координації щурів, яким проводили введення, в порівнянні з контрольними щурами, у випробуванні ходіння по перекладині, а також у випробуванні зісковзувань задніх кінцівок; ці результати були підтверджені показником NeuroScale.

Більше того, імуногістохімічний профіль показав, що імунотерапія фосфопептидом SEQ ID NO: 3 привела до 58 % зниження NFT в стовбурі головного мозку тварин, яким вводили вакцину (фіг. 36). Ці результати демонструють, що імунізація SEQ ID NO: 3, що містить епітоп № 1 DC8E8, значно знижувала рівень патологічного полімерного білка тау, що збирається в NFT. Більше того, цей позитивний ефект введення також був показаний на біохімічному рівні, який відображає статистично значуще зниження рівня нерозчинного патологічного білка тау.

(e) SEQ ID NO: 4, тау 275-VQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGG-304. Пептид SEQ ID NO: 4 кон'югували з KLH і використовували для імунізації ад'ювантом на основі галуну (AdjuPhos).

На фіг. 37 і 26B показано, що імунотерапія за допомогою SEQ ID NO: 4 приводить до зниження кількості нерозчинного білка тау у імунізованих щурів в порівнянні з контрольними щурами, яким вводили ад'ювант окремо. Дані показують, що зниження рівня нерозчинного білка тау було виявлене для всіх проаналізованих епітопів білка тау. Загальні рівні нерозчинного

білка тау були знижені на 63 %, як було виявлено по імунореактивності за допомогою загального антитіла проти білків тау DC25. Аналогічно, вакцина індукувала зниження рівня білка тау, фосфорилованого в положеннях pThr217 (92 %), Thr231 (95 %), Thr181 (87 %) і Ser202/Thr205 (95 %), як показано на фіг. 26B. Раніше було показано, що рівень нерозчинного білка тау корелює з прогресуванням патології білка тау (Zilka et al., 2006). Дані результати показують, що імунотерапія, направлена на терапевтичний епітоп білка тау, що міститься в SEQ ID NO: 99, може знижувати рівні нерозчинного білка тау і уповільнювати прогресування патології білка тау.

Комплексну рухову недостатність визначали за допомогою стандартних рухових випробувань в комбінації з неврологічною оцінкою в складеному показнику - NeuroScale. У віці 6,5 місяця трансгенних щурів SHR72, яким вводили тау-пептид SEQ ID NO: 4, піддавали поведінковим випробуванням з метою визначення ефекту цієї імунотерапії. Щури, яким вводили імунотен у вигляді тау-пептиду SEQ ID NO: 4, продемонстрували зниження латентності порятунку у випробуванні ходіння по перекладині, в порівнянні з трансгенними щурами, яким вводили тільки ад'ювант (контролі) (фіг. 38A). Аналогічно, у вакцинованій групі спостерігали позитивні результати для числа зісковзувань задніх кінцівок в порівнянні з трансгенними щурами з контрольним введенням (фіг. 38B). Загальний показник NeuroScale обчислювали, виходячи з даних, одержаних у випробуваннях ходіння по перекладині, випробуваннях м'язової тяги із захопленням і при неврологічній оцінці (основні рефлекс, рефлекс втікання у вигляді розтягнення задніх кінцівок). Імунізація поліпшила показник NeuroScale у щурів, яким вводили пептид SEQ ID NO: 4, в порівнянні з контрольною групою введення (фіг. 38C). Загальний показник NeuroScale підтвердив нейроповедінкове поліпшення у трансгенних щурів, яким проводили введення, в порівнянні з трансгенними щурами, яким не проводили введення.

Ефективність імунотерапії тау-пептидом SEQ ID NO: 4 далі досліджували на імунгістохімічному рівні (фіг. 39). Нейрофібрилярні вузлики (NFT) аналізували з використанням антитіла проти білка тау AT8 і DC217, які розпізнають фосфориловані епітопи на патологічному білку тау, в стовбурі головного мозку щурів SHR72, яким вводили вакцину і яким вводили ад'ювант (контроль). Тканина головного мозку тварин, яким вводили тільки ад'ювант, містила позитивні по AT8 і DC217 NFT у всіх областях стовбура головного мозку і, головним чином, в ретикулярній формації стовбура головного мозку. Імунгістохімічний аналіз показав 66 % зниження нейрофібрилярної патології у трансгенних щурів SHR72, яким вводили вакцину (фіг. 39).

Зміни рівнів нерозчинного білка тау в стовбурі головного мозку трансгенної лінії щурів SHR72 є чутливим показником ефекту лікування. Як рівні нерозчинного загального білка тау, так і рівні фосфорилованого білка тау (патологічні мономери, димери, олігомери і полімери) ефективно знижувалися в стовбурі головного мозку при введенні тау-пептиду SEQ ID NO: 4 (63-95 % зниження; фіг. 26B). Зниження рівнів нерозчинного білка тау, виміряних біохімічно, корелювало з результатами, одержаними в імунгістохімічному аналізі. Цей аналіз показав більше ніж 60 % зниження нейрофібрилярної патології в стовбурі головного мозку трансгенних щурів, яким вводили вакцину (фіг. 38). Дані імунізації за допомогою SEQ ID NO: 4 демонструють лікувальну здатність цього пептиду, що містить епітоп № 2 DC8E8.

(f) SEQ ID NO: 5, тау 201-GSPGTPGSRRTPLTPPTREPCKVAVVR-230, що містить фосфорилований треонін в положенні 217. Тау-пептид SEQ ID NO: 5, фосфорилований в положенні треоніну 217, вводили трансгенним щурам SHR72 з використанням ад'юванту на основі галуни (AdjuPhos).

Аналіз з використанням імуноблотингу показав, що імунізація фосфопептидом SEQ ID NO: 5 не впливає на кількість загального нерозчинного білка тау (виявленого за допомогою антитіла DC25) в порівнянні з контрольними Tg-щурами, якими вводили ад'ювант окремо (фіг. 40 і 26B). Однак аналіз за допомогою антитіла DC209 і AT270 показав приблизно 30 % зниження рівнів білка фосфо-тау pThr231 і pThr181 у фракції нерозчинного білка тау (фіг. 26B). З іншого боку, введення індукувало помірне збільшення рівня нерозчинного білка тау, фосфорилованого в положенні треоніну 217 (11 % збільшення), і білка тау, що містить фосфориловані ділянки Ser202/Thr205 (31 % збільшення) в порівнянні з контрольними трансгенними щурами. Ці дані вказують на неоднозначний або нейтральний ефект вакцини при імунізації фосфопептидом SEQ ID NO: 5 на оцінювані маркери, що мають значення при AD, причому цей пептид не охоплює ніякої агрегації епітопів #1-4 білка тау, ідентифікованих вище (приклад 1-11), як терапевтичних епітопів.

Нейроповедінковий аналіз щурів, яким вводили фосфорилований тау-пептид SEQ ID NO: 5, продемонстрував, що відбувалося значуще поліпшення нейроповедінкових функцій в групі, в якій проводили введення, у випробуванні ходіння по перекладині (фіг. 41A, $p=0,19$) або в числі

зісковзувань задніх кінцівок в порівнянні з контрольною групою (фіг. 41B). Загальний показник NeuroScale (фіг. 41C) не підтвердив нейроповедінкового поліпшення у щурів, яким проводили введення, в порівнянні зі щурами з імітуючою імунізацією ($p=0,28$).

5 Імунотерапія тау-фосфопептидом SEQ ID NO: 5 не знижувала кількість трансгенних щурів (SHR72) з великими NFT в стовбурі головного мозку в порівнянні з контрольними щурами за допомогою імуногістохімії (фіг. 42).

Ці результати демонструють, що вакцинація тау-пептидом SEQ ID NO: 5 pT217, який позбавлений всіх з терапевтичних епітопів (SEQ NO: 98-101), не приводить до статистично значущого поліпшення нейроповедінкової функції, а тільки до 11 % зниження кількості нейрофібрилярних осередків приблизно на імуногістохімічному рівні. Не було виявлено ефекту на біохімічний рівень відносно зниження нерозчинного білка тау при оцінці за допомогою антитіла DC25.

10 (g) SEQ ID NO: 6, тау 379-RENAKAKTDHGAEIVYKSPVVS GDTSPRHL-408, що містить фосфорилованні залишки серину в положенні 396 і 404. Тау-пептид, фосфорилований в положенні 396 і 404, вводили SHR72 з використанням ад'юванту на основі галуну (AdjuPhos). SEQ ID NO: 6/pS396/pS404 позбавлений яких-небудь терапевтичних епітопів, відповідних SEQ NO: 98-101, але містить фосфоепітоп, надмірно присутній в білках тау в головному мозку при AD (Greenberg et al. 1992; Otvos et al. 1994).

На протилежність зниженню кількості нерозчинного в саркозилі білка тау, що спостерігається для пептидів SEQ ID NO: 1-4, імунізація фосфорилованим пептидом SEQ ID NO: 6 привела до збільшення кількості нерозчинного білка тау у імунізованих щурів в порівнянні з контрольними щурами, яким вводили тільки ад'ювант. Аналіз з використанням імуноблотингу показав тенденцію в напрямі загального збільшення рівнів нерозчинного білка фосфо-тау (фіг. 43 і фіг. 26B). Імунізація привела до збільшення загальних рівнів білка тау у фракції нерозчинного білка тау, як виявлено за допомогою загального mAb проти білків тау DC25. Збільшення також спостерігали для епітопів білка тау pT217 (33 % збільшення), Thr231 (44 % збільшення) і Thr181 (7 % збільшення). Однак епітоп pS202/pT205, що має значення при AD, був виключенням (фіг. 26B). Рівень білка тау, що містить цей фосфоепітоп, був знижений на 19 % в порівнянні з контрольними щурами. Збільшені рівні патологічного нерозчинного білка тау, що має значення для множини захворювань, вказують на небажаний негативний ефект цієї вакцини у щурів.

Оцінювали нейроповедінкову відповідь у щурів, яким вводили тау-пептид SEQ ID NO: 6/pS396/pS404, і контрольних щурів (фіг. 44A, B і C). Імунотерапія продемонструвала відсутність статистично значущих відмінностей між щурами, яким проводили введення, і контрольними щурами в латентності виходу при ходінні по перекладині ($p=0,82$) або в числі зісковзувань задніх кінцівок ($p=0,75$). Ці результати були підтверджені за допомогою показника NeuroScale ($p=0,96$), для якого не було виявлено статистично значущих відмінностей в загальних нейроповедінкових характеристиках між імунізованими і контрольними щурами. Таким чином, введення пептиду SEQ ID NO: 6/pS396/pS404 не мало статистично значущого впливу на латентність виходу у випробуванні ходіння по перекладині або в числі зісковзувань задніх кінцівок, або в загальній руховій активності досліджуваних щурів.

На фіг. 45 показаний процент трансгенних щурів з великою патологією білка тау, оцінюваною шляхом імуногістохімії з AT8. Імунотерапія тау-пептидом SEQ ID NO: 6/pS396/pS404 збільшувала навантаження вузликами на 9 % відносно контрольної групи. Таким чином, негативний ефект SEQ ID NO: 6/pS396/pS404 на імуногістохімічному рівні був підтверджений на біохімічному і нейроповедінковому рівнях.

Ці результати показують, що вакцинація тау-фосфопептидом SEQ ID NO: 6/pS396/pS404, який позбавлений якого-небудь з терапевтичних епітопів білка тау, представленого в SEQ ID NO: 98-101, демонструє: 1) відсутність терапевтичного ефекту на нерозчинний білок тау в головному мозку імунізованих щурів; 2) відсутність ефекту на поведінковому рівні; і 3) відсутність зниження, а замість цього 9 % збільшення навантаження вузликами. Таким чином, цей фосфоепітоп, який був описаний як специфічний для AD (Greenberg et al. 1992; Otvos et al. 1994), не індукував терапевтичного ефекту.

55 (h) SEQ ID NO: 7, тау 181-TPSSGEPKSGDRSGYSSPGSGTPGSRS-210, що містить фосфорилований залишок серину в положенні 202 і фосфорилований залишок треоніну в положенні 205. Одержаний тау-пептид SEQ ID NO: 7/pS202/pT205 позбавлений якого-небудь з терапевтичних епітопів, присутніх в SEQ ID NO: 98-101. Фосфопептид кон'югували з KLH і вводили трансгенним щурам (лінія SHR72) в ад'юванті Фрейнда.

60 Кількісний аналіз імунореактивності білка тау в стовбурі головного мозку за допомогою імуноблотингу не продемонстрував ніякого терапевтичного ефекту (фіг. 46). Рівні загального

білка тау (епітоп DC25, 6 % збільшення) і білків тау, фосфорилованих по епітопах білка тау, що мають значення для захворювання, pT217 (3 % збільшення), Thr231 (11 % збільшення) і Thr181 (7 % збільшення), були трохи збільшені у імунізованих щурів в порівнянні з контролями (фіг. 46 і 26B). Імунізація індукувала більш високе збільшення рівня нерозчинного білка тау, фосфорилизованого в положенні Ser202/Thr205 (41 % збільшення).

Імунотерапія фосфорилованим пептидом SEQ ID NO: 7 не впливала значно на сенсорно-рухову функцію щурів (фіг. 47). Імунізовані щури продемонстрували помітне поліпшення нейроповедінкових параметрів в порівнянні з контролями. Однак групи статистично не відрізнялися, оскільки не було виявлено статистично значущих відмінностей між щурами, яким проводили введення, і контролями в латентності виходу при ходінні по перекладині ($p=0,47$, фіг. 47A), а також в кількості зісковзувань задніх кінцівок ($p=0,54$, фіг. 47B) і показнику NeuroScale ($p=0,3$, фіг. 47C).

Пептид SEQ ID NO: 7 містить фосфорилований епітоп білка тау, який не містить ніякий з епітопів DC8E8. Дослідження стовбура головного мозку щурів SHR72, яким проводили введення, показало, що імунотерапія тау-пептидом SEQ ID NO: 7 не була здатна знизити навантаження нейрофібрилярними вузликами (фіг. 48). Тканина головного мозку від вакцинованих і контрольних тварин містила практично ідентичні кількості позитивних по AT8 і DC217 NFT у всіх областях стовбура головного мозку, а саме в ретикулярній формації. Вакцина, що містить SEQ ID NO: 7, позбавлений епітопів DC8E8, не продемонструвала ніякого сприятливого ефекту на тваринах, яким проводили введення.

Ці результати демонструють, що вакцинація тау-фосфопептидом SEQ ID NO: 7/pS202/pT205 викликає: 1) відсутність зміни рівнів нерозчинного білка тау в головному мозку імунізованих щурів на біохімічному рівні; і 2) відсутність ефекту на поведінковому рівні. Цей фосфопептид забезпечує додаткові докази того, що фосфорилованні ділянки, відповідні pS202/pThr205, не є достатніми для індукції імунної реакції, що усуває патологічні білки тау і/або позитивно впливає на нейроповедінковий статус щурів. Навпаки, терапевтичні епітопи білка тау (SEQ ID NO: 98-101) досягають цього ефекту.

(i) SEQ ID NO: 8, тау-300-VPGGGSVQIVYKPVDSLK-317. Імунотерапію більш коротким тау-пептидом, який використовували як контроль, оскільки він не містить ні повного 6-мера білка тау, в якому може знаходитися один з чотирьох "терапевтичних епітопів" білка тау, ні фосфорилованого епітопа, проводили для визначення її здатності впливати на рівні патологічного нерозчинного білка тау і нейрофібрилярних відкладень в головному мозку. Рівень загального нерозчинного білка тау, виявлений за допомогою загального mAb проти білків тау DC25, був значно збільшений (82 %) у імунізованих щурів в порівнянні з контролями, яким вводили тільки ад'ювант (фіг. 49 і 26B). Аналогічно, імунотерапія індукувала збільшення рівнів нерозчинного білка тау, фосфорилованого в положенні T231 (60 %), і схоже збільшення рівнів нерозчинного білка тау, фосфорилованого в положенні T181 (10 %). Кількісний аналіз з різним набором антитіл: DC217 (pT217) і AT8 (pS202/pT205) не виявив ніякого ефекту на ці епітопи в нерозчинному білку (фіг. 26B).

Тварин піддавали поведінковому аналізу (фіг. 50A, B, C). Щури, яким вводили пептид SEQ ID NO: 8, продемонстрували відсутність статистично значущих відмінностей в латентності виходу у випробуванні ходіння по перекладині ($p=0,6$) в порівнянні з контролями. Відмінність в числі зісковзувань задніх кінцівок також не була статистично значущою ($p=0,49$) в порівнянні з контролями. Аналогічно, не було статистично значущих відмінностей в показнику NeuroScale ($p=0,9$). Таким чином, введення пептиду SEQ ID NO: 8 не здійснювало статистично значущого впливу на рухову активність щурів.

Ці результати демонструють, що вакцинація тау-пептидом SEQ ID NO: 8, який позбавлений всіх терапевтичних епітопів (в SEQ ID NO: 98-101), викликала: 1) відсутність зміни рівня нерозчинного білка тау в головному мозку імунізованих щурів на біохімічному рівні; і 2) відсутність ефекту на нейроповедінковому рівні.

Ефект пептидної вакцини на навантаження NFT в стовбурі головного мозку тварин, яким проводили введення і яким вводили імітуючий контроль (вводили тільки ад'ювант), оцінювали за допомогою імуногістохімії. Результати показали, що імунотерапія тау-пептидом SEQ ID NO: 8 не знижувала кількість нейрофібрилярних вузликів (фіг. 51). У тварин, яким проводили введення і яким вводили імітуючий контроль, розвивалася практично ідентична кількість нейродегенеративних змін у всіх областях стовбура головного мозку, головним чином в ретикулярній формації стовбура головного мозку, що виявляються забарвленням AT8 і DC217.

Вакцинація SEQ ID NO: 8, що не охоплює ніякий повний терапевтичний епітоп (SEQ ID NO: 98-101), не продемонструвала ніякого сприятливого ефекту у тварин, яким проводили введення. Таким чином, результати імунізації пептидами SEQ ID NO: 5-8 демонструють, що

присутність щонайменше одного повного терапевтичного епітопа (розташованого в SEQ ID NO: 98-101) необхідна для бажаного позитивного ефекту вакцини - зниження патології білка тау і поліпшення щонайменше одного нейроповедінкового параметра.

(j) SEQ ID NO: 108, тау 294-KDNIKHVPGGGS-305. Щурів SHR72 імунізували тау-пептидом SEQ ID NO: 108, кон'югованим з носієм KLH, складеним з ад'ювантом на основі галуну, і вводили в дозі 100 мкг на тварину.

Вакцинація трансгенних щурів SHR72 тау-пептидом SEQ ID NO: 108 статистично значуще знижувала рівень нерозчинного патологічного білка тау ($p < 0,001$). Оскільки патологія хвороби Альцгеймера у SHR72 викликана патологічними нерозчинними формами білка тау (відповідні мономерам, димерам, олігомерам і полімерам патологічного білка тау), аналізували вплив введення 12-мерної пасивної вакцини SEQ ID NO: 108 на рівні нерозчинного білка тау. Стовбур головного мозку трансгенних тварин, імунізованих відповідним імуногеном, і контрольної групи, імунізованої тільки ад'ювантом, використовували для екстракції нерозчинного в саркозилі патологічного білка тау (як описано вище). Результати кількісного аналізу з використанням імуноблотингу для групи трансгенних щурів, імунізованих тау-пептидом SEQ ID NO: 108, і контрольної групи представлені на фіг. 52 і 26B. Вакцинація статистично значуще знижувала рівень патологічного нерозчинного білка тау у імунізованих тварин в порівнянні з контрольними трансгенними щурами, яким вводили тільки ад'ювант (фіг. 52). Це зниження спостерігали для всіх проаналізованих епітопів білка тау, що мають відношення до AD. Імунізація тау-пептидом SEQ ID NO: 108 індукувала значне зниження нерозчинного патологічного білка тау ($p < 0,001$; 70 %), що виявляється шляхом вимірювання за допомогою загального моноклонального антитіла проти білків тау DC25 (фіг. 52). Більше того, аналіз за допомогою фосфозалежних mAb DC217 (pThr217) і AT8 (pSer202/pThr205) показав значуще зниження рівнів патологічних типів білка тау, фосфорилуваних по Thr217 ($p < 0,001$; 96 %) і по Ser202/pThr205 ($p < 0,05$; 98 %) в нерозчинному білку тау, у імунізованих щурів в порівнянні з контролем (фіг. 52). Статистично значуще зниження також спостерігали відносно рівнів нерозчинного патологічного білка тау, що містить pThr231 ($p < 0,05$; 97 %) і pThr181 ($p < 0,05$; 94 %). Ці результати показують, що індукована вакциною імунна відповідь приводить до статистично значущого зниження рівнів ранніх форм патологічного білка тау (представлених мономерами, димерами, олігомерами) і пізніх форм патологічних полімерів білка тау (представлених PHF).

Вакцинація трансгенних щурів SHR72 тау-пептидом SEQ ID NO: 108 статистично значуще поліпшувала нейроповедінкові параметри ($p < 0,05$). Рухову недостатність вимірювали за допомогою набору стандартних рухових випробувань в комбінації з неврологічним дослідженням в складеному показнику - NeuroScale. У віці 6,5 місяця трансгенних щурів SHR72, яким вводили тау-пептид SEQ ID NO: 108, піддавали поведінковим випробуванням з метою визначення ефекту імунотерапії. Щури, яким вводили імуноген у вигляді тау-пептиду SEQ ID NO: 108, продемонстрували значуще знижену латентність виходу у випробуванні ходіння по перекладині ($*p = 0,04$) в порівнянні з трансгенними щурами, яким вводили тільки ад'ювант (контролі) (фіг. 53). Аналогічно, спостерігали позитивну тенденцію в числі зісковзувань задніх кінцівок у вакцинованій групі в порівнянні з трансгенними щурами з контрольним введенням, ця відмінність була значущою ($*p = 0,045$, фіг. 53). Загальний показник NeuroScale обчислювали з даних, одержаних у випробуванні ходіння по перекладині, випробуваннях м'язової тяги із захопленням і неврологічних дослідженнях (основні рефлекс, рефлекс втікання у вигляді розтягнення задніх кінцівок). Імунізація значуще поліпшувала показник NeuroScale у щурів, яким вводили пептид SEQ ID NO: 108, в порівнянні з контрольною групою введення ($*p = 0,047$) (фіг. 53C). Загальний показник NeuroScale підтвердив нейроповедінкове поліпшення у трансгенних щурів, яким проводили введення, в порівнянні з трансгенними щурами, яким не проводили введення. Всі статистичні дані одержували з використанням непараметричного U-критерію Манна-Уїтні.

Нейроповедінкові параметри корелювали з рівнями нерозчинного патологічного білка тау в стовбурі головного мозку трансгенних тварин, яким проводили введення. Тварини, яким вводили вакцинний пептид SEQ ID NO: 108, мали низькі рівні нерозчинного патологічного білка тау, які були асоційовані з більш низькою латентністю виходу і більш низьким числом зісковзувань задніх кінцівок в порівнянні з тваринами з контрольним введенням. Ці дані показують, що зниження рівнів нерозчинного патологічного білка тау приводить до статистично значущого поліпшення нейроповедінкового дефіциту в групі трансгенних тварин, імунізованих вакциною на основі 12-мерного пептиду (SEQ ID NO: 108), демонструючи її терапевтичну цінність.

Вакцинація трансгенних щурів SHR72 тау-пептидом SEQ ID NO: 108 привела до 60 % зниження навантаження нейрофібрилярними вузликами (NFT). Імуногістохімічний аналіз

нейрофібрилярної патології білка тау (нейрофібрилярні вузлики, NFT) в стовбурі головного мозку продемонстрував зниження NFT, що досягається у щурів SHR72, яким вводили вакцину (фіг. 54). Кількість імунізованих трансгенних щурів з великими NFT в стовбурі головного мозку в порівнянні з тваринами, яким вводили ад'ювант, була знижена більше ніж на 60 %. Імунізація

5 знижувала патологію білка тау (полімери патологічного білка тау, PHF) в головному мозку трансгенних тварин, імунізованих вакциною на основі пептиду SEQ ID NO: 108.

Результати демонструють, що імуноterapia тау-пептидом SEQ ID NO: 108 ефективно зменшувала патологію білка тау у щурів SHR72. Вакцинація привела до статистично значущого зниження рівнів нерозчинного патологічного білка тау в головному мозку імунізованих тварин, а

10 також до зниження навантаження нейрофібрилярними вузликами (PHF). Зменшення кількості патологічних білків тау приводило до статистично значущого поліпшення нейроповедінкових параметрів трансгенних щурів, яким проводили введення. Таким чином, введення тау-пептиду SEQ ID NO: 108 має здатність лікувати AD.

ПРИКЛАД 21: ІМУНОТЕРАПІЯ ТЕРАПЕВТИЧНИМИ ПЕПТИДАМИ ПРОТИ AD Є ІМУНОГЕННОЮ І ІНДУКУЄ ПРОДУКЦІЮ СПЕЦИФІЧНИХ ДО ПОВ'ЯЗАНОГО З ЗАХВОРЮВАННЯМ БІЛКА ТАУ АНТИТІЛ У ТРАНСГЕННИХ ЩУРІВ

15

(а) Після п'яти доз вакцини на основі тау-пептиду проводили аналіз імуногенності пептиду у щурів, яким проводили введення. Для визначення титру антитіл використовували сироватку імунізованих щурів. Сироватку щурів, імунізованих тільки ад'ювантом, використовували як

20 контроль. Титри специфічних антитіл проти білка тау визначали за допомогою ELISA, як описано в прикладі 19. Серійні розведення кожної сироватки досліджували проти пов'язаного з AD тау Δ (1-150; 392-441)/4R і рекомбінантного повнорозмірного білка тау 2N4R, якими були попередньо покриті ямки мікропланшетів для титрування. Аналізовані імуногени індукували продукцію специфічних антитіл проти білка тау.

Наприклад, специфічні антитіла проти білка тау одержували після імунізації 275-VQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGG-304 (SEQ ID NO: 4). Антитіла, індуковані тау-пептидом SEQ ID NO: 4, виявляли приблизно в 3 рази більш високу активність зв'язування з неправильно невпорядкованим тау Δ (1-150; 392-441)/4R, ніж з білком тау 2N4R (фіг. 55; розведення 1:3200). Ці результати далі вказують на те, що ця вакцина індукувала антитіла, які

25 мають терапевтичний потенціал і розпізнають і усувають/нейтралізують патологічні білки тау при хворобі Альцгеймера.

Також, вакцинація трансгенних щурів SHR72 тау-пептидом SEQ ID NO: 108 індукувала утворення антитіл, що переважно зв'язуються з патологічним білком тау, відносно фізіологічного білка тау. Після п'яти доз вакцини проводили аналіз імуногенності у кожного з

35 вакцинованих щурів. У тварин відбирали кров через два тижні після останньої допоміжної дози, і зібрані сироватки використовували для визначення геометричного середнього титру антитіл (GMT). Титри специфічних антитіл проти білка тау визначали за допомогою ELISA, як описано в прикладі 19. Серійні розведення (від 1:100 до 1:51200) кожної сироватки досліджували проти патологічного білка тау Δ (1-150; 392-441)/4R і фізіологічного білка тау 2N4R, використаних як

40 тверда фаза. Титри визначали як зворотну величину розведення сироватки, яка дає половину максимальної оптичної густини (поглинання). Для обчислення геометричних середніх титрів антитіл, результатом титрів, меншим 100, приписували величину 10. Як показано на фіг. 56, титр антитіл патологічного білка тау Δ (1-150; 392-441)/4R (GMT 12800) був в три рази вище, ніж титр повнорозмірного білка тау 2N4R (GMT 4200). Титри антитіл також вимірювали проти некон'югованого пептиду SEQ ID NO: 108 з використанням тієї ж технології, яка описана в

45 прикладі 19. На фіг. 56 показано, що найбільш високі титри антитіл індукувалися проти тау-пептиду SEQ ID NO: 108 (GMT 20800). У трансгенних щурів, імунізованих тільки ад'ювантом, не було виявлено антитільних відповідей (GMT 10; дані не представлені). Вакцинація пептидом SEQ ID NO: 108, що містить епітоп DC8E8 № 2 (в SEQ ID NO: 99), індукувала антитіла, що

50 переважно розпізнають патологічний білок тау, які, таким чином, розрізняють патологічний тау Δ (1-150; 392-441)/4R і фізіологічний білок тау 2N4R. Більше того, результат показав, що SEQ ID NO: 108 є імуногенним і, таким чином, має терапевтичний потенціал відносно усунення патологічних білків тау при хворобі Альцгеймера.

Більше того, вакцинація трансгенних щурів SHR72 тау-пептидом SEQ ID NO: 108 переважно індукувала утворення ізотипів IgG-антитіл, специфічних до патологічного білка тау. Для визначення конкретних ізотипів антитіл, продукованих у відповідь на пептид SEQ ID NO: 108, сироватки щурів імунізованої і контрольної груп піддавали серійному розведенню від 1:100 до 1:12800, і досліджували в двох екземплярах за допомогою ELISA (як описано в прикладі 19) проти патологічного білка тау Δ (1-150; 392-441)/4R. Для виявлення ізотипів IgG1, IgG2a, IgG2b,

60 IgG2c і IgM щура, специфічних до підкласів антитіл щура, кон'юговані з HRP вторинні антитіла

розбавляли 1:5000 в PBS (Pierce, антитіло проти IgG1-PA1-84708, антитіло проти IgG2a-PA1-84709, антитіло проти IgG2b-PA1-84710, антитіло проти IgG2c-PA1-84711, і антитіло проти IgM-PA1-84712). На фіг. 57 представлені результати для репрезентативного розведення 1:800. Дані демонструють, що пептид SEQ ID NO: 108, кон'югований з KLH, індукував широкий спектр ізотипів антитіл проти білка тау. Вакцина індукує високі рівні ізотипів антитіл (IgG1, IgG2a, IgG2b і IgG2c), які вважаються високоафінними антитілами. Навпаки, ізотипічний профіль продемонстрував дуже низькі рівні IgM-антитіл. Вважається, що вони мають низьку афінність до антигена. Наявність високих титрів IgG-антитіла з переважною афінністю відносно патологічного білка тау показала, що імунна відповідь, індукована вакциною, направлена проти типів патологічного білка тау. Контрольні сироватки, одержані від щурів з імітуючою імунізацією (яким вводили тільки ад'ювант), були негативними.

Ці дані далі використовували для визначення поляризації (фенотип Th1/Th2) імунної відповіді. Рівні ізотипів IgG1 і IgG2a, індуковані імунізацією, посередньо вказують на внесок Th1-цитокінів відносно Th2-цитокінів у імунну відповідь. Як правило, продукція IgG1-антитіл індукується Th2-цитокінами і продукція IgG2a-антитіл індукується Th1-цитокінами. Таким чином, співвідношення ізотипів IgG1 і IgG2a обчислювали шляхом ділення величин OD для IgG1 на величини OD для IgG2a. Ці дані вказують на те (співвідношення=0,625), що імунна відповідь трохи зсунута у бік Th1-фенотипу.

(b) Моніторинг в реальному часі подій зв'язування з використанням поверхневого плазмонного резонансу дозволив вимірювання кінетичної швидкості асоціації (k_{ON}) і дисоціації (k_{OFF}) антитіл з об'єднаних сироваток щурів, імунізованих тау-пептидом 275-VQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGG-304 (SEQ ID NO: 4). Аналіз показав відмінність між розпізнаванням тау Δ (1-150; 392-441)/4R і фізіологічної ізоформи білка тау 2N4R (фіг. 58). Антитіла, індуковані імунізацією, виявляли переважну афінність відносно тау Δ (1-150; 392-441)/4R, зв'язуючи цей білок тау з в три рази більш високою афінністю у випадку укороченого пов'язаного з AD білка тау в порівнянні з їх афінністю відносно відповідної повнорозмірної ізоформи 2N4R. Було визначено, що ця відмінність в зв'язуванні є, частково, наслідком приблизно в п'ять разів більш високої швидкості k_{ON} для тау Δ (1-150; 392-441)/4R (дані не представлені).

(c) Для подальшого визначення специфічності антитіл, індукованих у щурів, імунізованих терапевтичними тау-пептидами, антисироватку можна використовувати для імуногістохімічного забарвлення заморожених зрізів гіпокампа з головного мозку людини з AD. Наприклад, за допомогою цього аналізу оцінювали антитіла, індуковані після імунізації SEQ ID NO: 4. Гіпокамп з головного мозку людини з AD фіксували 4 % параформальдегідом при 4 °C протягом 2 діб, а потім обробляли 25 % сахарозою протягом 72 годин для забезпечення кріопротекції. Потім матеріал заморожували в холодному 2-метилбутані (-42 °C) протягом 30 секунд і нарізали на зрізи на кріомікромомі. Коронарні зрізи (40-мкм) нарізали в кріостаті при -18 °C. Для імуногістохімічних досліджень використовували вільноплаваючі зрізи. Вільноплаваючі зрізи тканини обробляли холодною (+4 °C) 99 % мурашиною кислотою протягом 1 хв. при кімнатній температурі (25 °C). Зрізи головного мозку інкубували протягом 20 хвилин при кімнатній температурі в 0,01M PBS, pH 7,4, що містить 0,3 % Triton X-100 і 1 % H₂O₂, а потім проводили інкубацію протягом 30 хвилин в блокувальному розчині (0,01M PBS, що містить 0,3 % Triton X-100, 1 % сироватка коня), а потім проводили інкубацію протягом ночі з сироватками від трансгенних щурів, імунізованих вакциною, що містить пептид SEQ ID NO: 4 (розбавлений 1:1000) при 4 °C. Після промивання зрізи піддавали імунному забарвленню з використанням стандартного способу з авідином-біотином-пероксидазою (ABC Elite, Vector laboratories, Burlingame, CA). Продукт реакції візуалізували з використанням системи авідин-біотин і Vector VIP як хромогена (Vector laboratories). Потім зрізи досліджували за допомогою мікроскопа Olympus BX51. Імуногістохімічне забарвлення показало, що антитіла, індуковані шляхом імунізації пептидом SEQ ID NO: 4, специфічно розпізнавали патологічні структури білка тау, тобто нейрофібрилярні осередки в гіпокампі головного мозку при хворобі Альцгеймера (фіг. 59A, B). Сироватки від контрольних щурів, яким вводили тільки ад'ювант, використовували як негативний контроль, і вони не розпізнавали ніякої нейрональної патології (дані не представлені).

Вакцинація трансгенних щурів SHR72 тау-пептидом SEQ ID NO: 108 індукувала антитіла, що розпізнають патологічні білки тау в зрізах тканин головного мозку людини з хворобою Альцгеймера. Для подальшого визначення специфічності антитіл, індукованих у щурів, імунізованих терапевтичним тау-пептидом SEQ ID NO: 108, їх сироватку використовували для імуногістохімічного забарвлення ентोरинальної кори з використанням заморожених зрізів головного мозку людини з AD (стадія Браака VI). Вільноплаваючі зрізи тканин інкубували з

сироватками (розбавленими 1:1000) від імунізованих трансгенних щурів при 4 °С. Індивідуальні сироватки від тварин, вакцинованих SEQ ID NO: 108, використовували по окремі, в той час як сироватки від тварин, вакцинованих тільки ад'ювантом, об'єднували. Після імуного забарвлення з використанням стандартного способу з авідином-біотином-пероксидазою (ABC Elite, Vector laboratories, Burlingame, CA) зрізи досліджували за допомогою мікроскопа Olympus BX51. Імуногістохімічне забарвлення показало, що антитіла, індуковані імунізацією пептидом SEQ ID NO: 108, специфічно розпізнавали патологічні структури білка тау, тобто нейрофібрилярні осередки в енторинальній корі головного мозку при хворобі Альцгеймера. На фіг. 60A-E представлене репрезентативне імуноне забарвлення сироваткою щура, взятою від п'яти вакцинованих трансгенних щурів SHR72. Сироватки тварин, вакцинованих SEQ ID NO: 108, усували нейрофібрилярну патологію дуже інтенсивно, підтверджуючи, що антитіла ефективно націлювалися на патологічні білки тау. Сироватки контрольних щурів, яким вводили тільки ад'ювант, використовували як негативні контролю. Вони не розпізнавали ніякої нейрофібрилярної патології (фіг. 60F).

Антитіла, індуковані вакциною SEQ ID NO: 108, розпізнають патологічні білки тау, екстраговані з головного мозку SHR72 і з головного мозку людини з AD. Специфічність сироваток від щурів, імунізованих тау-пептидом SEQ ID NO: 108, далі досліджували відносно патологічних форм розчинного і нерозчинного патологічного білка тау з використанням способу імуноблотингу (як описано в прикладі 19). Стівбур головного мозку щурів SHR72 на пізній стадії патології використовували для екстракції розчинних і нерозчинних патологічних білків тау. Скроневу кору головного мозку людини з AD (стадія Браака VI; одержана від Netherlands Brain Bank, Нідерланди) використовували для екстракції патологічного білка тау людини з AD. Розчинні і нерозчинні патологічні білки тау одержували з використанням того ж способу, який описаний в прикладі 8. Для розчинних фракцій білка тау 15 мкг тотальних білків наносили на доріжку. Для нерозчинних фракцій білка тау осад розчиняли в 1× буфері для нанесення зразка з додецилсульфатом натрію (SDS) (Laemmli, 1970) в 1/50 об'єму розчинної фракції, використаної для одержання нерозчинної фракції білка тау, і рівний об'єм наносили на SDS-PAGE. Об'єднані сироватки імунізованих тварин розбавляли 1:1000 в PBS і використовували як первинне антитіло. Після інкубації з первинним антитілом ішло поліклональне антитіло кролика проти імуноглобулінів щура, кон'юговане з пероксидазою хрому (1:3000; Dako, Glostrup, Данія). Сигнал вестерн-блотингу оцифровували за допомогою візуалізуючої системи LAS3000 CCD (Fujifilm, Японія). Результати цього аналізу з використанням імуноблотингу представлені на фіг. 61.

Результати (фіг. 61) показують, що антитіла, індуковані проти пептиду, що містить епітоп 2 (SEQ ID NO: 99) DC8E8, розпізнають патологічні білки тау, екстраговані з SHR72 і з тканин головного мозку при AD. Індуковані антитіла розпізнавали мономерні форми патологічного білка тау (доріжка № 1, 2 і 3), а також олігомерні форми патологічного білка тау (доріжка № 2 і 3), включаючи триплет білка тау A68, характерний для AD. Ці дані впливають ключовим чином на імунотерапію з використанням цієї моделі хвороби Альцгеймера на щурах. Високоафінні антитіла, індуковані вакциною, націлені на всі форми патологічних білків тау. Вони націлені на мономерні форми патологічних білків тау і, таким чином, перешкоджають патологічній взаємодії тау-тау (олігомеризація), що веде до зниження рівнів нерозчинних білків тау у вакцинованого щура і, отже, до поліпшення нейроповедінкових параметрів. Індуковані антитіла також зв'язують олігомерні форми патологічного білка тау і націлюють їх на деградацію, наприклад мікроглією, як описано в прикладі 10 для mAb DC8E8.

ПРИКЛАД 22: ІМУНОТЕРАПІЯ ТЕРАПЕВТИЧНИМИ ПЕПТИДАМИ ПРОТИ AD ІНДУКУЄ ПРОДУКЦІЮ АНТИТІЛ, СПЕЦИФІЧНИХ ДО ПОВ'ЯЗАНОГО З ЗАХВОРЮВАННЯМ БІЛКА ТАУ, У МИШЕЙ

Пептиди SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110 (SEQ ID NO: 88 відповідає SEQ ID NO: 110 з додатковим N-кінцевим Cys для кон'югації), SEQ ID NO: 111 і SEQ ID NO: 112, що містять один з терапевтичних епітопів або в SEQ ID NO: 100, або в 101, індукували продукцію антитіл у імунізованих мишей. Одержані антитіла демонструють статистично значущо більш високу активність зв'язування з патологічним білком тауΔ(1-150; 392-441)/4R, ніж з фізіологічним білком тау 2N4R.

SEQ ID NO: 109, тау 314-DLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSE-342,
SEQ ID NO: 110, тау 352-SKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRN-381,
SEQ ID NO: 111, тау 325-LGNIHHKPGGGQ-336,
SEQ ID NO: 112, тау 357-LDNITHVPGGGN-368,
SEQ ID NO: 100, тау 329-HHKPGGG-335,
SEQ ID NO: 101, тау 361-THVPGGG-367.

Дійсно, з метою подальшого визначення імуногенного потенціалу пептидів, що містять один або декілька терапевтичних епітопів DC8E8 (наприклад, в 7-мері: SEQ ID NO: 100 і SEQ ID NO: 101), конструювали пептиди довжиною дванадцять і тридцять амінокислот (SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111 і SEQ ID NO: 112), що містять один з терапевтичних епітопів DC8E8. Тау-пептиди SEQ ID NO: 109 (30 амінокислот) і SEQ ID NO: 111 (12 амінокислот) містять терапевтичних епітоп, що знаходиться в SEQ ID NO: 100. Тау-пептиди SEQ ID NO: 110 (30 амінокислот) і SEQ ID NO: 112 (12 амінокислот) містять терапевтичний епітоп, що знаходиться в SEQ ID NO: 101. Пептиди кон'югували з KLH через їх N-кінцевий залишок Cys, як описано в прикладах 18-19. Одержували вакцини для імунізацій з кон'югатами пептид-KLH, що містять 100 мкг кон'югованого пептиду в 100 мкл PBS і емульговані 1:1 (об./об.) з ад'ювантом Фрейнда в кінцевому об'ємі дози 200 мкл. Використовували п'ять мишей Balb/c на групу введення. Першу імунізацію проводили з використанням кон'югата пептиду в PBS, складеного з повним ад'ювантом Фрейнда. Дві подальші імунізації з інтервалами два тижні проводили з використанням кон'югата пептиду в PBS, складеного з неповним ад'ювантом Фрейнда. Як контроль використовували вакцину, що містить тільки ад'ювант. Сироватки одержували через 10 діб після останньої імунізації і антитільну відповідь вимірювали за допомогою ELISA, як описано в прикладі 19. Сироватки індивідуальних мишей піддавали серійному розведенню від 1:100 до 1:12800 і досліджували в двох екземплярах. Для визначення специфічності сироваток патологічний білок тауΔ(1-150; 392-441)/4R і фізіологічний білок тау 2N4R використовували як тверду фазу. На фіг. 62-65 представлено узагальнення результатів для сироваток в розведенні 1:800. Результати ELISA статистично оцінювали з використанням непараметричного критерію Манна-Уїтні.

Всі досліджувані пептиди індукували специфічні до білка тау антитіла у імунізованих мишей. Антитіла, індуковані шляхом вакцинацій тау-пептидами SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111 і SEQ ID NO: 112, мали статистично значущо більш високу активність зв'язування з патологічним білком тауΔ(1-150; 392-441)/4R, ніж з фізіологічним білком тау 2N4R (фіг. 62-65). Більше того, укорочення пептидів від 30 амінокислот (SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110) до 12 амінокислот (SEQ ID NO: 111 і SEQ ID NO: 112) приводило до значно більш високої продукції специфічних антитіл, які переважно розпізнавали патологічний білок тау (SEQ ID NO: 109, $p=0,0115$; SEQ ID NO: 110, $p=0,0029$; SEQ ID NO: 111, $p=0,0007$; SEQ ID NO: 112, $p<0,001$). Взяті разом, ці результати показали, що пептиди SEQ ID NO: 109 і SEQ ID NO: 111 (що містять терапевтичний епітоп в SEQ ID NO: 100) і пептиди SEQ ID NO: 110 і SEQ ID NO: 112 (що містять терапевтичний епітоп в SEQ ID NO: 101) є імуногенними і мають терапевтичну активність, націлену на патологічні білки тау, присутні в головному мозку пацієнтів, що страждають на хворобу Альцгеймера.

ПРИКЛАД 23: ІДЕНТИФІКАЦІЯ СКОНСТРУЙОВАНИХ ПЕПТИДІВ (СКОНСТРУЙОВАНИ ТЕРАПЕВТИЧНІ ЕПІТОПИ), ЗДАТНИХ КОНКУРОВАТИ З ПАТОЛОГІЧНИМ БІЛКОМ ТАУ ЗА ЗВ'ЯЗУВАННЯ ЩОНАЙМЕНШЕ З ОДНИМ ЕПІТОПОМ DC8E8

Конструювали два додаткових пептиди (11-мери) на основі консервативних амінокислотних залишків між епітопом #1 (в KHQPGGG, SEQ ID NO: 98), #2 (в KHVPGGG, SEQ ID NO: 99), #3 (в HHKPGGG, SEQ ID NO: 100) і #4 (в THVPGGG, SEQ ID NO: 101). У їх конструкції п'ять залишків, що забезпечують зв'язування DC8E8 з цими епітопами, залишали фіксованими: гістидин, пролін і три залишки гліцину в послідовності HxPGGG (SEQ ID NO: 164). Пептиди були синтезовані в EZBiolabs (США) з чистотою більше 85 %. Два сконструйованих терапевтичних епітопи являють собою GWSIHSPGGGSC (SEQ ID NO: 250) і SVFQHLPGGGSC (SEQ ID NO: 251).

Ці пептиди аналізували відносно їх здатності конкурувати з патологічним білком тау з використанням конкурентного ELISA. Планшети для ELISA (планшет з високим зв'язуванням IWAKI, #3801-096, Bertoni GmbH, Австрія) покривали 100 мкл/ямку рекомбінантного очищеного тауΔ(1-150; 392-441)/4R в концентрації 5 г/мл в PBS протягом ночі при 4 °C. Покриті планшети для ELISA промивали 4 рази PBS/Tween 20 (фосфатно-сольовий буфер, доповнений 0,05 % об./об. Tween 20) і блокували PBS/Tween 20 протягом 2 год. при 25 °C. Кожний з пептидів по окремої розчиняли в PBS в кінцевій концентрації 5 мМ. Одержували серійні 2-кратні розведення пептидів в PBS/Tween 20 в поліпропіленових планшетах (Greiner, #651201) (діапазон концентрації 80, 40, 20, 10, 5 і 2,5 мкМ). 100 мкл кожного розведення пептиду змішували зі 100 мкл очищеного моноклонального антитіла DC8E8 в концентрації 2 мкг/мл (очищення проводили, як описано в прикладі 5). Отже, одержані 200 мкл суміші містили 1 мкг/мл антитіла DC8E8 і 40, 20, 10, 5, 2,5 і 1,25 мкМ пептиди. Як позитивний контроль включали тауΔ(1-150; 392-441)/4R. Суміші антитіло/пептид інкубували протягом 1 год. при 25 °C на обертовій платформі, встановленій на 250 об./хв. Потім сто мікролітрів сумішей антитіло/пептид переносили в підготовлені планшети для ELISA і інкубували протягом 1 год. при 25 °C на

обертовій платформі, встановленій на 250 об./хв. Планшети промивали 4× за допомогою PBS/Tween 20. Потім планшети для ELISA інкубували зі 100 мкл поліклонального антитіла кози проти імуноглобулінів миші/HRP (Dako, #P0447), розбавленого 1:4000 в PBS/Tween 20, і інкубували протягом 1 год. при 25 °C на обертовій платформі, встановленій на 250 об./хв.

5 Планшети для ELISA промивали 4× за допомогою PBS/Tween 20. Потім планшети для ELISA інкубували з 100 мкл розчину 1,5 мг/2 мл о-PDA (о-фенілендіамін, SIGMA, P1526) в 0,1M Na-ацетаті, pH 6,0 (Roth, #6779), доповненого в 1,5 мкл/2 мл 30 % H₂O₂ (SIGMA, H-0904), протягом 10 хвилин при 25 °C в темряві. Реакцію зупиняли додаванням 100 мкл 2M H₂SO₄ (Merck, 1.00731.1000). Сигнал, що формується, вимірювали шляхом зчитування при 490 нм (наприклад,

10 з використанням Victor Multilabel Counter (Wallac)).

Два сконструйованих пептиди, а саме GWSIHSPGGGSC (SEQ ID NO: 250) і SVFQHLPGGGSC (SEQ ID NO: 251), були обидва здатні конкурувати з тауΔ(1-150; 392-441)/4R за зв'язування з DC8E8 (фіг. 66). Пептид GWSIHSPGGGSC (SEQ ID NO: 250), названий сконструйованим терапевтичним епітопом 1, продемонстрував найбільш схожу афінність відносно DC8E8 в порівнянні з тауΔ(1-150; 392-441)/4R. Афінність пептиду SVFQHLPGGGSC (SEQ ID NO: 251), названого сконструйованим терапевтичним епітопом 2, відносно DC8E8 була більше ніж на один порядок величини вище, ніж афінність пов'язаного із захворюванням білка тау (тауΔ(1-150; 392-441)/4R) відносно цього антитіла.

15

ПРИКЛАД 24: ДОСЛІДЖЕННЯ IN VIVO СКОНСТРУЙОВАНИХ ТЕРАПЕВТИЧНИХ ЕПІТОПІВ 1 І 2 ДЛЯ ІМУНОГЕНЕТИКИ І СПЕЦИФІЧНІСТЬ ІМУННОЇ ВІДПОВІДІ

20

Сконструйований терапевтичний епітоп 1 (GWSIHSPGGGSC, SEQ ID NO: 250) і сконструйований терапевтичний епітоп 2 (SVFQHLPGGGSC, SEQ ID NO: 251) кон'югували з KLH через їх С-кінцевий залишок Cys (як описано в прикладі 18) і використовували для імунізації мишей Balb/c. Для кожного сконструйованого терапевтичного епітопа використовували трьох мишей. Імунізацію проводили таким чином. Одержували вакцини для імунізації з кон'югатами сконструйований терапевтичний епітоп-KLH, що містять 100 мкг кон'югованого пептиду в 100 мкл PBS, і емульгували 1:1 (об./об.) з ад'ювантом Фрейнда в кінцевому об'ємі дози 200 мкл. Першу імунізацію проводили з використанням кон'югата сконструйований терапевтичний епітоп-KLH в PBS, складеного з повним ад'ювантом Фрейнда.

25

30 Чотири подальших імунізації проводили з інтервалами чотири тижні з використанням кон'югатів сконструйований терапевтичний епітоп-KLH в PBS, складених з неповним ад'ювантом Фрейнда. Для контрольної імунізації використовували PBS замість кон'югатів сконструйованого терапевтичного епітопа. Сироватки одержували через 14 діб після останньої імунізації.

1. Антитіла розрізняють патологічний білок тау. Для визначення специфічності сироватки використовували два білки тау: рекомбінантний патологічний білок тауΔ(1-150; 392-441)/4R і фізіологічний білок тау 2N4R. Сироватку від кожної миші піддавали серійному розведенню від 1:100 до 1:12800 і досліджували в трьох екземплярах. Титри антитіл визначали з використанням поліклонального антитіла кози проти імуноглобулінів миші/HRP (Dako, #P0447), розбавленого 1:4000. На фіг. 67 представлені репрезентативні результати для розведення 1:3200.

35

Обидва сконструйованих терапевтичних епітопи індукували високу імунну відповідь у імунізованих мишей. Більше того, обидва досліджених сконструйованих терапевтичних епітопи індукували антитіла, які розпізнають патологічний білок тауΔ(1-150; 392-441)/4R з більш високою афінністю в порівнянні з фізіологічним білком тау 2N4R (фіг. 67). Ця відмінність є статистично значущою для сироваток всіх імунізованих тварин. Взяті разом, і в комбінації з результатами, одержаними для активності, спостережуваної для DC8E8, ці результати показують, що обидва сконструйованих терапевтичних епітопи 1 і 2 є імуногенними і індукують антитільну відповідь з терапевтичним потенціалом націлювання на патологічні білки тау в головному мозку пацієнтів з хворобою Альцгеймера.

45

2. Ізотип антитіла. Для визначення конкретних ізотипів антитіл, продукованих у відповідь на ці сконструйовані терапевтичні епітопи 1 і 2, сироватки від мишей з однієї і тієї ж групи об'єднували, піддавали серійному розведенню від 1:100 до 1:12800 і досліджували в трьох екземплярах за допомогою ELISA для визначення ізотипів антитіл. Для виявлення ізотипів IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b і IgG3 миші використовували вторинні антитіла, специфічні до підкласів антитіл миші, кон'юговані з HRP (антитіла, придбані від Lifespan Biosciences, антитіло проти IgG1 - #LS-C59107, антитіло проти IgG2a - #LS-C59112, антитіло проти IgG2b - #LS-C59117, антитіло проти IgG3 - #LS-C59125, і антитіло проти IgM - #LS-C55875). Антисироватки, одержані від контрольних мишей, були негативними. На фіг. 68 представлені репрезентативні результати для розведення 1:800. Дані, одержані для об'єднаних сироваток, продемонстрували, що імунізація обома досліджуваними сконструйованими терапевтичними епітопами індукувала широкий спектр ізотипів антитіл проти білка тау і що профіль ізотипів був високою мірою схожим

50

55

60

у всіх дослідженнях. Обидва сконструйованих терапевтичних епітопи індукували в основному IgG1-антитіла в порівнянні з відповідями IgG2a, IgG2b і IgG3 (фіг. 68).

3. Сконструйовані терапевтичні епітопи індукують антитільну відповідь, яка на статистично високозначущому рівні розрізняє патологічний і фізіологічний білок тау. Аналіз афінності антитіл, індукованих проти сконструйованих терапевтичних епітопів, проводили з використанням поверхневого плазмонного резонансу на BIACORE3000 з використанням сенсорного чипа CM5 (Biacore AB, Uppsala), як описано в прикладах 5 і 19. У кожному циклі аналізу антисироватку миші проти або GWSIHSPGGGSC (SEQ ID NO: 250), сконструйований терапевтичний епітоп 1 (розбавлений в 100 разів), або SVFQHLPGGGSC (SEQ ID NO: 251), сконструйований терапевтичний епітоп 2 (розбавлений в 100 разів) (об'єднані антисироватки від 3 мишей), іммобілізували в аналітичній проточній комірці до досягнення рівня іммобілізації ~950 ОЕ, який наближався до насичення. Як еталон в еталонній проточній комірці іммобілізували стороннє антитіло Rab50 (Macikova et al., 1992), яке не зв'язує білок тау. Для визначення K_A , а також для визначення кінетичних констант швидкості K_{ON} і K_{OFF} , 100 нМ розчини або патологічного білка тау Δ (1-150; 392-441)/4R, або фізіологічного білка тау 2N4R інжектували зі швидкістю потоку 100 мкл/хв. на сенсорний чип.

Антитіла, індуковані вакцинацією сконструйованими терапевтичними епітопами 1 і 2, розрізняли патологічний білок тау Δ (1-150; 392-441)/4R і фізіологічний білок тау 2N4R (фіг. 69A і 69B). Афінність антитіл, присутніх в антисироватці проти сконструйованого терапевтичного епітопа 1 (GWSIHSPGGGSC, SEQ ID NO: 250), виміряна з використанням поверхневого плазмонного резонансу, була практично в 50 разів більш високою відносно патологічного білка тау, в порівнянні з фізіологічним білком тау, що є статистично високозначущим ($p < 0,001$). Афінність антитіл, присутніх в антисироватці проти сконструйованого терапевтичного епітопа 2 (SVFQHLPGGGSC (SEQ ID NO: 251), виміряна з використанням поверхневого плазмонного резонансу, була практично в 15 разів більш високою відносно патологічного білка тау, в порівнянні з фізіологічним білком тау, що є статистично високозначущим ($p < 0,01$).

4. Сконструйовані терапевтичні епітопи індукують антитільну відповідь, що розпізнає патологічні типи білка тау в головному мозку людини з AD. Для визначення специфічності антитіл, індукованих у мишей, імунізованих сконструйованими терапевтичними епітопами, проводили імуногістохімічне забарвлення заморожених зрізів головного мозку людини з AD.

Зразки тканини головного мозку людини з AD (енторинальна кора, стадія AD Браака VI, надана Netherlands Brain Bank) фіксували 4 % параформальдегідом в PBS протягом 2 діб при 4 °C, а потім піддавали криопротекції (25 % сахароза), заморожували в холодному 2-метилбутані (-42 °C) і нарізали на зрізи на кріотомі. Вільноплаваючі зрізи тканин (40 мкм) обробляли холодною (4 °C) 99 % мурашиною кислотою протягом 1 хв. при кімнатній температурі (25 °C). Зрізи піддавали імунному забарвленню з використанням стандартного способу з авідинном-біотином-пероксидазою (ABC Elite, Vector laboratories, Burlingame, CA). Антисироватки проти сконструйованого терапевтичного епітопа 1 (SEQ ID: 250) і сконструйованого терапевтичного епітопа 2 (SEQ ID NO: 251), кожна з яких була об'єднаною від 3 імунізованих мишей, розбавляли 1:2000 в блокувальному розчині (5 % бичачий сироватковий альбумін, 0,3 % Triton X-100 в PBS). Потім зрізи досліджували за допомогою мікроскопа Olympus BX51.

Імуногістохімічне забарвлення показало, що імунні сироватки миші, одержані проти обох сконструйованих терапевтичних епітопів GWSIHSPGGGSC (SEQ ID NO: 250) і SVFQHLPGGGSC (SEQ ID NO: 251), специфічно розпізнавали патологічні структури білка тау, тобто нейрофібрилярні вузлики і нейропільні нитки, в енторинальній корі головного мозку при хворобі Альцгеймера (фіг. 70A-D). Антисироватки проти сконструйованого терапевтичного епітопа 1 і сконструйованого терапевтичного епітопа 2 не розпізнавали нормальний білок тау в контрольному головному мозку людини (фіг. 70E, F).

5. Сконструйований терапевтичний епітоп 2 (SVFQHLPGGGSC, SEQ ID NO: 251) індукує антитільну відповідь, що розпізнає патологічні типи білка тау в головному мозку трансгенних щурів в моделі хвороби Альцгеймера. Для визначення специфічності антитіл, індукованих у мишей, імунізованих сконструйованими терапевтичними епітопами, проводили імуногістохімічне забарвлення на поміщених в парафін зрізах головного мозку трансгенних щурів SHR72.

Трансгенних щурів лини SHR72 (у віці 7 місяців) піддавали транскардіальній перфузії PBS протягом 1 хв. під глибоким наркозом, а потім проводили перфузію 100 мл 4 % параформальдегіду (pH 7,4). Після перфузії голову відділяли і головний мозок швидко витягували. Головний мозок розрізали подовжньо на дві півкулі рівного розміру з використанням одноразових лез скальпеля. Тканини головного мозку піддавали пост-фіксації в 4 % параформальдегіді, поміщали в парафін і нарізали на зрізи на мікротомі. Імуногістохімічне і гістопатологічне дослідження проводили на 8-мкм поміщених в парафін зрізах тканин. Зрізи

тканини попередньо обробляли протягом 20 хв. розчином, що виявляє антиген (Vector laboratories, CA, США), і протягом 1 хв. холодною (+4 °C) 90 % мурашиною кислотою (Applichem, Німеччина), при кімнатній температурі (25 °C). Після блокування зрізи інкубували протягом ночі з сироваткою, одержаною проти сконструйованого терапевтичного епітопа 2 (SVFQHLPGGGSC, SEQ ID NO: 251), розбавленою 1:1000 в блокувальному розчині (5 % бичачий сироватковий альбумін, 0,3 % Triton X-100 в 50 нМ Tris-HCl). Після промивання зрізи інкубували з біотинільованим вторинним антитілом (Vectastain Elite ABC Kit, Vector laboratories) при кімнатній температурі протягом однієї години, а потім піддавали реакції з розчином комплексу авідин-біотин-пероксидаза протягом 60 хвилин (Vectastain Elite ABC Kit, Vector laboratories), при кімнатній температурі (25 °C). Імунну реакцію візуалізували за допомогою набору субстрату для пероксидази (Vector VIP, Vector laboratories, Ca, США). Зрізи досліджували за допомогою мікроскопа Olympus BX71.

У головному мозку трансгенного щура (SHR72) сироватка, одержана проти сконструйованого терапевтичного епітопа 2 (SVFQHLPGGGSC, SEQ ID NO: 251), розпізнавала нейрофібрилярні вузлики (фіг. 70G). У головному мозку співпадаючих за віком контрольних щурів антитіло не забарвлювало нейрональні клітини (фіг. 70H).

Сироватка, одержана проти сконструйованого терапевтичного епітопа 2 (SVFQHLPGGGSC, SEQ ID NO: 251), розпізнавала білок тау на олігомерній довузликовій стадії (фіг. 70I), а також внутрішньоклітинні нейрофібрилярні вузлики (фіг. 70J).

6. Антитіла, індуковані сконструйованими терапевтичними епітопами 1 і 2, розпізнають розчинний і нерозчинний патологічний білок тау в головному мозку людини з AD. Розчинний і нерозчинний в саркозилі патологічний білок тау виділяли зі скроневої кори людини з хворобою Альцгеймера (одержаної від Netherlands Brain Bank) і аналізували з використанням імуноблотингу, як описано в прикладі 8.

Мембрани, що містять розчинні і нерозчинні фракції патологічного білка тау, інкубували або з супернатантом гібридами DC8E8, розбавленим 1:1 5 % знежиреним сухим молоком в PBST, або з об'єднаними антисироватками миші, одержаними проти сконструйованого терапевтичного епітопа 1 (GWSIHSPGGGSC, SEQ ID NO: 250), або з об'єднаними антисироватками миші, одержаними проти сконструйованого терапевтичного епітопа 2 (SVFQHLPGGGSC, SEQ ID NO: 251), при цьому обидві об'єднані антисироватки розбавляли 1:100 в 5 % знежиреному сухому молоці в PBST. Мембрани промивали, а потім інкубували з кон'югованим з пероксидазою антитілом кози проти IgG миші (DAKO, Данія), розбавленим 1:4000. Блоти виявляли за допомогою хемілюмінесцентного субстрату SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, США), що виявляється з використанням візуалізуючої системи LAS3000 (FUJI Photo Film Co., Японія). Інтенсивність сигналу кількісно визначали з використанням програмного забезпечення AIDA (Advanced Image Data Analyzer, Raytest, Straubenhardt, Німеччина).

Результати цього аналізу з використанням імуноблотингу представлені на фіг. 71. Ці результати демонструють, що антитіла, індуковані проти обох сконструйованих терапевтичних епітопів 1 (тобто GWSIHSPGGGSC, SEQ ID NO: 250) і 2 (тобто SVFQHLPGGGSC, SEQ ID NO: 251), розпізнають ті ж патологічні білки тау, що і DC8E8. Всі з антисироваток проти GWSIHSPGGGSC (SEQ ID NO: 250), антисироваток проти SVFQHLPGGGSC (SEQ ID NO: 251) і антитіла DC8E8 специфічно розпізнавали патологічні білки тау, присутні в розчинних і нерозчинних в саркозилі фракціях білка тау, виділених з тканин головного мозку при AD (фіг. 71).

7. Антитіла, індуковані сконструйованими терапевтичними епітопами 1 і 2, розпізнають розчинний і нерозчинний патологічний білок тау в головному мозку з трансгенним білком тау щурів. Розчинний і нерозчинний в саркозилі патологічний білок тау виділяли з головного мозку щурів з трансгенним білком тау (лінія SHR72, описана в прикладі 7), як описано в прикладі 8.

Результати аналізу з використанням імуноблотингу (описаного в прикладі 8) подані на фіг. 72. Ці результати показують, що антитіла, індуковані сконструйованими терапевтичними епітопами 1 (тобто GWSIHSPGGGSC, SEQ ID NO: 250) і 2 (тобто SVFQHLPGGGSC, SEQ ID NO: 251), розпізнають ті ж патологічні білки тау, що і DC8E8 (фіг. 72). Націлювання на мономерний і олігомерний патологічний білок тау перешкоджає утворенню агрегатів патологічного білка тау, що приводить до зниження патології білка тау, забезпечуючи терапевтичний ефект і лікування AD у людини.

ПРИКЛАД 25: ЕФЕКТИВНІСТЬ IN VIVO СКОНСТРУЙОВАНИХ ТЕРАПЕВТИЧНИХ ЕПІТОПІВ У ТРАНСГЕННИХ ЩУРІВ В МОДЕЛІ AD

Імунотерапія сконструйованими терапевтичними епітопами продемонструвала поліпшення нейроповедінкових параметрів у щурів, яким проводили введення. Сконструйований терапевтичний епітоп 2 (SEQ ID NO: 251) був вибраний для імунотерапії у трансгенних щурів

SHR72. Щурів підшкірно імунізували дозами вакцини, що містила сконструйований терапевтичний епітоп 2 (SEQ ID NO: 251), кон'югований з KLH, в комбінації з ад'ювантом AdjuPhos. Вакцини одержували, як описано в прикладі 18. Одна доза містила 100 мкг кон'югованого сконструйованого терапевтичного епітопа 2. Комплексну рухову недостатність визначали за допомогою стандартних рухових випробувань в комбінації з неврологічною оцінкою в складеному показнику - NeuroScale. У віці 6,5 місяця трансгенних щурів SHR72, яким вводили вакцину, що містить сконструйований терапевтичний епітоп 2 (SEQ ID NO: 251), піддавали поведінковим випробуванням з метою визначення ефекту цієї імунотерапії.

Щури, яким вводили сконструйований терапевтичний епітоп 2 (SEQ ID NO: 251), продемонстрували зниження латентності виходу на 27 % у випробуванні ходіння по перекладині відносно контрольних щурів, яким вводили тільки ад'ювант (фіг. 73A). Кількість зісковзувань задніх кінцівок була статистично значущо знижена ($p < 0,05$) на 44 % у вакцинованій групі в порівнянні з трансгенними контролями (фіг. 73B). Показник NeuroScale обчислювали, виходячи з величин, одержаних у випробуваннях ходіння по перекладині, випробуваннях м'язової тяги із захопленням і при неврологічній оцінці (основні рефлекс, рефлекс вітання у вигляді розтягнення задніх кінцівок). Імунізація значно поліпшувала показник NeuroScale у щурів, яким вводили пептид SEQ ID NO: 251, на 26 %, в порівнянні з контрольною групою (фіг. 73C). Загальний показник NeuroScale підтвердив нейроповедінкове поліпшення у трансгенних щурів, яким проводили введення, в порівнянні з трансгенними щурами, яким не проводили введення. Всі статистичні дані одержували з використанням непараметричного U-критерію Манна-Уїтні.

Імунотерапія сконструйованим терапевтичним епітопом 2 продемонструвала статистично значуще зниження ($p < 0,05$) рівня патологічного білка тау в головному мозку трансгенних щурів з хворобою Альцгеймера, яким проводили введення. Для підтвердження ефекту імунізації сконструйованим терапевтичним епітопом 2 (SEQ ID NO: 251) на рівні нерозчинного патологічного білка тау, автори даного винаходу використовували аналіз з використанням імуноблотингу зразків головного мозку щура. Тканину головного мозку (стовбура головного мозку) трансгенних тварин, імунізованих сконструйованим терапевтичним епітопом 2 (SEQ ID NO: 251), і контрольної групи трансгенних тварин, імунізованих тільки ад'ювантом, використовували для одержання фракції нерозчинного в саркозилі білка тау, як описано в прикладі 8. Аналіз з використанням імуноблотингу проводили, як описано в прикладі 19. Статистичний аналіз проводили з використанням Т-критерію. У дослідженні використовували залежні від фосфорилювання моноклональні антитіла AT8, DC209, DC217 і загальне моноклональне антитіло проти білка DC25.

Результати кількісного аналізу з використанням імуноблотингу рівнів нерозчинного білка тау в групі трансгенних щурів, імунізованих сконструйованим терапевтичним епітопом 2 (SEQ ID NO: 251), і в контрольній групі представлені на фіг. 74. Імунотерапія статистично значущо знижувала кількість нерозчинного білка тау у імунізованих тварин в порівнянні з контрольними трансгенними щурами, яким вводили тільки ад'ювант. Зниження рівня нерозчинного білка тау спостерігали для всіх проаналізованих епітопів білка тау. Зниження рівнів епітопа 347-353 і епітопів білка фосфо-тау було статистично значущим ($P < 0,05$). Спостережуване зниження було наступним: для епітопа тау 347-353 на 46 % ($P < 0,05$), для епітопа тау pT217 на 57 % ($P < 0,05$), для епітопа тау p231 на 55 % ($P < 0,05$), для епітопа тау pS202/pT205 на 47 % ($P < 0,05$).

Ці результати показують, що вакцина індукувала антитіла, специфічні до патологічного білка тау, які привели до зниження рівня патологічного білка тау. Зниження рівнів патологічного білка тау в головному мозку в моделі хвороби Альцгеймера у щурів, яким проводили введення, корелювало з нейроповедінковими параметрами. Тварини, яким проводили введення, з низькими рівнями нерозчинного білка тау, продемонстрували більш коротку латентність виходу і статистично значущо знижену кількість зісковзувань задніх кінцівок ($p < 0,05$), в порівнянні з контрольними тваринами. Ці дані показують, що імунізація сконструйованим терапевтичним епітопом приводить до зниження рівня нерозчинного патологічного білка тау і до нейроповедінкового поліпшення у тварин, яким проводили введення, що підкреслює терапевтичний потенціал вакцин для лікування хвороби Альцгеймера і споріднених таупатій у людини.

ПРИКЛАД 26: ПОДАЛЬША ОХАРАКТЕРИЗАЦІЯ МІНІМАЛЬНИХ ЕПІТОПІВ DC8E8 (ДЛЯ ТЕРАПЕВТИЧНИХ ЦЕНТРАЛЬНИХ ЕЛЕМЕНТІВ)

Для подальшої охарактеризації мінімальних епітопів DC8E8 конструювали панель тау-пептидів різної довжини (42-мер, 19-мер, 12-мери, 7-мери, 6-мери і 5-мери), що походять з областей зв'язуючих мікротрубочки повторів (MTBR1, MTBR2, MTBR3, MTBR4) білка тау людини 2N4R (фіг. 75A, B). Пептиди були синтезовані в EZBiolabs (США) з чистотою більше 95 %. Всі пептиди аналізували відносно їх здатності конкурувати з патологічним білком тауΔ(1-

150; 392-441)/4R за зв'язування з DC8E8 за допомогою конкурентного ELISA. Планшети для ELISA (Sarstedt, #821581001) покривали 50 мкл/ямку рекомбінантного очищеного тауΔ(1-150; 392-441)/4R в PBS в концентрації 5 мкг/мл протягом ночі при 37 °С. Покриті планшети промивали 5 разів PBS/Tween 20 (0,05 % об./об.) і блокували PBS/Tween 20 (0,05 % об./об.) протягом 1 год. при 25 °С. Кожний з пептидів окремо розчиняли в PBS в кінцевій концентрації 1 мМ. Одержували серійні розведення (2,5×) пептидів в PBS/Tween 20 в поліпропіленових мікропланшетах для титрування з кінчним дном ямок (Greiner, #651201) в діапазоні концентрацій 200; 80; 32; 12,8; 5,12; 2,048; 0,8192; 0,32768 мМ. Моноклональне антитіло для перевірки DC8E8 розбавляли до концентрації 0,6 мкг/мл в PBS і 60 мкл цього розбавленого антитіла додавали в кожен ямок з серійними розведеннями пептидів з одержанням 120 мкл/ямку суміші. Суміші антитіло/пептид інкубували протягом 1 год. при 25 °С на обертовій платформі, встановленій на 230 об./хв. 50 мкл/ямку сумішей антитіло/пептид переносили з поліпропіленових планшетів в покриті тауΔ(1-150; 392-441)/4R і блокувані PBS/Tween 20 планшети для ELISA (в двох екземплярах) і інкубували протягом 1 год. при 25 °С. Планшети промивали 5× PBS/Tween 20 і інкубували з 50 мкл/ямку поліклонального антитіла кози проти імуноглобулінів миші/HRP (Dako, #P0447), розбавленого 1:1000 в PBS/Tween 20, протягом 1 год. при 25 °С. Після промивання планшети інкубували з 50 мкл/ямку 1 мг/2 мл о-PDA (о-фенілендіамін, Sigma, P1526) в 0,1M Na-ацетаті, pH=6,0 (Roth, #6779), доповненому 1,5 мкл/2 мл 30 % H₂O₂ (Sigma, H-0904), протягом 20 хвилин при 25 °С в темряві. Реакцію зупиняли додаванням 50 мкл/ямку 2M H₂SO₄ (Merck, 1.00731.1000), а потім проводили зчитування планшетів при 492 нм (наприклад, Powerwave HT, Bio-Tek).

На фіг. 76 представлені результати конкурентного ELISA, що проводиться з наступними пептидами: TENLKHQPGGGK (SEQ ID NO: 270), KHQPGGG (SEQ ID NO: 271), HQPGGG (SEQ ID NO: 272), HQPGG (SEQ ID NO: 273), QPGGG (SEQ ID NO: 274), ENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGG (SEQ ID NO: 275), KHVPGGG (SEQ ID NO: 276), HVPGGG (SEQ ID NO: 277), HVPGG (SEQ ID NO: 278), VPGGG (SEQ ID NO: 279), DNIKHVPGGGSVQIVYKPV (SEQ ID NO: 280), HHKPGGG (SEQ ID NO: 281), HKPGGG (SEQ ID NO: 282) і THVPGGG (SEQ ID NO: 283). Всі аналізовані пептиди, які охоплювали терапевтичні епітопи білка тау, конкурували з патологічним білком тауΔ(1-150; 392-441)/4R. Як показано на фіг. 76, навіть 6-мерні пептиди (SEQ ID NO: 272, SEQ ID NO: 277 і SEQ ID NO: 282) були здатні конкурувати з білком тауΔ(1-150; 392-441)/4R за зв'язування з DC8E8. Однак видалення або гістидину (5-мерні пептиди SEQ ID NO: 274, 279), або останнього гліцину (5-мерні пептиди SEQ ID NO: 273, 278) привело до втрати активності конкурування з тауΔ(1-150; 392-441)/4R за зв'язування з DC8E8 (5-мерні пептиди походили з SEQ ID NO: 272 і SEQ ID NO: 277, видалені амінокислоти His і Gly підкреслені, див. вище). Ці результати вказують на те, що 5-мерні пептиди не утворювали терапевтичну 3D-структуру, яка розпізнається DC8E8 на патологічному білку тау. З іншого боку, пептиди, що містять шість амінокислотних залишків, утворюють терапевтичну 3D-структуру, відповідальну за біологічну активність, виміряну за допомогою конкурентного ELISA, і формують мінімальні епітопи (терапевтичні центральні елементи) DC8E8. У цій конструкції п'ять амінокислотних залишків важливі для розпізнавання DC8E8, які є консервативними (гістидин, пролін і три залишки гліцину в послідовності HxPGGG).

Висновок. Дані вказують на те, що мінімальний епітоп DC8E8 на білку тау людини складається з 6 амінокислот, які містять залишки HQPGGG (розташовані в MTBR1), HVPGGG (в MTBR2), HKPGGG (в MTBR3) і HVPGGG (в MTBR4). Таким чином, ділянка зв'язування DC8E8 (=епітоп) присутня чотири рази в білку тау 2N4R і три рази в білку тау 2N3R. Це вказує на те, що необхідними амінокислотами в 6-мерній послідовності є гістидин і всі три залишки гліцину.

ПРИКЛАД 27: ВИЗНАЧЕННЯ ІМУНОГЕНЕТИКИ ПЕПТИДІВ, ЯКІ МІСТЯТЬ МІНІМАЛЬНІ ЕПІТОПИ DC8E8

(а) Пептиди, що містять мінімальні епітопи DC8E8, є імуногенними. З метою визначення імуногенного потенціалу індивідуальних тау-пептидів, пептиди кон'югували з KLH через їх N-кінцевий залишок Cys.

Для цього тау-пептиди синтезували як цистеїновані пептиди з додатковим розташуванням на N-кінці залишком цистеїну з метою досягнення орієнтованого приєднання пептиду на поверхні білка KLH. Пептиди зв'язували з носієм KLH через біфункціональний зшивальний лінкер N-[γ-малеїмідобутирилокси]сукцинімідний складний ефір (GMBS). Для одержання реакційної суміші для кон'югації, 20 мг KLH (Calbiochem) розчиняли в буфері для кон'югації (PBS з 0,9M NaCl, 10 мМ EDTA) до концентрації 10 мг/мл шляхом обережного перемішування протягом 10 хвилин. Для одержання активованого малеїнімідом KLH, 2 мг активного біфункціонального зшивального лінкера GMBS розчиняли в 50 мкл безводного диметилформаміду і змішували з 2 мл розчину KLH протягом 1 години при кімнатній температурі. Потім GMBS, що не вступив в реакцію,

видаляли на 5-мл колонці для знесолювання HiTrap Desalting column (GE Healthcare), зрівноважений буфером для кон'югації. Кон'югацію проводили при співвідношенні пептиду до активованого малеїнімідом KLN 1:1 (мас./мас., 20 мг пептиду) протягом 2 год. при кімнатній температурі (25 °C). Одержані кон'югати піддавали діалізу проти 100-кратного надлишку PBS з чотирма замінами буфера для діалізу, щоб видалити некон'югований пептид. Після діалізу кон'югати центрифугували при 21000×g протягом 15 хв. при 2 °C. Кон'югати розділяли на аліквоти і зберігали при -20 °C до застосування.

Одержували вакцини для імунізації з кон'югатами пептид-KLN, що містять 100 мкг кон'югованого пептиду, в 100 мкл PBS і емульгували 1:1 (об./об.) з ад'ювантом Фрейнда в кінцевому об'ємі дози 200 мкл. Використовували п'ять мишей C57/BL на групу введення. Першу імунізацію проводили з використанням кон'югата пептиду в PBS, складеного з ад'ювантом Фрейнда. Дві подальші імунізації з інтервалами один тиждень проводили з використанням кон'югата пептиду в PBS, складеного з неповним ад'ювантом Фрейнда. У тварин відбирали кров через один тиждень після останньої допоміжної дози, і зібрані сироватки використовували для визначення титру антитіл. Титри специфічних антитіл проти білка тау визначали за допомогою ELISA, як описано в прикладі 19. Серійні розведення (від 1:100 до 1:102400) кожної сироватки досліджували проти патологічного білка тау Δ (1-150; 392-441)/4R і фізіологічного білка тау 2N4R, використовуюваного як тверда фаза. На фіг. 77A-C представлено узагальнення результатів для сироваток в розведенні 1:800. Результати ELISA статистично оцінювали з використанням непараметричного критерію Манна-Уїтні. Титри визначали як зворотну величину розведення сироватки, що дає половину максимальної OD, і вони узагальнено представлені на фіг. 78.

Імунізація мишей тау-пептидами TENLKHQPGGGK (SEQ ID NO: 270), KHQPGGG (SEQ ID NO: 271), ENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNKHVPGGGS (SEQ ID NO: 275), KHVPGGG (SEQ ID NO: 276), HVPGGG (SEQ ID NO: 277), DNIKHVPGGGSVQIVYKPV (SEQ ID NO: 280), HHKPGGG (SEQ ID NO: 281) і THVPGGG (SEQ ID NO: 283) індукувала високі рівні специфічних до білка тау антитіл у імунізованих мишей. Більше того, індуковані антитіла виявляли більш високу афінність відносно патологічного білка тау Δ (1-150; 392-441)/4R, ніж відносно фізіологічного білка тау 2N4R (фіг. 77A-C). Ця відмінність була статистично значущою для сироваток всіх імунізованих тваринних (SEQ ID NO: 270, $p < 0,0079$; SEQ ID NO: 271, $p < 0,0052$; SEQ ID NO: 275, $p < 0,0079$; SEQ ID NO: 276, $p < 0,0079$; SEQ ID NO: 277, $p < 0,0379$; SEQ ID NO: 280, $p < 0,0159$; SEQ ID NO: 281, $p < 0,0379$; і SEQ ID NO: 283, $p < 0,0286$). В основному, геометричні середні титри антитіл до патологічного білка тау Δ (1-150; 392-441)/4R були від трьох до п'яти разів більш високими, ніж до фізіологічного білка тау 2N4R (фіг. 78). Як показано на фіг. 78, найбільш високі титри антитіла до патологічного білка тау індукувалися тау-пептидом SEQ ID NO: 275 (GMT 51200), SEQ ID NO: 280 (GMT 51200), SEQ ID NO: 270 (GMT 22286) і SEQ ID NO: 276 (GMT 22286). 5-мерні пептиди (SEQ ID NO: 273, 274, 278, 279), які, мабуть, позбавлені терапевтичної 3D-структури, не були здатні індукувати специфічні до білка тау антитіла у імунізованих тварин. Взяті разом, ці результати показали, що пептиди (SEQ ID NO: 270, 271, 272, 275, 276, 277, 280, 281 і 283), що містять мінімальні терапевтичні епітопи (терапевтичні центральні елементи), є імуногенними і індукують антитіла з терапевтичним потенціалом націлювання на патологічні білки тау в головному мозку пацієнтів з хворобою Альцгеймера. Згадані вище експерименти по картуванню епітопів продемонстрували, що пептид SEQ ID NO: 282 формує терапевтичну 3D-структуру (наприклад, щонайменше частково імітує мінімальний епітоп DC8E8), проте він не індукував специфічну антитільну відповідь у імунізованих мишей (GMT для патологічного білка тау становив 174, фіг. 78).

(b) Ізотипічний профіль. Вакцинація мишей C57/BL тау-пептидами SEQ ID NO: 270, 271, 275, 276, 277, 280, 281 і 283 переважно індукувала утворення ізотипів антитіл IgG1 і IgG2b, специфічних до патологічного білка тау. Для визначення специфічних ізотипів антитіл, продукованих у відповідь на пептиди, сироватки мишей об'єднували і розбавляли від 1:100 до 1:12800, і досліджували в двох екземплярах за допомогою ELISA (як описано в прикладі 19) проти патологічного білка тау Δ (1-150; 392-441)/4R. Для виявлення ізотипів IgG1, IgG2b, IgG2c, IgG3 і IgM миші, специфічних до підкласів антитіл миші, кон'юговані з HRP вторинні антитіла розбавляли 1:5000 в PBS (антитіла, придбані від Lifespan Biosciences). На фіг. 79 представлені результати для репрезентативного розведення 1:800. Дані вказують на те, що пептиди, кон'юговані з KLN, індукували широкий спектр ізотипів антитіл проти білка тау. Як правило, вакцинація пептидами індукувала найбільш високі рівні ізотипів антитіл (IgG1, IgG2b), які вважаються високоафінними антитілами. Присутність високих титрів антитіл IgG1 і IgG2b з переважною афінністю до патологічного білка тау показала, що імунна відповідь, індукована вакциною, направлена проти патологічних типів білка тау. Контрольні сироватки, одержані від

мишей з імітуючою імунізацією (яким вводили тільки ад'ювант), були негативними (дані не представлені).

(с) Пептиди, які мають терапевтичні епітопи, індують антитіла, що розрізняють патологічний і фізіологічний білок тау. Моніторинг в реальному часі подій зв'язування з використанням поверхневого плазмонного резонансу дозволив вимірювання кінетичної швидкості асоціації (k_{ON}) і дисоціації (k_{OFF}) антитіл з об'єднаних сироваток мишей C57/BL, імунізованих окремими тау-пептидами TENLKHQPGGGK (SEQ ID NO: 270), KHQPGGG (SEQ ID NO: 271), HQPGGG (SEQ ID NO: 272), HQPGG (SEQ ID NO: 273), QPGGG (SEQ ID NO: 274), ENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGS (SEQ ID NO: 275), KHVPGGG (SEQ ID NO: 276), HVPGGG (SEQ ID NO: 277), HVPGG (SEQ ID NO: 278), VPGGG (SEQ ID NO: 279), DNIKHVPGGGSVQIVYKPV (SEQ ID NO: 280), HHKPGGG (SEQ ID NO: 281), HKPGGG (SEQ ID NO: 282) і THVPGGG (SEQ ID NO: 283). Аналіз проводили з використанням поверхневого плазмонного резонансу на BIACORE3000 з використанням сенсорного чипа CM5 (Biacore AB, Uppsala), як описано в прикладах 5 і 19. Аналіз показав, що антитіла, індуковані імунізацією пептидами, були здатні розрізнявати розпізнавання тау Δ (1-150; 392-441)/4R і фізіологічної ізоформи білка тау 2N4R (фіг. 80). Антитіла, індуковані імунізацією пептидами SEQ ID NO: 270, 271, 272, 275, 276, 277, 280, 281 і 283, що містять мінімальні терапевтичні епітопи, виявляли переважну афінність відносно тау Δ (1-150; 392-441)/4R, в порівнянні з їх афінністю відносно відповідного фізіологічного білка тау 2N4R. Ця відмінність була статистично значущою для сироваток, одержаних для пептидів: SEQ ID NO: 270 ($p=0,0392$), SEQ ID NO: 271 ($p=0,0363$), SEQ ID NO: 272 ($p=0,0022$), SEQ ID NO: 276 ($p=0,0013$), SEQ ID NO: 277 ($p=0,0023$), SEQ ID NO: 280 ($p=0,0104$), SEQ ID NO: 281 ($p=0,0123$) і SEQ ID NO: 283 ($p=0,0011$). Одержані результати відповідають попереднім експериментам по імуногенності, узагальнено представленим на фіг. 77A-C і 78.

(d) Індуковані пептидами антитіла розпізнають патологічні форми білка тау у вестерн-блотингу: Антитіла, індуковані імунізацією мишей C57/BL окремими тау-пептидами, досліджували відносно патологічних форм білка тау з використанням способу імуноблотингу (як описано в прикладі 19). Стовбур головного мозку щурів SHR72 на пізній стадії нейрофібрилярної патології використовували для екстракції нерозчинних патологічних білків тау. Для екстракції патологічного білка тау при AD у людини використовували скроневу кору головного мозку людини з AD (стадія Браака VI; одержана від Netherlands Brain Bank, Нідерланди). Екстраговані білки тау одержували згідно зі способом з саркозілом (Greenberg and Davies 1990). Об'єднані сироватки імунізованих тварин розбавляли 1:1000 в PBS і використовували як первинне антитіло. Після інкубації з первинним антитілом ішло поліклональне антитіло кролика проти імуноглобулінів щура, кон'юговане з пероксидазою хрому (1:3000; Dako, Glostrup, Данія). Потім антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому, візуалізували за допомогою хемілюмінесценції з використанням хемілюмінесцентного субстрату SuperSignal West Pico Chemiluminescence Substrate (Thermo Scientific, Belgium). Сигнал оцифровували за допомогою візуалізуючої системи LAS3000 CCD (Fujifilm, Японія). Узагальнені результати представлені на фіг. 81. Антитіла, індуковані вакцинацією пептидами, що ймовірно формують терапевтичну 3D-структуру епітопа(ів) DC8E8 (SEQ ID NO: 270, 271, 272, 275, 276, 277, 280, 281 і 283), розпізнавали всі патологічні форми білка тау, екстраговані з SHR72 і з тканин головного мозку при AD, включаючи тау-триплет A68, характерний для AD. Проте, пептид SEQ ID NO: 282, який, мабуть, формує терапевтичну 3D-структуру (конкурує з тау Δ (1-150; 392-441)/4R за зв'язування з DC8E8), не індукував специфічну антитільну відповідь у цих імунізованих мишей, таким чином реактивність була негативною. Аналогічно, 5-мерні пептиди, які не були здатні індукувати специфічну до білка тау антитільну відповідь, були негативними в цьому аналізі.

(e) Індуковані пептидами антитіла розпізнають патологічні білки тау в зрізах головного мозку людини при хворобі Альцгеймера. Специфічні до білка тау антитіла, індуковані вакцинацією мишей C57/BL окремими пептидами, досліджували на тканині головного мозку людини (парафінові блоки), одержаній від Netherlands brain bank. Блоки нарізали на мікротомі. Поміщені в парафін зрізи (8 мкм) гіпокампа-сектора CA1 з головного мозку при хворобі Альцгеймера (стадія Браака V) обробляли холодною (+4 °C) 99 % мурашиною кислотою протягом 1 хв. при кімнатній температурі (25 °C). Зрізи тканин інкубували в блокувальному розчині (5 % BSA, 0,3 % Triton X-100 в 50 mM Tris-HCl), а потім протягом ночі з сироваткою, розбавленою 1:1000 в блокувальному розчині. Потім зрізи інкубували з біотинільованим вторинним антитілом (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories) при кімнатній температурі протягом однієї години, а потім піддавали реакції з комплексом авідин-біотин-пероксидаза протягом 60 хвилин (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories), в обох випадках при 25 °C. Імунну реакцію візуалізували за допомогою набору субстрату пероксидази (Vector VIP, Vector laboratories, Ca, США) і контрастно

забарвлювали метиловим зеленим (Vector Laboratories). Зрізи досліджували за допомогою мікроскопа Olympus BX71. Імуногістохімічне забарвлення (фіг. 82A-C, 83) вказує на те, що антитіла, індуковані імунізацією пептидом SEQ ID NO: 270, 271, 275, 276, 280, 281 і 283, специфічно розпізнавали патологічні структури білка тау, тобто нейрофібрилярні вузлики, в гіпокампі тканині головного мозку при хворобі Альцгеймера. Сироватки тварин, вакцинованих згаданими вище пептидами, інтенсивно усували нейрофібрилярну патологію, підтверджуючи, що антитіла націлювалися на патологічні білки тау. Антитіла, індуковані вакцинацією пептидами SEQ ID NO: 272 і 277, демонструють більш слабку інтенсивність забарвлення патологічних структур білка тау в тканинах головного мозку. Пептиди, які індукували більш низькі рівні специфічної до білка тау антитільної відповіді або не індукували специфічну до білка тау антитільну відповідь (SEQ ID NO: 273, 274, 278, 279 і 282), були негативними в цьому аналізі. Сироватки від мишей, яким вводили тільки ад'ювант, використовували як негативні контролю. Вони не розпізнавали нейрофібрилярну патологію (фіг. 82C).

Всі посилання, цитовані в даному описі, включаючи патенти, патентні заявки, статті, довідники і т. п., і посилання, цитовані в них, якщо вони ще не включені, включені в даний опис як посилання в повному обсязі. Крім цього, наступні посилання, які цитовані в попередніх абзацах в більш скороченій формі, також включені в даний опис як посилання в повному обсязі, включаючи посилання, цитовані в таких посиланнях.

Alfaro-Acha *et al.* Handgrip Strength and Cognitive Decline in Older Mexican Americans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* (2006); 61(8): 859–865.

Alonso A, Zaidi T, Novak M, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. 2001.

Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 6923-6928.

Al-Lazikani, B., Lesk, A.M., and Chothia, C. (1997). Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. *Journal of molecular biology* 273, 927-948.

Andreasen N, Blennow K, Zetterberg H. 2010. Neuroinflammation Screening in Immunotherapy Trials against Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis.* 2010:638379.

Asuni AA, Boutajangout A, Quartermain D, Sigurdsson EM.

Immunotherapy targeting pathological tau conformers in a tangle mouse model reduces brain pathology with associated functional improvements. *J Neurosci* 27:9115-9129 (2007).

Balin BJ, Little CS, Hammond CJ, Appelt DM, Whittum-Hudson JA, Gerard HC, Hudson AP. 2008. Chlamydia Pneumoniae and the Etiology of Late-Onset Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis* 13:371–380.

Berg, L., *et al.* Clinicopathologic Studies in Cognitively Healthy Aging and Alzheimer disease. *ARCH NEUROL/VOL* 55, MAR 1998.

Bertram L, Tanzi RE. Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta-analyses. *Nat Rev Neurosci* 9:768-778 (2008).

Bierer, L.M., *et al.* Neocortical Neurofibrillary Tangles Correlate With Dementia Severity in Alzheimer's disease. *Arch Neuro/Vol.* 52, Jan 1995.

Boyle, P., *et al.* Association of Muscle Strength With the Risk of Alzheimer disease and the Rate of Cognitive Decline in Community-Dwelling Older Persons. (REPRINTED) *ARCH NEUROL/VOL* 66 (NO. 11), NOV 2009.

Braak H, Braak E (1999) Temporal sequence of Alzheimer's disease-related pathology. In: Neurodegenerative and age-related changes in structure and function of the cerebral cortex, vol. 14 (Peters, A. and Morrison, J. H., eds), pp 475-512 New York: Kluwer Academic/Plenum Publications.

Braak, H., *et al.* Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82:239 - 259 (1991).

Braak, H., *et al.* The pathological process underlying Alzheimer's disease in individuals under thirty. *Acta Neuropathol* (2011) 121:171–181.

Buchman, A., *et al.*, Frailty is Associated With Incident Alzheimer's disease and Cognitive Decline in the Elderly. *Psychosomatic Medicine* 69:483–489 (2007).

Buchman, A., *et al.*, Grip Strength and the Risk of Incident Alzheimer's disease. *Neuroepidemiology*;29:66–73 (2007)

Buee, L., Bussiere, T., Buee-Scherrer, V., Delacourte, A., Hof, P.R. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Research. Brain Research Reviews.* 33, 95-130.

Burns, A., Zaudig, M. 2002. Mild cognitive impairment in older people. *Lancet*. 360(9349),1963-5.

Burns, J.M., *et al.* The pathology of the substantia nigra in Alzheimer disease with extrapyramidal signs. *Neurology* 2005;64;1397.

Carter J, Lippa CF. Beta-amyloid, neuronal death and Alzheimer's disease. *Curr Mol Med* 1:733-737 (2001).

Cevc G, Gebauer D, Stieber J, Schätzlein A, Blume G (1998) Ultraflexible vesicles, Transfersomes, have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin. *Biochem. Biophys. Acta* 1368, 201-15.

Chui, H.C., *et al.* Extrapyramidal Signs and Psychiatric Symptoms Predict Faster Cognitive Decline in Alzheimer's disease. *Arch Neurol/Vol* 51, July 1994.

Citron, M. (2010). Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nature Rev Drug Discovery* 9, 387-398.

Clavaguera, F., Bolmont, T., Crowther, R.A., Abramowski, D., Probst, A., Fraser, G., Stalder, A.K., Beibel, M., Staufenbiel, M., Jucker, M., Goedert, M., Tolnay, M. (2009). Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol* 11(7), 909-13.

Csokova N, Skrabana R, Liebig HD, Mederlyova A, Kontsek P, Novak M. Rapid purification of truncated tau proteins: model approach to purification of functionally active fragments of disordered proteins, implication for neurodegenerative diseases. *Protein Expr Purif* 35:366-372 (2004).

Current Protocols in Protein Science 2001 May;Chapter 5

Dickey CA, Ash P, Klosak N, Lee WC, Petrucelli L, Hutton M, Eckman CB (Pharmacologic reductions of total tau levels; implications for the role of microtubule dynamics in regulating tau expression. *Mol Neurodegener* 1:6.2006).

Dickey CA, Eriksen J, Kamal A, Burrows F, Kasibhatla S, Eckman CB, Hutton M, Petrucelli L (Development of a high throughput drug screening assay for the detection of changes in tau levels -- proof of concept with HSP90 inhibitors. *Curr Alzheimer Res* 2:231-238.2005).

- Dickey CA, Petrucelli L. Current strategies for the treatment of Alzheimer's disease and other tauopathies. *Expert Opin Ther Targets* 10:665-676 (2006).
- Dodart JC, Bales KR, Gannon KS, Greene SJ, DeMattos RB, Mathis C, DeLong CA, Wu S, Wu X, Holtzman DM, Paul SM (Immunization reverses memory deficits without reducing brain Abeta burden in Alzheimer's disease model. *Nat Neurosci* 5:452-457 (2002).
- Duyckaerts, C., *et al.* Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol* (2009) 118:5–36.
- Duyckaerts, C., *et al.* Diagnosis and Staging of Alzheimer disease. *Neurobiology of Aging*, Vol. 18, No. S4, pp. S33–S42 (1997)
- Duyckaerts, C., *et al.* The progression of the lesions in Alzheimer disease: insights from a prospective clinicopathological study. *J. Neural Transm* (1998) [Suppl] 53:119-126.
- D'Souza, I., and Schellenberg, G.D. (2005). Regulation of tau isoform expression and dementia. *Biochimica et biophysica acta* 1739, 104-115.
- Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Scazufca M (Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 366:2112-2117(2005).
- Filipcik P, Zilka N, Bugos O, Kucerak J, Koson P, Novak P, Novak M. (2010) First transgenic rat model developing progressive cortical neurofibrillary tangles. *Neurobiol Aging*. 2010 Dec 31. [Epub ahead of print]
- Fodero-Tavoletti, M.T., *et al.* F-THK523: a novel *in vivo* tau imaging ligand for Alzheimer's disease. *Brain* 134; 1089–1100 (2011)
- Frenkel D, Dewachter I, Van Leuven F, Solomon B (Reduction of beta-amyloid plaques in brain of transgenic mouse model of Alzheimer's disease by EFRH-phage immunization. *Vaccine* 21:1060-1065 (2003).
- Frost, B., Diamond, M.I. (2009). The expanding realm of prion phenomena in neurodegenerative disease. *Prion* 3(2):74-7.
- Frost, B., Jacks, R.L., Diamond, M.I. (2009). Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J Biol Chem* 284(19),12845-52

Furlan R, Brambilla E, Sanvito F, Roccatagliata L, Olivieri S, Bergami A, Pluchino S, Uccelli A, Comi G, Martino G (Vaccination with amyloid-beta peptide induces autoimmune encephalomyelitis in C57/BL6 mice. *Brain* 126:285-291 (2003).

Gelinas DS, DaSilva K, Fenili D, St George-Hyslop P, McLaurin J (Immunotherapy for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 Suppl 2:14657-14662 (2004).

Giannakopoulos, P., *et al.* Pathologic Correlates of Apraxia in Alzheimer disease. *ARCH NEUROL/VOL* 55, MAY 1998.

Giannakopoulos, P., Herrmann, F.R., Bussiere, T., Bouras, C., Kövari, E., Perl, D.P., Morrison, J.H., Gold, G., Hof, P.R. (2003). Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurology* 60,1495-500.

Glenn GM, Rao M, Matyas GR, Alving CR. (1998). Skin immunization made possible by cholera toxin. *Nature* 391:851.

Goedert, M., Spillantini, M.G., Jakes, R., Rutherford, D., Crowther, R.A. (1989a). Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron*. 3, 519-526.

Goedert, M., Spillantini, M.G., Potier, M.C., Ulrich, J., Crowther, R.A. (1989b.) Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO J*. 8,393-399.

Goldman, W.P., *et al.*, Motor dysfunction in mildly demented AD individuals without extrapyramidal signs. *Neurology* (1999);53;956.

Gomez-Isla T, Hollister R, West H, Mui S, Growdon JH, Petersen RC, Parisi JE, Hyman BT. Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 41:17-24 (1997).

Gómez-Isla, T., Price, J.L., McKeel Jr, D.W., Morris, J.C., Growdon, J.H., Hyman, B.T. (1996). Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci* 16(14),4491-500.

Gómez-Ramos, A., Díaz-Hernández, M., Cuadros, R., Hernández, F., and Avila, J. (2006). Extracellular tau is toxic to neuronal cells. *FEBS Lett* 580(20), 4842-50.

Gómez-Ramos, A., Díaz-Hernández, M., Rubio, A., Díaz-Hernández, J.I., Miras-Portugal, M.T., Avila, J. (2009). Characteristics and consequences of muscarinic receptor activation by tau protein. *Eur Neuropsychopharmacol* 19(10):708-17.

Gómez-Ramos, A., Díaz-Hernández, M., Rubio, A., Miras-Portugal, M.T., Avila, J. (2008). Extracellular tau promotes intracellular calcium increase through M1 and M3 muscarinic receptors in neuronal cells. *Mol Cell Neurosci* 37(4), 673-81.

Goode, B.L., Chau, M., Denis, P.E., Feinstein, S.C. 2000. Structural and functional differences between 3-repeat and 4-repeat tau isoforms. Implications for normal tau function and the onset of neurodegenerative disease. *J Biol Chem* 275, 38182-38189.

Goode, B.L., Feinstein, S.C. (1994). Identification of a novel microtubule binding and assembly domain in the developmentally regulated inter-repeat region of tau. *J Cell Biol.* 124, 769-782.

Greenberg SG, Davies P. A preparation of Alzheimer paired helical filaments that displays distinct tau proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:5827-5831 (1990).

Greenberg SG, Davies P, Schein JD, Binder LI. (1992). Hydrofluoric acid-treated tau PHF proteins display the same biochemical properties as normal tau. *The Journal of Biological Chemistry* 267: 564-569.

Gruden MA, Davudova TB, Malisauskas M, Zamotin VV, Sewell RD, Voskresenskaya NI, Kostanyan IA, Sherstnev VV, Morozova-Roche LA. Autoimmune responses to amyloid structures of Abeta(25-35) peptide and human lysozyme in the serum of patients with progressive Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 18:165-171 (2004).

Grudzien, A., *et al.* Locus coeruleus neurofibrillary degeneration in aging, mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 28 (2007) 327–335.

Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:4913-4917 (1986).

Hampel, H., Blennow, K., Shaw, L.M., Hoessler, Y.C., Zetterberg, H., Trojanowski, J.Q. (2010). Total and phosphorylated tau protein as biological markers of Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* 45(1), 30-40.

Hardy J, Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* 12:383-388 (1991).

Hardy J, Duff K, Hardy KG, Perez-Tur J, Hutton M. Genetic dissection of Alzheimer's disease and related dementias: amyloid and its relationship to tau. *Nat Neurosci* 1:355-358 (1998).

Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353-356 (2002).

Haynes JR, McCabe DE, Swain WF, Widera G, Fuller JT. Particle-mediated nucleic acid immunization. *J Biotechnol* 44:37-42.1996).

Hertz, L. Is Alzheimer's disease an anterograde degeneration, originating in the brainstem, and disrupting metabolic and functional interactions between neurons and glial cells? *Brain Research Reviews*, 14 (1989) 335-353.

Hunter RL. Overview of vaccine adjuvants: present and future. *Vaccine* 2002;20 Suppl. 3:S7-12.

Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Developing pharmacological therapies for Alzheimer disease. *Cell Mol Life Sci* 64:2234-2244 (2007).

Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Inhibition of neurofibrillary degeneration: a promising approach to Alzheimer's disease and other tauopathies. *Curr Drug Targets* 5:495-502 (2004).

Ivanovova N, Handzusova M, Hanes J, Kontsekova E, Novak M. High-yield purification of fetal tau preserving its structure and phosphorylation pattern. *J Immunol Methods* 339:17-22 (2008).

Itzhaki RF, Wozniak MA. 2008. Herpes Simplex Virus Type 1 in Alzheimer's disease: The Enemy Within. *J Alzheimers Dis.* 13:393-405.

Jacobsen JS, Reinhart P, Pangalos MN. Current concepts in therapeutic strategies targeting cognitive decline and disease modification in Alzheimer's disease. *NeuroRx* 2:612-626 (2005).

Jakes, R., Novak, M., Davison, M., Wischik, C.M. (1991). Identification of 3- and 4-repeat tau isoforms within the PHF in Alzheimer's disease. *EMBO J* 10, 2725-2729.

Jansen FK, Blythman HE, Carrière D, Casellas P, Gros O, Gros P, Laurent JC, Paolucci F, Pau B, Poncelet P, Richer G, Vidal H, Voisin GA. (1982). Immunotoxins: hybrid molecules combining high specificity and potent cytotoxicity. *Immun. Rev.* 62, 185-216

Janus C, Pearson J, McLaurin J, Mathews PM, Jiang Y, Schmidt SD, Chishti MA, Horne P, Heslin D, French J, Mount HT, Nixon RA, Mercken M, Bergeron C, Fraser PE, St George-Hyslop P, Westaway D (A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature* 408:979-982.2000).

Jensen FC, Savary JR, Diveley JP, Chang JC (1998). Adjuvant activity of incomplete Freund's adjuvant, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 32:173-186.

Krebber A, Bornhauser S, Burmester J, Honegger A, Willuda J, Bosshard HR, Plückthun A. Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. *J Immunol Methods.* 1997 Feb 14;201(1): 35-55

Kawasaki G (1991). International Patent Application Publication No. WO91/05058.

Kontsekova, E. (2002) International Patent Application Publication No. WO/2004/007547.

Korenova M, Zilka N, Stozicka Z, Bugos O, Vanicky I, Novak M (NeuroScale, the battery of behavioural tests with novel scoring system for phenotyping of transgenic rat model of tauopathy. *J Neurosci Methods* 177:108-114.2009).

Kosik, K.S., Kowall, N.W., McKee, A. (1989a). Along the way to a neurofibrillary tangle: a look at the structure of tau. *Ann Med.* 21,109-112.

Koson P, Zilka N, Kovac A, Kovacech B, Korenova M, Filipcik P, Novak M. Truncated tau expression levels determine life span of a rat model of tauopathy without causing neuronal loss or correlating with terminal neurofibrillary tangle load. *Eur J Neurosci* 28:239-246 (2008).

Kovac, A., Zilkova, M., Deli, M.A., Zilka, N., Novak, M. (2009). Human truncated tau is using a different mechanism from amyloid-beta to damage the blood-brain barrier. *J Alzheimers Dis* 18(4), 897-906.

Kovacech B, Novak M. (2010). Tau truncation is a productive posttranslational modification of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 7: in press.

Kovacech B, Skrabana R, Novak M. (2010). Transition of tau protein from disordered to misordered in Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis* 7: 24-27.

Kraemer, H.C., *et al.* 'How Far' vs 'How Fast' in Alzheimer's disease. *Arch Neurol/Vol* 51, Mar (1994).

Krajciova, G., Skrabana, R., Filipcik, P., and Novak, M. (2008). Preserving free thiols of intrinsically disordered tau protein without the use of a reducing agent. *Anal Biochem* 383, 343-345.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685 (1970).

Langer R, Cleland JL, Hanes J. (1997). New advances in microsphere-based single-dose vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews* 28, 97-119.

Langer R. New methods of drug delivery. (1990) *Science* 249:1527-33.

Larbig G, Pickhardt M, Lloyd DG, Schmidt B, Mandelkow E. Screening for inhibitors of tau protein aggregation into Alzheimer paired helical filaments: a ligand based approach results in successful scaffold hopping. *Curr Alzheimer Res* 4:315-323 (2007).

Lee HG, Perry G, Moreira PI, Garrett MR, Liu Q, Zhu X, Takeda A, Nunomura A, Smith MA Tau phosphorylation in Alzheimer's disease: pathogen or protector? *Trends Mol Med* 11:164-169 (2005).

Liu, Y., *et al.* Pathological Correlates of Extrapyrmidal Signs in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* (1997);4 1:368 -374.

Livingston, B.D., Crimi, C., Grey, H., Ishioka, G., Chisari, F.V., Fikes, J., Grey, H., Chesnut, R.W., and Sette, A. The hepatitis B virus-specific CTL responses induced in humans by lipopeptide vaccination are comparable to those elicited by acute viral infection. *J. Immunol.* 159:1383-1392 (1997).

Louis, E.D., *et al.* Parkinsonian Signs in Older People in a Community-Based Study. (REPRINTED) *ARCH NEUROL/VOL* 61, (AUG 2004).

MacCallum RM, Martin AC, Thornton JM. Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding site topography. *J Mol Biol.* (1996) Oct 11;262(5):732-45.

Macikova I., Dedek L., Kontsekova E., Kontsek P., Ciampor F, Novak M., Vrzal V. (1992) Common and different antigenic properties of the rabies virus glycoprotein between strains SAD-Vnukovo and Pitman-Moore. *Acta virol.* 36, 541-55.

März W, Scharnagl H, Kirça M, Bohl J, Gross W, Ohm TG. 1996. Apolipoprotein E polymorphism is associated with both senile plaque load and Alzheimer-type neurofibrillary tangle formation. *Ann N Y Acad Sci.* 777:276-80.

Matsuo ES, Shin RW, Billingsley ML, Van deVoorde A, O'Connor M, Trojanowski JQ, Lee VM Biopsy-derived adult human brain tau is phosphorylated at many of the same sites as Alzheimer's disease paired helical filament tau. *Neuron* 13:989-1002 (1994).

Miklosy J. 2008. Chronic Inflammation and Amyloidogenesis in Alzheimer's disease – Role of Spirochetes. *J Alzheimer's Dis* 13:381–391 381

Moe, J.G., Chatterjee, I., Davidowitz, E.J., Arancio, O. (2009). Modulation of synaptic function by extracellular tau enriched in oligomers. *Alzheimer Dem* 5 (4), P499

Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE, Ugen KE, Dickey C, Hardy J, Duff K, Jantzen P, DiCarlo G, Wilcock D, Connor K, Hatcher J, Hope C, Gordon M, Arendash GW. A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* 408:982-985 (2000).

Morgan D. 2011. Immunotherapy for Alzheimer's disease. *J Intern Med.* 269(1):54-63.

Morris, J.C., *et al.* Clinical and Pathological Aspects of Parkinsonism in Alzheimer's disease. *Arch Neurol-Vol* 46 (June 1989).

Mouri A, Noda Y, Hara H, Mizoguchi H, Tabira T, Nabeshima T. Oral vaccination with a viral vector containing Abeta cDNA attenuates age-related Abeta accumulation and memory deficits without causing inflammation in a mouse Alzheimer model. *FASEB J* 21:2135-2148 (2007).

Myszka, D.G. (1999) Improving biosensor analysis. *J. Mol. Recognit.* 12, 279-84.

Necula M, Chirita CN, Kuret J Cyanine dye N744 inhibits tau fibrillization by blocking filament extension: implications for the treatment of tauopathic neurodegenerative diseases. *Biochemistry* 44:10227-10237 (2005).

Nicolau C, Greferath R, Balaban TS, Lazarte JE, Hopkins RJ A
liposome-based therapeutic vaccine against beta -amyloid plaques on the pancreas
of transgenic NORBA mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2332-2337 (2002).

Noble W, Planel E, Zehr C, Olm V, Meyerson J, Suleman F, Gaynor K,
Wang L, LaFrancois J, Feinstein B, Burns M, Krishnamurthy P, Wen Y, Bhat R,
Lewis J, Dickson D, Duff K (Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium
correlates with reduced tauopathy and degeneration *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S*
A 102:6990-6995 (2005).

Novak, M., Kabat, J., Wischik, C.M. (1993). Molecular characterization
of the minimal protease resistant tau unit of the Alzheimer's disease paired helical
filament. *EMBO J* 12, 365-70.

Oddo S, Billings L, Kesslak JP, Cribbs DH, LaFerla FM. Abeta
immunotherapy leads to clearance of early, but not late, hyperphosphorylated tau
aggregates via the proteasome. *Neuron* 43:321-332 (2004).

Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R,
Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM. Triple-transgenic model of
Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic
dysfunction. *Neuron* 39:409-421 (2003).

O'Hagan DT, Valiante NM (Recent advances in the discovery and
delivery of vaccine adjuvants. *Nat Rev Drug Discov* 2:727-735 (2003).

O'Mahony, DJ. (1995) International Patent Application Publication No.
WO9717613

Otvos L, Jr., Feiner L, Lang E, Szendrei GI, Goedert M, Lee VM.
(1994). Monoclonal antibody PHF-1 recognizes tau protein phosphorylated at serine
residues 396 and 404. *Journal of neuroscience research* 39: 669-673.

Paul A, Cevc G, Bachhawat BK. (1995). Transdermal immunization
with large proteins by means of ultradeformable drug carriers. *Eur J Immunol.*
Dec;25(12):3521-4.

Pettersson, A.F., *et al.* Motor Function in Subjects with Mild Cognitive
Impairment and Early Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*
(2005);19:299-304.

Pickhardt M, von Bergen M, Gazova Z, Hascher A, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E Screening for inhibitors of tau polymerization. *Curr Alzheimer Res* 2:219-226 (2005).

Price JL, Morris JC Tangles and plaques in nondemented aging and "preclinical" Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 45:358-368 (1999).

Rapoport M, Dawson HN, Binder LI, Vitek MP, Ferreira A Tau is essential to beta -amyloid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:6364-6369 (2002).

Reichert, J.M. (2011). Antibody-based therapeutics to watch in 2011. *mAbs* 3(1),76-99.

Reitz, C., *et al.* Memory performance is related to amyloid and tau pathology in the hippocampus. (Mar 2009); *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2009;80;715-721; originally published online.

Roberson ED, Scearce-Levie K, Palop JJ, Yan F, Cheng IH, Wu T, Gerstein H, Yu GQ, Mucke L Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science* 316:750-754 (2007).

Sambrook J, Russell D (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Santacruz K, Lewis J, Spires T, Paulson J, Kotilinek L, Ingelsson M, Guimaraes A, DeTure M, Ramsden M, McGowan E, Forster C, Yue M, Ome J, Janus C, Mariash A, Kuskowski M, Hyman B, Hutton M, Ashe KH Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* 309:476-481 (2005).

Saurwein-Teissl M, Lung TL, Marx F, Gschösser C, Asch E, Blasko I, Parson W, Böck G, Schönitzer D, Trannoy E, Grubeck-Loebenstien B. 2002. Lack of antibody production following immunization in old age: association with CD8(+)CD28(-) T cell clonal expansions and an imbalance in the production of Th1 and Th2 cytokines. *J Immunol.* 168(11):5893-9.

Scarmeas, N., *et al.* Motor signs during the course of Alzheimer disease. *Neurology.* (2004); 63(6): 975–982.

Scarmeas, N., *et al.* Motor signs predict poor outcomes in Alzheimer disease. *Neurology*. (2005); 64(10): 1696–1703.
doi:10.1212/01.WNL.0000162054.15428.E9.

Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Liao Z, Lieberburg I, Motter R, Mutter L, Soriano F, Shopp G, Vasquez N, Vandever C, Walker S, Wogulis M, Yednock T, Games D, Seubert P Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400:173-177 (1999).

Schenk D, Hagen M, Seubert P Current progress in beta-amyloid immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 16:599-606 (2004).

Schneider, A., Mandelkow, E., (2008). Tau-based treatment strategies in neurodegenerative diseases. *Neurotherapeutics* 5(3), 443-57.

Seabrook GR, Ray WJ, Shearman M, Hutton M Beyond amyloid: the next generation of Alzheimer's disease therapeutics. *Mol Interv* 7:261-270 (2007).

Selkoe DJ Alzheimer's disease: a central role for amyloid. *J Neuropathol Exp Neurol* 53:438-447 (1994).

Shipton OA, Leitz JR, Dworzak J, Acton CE, Tunbridge EM, Denk F, Dawson HN, Vitek MP, Wade-Martins R, Paulsen O, Vargas-Caballero M (Tau Protein Is Required for Amyloid {beta}-Induced Impairment of Hippocampal Long-Term Potentiation. *J Neurosci* 31:1688-1692 (2011).

Siegrist CA, Aspinall R. (2009). B-cell responses to vaccination at the extremes of age. *Nat Rev Immunol*. 9(3):185-94

Sigurdsson EM, Knudsen E, Asuni A, Fitzner-Attas C, Sage D, Quartermain D, Goni F, Frangione B, Wisniewski T (An attenuated immune response is sufficient to enhance cognition in an Alzheimer's disease mouse model immunized with amyloid-beta derivatives. *J Neurosci* 24:6277-6282 (2004).

Sigurdsson EM, Scholtzova H, Mehta PD, Frangione B, Wisniewski T Immunization with a nontoxic/nonfibrillar amyloid-beta homologous peptide reduces Alzheimer's disease-associated pathology in transgenic mice. *Am J Pathol* 159:439-447 (2001).

Simic, G., *et al.* Annotation - Does Alzheimer's disease begin in the brainstem? *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2009 December ; 35(6): 532–554. doi:10.1111/j.1365-2990.2009.01038.x.

Skrabana, R., Sevcik, I., Novak, M. (2006). Intrinsically disordered proteins in the neurodegenerative processes: formation of tau protein paired helical filaments and their analysis. *Cell Mol Neurobiol* 26, 1085-1097.

Skrabana, R., M. Skrabanova-Khuebachova, *et al.* (2006). "Alzheimer's-disease-associated conformation of intrinsically disordered tau protein studied by intrinsically disordered protein liquid-phase competitive enzyme-linked immunosorbent assay." *Anal Biochem* 359(2): 230-7.

Sloane PD, Zimmerman S, Suchindran C, Reed P, Wang L, Boustani M, Sudha S The public health impact of Alzheimer's disease, 2000-2050: potential implication of treatment advances. *Annu Rev Public Health* 23:213-231 (2002).

Soininen, H., *et al.* Extrapyramidal signs in Alzheimer's disease: a 3-year follow-up study. *J Neural Transm [P-D Sect]* (1992) 4:107-119.

Steinhilb ML, Dias-Santagata D, Fulga TA, Felch DL, Feany MB (Tau phosphorylation sites work in concert to promote neurotoxicity *in vivo*. *Mol Biol Cell* 18:5060-5068 (2007a).

Steinhilb ML, Dias-Santagata D, Mulkearns EE, Shulman JM, Biernat J, Mandelkow EM, Feany MB. S/P and T/P phosphorylation is critical for tau neurotoxicity in *Drosophila*. *J Neurosci Res* 85:1271-1278 (2007b).

Taniguchi S, Suzuki N, Masuda M, Hisanaga S, Iwatsubo T, Goedert M, Hasegawa M. Inhibition of heparin-induced tau filament formation by phenothiazines, polyphenols, and porphyrins. *J Biol Chem* 280:7614-7623 (2005a).

Taniguchi T, Sumida M, Hiraoka S, Tomoo K, Kakehi T, Minoura K, Sugiyama S, Inaka K, Ishida T, Saito N, Tanaka C (Effects of different anti-tau antibodies on tau fibrillogenesis: RTA-1 and RTA-2 counteract tau aggregation. *FEBS Lett* 579:1399-1404 (2005b).

Trollet C, Scherman D, Bigey P Delivery of DNA into muscle for treating systemic diseases: advantages and challenges. *Methods Mol Biol* 423:199-214 (2008).

van den Berg JH, Nuijen B, Beijnen JH, Vincent A, van Tinteren H, Kluge J, Woerdeman LA, Hennink WE, Storm G, Schumacher TN, Haanen JB.

Optimization of intradermal vaccination by DNA tattooing in human skin. *Hum Gene Ther* 20:181-189 (2009).

Van Nest G., Ott G., Barchweld G. (1990) Patent Application
Publication No. WO9014837

Vechterova L, Kontsekova E, Zilka N, Ferencik M, Ravid R, Novak M. (2003). DC11: a novel monoclonal antibody revealing Alzheimer's disease-specific tau epitope. *Neuroreport* 14: 87-91.

Wai, M., *et al.* Co-localization of hyperphosphorylated tau and caspases in the brainstem of Alzheimer's disease patients. *Biogerontology* (2009) 10:457–469.

Waite, L.M., *et al.* Gait slowing as a predictor of incident dementia: 6-year longitudinal data from the Sydney Older Persons Study. *Journal of the Neurological Sciences* 229– 230 (2005) 89–93

Walsh DM, Selkoe DJ. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron* 44:181-193 (2004).

Wang, Li, *et al.* Performance-Based Physical Function and Future Dementia in Older People. (REPRINTED) *ARCH INTERN MED/VOL* 166 (MAY 22, 2006).

Weiner HL, Lemere CA, Maron R, Spooner ET, Grenfell TJ, Mori C, Issazadeh S, Hancock WW, Selkoe DJ (Nasal administration of amyloid-beta peptide decreases cerebral amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 48:567-579 (2000).

Weng NP, Akbar AN, Goronzy J. 2009. CD28(-) T cells: their role in the age-associated decline of immune function. *Trends Immunol.* 30(7):306-12.

West, M.J., Coleman, P.D., Flood, D.G., Troncoso, J.C. (1994). Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet* 344,769-72.

Wilson, R.S., *et al.* Parkinsonian-like Signs and Risk of Incident Alzheimer disease in Older Persons. (REPRINTED) *ARCH NEUROL/VOL* 60 (APR 2003).

Wilson-Welder JH, Torres MP, Kipper MJ, Mallapragada SK, Wannemuehler MJ, Narasimhan B. Vaccine adjuvants: current challenges and future approaches. *J Pharm Sci* 98:1278-1316 (2009).

Wischik CM, Edwards PC, Lai RY, Roth M, Harrington CR (Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11213-11218 (1996).

Wischik, C.M., Novak, M., Edwards, P.C., Klug, A., Tichelaar, W., Crowther, R.A. (1988a). Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease, *Proc Natl Acad Sci USA* 85,4884-8.

Wischik, C.M., Novak, M., Thøgersen, H.C., Edwards, P.C., Runswick, M.J., Jakes, R., Walker, J.E., Milstein, C., Roth, M., Klug, A. (1988b). Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease, *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 4506-10.

Xing Z, Santosuosso M, McCormick S, Yang TC, Millar J, Hitt M, Wan Y, Bramson J, Vordermeier HM. Recent advances in the development of adenovirus- and poxvirus-vectored tuberculosis vaccines. *Curr Gene Ther* 5:485-492 (2005).

Zarow, C., *et al.* Neuronal Loss Is Greater in the Locus Coeruleus Than Nucleus Basalis and Substantia Nigra in Alzheimer and Parkinson diseases. (REPRINTED) *ARCH NEUROL/VOL* 60, MAR 2003.

Zhang B, Maiti A, Shively S, Lakhani F, McDonald-Jones G, Bruce J, Lee EB, Xie SX, Joyce S, Li C, Toleikis PM, Lee VM, Trojanowski JQ. Microtubule-binding drugs offset tau sequestration by stabilizing microtubules and reversing fast axonal transport deficits in a tauopathy model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:227-231 (2005).

Zhang J, Wu X, Qin C, Qi J, Ma S, Zhang H, Kong Q, Chen D, Ba D, He W (A novel recombinant adeno-associated virus vaccine reduces behavioural impairment and beta-amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 14:365-379 (2003).

Zielinski C, Scheiner O, Jensen-Jarolim E, Breiteneder H, Pehamberger H. (2003). Patent Application Publication No. WO03/020750

Zilka N, Vechterová L, Kontseková E, Novák M. (2003) A rapid immunohistochemical primary screening assay for hybridomas. *J Immunol Methods*. 272(1-2):49-53.

Zilka N, Filipcik P, Koson P, Fialova L, Skrabana R, Zilkova M, Rolkova G, Kontseкова E, Novak M. Truncated tau from sporadic Alzheimer's disease

suffices to drive neurofibrillary degeneration *in vivo*. *FEBS Lett* 580:3582-3588 (2006).

Zilka, N., *et al.* Chaperone-like Antibodies Targeting Misfolded Tau Protein: New Vistas in the Immunotherapy of Neurodegenerative Foldopathies. *Journal of Alzheimer's disease* 15 (2008) 169–179.

Zilkova, M., Koson, P., Zilka, N. 2006. The hunt for dying neurons: insight into the neuronal loss in Alzheimer's disease. *Bratisl Lek Listy* 107(9-10), 366-73.

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> NOVAK, MICHAL

KONTSEKOVA, EVA

5 KOVACECH, BRANISLAV

ZILKA, NORBERT

<120> ТЕРАПІЯ І ДІАГНОСТИКА НА ОСНОВІ БІЛКІВ ТАУ-ОПОСЕРЕДКОВУВАНОЇ
ПАТОЛОГІЇ ПРИ ХВОРОБІ АЛЬЦГЕЙМЕРА

<130> 1163400010000

10 <150> US 61/536,339

<151> 2011-09-19

<150> US 61/653,115

<151> 2012-05-30

<160> 283

15 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 30

<212> БІЛОК

<213> Homo sapiens

20 <400> 1

Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu

1

5

10

15

Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys

20

25

30

<210> 2

<211> 30

<212> БІЛОК

25 <213> Homo sapiens

<400> 2

Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly

1

5

10

15

Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser

20

25

30

<210> 3

<211> 30

<212> БІЛОК

30 <213> Homo sapiens

<400> 3

Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys

1

5

10

15

Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln

20

25

30

<210> 4

<211> 30

<212> БІЛОК

35

<213> Homo sapiens

<400> 4

Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys

1 5 10 15

Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly

20 25 30

<210> 5

<211> 30

<212> БЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 5

Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro

1 5 10 15

Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg

20 25 30

<210> 6

<211> 30

<212> БЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 6

Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr

1 5 10 15

Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu

20 25 30

<210> 7

<211> 30

<212> БЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 7

Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly

1 5 10 15

Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser

20 25 30

<210> 8

<211> 18

<212> БЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 8

Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu
1 5 10 15

5 Ser Lys
<210> 9
<211> 30
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 9
Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys
1 5 10 15

10 Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly
20 25 30
<210> 10
<211> 30
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 10
Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile
1 5 10 15

15 Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys
20 25 30
<210> 11
<211> 30
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 11
Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly
1 5 10 15

20 Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val
20 25 30
<210> 12
<211> 30
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 12

Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser
1 5 10 15

Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln
20 25 30

<210> 13
<211> 30
<212> БЛОК
5 <213> Homo sapiens
<400> 13

Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr
1 5 10 15

Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile
20 25 30

<210> 14
10 <211> 30
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 14

Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu
1 5 10 15

Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile
20 25 30

<210> 15
15 <211> 30
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 15

Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn
1 5 10 15

Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn
20 25 30

<210> 16
20 <211> 30
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
25 <400> 16

Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys
1 5 10 15

His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys
20 25 30

<210> 17

<211> 30

<212> БЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 17

Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His

1 5 10 15

Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu

5 20 25 30

<210> 18

<211> 30

<212> БЛОК

<213> Homo sapiens

10 <400> 18

Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln

1 5 10 15

Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp

20 25 30

<210> 19

<211> 30

<212> БЛОК

15 <213> Homo sapiens

<400> 19

Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro

1 5 10 15

Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu

20 25 30

<210> 20

<211> 30

20 <212> БЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 20

Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn

20 25 30

<210> 21

<211> 30

<212> БЛОК

25 <213> Homo sapiens

<400> 21

Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly
1 5 10 15

Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val
20 25 30

<210> 22

<211> 30

<212> БЛОК

5 <213> Homo sapiens

<400> 22

Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val
1 5 10 15

Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser
20 25 30

<210> 23

<211> 30

10 <212> БЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 23

Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln
1 5 10 15

Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys
20 25 30

<210> 24

<211> 30

15 <212> БЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 24

Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile
1 5 10 15

Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys
20 25 30

<210> 25

<211> 30

<212> БЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 25

Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile
1 5 10 15

Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly
20 25 30

5
<210> 26
<211> 30
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 26

Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn
1 5 10 15

Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser
20 25 30

10
<210> 27
<211> 30
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 27

Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys
1 5 10 15

Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys
20 25 30

15
<210> 28
<211> 30
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 28

Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys
1 5 10 15

Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp
20 25 30

20
<210> 29
<211> 30
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 29

Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu
1 5 10 15

Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn
20 25 30

5
<210> 30
<211> 30
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 30

Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys
1 5 10 15

Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser
20 25 30

10
<210> 31
<211> 30
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 31

Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly
1 5 10 15

Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val
20 25 30

15
<210> 32
<211> 30
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 32

Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser
1 5 10 15

Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln
20 25 30

20
<210> 33
<211> 30
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 33

Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys
25 1 5 10 15

Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile
20 25 30
<210> 34
<211> 30
<212> БЛОК
5 <213> Homo sapiens
<400> 34
Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp
1 5 10 15

Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val
20 25 30
<210> 35
<211> 30
10 <212> БЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 35
Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn
1 5 10 15

Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr
20 25 30
<210> 36
<211> 30
15 <212> БЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 36
Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile
1 5 10 15
Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys
20 25 30
<210> 37
<211> 30
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
25 <400> 37
Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys
1 5 10 15

His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro
20 25 30
<210> 38
<211> 30
<212> БЛОК
30 <213> Homo sapiens

<400> 38

Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His
1 5 10 15

Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val
20 25 30

<210> 39

<211> 30

5

<212> БЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 39

Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val
1 5 10 15

Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp
20 25 30

<210> 40

10

<211> 30

<212> БЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 40

Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu
20 25 30

15

<210> 41

<211> 30

<212> БЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 41

Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly
1 5 10 15

Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser
20 25 30

20

<210> 42

<211> 30

<212> БЛОК

<213> Homo sapiens

25

<400> 42

Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly
1 5 10 15

Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys
20 25 30

5
<210> 43
<211> 30
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 43

Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val
20 25 30

10
<210> 44
<211> 30
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 44

Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr
20 25 30

15
<210> 45
<211> 30
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 45

Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln
1 5 10 15

Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys
20 25 30

20
<210> 46
<211> 30
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 46

Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile
1 5 10 15

Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys
20 25 30

<210> 47

<211> 30

<212> БІЛОК

5 <213> Homo sapiens

<400> 47

Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val
1 5 10 15

Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly
20 25 30

<210> 48

<211> 30

10 <212> БІЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 48

Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr
1 5 10 15

Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser
20 25 30

<210> 49

<211> 30

15 <212> БІЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 49

Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys
1 5 10 15

Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu
20 25 30

20 <210> 50

<211> 30

<212> БІЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 50

Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro
1 5 10 15

Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly
20 25 30

5
<210> 51
<211> 30
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 51

Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val
1 5 10 15

Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn
20 25 30

10
<210> 52
<211> 30
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 52

Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys
1 5 10 15

Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln
20 25 30

15
<210> 53
<211> 30
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 53

Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly
1 5 10 15

Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val
20 25 30

20
<210> 54
<211> 30
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
25
<400> 54

Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser
1 5 10 15

Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu
20 25 30

<210> 55
<211> 30
<212> БІЛОК
5 <213> Homo sapiens
<400> 55

Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu
1 5 10 15

Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val
20 25 30

<210> 56
<211> 30
10 <212> БІЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 56

Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys
20 25 30

15 <210> 57
<211> 30
<212> БІЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 57

Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn
1 5 10 15

Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser
20 25 30

20 <210> 58
<211> 30
<212> БІЛОК
<213> Homo sapiens
25 <400> 58

Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile
1 5 10 15

His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu
20 25 30

<210> 59

<211> 30

<212> БЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 59

Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His
1 5 10 15

His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys
20 25 30

<210> 60

<211> 30

<212> БЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 60

Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His
1 5 10 15

Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu
20 25 30

<210> 61

<211> 30

<212> БЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 61

Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys
1 5 10 15

Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp
20 25 30

<210> 62

<211> 30

<212> БЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 62

Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe
20 25 30

<210> 63

<211> 30

<212> БЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 63

Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys
20 25 30

<210> 64

<211> 30

<212> БЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 64

Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp
20 25 30

<210> 65

<211> 30

<212> БЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 65

Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly
1 5 10 15

Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg
20 25 30

<210> 66

<211> 30

<212> БЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 66

Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln
1 5 10 15

Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val
20 25 30

5
<210> 67
<211> 30
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 67

Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val
1 5 10 15

Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln
20 25 30

10
<210> 68
<211> 30
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 68

Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu
1 5 10 15

Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser
20 25 30

15
<210> 69
<211> 30
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 69

Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val
1 5 10 15

Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys
20 25 30

20
<210> 70
<211> 30
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 70

Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys
1 5 10 15

Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile
20 25 30

5
<210> 71
<211> 30
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 71

Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser
1 5 10 15

Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly
20 25 30

10
<210> 72
<211> 30
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 72

Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu
1 5 10 15

Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser
20 25 30

15
<210> 73
<211> 30
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 73

Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys
1 5 10 15

Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu
20 25 30

20
<210> 74
<211> 30
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
25
<400> 74

His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu
1 5 10 15

Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp
20 25 30

5
<210> 75
<211> 30
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 75

Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile
1 5 10 15

Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
20 25 30

10
<210> 76
<211> 30
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 76

Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly
1 5 10 15

Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys
20 25 30

15
<210> 77
<211> 30
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 77

Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser
1 5 10 15

Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys
20 25 30

20
<210> 78
<211> 30
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
25
<400> 78

Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu
1 5 10 15

Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile
20 25 30

<210> 79

<211> 30

<212> БЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 79

Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp
1 5 10 15

Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu
20 25 30

<210> 80

<211> 30

<212> БЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 80

Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn
1 5 10 15

Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr
20 25 30

<210> 81

<211> 30

<212> БЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 81

Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile
1 5 10 15

Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His
20 25 30

<210> 82

<211> 30

<212> БЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 82

Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr
1 5 10 15

His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys
20 25 30
<210> 83
<211> 30
<212> БЛОК
5 <213> Homo sapiens
<400> 83

Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His
1 5 10 15

Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu
20 25 30
<210> 84
<211> 30
10 <212> БЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 84

Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val
1 5 10 15

Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr
20 25 30
<210> 85
15 <211> 30
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 85

Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro
1 5 10 15

Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe
20 25 30
20 <210> 86
<211> 30
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 86

Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly
1 5 10 15

Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg
20 25 30

5
<210> 87
<211> 30
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 87

Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly
1 5 10 15

Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu
20 25 30

10
<210> 88
<211> 31
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 88

Cys Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly
1 5 10 15

Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn
20 25 30

15
<210> 89
<211> 30
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 89

Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
1 5 10 15

Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala
20 25 30

20
<210> 90
<211> 30
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 90

Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys
1 5 10 15

Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys
20 25 30

5
<210> 91
<211> 30
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 91

Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys
1 5 10 15

Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala
20 25 30

10
<210> 92
<211> 30
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 92

Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile
1 5 10 15

Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys
20 25 30

15
<210> 93
<211> 30
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 93

Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu
1 5 10 15

Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr
20 25 30

20
<210> 94
<211> 30
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
25
<400> 94

Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr
1 5 10 15

His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp
20 25 30

<210> 95

<211> 30

<212> БЛОК

5 <213> Homo sapiens

<400> 95

Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His
1 5 10 15

Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His
20 25 30

<210> 96

<211> 30

10 <212> БЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 96

Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys
1 5 10 15

Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly
20 25 30

15 <210> 97

<211> 30

<212> БЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 97

Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu
1 5 10 15

Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala
20 25 30

20 <210> 98

<211> 7

<212> БЛОК

<213> Homo sapiens

25 <400> 98

Lys His Gln Pro Gly Gly Gly

1 5

<210> 99

<211> 7

<212> БЛОК

30 <213> Homo sapiens

<400> 99
 Lys His Val Pro Gly Gly Gly
 1 5
 <210> 100
 <211> 7
 5 <212> БЛОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 100
 His His Lys Pro Gly Gly Gly
 1 5
 <210> 101
 10 <211> 7
 <212> БЛОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 101
 Thr His Val Pro Gly Gly Gly
 1 5
 15 <210> 102
 <211> 441
 <212> БЛОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 102
 Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
 1 5 10 15

 Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
 20 25 30

 Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
 35 40 45

 Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
 20 50 55 60

Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
65 70 75 80

Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
85 90 95

Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
100 105 110

Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
115 120 125

Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
130 135 140

Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
145 150 155 160

Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
165 170 175

Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
180 185 190

Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
195 200 205

Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
210 215 220

Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys
225 230 235 240

Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val
245 250 255

Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Gln Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
260 265 270

Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln
275 280 285
Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly
290 295 300

Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser
305 310 315 320

Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln
325 330 335

Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser
340 345 350

Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
355 360 365

Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala
370 375 380

Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser
385 390 395 400

Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser
405 410 415

Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val
420 425 430

Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
435 440

<210> 103

<211> 412

<212> БІЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 103

5

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1 5 10 15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
20 25 30

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
35 40 45

Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
50 55 60

Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly
65 70 75 80

Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala
85 90 95

Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys
100 105 110

Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala
115 120 125

Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala
130 135 140

Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro
145 150 155 160

Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr
165 170 175

Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg
180 185 190

Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser
195 200 205

Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu
210 215 220

Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln
225 230 235 240

Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser
245 250 255

Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro
260 265 270

Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys
275 280 285
Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly
290 295 300

Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg
305 310 315 320

Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly
325 330 335
Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn
340 345 350

Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro
355 360 365

Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser
370 375 380

Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala
385 390 395 400

Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
405 410

<210> 104

<211> 410

<212> БИЛОК

5 <213> Homo sapiens

<400> 104

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1 5 10 15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
20 25 30

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
35 40 45

Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
50 55 60

Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
65 70 75 80

Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
85 90 95

Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
100 105 110

Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
 115 120 125

Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
 130 135 140

Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
 145 150 155 160

Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
 165 170 175
 Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
 180 185 190

Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
 195 200 205

Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
 210 215 220
 Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys
 225 230 235 240

Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val
 245 250 255

Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
 260 265 270

Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr
275 280 285

Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly
290 295 300

Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln
305 310 315 320

Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly
325 330 335

Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys
340 345 350

Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val
355 360 365

Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly
370 375 380

Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu
385 390 395 400

Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
405 410

<210> 105

<211> 383

<212> БІЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 105

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1 5 10 15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
20 25 30

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Ala Glu Glu Ala
35 40 45
Gly Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val
50 55 60

Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp
65 70 75 80

Asp Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro
85 90 95
Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg
100 105 110

Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly
115 120 125

Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser
130 135 140

Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro
145 150 155 160

Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys
165 170 175

Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met
180 185 190

Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu
195 200 205
Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu
210 215 220

Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys
225 230 235 240

His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp
245 250 255
Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His
260 265 270

Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe
275 280 285

Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His
290 295 300

Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe
305 310 315 320

Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr
325 330 335

Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn
340 345 350

Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala
355 360 365

Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
370 375 380

5 <210> 106
<211> 381
<212> БІЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 106

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1 5 10 15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
20 25 30

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
35 40 45

Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
50 55 60

Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly
65 70 75 80

Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala
85 90 95

Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys
100 105 110

Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala
115 120 125

Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala
130 135 140

Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro
145 150 155 160

Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr
165 170 175

Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg
180 185 190

Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser
195 200 205

Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu
210 215 220

Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln
225 230 235 240

Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser
245 250 255

Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro
260 265 270

Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp
275 280 285

Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro
290 295 300

Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu
305 310 315 320

Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser
325 330 335

Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser
340 345 350

Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu
355 360 365

Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
370 375 380

<210> 107

<211> 352

<212> БІЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 107

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1 5 10 15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
20 25 30

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Ala Glu Glu Ala
35 40 45

Gly Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val
50 55 60

Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp
65 70 75 80

Asp Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro
85 90 95

Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg
100 105 110

Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly
115 120 125

Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser
130 135 140

Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro
145 150 155 160

Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys
165 170 175

Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met
180 185 190

Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu
195 200 205

Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val
210 215 220

Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His
225 230 235 240

His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp
245 250 255

Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr
260 265 270

His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr
275 280 285

Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val
290 295 300

Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser
305 310 315 320

Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu
325 330 335

Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
340 345 350

- 5
<210> 108
<211> 12
<212> БЛОК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид
<400> 108

Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser
1 5 10

- 10
<210> 109
<211> 29
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 109

Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His
1 5 10 15
His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu
20 25

- 20
<210> 110
<211> 30
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 110

Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly
1 5 10 15

Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn
20 25 30

- 25
<210> 111
<211> 12
<212> БЛОК

<213> Homo sapiens
 <400> 111
 Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln
 1 5 10
 5 <210> 112
 <211> 12
 <212> БЛОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 112
 Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
 1 5 10
 10 <210> 113
 <211> 8
 <212> БЛОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 113
 Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys
 1 5
 15 <210> 114
 <211> 29
 <212> БЛОК
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 114
 Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro
 1 5 10 15

 Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu
 20 25
 25 <210> 115
 <211> 6
 <212> БЛОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 115
 Val Gln Ile Val Tyr Lys
 1 5
 30 <210> 117
 <211> 12
 <212> БЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид
 <400> 117
 Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr
 1 5 10
 35 <210> 118
 <211> 3
 <212> БЛОК
 <213> Штучна послідовність
 40 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид
 <400> 118

Trp Ala Ser
1
<210> 119
<211> 8
<212> БЛОК
5 <213> Штучна послідовність
<220>
<223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид
<400> 119
Lys Gln Ser Phe Tyr Leu Arg Thr
1 5
10 <210> 120
<211> 10
<212> БЛОК
<213> Штучна послідовність
<220>
15 <223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид
<400> 120
Gly Tyr Ile Phe Thr Asp Tyr Val Ile Ser
1 5 10
20 <210> 121
<211> 8
<212> БЛОК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид
<400> 121
Ile Phe Pro Arg Ser Gly Ser Thr
1 5
25 <210> 122
<211> 13
<212> БЛОК
<213> Штучна послідовність
30 <220>
<223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид
<400> 122
Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly Thr Ser Phe Ala Met Asp Tyr
1 5 10
35 <210> 123
<211> 13
<212> БЛОК
<213> Вірус грипу А
<400> 123
Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr
1 5 10
40 <210> 124
<211> 13
<212> БЛОК
<213> Штучна послідовність
<220>
45 <223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид
<220>
<221> МОДИФІКОВАНИЙ ЗАЛИШОК
<222> (3)...(3)
<223> Будь-яка амінокислота
50 <400> 124

Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala
1 5 10
<210> 125
<211> 16
<212> БЛОК
5 <213> Plasmodium falciparum
<400> 125
Glu Lys Lys Ile Ala Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser Val Phe Asn Val
1 5 10 15
<210> 126
<211> 10
10 <212> БЛОК
<213> Вірус гепатиту В
<400> 126
Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile
1 5 10
<210> 127
15 <211> 19
<212> БЛОК
<213> Невідомий
<220>
<223> Опис невідомої послідовності: білок теплового шоку 65
20 <400> 127
Asp Gln Ser Ile Gly Asp Leu Leu Ala Glu Ala Met Asp Lys Val Gly
1 5 10 15
Asn Glu Gly
<210> 128
<211> 14
<212> БЛОК
25 <213> Mycobacterium bovis
<400> 128
Gln Val His Phe Gln Pro Leu Pro Pro Ala Val Val Lys Leu
1 5 10
<210> 129
<211> 15
30 <212> БЛОК
<213> Clostridium tetani
<400> 129
Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu
1 5 10 15
<210> 130
35 <211> 21
<212> БЛОК
<213> Clostridium tetani
<400> 130

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
1 5 10 15

Ala Ser His Leu Glu

20

<210> 131

<211> 16

<212> БЛОК

5 <213> Вірус імунodefіциту людини

<400> 131

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala

1

5

10

15

<210> 132

<211> 29

10 <212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний праймер

<400> 132

15 acattgtgat gtcacagtct ccatactcc

29

<210> 133

<211> 23

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

20 <220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний праймер

<400> 133

ctcctccaat tgcagcagtc tgg

23

<210> 134

25 <211> 10

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид

30 <400> 134

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser

1

5

10

<210> 135

<211> 10

<212> БЛОК

35 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид

<400> 135

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu

1

5

10

40 <210> 136

<211> 30

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

45 <223> Опис штучної послідовності: синтетичний праймер

<400> 136

```

ggaattcggtt gaagctcttg acaatgggtg                                     30
<210> 137
<211> 30
<212> ДНК
5 <213> Штучна послідовність
<220>
<223> Опис штучної послідовності: синтетичний праймер
<400> 137
ggaattcaca tatgcaaggc ttacaaaccac                                     30
10 <210> 138
<211> 120
<212> БЛОК
<213> Штучна послідовність
<220>
15 <223> Опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид
<400> 138
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Thr
1           5           10           15

Ser Val Lys Met Pro Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asp Tyr
           20           25           30

Val Ile Ser Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
           35           40           45

Gly Glu Ile Phe Pro Arg Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
           50           55           60

```

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Val Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly Thr Ser Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 139

<211> 120

<212> БЛОК

5 <213> Homo sapiens

<400> 139

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Asn His Cys Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 140

<211> 120

<212> БЛОК

5 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид

<400> 140

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Pro Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Val Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Glu Ile Phe Pro Arg Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly Thr Ser Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 141

<211> 112

<212> БЛОК

5 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид

<400> 141

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
85 90 95

Ser Phe Tyr Leu Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys
100 105 110

<210> 142

<211> 112

<212> БИЛОК

5 <213> Homo sapiens

<400> 142

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 143

<211> 112

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

5 <223> Опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид

<400> 143

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser

20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln

85 90 95

Ser Phe Tyr Leu Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 144

10 <211> 11

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид

15 <400> 144

Ala Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 145

<211> 120

<212> БЛОК

20 <213> Mus sp.

<400> 145

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Tyr Pro Arg Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly Thr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 146

<211> 11

5

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид

<400> 146

Asp Ala Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser

10

1 5 10

<210> 147

<211> 120

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

15

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид

<400> 147

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Val Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Pro Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Glu Ile Phe Pro Arg Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly Thr Ser Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 148

5 <211> 120

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид

10 <400> 148

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Val Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Pro Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Glu Ile Phe Pro Arg Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly Thr Ser Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

- 5
<210> 149
<211> 11
<212> БЛОК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид
<400> 149
Asp Asn Ala Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser
10 1 5 10
<210> 150
<211> 112
<212> БЛОК
<213> Mus sp.
15 <400> 150

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
85 90 95

Ser Tyr Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 151

<211> 11

5 <212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид

<400> 151

Asp Asn Ile Ala His Val Pro Gly Gly Gly Ser

10 1 5 10

<210> 152

<211> 112

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

15 <220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид

<400> 152

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Asn Ser
20 25 30

Arg Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
85 90 95

Ser Phe Tyr Leu Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 153

<211> 112

5

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид

<400> 153

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Asn Ser
20 25 30

Arg Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

10

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
85 90 95

Ser Phe Tyr Leu Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 154
<211> 6
<212> БЛОК
5 <213> Homo sapiens
<400> 154
His Val Pro Gly Gly Gly

1 5

<210> 155
<211> 29
10 <212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Опис штучної послідовності: синтетичний праймер
<400> 155

15 atattaccat ggacattgtg atgtcacag 29

<210> 156

<211> 32

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

20 <220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний праймер

<400> 156

atattattot cgagggagac ggtgactgag gt 32

<210> 157

25 <211> 51

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний праймер

30 <400> 157

ggcgggggcy gctccgggtg tgggtggtcc atgcagggtcc aattgcagca g 51

<210> 158

<211> 69

<212> ДНК

35 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний праймер

<400> 158

ggagccgccc cccccagaac caccaccacc agaaccacca ccccccgtt tgatgtccag 60

cttggtgcc

69

<210> 159

<211> 11

5 <212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид

<400> 159

Asp Asn Ile Lys Ala Val Pro Gly Gly Gly Ser

10 1 5 10

<210> 160

<211> 17

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

15 <220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид

<400> 160

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

1 5 10 15

Tyr

20 <210> 161

<211> 11

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид

25 <400> 161

Asp Asn Ile Lys His Ala Pro Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 162

<211> 15

<212> БЛОК

30 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид

<400> 162

Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu

1 5 10 15

35 <210> 163

<211> 6

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

40 <223> Опис штучної послідовності: синтетична 6xHis-мітка

<400> 163

His His His His His His

1 5

<210> 164

<211> 6
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 5 <223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид
 <220>
 <221> МОДИФІКОВАНИЙ ЗАЛИШОК
 <222> (2)...(2)
 <223> Будь-яка амінокислота
 10 <400> 164
 His Xaa Pro Gly Gly Gly
 1 5
 <210> 165
 <211> 336
 <212> ДНК
 15 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: синтетичний полінуклеотид
 <400> 165
 gacattgtga tgcacagtc tccatcctcc ctggcgtgt cagcaggaga gaaggtcact 60
 atgagctgca aatccagtc gagtctgctc aacagtagaa cccgaaagaa ctacctggct 120
 tggtaaccagc agaaaccagg gcagtcctct aaactgctga tctactgggc atccactagg 180
 gaatctgggg tccctgactg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcaagcaatc tttttatctt 300
 cggacgttcg gtggaggcac caagctggac atcaaa 336
 20 <210> 166
 <211> 301
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 25 <223> Опис штучної послідовності: синтетичний полінуклеотид
 <400> 166

	gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtcact	60
	atgagctgca aatccagtca gagtctgctc aacagtagaa cccgaaagaa ctacttggct	120
	tggtaaccagc agaaaccagg gcagtcctct aaactgctga tctactgggc atccactagg	180
	gaatctgggg tccctgacgc cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc	240
	atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcaagcaatc tttttatctt	300
	c	301
5	<210> 167 <211> 301 <212> ДНК <213> Mus sp. <400> 167	
	gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtcact	60
	atgagctgca aatccagtca gagtctgctc aacagtagaa cccgaaagaa ctacttggct	120
	tggtaaccagc agaaaccagg gcagtcctct aaactgctga tctactgggc atccactagg	180
	gaatctgggg tccctgacgc cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc	240
	atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcaagcaatc tttttatctt	300
	c	301
10	<210> 168 <211> 36 <212> ДНК <213> Штучна послідовність <220> <223> Опис штучної послідовності: синтетичний олігонуклеотид <400> 168	
15	ggacgttcgg tggaggcacc aagctggaca tcaaac	36
	<210> 169 <211> 36 <212> ДНК <213> Mus sp. <400> 169	
20	ggacgttcgg tggaggcacc aagctggaaa tcaaac	36
	<210> 170 <211> 360 <212> ДНК <213> Штучна послідовність <220> <223> Опис штучної послідовності: синтетичний полінуклеотид <400> 170	
25		

	cagggtccaat tgcagcagtc tggacctgag ctggtgaagc ctgggacttc agtgaagatg	60
	ccctgtaagg cttctggata catattcact gactatgtca taagctgggt gaagcagaga	120
	actggacagg gccttgagtg gattggagag atttttccta gaagtggtag tacttactac	180
	aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccaa cacagcctac	240
	atgcagctca gcagcgtgac atctgaggac tctgcggtct attctgtgc aagagattac	300
	tacggtactt catttgctat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctctca	360
5	<210> 171 <211> 11 <212> БЛОК <213> Штучна послідовність <220> <223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид <400> 171 Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser	
10	1 5 10 <210> 172 <211> 294 <212> ДНК <213> Штучна послідовність <220>	
15	<223> Опис штучної послідовності: синтетичний полінуклеотид <400> 172 cagggtccaat tgcagcagtc tggacctgag ctggtgaagc ctgggacttc agtgaagatg	60
	ccctgtaagg cttctggata catattcact gactatgtca taagctgggt gaagcagaga	120
	actggacagg gccttgagtg gattggagag atttttccta gaagtggtag tacttactac	180
	aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccaa cacagcctac	240
	atgcagctca gcagcgtgac atctgaggac tctgcggtct attctgtgc aaga	294
20	<210> 173 <211> 294 <212> ДНК <213> Mus sp. <400> 173	

	caggttcagc tgcagcagtc tggagctgag ctggcgaggc ctggggcttc agtgaagctg	60
	tcttgcaagg cttctggcta cacccttcaca agctatggta taagctgggt gaagcagaga	120
	actggacagg gccttgagtg gattggagag atttatctta gaagtggtaa tacttactac	180
	aatgagaagt tcaagggcaa ggcacactg actgcagaca aatctctcag cacagcgtac	240
	atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attctctgtgc aaga	294
5	<210> 174 <211> 14 <212> ДНК <213> Штучна послідовність <220> <223> Опис штучної послідовності: синтетичний олігонуклеотид <400> 174	
10	gattactacg gtac	14
	<210> 175 <211> 15 <212> ДНК <213> Mus sp. <400> 175	
15	gactactata ggtac	15
	<210> 176 <211> 53 <212> ДНК <213> Штучна послідовність <220> <223> Опис штучної послідовності: синтетичний олігонуклеотид <400> 176	
20	ttcatttgct atggactact ggggtcaagg aacctcagtc accgtctctt cag	53
25	<210> 177 <211> 53 <212> ДНК <213> Mus sp. <400> 177	
30	ttactatgct atggactact ggggtcaagg aacctcagtc accgtctctt cag	53
	<210> 178 <211> 267 <212> ДНК <213> Штучна послідовність <220> <223> Опис штучної послідовності: синтетичний полінуклеотид <400> 178	
35		

	ggggtgatgc tgcacaaact gtatccatct tcccaccatc cagtgcagcag ttaacatctg	60
	gaggtgcctc agtcgtgtgc ttcttgaaca acttctaccc caaagacatc aatgtcaggt	120
	ggaagattga tggcagtgaa cgacaaaatg gcgtcctgaa cagttggact gatcaggaca	180
	gcaaagacag caactacagc atgagcagca ccttcacgtt gaccaaggac gagtatgaac	240
	gacataacag ctatacctgt gaggcca	267
	<210> 179	
	<211> 276	
	<212> ДНК	
5	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> Опис штучної послідовності: синтетичний полінуклеотид	
	<400> 179	
	ccaaaaagac aaccccatct gtatatccac tggccctgg atctgctgcc caaactaaat	60
	ccatggtgac cctgggaigc ctgggtcaagg gctatttccc tgagccagtg acagtgacct	120
	ggaactcttg areccctgccc agcgggtgtgc acaccttccc agctgtcctg cagtctgacc	180
	tctacactct gagcagctca gtgactgtcc cctccagcac ctggccccagc gagaccgtca	240
10	cctgcaacgt tgcacacccg gccagcagca ccaagg	276
	<210> 180	
	<211> 305	
	<212> ДНК	
	<213> Homo sapiens	
15	<400> 180	
	gacatcgtga tgaccacagtc tccagactcc ctgggtgtgt ctctggggga gaggggccac	60
	atcaactgca agtccagcca gagtgttcta tacagctcca acaataagaa ctacttagct	120
	tggtaaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atctaccgg	180
	gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc	240
	atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtaet	300
	ctcca	305
	<210> 181	
	<211> 38	
	<212> ДНК	
20	<213> Homo sapiens	
	<400> 181	
	gtggacgttc ggccaaggga ccaaggtgga aatcaaac	38

<210> 182
 <211> 296
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 182
 cagggtccagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc agtgaaggtc 60
 tcttgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120

 cctggacaag gccttgagtg gatgggaggg atcatcccta tcttggtat agcaaaactac 180

 gcacagaagt tccagggcag agtcaegatt accgaggaca atccaacgag cacagcctac 240

 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggcctgtg attactgtgc gagaga 296
 <210> 183
 <211> 51
 10 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 183
 ctgagctgag aaccactgtg ctaactgggg acacagtgat tggcagctct a 51
 <210> 184
 <211> 8
 <212> БЛОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 184
 Cys Thr His Val Pro Gly Gly Gly
 1 5
 20 <210> 185
 <211> 50
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 185
 tgatgctttt gatgtctggg gccaagggac aatggtcacc gtctcttcag 50
 25 <210> 186
 <211> 357
 <212> БЛОК
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 186

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1 5 10 15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
20 25 30

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
35 40 45

Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
50 55 60
Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
65 70 75 80

Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
85 90 95

Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
100 105 110

Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
115 120 125

Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
130 135 140

Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
145 150 155 160

Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
165 170 175

Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
180 185 190

Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
195 200 205

Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
210 215 220
Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys
225 230 235 240

Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val
245 250 255

Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
260 265 270
Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln
275 280 285

Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly
290 295 300

Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser
305 310 315 320

Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln
325 330 335

Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser
340 345 350

Lys Ile Gly Ser Leu
355

<210> 187

<211> 235

<212> БІЛОК

5 <213> Homo sapiens

<400> 187

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1 5 10 15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
20 25 30

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
35 40 45

Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
50 55 60

Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
65 70 75 80

Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
85 90 95

Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
100 105 110

Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
115 120 125

Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
130 135 140
Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
145 150 155 160

Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
165 170 175

Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
180 185 190
Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
195 200 205

Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Leu Ala Asp
210 215 220

Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
225 230 235

5

<210> 188
<211> 346
<212> БІЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 188

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1 5 10 15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
20 25 30

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
35 40 45

Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
50 55 60

Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
65 70 75 80

Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
85 90 95

Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
100 105 110

Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
115 120 125

Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
130 135 140

Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
145 150 155 160

Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
165 170 175

Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
180 185 190
Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
195 200 205

Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
210 215 220

Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys
225 230 235 240
Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val
245 250 255

Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
260 265 270

Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln
275 280 285

Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly
290 295 300

Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly
305 310 315 320

Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu
325 330 335

Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
340 345

<210> 189

<211> 420

<212> БИЛОК

5 <213> Homo sapiens

<400> 189

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1 5 10 15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
20 25 30

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
35 40 45

Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
50 55 60

Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
65 70 75 80

Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
85 90 95

Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
100 105 110

Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
115 120 125

Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
130 135 140
Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
145 150 155 160

Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
165 170 175

Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
180 185 190
Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
195 200 205

Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
210 215 220

Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys
225 230 235 240

Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val
245 250 255

Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
260 265 270

Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln
275 280 285

Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly
290 295 300

Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser
305 310 315 320

Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln
325 330 335

Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser
340 345 350

Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
355 360 365

Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala
370 375 380

Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser
385 390 395 400

Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser
405 410 415

Ile Asp Met Val
420

<210> 190

<211> 227

<212> БИЛОК

5 <213> Homo sapiens

<400> 190

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1 5 10 15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
20 25 30

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
35 40 45

Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
50 55 60

Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
65 70 75 80

Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
85 90 95

Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
100 105 110

Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
115 120 125

Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
130 135 140

Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
145 150 155 160

Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
165 170 175

Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
180 185 190

Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
195 200 205

Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
210 215 220

Lys Val Ala

225

<210> 191

<211> 428

<212> БІЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 191

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1 5 10 15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
20 25 30

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
35 40 45

Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
50 55 60

Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
65 70 75 80

Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
85 90 95

Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
100 105 110

Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
115 120 125

Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
130 135 140

Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
145 150 155 160

Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
165 170 175

Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
180 185 190

Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
195 200 205

Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
210 215 220
Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys
225 230 235 240

Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val
245 250 255

Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
260 265 270

Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln
275 280 285

Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Asp Leu Ser Lys
290 295 300

Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly
305 310 315 320

Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg
325 330 335

Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly
340 345 350

Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn
355 360 365

Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro
370 375 380

Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser
385 390 395 400

Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala
405 410 415

Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
420 425

5 <210> 192
<211> 297
<212> БИЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 192

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1 5 10 15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
20 25 30

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
 35 40 45

Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
 50 55 60

Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
 65 70 75 80

Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
 85 90 95
 Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
 100 105 110

Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
 115 120 125

Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
 130 135 140
 Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
 145 150 155 160

Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
 165 170 175

Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
 180 185 190

Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
195 200 205

Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
210 215 220

Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys
225 230 235 240

Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val
245 250 255

Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser
260 265 270

Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val
275 280 285

Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
290 295

5 <210> 193
<211> 136
<212> БІЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 193

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1 5 10 15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
20 25 30

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
35 40 45

Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
50 55 60

Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
65 70 75 80

Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
85 90 95

Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Gln Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
100 105 110

Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
115 120 125

Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly
130 135

<210> 194

<211> 282

<212> БІЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 194

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1 5 10 15

5

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
20 25 30

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
35 40 45

Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
50 55 60

Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
65 70 75 80
Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
85 90 95

Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
100 105 110

Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
115 120 125

Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
130 135 140

Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
145 150 155 160

Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
165 170 175

Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
180 185 190

Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
195 200 205

Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
210 215 220

Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys
225 230 235 240

Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val
245 250 255

Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
260 265 270

Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu
275 280

5 <210> 195
<211> 406
<212> БІЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 195

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1 5 10 15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
20 25 30

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
35 40 45

Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
50 55 60

Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
65 70 75 80

Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
85 90 95

Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
100 105 110

Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
115 120 125

Ser Lys Ser Lys Asp Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro
130 135 140

Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser
145 150 155 160

Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg
165 170 175

Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala
180 185 190

Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu
195 200 205

Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys
210 215 220

Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val
225 230 235 240

Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys
245 250 255

Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln
260 265 270

Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly
275 280 285

Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val
290 295 300

Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly
305 310 315 320

Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile
325 330 335

Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp
340 345 350

His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr
355 360 365

Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met
370 375 380

Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser
385 390 395 400

Leu Ala Lys Gln Gly Leu
405

<210> 196

<211> 222

<212> БІЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 196

5

Met Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser
1 5 10 15

Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro
20 25 30

Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys
35 40 45

His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp
50 55 60

Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His
65 70 75 80

Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu
85 90 95

Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys
100 105 110

Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys
115 120 125

Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val
130 135 140

Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg
145 150 155 160

Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys
165 170 175

Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val
180 185 190

Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr
195 200 205

Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
210 215 220

5
<210> 197
<211> 315
<212> БІЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 197

Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala
1 5 10 15

Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala
20 25 30

Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys
35 40 45

Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys
50 55 60

Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro
65 70 75 80

Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu
85 90 95

Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser
100 105 110

Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys
115 120 125

Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro
130 135 140

Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn
145 150 155 160

Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly
165 170 175

Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val
180 185 190

Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly
195 200 205

Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val
210 215 220

Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly
225 230 235 240

Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala
245 250 255

Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val
260 265 270

Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr
275 280 285

Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp
290 295 300

Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
305 310 315

5 <210> 198
<211> 96
<212> БІЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 198

Met Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys
1 5 10 15

Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn
20 25 30

Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys
35 40 45

Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn
50 55 60

Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys
65 70 75 80

Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu
85 90 95

10 <210> 199
<211> 242
<212> БІЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 199

Met Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln
1 5 10 15

Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr
20 25 30

Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr
35 40 45
Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro
50 55 60

Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val
65 70 75 80

Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr
85 90 95
Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly
100 105 110

Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile
115 120 125

Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser
130 135 140

Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val
145 150 155 160

Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu
165 170 175

Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser
180 185 190

Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu
195 200 205

Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr
210 215 220

His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly
225 230 235 240

Ala Glu

<212> БІЛОК

<213> Homo sapiens

5 <400> 201

Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 202

<211> 9

<212> БІЛОК

10 <213> Homo sapiens

<400> 202

Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 203

<211> 9

<212> БІЛОК

15 <213> Homo sapiens

<400> 203

Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val

1 5

<210> 204

<211> 9
 <212> БЛОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 204
 His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln
 1 5
 5 <210> 205
 <211> 8
 <212> БЛОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 205
 Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln
 1 5
 10 <210> 206
 <211> 31
 <212> БЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид
 <400> 206
 Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn
 1 5 10 15
 Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro
 20 25 30
 20 <210> 207
 <211> 30
 <212> БЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 25 <223> Опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид
 <400> 207
 Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser
 20 25 30
 30 <210> 208
 <211> 30
 <212> БЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид
 35 <220>
 <221> МОДИФІКОВАНИЙ ЗАЛИШОК
 <222> (7) ... (7)
 <223> фосфо-Ser
 <400> 208

Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser
20 25 30

- 5
<210> 209
<211> 31
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 209

Cys Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro
1 5 10 15

Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser
20 25 30

- 10
<210> 210
<211> 30
<212> БЛОК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид
<220>
15
<221> МОДИФІКОВАНИЙ ЗАЛИШОК
<222> (7)...(7)
<223> фосфо-Ser
<400> 210

Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser
20 25 30

- 20
<210> 211
<211> 30
<212> БЛОК
<213> Штучна послідовність
<220>
25
<223> Опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид
<400> 211

Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys
1 5 10 15

Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr
20 25 30

- 30
<210> 212
<211> 30
<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид
 <220>
 5 <221> МОДИФІКОВАНИЙ ЗАЛИШОК
 <222> (4)... (4)
 <223> фосфо-Ser
 <400> 212
 Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys
 1 5 10 15

 Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr
 20 25 30
 10 <210> 213
 <211> 31
 <212> БЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 15 <223> Опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид
 <400> 213
 Cys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser
 1 5 10 15
 Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly
 20 25 30
 <210> 214
 20 <211> 30
 <212> БЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид
 25 <220>
 <221> МОДИФІКОВАНИЙ ЗАЛИШОК
 <222> (4) ... (4)
 <223> фосфо-Ser
 <400> 214
 Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys
 1 5 10 15

 Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln
 20 25 30
 30 <210> 215
 <211> 31
 <212> БЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 35 <223> Опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид
 <400> 215
 Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser
 1 5 10 15

Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val
20 25 30

5 <210> 216
<211> 31
<212> БЛОК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид
<400> 216
Cys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser
1 5 10 15

Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser
20 25 30

10 <210> 217
<211> 30
<212> БЛОК
<213> Штучна послідовність
<220>
15 <223> Опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид
<400> 217
Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr
1 5 10 15

Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser
20 25 30

20 <210> 218
<211> 13
<212> БЛОК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид
<400> 218
Cys Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser
1 5 10

25 <210> 219
<211> 25
<212> БЛОК
30 <213> Штучна послідовність
<220>
<223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид
<400> 219

Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn
1 5 10 15

Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser
20 25

<210> 220
<211> 8
<212> БЛОК
5 <213> Homo sapiens
<400> 220

Cys His His Lys Pro Gly Gly Gly
1 5

<210> 221
<211> 30
10 <212> БЛОК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид
<400> 221

Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val
1 5 10 15

Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser
20 25 30

15 <210> 222
<211> 30
<212> БЛОК
<213> Штучна послідовність
20 <220>
<223> Опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид
<400> 222

Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser
1 5 10 15

Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His
20 25 30

25 <210> 223
<211> 6
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 223

His Gln Pro Gly Gly Gly
1 5

30 <210> 224
<211> 6
<212> БЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 224

His Lys Pro Gly Gly Gly

1 5

<210> 225

<211> 104

<212> БІЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 225

Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys

1 5 10 15

Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn

20 25 30

Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro

35 40 45

His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu

65 70 75 80

Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile

85 90 95

Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn

100

<210> 226

<211> 104

<212> БІЛОК

<213> Pan sp.

<400> 226

Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys
1 5 10 15

Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn
20 25 30

Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro
35 40 45
Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile
50 55 60

His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu
65 70 75 80

Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile
85 90 95

Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
100

5

<210> 227

<211> 104

<212> БЛОК

<213> Macaca sp.

<400> 227

Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys
1 5 10 15

Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn
20 25 30

Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro
35 40 45

Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile
50 55 60

His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Gln Val Lys Ser Glu Lys Leu
65 70 75 80

Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile
85 90 95

<210> 228

<211> 104

<212> БЛОК

5 <213> Невідомий

<220>

<223> Опис невідомої послідовності: поліпептид тау гібона

<400> 228

Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys
1 5 10 15

Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn
20 25 30

Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro
35 40 45

Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile
50 55 60

His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu
65 70 75 80

Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile
85 90 95

Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
100

<210> 229

<211> 104

<212> БИЛОК

<213> Pongo sp.

<400> 229

Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys
1 5 10 15

Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn
20 25 30

Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro
35 40 45

Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile
50 55 60

His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu
65 70 75 80

Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile
85 90 95

Thr His Val Pro Gly Gly Gly His
100

<210> 230

<211> 104

<212> БІЛОК

<213> Ailuropoda melanoleuca

<400> 230

5

Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys

1 5 10 15

Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn

20 25 30

Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro

35 40 45

Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile

50 55 60

His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu

65 70 75 80

Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile

85 90 95

Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn

100

10

<210> 231

<211> 104

<212> БІЛОК

<213> Sus sp.

<400> 231

Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys

15

1 5 10 15

Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro
35 40 45

Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile
50 55 60

His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu
65 70 75 80

Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile
85 90 95

Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
100

<210> 232

<211> 104

<212> БИЛОК

<213> Equus sp.

<400> 232

5

Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys
1 5 10 15

Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn
20 25 30

Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro
35 40 45

Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile
50 55 60

His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu
65 70 75 80

Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile
85 90 95

Thr His Val Pro Gly Gly Gly His
100

<210> 233

<211> 104

<212> БИЛОК

<213> Canis lupus

<400> 233

Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys
1 5 10 15

Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn
20 25 30

Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro
35 40 45

Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile
50 55 60

His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu
65 70 75 80

5

Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile
85 90 95

Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
100

5 <210> 234
<211> 104
<212> БЛОК
<213> Невідомий
<220>
<223> Опис невідомої послідовності: поліпептид тау кролика
<400> 234

Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys
1 5 10 15

Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn
20 25 30

Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro
35 40 45
Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile
50 55 60

His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Gln Val Lys Ser Glu Lys Leu
65 70 75 80

10 Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile
85 90 95

Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
100

15 <210> 235
<211> 104
<212> БЛОК
<213> Rattus sp.
<400> 235

Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys
1 5 10 15

Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn
20 25 30

Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro
35 40 45

Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile
50 55 60

His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu
65 70 75 80

Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile
85 90 95

Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
100

- 5
- <210> 236
 - <211> 104
 - <212> БІЛОК
 - <213> Невідомий
 - <220>
 - <223> Опис невідомої послідовності: поліпептид тау нориці
 - <400> 236

Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys
1 5 10 15

Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn
20 25 30

Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro
35 40 45

Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile
50 55 60

His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu
65 70 75 80

Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile
85 90 95

Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
100

5 <210> 237
<211> 104
<212> БІЛОК
<213> Mus sp.
<400> 237

Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys
1 5 10 15

Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn
20 25 30

Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro
35 40 45

Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile
50 55 60

His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu
65 70 75 80

Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile
85 90 95

Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
100

- 5
- <210> 238
 - <211> 104
 - <212> БЛОК
 - <213> Невідомий
 - <220>
 - <223> Опис невідомої послідовності: поліпептид тау ховрашка
 - <400> 238

Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys
1 5 10 15

Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn
20 25 30

Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro
35 40 45

Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile
50 55 60

His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu
65 70 75 80

Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile
85 90 95

Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
100

<210> 239

<211> 104

<212> БЛОК

<213> Bos sp.

<400> 239

Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys
1 5 10 15

5

Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn
 20 25 30

Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro
 35 40 45

Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile
 50 55 60

His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu
 65 70 75 80

Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile
 85 90 95

Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
 100

5 <210> 240
 <211> 104
 <212> БЛОК
 <213> Невідомий
 <220>
 <223> Опис невідомої послідовності: поліпептид тау курки
 <400> 240

Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys
 1 5 10 15

10 Lys Leu Asp Phe Ser Ser Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn
 20 25 30

Ile Lys His Ile Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro
 35 40 45

Val Asp Leu Ser His Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile
 50 55 60

His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu
65 70 75 80

Asp Phe Lys Asp Lys Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile
85 90 95

Ser His Val Pro Gly Gly Gly Asn
100

- 5 <210> 241
<211> 104
<212> БЛОК
<213> Невідомий
<220>
<223> Опис невідомої послідовності: поліпептид тау в'юрка
<400> 241

Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys
1 5 10 15

Lys Leu Asp Phe Ser Ser Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn
20 25 30

Ile Lys His Ile Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro
35 40 45

Val Asp Leu Ser His Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile
50 55 60

His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu
65 70 75 80

Asp Phe Lys Asp Lys Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile
85 90 95

Ser His Val Pro Gly Gly Gly Asn
100

5 <210> 242
<211> 102
<212> БІЛОК
<213> Данію-регіо
<400> 242

Asn Ile Lys His Ala Pro Gly Gly Gly Asn Val Gln Ile Leu Asp Gln
1 5 10 15

Lys Leu Asp Leu Thr Asn Val Gln Ala Arg Cys Gly Ser Lys Asp Asn
20 25 30

Leu Lys His Val Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Leu His Lys Lys
35 40 45

Ile Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Leu
50 55 60

Arg His Lys Pro Gly Gly Gly Asn Ile Glu Ile Arg Ser Glu Lys Leu
65 70 75 80

Asp Phe Lys Ala Gln Ser Lys Ile Gly Ser Met Asp Asn Ile Lys His
85 90 95

Thr Pro Gly Gly Gly Asn
100

<210> 243

<211> 103

<212> БІЛОК

5 <213> *Xenopus laevis*

<400> 243

Asn Ile Arg His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val His Lys
1 5 10 15

Lys Val Asp Leu Gly Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn
20 25 30

Leu Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ala Ile Gln Ile Thr His Lys Pro
35 40 45

Ile Asp Leu Thr Arg Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Phe Val Asn Ile
50 55 60

His His Lys Pro Gly Gly Gly Asn Val Glu Leu Lys Ser Glu Lys Leu
65 70 75 80

Glu Phe Asp Lys Ile Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Val Thr
85 90 95

His Val Pro Gly Gly Gly Ala
100

10 <210> 244

<211> 101

<212> БІЛОК

<213> *Drosophila sp.*

<400> 244

Asn Ala Thr Tyr Lys Pro Gly Gly Gly His Val Lys Ile Glu Ser Lys
1 5 10 15

Lys Ile Asp Ile Lys Ala Ala Pro Arg Ile Glu Ala Lys Asn Asp Lys
20 25 30

Tyr Met Pro Lys Gly Gly Glu Lys Lys Ile Val Thr Thr Lys Leu Gln
35 40 45

Trp Asn Ala Lys Ser Lys Ile Gly Ser Leu Glu Asn Ala Ala His Lys
50 55 60

Pro Gly Gly Gly Asp Lys Lys Ile Glu Thr Leu Lys Met Asp Phe Lys
65 70 75 80

Asp Lys Ala Lys Pro Lys Val Gly Ser Thr Ala Asn Val Lys His Gln
85 90 95

Pro Gly Gly Gly Asp

100

5

<210> 245

<211> 97

<212> БЛОК

<213> Невідомий

<220>

10

<223> Опис невідомої послідовності: поліпептид тау круглого черв'яка

<400> 245

Asn His Lys Ala Gly Gly Gly Asn Val Glu Ile Phe Ser Glu Lys Arg
1 5 10 15

Leu Tyr Asn Ala Gln Ser Lys Val Gly Ser Leu Lys Asn Ala Thr His
20 25 30

Val Ala Gly Gly Gly Asn Val Gln Ile Glu Asn Arg Lys Leu Asp Phe
35 40 45
Ser Ala Ala Ser Pro Lys Val Gly Ser Lys Thr Asn Tyr Gln Pro Ala
50 55 60

Lys Ser Asp Val Lys Ile Val Ser Glu Lys Leu Thr Trp Gln Ala Lys
65 70 75 80

Ser Lys Val Gly Ser Met Asp Asn Ala Ala His Lys Pro Ala Gly Gly
85 90 95

Asn

5

<210> 246

<211> 113

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид

<400> 246

Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln
1 5 10 15

Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly
20 25 30

Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile
35 40 45

Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser
50 55 60

Leu Gly Asn Ile His His Val Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys
65 70 75 80

Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser
85 90 95

Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu
100 105 110

Thr

<210> 247

<211> 12

5

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид

<400> 247

Gln Ser Leu Leu Ala Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr

10

1

5

10

<210> 248

<211> 12

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

15

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид

<400> 248

Gln Ser Leu Leu Asn Ser Ala Thr Arg Lys Asn Tyr
1 5 10
<210> 249
<211> 12
<212> БЛОК
5 <213> Штучна послідовність
<220>
<223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид
<400> 249
Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Ala
10 1 5 10
<210> 250
<211> 12
<212> БЛОК
<213> Штучна послідовність
15 <220>
<223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид
<400> 250
Gly Trp Ser Ile His Ser Pro Gly Gly Gly Ser Cys
1 5 10
20 <210> 251
<211> 12
<212> БЛОК
<213> Штучна послідовність
<220>
25 <223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид
<400> 251
Ser Val Phe Gln His Leu Pro Gly Gly Gly Ser Cys
1 5 10
30 <210> 252
<211> 17
<212> БЛОК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид
<400> 252
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
1 5 10 15
35 Ala
<210> 253
<211> 3
<212> БЛОК
<213> Штучна послідовність
<220>
40 <223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид
<400> 253
Ala Ala Ser
1
45 <210> 254
<211> 8
<212> БЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид
 <400> 254
 Ala Gln Ser Phe Tyr Leu Arg Thr
 1 5
 5 <210> 255
 <211> 8
 <212> БЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 10 <223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид
 <400> 255
 Lys Ala Ser Phe Tyr Leu Arg Thr
 1 5
 <210> 256
 <211> 8
 15 <212> БЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид
 <400> 256
 Lys Gln Ala Phe Tyr Leu Arg Thr
 1 5
 20 <210> 257
 <211> 8
 <212> БЛОК
 <213> Штучна послідовність
 25 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид
 <400> 257
 Lys Gln Ser Ala Tyr Leu Arg Thr
 1 5
 30 <210> 258
 <211> 8
 <212> БЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид
 35 <400> 258
 Lys Gln Ser Phe Ala Leu Arg Thr
 1 5
 <210> 259
 <211> 8
 <212> БЛОК
 40 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид
 <400> 259
 Lys Gln Ser Phe Tyr Ala Arg Thr
 1 5
 45 <210> 260
 <211> 8
 <212> БЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид
 <400> 260
 Lys Gln Ser Phe Tyr Leu Ala Thr
 1 5
 5
 <210> 261
 <211> 10
 <212> БЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид
 10
 <400> 261
 Gly Tyr Ile Phe Thr Asp Ala Val Ile Ser
 1 5 10
 <210> 262
 <211> 10
 <212> БЛОК
 15
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид
 <400> 262
 Gly Tyr Ile Phe Thr Asp Tyr Ala Ile Ser
 1 5 10
 20
 <210> 263
 <211> 15
 <212> БЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 25
 <223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид
 <400> 263
 Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala
 1 5 10 15
 <210> 264
 <211> 8
 30
 <212> БЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид
 <400> 264
 Ile Ala Pro Arg Ser Gly Ser Thr
 1 5
 35
 <210> 265
 <211> 8
 <212> БЛОК
 <213> Штучна послідовність
 40
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид
 <400> 265
 Ile Phe Pro Arg Ser Gly Ala Thr
 1 5
 45
 <210> 266
 <211> 13
 <212> БЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид

<400> 266
 Ala Arg Ala Tyr Tyr Gly Thr Ser Phe Ala Met Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 267
 <211> 13
 5 <212> БЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид
 <400> 267
 Ala Arg Asp Ala Tyr Gly Thr Ser Phe Ala Met Asp Tyr
 1 5 10
 10 <210> 268
 <211> 13
 <212> БЛОК
 <213> Штучна послідовність
 15 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид
 <400> 268
 Ala Arg Asp Tyr Ala Gly Thr Ser Phe Ala Met Asp Tyr
 1 5 10
 20 <210> 269
 <211> 13
 <212> БЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид
 25 <400> 269
 Ala Arg Asp Tyr Tyr Ala Thr Ser Phe Ala Met Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 270
 <211> 12
 <212> БЛОК
 30 <213> Homo sapiens
 <400> 270
 Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys
 1 5 10
 <210> 271
 <211> 7
 35 <212> БЛОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 271
 Lys His Gln Pro Gly Gly Gly
 1 5
 40 <210> 272
 <211> 6
 <212> БЛОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 272
 His Gln Pro Gly Gly Gly
 1 5
 45 <210> 273
 <211> 5
 <212> БЛОК

<213> Homo sapiens
 <400> 273
 His Gln Pro Gly Gly
 1 5
 <210> 274
 <211> 5
 <212> БЛОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 274
 Gln Pro Gly Gly Gly
 1 5
 <210> 275
 <211> 42
 <212> БЛОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 275
 Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn
 1 5 10 15
 Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp
 20 25 30
 Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser
 35 40
 <210> 276
 <211> 7
 <212> БЛОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 276
 Lys His Val Pro Gly Gly Gly
 1 5
 <210> 277
 <211> 6
 <212> БЛОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 277
 His Val Pro Gly Gly Gly
 1 5
 <210> 278
 <211> 5
 <212> БЛОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 278
 His Val Pro Gly Gly
 1 5
 <210> 279
 <211> 5
 <212> БЛОК

<213> Homo sapiens
 <400> 279
 Val Pro Gly Gly Gly
 1 5
 <210> 280
 5 <211> 19
 <212> БЛОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 280
 Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr
 1 5 10 15

 Lys Pro Val
 10 <210> 281
 <211> 7
 <212> БЛОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 281
 His His Lys Pro Gly Gly Gly
 15 1 5
 <210> 282
 <211> 6
 <212> БЛОК
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 282
 His Lys Pro Gly Gly Gly
 1 5
 <210> 283
 <211> 7
 <212> БЛОК
 25 <213> Homo sapiens
 <400> 283
 Thr His Val Pro Gly Gly Gly
 1 5

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 30
1. Синтетичний пептид для застосування в лікуванні хвороби Альцгеймера або іншої таупатії, що включає імуногенний фрагмент білка тау 2N4R, що включає амінокислотну послідовність KDNKHHVPGGGS (SEQ ID NO: 108) або CKDNKHHVPGGGS (SEQ ID NO: 218) або її сіль.
 2. Синтетичний пептид за п. 1, де синтетичний пептид складається з амінокислотної послідовності KDNKHHVPGGGS (SEQ ID NO: 108) або CKDNKHHVPGGGS (SEQ ID NO: 218) або її солі.
 3. Синтетичний пептид за п. 1 або 2, де синтетичний пептид зв'язаний з носієм.
 4. Синтетичний пептид за п. 3, де носій зв'язаний з N-кінцевою, C-кінцевою або внутрішньою амінокислотою синтетичного пептиду.
 - 40 5. Синтетичний пептид за п. 4, де носій зв'язаний з N-кінцевою амінокислотою синтетичного пептиду.
 6. Синтетичний пептид за будь-яким із пп. 3-5, де носій містить сироватковий альбумін, гемоціанін лімфи равлика, молекулу імуноглобуліну, тиреоглобулін, овальбумін, правцевий токсод, токсод, що походить з інших патогенних бактерій, дифтерійний токсод, токсод з E. coli, холерний токсод або токсод H. pylori, послаблене похідне токсину, цитокін, IL-1, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IFN- γ , IL-10, GM-CSF, хемокін, MIP1 α , MIP1 β або RANTES.
 - 45

7. Синтетичний пептид за п. 6, де носій являє собою білок правцевого токсоїду.
8. Синтетичний пептид за п. 6, де носій являє собою гемоціанін лімфи равлика.
9. Синтетичний пептид за будь-яким із пп. 3-8, де синтетичний пептид зв'язаний з носієм у вигляді злитого білка.
- 5 10. Синтетичний пептид за будь-яким із пп. 3-8, де синтетичний пептид зв'язаний з носієм хімічним зшиванням.
11. Синтетичний пептид за п. 10, де носій зв'язаний з N-кінцевою амінокислотою синтетичного пептиду за допомогою зшиваючого лінкеру, що включає N-сукцинімідил-3-(2-піридилтіо)пропіонат (SPDP), сукцинімідил-4-(N-малеїдометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC) або N-[γ-малеїмідобутирилокси]сукцинімідний складний ефір (GMBS).
- 10 12. Синтетичний пептид за п. 11, де зшиваючий лінкер включає GMBS.
13. Синтетичний пептид за будь-яким із пп. 3-12, де носій зв'язаний з синтетичним пептидом через спейсер.
14. Фармацевтична композиція для застосування в лікуванні хвороби Альцгеймера або іншої таупатії, що містить синтетичний пептид за будь-яким із пп. 1-13.
- 15 15. Фармацевтична композиція за п. 14, яка додатково містить фармацевтично прийнятний ексципієнт, розріджувач і/або ад'ювант.
16. Фармацевтична композиція за п. 15, де ад'ювант містить алюміній або його сіль.
17. Фармацевтична композиція за п. 16, де ад'ювант містить гідроксид алюмінію.
- 20 18. Фармацевтична композиція за будь-яким із пп. 14-17, яка додатково містить щонайменше один комбінований засіб.
19. Фармацевтична композиція за п. 18, де щонайменше один комбінований засіб включає один або більше з інгібіторів ацетилхолінестерази, антагоністів рецептора NMDA, хелаторів перехідних металів, факторів росту, гормонів, нестероїдних протизапальних лікарських засобів (NSAID), антиоксидантів, засобів, що знижують рівень ліпідів, селективних інгібіторів фосфодіестерази, інгібіторів агрегації білка тау, інгібіторів протеїнкіназ, інгібіторів білків теплового шоку, реагентів для пасивної і активної імунізації проти амілоїду, інгібітора агрегації амілоїду і інгібітора секретаз.
- 25 20. Спосіб пом'якшення щонайменше одного з симптомів, асоційованих з хворобою Альцгеймера або іншою таупатією у індивідуума, який потребує цього, що включає введення індивідууму ефективної кількості фармацевтичної композиції за будь-яким із пп. 14-19.
21. Спосіб за п. 20, в якому щонайменше один симптом включає щонайменше одне з прогресуючого порушення пам'яті, когнітивного відхилення, мовного відхилення, поведінкових змін, психологічних симптомів, порушень настрою, емоційних порушень, зниження апетиту, порушень циклу сну і пробудження, сплутаності свідомості, тривожного збудження, депресії, порушення рухової функції, апраксії, міоклонусу, порушення ходи, зниженої сили м'язів, екстрапірамідальних ознак, брадикінезії, ригідності, тремору в стані спокою, порушень здійснення основних дій в повсякденному житті і дезорієнтації.
- 35 22. Спосіб профілактики або лікування хвороби Альцгеймера або іншої таупатії у індивідуума, який потребує цього, що включає введення індивідууму ефективної кількості фармацевтичної композиції за будь-яким із пп. 14-19.
23. Спосіб за будь-яким із пп. 20-22, який додатково включає введення індивідууму щонайменше одного комбінованого засобу.
24. Спосіб за п. 23, де щонайменше один комбінований засіб включає один або більше з інгібіторів ацетилхолінестерази, антагоністів рецептора NMDA, хелаторів перехідних металів, факторів росту, гормонів, нестероїдних протизапальних лікарських засобів (NSAID), антиоксидантів, засобів, що знижують рівень ліпідів, селективних інгібіторів фосфодіестерази, інгібіторів агрегації білка тау, інгібіторів протеїнкіназ, інгібіторів білків теплового шоку, реагентів для пасивної і активної імунізації проти амілоїду, інгібітора агрегації амілоїду і інгібітора секретаз.
- 50 25. Спосіб за п. 23 або 24, де щонайменше один комбінований засіб вводять до фармацевтичної композиції.
26. Спосіб за п. 23 або 24, де щонайменше один комбінований засіб вводять одночасно з фармацевтичною композицією.
- 55 27. Спосіб за п. 23 або 24, де щонайменше один комбінований засіб вводять після фармацевтичної композиції.
28. Спосіб за будь-яким із пп. 20-27, де фармацевтичну композицію вводять щонайменше одним шляхом, вибраним з парентерального, підшкірного, внутрішньом'язового, внутрішньовенного, внутрішньосуглобового, внутрішньобронхіального, внутрішньочеревного, внутрішньокапсулярного, внутрішньохрящового, внутрішньопорожнинного, здійснюваного
- 60

- всередину черевної порожнини, внутрішньомозочкового, інтрацеребровентрикулярного, інтратекального, внутрішньотовстокишкового, інтрацервікального, внутрішньошлункового, внутрішньопечінкового, інтраміокардіального, внутрішньокісткового, внутрішньотазового, внутрішньоперикардіального, внутрішньоочеревинного, внутрішньоплеврального, внутрішньопростатичного, внутрішньолегеневого, внутрішньоректального, внутрішньониркового, інtrarетинального, внутрішньохребтового, інтрасиновіального, внутрішньогрудного, внутрішньоматкового, внутрішньоміхурового, внутрішньоосередкового, болюсного, вагінального, ректального, букального, сублінгвального, інтраназального і трансдермального.
29. Спосіб за п. 28, де фармацевтичну композицію вводять підшкірно.
30. Спосіб за будь-яким із пп. 20-29, який включає введення щонайменше 1 мкг синтетичного пептиду.
31. Спосіб за будь-яким із пп. 20-30, який включає введення щонайменше 10 мкг синтетичного пептиду.
32. Спосіб за будь-яким із пп. 20-31, який включає введення від 0,001 до 1000 мг синтетичного пептиду.
33. Спосіб за будь-яким із пп. 20-32, який включає введення приблизно 40 мкг або приблизно 160 мкг синтетичного пептиду.
34. Спосіб за будь-яким із пп. 20-33, де фармацевтичну композицію вводять у множині дозувань.
35. Спосіб за п. 34, де кожна доза фармацевтичної композиції включає від 1 до 10 мг синтетичного пептиду.
36. Спосіб за п. 34 або 35, де дозування вводять протягом періоду щонайменше шість місяців.
37. Спосіб за будь-яким із пп. 20-36, де пом'якшення, профілактика або лікування включає посилення імунної відповіді проти патологічного білка тау у індивідуума.
38. Спосіб за п. 37, де імунна відповідь включає продукування антитіл проти синтетичного пептиду.
39. Спосіб за будь-яким із пп. 20-38, де рівні костимулюючої молекули CD28 на CD8⁺ Т-клітинах визначають до введення фармацевтичної композиції і/або після введення фармацевтичної композиції.
40. Спосіб за будь-яким із пп. 20-39, де введення фармацевтичної композиції інгібує агрегацію тау-тау.

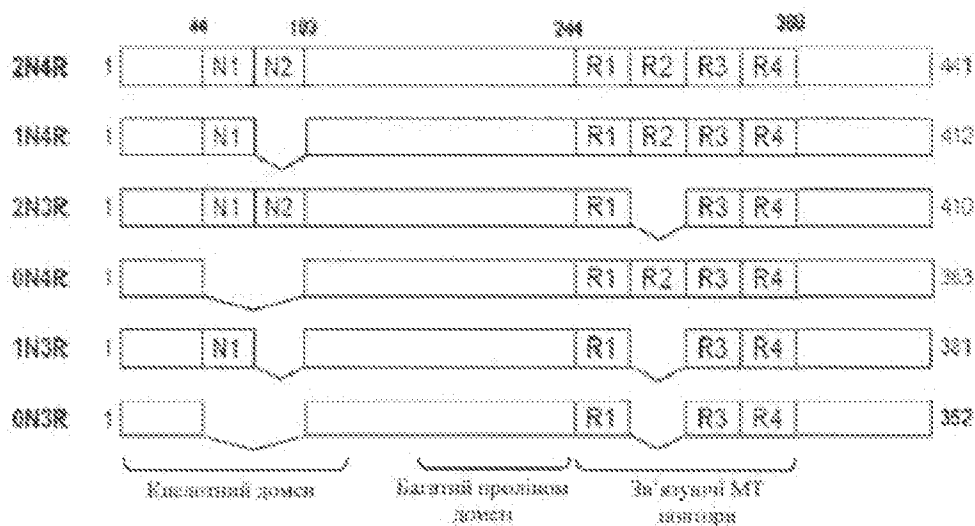


Fig. 1

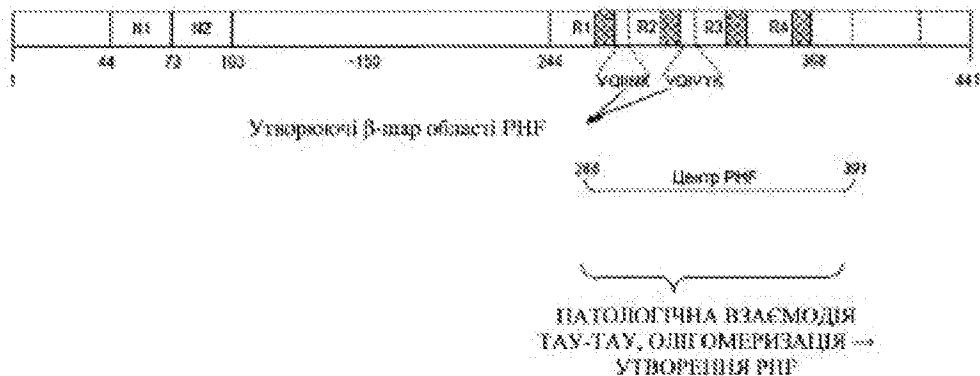


Fig. 2

A. Невзорова *исполнитель, наладчик сети сервера (VL) DCN-8*

[illegible]

Н. А. Шибирякова, кандидат филологических наук, старший научный сотрудник (VI) ИДРБС.

```

0001: 0000000000000000
0002: 000
0003: 0000000000000000

```

С. Вербицкий (Москва)

V-regi (298/301): Isotermičnost, socia (zobuhodni 99.0%)

[illegible][illegible][illegible][illegible]

1997-23*81: CTTTCAGGACAGTGGATCTCGGACAGGATTCACCTCTCACCTCTCA~AGT

Fig. 3

0088 TCGAGGCTGAAGAGCTGCGAGTTTATTACGCAAGCAATCTTTTATCTTT
 5089-51... TCGAGGCTGAAGAGCTGCGAGTTTATTACGCAAGCAATCTTTATATCTTT

0000 00000 000000 0
XXXX-XX-XX 0

3-ten (18/36); læserminister, docifactoriser 97,2%);

[illegible]

D. Інженерія поєднання: сприяє більшій об'єднаності між ними (VET) DCS8.

CAGCTCTCATTGTCAGTACTCTGGAGCTTGAAGCTGGTGAAGCCCTGGGACTTCTAGTTAAAGTCTCCCTGAAGGCCTTCTGGATTAAGTATTTCACT
 GACTATTCCTCTAGCTCTGGCTGAAGCAGAGGACTTGGACAGGGCCTTGGAGGAAATTTGGAGAAATTTTCTCTAGAAATGCTGTAATCTTAC TAC
 TATTGGAGATCTTAAGGGGCAAGGCTCAGACTGCTACAGCAAAATCTTCTCAGCAAGCTTCACTGCGAGTCTGCGAGCTGAGCTCTGAGGAC
 CTCGGGGGATATTTCTTGGCAGAGAACTTACTAGCTGACTCACTTCTGCTATGACACTACTCTGCTCAAGAGCACTCTGATGACATCTTCTCTCTA

Е. Амівозкіслова підялюєтьс являється об'єкту важкого занепокоєння (VH) DCRES:

YQVQLQSGFPELVKPTVQRMKRAAGIIFLTDTYISNFKRTSQGLRWIGRIFFRGGSTYYNKPNSKATLTADKESWTYNQLSIVTSEL
 SASTPCARDYVTEFEAMDYWGCGSTSTVPS

0001: 00100000
0002: 10000000
0003: 000000000000

Ф. Виринговина послідовності DC8E8 (VII) з найбільш схожою послідовністю миші ембріонального типу CGEY8-81*61.

У-сен (269/294; ідеальність прикладності 91,5%);

[illegible]

Фіг. 3 (продовження)

V-ген (219/294; ідентичність послідовності 74,3%):

```

DC8E8_важкий ланцюг_V      CAGGTCGAAATGCGACGATCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCCTGGGACTTC
IGHV1-69*10_Комо+variana  CAGGTCGAGCTGCTGCGAGTCTGCGGCTGAGCTGACGAGGCTGGGCTGCTC
***** ** ***** ** ***** ** ***** ** *****
DC8E8_важкий ланцюг_V      AGTGAAGATGCGCTGTAAAGGCTCTGTGATACATATTCAGTCACTATGTCA
IGHV1-69*10_Комо+variana  AGTGAAGGCTCTGCTGCGAGGCTCTGTGAGGCTGAGCTGAGCTATGTCA
***** * **** ***** ** ***** ** *****
DC8E8_важкий ланцюг_V      TAAAGCTGGGTGAAGCAGAGGACTGACAGAGGCTCTGAGTGGATTGGAGAG
IGHV1-69*10_Комо+variana  TCAGCTGGGCTGCGACAGCGGCTGAGCAGAGGCTCTGAGTGGATTGGAGAG
* ***** ** ***** ** ***** ** *****
DC8E8_важкий ланцюг_V      ATTTTTCTAGAAAGTGGTACTACTTACTTCAATGAGAAATTCAGAGGCA
IGHV1-69*10_Комо+variana  ATCATGCTATGCTCTTCTGATAGCAAACTACCGCAGAGATTCAGAGGCA
** * **** ***** * ***** *****
DC8E8_важкий ланцюг_V      GGGCAGACTGAGTGCACACAAATCTCTCAACACAGGCTACATGAGCTCA
IGHV1-69*10_Комо+variana  AGTCACGATTACCGCGACAAATCTCAACACAGGCTACATGAGCTCA
* *** * ** * ***** * *****
DC8E8_важкий ланцюг_V      GCAGGCTGAGATCTGAGGAGCTCTGGGCTCTATTTCCTGCAAGA--
IGHV1-69*10_Комо+variana  GCAGGCTGAGATCTGAGGAGCTCTGGGCTCTATTTCCTGCAAGA--
***** ** ***** * ** * *****

```

Фіг. 5

D-ген (9/14; ідентичність послідовності 64,3%):

```

DC8E8      -----GATTACTACGGTAC-----
IGHV1-27*03_Комо+variana  CTGAGCTGAGAGCACTGTACTAGTGGGACAGAGTATTCAGCTCTC
*****

```

```

DC8E8      --
IGHV1-27*03_Комо+variana  A

```

J-ген (35/53; ідентичність послідовності 66,0%):

```

DC8E8      TTCATTTCCTATGCACTACTGGGCTCAAGGAACCTGAGTCACTGCTCTCT
IGHV1*01_Комо+variana  ---TCATGCTTTTGAATGTTCTGGGCTCAAGGAACCTGAGTCACTGCTCTCT
***** ** ***** ** *****

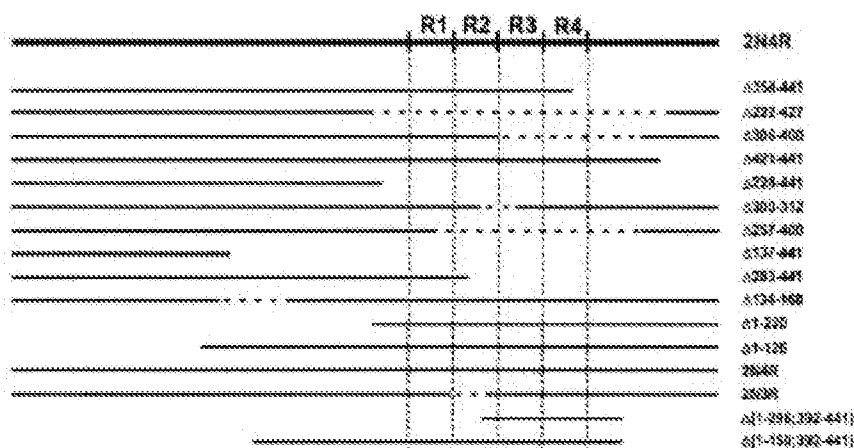
```

```

DC8E8      CAG
IGHV1*01_Комо+variana  CAG
***

```

Фіг. 5 (продовження)



Фіг. 6A

A358-441

1 MAREPQEFY MEDHAGTYL GDRKDGQYI MGGQGSQDTS AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
 61 SETSDAKSTP TADQVTAPLV DEGAHGEQAA AQPHTEIPES TTAREAGIGD TPLEDEEAG
 121 NVTQARNVSK SGGDTGSDSK KAKGADGKTK IATPHGAAPP GQNGQANATH IPASTTPAPK
 181 TFPSSGEFFK SGRRSQYSEF GSPSTPGSAS RYPSLPTPTT RERPKYAVVR TFPKSPESAK
 241 SRLQTAVVNH NULENVKSLI GSTENLKHQP GGGNVQIINH KLGLSHVQSK GSKKDNINHY
 301 PGGGQVQIVY KPVULSNVTS KCGSLGNINH KPGGQGVVVK RYKLSDFKDV QSKIGSL

A222-427

1 MAREPQEFY MEDHAGTYL GDRKDGQYI MGGQGSQDTS AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
 61 SETSDAKSTP TADQVTAPLV DEGAHGEQAA AQPHTEIPES TTAREAGIGD TPLEDEEAG
 121 NVTQARNVSK SGGDTGSDSK KAKGADGKTK IATPHGAAPP GQNGQANATH IPASTTPAPK
 181 TFPSSGEFFK SGRRSQYSEF GSPSTPGSAS RYPSLPTPTT NLADEVKSL AKQSL

A306-400

1 MAREPQEFY MEDHAGTYL GDRKDGQYI MGGQGSQDTS AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
 61 SETSDAKSTP TADQVTAPLV DEGAHGEQAA AQPHTEIPES TTAREAGIGD TPLEDEEAG
 121 NVTQARNVSK SGGDTGSDSK KAKGADGKTK IATPHGAAPP GQNGQANATH IPASTTPAPK
 181 TFPSSGEFFK SGRRSQYSEF GSPSTPGSAS RYPSLPTPTT RERPKYAVVR TFPKSPESAK
 241 SRLQTAVVNH NULENVKSLI GSTENLKHQP GGGNVQIINH KLGLSHVQSK GSKKDNINHY
 301 PGGGQVQIVY KPVULSNVTS KCGSLGNINH KPGGQGVVVK RYKLSDFKDV QSKIGSL

A421-441

1 MAREPQEFY MEDHAGTYL GDRKDGQYI MGGQGSQDTS AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
 61 SETSDAKSTP TADQVTAPLV DEGAHGEQAA AQPHTEIPES TTAREAGIGD TPLEDEEAG
 121 NVTQARNVSK SGGDTGSDSK KAKGADGKTK IATPHGAAPP GQNGQANATH IPASTTPAPK
 181 TFPSSGEFFK SGRRSQYSEF GSPSTPGSAS RYPSLPTPTT RERPKYAVVR TFPKSPESAK
 241 SRLQTAVVNH NULENVKSLI GSTENLKHQP GGGNVQIINH KLGLSHVQSK GSKKDNINHY
 301 PGGGQVQIVY KPVULSNVTS KCGSLGNINH KPGGQGVVVK RYKLSDFKDV QSKIGSL
 361 QVYFGGQVVK IETHLTYSK NAKAKTSQCA KIVYKSPVVS GQFHHHLN VNSTGSDIMV

A228-441

1 MAREPQEFY MEDHAGTYL GDRKDGQYI MGGQGSQDTS AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
 61 SETSDAKSTP TADQVTAPLV DEGAHGEQAA AQPHTEIPES TTAREAGIGD TPLEDEEAG
 121 NVTQARNVSK SGGDTGSDSK KAKGADGKTK IATPHGAAPP GQNGQANATH IPASTTPAPK
 181 TFPSSGEFFK SGRRSQYSEF GSPSTPGSAS RYPSLPTPTT RERPKYAVVR

Fir. 6B

Δ388-312

1 MAREPQKFEV MEDNASTYGL GORKIQGGTY NHQDQGGDTD AGLKEEPLOT PTEDGSEEPG
 61 SETTSAAKSTP TAEQVTAFLV DEQAPQKQAA AQNTETEPG YTAKEAGTGD TPELEDEAAS
 121 NVTQAMNVEK SKDQTSDDK KAPQALDQNTK IATPQGAAP GQKQGANATR TPARTTQAPK
 181 TFFSAGEEPK GQKASVSSP GSPQTSQAS STPELPTPTT AEFKRYAVVR TPKSSPQAK
 241 SLQQTAPVEM PDLKNVDEK GSTEMKQGF GSKVQIINK SLGLNVQVM GSKGNHINW
 301 GLSKVTAKQD SLGNHAKPS GQVENVSEK LQPKLVQSK ISSLGNITNV PGGNNHINW
 361 KLLQTPKPK AKTQGAIV YKAPVVEST SKRLNVVR TGLTNVDSR GLATLADVY
 421 ASLRQGL

Δ387-468

1 MAREPQKFEV MEDNASTYGL GORKIQGGTY NHQDQGGDTD AGLKEEPLOT PTEDGSEEPG
 61 SETTSAAKSTP TAEQVTAFLV DEQAPQKQAA AQNTETEPG YTAKEAGTGD TPELEDEAAS
 121 NVTQAMNVEK SKDQTSDDK KAPQALDQNTK IATPQGAAP GQKQGANATR TPARTTQAPK
 181 TFFSAGEEPK GQKASVSSP GSPQTSQAS STPELPTPTT AEFKRYAVVR TPKSSPQAK
 241 SLQQTAPVEM PDLKNVDEK GSTEMKQGF GSKVQIINK LATLADVYR SLAQGL

Δ137-441

1 MAREPQKFEV MEDNASTYGL GORKIQGGTY NHQDQGGDTD AGLKEEPLOT PTEDGSEEPG
 61 SETTSAAKSTP TAEQVTAFLV DEQAPQKQAA AQNTETEPG YTAKEAGTGD TPELEDEAAS
 121 NVTQAMNVEK SKDQTS

Δ383-441

1 MAREPQKFEV MEDNASTYGL GORKIQGGTY NHQDQGGDTD AGLKEEPLOT PTEDGSEEPG
 61 SETTSAAKSTP TAEQVTAFLV DEQAPQKQAA AQNTETEPG YTAKEAGTGD TPELEDEAAS
 121 NVTQAMNVEK SKDQTSDDK KAPQALDQNTK IATPQGAAP GQKQGANATR TPARTTQAPK
 181 TFFSAGEEPK GQKASVSSP GSPQTSQAS STPELPTPTT AEFKRYAVVR TPKSSPQAK
 241 SLQQTAPVEM PDLKNVDEK GSTEMKQGF GSKVQIINK KL

Δ134-168

1 MAREPQKFEV MEDNASTYGL GORKIQGGTY NHQDQGGDTD AGLKEEPLOT PTEDGSEEPG
 61 SETTSAAKSTP TAEQVTAFLV DEQAPQKQAA AQNTETEPG YTAKEAGTGD TPELEDEAAS
 121 NVTQAMNVEK ANDTATKAT PPAKMTTSS GEPKASQAR QAKASQAPR PGNKSTSL
 181 STPTAKPKK VVVVTPPK PSAPKSLQT AVVVPRLK VPKIGSTEN LQAPQGGKV
 241 QIINKKLLS NVQKQSKK NIKNVQGAN VQIVYKVEL SKVTSKQSL GSKNNPQGG
 301 QVENVAKLS PDKVQSKIS SLGNITNV GSKKIEINK ITPKNAKAK TONGAEIVK
 361 SPVQGGTSP SLGNVSTP SIDNVDRQI ATLADVYR LAQGL

Δ1-229

1 MAREPQKFEV MEDNASTYGL GORKIQGGTY NHQDQGGDTD AGLKEEPLOT PTEDGSEEPG
 61 SETTSAAKSTP TAEQVTAFLV DEQAPQKQAA AQNTETEPG YTAKEAGTGD TPELEDEAAS
 121 NVTQAMNVEK ANDTATKAT PPAKMTTSS GEPKASQAR QAKASQAPR PGNKSTSL
 181 STPTAKPKK VVVVTPPK PSAPKSLQT AVVVPRLK VPKIGSTEN LQAPQGGKV
 241 QIINKKLLS NVQKQSKK NIKNVQGAN VQIVYKVEL SKVTSKQSL GSKNNPQGG
 301 QVENVAKLS PDKVQSKIS SLGNITNV GSKKIEINK ITPKNAKAK TONGAEIVK
 361 SPVQGGTSP SLGNVSTP SIDNVDRQI ATLADVYR LAQGL

Фіг. 6В (продовження)

Δ1-426

1 MVEKSGDGGT SDDKKAASAD GHTKIATFAG AAFPGQAGQA NATRIIPAKTF PAKTTPSSSG
 61 KPFKSGDAGG YSGPSSGPTT GSRARTSLP TPTTTRKKY AVVATPPKPS SSKNSALQTA
 121 PVVAPDLAWY KKHISTENL KHQFGGKVVQ IINXKLGLSN VQKCCGKSN IKRVFSGSSV
 181 QIVYKPVGLS KVFSSGGLG NINHPGQQQ YEVNKKSLP KRVQSGKISG LQNTTSTVSG
 241 GHTKIETHL TFRHAKKATF DNGAEIVYNS PVVSGPTKPA SLGKVVSTON IDMDGEPQLA
 301 TLADKYAAEL AKQGL

ΔR2N

1 MVEPQGETV MEDKASTYL GGRKQGGYT KHQGGAGST AGLKESPLQT PTEGSGKPSG
 61 SEISDAKSTP TAEQVTAPLV DSGAPGQAA AGPTSTIPSS TAEKAGIGD TPTEDELAG
 121 NVTGAMVSK SDDSTSSDK KAKGAGKTE IATPGGAAP GQKQGANATP IAKTTPKAPK
 181 TPSSSGEPFR SDRSGYSSP GSPPTPSKS RTSLPTPTT KRPKRVAVV TPKSPSSAK
 241 KKLQTAPVW POLKVVSKL GETHLAKQP GQKQVQIIN KLDLNVQSK GSKKDNIRNV
 301 GQKQVQIVY KPVGLKVTG KGSGLNIN KQSGQVETK SEKLDPTDNP GSKISGLNF
 361 TVVSGSKKK IETHLTPEE KAKATDNGA KIVVSGPVV GUTSPKLAN VESTUSTONV
 421 DDPQLATLAS VVSAALAKG L

3R2N

1 MVEPQGETV MEDKASTYL GGRKQGGYT KHQGGAGST AGLKESPLQT PTEGSGKPSG
 61 SEISDAKSTP TAEQVTAPLV DSGAPGQAA AGPTSTIPSS TAEKAGIGD TPTEDELAG
 121 NVTGAMVSK SDDSTSSDK KAKGAGKTE IATPGGAAP GQKQGANATP IAKTTPKAPK
 181 TPSSSGEPFR SDRSGYSSP GSPPTPSKS RTSLPTPTT KRPKRVAVV TPKSPSSAK
 241 KKLQTAPVW POLKVVSKL GETHLAKQP GQKQVQIIN KLDLNVQSK GSKKDNIRNV
 301 GQKQVQIVY KPVGLKVTG KGSGLNIN KQSGQVETK SEKLDPTDNP GSKISGLNF
 361 TVVSGPVVSG GUTSPKLANV SESSSITWVD DPQLATLAE VVSAALAKQL

Δ(1-296;392-441)

1 KIKVPSGSS VQIVYKVTL SEVTSKGLL GHTKAPSGG QVTVKSKLD VQKQSGKISG
 61 SLNTTSTVSG GSKKISTTK ITRHAKKAK TNGAK

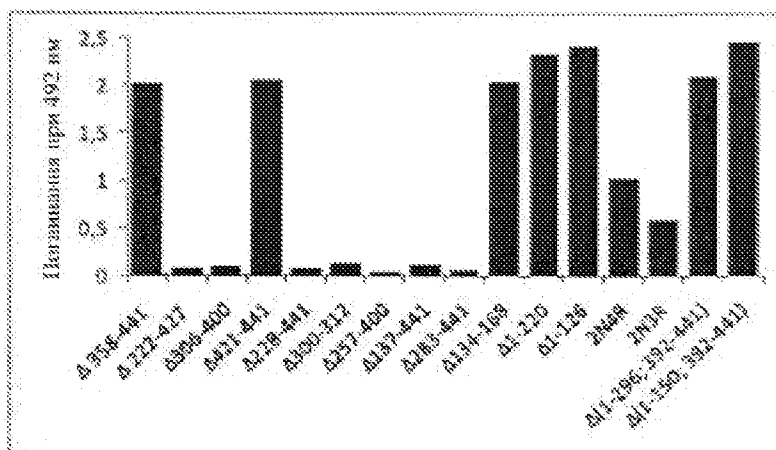
Δ(1-150;392-441)

1 KILATPGAAP PQKQGANAG ELPAKTPAP KIPPSGEPF KSGKSGIISG GSPPTPSKS
 61 SSTSLPTP TPKRVAVV GTPSSSNA KKLQTAPVT KPOLKVVSK IOSTENLAKQ
 121 GQKQVQIIN KLDLNVQSK KSKKDNIRK VNGGQVQIV KPVGLKVTG KGSGLNIN
 181 KQSGQVETV KKKLQVWDA VQKISGLISG KTVVSGSKK KIKTAKLTPN KAKATDNGA
 241 AS

Примітка

Мієтоїни (M) в положенні 1 в дельційних конструкціях тау Δ1-220, Δ(1-296; 392-441) і Δ(1-150; 392-441) не є частиною природної послідовності білка тау дельта. Він був доданий для забезпечення стартового кодону в трансляційному апараті бактерій.

Фіг. 6В (продовження)



Фіг. 6С

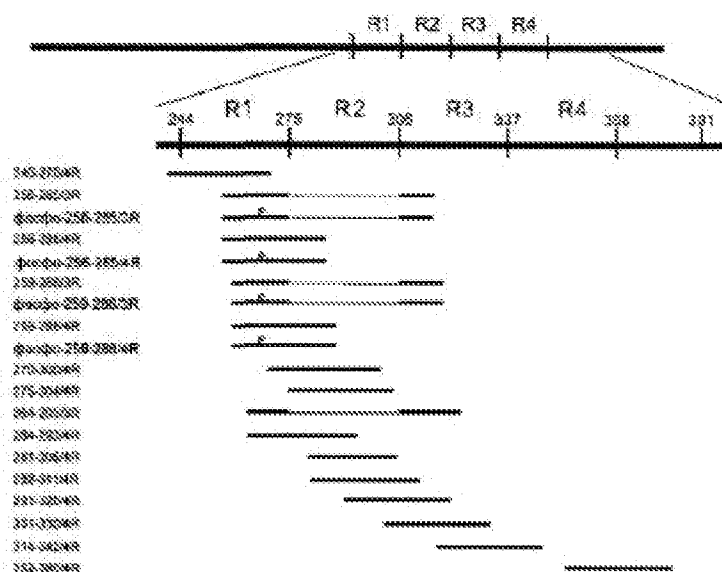
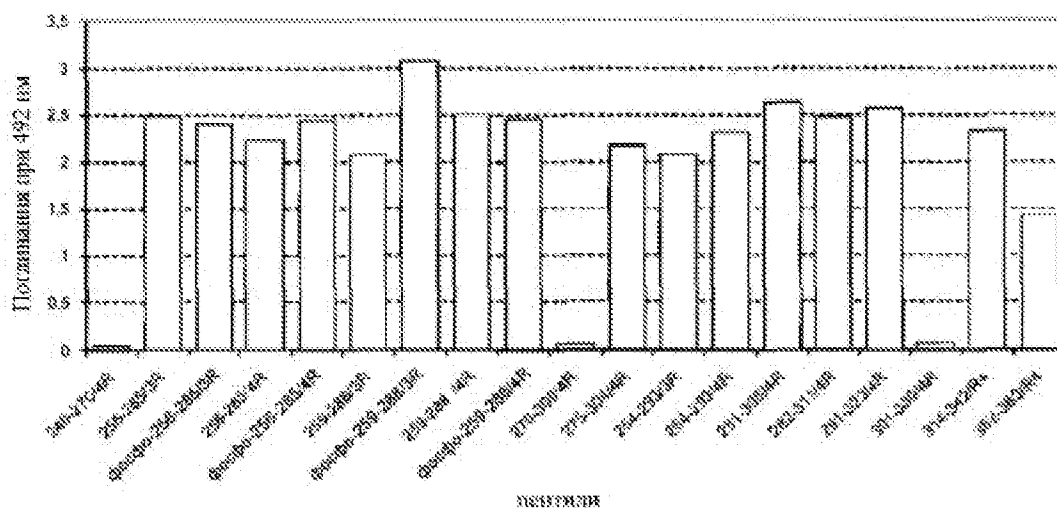


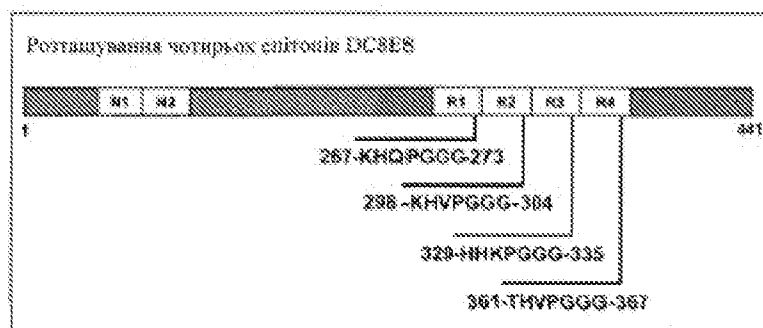
Fig. 7A

CNTRLPRGMS PRINTED	LOCAL SUBJECTS
240-2704R	KBRLOTPAVPMPDLXWVKSIGSTENLKHOP
256-2853R	VKSKIGSTENLKHOPGGGKVQIVYKPVLDLS
gocpe 256-2853R (pSe-262)	VKSKIGSTENLKHOPGGGKVQIVYKPVLDLS
256-2854R	VKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKL DLS
gocpe 256-2854R (pSe-262)	VKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKL DLS
259-2883R	KIGSTENLXHQPGGGKVQIVYKPVLDLSKYT
gocpe 259-2883R (pSe-262)	KIGpSTENLKHQPGGGKVQIVYKPVLDLSKYT
259-2884R	KIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKL DLSNVQ
gocpe 259-2884R (pSe-262)	KIGpSTENLKHQPGGGKVQIINKKL DLSNVQ
270-3004R	PGGGKVQIINKKL DLSNVQSKCGSKDNKHVP
275-3084R	VQIINKKL DLSNVQSKCGSKDNKHVP GGGS
284-2933R	ENLKHOPGGGKVQIVYKPVLDLSKVTSKCGS
284-2934R	ENLKHOPGGGKVQIINKKL DLSNVQSKCGGS
281-3054R	KL DLSNVQSKCGSKDNKHVP GGGS
282-3114R	L DLSNVQSKCGSKDNKHVP GGGSVQIVYK
281-3204R	CGSKDNKHVP GGGSVQIVYKPVLDLSKYTS
301-3304R	PGGGSVQIVYKPVLDLSKVTSKCGSLDNHH
314-3434R	DLSKYTSKCGSLGNHHPKPGGGQVEVKSE
352-3804R	GKSHDNLTHVPPGGGNKIE THKLTFREN

Fig. 7B



Фиг. 7C



Фиг. 7D

[illegible]

Fig. 3A

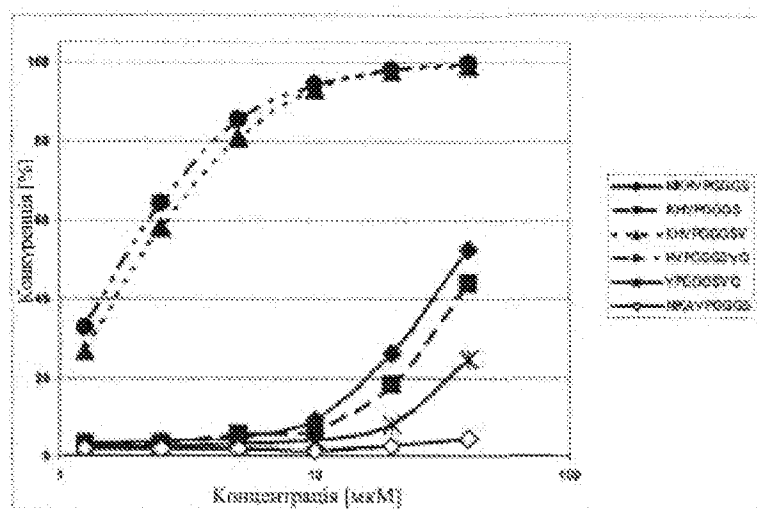


Fig. 8B

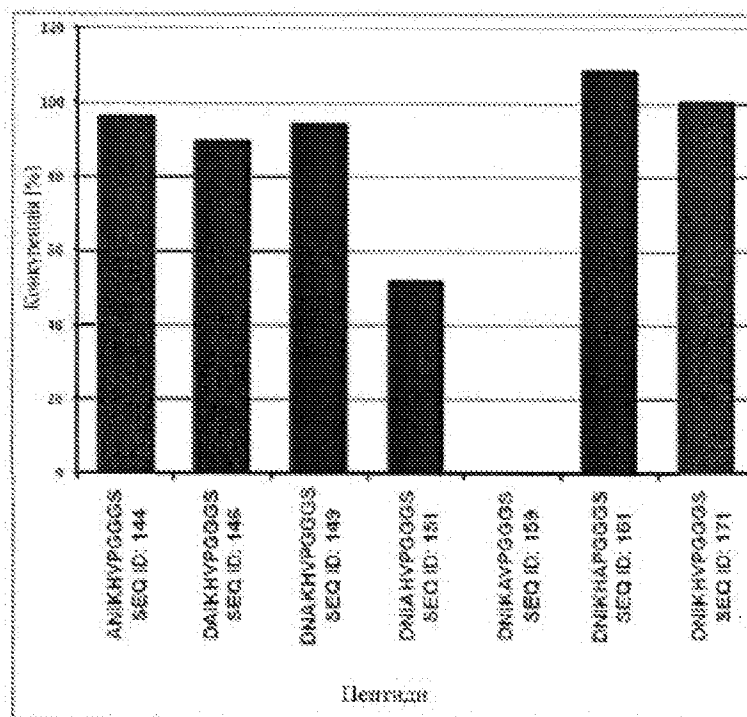


Fig. 8C

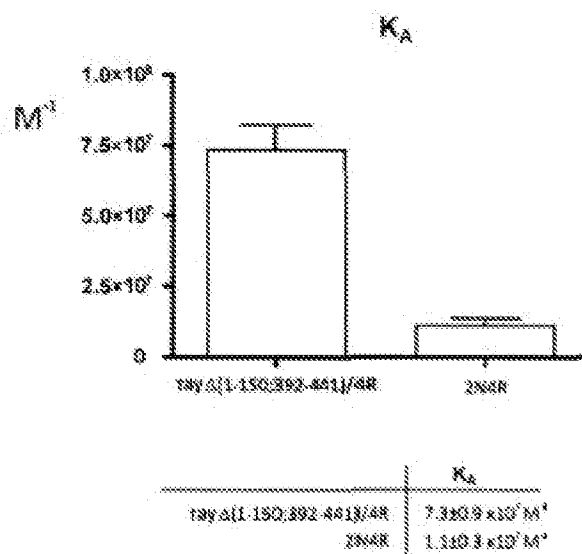
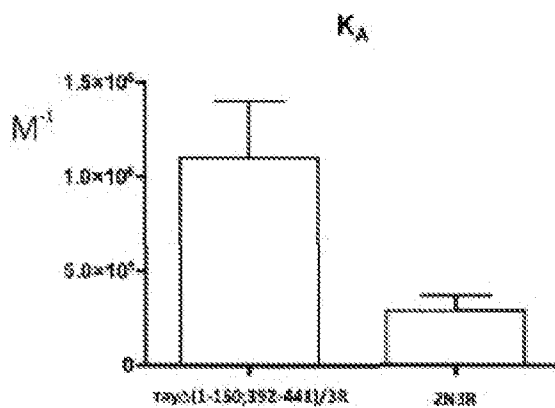


Fig. 9A



	K_A
$\gamma\gamma\delta\delta(1-150;392-441)/3R$	$1.1 \pm 0.3 \times 10^6 M^{-1}$
2N3R	$0.3 \pm 0.1 \times 10^6 M^{-1}$

Fig. 9B

	$k_{on} (s^{-1} M^{-1})$	$k_{off} (s^{-1})$
$\gamma\gamma\delta\delta(1-150;392-441)/4R$	$2.5 \pm 0.5 \times 10^7$	0.04 ± 0.01
2N4R	$4.5 \pm 1.4 \times 10^7$	0.04 ± 0.01

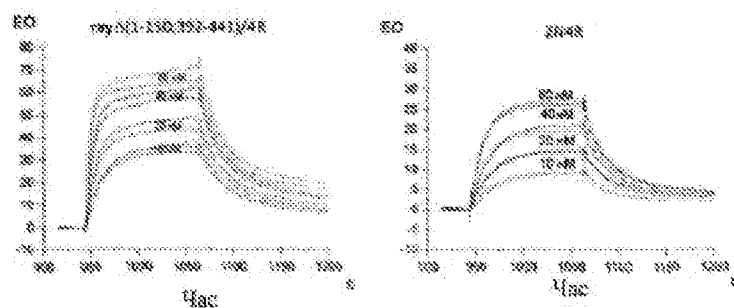


Fig. 10A

	$k_{on} (s^{-1} M^{-1})$	$k_{off} (s^{-1})$
$\gamma\gamma\delta\delta(1-150;392-441)/3R$	$4.0 \pm 1.4 \times 10^7$	0.5 ± 0.1
2N3R	$1.4 \pm 0.4 \times 10^7$	0.5 ± 0.1

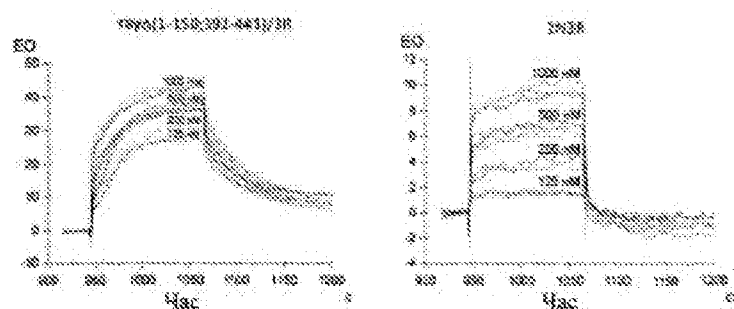


Fig. 10B

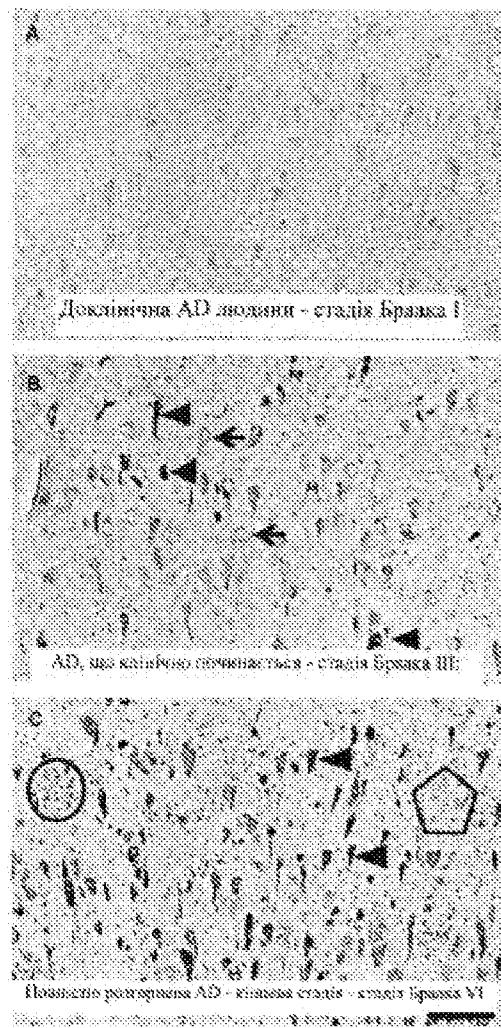


Fig. 11

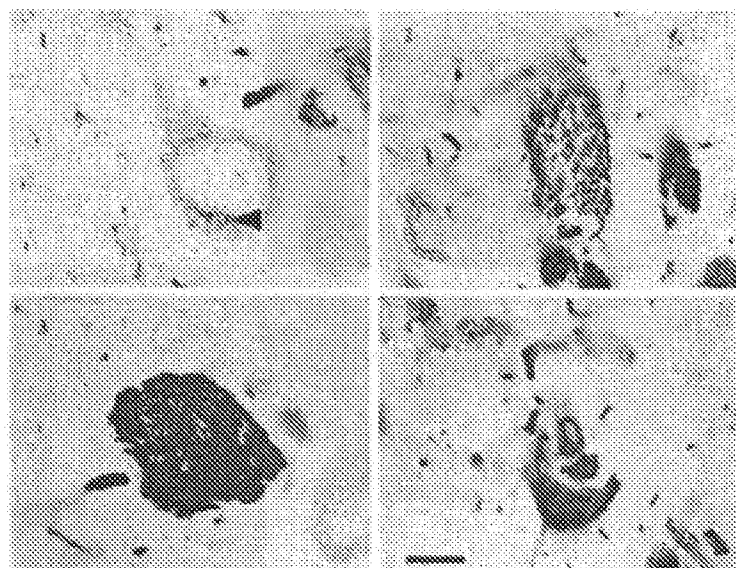


Fig. 11D

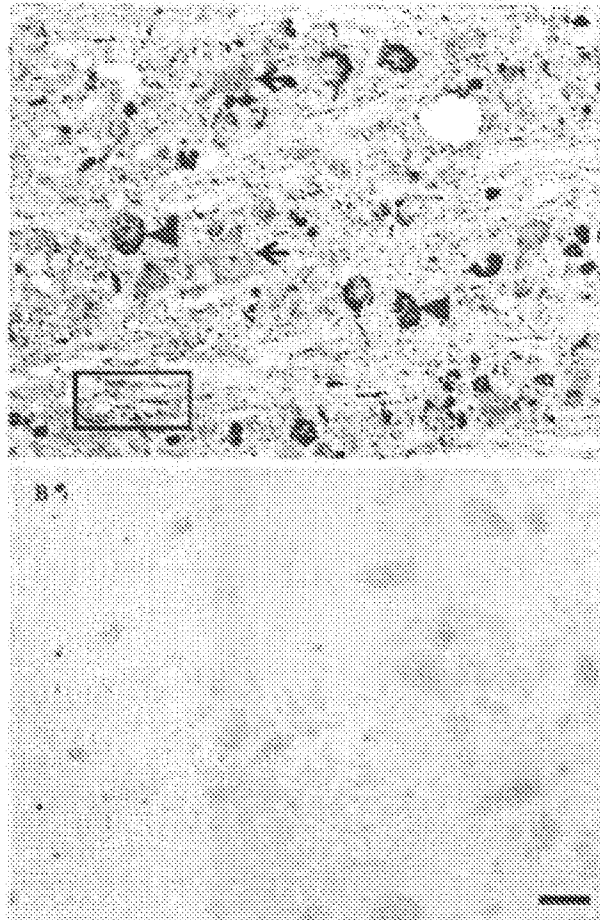


Fig. 12A i Fig.12B

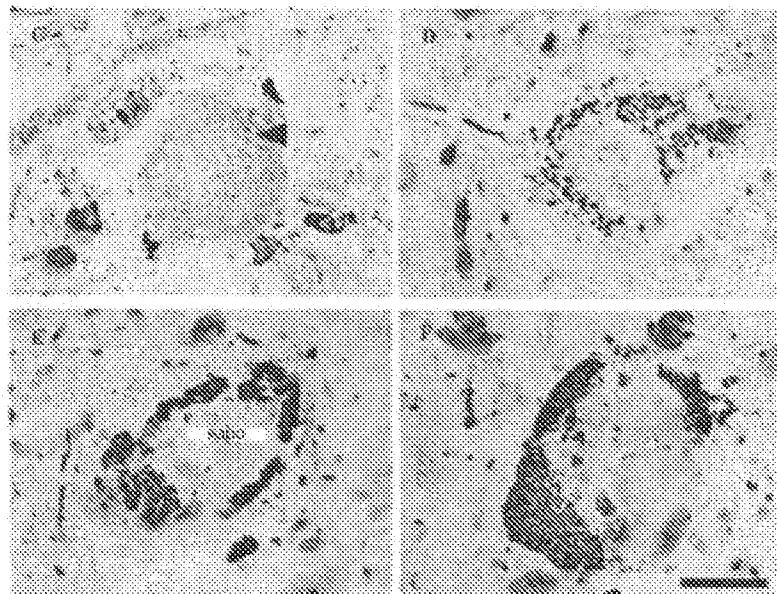
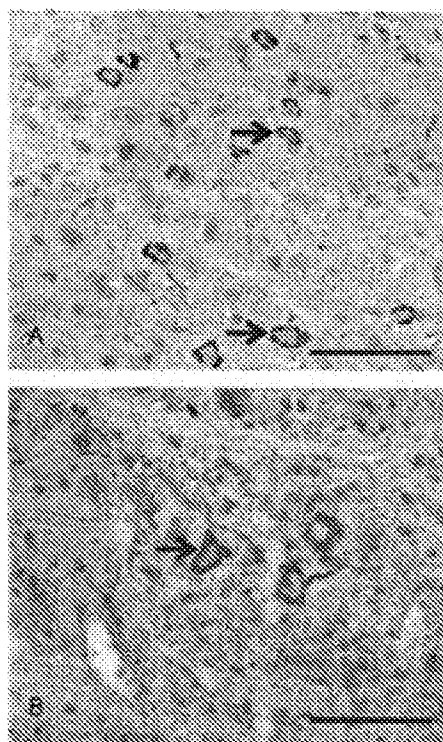
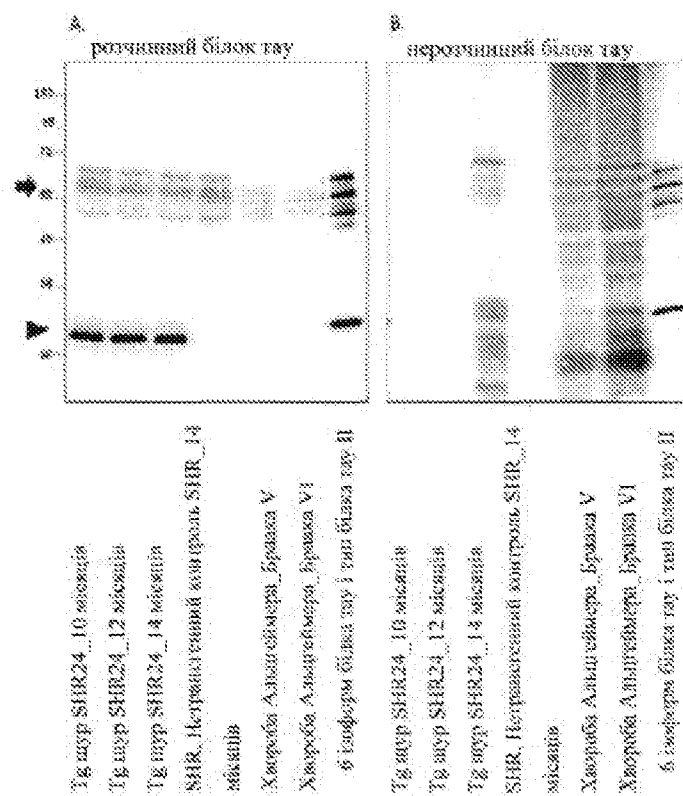


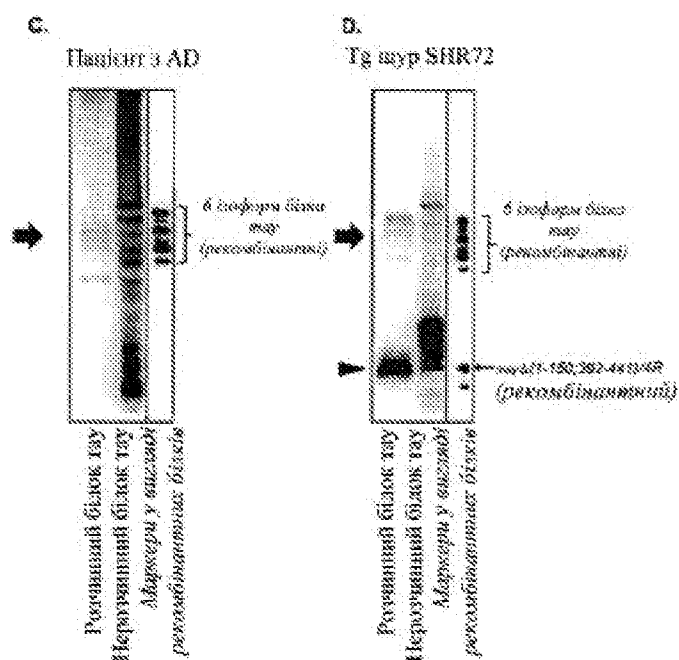
Fig. 12C - Fig. 12F



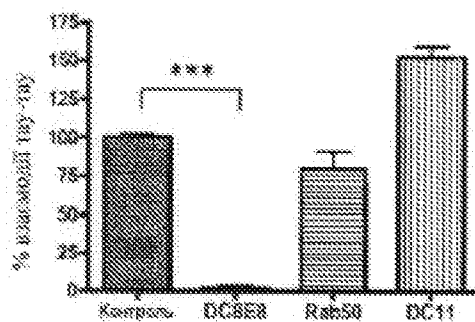
Фіг. 13



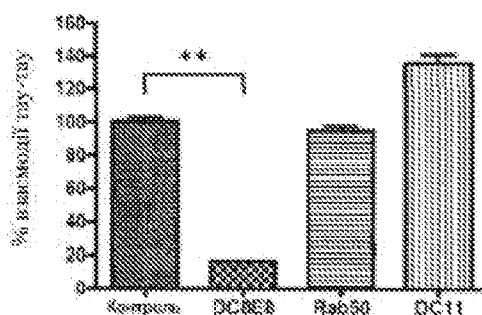
Фіг. 14A і Фіг. 14B



Фіг. 14C і Фіг. 14D



Фіг. 15A



Фіг. 15B

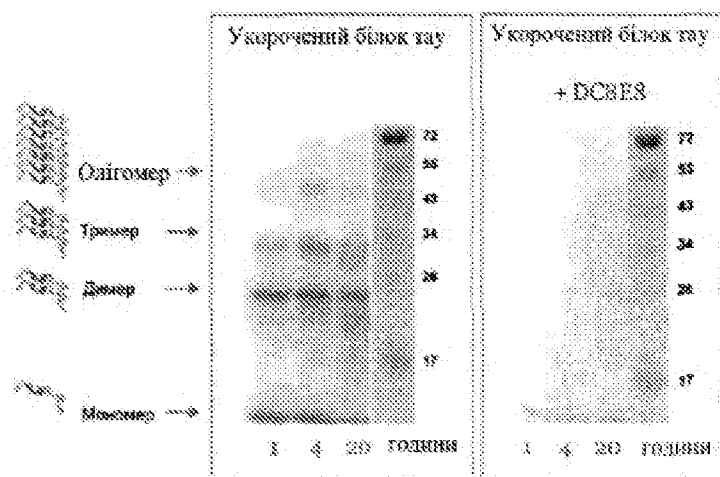


Fig. 16

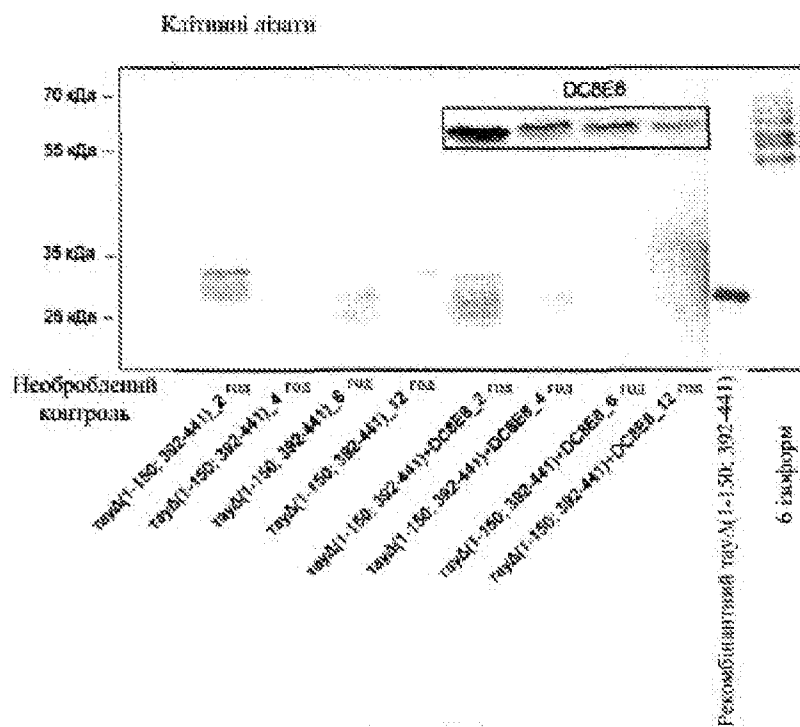
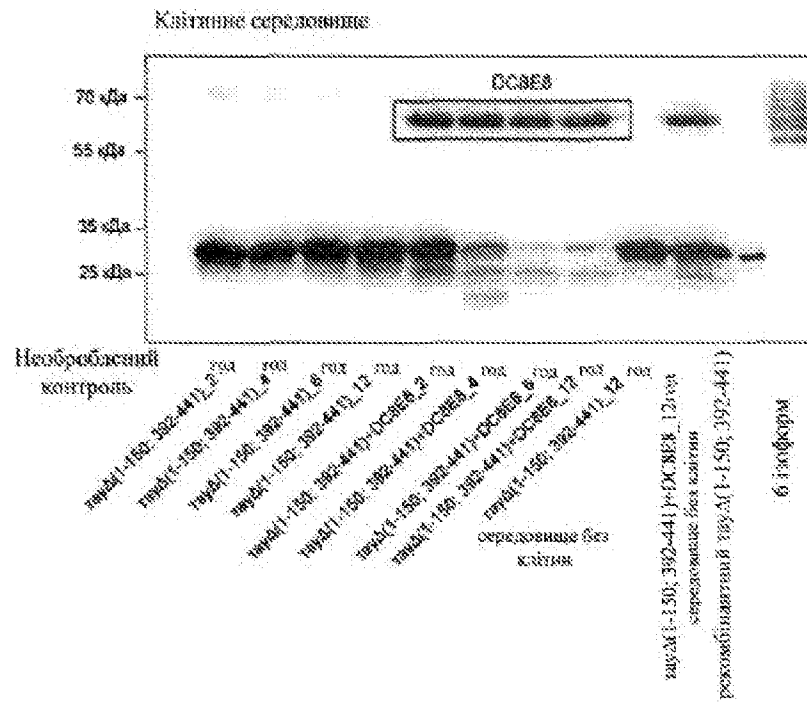
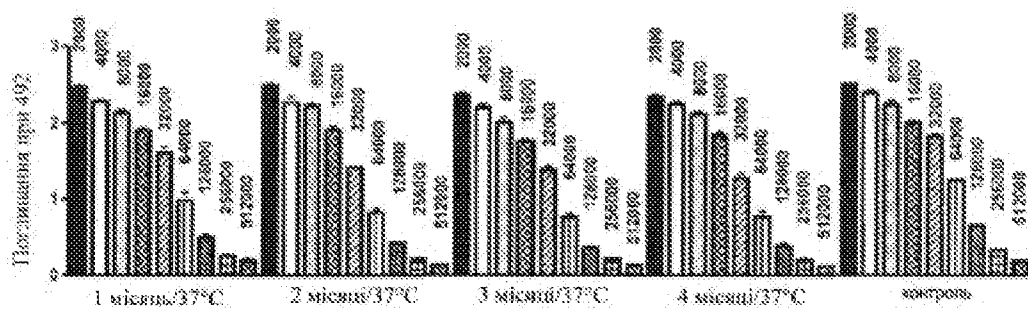


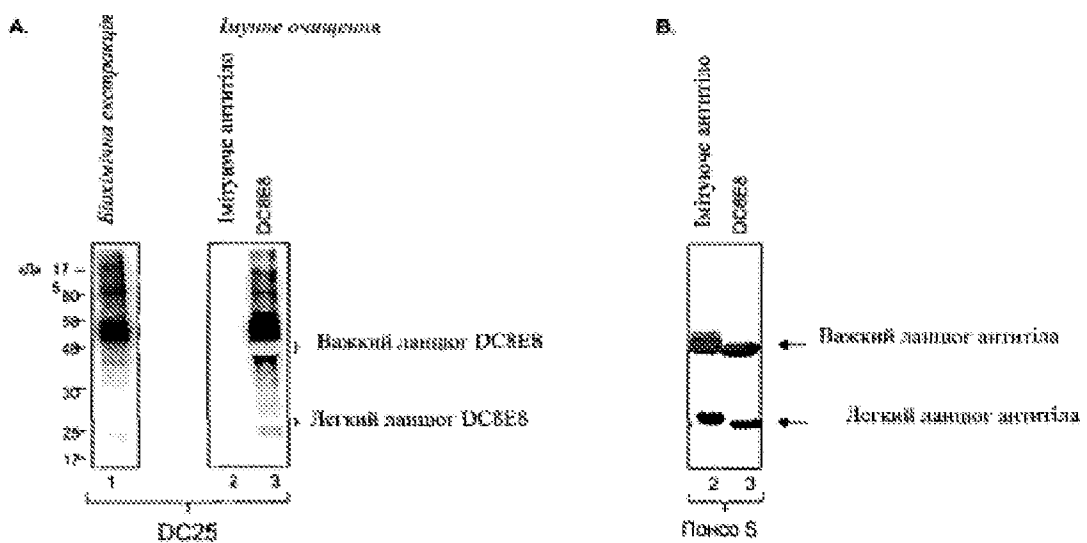
Fig. 17A



Фіг. 17В

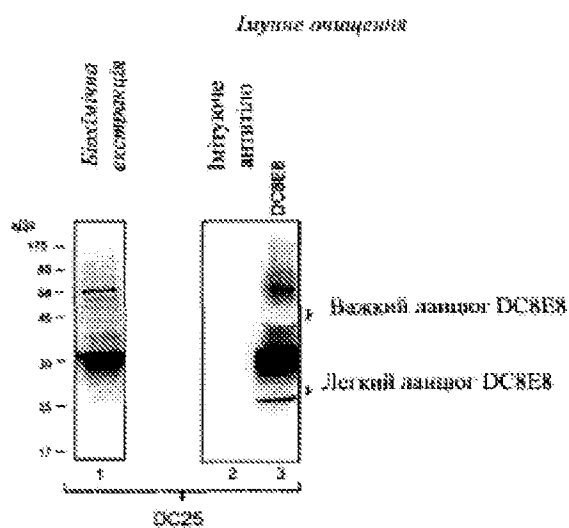


Фіг. 18

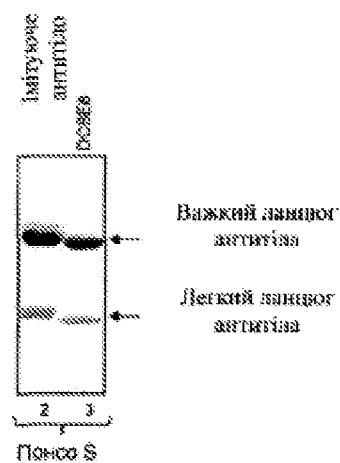


Фіг. 19

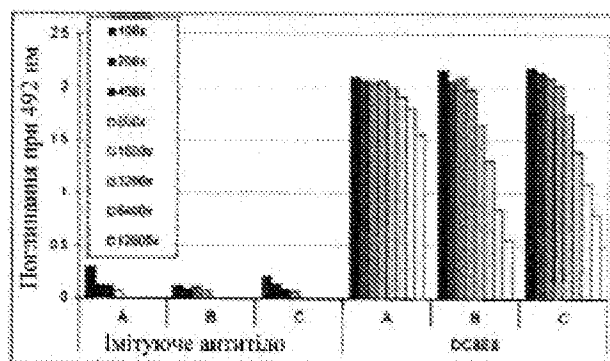
А. Білок тау при хворобі Альцгеймера



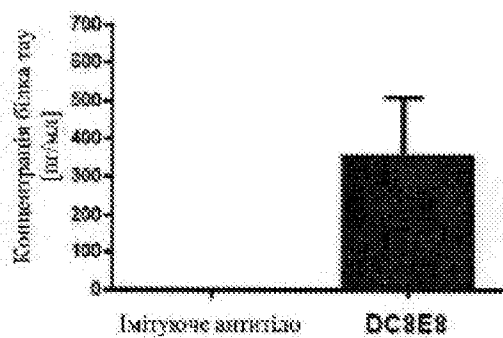
В.



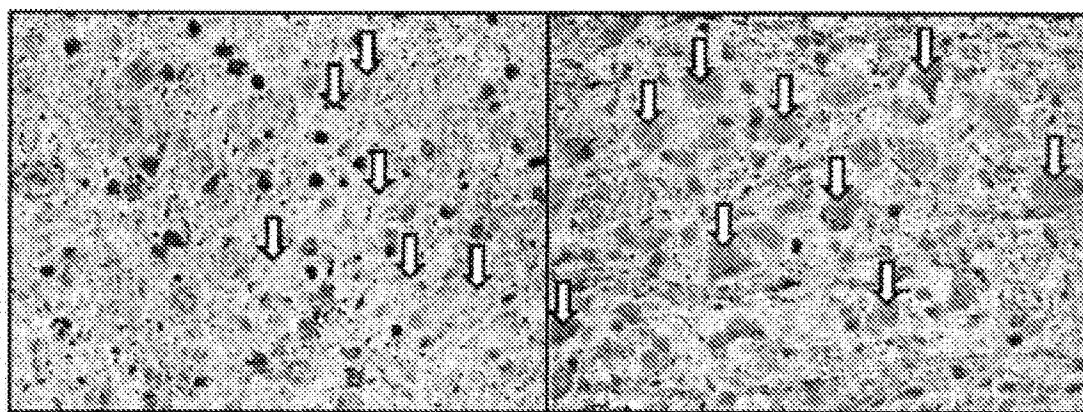
Фиг. 20



Фиг. 21А



Фиг. 21В



Обробка DC8E8

Обробка імітунним антитілом

Fig. 22A

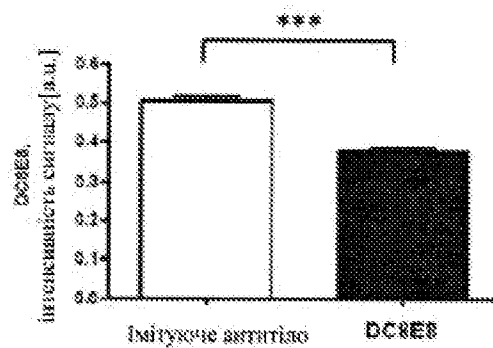


Fig. 22B

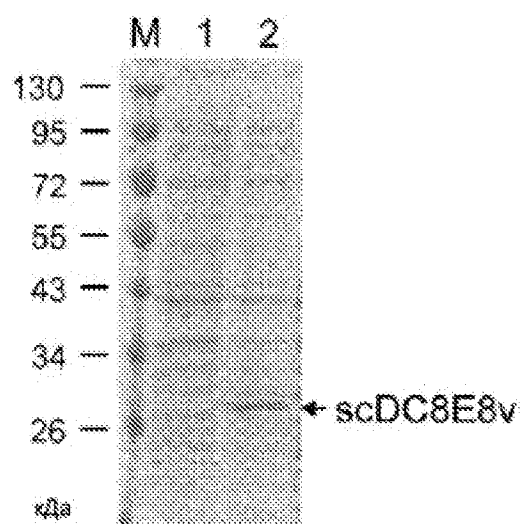


Fig. 23A

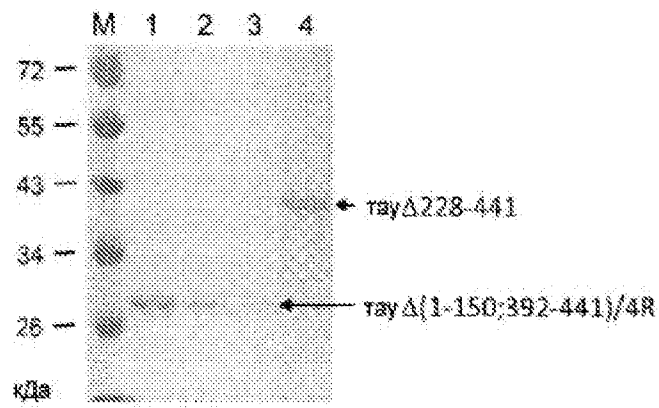


Fig. 23B

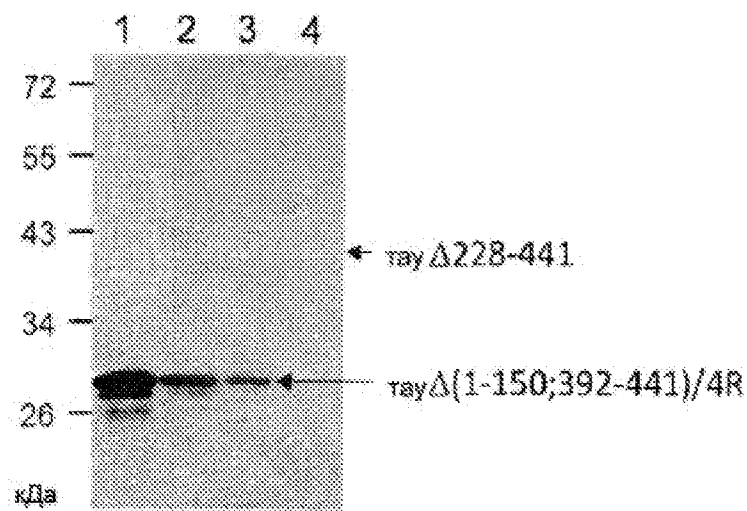


Fig. 23C

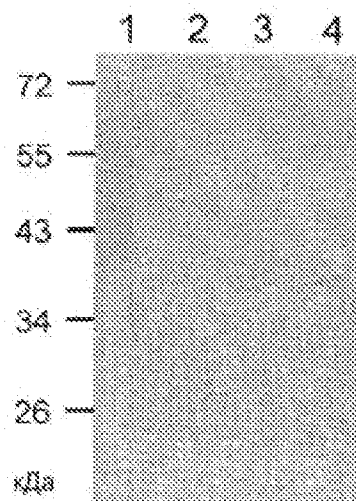
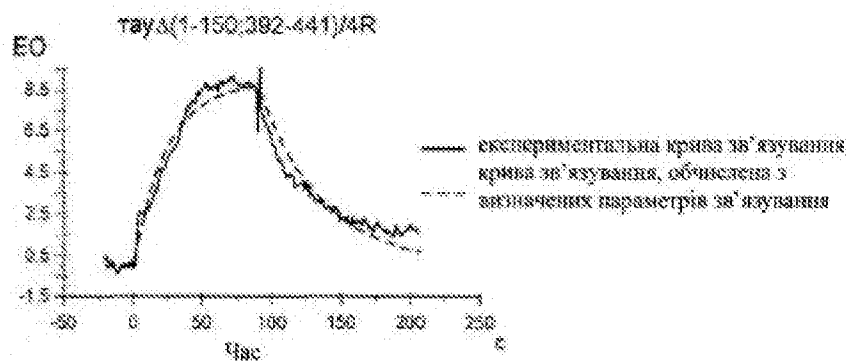
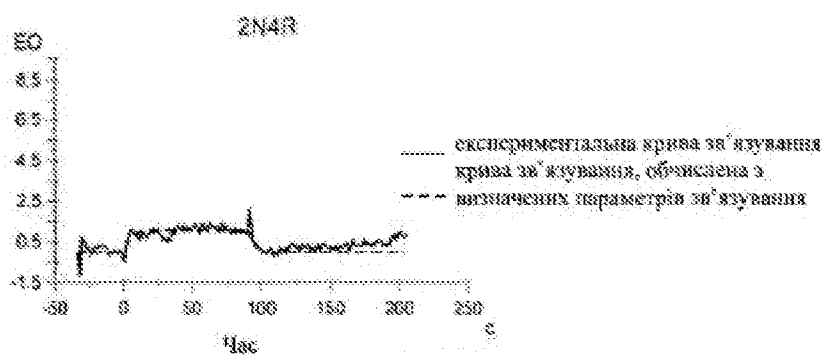


Fig. 23D



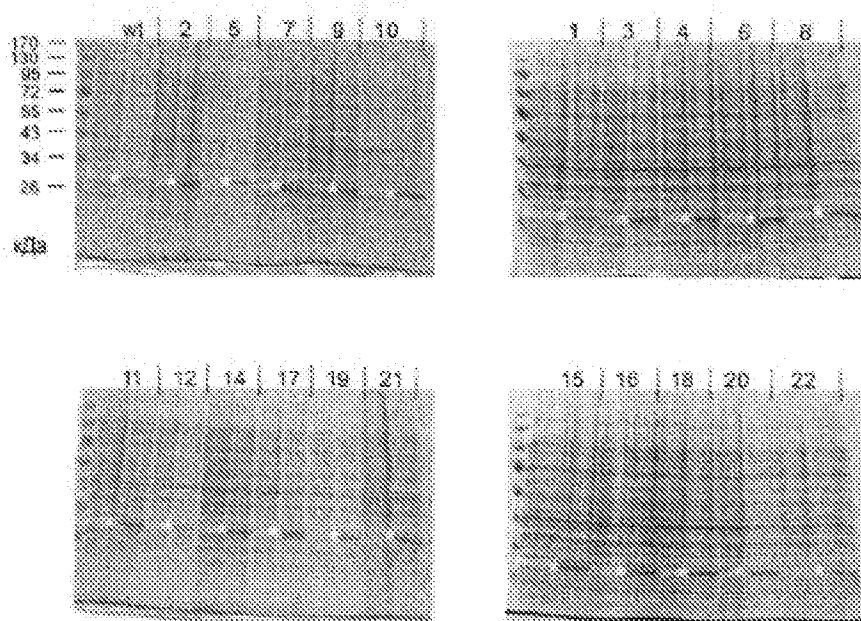
Фіг. 24А



Фіг. 24В

	$k_{\text{on}}(\text{с}^{-1} \text{M}^{-1})$	$k_{\text{off}}(\text{с}^{-1})$	$K_{\text{a}}(\text{M}^{-1})$
$\tau_{\text{au}}\Delta(1-150,392-441)/4R$	1.8×10^5	0.02	8.1×10^6
2N4R	5.7×10^4	0.2	2.7×10^5

Фіг. 24С



Фіг. 25А

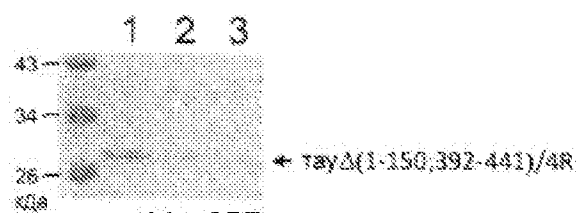


Fig. 25B

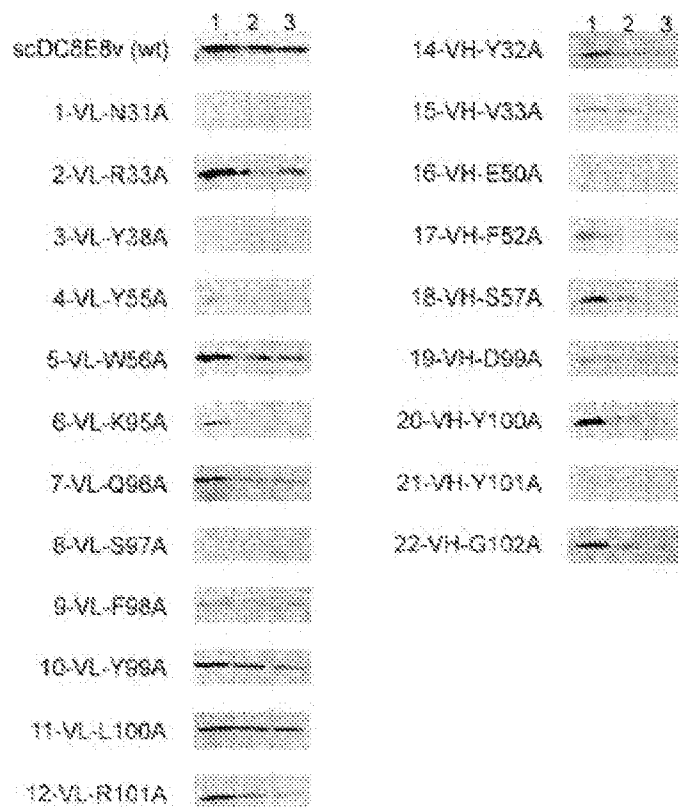


Fig. 25C

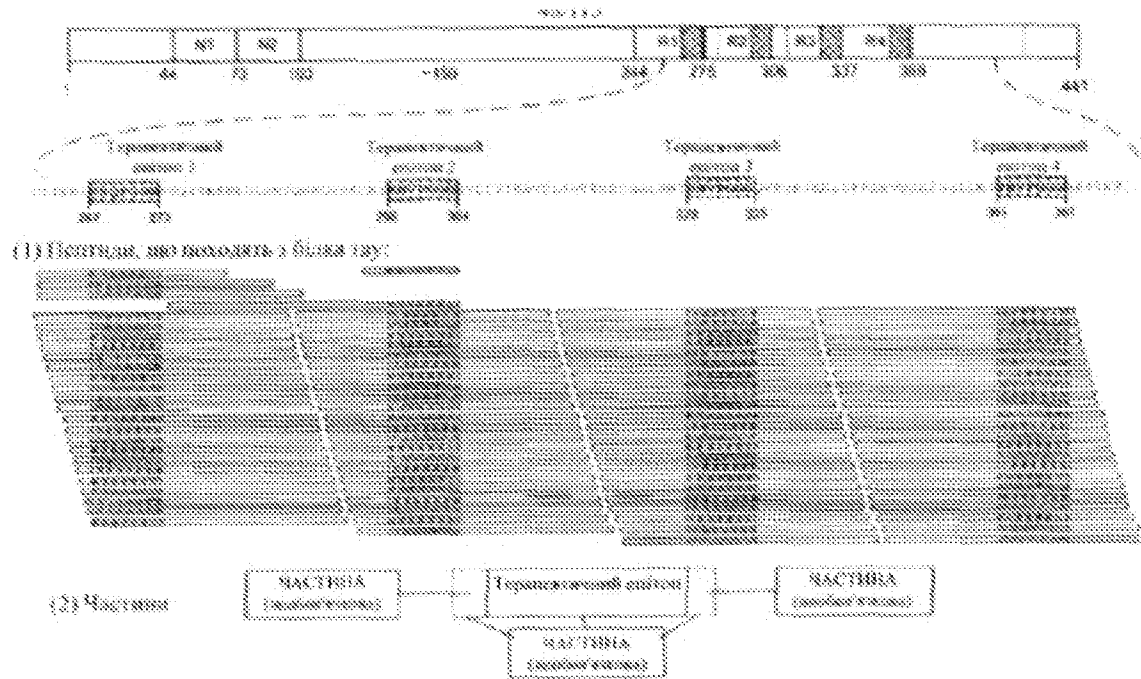
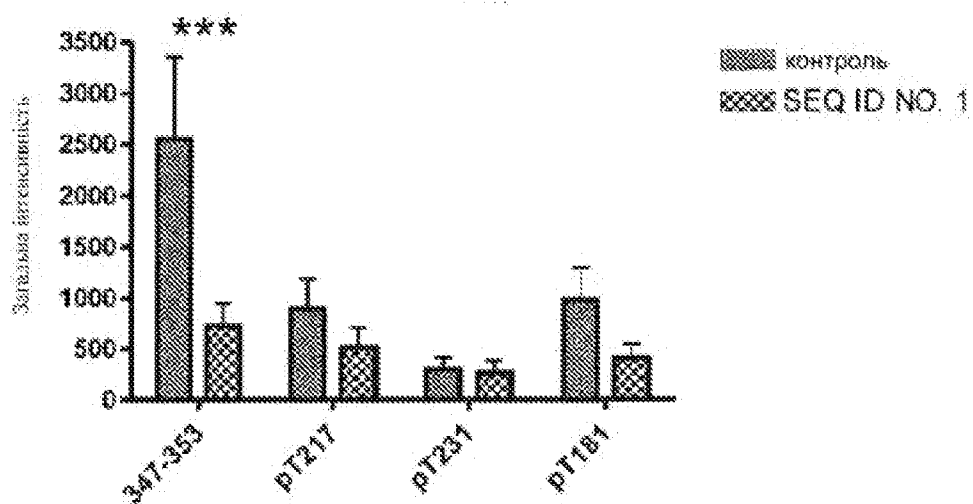


Fig. 26A

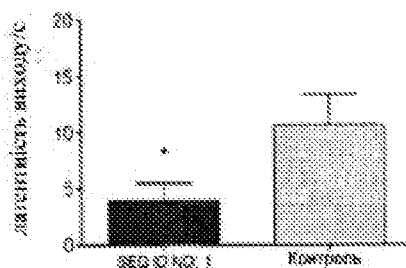
SEQ ID NO	Інсукопи	Зниження рівня епітонів нерозчинного біля тасу, що мають значення при AD (%)				
		347-353	pT217	pT231	pS202/pT205	pT383
SEQ ID NO: 1	Tay253-280	71	42	11	ND	58
SEQ ID NO: 2	Tay256-285	41	72	84	80	74
SEQ ID NO: 2	Tay256-285/pS262	46	73	85	82	82
SEQ ID NO: 3	Tay258-288	40	30	63	61	74
SEQ ID NO: 4	Tay275-304	83	92	95	95	97
SEQ ID NO: 108	Tay294-305	70	86	97	98	94
SEQ ID NO: 5	Tay201-230/pT217	1	-11	33	-31	30
SEQ ID NO: 6	Tay379-408/pS396/pS404	-87	-33	-44	18	-7
SEQ ID NO: 7	Tay181-210/pS202/pT205	-6	-3	-11	-41	-7
SEQ ID NO: 8	Tay300-317	-82	9	-80	17	-10

Fig. 26B

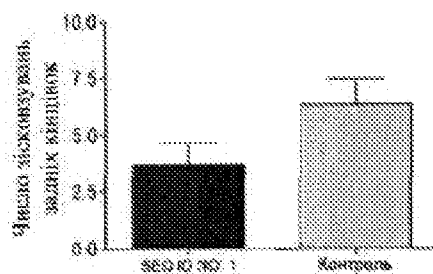


Фиг. 26С

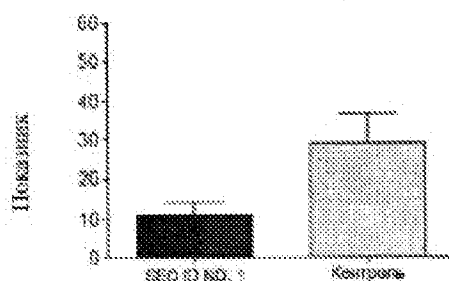
А Випробування ходіння по перекладині (3,5-см перекладина)



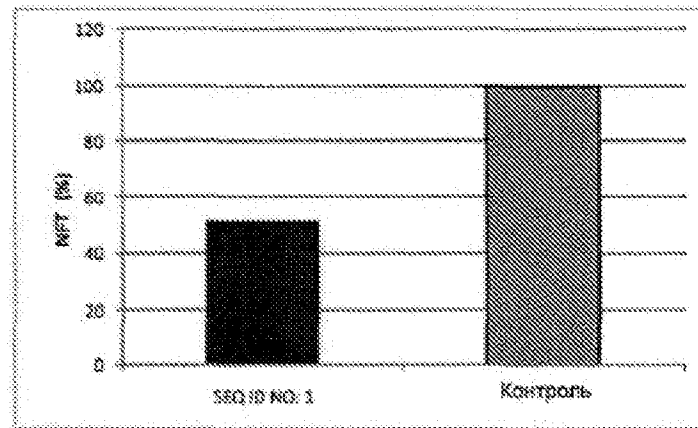
В Число зісковзувань задніх кінцівок (3,5-см перекладина)



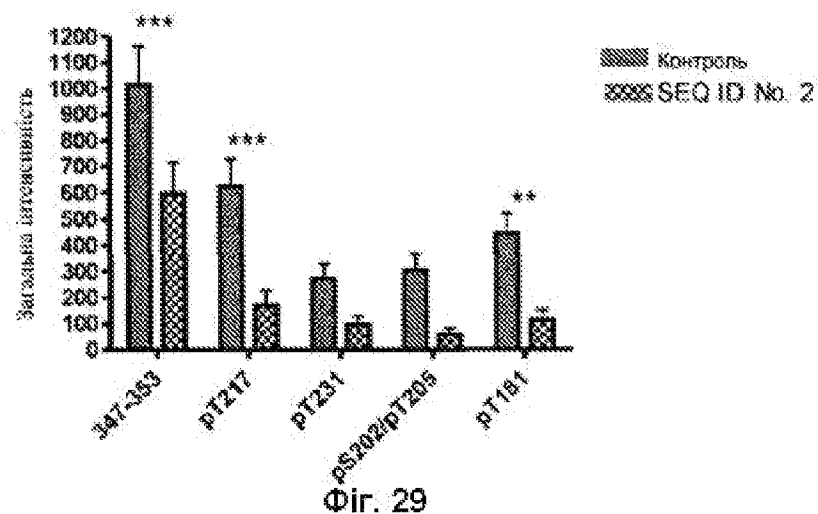
С Neuroscale



Фиг. 27

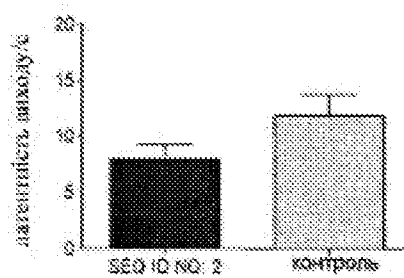


Фиг. 28

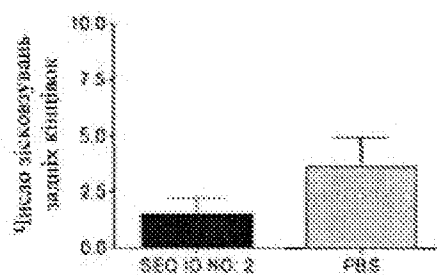


Фиг. 29

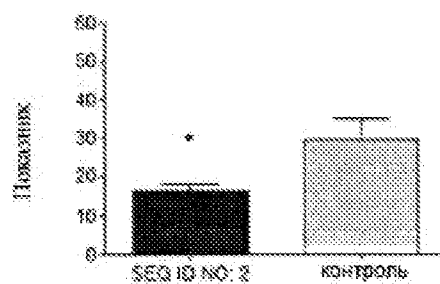
А. Випробування ходіння по перекладині (3,5-см перекладина)



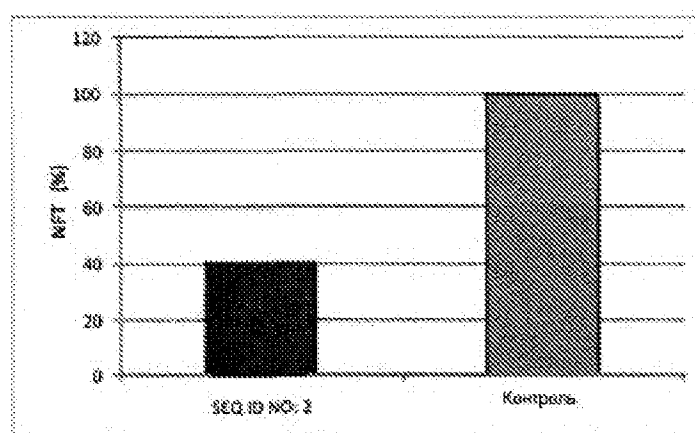
В. Число зісковзувань задніх кінцівок (3,5-см перекладина)



С. Neuroscale



Фиг. 30



Фиг. 31

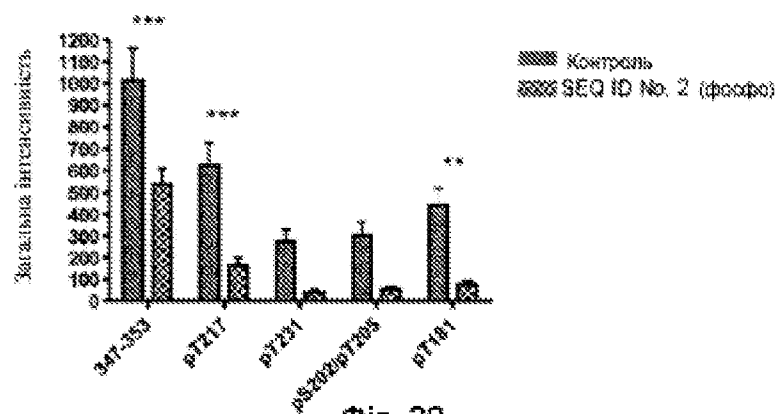


Fig. 32

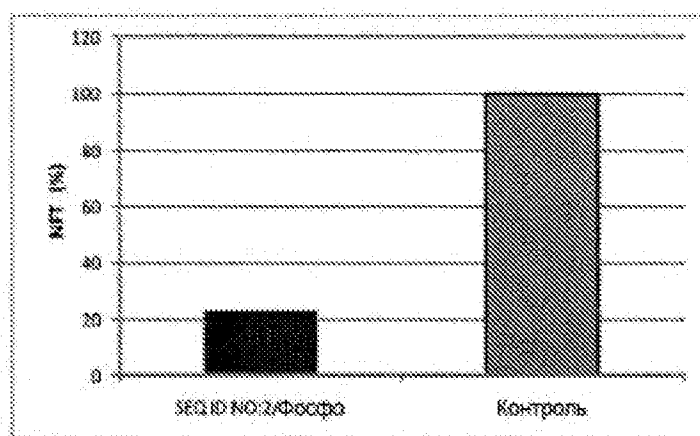


Fig. 33

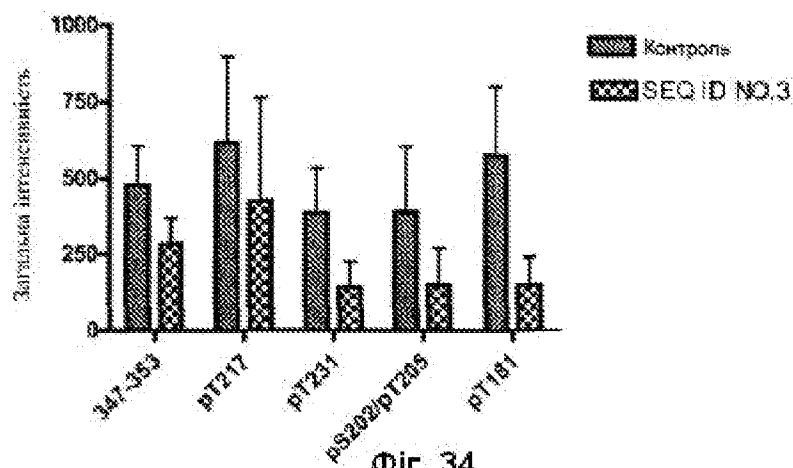
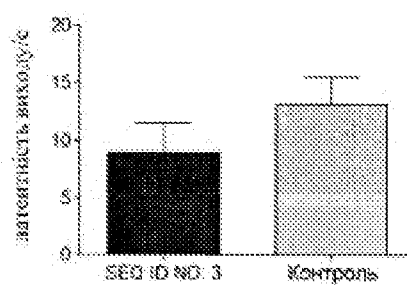
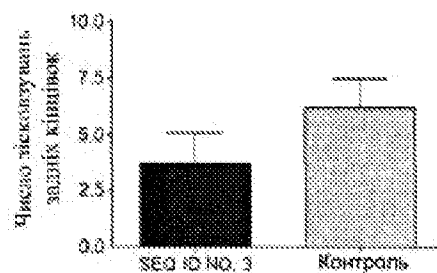


Fig. 34

A. Випробування ходіння по перекладині (3,5-см перекладина)



B. Число зісковзувань задніх кінцівок (3,5-см перекладина)



C. Neuroscale

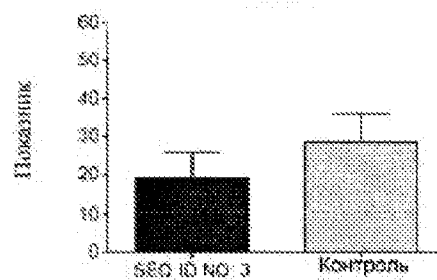


Fig. 35

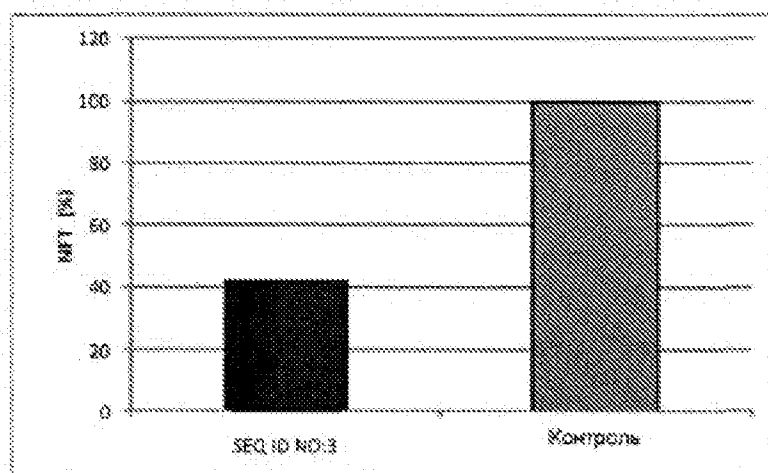
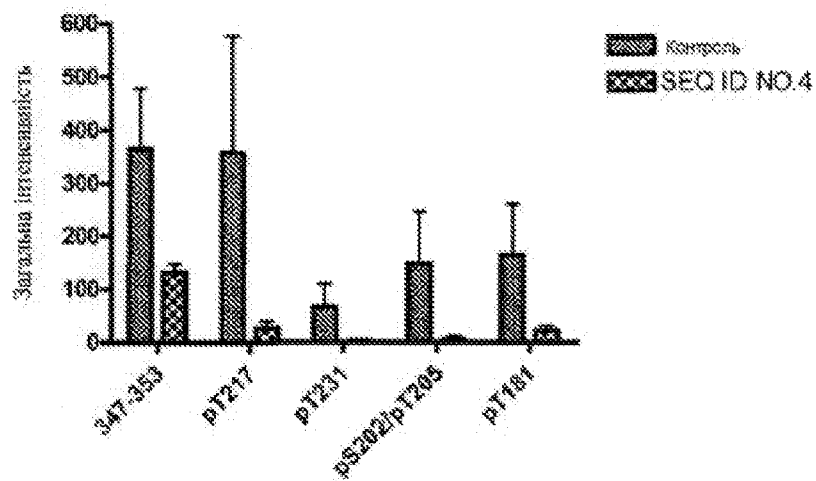
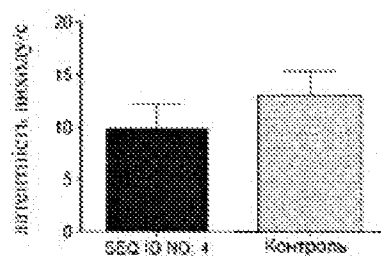


Fig. 36

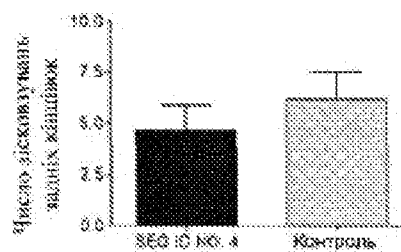


Фіг. 37

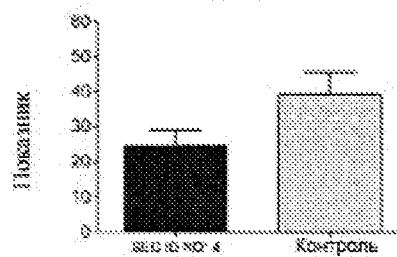
A Випробування ходіння по перекладині (3,5-см перекладина)



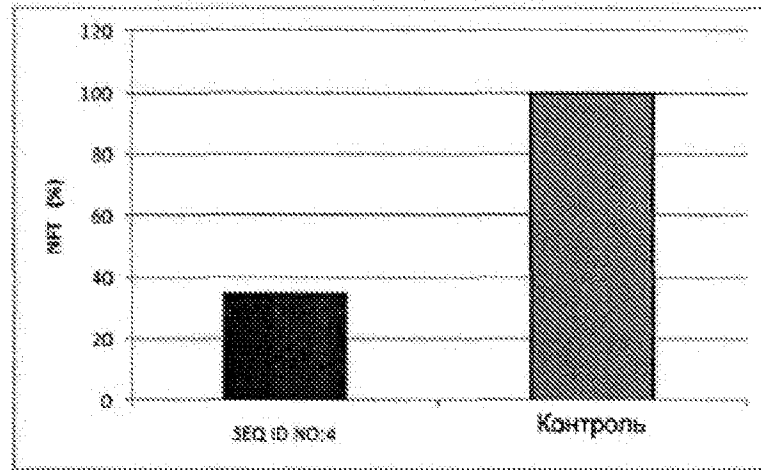
B Число зіскочувань задніх кінцівок (3,5-см перекладина)



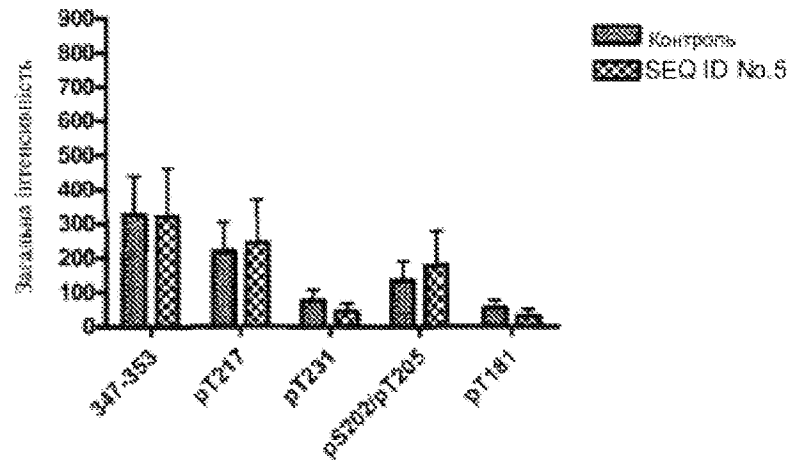
C Neuroscale



Фіг. 38



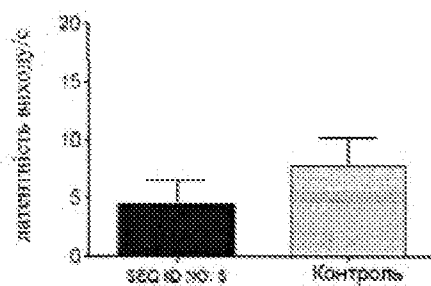
Фиг. 39



Фиг. 40

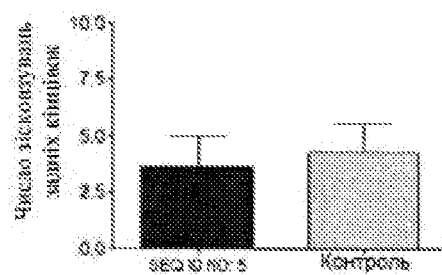
A.

Випробування ходіння по перекладині (3,5-см перекладина)

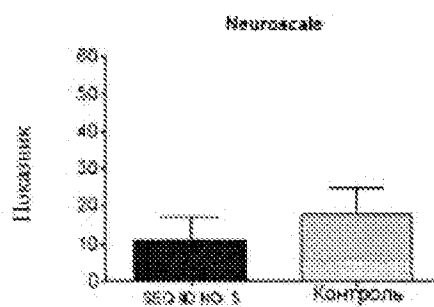


Число зіскозувань задніх кінцівок (3,5-см перекладина)

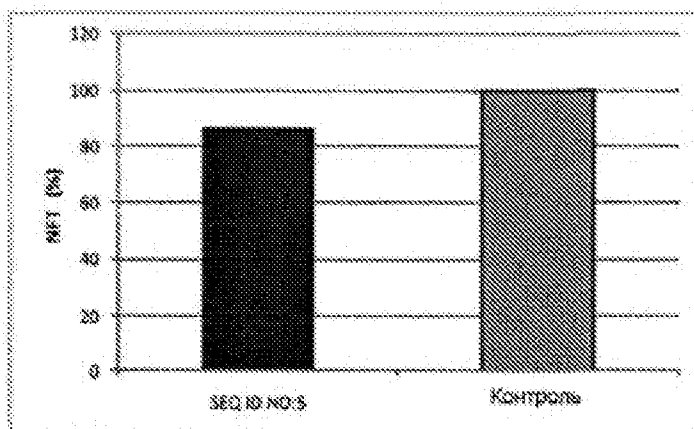
B.



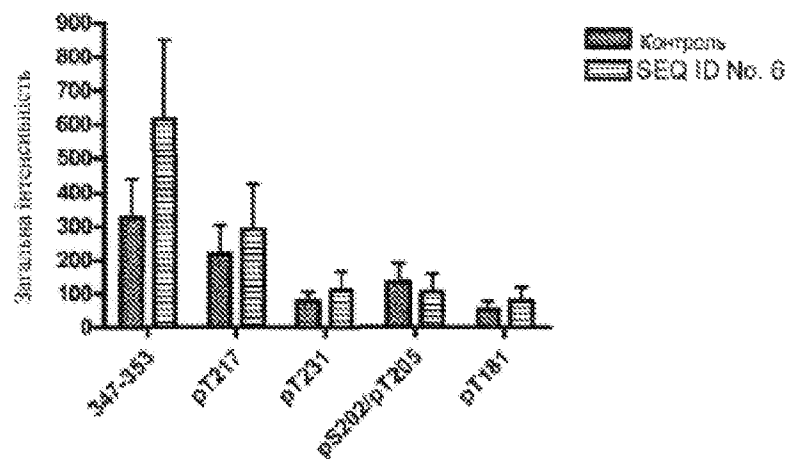
C.



Фіг. 41

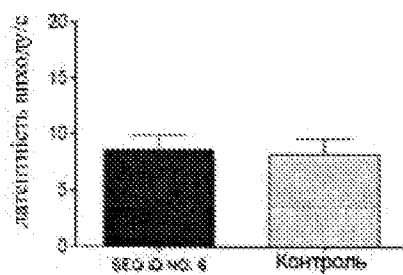


Фіг. 42

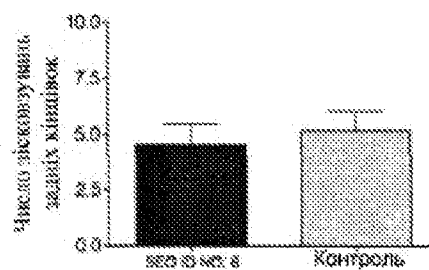


Фиг. 43

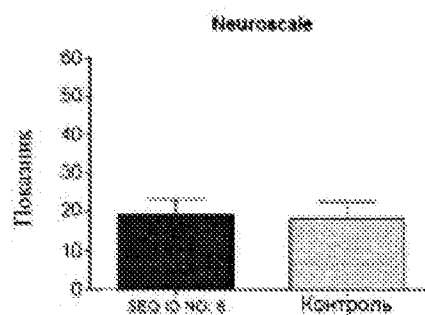
A. Випробування ходіння по перекладні (3,5-см перекладня)



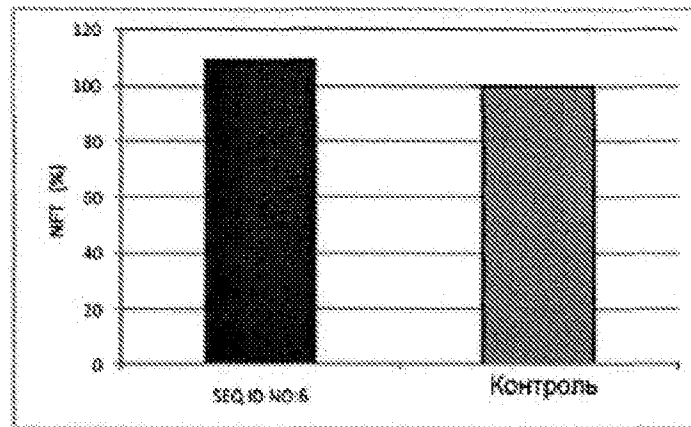
B. Число зісковзувань задніх кінцівок (3,5-см перекладня)



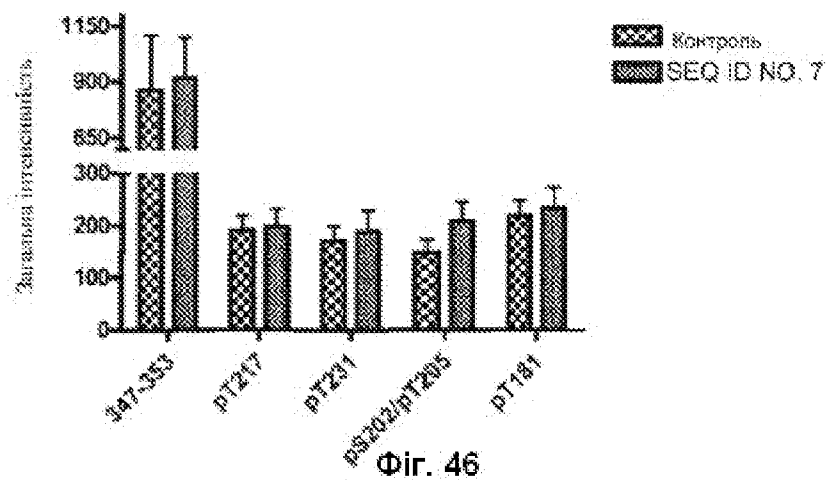
C.



Фиг. 44

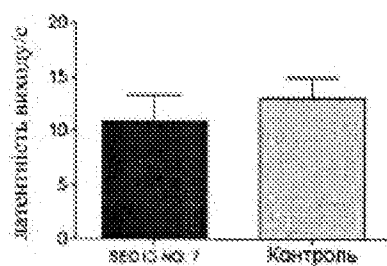


Фиг. 45

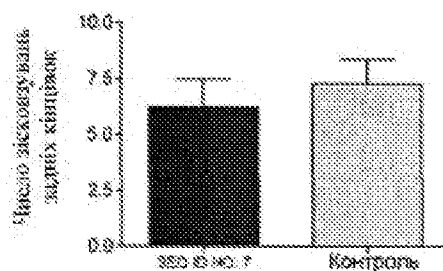


Фиг. 46

А. Випробування ходіння по перекладині (3,5-см перекладина)



Б. Число зіскоблювань задніх кінцівок (3,5-см перекладина)



В. Neuroscale

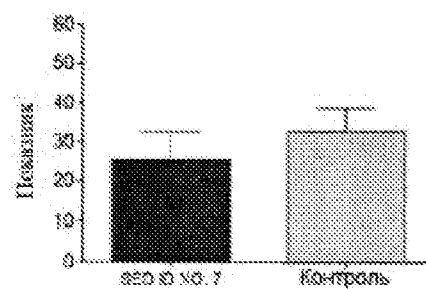


Fig. 47

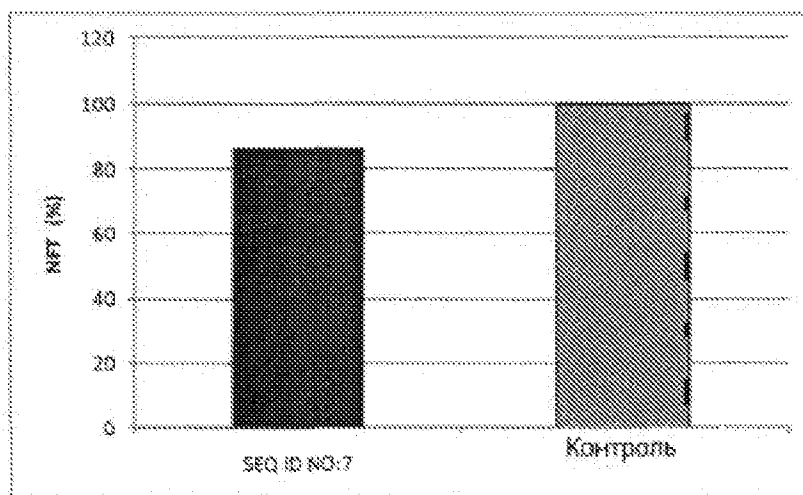


Fig. 48

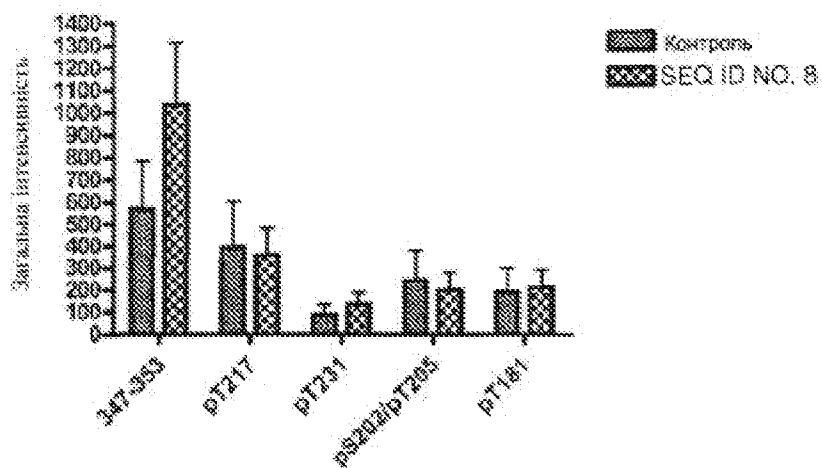
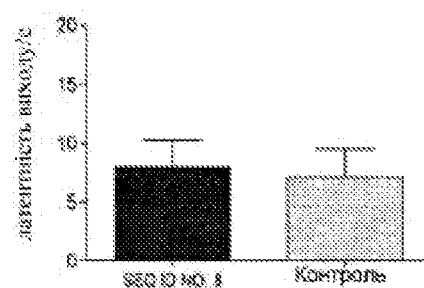


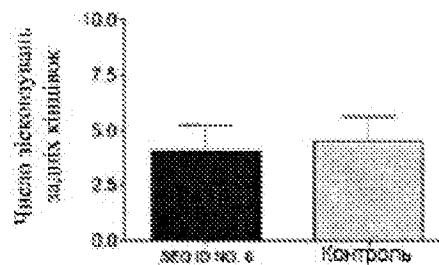
Fig. 49

A. Випробування ходіння по перекладині (3,5-см перекладина)



Число зісковзувань задніх кінцівок (3,5-см перекладина)

B.



C.

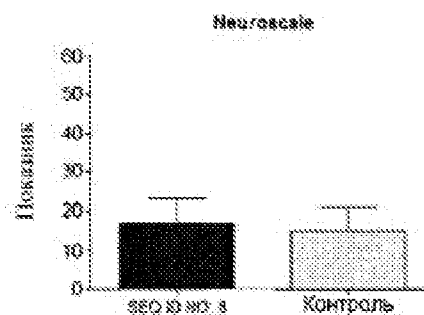
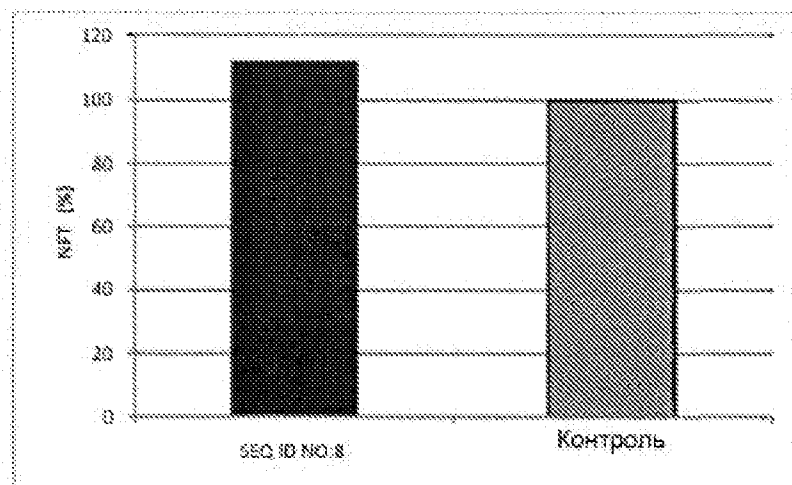
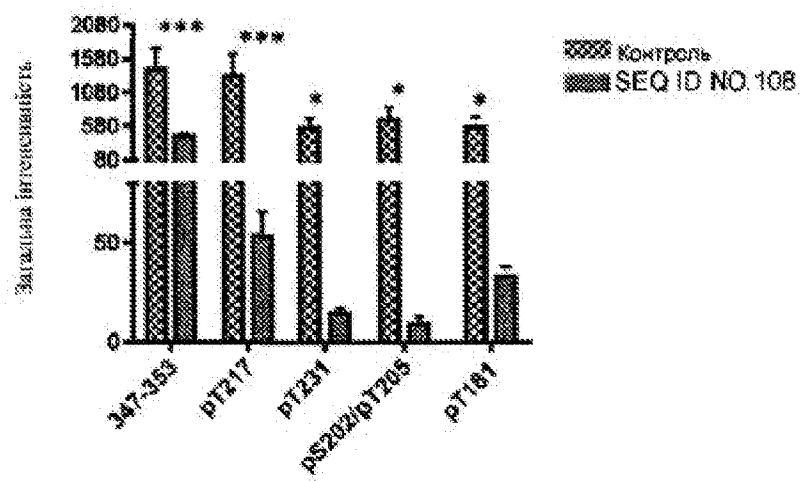


Fig. 50

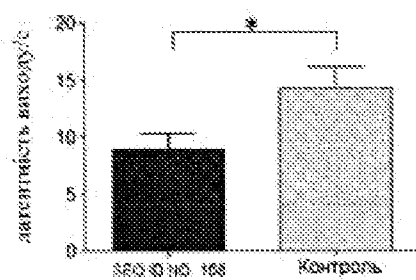


Фиг. 51

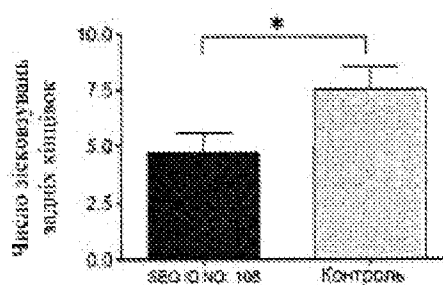


Фиг. 52

A Випробування ходіння по перекладині (3,5-см перекладина)



B Число зісковзувань задніх кінцівок (3,5-см перекладина)



C NeuScale

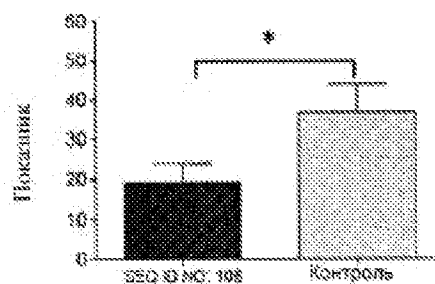


Fig. 53

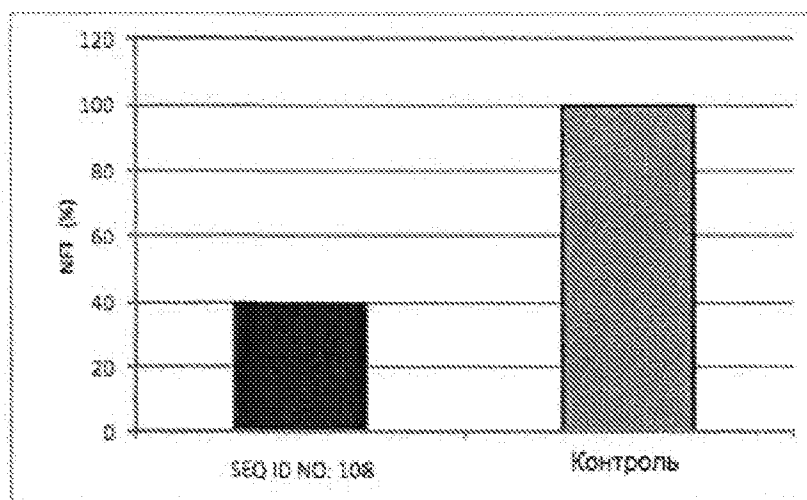


Fig. 54

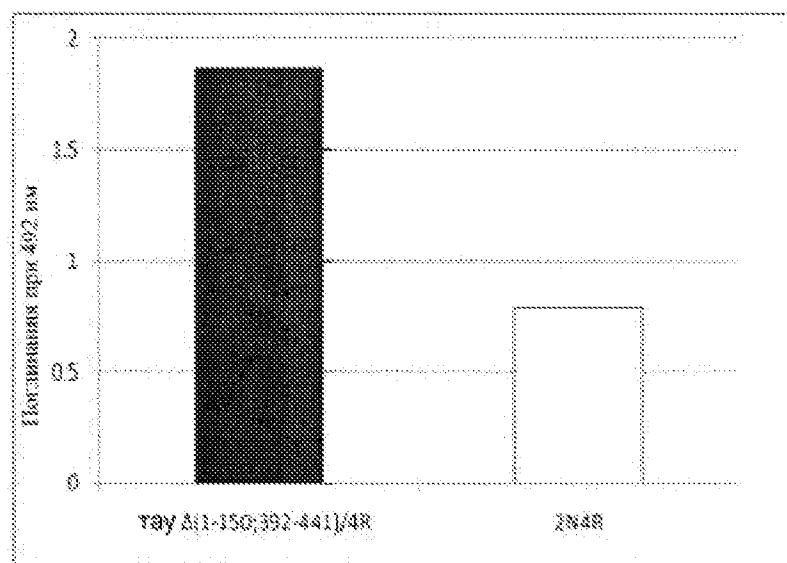


Fig. 55

Геометричні середні титри антитіл

Розведення сироватки	Тверда фаза		
	Пептид SEQ ID NO:108	TauΔ(1-180;382-441)/4R	Tau 2N4R
100	0*	0	0
200	0	0	0
400	0	0	0
800	0	0	2
1 600	0	0	1
3 200	1	0	3
6 400	0	4	1
12 800	2	2	1
25 600	5	4	2
51 200	2	0	0
GMT ^b	20800	12800	4200

Висновки:

*Кількість відповіданих

^bГеометричний середній титр

Fig. 56



Fig. 57

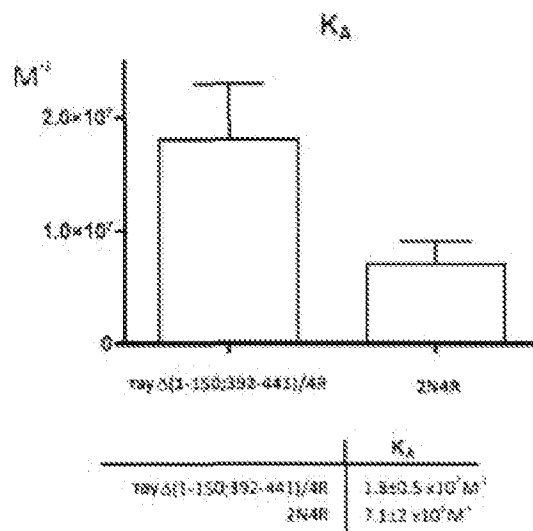


Fig. 58

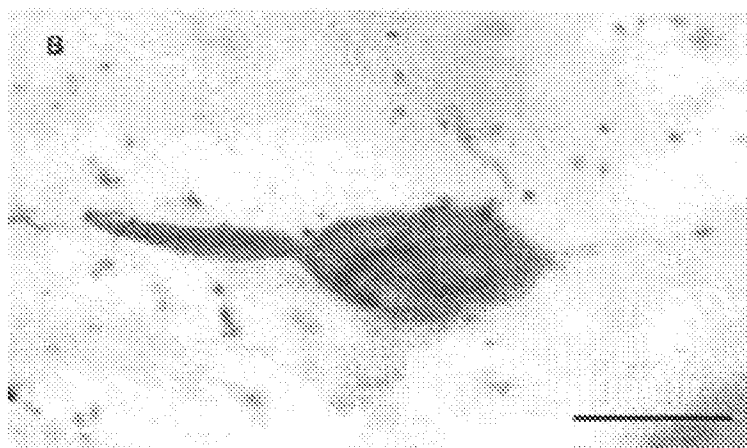
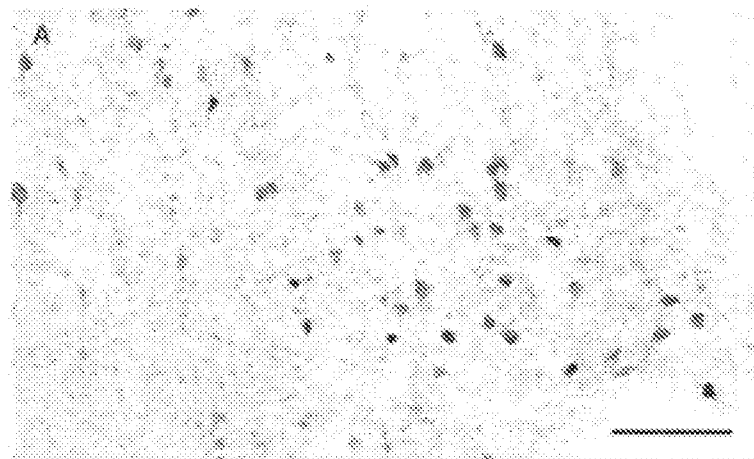


Fig. 59

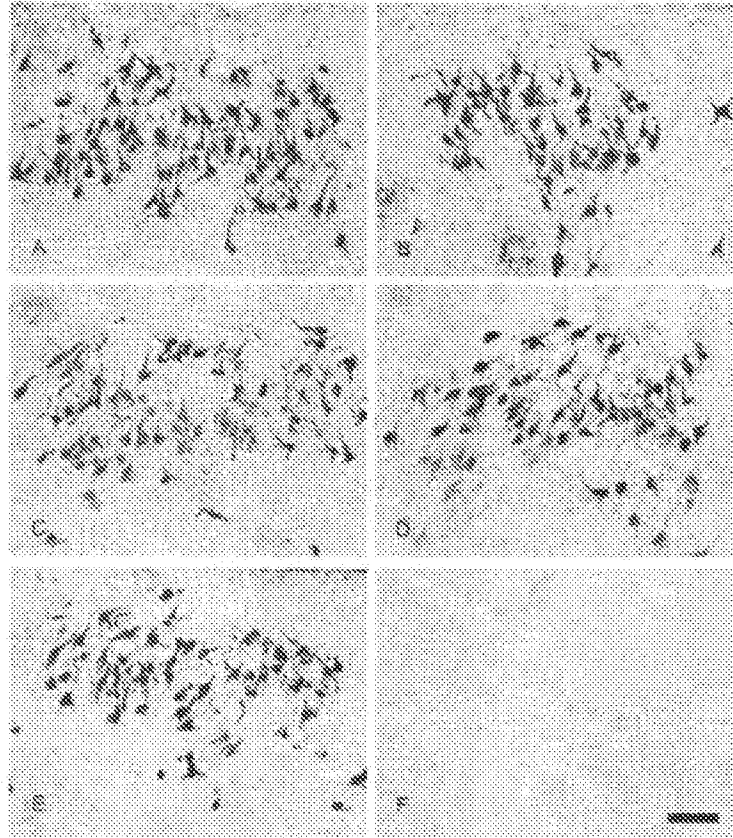


Fig. 60

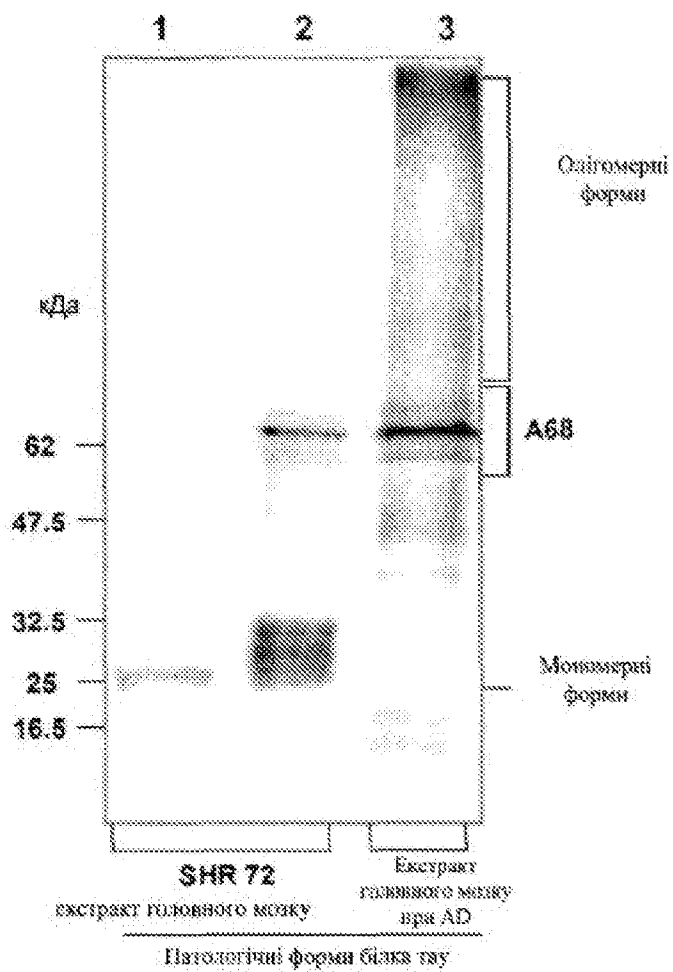


Fig. 61

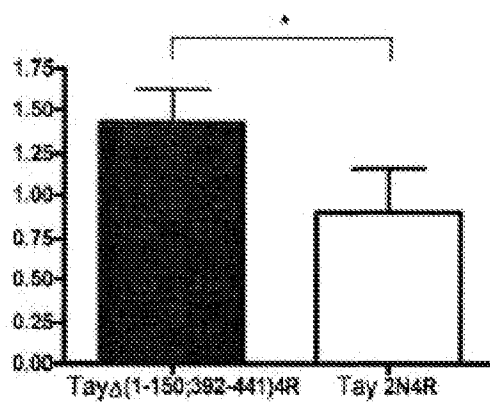


Fig. 62

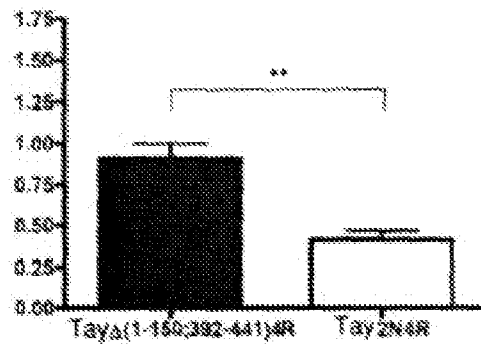


Fig. 63

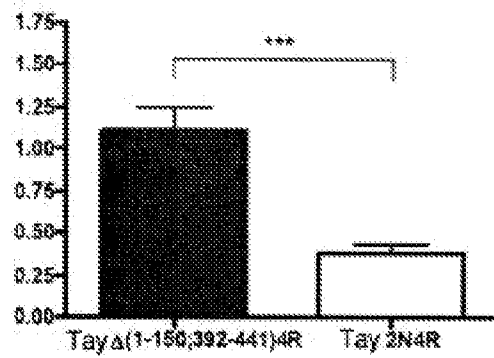


Fig. 64

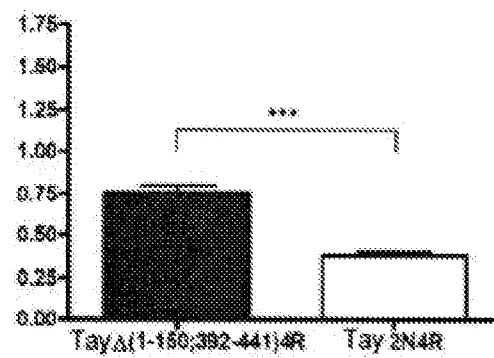
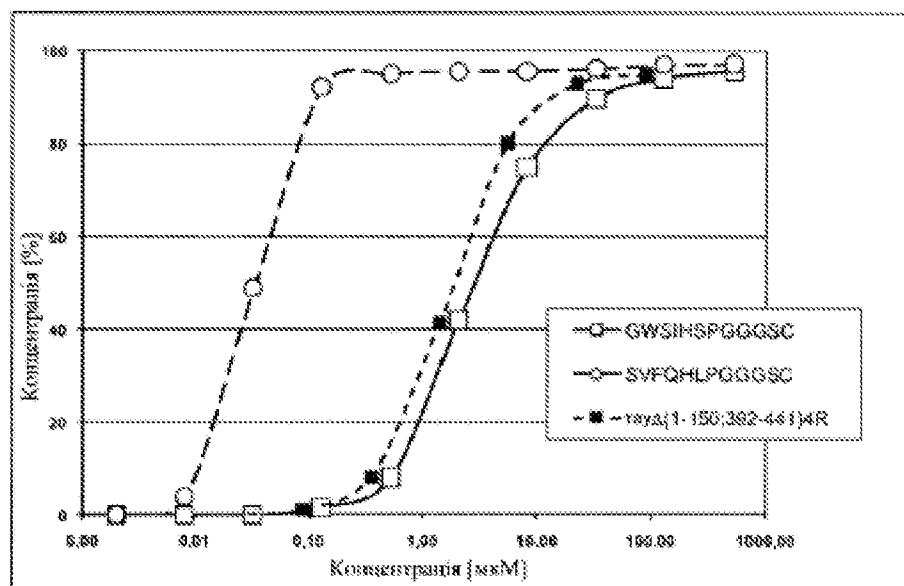
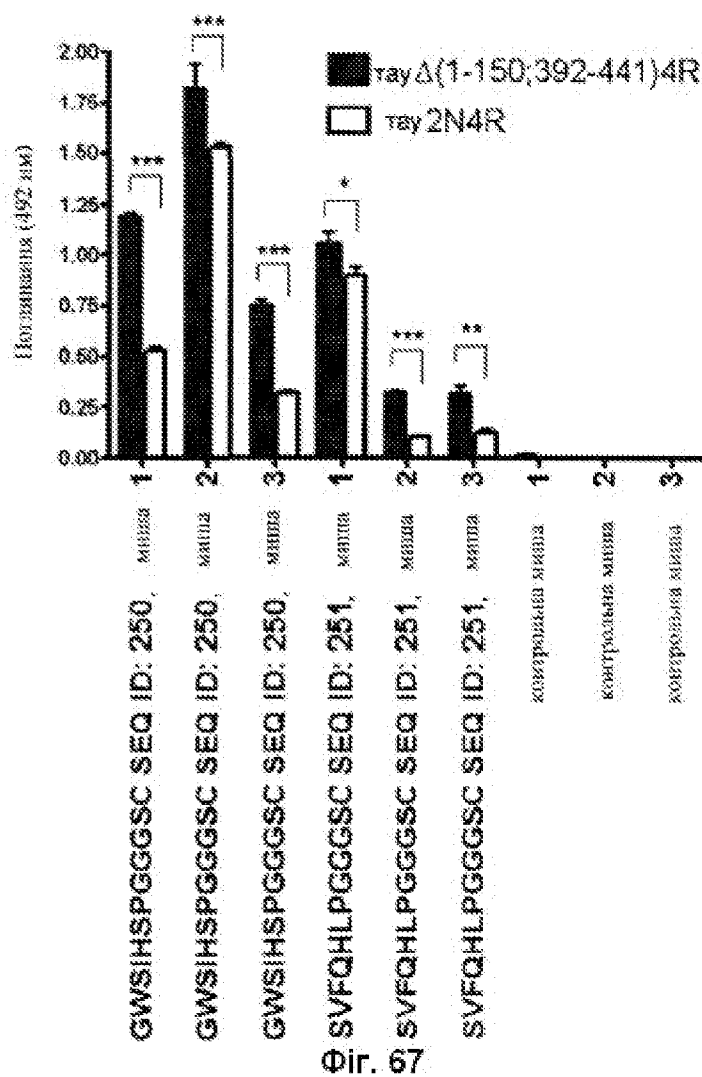


Fig. 65



Фиг. 66



Фиг. 67

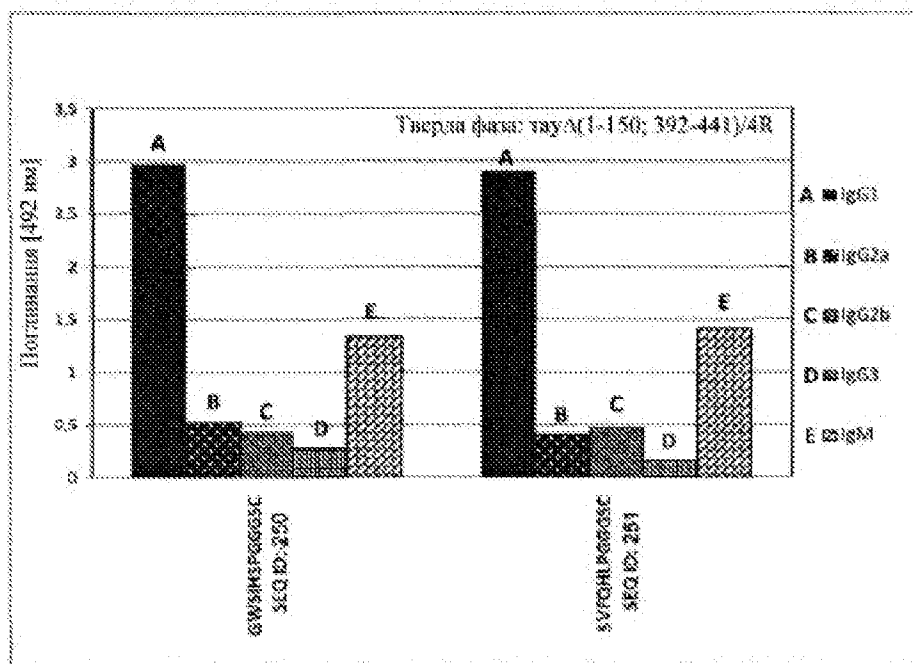
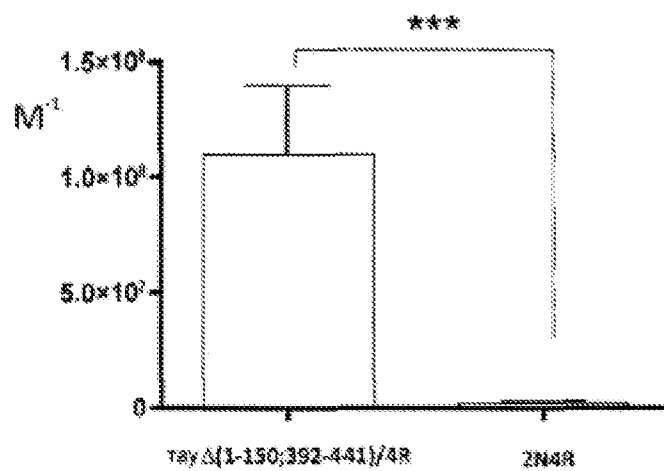


Fig. 68

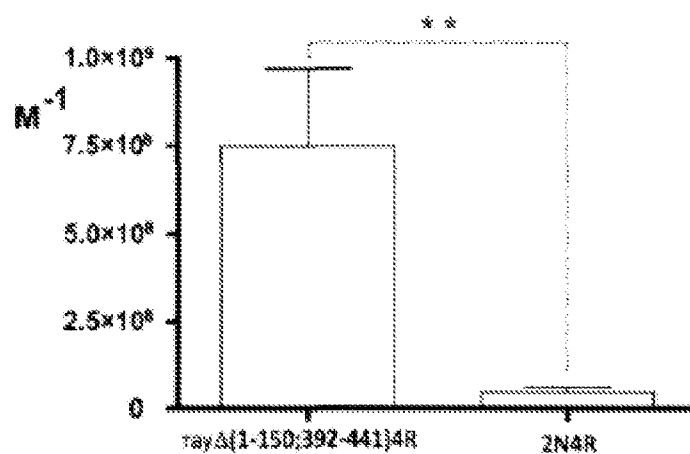
{GW5IHSPGGGSC (SEQ ID: 250)}



	K_d
тау Δ(1-150;392-441)/4R	1.1 ± 0.3 × 10 ⁸ M ⁻¹
2N4R	2.3 ± 0.7 × 10 ⁸ M ⁻¹

Fig. 69A

[SVFQHLPGGGSC (SEQ ID: 251)]



	K_A
ray $\Delta(1-150;392-441)4R$	$7.5 \pm 2.2 \times 10^8 M^{-1}$
2N4R	$4.7 \pm 1.4 \times 10^8 M^{-1}$

Fig. 69B

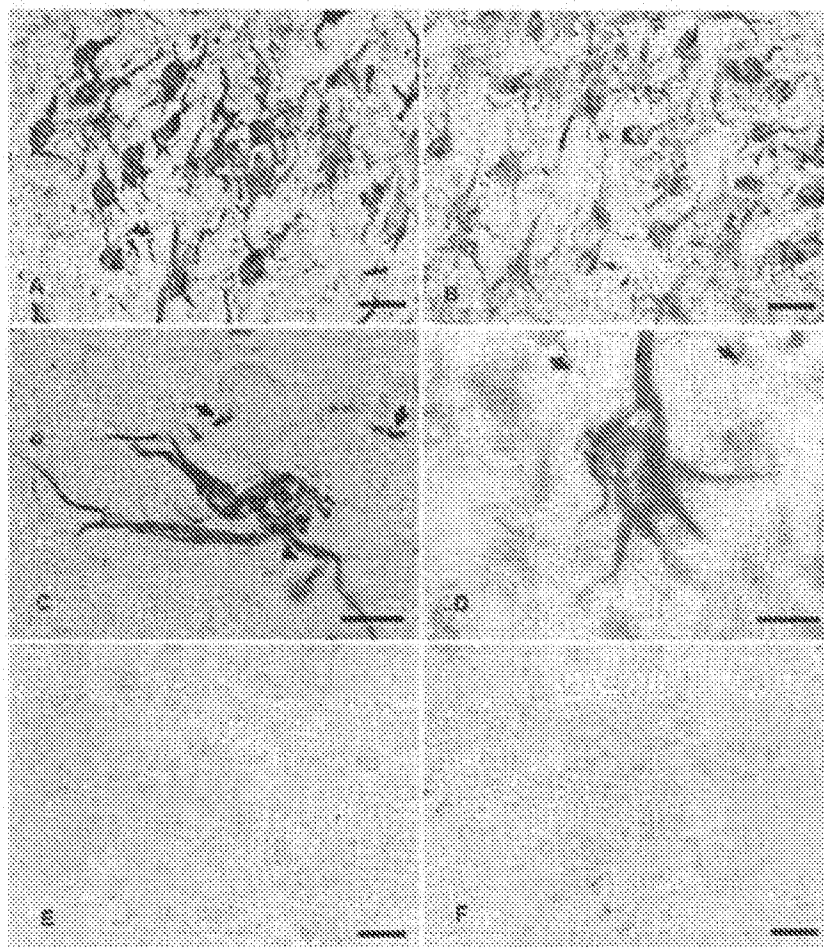


Fig. 70A-F

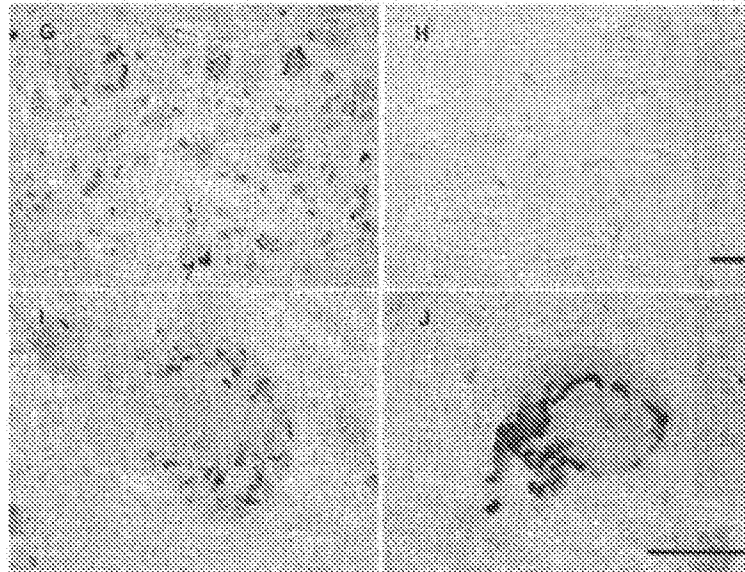


Fig. 70G-J

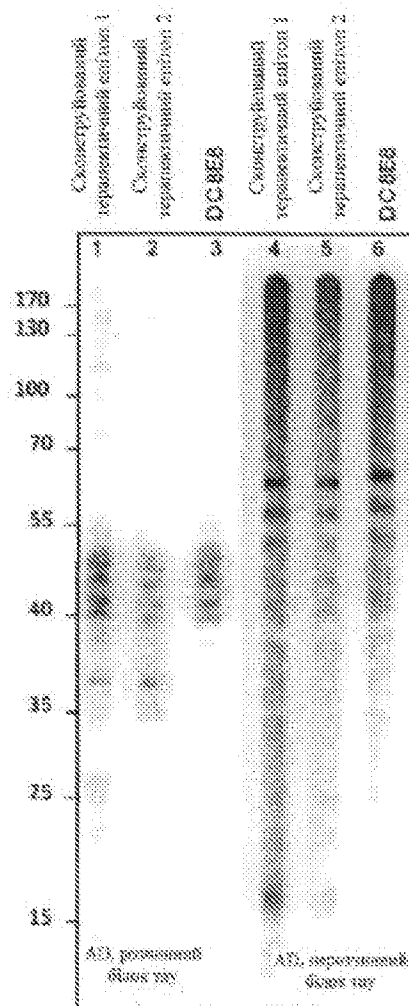


Fig. 71

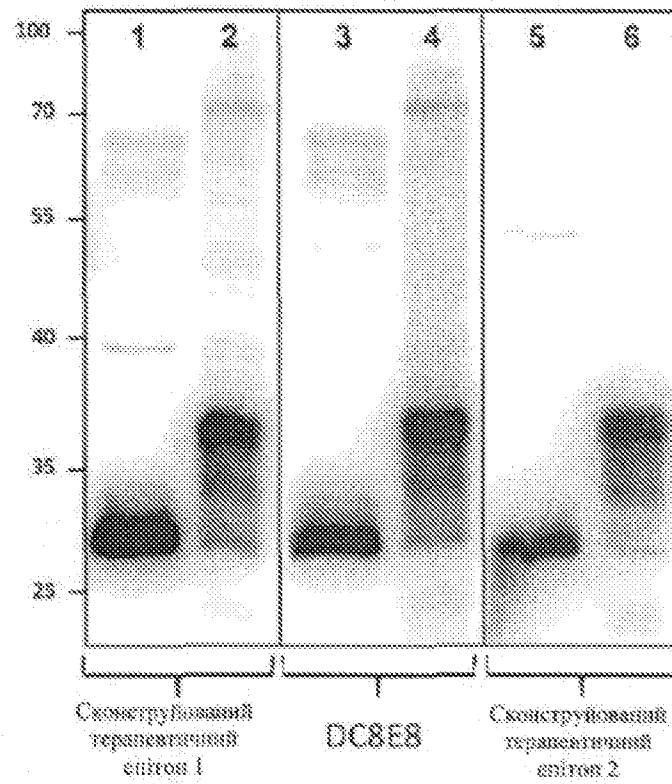


Fig. 72

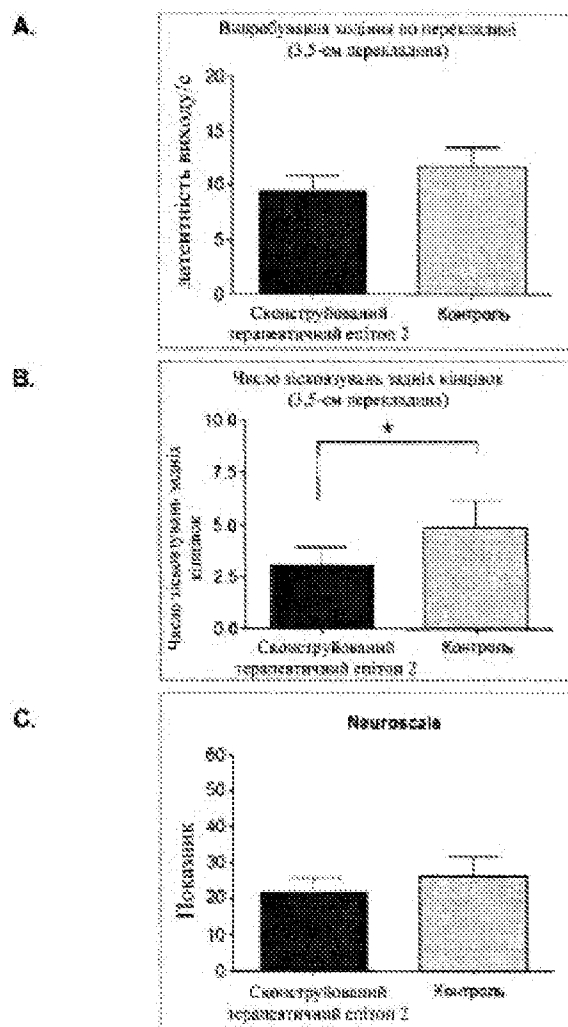


Fig. 73

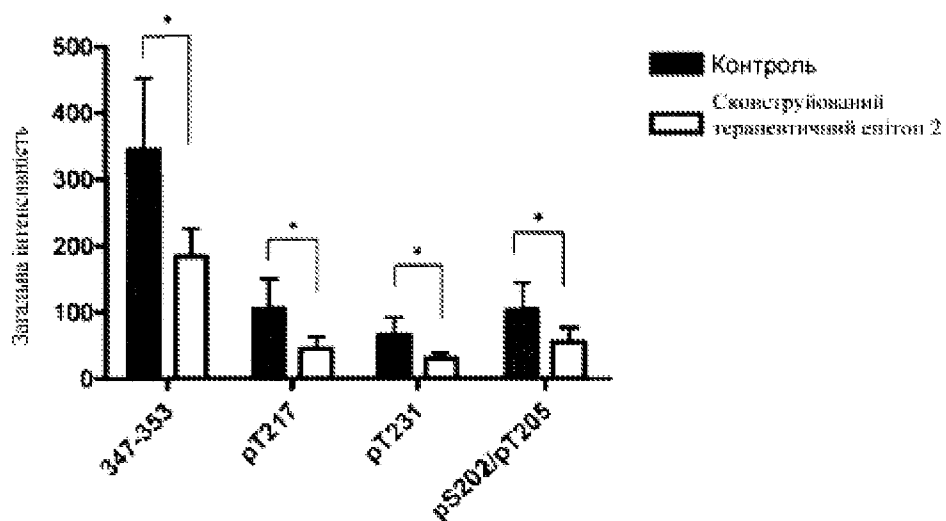


Fig. 74

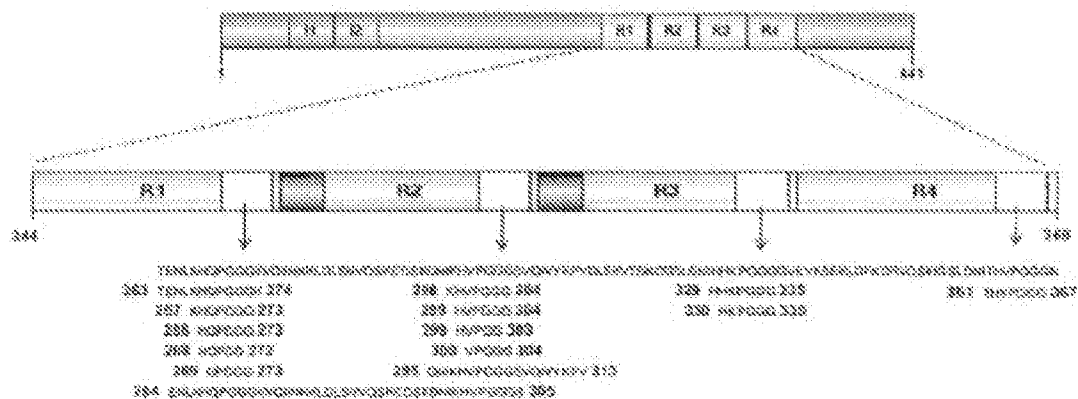


Fig. 75A

Синонимический номер	SEQ ID NO	Последовательность
Tay 263-274	SEQ ID NO: 270	TENVKHPGGGGK
Tay 267-273	SEQ ID NO: 271	KHPPGGG
Tay 268-273	SEQ ID NO: 272	KHPPGGG
Tay 268-272	SEQ ID NO: 273	KHPPGGG
Tay 269-273	SEQ ID NO: 274	QPPGGG
Tay 264-309	SEQ ID NO: 275	ENLKHPPGGGKRVQHNKKLDLSNVOSKCGSKDNKHVPGGGS
Tay 295-304	SEQ ID NO: 276	KHVPGGG
Tay 299-304	SEQ ID NO: 277	HVPGGG
Tay 299-303	SEQ ID NO: 278	HVPGGG
Tay 300-304	SEQ ID NO: 279	VPPGGG
Tay 295-313	SEQ ID NO: 280	DNKHVPGGGSGVQIVYKPV
Tay 329-335	SEQ ID NO: 281	NHKPPGGG
Tay 330-335	SEQ ID NO: 282	NKPPGGG
Tay 361-367	SEQ ID NO: 283	THVPGGG

Fig. 75B

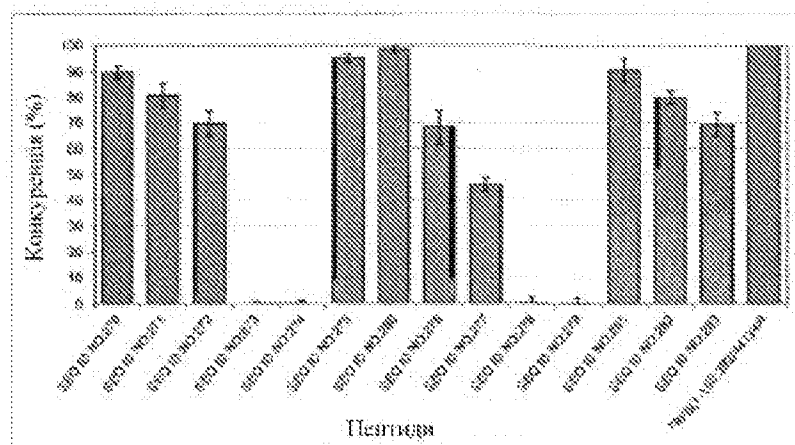


Fig. 76

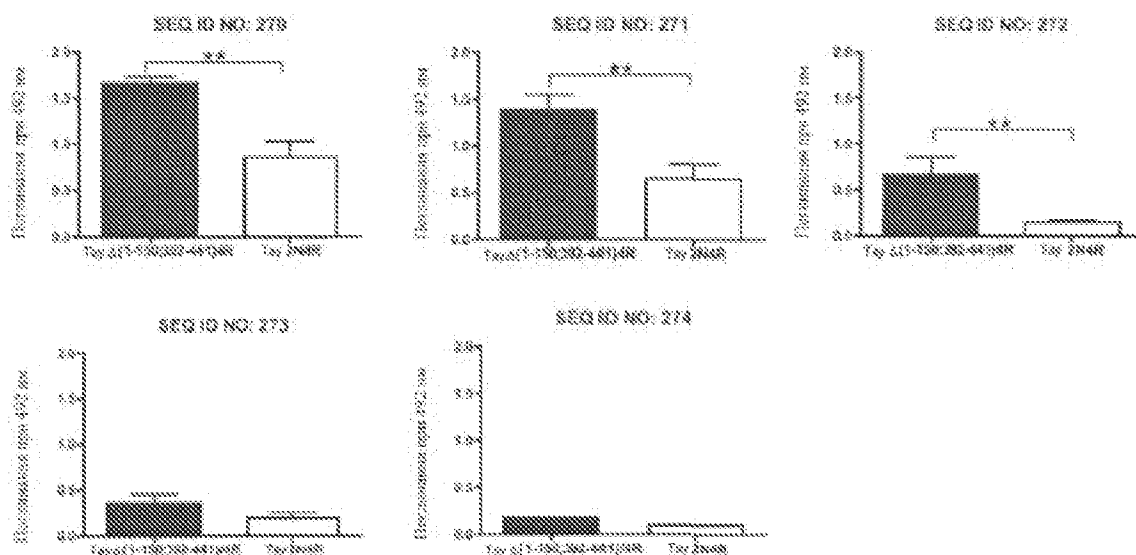


Fig. 77A

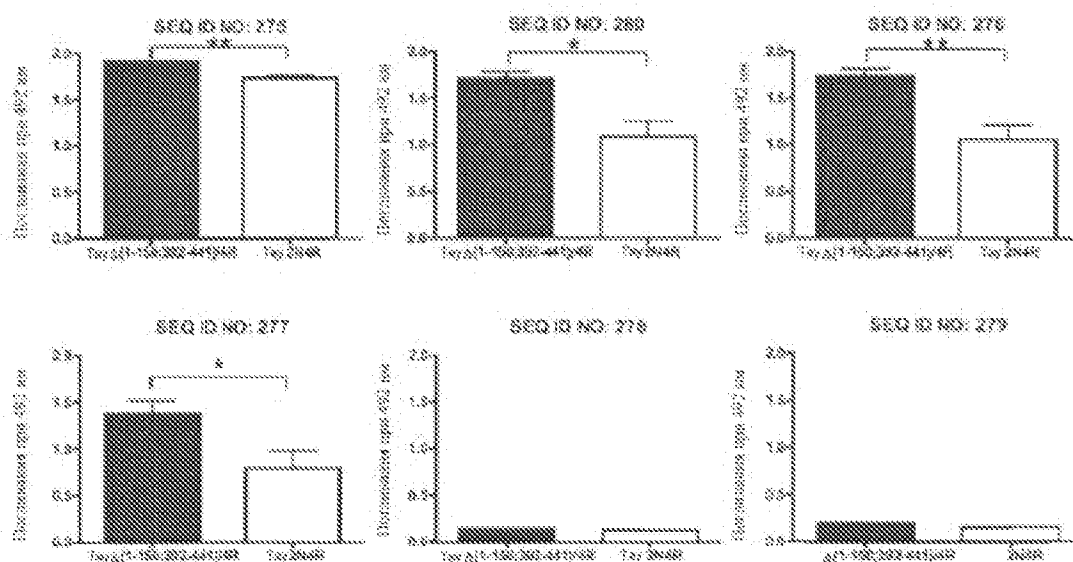


Fig. 77B

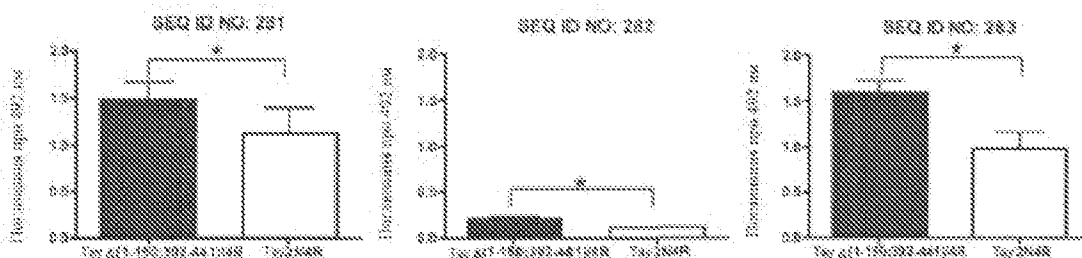
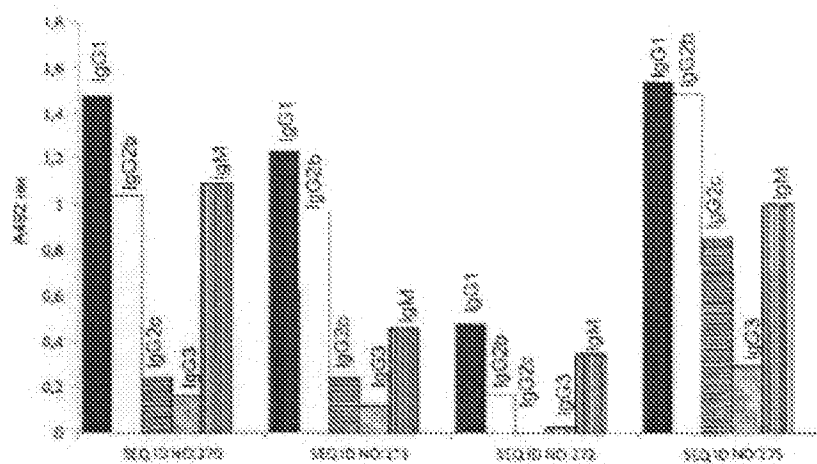


Fig. 77C

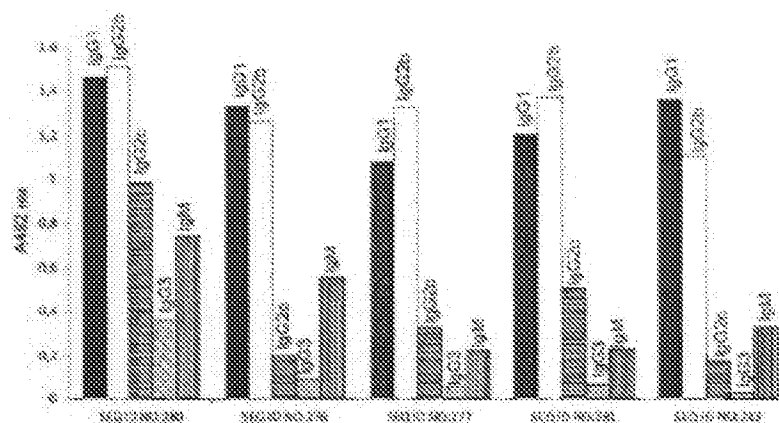
Геометричні середні титри антитіл

Пептиди	серія фін	
	Титул(1:150) 892-443/48	Титул 2808
SSQ ID NO: 270	22280	4222
SSQ ID NO: 271	12800	3200
SSQ ID NO: 272	2784	564
SSQ ID NO: 273	400	<100
SSQ ID NO: 274	232	8
SSQ ID NO: 275	651250	18860
SSQ ID NO: 280	51200	12800
SSQ ID NO: 276	22784	4058
SSQ ID NO: 277	12800	3806
SSQ ID NO: 278	277	383
SSQ ID NO: 279	<100	<100
SSQ ID NO: 281	8448	2425
SSQ ID NO: 282	176	<100
SSQ ID NO: 283	14208	4222

Фіг. 78



Фіг. 79A



Фіг. 79B

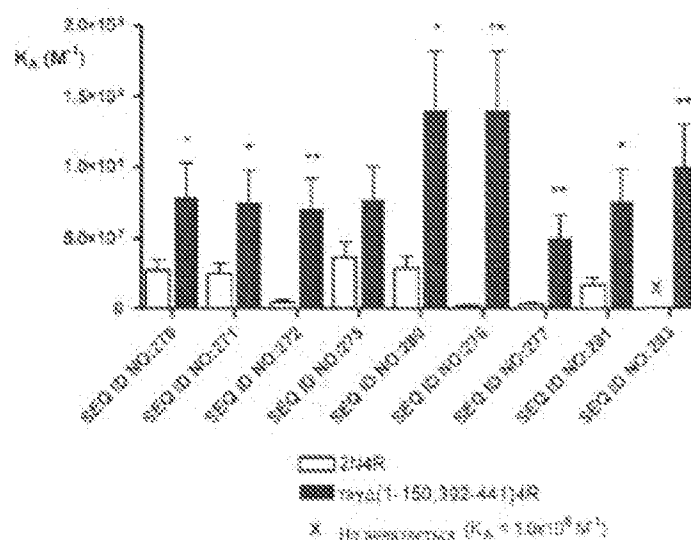


Fig. 80

Патологічні форми білка тау, розпізнавані
індукованими тау-пептидами антитілами в імуно-
блястинці

Пептиди	5B12L, екстракт головного мозку	Екстракт головного мозку при АБ
SEQ ID NO: 270	+	+
SEQ ID NO: 271	+	+
SEQ ID NO: 272	+	+
SEQ ID NO: 273	+	+
SEQ ID NO: 274	+	+
SEQ ID NO: 275	+	+
SEQ ID NO: 276	+	+
SEQ ID NO: 277	+	+
SEQ ID NO: 278	+	+
SEQ ID NO: 279	+	+
SEQ ID NO: 280	+	+
SEQ ID NO: 281	+	+
SEQ ID NO: 282	+	+
SEQ ID NO: 283	+	+

+ позитивний

- негативний

Fig. 81

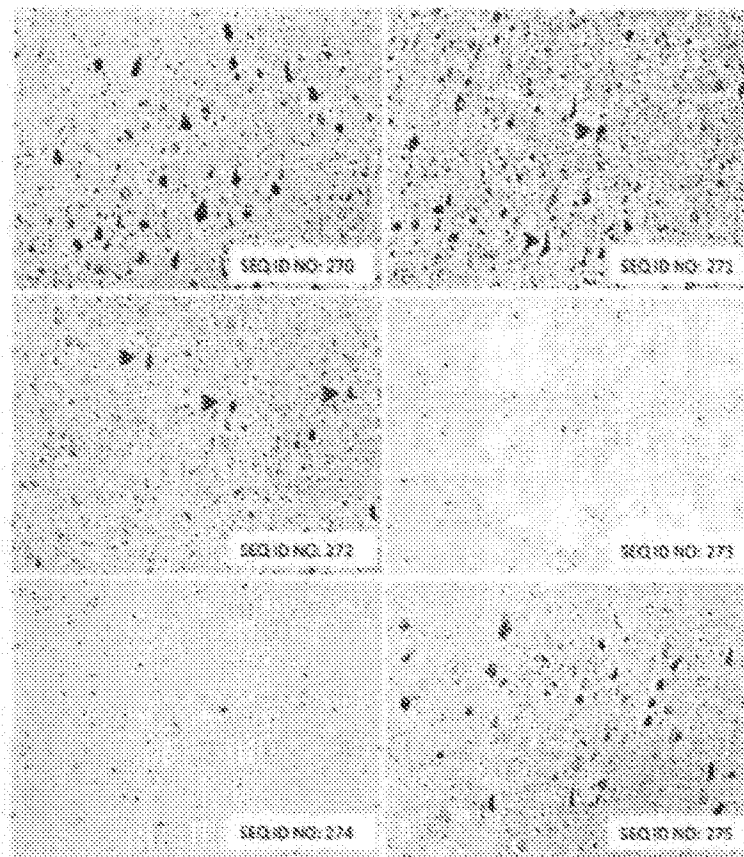


Fig. 82A

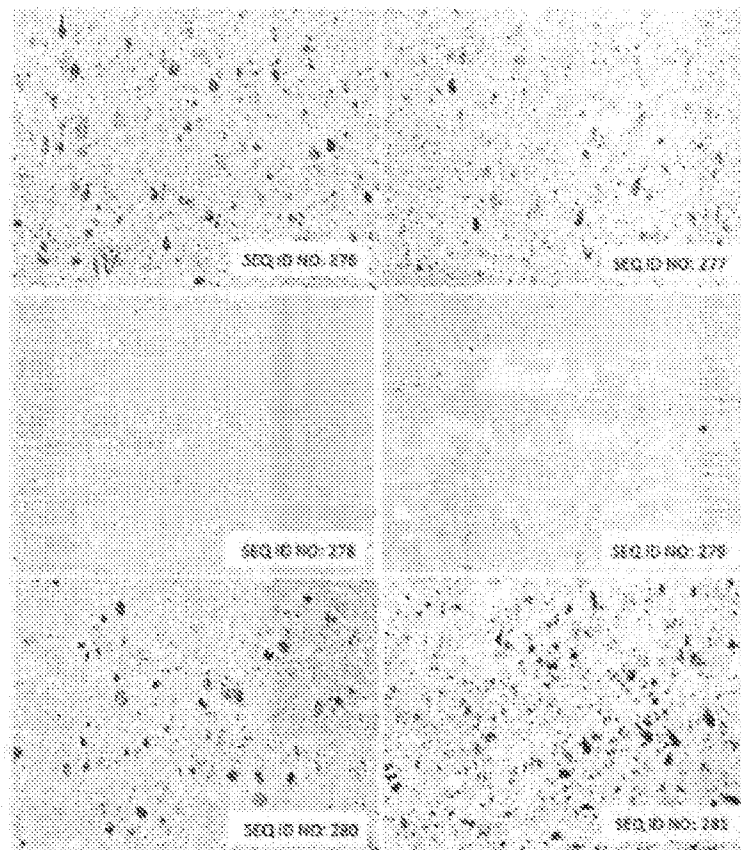


Fig. 82B

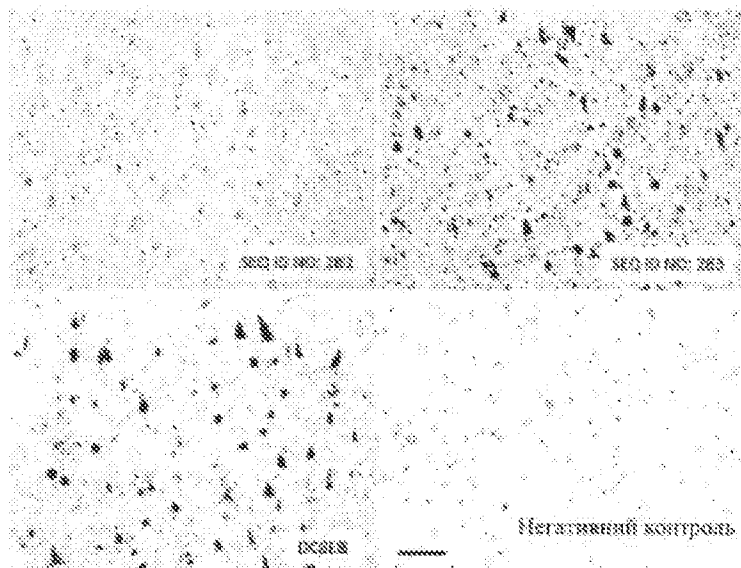


Fig. 82C

Нейрофібрилярні вузлики, розпізнавані індукованими тау-пептидами антитілами в тканинах головного мозку людини з AD

Пегидола	Інтенсивність забарвлення	Кількість NFT
55Q (Q 8Q) 270	Дуже інтенсивне забарвлення NFT	+++
55Q (Q 8Q) 271	Інтенсивне забарвлення NFT	++
55Q (Q 8Q) 272	Слабке забарвлення малої кількості NFT	+
55Q (Q 8Q) 273	Немає забарвлення NFT	-
55Q (Q 8Q) 274	Немає забарвлення NFT	-
55Q (Q 8Q) 275	Дуже інтенсивне забарвлення NFT	+++
55Q (Q 8Q) 280	Інтенсивне забарвлення NFT	+++
55Q (Q 8Q) 276	Інтенсивне забарвлення NFT	+++
55Q (Q 8Q) 277	Слабке забарвлення NFT	+
55Q (Q 8Q) 278	Немає забарвлення NFT	-
55Q (Q 8Q) 279	Немає забарвлення NFT	-
55Q (Q 8Q) 281	Інтенсивне забарвлення NFT	++
55Q (Q 8Q) 282	Немає забарвлення NFT	-
55Q (Q 8Q) 283	Дуже інтенсивне забарвлення NFT	+++

Fig. 83