

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202091012 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.08.27

(51) Int. Cl. A61K 39/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.10.24

(54) КОМПОЗИЦИИ ФОСФОРИЛИРОВАННЫХ ТАУ-ПЕПТИДОВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/577,157

(32) 2017.10.25

(33) US

(86) PCT/US2018/057286

(87) WO 2019/084118 2019.05.02

(88) 2019.06.06

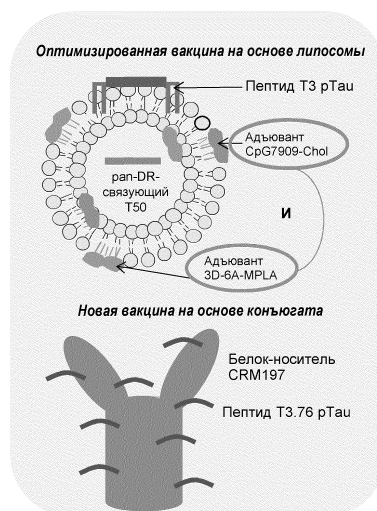
(71) Заявитель:
ЯНССЕН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US); АЦ ИММУНЕ С.А. (CH)

(72) Изобретатель:

Рамсбург Элизабет Энн, Де Марко
Доната, Чаккумал Аниш, Садака
Шарлотт, Гоудсмит Яп (US), Мус
Андреас, Пильгрен Бош Мария,
Вукицевиц Вергилле Мария, Хикман
Дэвид, Пио Николя, Гимире Сародж
Радж (CH)

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

(57) Описаны липосомы, содержащие тау-пептиды, предпочтительно фосфорилированные тау-пептиды, и конъюгаты, содержащие тау-пептиды, предпочтительно фосфорилированные тау-пептиды, конъюгированные с иммуногенным носителем. Также описаны фармацевтические композиции и применения липосом и/или конъюгатов для лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания или нарушений, такого как болезнь Альцгеймера.



A1

202091012

202091012

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-562658EA/011

КОМПОЗИЦИИ ФОСФОРИЛИРОВАННЫХ ТАУ-ПЕПТИДОВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ.

[0001] Настоящее изобретение относится к области медицины. В частности, настоящее изобретение относится к липосомам или конъюгатам тау-пептидов и их применению для профилактики или лечения таупатии, такой как болезнь Альцгеймера.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] Болезнь Альцгеймера (AD) представляет собой прогрессирующее истощающее нейродегенеративное заболевание, которое поражает приблизительно 44 миллиона человек во всем мире (Alzheimers.net). Лечение AD, которое в настоящее время доступно в клинике, направлено на замедление прогрессирования клинических симптомов, но не нацелено на патогенные процессы, лежащие в основе заболевания. К сожалению, эти методы лечения являются лишь в минимальной степени эффективными, и поэтому существует настоятельная необходимость в разработке и тестировании дополнительных профилактических и терапевтических мер.

[0003] Отличительными чертами патологии болезни Альцгеймера являются накопление внеклеточных бляшек, содержащих агрегированный белок бета-амилоида, и внутриклеточные «клубки» или агрегации гиперфосфорилированного тау-белка. Молекулярные события, которые приводят к накоплению этих белков, слабо охарактеризованы. Что касается амилоида, предполагается, что aberrantное расщепление белка-предшественника амилоида приводит к накоплению склонного к агрегации фрагмента, включающего аминокислоты 1-42. Что касается тау, предполагается, что нарушение регуляции либо киназ, фосфатаз, либо обоих приводит к aberrantному фосфорилированию тау. Как только тау становится гиперфосфорилированным, он теряет способность эффективно связывать и стабилизировать микротрубочки и вместо этого накапливается в цитоплазме пораженного нейрона. Несвязанный и гиперфосфорилированный тау, по-видимому, образует сначала олигомеры, а затем агрегаты более высокого порядка, присутствие которых предположительно отрицательно влияет на функционирование нейрона, в котором они образуются, возможно, посредством прерывания нормального аксонального транспорта.

[0004] В развитых странах индивидуумов, у которых диагностирована болезнь Альцгеймера или другие вызывающие деменцию таупатии, обычно лечат ингибиторами холинэстеразы (например, Aricept®) или мемантинами (например, Namenda™). Эти лекарственные средства, хотя и достаточно хорошо переносятся, имеют очень невысокую эффективность. Например, Aricept® задерживает увеличение интенсивности симптомов на 6-12 месяцев у приблизительно 50% подвергнутых лечению индивидуумов. Остальная часть лечения является нефармакологической и направлена на то, чтобы сделать пациентов более способными выполнять повседневные задачи по мере снижения их когнитивных

способностей.

[0005] В нескольких опубликованных исследованиях (Asuni AA *et al.*, J Neurosci. 2007 Aug 22;27(34):9115-29., Theunis C *et al.*, PLoS One. 2013; 8(8): e72301., Kontseikova E *et al.*, Alzheimers Res Ther. 2014 Aug 1;6(4):44) демонстрируется, что активные вакцины, содержащие тау-пептиды, могут индуцировать иммунные ответы против тау у мышей или крыс; уменьшать накопление патологических агрегатов тау в головном мозге грызунов; и снижать скорость прогрессирования снижения когнитивных способностей в моделях болезни Альцгеймера на животных. Было показано, что активная вакцина против патологических тау-белков является иммуногенной у являющихся людьми пациентов с болезнью Альцгеймера (Novak P *et al.*, *Lancet Neurology* 2017, 16:123-134). В WO2010/115843 описывается антигенный фосфопептид, имитирующий основной патологический фосфоэпитоп белка тау, и связанные композиции для терапевтического и диагностического применения при лечении таупатий, в том числе болезни Альцгеймера. Однако в настоящее время на рынке до сих пор нет разрешенных к применению эффективных вакцин для предотвращения возникновения тау-опосредованного заболевания. На рынке также нет эффективных лекарственных средств, позволяющих остановить или замедлить течение болезни, как только она начнется. Поэтому существует настоятельная необходимость в определении новых профилактических мер (например, вакцин), которые могут предотвратить эти заболевания.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] В одном общем аспекте настоящее изобретение относится к липосоме, содержащей:

- a. тау-пептид, предпочтительно тау-пептид представляет собой тау-фосфопептид; и
- b. эпитоп для Т-клеток-хелперов,

причем тау-пептид представлен на поверхности липосомы.

[0007] В одном варианте осуществления липосома дополнительно содержит по меньшей мере один адъювант, содержащий лиганд toll-подобного рецептора. Предпочтительно, когда липосома дополнительно содержит по меньшей мере один из лиганда toll-подобного рецептора 4 и лиганда toll-подобного рецептора 9.

[0008] В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к липосоме, содержащей:

- a. тау-пептид, предпочтительно тау-пептид представляет собой тау-фосфопептид;
- b. эпитоп для Т-хелперов; и
- c. по меньшей мере один из
 - i. лиганда toll-подобного рецептора 9, предпочтительно липидированного CpG-олигонуклеотида; и

ii. лиганда toll-подобного рецептора 4, предпочтительно агониста toll-подобного рецептора 4,

причем тау-пептид представлен на поверхности липосомы.

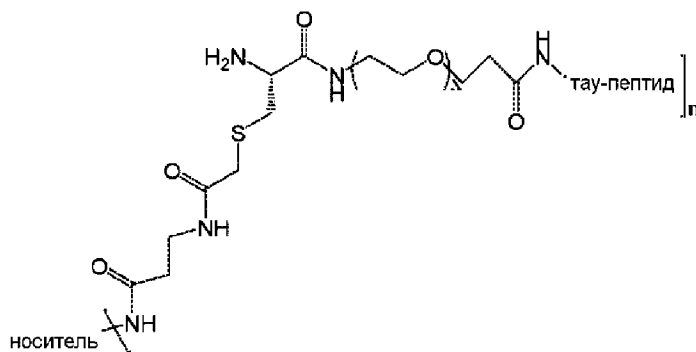
[0009] В дальнейшем предпочтительном варианте осуществления настоящее

изобретение относится к липосоме, содержащей:

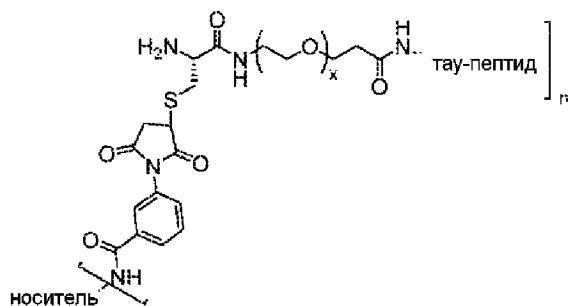
- a. тау-фосфопептид;
 - b. эпитоп для Т-хелперов;
 - c. липидированный CpG-олигонуклеотид; и
 - d. адъювант, содержащий лиганд toll-подобного рецептора 4;
- причем тау-фосфопептид представлен на поверхности липосомы.

[0010] В другом общем аспекте настоящее изобретение относится к конъюгату, включающему тау-пептид, предпочтительно тау-фосфопептид, и конъюгированный с ним иммуногенный носитель, причем тау-пептид конъюгирован с носителем через линкер. Линкер может включать один или более из полиэтиленгликоля (PEG), сукцинимидил-3-(бромацетамидо)пропионата (SBAP) и м-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидного эфира (MBS). Примеры иммуногенного носителя, примененного для настоящего изобретения, включают, но без ограничения этим, гемоцианин лимфы улитки (KLH), столбнячный анатоксин (TT), CRM197 и смесь белков наружной мембраны из *N. meningitidis* (OMP) или их производное.

[0011] В одном предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к конъюгату, имеющему структуру формулы (I):



или структуру формулы (II):



где

x представляет собой целое число от 0 до 10, предпочтительно от 2 до 6, наиболее предпочтительно 3; и

n представляет собой целое число от 2 до 11, предпочтительно от 3 до 11.

[0012] аспекты настоящего изобретения относятся к фармацевтической композиции, содержащей липосому или конъюгат по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель, к способам приготовления фармацевтической композиции и

применению фармацевтической композиции для индукции иммунного ответа против тау или для лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом.

[0013] В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу индукции иммунного ответа у субъекта, страдающего нейродегенеративным нарушением, или для лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом. Способ включает введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей липосому по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель, или фармацевтической композиции, содержащей конъюгат по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. Предпочтительно, когда способ включает введение субъекту фармацевтической композиции по настоящему изобретению для первичной иммунизации и фармацевтической композиции по настоящему изобретению для повторной иммунизации (бустер-иммунизации).

[0014] Другие аспекты, признаки и преимущества настоящего изобретения будут лучше поняты после прочтения следующего подробного описания изобретения и формулы изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0015] Вышеизложенное краткое изложение, а также последующее подробное описание предпочтительных вариантов осуществления настоящей заявки будут лучше поняты при прочтении вместе с прилагаемыми чертежами. Однако следует понимать, что заявка не ограничивается точными вариантами осуществления, продемонстрированными на чертежах.

[0016] На фиг. 1 проиллюстрированы новые вакцины в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения: Содержащая тау липосома в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения (вверху) и конъюгат тау в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения (внизу).

[0017] Фиг. 2 иллюстрирует, что вакцина, содержащая липосому в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения (липосому 2-го поколения), которая содержит инкапсулированный эпитоп для Т-хелперов (например, полипептид возбудителя столбняка (tet)), активирует Т-клетки-хелперы.

[0018] Фиг. 3 иллюстрирует, что вакцина, содержащая конъюгат в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения, который содержит несобственный или иммуногенный белок-носитель, активирует Т-хелперы.

[0019] На фиг. 4 показано, что вакцины против тау в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения индуцируют устойчивый высокий титр антител против фосфорилированного тау у макака-резуса: среднее геометрическое значение конечных точек титрования для каждой группы, определенное с помощью иммуноферментного твердофазного анализа (ELISA) с течением времени, выше в случае вакцины, содержащей липосому (липосому Z) в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения, или в случае вакцины, содержащей конъюгат (конъюгат A), в

соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения, по сравнению с контрольной вакциной, содержащей липосому без эпитопа для Т-хелперов.

[0020] На фиг. 5 показано, что сыворотка макак-резусов, иммунизированных липосомой (липосомой Z) в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения, связывается с патологическими структурами тау в срезах головного мозга человека с болезнью Альцгеймера (AD) (левая панель) по сравнению со срезами головного мозга здорового человека (правая панель).

[0021] На фиг. 6 показано, что сыворотка макак-резусов, иммунизированных конъюгатом (конъюгатом A) в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения, содержащимся в композиции, содержащей растворимый CpG и гидроксид алюминия, связывается с патологическими структурами тау в срезах головного мозга человека с AD (верхний ряд) по сравнению со срезами головного мозга здорового человека (нижний ряд).

[0022] На фиг. 7 показаны титры антител против фосфорилированного тау у макак-резусов, индуцированных вакцинами на основе липосом в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, липосом X, Y и Z, каждая из которых содержит инкапсулированный, распознаваемый Т-клетками эпитоп T50 и один или более адъювантов; титры были измерены с помощью ELISA и представлены в виде конечных точек титрования с течением времени у отдельных обезьян. В частности:

[0023] На фиг. 7A показаны титры антител против фосфорилированного тау, индуцированных липосомой X с лигандом TLR4, только MPLA (3D-6-ацил)PHAD®) в качестве адъюванта;

[0024] На фиг. 7B показаны титры антител против фосфорилированного тау, индуцированных липосомой Y с только лигандом TLR9 (липидированным CpG-олигонуклеотидом) в качестве адъюванта;

[0025] На фиг. 7C показаны титры антител против фосфорилированного тау, индуцированных липосомой Z с комбинацией лиганда TLR4, MPLA (3D-(6-ацил)PHAD®) и лиганда TLR9 (липидированного CpG-олигонуклеотида) в качестве адъювантов, которая также показывает, что комбинация двух адъювантов вызывает меньшую вариабельность титров антител среди отдельных обезьян;

[0026] На фиг. 7D представлено среднее геометрическое значение титров антител вышеупомянутых групп иммунизации и контрольной вакцины на основе липосомы с лигандом TLR4, MPLA, но без распознаваемого Т-клетками эпитопа, и показано, что вакцины в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения приводят к более высоким титрам антител против фосфорилированного тау по сравнению с контрольной вакциной на основе липосомы: титры были измерены с помощью ELISA и представлены в виде геометрического среднего $\pm$ 95% доверительный интервал конечных точек титрования для каждой группы с течением времени.

[0027] На фиг. 8 показано, что иммунизация с использованием вакцины на основе липосомы (например, липосомы X, Y или Z) или вакцины на основе конъюгата (конъюгата

А) в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения индуцирует титры антител класса IgG, специфических для обогащенных спаренных спиральных нитей (ePHF), выделенных из головного мозга после смерти пациентов с болезнью Альцгеймера: титры антител были измерены с помощью технологии Meso Scale Discovery (MSD) и представлены в виде значений для отдельных обезьян в день 50 и среднего геометрического значения $\pm$ 95% доверительный интервал (CI) после первой иммунизации.

[0028] На фиг. 9 показано, что иммунизация вакциной на основе липосомы в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения (липосомы Z), содержащей инкапсулированный T50 и комбинацию лиганда TLR4 (3D-(6-ацил)PHAD®) и лиганда TLR9 (липидизированного CpG-олигонуклеотида) в качестве адъювантов, индуцирует антитела, которые в основном связываются с N-концом фосфорилированного тау-пептида SEQ ID NO:2 (фиг. 9A), тогда как у обезьян, иммунизированных вакциной на основе конъюгата в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения (конъюгата А), вырабатываются антитела класса IgG которые связываются в основном с С-концевой частью пептида, как в случае фосфорилированного пептида (слева), так и в случае нефосфорилированного пептида (справа) (фиг. 9B).

[0029] На фиг. 10А и В показано, что вакцинация вакциной на основе липосомы в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения, содержащей инкапсулированный распознаваемый Т-клетками эпитоп T50 и лиганд TLR4 (3D-(6-ацил)PHAD®) в качестве адъюванта, (липосомы S) индуцирует значительно более высокие титры антител, чем контрольной вакциной на основе липосомы (с лигандом TLR4, 3D-(6-ацил)PHAD®, но без распознаваемого Т-клетками эпитопа T50, липосомы R), а также вакциной на основе липосомы в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения, содержащей поверхностный Т-клеточный эпитоп T57 (дипальмитоилированный T50) и лиганд TLR4 (3D-(6-ацил)PHAD®, липосомы Т) у мышей: титры антител измеряли в день 21 (фиг. 10А) и 35 (фиг. 10В) после первой иммунизации определяли с помощью ELISA и представляли в виде отдельных значений и среднего геометрического значения для группы $\pm$ 95% CI; (**: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$).

[0030] На фиг. 11 показано, что инкапсуляция распознаваемого Т-клетками пептидов T48 или T52 в липосому (липосому М или N, соответственно) индуцирует у мышей Т-клеточную реакцию, специфическую для инкапсулированного пептида: Т-клеточную реакцию оценивали с помощью специфического для IFN- γ (фиг. 11А) и IL-4 (фиг. 11В) ELISPOT.

[0031] На фиг. 12 показано, что вакцина на основе липосомы, содержащая инкапсулированный распознаваемый Т-клетками эпитоп, (липосомы L) и вакцина на основе липосомы, содержащей заякоренный, распознаваемый Т-клетками эпитоп, (липосомы О), каждая индуцировала более высокие титры специфических для тау-фосфопептида антител, чем контрольная вакцина на основе липосомы без распознаваемого Т-клетками эпитопа; каждая из липосомы L, липосомы О и контрольной липосомы дополнительно содержит MPLA в качестве адъюванта.

[0032] На фиг. 13 показано, что конъюгат тау (KLH-TAUVAC-p7.1 или KLH-TAUVAC-p22.1) стимулирует Tfh-клетки и индуцирует устойчивые титры антител против тау-пептида у мышей дикого типа, в частности:

[0033] На фиг. 13A проиллюстрировано, что группы взрослых самок мышей Balb/C (n=14 в каждой группе) иммунизировали в общей сложности четыре раза с использованием 100 мкг вакцины на основе конъюгата KLH-тау (KLH-TAUVAC-p7.1 или KLH-TAUVAC-p22.1) с адъювантом, активного плацебо в качестве вакцины (KLH плюс квасцы или Ribi) или неактивного плацебо (PBS) в соответствии с представленной схемой: четырех животных из каждой группы иммунизации умерщвляли через семь дней после первичной иммунизации, и собирали лимфатические узлы, дренирующие место введения;

[0034] На фиг. 13B показано среднее геометрическое значение процента Tfh по группе иммунизации (n=4 мыши в каждой группе, проанализированные индивидуально) в дренирующих узлах: все группы, получавшие активные вакцины или плацебо, имели измеримые Tfh; более того, животные, получавшие вакцину KLH-TAUVAC-p7.1, KLH-TAUVAC-p22.1 или активный плацебо KLH плюс квасцы, имели значительно больше Tfh, чем животные, получавшие неактивное плацебо (p=0,0044 для KLH-TAUVAC-p7.1; p=0,0482 для KLH-TAUVAC-p22.1; p=0,0063 для KLH, используя дисперсионный анализ с последующей корректировкой по Даннетту для множественных сравнений);

[0035] На фиг. 13C-H показано изменение сывороточных титров по сравнению с исходным уровнем (днем 0) в четыре момента времени после иммунизации (дни 14, 28, 56 и 84) для средних групповых значений (n=5-10) с 95%-ным доверительным интервалом: звездочкой указаны моменты времени, в которые индуцированный KLH-TAUVAC гуморальный ответ значительно выше, чем индуцированный активным плацебо гуморальный ответ (p<0,05, как определено с использованием дисперсионного анализа с последующей корректировкой по Тьюки для множественных сравнений), конкретнее:

[0036] На фиг. 13C показаны титры связывающихся с фосфорилированным тау-пептидом p7.1 антител;

[0037] На фиг. 13D показаны титры связывающихся с фосфорилированным тау-пептидом p22.1 антител;

[0038] На фиг. 13E показаны титры связывающихся с нефосфорилированным тау-пептидом 7.1 антител;

[0039] На фиг. 13F показаны титры связывающихся с нефосфорилированным тау-пептидом 22.1 антител; и

[0040] На каждой из фиг. 13G и H показаны титры связывающихся с белком-носителем KLH антител.

[0041] На фиг. 14 показано, что сыворотки от мышей, иммунизированных конъюгатом тау, также связывали патологические структуры тау в случае других таупатий: объединенные сыворотки (n=6) из каждой группы вакцинации через 84 дня после первичной иммунизации использовали для окрашивания ткани головного мозга в случае лобно-височной деменции с мутацией MAPT (MAPT P301S, лобной коры), в случае болезни

Пика (лобной коры), прогрессирующего надъядерного паралича (PSP, хвостатого ядра) и первичной возрастной таупатии (PART, гиппокампа); сыворотки животных, получавших активные вакцины, выделяли связанные с тау структуры, характерные для каждой таупатии, тогда как сыворотки от животных, иммунизированных активным плацебо (KLH-квасцы или KLH-Ribi) или неактивным плацебо (PBS), не окрашивали ни одну из этих структур; в качестве контроля показано иммуноокрашивание с помощью AT8 соответствующей области; масштабная линейка=50 мкм;

[0042] На фиг. 15 показано, что индуцированные вакциной антитела уменьшают количество агрегированного тау в модели ускоренной таупатии, в частности:

[0043] Фиг. 15А: трехмесячные P301L-трансгенные мыши (n=15 в каждой группе) получали стереотаксическую инъекцию ePHF человека, предварительно проинкубированных с очищенным IgG от мышей, иммунизированных либо KLH-TAUVAC-p7.1 плюс RIBI, либо активным плацебо KLH плюс RIBI; через два месяца после инъекции всех мышей умерщвляли, и определяли количество агрегированного тау у мышей в общей и нерастворимой в саркозиде фракциях;

[0044] Фиг. 15В и 15С: общие фракции (В) и нерастворимые в саркозиде фракции (С), собранные из подвергшегося инъекции полушария каждого животного: графики показывают количество тау, определенное с помощью MSD, как в общей фракции, так и в нерастворимой фракции, в головном мозге мышей, получавших ePHF, предварительно проинкубированных с IgG от мышей, иммунизированных KLH-TAUVAC-p7.1, имелось значительно меньше агрегированного тау, чем в головном мозге мышей, получавших ePHF, предварительно проинкубированные с контрольными антителами ($p < 0,0001$, используя дисперсионный анализ с последующей корректировкой по Холму-Бонферрони для множественных сравнений).

[0045] Фиг. 16 показывает, что конъюгат тау (конъюгат В) в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения индуцирует высокие титры антител против фосфорилированного тау и ePHF у приматов, не являющихся людьми: макак-резусов иммунизировали KLH-TAUVAC.p7.1 с квасцами и CpG в качестве адъювантов (n=6) или KLH (n=2) в день 1, 29, 85 и 169; кровь собирали каждые 14 дней, в частности:

[0046] Фиг. 16А: сыворотки животных, иммунизированных KLH-TAUVAC-p7.1, тестировали на реактивность с иммунизирующим пептидом p7.1, используя ELISA;

[0047] Фиг. 16В: сыворотки, собранные у всех животных через 50 дней после первичной иммунизации, имели измеримые уровни антител против ePHF человека, используя MSD, при этом 3 из 6 животных продемонстрировали высокую реактивность с этим антигеном;

[0048] Фиг. 16С: сыворотки, собранные у животных через 50 дней после первичной иммунизации, наносили на срезы головного мозга от здоровых индивидуумов или от пациентов с AD, постиммунные сыворотки от группы иммунизации KLH-TAUVAC-p7.1 окрашивали патологические структуры тау, а именно нейрофибриллярных клубки, нейропильные нити и сенильные бляшки, в ткани головного мозга пациентов с AD, в то

время как сыворотки от мышей, иммунизированных KLH, не проявляли какой-либо реактивности, и окрашивание контрольной ткани не наблюдалось;

[0049] Фиг. 16D: при тестировании в анализе иммунодеплекции тау животные, получавшие KLH-TAUVAC-p7.1, имели антитела, способные связывать и истощать «источник» тау ($p=0,03$ в день 50, используя дисперсионный анализ с последующей корректировкой по Даннетту для множественных сравнений), в то время как иммунизация KLH не инициировала продукцию таких антител;

[0050] Фиг. 16E: сыворотки до и после иммунизации также тестировали в анализе нейтрализации в виде последовательно разведенных отдельных образцов; изменения по сравнению с исходным уровнем (CFB) рассчитывали как разницу между значениями FRET (резонансного переноса энергии флуоресценции) для показаний в день -14 до вакцинации (исходный уровень) и в дни 50, 106 и 190 после вакцинации, соответственно. Ответ в определенный день после вакцинации (день_i) затем рассчитывали следующим образом: *Ответ = % FRET_день_i - % FRET_исходный уровень*; общая линейная смешанная модель для вышеупомянутых ответов, со случайным эффектом на животных, применялась с переменными: группами вакцинации, днем и уровнями в сыворотке, рассматриваемыми как категориальные переменные, и всеми их взаимодействиями.

[0051] На фиг. 17 показано, что мыши, иммунизированные вакциной на основе конъюгата (конъюгата А) в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения и комбинацией гидроксида алюминия (квасцами) с CpG-олигонуклеотидом (CpG) в качестве адъювантов, дают более высокие титры антител против вакцинного пептида; взрослых самок мышей C57BL/6 ($n=5-6$ в каждой группе) иммунизировали внутримышечно с использованием либо 2 мкг, либо 0,2 мкг вакцины на основе конъюгата А, и вакцину на основе конъюгата вводили либо отдельно, с квасцами, с CpG, либо с комбинацией квасцов с CpG; всех мышей подвергали первичной иммунизации в день 0 исследования, а затем однократной бустер-иммунизации в день 28; доза квасцов в качестве адъюванта составляла 500 мкг/мышь на инъекцию, а доза CpG в качестве адъюванта составляла 20 мкг/мышь на инъекцию; графики показывают результаты связывания в ELISA с использованием сыворотки, собранной от мышей, иммунизированных вакцинным пептидом Т3.5, использованным в качестве антигена для покрытия, при этом на графики наносили средние конечные точки титрования Т3.5-специфических антител для каждой группы, до иммунизации (день 0) и в два момента времени после иммунизации (дни 28 и 42), и с «усами», представляющими среднеквадратическую ошибку; в таблицах представлен статистический анализ результатов, в случае которого титры антител сравнивались с использованием непараметрического критерия Крускала-Уоллиса, а попарные сравнения групп оценивались с использованием знакового критерия Уилкоксона по результатам, полученным с помощью критерия Крускала-Уоллиса; в частности:

[0052] Фиг. 17А: мышей иммунизировали 2 мкг вакцины на основе конъюгата А; и

[0053] Фиг. 17В: мышей иммунизировали 0,2 мкг вакцины на основе конъюгата А.

[0054] На фиг. 18 показано, что вакцины против тау в соответствии с вариантами

осуществления настоящего изобретения с различными соотношениями тау-пептида и распознаваемого Т-клетками эпитопа индуцируют устойчивые и высокие титры антител против фосфорилированного тау у макак-резусов.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0055] Различные публикации, статьи и патенты приводятся или описываются в разделе «Предпосылки создания изобретения» и на протяжении всего описании; каждая из этих ссылок полностью включена сюда посредством ссылки. Обсуждение документов, актов, материалов, устройств, статей или т.п., которые были включены в настоящее описание, имеет целью предоставить фон для настоящего изобретения. Такое обсуждение не является признанием того, что какие-либо или все эти материалы являются частью предшествующего уровня техники в отношении любых раскрытых или заявленных изобретений.

[0056] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые здесь, имеют то же значение, в котором они обычно понимаются специалистом со средним уровнем компетентности в области техники, к которой относится это изобретение. В противном случае некоторые термины, используемые здесь, имеют значения, указанные в описании.

[0057] Должно быть отмечено, что, используемые здесь и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа "a", "an" и "the" включают множественное число, если контекст явно не предписывает иное.

[0058] Если не указано иное, любые числовые значения, такие как концентрация или диапазон концентраций, описанные здесь, следует понимать как изменяемые во всех случаях термином «приблизительно». Таким образом, числовое значение обычно включает $\pm 10\%$ от приведенного значения. Например, концентрация, составляющая 1 мг/мл, включает от 0,9 мг/мл до 1,1 мг/мл. Аналогично, диапазон концентраций от 1% до 10% (в отношении веса к объему) включает от 0,9% (в отношении веса к объему) до 11% (в отношении веса к объему). Используемый здесь числовой диапазон явно включает все возможные поддиапазоны, все отдельные числовые значения в этом диапазоне, в том числе целые числа в таких диапазонах и доли значений, если контекст явно не указывает на иное.

[0059] Если не указано иное, термин «по меньшей мере», предшествующий ряду элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу в этом ряду. Специалисты в данной области техники распознают или смогут установить, используя не более чем обычные эксперименты, множество эквивалентов конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных здесь. Такие эквиваленты, как предполагается, охватываются настоящим изобретением.

[0060] Используемые здесь термины «содержит», «содержащий», «включает», «включающий», «имеет», «имеющий», «содержит» или «содержащий» или любой другой их вариант, как будет понятно, подразумевают включение указанного целого числа или группы целых чисел, но не исключение какого-либо другого целого числа или группы целых чисел и, как предполагается, являются неисключительными или открытыми.

Например, композиция, смесь, процесс, способ, изделие или устройство, которое содержит список элементов, необязательно ограничивается только этими элементами, но может включать другие элементы, не перечисленные в явном виде или не присущие такой композиции, смеси, процессу, способу, изделию или устройству. Кроме того, если прямо не указано иное, «или» относится к включающему или не исключающему или. Например, условию «А или В» удовлетворяет любое из следующего: А является верным (или присутствует), а В является ложным (или не присутствует), А является ложным (или не присутствует), а В является верным (или присутствует), и как А, так и В являются верными (или присутствуют).

[0061] Следует также понимать, что термины «примерно», «приблизительно», «в целом», «по существу» и подобные термины, используемые здесь при ссылке на размер или характеристику компонента предпочтительного изобретения, указывают на то, что описанный размер, характеристика не является строгой границей или параметром и не исключает незначительных отклонений от него, которые являются функционально одинаковыми или схожими, как это понятно специалисту со средним уровнем компетентности в данной области техники. Как минимум, такие ссылки, которые включают числовой параметр, будут включать вариации, которые с использованием математических и промышленных принципов, принятых в данной области техники, (например, округления, измерения или других систематических ошибок, производственных допусков и т.д.), не будут менять наименьшую значащую цифру.

[0062] Используемый здесь термин «тау» или «тау-белок», также известный как ассоциированный с микротрубочками белок тау, MAPT, белок нейрофибриллярных клубков, спаренная спиральная нить тау, PHF-тау, MAPTL, MTBT1, относится к присутствующему в избытке в центральной и периферической нервной системе белку, имеющему множество изоформ. В центральной нервной системе (ЦНС) человека существует шесть основных изоформ тау размером от 352 до 441 аминокислоты вследствие альтернативного сплайсинга (Hanger et al., *Trends Mol Med.* 15:112-9, 2009). Примеры тау включают, но без ограничения этим, изоформы тау в ЦНС, такие как самая длинная изоформа тау из 441 аминокислоты (4R2N), которая имеет четыре повтора и две вставки, и самая короткая (эмбриональная) изоформа длиной 352 аминокислоты (3R0N), которая имеет три повтора и не имеет вставок. Примеры тау также включают изоформу «большой тау», экспрессируемую в периферических нервах, которая содержит 300 дополнительных остатков (экзон 4a). Friedhoff et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 1502 (2000) 122-132. Примеры тау включают большой тау человека, который представляет собой белок длиной 758 аминокислот, кодируемый транскриптом мРНК длиной 6762 нуклеотида (NM_016835.4), или его изоформы. Аминокислотная последовательность приведенного в качестве примера большого тау человека представлена под номером доступа в GenBank - NP_058519.3. Используемый здесь термин «тау» включает гомологи тау из видов, отличных от человека, таких как *Macaca fascicularis* (яванские макаки) или *Pan troglodytes* (шимпанзе). Используемый здесь термин «тау» включает белки, содержащие мутации, например

точечные мутации, фрагменты, вставки, делеции и варианты сплайсинга полноразмерного тау дикого типа. Термин «тау» также охватывает посттрансляционные модификации аминокислотной последовательности тау. Посттрансляционные модификации включают, но без ограничения этим, фосфорилирование.

[0063] Используемый здесь термин «пептид» или «полипептид» относится к полимеру, состоящему из аминокислотных остатков, родственных встречающихся в природе структурных вариантов и их синтетических не встречающихся в природе аналогов, связанных с помощью пептидных связей. Термин относится к пептиду любого размера, структуры или функции. Как правило, пептид имеет длину, составляющую по меньшей мере три аминокислоты. Пептид может быть встречающимся в природе, рекомбинантным или синтетическим, или любой их комбинацией. Синтетические пептиды можно синтезировать, например, с использованием автоматического синтезатора полипептидов. Примеры тау-пептидов включают любой пептид белка тау длиной от приблизительно 5 до приблизительно 30 аминокислот, предпочтительно от приблизительно 10 до приблизительно 25 аминокислот, более предпочтительно от приблизительно 16 до приблизительно 21 аминокислоты. В настоящем раскрытии пептиды приведены от N-конца к C-концу с использованием стандартного трех- или однобуквенного сокращения аминокислот, причем фосфорилированные остатки обозначены «р». Примеры тау-пептидов, применимых в настоящем изобретении, включают, но без ограничения этим, тау-пептиды, включающие аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:1-12, или тау-пептиды, имеющие аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO:1-12.

[0064] Используемый здесь термин «фосфопептид» или «фосфоэпитоп» относится к пептиду, который фосфорилирован по одному или более аминокислотных остатков. Примеры тау-фосфопептидов включают любой тау-пептид, включающий один или более фосфорилированных аминокислотных остатков. Примеры тау-фосфопептидов, применимых в настоящем изобретении, включают, но без ограничения этим, тау-фосфопептиды, включающие аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:1-3 или 5-12, или тау-фосфопептиды, имеющие аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO:1-3 или 5-12.

[0065] Тау-пептиды по настоящему изобретению могут быть синтезированы путем твердофазного синтеза пептидов или с помощью рекомбинантных экспрессионных систем. Автоматические синтезаторы пептидов коммерчески доступны от многочисленных поставщиков, таких как Applied Biosystems (Foster City, CA). Рекомбинантные экспрессионные системы могут включать бактерии, такие как *E. coli*, дрожжи, клетки насекомых или клетки млекопитающих. Процедуры для рекомбинантной экспрессии описаны в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (CSHP Press, NY 2d ed., 1989).

[0066] Тау представляет собой «собственный» белок человека. Это означает, что, в принципе, все лимфоциты, несущие рецептор, специфический для тау, должны были быть удалены во время развития центральной толерантности или приведены в состояние толерантности по механизму развития периферической толерантности. Было доказано, что эта проблема является существенным препятствием на пути разработки вакцин против собственных или «измененных собственных» белков (например, противоопухолевых антигенов).

[0067] Для выработки высококачественных антител против антигена (собственного или инфекционного) требуется действие не только В-лимфоцитов, которые продуцируют антитело, но также CD4⁺ Т-лимфоцитов-«хелперов». CD4⁺ Т-клетки обеспечивают крайне необходимые сигналы выживания и созревания для В-лимфоцитов, и у животных с дефицитом CD4⁺ глубоко подавлен иммунитет. CD4⁺ Т-клетки также подвержены механизмам толерантности, и дополнительным препятствием для выработки сильных гуморальных ответов на собственный белок (например, тау) является то, что тау-реактивные CD4⁺ Т-клетки также могут быть редко или вообще не существовать в репертуаре являющегося человеком животного.

[0068] Не желая ограничиваться какой-либо теорией, полагают, но без ограничения каким-либо образом объема настоящего изобретения, что эта проблема решается с помощью вакцинных композиций по настоящему изобретению.

[0069] В одном варианте осуществления получают липосому, содержащую тау-пептид (один пример показан на фиг. 1; наверху), которая также содержит распознаваемый Т-клетками эпитоп, который способен связываться с большей частью или всеми молекулами HLA-DR (родственными антигену D - лейкоцитарному антигену человека). Распознаваемый Т-клетками эпитоп потом способен активировать CD4⁺ Т-клетки и обеспечивает необходимые сигналы созревания и выживания для тау-специфических В-клеток (фиг. 2). В другом варианте осуществления получают конъюгат тау-пептида с белком-носителем (один пример показан на фиг. 1; внизу), который индуцирует сильную Т-хелперную реакцию (фиг. 3). В этом варианте осуществления используется «несвязанное распознавание», при котором специфические для носителя Т-клетки обеспечивают сигналы выживания и созревания для самореактивных В-клеток. Соответственно, тау-специфические В-клетки получают крайне важные сигналы для инициирования созревания аффинности, переключения классов иммуноглобулинов и создания пула клеток долговременной памяти. Липосомы с тау и конъюгаты тау могут использоваться для выработки высококачественных антител против тау-антигена в схемах гомологичной или гетерологичной иммунизации, при этом липосомы или конъюгаты используются при первичной и/или повторной иммунизации.

[0070] *Липосомы*

[0071] В одном общем аспекте настоящее изобретение относится к липосоме, содержащей:

а. тау-пептид, предпочтительно тау-пептид, представляет собой тау-фосфопептид; и

в. эпитоп для Т-клеток-хелперов,
 причем тау-пептид представлен на поверхности липосомы.

[0072] Липосомы в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения также упоминаются здесь как «улучшенные липосомы», «улучшенные содержащие липосомы вакцины» или «вакцины на основе липосомы в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения», или «липосомы с тау» или «оптимизированные, содержащие липосомы вакцины» на основе «липосом 2-го поколения».

[0073] Используемый здесь термин «липосома», как правило, относится к липидной везикуле, которая изготовлена из материалов с высоким содержанием липидов, например фосфолипидов, холестерина. Липиды этих везикул, как правило, организованы в форму липидных бислоев. Липидные бислои, как правило, инкапсулируют объем, который либо распределен между несколькими лукообразными оболочками липидных бислоев, образуя многослойные липидные везикулы (MLV), либо содержится в аморфной центральной полости. Липидные везикулы, имеющие аморфную центральную полость, представляют собой однослойные липидные везикулы, т.е. липидные везикулы с одним периферическим бислоем, окружающим полость. Большие однослойные везикулы (LUV), как правило, имеют диаметр от 100 нм до нескольких микрометров, например 100-200 нм или более, в то время как небольшие однослойные липидные везикулы (SUV), как правило, имеют диаметр, составляющий менее 100 нм, например 20-100 нм, обычно 15-30 нм.

[0074] В соответствии с конкретными вариантами осуществления липосома содержит один или более тау-пептидов. В соответствии с конкретными вариантами осуществления тау-пептиды в липосоме могут быть одинаковыми или разными.

[0075] Любой подходящий тау-пептид, известный специалистам в данной области техники, может использоваться в настоящем изобретении с учетом настоящего раскрытия. В соответствии с конкретными вариантами осуществления один или более тау-пептидов включают аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO:1-12. В других вариантах осуществления один или более тау-пептидов включают аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична аминокислотной последовательности одной из SEQ ID NO:1-12, причем ни один из аминокислотных остатков не является фосфорилированным, или один или более аминокислотных остатков являются фосфорилированными.

[0076] В соответствии с конкретными вариантами осуществления один или более тау-пептидов представляет собой тау-фосфопептид. В соответствии с конкретными вариантами осуществления один или более тау-фосфопептидов включают аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO:1-3 или 5-12 или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична аминокислотной последовательности одной из SEQ ID NO:1-3 или 5-12, причем один или более указанных аминокислотных остатков являются фосфорилированными. Предпочтительно, когда тау-фосфопептид включает аминокислотную последовательность

одной из SEQ ID NO:1-3. Тау-пептид может иметь амидированный С-конец.

[0077] В соответствии с вариантами осуществления настоящей заявки тау-пептид представлен на поверхности липосомы. Тау-пептид, предпочтительно тау-фосфопептид, может быть представлен на поверхности липосомы с использованием способов, известных в данной области техники с учетом настоящего раскрытия. Смотрите, например, соответствующее раскрытие в патентах США с №№ 8647631 и 9687447, содержание которых включено сюда посредством ссылки. В соответствии с конкретными вариантами осуществления один или более тау-пептидов, в том числе фосфопептидов, дополнительно содержат одну или более модификаций, таких как пальмитоилирование или модификация с помощью додецила, чтобы позволить тау-пептидам быть представленными на поверхности липосомы. Дополнительные аминокислотные остатки, такие как Lys, Cys или иногда Ser или Thr, могут быть добавлены к тау-пептиду для облегчения модификации. Сообщалось, что положение липидных якорей порождает различные конформации пептидной последовательности (Hickman et al., J. Biol. Chem. Vol. 286, NO. 16, pp. 13966-13976, 22 апреля 2011). Не желая быть ограниченными какой-либо теорией, полагают, что добавление гидрофобных составляющих на обоих концах может увеличить патологическую конформацию бета-листа тау-пептида. Таким образом, один или более тау-пептидов дополнительно включают гидрофобные составляющие на обоих концах. Модифицированный тау-пептид может иметь амидированный С-конец. Предпочтительно тау-пептид, представленный на поверхности липосомы, состоит из аминокислотной последовательности одной из SEQ ID NO:27-SEQ ID NO:38.

[0078] Используемый здесь термин «эпитоп для Т-клеток-хелперов» относится к полипептиду, содержащему эпитоп, который способен распознаваться Т-клеткой-хелпером. Примеры эпитопов для Т-хелперов включают, но без ограничения этим, столбнячный анатоксин (например, эпитопы P2 и P30, также называемые соответственно T2 и T30), поверхностный антиген вируса гепатита В, холерный токсин В, анатоксин, дифтерийный анатоксин, F-белок вируса кори, основной белок наружной мембраны *Chlamydia trachomatis*, циркумспорозитный белок T *Plasmodium falciparum*, антиген CS *P. falciparum*, триозофосфатизомеразу *Schistosoma mansoni*, *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Pertusaria trachythallina*, TraT *Escherichia coli* и гемагглютинин вируса гриппа (HA).

[0079] Любой подходящий эпитоп для Т-хелперов, известный специалистам в данной области техники, может использоваться в настоящем изобретении с учетом настоящего раскрытия. В соответствии с конкретными вариантами осуществления эпитоп для Т-хелперов включает по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:23-SEQ ID NO:26. Предпочтительно, когда эпитоп для Т-хелперов включает две или более аминокислотных последовательностей из SEQ ID NO:23-SEQ ID NO:26, слитых вместе через линкер, такой как пептидный линкер, включающий одну или более аминокислот, например Val (V), Ala (A), Arg (R), Gly (G), Ser (S), Lys (K). Длина линкера может варьироваться, предпочтительно 1-5 аминокислот. Предпочтительно, когда эпитоп для Т-хелперов включает три или более аминокислотных

последовательностей из SEQ ID NO:23-SEQ ID NO:26, слитых вместе через один или более линкеров, выбранных из группы, состоящей из VVR, GS, RR, RK. Эпитоп для Т-хелперов может иметь амидированный С-конец.

[0080] В соответствии с вариантами осуществления настоящей заявки эпитопы для Т-хелперов могут быть включены на поверхность липосомы, например, заякорены с помощью ковалентно связанной гидрофобной составляющей, причем указанная гидрофобная составляющая представляет собой алкильную группу, жирную кислоту, триглицерид, диглицерид, стероид, сфинголипид, гликолипид или фосфолипид, в частности, алкильную группу или жирную кислоту, в частности, с углеродным скелетом из по меньшей мере 3 атомов углерода, в частности, по меньшей мере 4 атомов углерода, в частности, по меньшей мере 6 атомов углерода, в частности, по меньшей мере 8 атомов углерода, в частности, по меньшей мере 12 атомов углерода, в частности, по меньшей мере 16 атомов углерода. В одном варианте осуществления настоящего изобретения гидрофобная составляющая представляет собой пальмитиновую кислоту. Альтернативно, эпитопы для Т-хелперов могут быть инкапсулированы в липосомы. В соответствии с конкретными вариантами осуществления эпитоп для Т-хелперов инкапсулирован в липосому.

[0081] Эпитоп для Т-хелперов может быть модифицирован для желаемого расположения его в липосомах, используя известные в данной области техники способы, с учетом настоящего раскрытия. В соответствии с конкретными вариантами осуществления эпитоп для Т-хелперов, применимый для настоящего изобретения, включает аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO:39-SEQ ID NO:44. Предпочтительно, когда эпитоп для Т-хелпера состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:13-SEQ ID NO:17.

[0082] В соответствии с конкретными вариантами осуществления липосома содержит тау-пептид и эпитоп для Т-хелперов в весовом соотношении 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 или 6:1.

[0083] В одном варианте осуществления липосома дополнительно содержит по меньшей мере один адъювант, содержащий лиганд toll-подобного рецептора. Таким образом, в другом общем аспекте, настоящее изобретение относится к липосоме, содержащей:

- a. тау-пептид, предпочтительно тау-фосфопептид;
- b. эпитоп для Т-хелперов; и
- c. по меньшей мере один из
 - i. лиганда toll-подобного рецептора 9 и
 - ii. лиганда toll-подобного рецептора 4.

[0084] Используемый здесь термин «toll-подобный рецептор» или «TLR» относится к классу белков рецепторов, распознающих структуры, (PRR), которые играют ключевую роль во врожденном иммунном ответе. TLR распознают связанные с патогеном молекулярные структуры (PAMP) микробных патогенов, таких как бактерии, грибы,

паразиты и вирусы, которые можно отличить от молекул-хозяев. TLR представляют собой простирающиеся через мембрану белки, которые обычно функционируют в виде димеров и экспрессируются клетками, участвующими во врожденном иммунном ответе, включая антигенпрезентирующие дендритные клетки и фагоцитарные макрофаги. Существует по меньшей мере десять членов семейства TLR человека, TLR1-TLR10, и по меньшей мере двенадцать членов семейства TLR мыши, TLR1-TLR9 и TLR11-TLR13, и они различаются типами антигенов, которые они распознают. Например, TLR4 распознает липополисахариды (LPS), компонент, присутствующий во многих грамотрицательных бактериях, а также вирусные белки, полисахариды и эндогенные белки, такие как липопротеин низкой плотности, бета-дефензины и белок теплового шока; а TLR9 представляет собой нуклеотид-чувствительный TLR, который активируется неметилованными одноцепочечными или двухцепочечными динуклеотидами цитозин-фосфат-гуанини (CpG), которые имеются в избытке в прокариотических геномах, но редки в геномах позвоночных. Активация TLR приводит к ряду событий передачи сигналов, приводящих к продукции интерферонов I типа (IFN), цитокинов и хемокинов воспаления и индукции иммунных ответов. В конце концов, это воспаление также активирует адаптивную иммунную систему, которая затем приводит к клиренсу являющихся колонистами патогенов и инфицированных клеток.

[0085] Используемый здесь термин «лиганд» относится к молекуле, которая образует комплекс с биомолекулой (например, рецептором) для биологической цели. В соответствии с конкретным вариантом осуществления лиганд toll-подобного рецептора представляет собой агонист toll-подобного рецептора.

[0086] Используемый здесь термин «агонист» относится к молекуле, которая связывается с одним или более TLR и индуцирует опосредуемый рецептором ответ. Например, агонист может индуцировать, стимулировать, увеличивать, активировать, облегчать, усиливать активность рецептора или повышать ее регуляцию. Такие действия называются «агонистическими действиями». Например, агонист TLR4 или TLR9 может активировать или усиливать передачу сигналов в клетку через связанный рецептор. Агонисты включают, но без ограничения этим, нуклеиновые кислоты, небольшие молекулы, белки, углеводы, липиды или любые другие молекулы, которые связываются или взаимодействуют с рецепторами. Агонисты могут имитировать активность встречающегося в природе лиганда рецептора. Агонисты могут быть гомологичными этим встречающимся в природе лигандам рецептора, что касается последовательности, конформации, заряда или других характеристик, так что они могут распознаваться рецепторами. Это распознавание может приводить к физиологическим и/или биохимическим изменениям внутри клетки, так что клетка реагирует на присутствие агониста таким же образом, как если бы присутствовал встречающийся в природе лиганд рецептора. В соответствии с конкретными вариантами осуществления агонист toll-подобного рецептора представляет собой по меньшей мере один из агониста toll-подобного рецептора 4 и агониста toll-подобного рецептора 9.

[0087] Используемый здесь термин «агонист toll-подобного рецептора 4» относится к любому соединению, которое действует как агонист TLR4. Любой подходящий агонист toll-подобного рецептора 4, известный специалистам в данной области техники с учетом настоящего раскрытия, может использоваться в настоящем изобретении. Примеры лиганда toll-подобного рецептора 4, применимого для настоящего изобретения, включают агонист TLR4, включая, но без ограничения этим, монофосфорилипид А (MPLA). Используемый здесь термин «монофосфорилипид А» или «MPLA» относится к модифицированной форме липида А, которая является биологически активной частью эндотоксина липополисахарида (LPS) грамотрицательных бактерий. MPLA менее токсичен, чем LPS, при сохранении иммуностимулирующей активности. В качестве адъюванта для вакцины MPLA стимулирует как клеточный, так и гуморальный ответы на вакцинный антиген. Примеры MPLA включают, но без ограничения этим, 3-О-деацил-4'-монофосфорилипид А, монофосфорилгексаациллипид А, 3-деацилированный, монофосфорил-3-деацил-липид А и их структурно родственные варианты. MPLA, применимый для настоящего изобретения, может быть получен с использованием способов, известных в данной области техники, или из коммерческого источника, например 3D-(6-ацил)PHAD®, PHAD®, PHAD®-504, 3D-PHAD® от Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, США) или MPL™ из различных коммерческих источников. В соответствии с конкретными вариантами осуществления агонист toll-подобного рецептора 4 представляет собой MPLA. Используемый здесь термин «агонист toll-подобного рецептора 9» относится к любому соединению, которое действует как агонист TLR9. Любой подходящий агонист toll-подобного рецептора 9, известный специалистам в данной области техники с учетом настоящего раскрытия, может использоваться в настоящем изобретении. Примеры лиганда toll-подобного рецептора 9, применимого для настоящего изобретения, включают агонист TLR9, включая, но без ограничения этим, CpG- олигонуклеотиды.

[0089] Используемый здесь термин «CpG-олигонуклеотид», «CpG-олигодезоксинуклеотид» или «CpG-ODN» относится к олигонуклеотиду, включающему по меньшей мере один мотив CpG. Используемый здесь термин «олигонуклеотид», «олигодезоксинуклеотид» или «ODN» относится к полинуклеотиду, образованному из множества связанных нуклеотидных единиц. Такие олигонуклеотиды могут быть получены из существующих источников нуклеиновых кислот или могут быть получены синтетическими способами. Используемый здесь термин «мотив CpG» относится к нуклеотидной последовательности, которая содержит неметилированные динуклеотиды цитозин-фосфат-гуанин (CpG) (т.е. цитозин (C), за которым следует гуанин (G)), связанный с помощью фосфатной связи или фосфодиэфирного остова или других межнуклеотидных связей.

[0090] В соответствии с конкретными вариантами осуществления CpG-олигонуклеотид является липидированным, т.е. конъюгированным (ковалентно связанным) с липидной составляющей.

[0091] Используемый здесь термин «липидная составляющая» относится к

составляющей, содержащей липофильную структуру. Липидные составляющие, такие как алкильная группа, жирная кислота, триглицерид, диглицерид, стероид, сфинголипид, гликолипид или фосфолипид, в частности, стерол, такой как холестерин, или жирные кислоты, когда они присоединены к высокогидрофильным молекулам, таким как нуклеиновые кислоты, могут существенно увеличить связывание с белками плазмы и, следовательно, время полужизни в кровотоке гидрофильных молекул. Кроме того, было показано, что связывание с некоторыми белками плазмы, такими как липопротейны, увеличивает поглощение в специфических тканях, экспрессирующих соответствующие рецепторы липопротейнов (например, рецептор ЛПНП, рецептор ЛПВП или фагоцитарный рецептор SR-B1). В частности, липидная составляющая, конъюгированная с фосфопептидами и/или CpG-олигонуклеотидом, позволяет закоривать указанные пептиды и/или олигонуклеотиды в мембране липосомы через гидрофобную составляющую.

[0092] В соответствии с конкретными вариантами осуществления, с учетом настоящего раскрытия, CpG-олигонуклеотид может включать любые подходящие межнуклеотидные связи.

[0093] Используемый здесь термин «межнуклеотидная связь» относится к химической связи, соединяющей два нуклеотида через их сахара, состоящей из атома фосфора и заряженной или нейтральной группы между соседними нуклеозидами. Примеры межнуклеотидной связи включают фосфодиэфирную (po), фосфоротиоатную (ps), фосфородитиоатную (ps2), метилфосфонатную (mp) и метилфосфоротиоатную (gp) связи. Фосфоротиоатная, фосфородитиоатная, метилфосфонатная и метилфосфоротиоатная связи являются стабилизирующими межнуклеотидными связями, в то время как фосфодиэфирная связь является встречающейся в природе межнуклеотидной связью. Фосфоротиоаты олигонуклеотидов, как правило, синтезируют в виде случайной рацемической смеси Rp и Sp фосфоротиоатных связей.

[0094] Любой подходящий CpG-олигонуклеотид, известный специалистам в данной области техники, может использоваться в настоящем изобретении с учетом настоящего раскрытия. Примеры таких CpG-олигонуклеотидов включают, но без ограничения этим, CpG2006 (также известный как CpG7909), CpG1018, CpG2395, CpG2216 или CpG2336.

[0095] CpG-олигонуклеотид может быть липидирован с использованием способов, известных в данной области техники с учетом настоящего раскрытия. В некоторых вариантах осуществления 3'-конец CpG-олигонуклеотида ковалентно связан с молекулой холестерина посредством фосфатной связи, необязательно через линкер, включающий PEG (ПЭГ). Другая липофильная составляющая также может быть ковалентно связана с 3'-концом CpG-олигонуклеотида. Например, CpG-олигонуклеотид может быть ковалентно связан с липидным якорем той же длины, что и фосфолипиды из липосомы: одной цепью пальмитиновой кислоты (используя Pal-OH или аналог, активированный для связывания) или двумя пальмитиновыми кислотами (например, используя 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-(сукцинил) или аналог, активированный для связывания), необязательно через линкер, включающий PEG. Смотрите, например, соответствующее

раскрытие в патенте США с № 7741297, содержание которого включено сюда посредством ссылки. Длина PEG может варьироваться, например, от 1 до 5 единиц PEG.

[0096] Для ковалентного соединения CpG-олигонуклеотида с липофильной составляющей (такой как молекула холестерина) также могут использоваться другие линкеры, примеры которых включают, но без ограничения этим, алкильный спейсер, содержащий от 3 до 12 атомов углерода. Короткий линкер, совместимый с химией олигонуклеотидов, необходим в виде аминодиола. В некоторых вариантах осуществления линкер не используется для ковалентного связывания. Смотрите, например, Ries et al., “Convenient synthesis and application of versatile nucleic acid lipid membrane anchors in the assembly and fusion of liposomes, *Org. Biomol. Chem.*, 2015, 13, 9673, соответствующее раскрытие которого включено сюда посредством ссылки.

[0097] В соответствии с конкретными вариантами осуществления липидированный CpG-олигонуклеотид, применимый для настоящего изобретения, включает нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:18-SEQ ID NO:22, причем нуклеотидная последовательность содержит одну или более фосфоротиоатных межнуклеотидных связей, и нуклеотидная последовательность ковалентно связана с по меньшей мере одним холестерином через линкер. Любые подходящие линкеры могут использоваться для ковалентного связывания CpG-олигонуклеотида с молекулой холестерина. Предпочтительно, когда линкер включает полиэтиленгликоль (PEG).

[0098] В соответствии с конкретными вариантами осуществления липосома содержит:

- a) тау-фосфопептид,
- b) эпитоп для Т-хелперов,
- c) липидированный CpG-олигонуклеотид и
- d) лиганд toll-подобного рецептора 4;

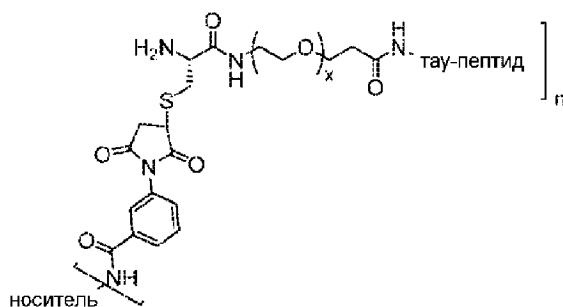
причем тау-фосфопептид представлен на поверхности липосомы, а эпитоп для Т-хелперов инкапсулирован в липосому.

[0099] В соответствии с конкретными вариантами осуществления липосома содержит:

a. тау-пептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:27-SEQ ID NO:38;

b. эпитоп для Т-хелперов, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:39-SEQ ID NO:44, предпочтительно эпитоп для Т-хелперов, состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:13-SEQ ID NO:17;

c. липидированный CpG-олигонуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:18-SEQ ID NO:22, причем CpG-олигонуклеотид содержит одну или более фосфоротиоатных межнуклеотидных связей, и CpG-олигонуклеотид ковалентно связан с по меньшей мере одним холестерином через линкер; и



где

x представляет собой целое число от 0 до 10, и

n представляет собой целое число от 2 до 15, предпочтительно 3-11.

[00108] В соответствии с конкретными вариантами осуществления x представляет собой целое число от 1 до 10, от 2 до 9, от 2 до 8, от 2 до 7, от 2 до 6, от 2 до 5, от 2 до 4 или от 2 до 3. В соответствии с конкретными вариантами осуществления x равен 3.

[00109] В соответствии с конкретными вариантами осуществления n равно от 2 до 15, от 3 до 11, от 3 до 9, от 3 до 8 или от 3 до 7.

[00110] В соответствии с конкретными вариантами осуществления конъюгат включает один или более тау-пептидов. В соответствии с конкретными вариантами осуществления тау-пептиды конъюгата могут быть одинаковыми или разными.

[00111] В соответствии с конкретными вариантами осуществления, с учетом настоящего раскрытия, любые подходящие тау-пептиды могут использоваться в настоящем изобретении. В соответствии с конкретными вариантами осуществления один или более тау-пептидов включают аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO:1-12 или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична аминокислотной последовательности одной из SEQ ID NO:1-12, причем ни один из аминокислотных остатков не является фосфорилированным, один или более аминокислотных остатков являются фосфорилированными.

[00112] В соответствии с конкретными вариантами осуществления один или более тау-пептидов представляет собой тау-фосфопептид. В соответствии с конкретными вариантами осуществления один или более тау-фосфопептидов включают аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO:1-3 или 5-12 или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична аминокислотной последовательности одной из SEQ ID NO:1-3 или 5-12, причем один или более указанных аминокислотных остатков являются фосфорилированными.

[00113] В соответствии с конкретными вариантами осуществления тау-фосфопептид состоит из аминокислотной последовательности одной из SEQ ID NO:1-3.

[00114] Используемый здесь термин «иммуногенный носитель» относится к иммуногенному веществу, которое может быть связано с тау-пептидом. Иммуногенная составляющая, связанная с тау-пептидом, может вызывать иммунный ответ и вызывать продукцию антител, которые могут специфически связывать тау-пептид. Иммуногенные составляющие представляют собой функциональные составляющие, которые включают

белки, полипептиды, гликопротеины, сложные полисахариды, частицы, нуклеиновые кислоты, полинуклеотиды и т.п., которые распознаются как чужеродные и тем самым вызывают иммунологический ответ у хозяина. Любой подходящий иммуногенный носитель, известный специалистам в данной области техники с учетом настоящего раскрытия, может использоваться в настоящем изобретении. В соответствии с конкретными вариантами осуществления иммуногенный носитель представляет собой гемоцианин лимфы улитки (KLH), столбнячный анатоксин, CRM197 (нетоксичную форму дифтерийного токсина), смесь белков наружной мембраны из *N. meningitidis* (OMP) или его производное. В соответствии с конкретными вариантами осуществления иммуногенный носитель представляет собой KLH или CRM197.

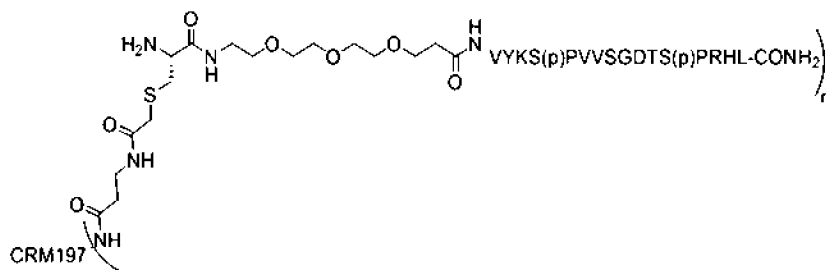
[00115] В соответствии с конкретными вариантами осуществления тау-пептид конъюгируют с носителем через линкер. Используемый здесь термин «линкер» относится к химической составляющей, которая присоединяет иммуногенный носитель к тау-пептиду. Любой подходящий линкер, известный специалистам в данной области техники с учетом настоящего раскрытия, может использоваться в настоящем изобретении. Линкерами могут быть, например, одинарная ковалентная связь, замещенный или незамещенный алкил, замещенная или незамещенная гетероалкильная составляющая, линкер, включающий полиэтиленгликоль (PEG), пептидный линкер, линкер на основе сахаров или расщепляемый линкер, такой как дисульфидная связь или сайт расщепления протеазой, или аминокислота, или их комбинация. Примеры линкера могут включать одну или более из полиэтиленгликоля (PEG), сукцинимидил-3-(бромацетиламино)пропионата (SBAP), м-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидного эфира (MBS) или одну или более аминокислот, таких как Cys, Lys или иногда Ser или Thr, или их комбинацию.

[00116] В соответствии с конкретными вариантами осуществления линкер включает $(C_2H_4O)_x$ -цистеин-ацетиламинопропионамид или м-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидный эфир-цистеин- $(C_2H_4O)_x$, где x представляет собой целое число от 0 до 10, например 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

[00117] В соответствии с конкретными вариантами осуществления носитель ковалентно связан с N-концом тау-пептида через линкер.

[00118] В соответствии с другими конкретными вариантами носитель ковалентно связан с C-концом тау-пептида через линкер.

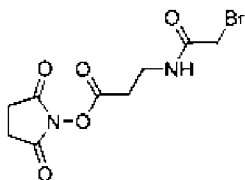
[00119] В соответствии с конкретными вариантами осуществления конъюгат имеет структуру:



где n представляет собой целое число от 2 до 15, предпочтительно 3-11, более

предпочтительно 3-7.

[00120] Конъюгаты по настоящему изобретению могут быть получены способами, известными в данной области техники с учетом настоящего раскрытия. Например, указанный выше конъюгат может быть получен путем взаимодействия сукцинимидил-3-(бромацетиламино)пропионата (SBAP):



с аминогруппой CRM197 с образованием амидной связи. Этот предшественник CRM197 может впоследствии вступать в реакцию с тау-пептидом (например, фосфорилированным тау-пептидом с SEQ ID NO:2), конъюгированным на своем N-конце или на своем C-конце с линкером в виде PEG-цистеина со свободной нуклеофильной тиольной группой, с образованием конъюгата тау-фосфопептида.

[00121] Приведенный в качестве примера конъюгат в соответствии с вариантом осуществления настоящей заявки проиллюстрирован на фиг. 1. Конкретнее, множество тау-фосфопептидов (рТау-пептид T3.76) ковалентно связаны с белком-носителем CRM197.

[00122] *Фармацевтические композиции*

[00123] В одном общем аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим терапевтически эффективное количество липосомы или конъюгата по настоящему изобретению вместе с фармацевтически приемлемым наполнителем и/или носителем. Фармацевтически приемлемые наполнители и/или носители хорошо известны в данной области техники (смотрите Remington's Pharmaceutical Science (15-е изд.), Mack Publishing Company, Easton, PA., 1980). Предпочтительный состав фармацевтической композиции зависит от предполагаемого способа введения и терапевтического применения. Композиции могут включать фармацевтически приемлемые, нетоксичные носители или разбавители, которые определяются как носители, обычно используемые для составления фармацевтических композиций для введения животным или людям. Разбавитель выбирается таким образом, чтобы не влиять на биологическую активность комбинации. Примерами таких разбавителей являются дистиллированная вода, физиологический забуференный фосфатом раствор, растворы Рингера, раствор декстрозы и раствор Хэнка. Кроме того, фармацевтическая композиция или препарат может также включать другие носители, адъюванты или нетоксичные, нетерапевтические, неиммуногенные стабилизаторы и т.п. Понятно, что характеристики носителя, наполнителя или разбавителя будут зависеть от пути введения для конкретного применения.

[00124] Фармацевтическая композиция может содержать смесь одного и того же иммуногенного тау-пептида. Альтернативно, фармацевтическая композиция может содержать смесь различных иммуногенных тау-пептидов по настоящему изобретению.

[00125] Другая проблема, связанная с вакцинами против болезней нейронов,

заключается в том, что исключительно высокие титры антител могут быть необходимы для обеспечения эффективности. Это обусловлено тем, что антиген-мишень для вакцины находится в головном мозге. Головной мозг отделен от кровотока специализированной клеточной структурой, называемой гематоэнцефалическим барьером (ГЭБ). ГЭБ ограничивает проникновение веществ из кровотока в головной мозг. Это предотвращает проникновение токсинов, микробов и т.д. в центральную нервную систему. ГЭБ также оказывает потенциально менее желательный эффект предотвращения эффективного проникновения иммунных медиаторов (таких как антитела) в интерстициальную и спинномозговую жидкость, которая окружает головной мозг.

[00126] Приблизительно 0,1% антител, присутствующих в системном кровотоке, пересекают ГЭБ и проникают в головной мозг. Это означает, что системные титры, индуцируемые вакциной, нацеленной на антиген ЦНС, должны быть в по меньшей мере 1000 раз выше минимального эффективного титра, чтобы быть эффективными в головном мозге.

[00127] В соответствии с конкретными вариантами осуществления фармацевтические композиции по настоящему изобретению, поэтому дополнительно содержат один или более подходящих адъювантов. Таким образом, тау-пептиды по настоящему изобретению, присутствующие в липосоме или конъюгате, могут вводиться в комбинации с подходящим адъювантом для достижения желаемого иммунного ответа у субъекта. Подходящие адъюванты могут вводиться до, после или одновременно с введением липосомы или конъюгата по настоящему изобретению. Предпочтительные адъюванты усиливают внутренний ответ на иммуноген, не вызывая конформационных изменений иммуногена, которые влияют на характеристическую форму ответа. Примерами адъювантов являются соли алюминия (квасцы), такие как гидроксид алюминия, фосфат алюминия и сульфат алюминия. Такие адъюванты могут использоваться с другими специфическими иммуностимулирующими агентами или без них, такими как класс MPLA (3-де-О-ацилированный монофосфориллипид А (MPLTM), монофосфорилгексаацил-липид А 3-деацилированный синтетический (3D-(6-ацил)PHAD®), PHADTM, PHAD®-504, 3D-PHAD®), липид А), полимерные или мономерные аминокислоты, такие как полиглутаминовая кислота или полилизин. Такие адъюванты могут использоваться с или без других специфических иммуностимулирующих агентов, таких как мурамилпептиды (например, N-ацетилмурамил-L-треонил-D-изоглутамин (thr-MDP), N-ацетилнормурамил-L-аланил-D-изоглутамин (nor-MDP), N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутаминил-L-аланин-2-(1'-2'дипальмитоил-sn-глицеро-3-гидроксифосфорилокси)этиламин (MTP-PE), N-ацетилглюкозаминил-N-ацетилмурамил-L-Al-D-изоглю-L-Ala-дипальмитоксипропиламид (DTP-DPP) TheramideTM) или другие компоненты бактериальной клеточной стенки. Эмульсии типа «масло в воде» включают адъювант MF59 (смотрите WO 90/14837), содержащий 5% сквалена, 0,5% Tween 80 и 0,5% Span 85 (необязательно содержащий различные количества MTP-PE), приготовленный в виде субмикронных частиц с использованием микрофлюидизатора; SAF, содержащий 10% сквалена, 0,4% Tween 80, 5%

плюроники-блокированного полимера L121 и thr-MDP, либо микрофлюидизированный в субмикронную эмульсию, либо перемешанный на вортексе с образованием эмульсии с более крупным размером частиц; и адьювантную систему Ribi™ (RAS) (Ribi ImmunoChem, Hamilton, Mont.) 0,2% Tween 80 и один или более компонентов бактериальной клеточной стенки, выбранных из группы, состоящей из монофосфориллипида A (MPL™), трегалозы димиколата (TDM) и скелет клеточной стенки (CWS), предпочтительно MPL™+CWS (Detox™). Другие адьюванты включают полный адьювант Фрейнда (CFA) и цитокины, такие как интерлейкины (IL-1, IL-2 и IL-12), макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF) и фактор некроза опухолей (TNF).

[00128] Используемый здесь термин «в комбинации» в связи с назначением двух или более терапий субъекту относится к применению более чем одной терапии. Использование термина «в комбинации» не ограничивает порядок, в котором терапии назначаются субъекту. Например, первую терапию (например, описанную здесь композицию) можно вводить до (например, за 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 16 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель), одновременно или после (например, через 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 16 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель) введения второй терапии субъекту.

[00129] Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть составлены в соответствии со способами, хорошо известными в данной области техники. Оптимальные соотношения каждого компонента в композициях могут быть определены с помощью методов, хорошо известных специалистам в данной области техники с учетом настоящего раскрытия.

[00130] *Способы применения*

[00131] Другой общий аспект настоящего изобретения относится к способам индукции иммунного ответа против тау-белка у субъекта, страдающего нейродегенеративным заболеванием, нарушением или состоянием, включающим введение субъекту фармацевтической композиции в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения. В соответствии с конкретными аспектами иммунный ответ индуцируется против фосфорилированного тау-белка, предпочтительно ePHF.

[00132] Другой общий аспект настоящего изобретения относится к способам лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания, нарушения или состояния, включающим введение субъекту фармацевтической композиции в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения.

[00133] Используемые здесь термины «индуцировать» и «стимулировать» и их вариации относятся к любому измеримому увеличению клеточной активности. Индукция иммунного ответа может включать, например, активацию, пролиферацию или созревание популяции иммунных клеток, увеличение продукции цитокинов и/или другой показатель повышения иммунной функции. В некоторых вариантах осуществления индукция

иммунного ответа может включать увеличение пролиферации В-клеток, продуцирование антигенспецифических антител, увеличение пролиферации антигенспецифических Т-клеток, улучшение презентации антигена дендритными клетками и/или увеличение экспрессии определенных цитокинов, хемокинов и костимулирующих маркеров.

[00134] Способность индуцировать или стимулировать иммунный ответ против тау при введении в организм животного или человека можно оценивать либо *in vitro*, либо *in vivo* с использованием различных анализов, которые являются стандартными в данной области техники. Для общего описания методов, доступных для оценки возникновения и активации иммунного ответа, смотрите, например, Coligan et al. (1992 and 1994, *Current Protocols in Immunology*; ed. J Wiley & Sons Inc, National Institute of Health). Определение клеточного иммунитета может быть выполнено способами, полностью известными в данной области техники, например, путем измерения профилей цитокинов, секретируемых активированными эффекторными клетками, включая происходящие от CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток (например, количественного анализа продуцирующих IL-4 или IFN-гамма клеток методом ELISPOT), путем определения состояния активации иммунных эффекторных клеток (например, анализа пролиферации Т-клеток с помощью классического захвата [3H]тимидина), путем анализа антигенспецифических Т-лимфоцитов у сенсibilизированного субъекта (например, пептидоспецифического лизиса в анализе цитотоксичности и т.д.).

[00135] Способность стимулировать клеточный и/или гуморальный ответ может быть определена путем тестирования биологического образца (например, крови, плазмы, сыворотки, PBMC, мочи, слюны, кала, спинномозговой жидкости или лимфатической жидкости) от субъекта на наличие антител, направленных на иммуногенный тау-пептид(ы), вводимый в фармацевтическую композицию (смотрите, например, Harlow, 1989, *Antibodies*, Cold Spring Harbor Press). Например, титры антител, продуцируемых в ответ на введение композиции, обеспечивающей иммуноген, можно измерить с помощью иммуноферментного твердофазного анализа (ELISA), дот-блотов, SDS-ПААГ для электрофореза, ELISPOT или анализа антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP).

[00136] Используемый здесь термин «субъект» относится к животному. В соответствии с конкретными вариантами осуществления субъектом является млекопитающее, в том числе не примат (например, верблюд, осел, зебра, корова, свинья, лошадь, коза, овца, кошка, собака, крыса, кролик, морская свинка или мышь) или примат (например, обезьяна, шимпанзе или человек). В соответствии с конкретными вариантами осуществления субъектом является человек.

[00137] Используемый здесь термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству активного ингредиента или компонента, которое вызывает желательный биологический или лекарственный ответ у субъекта. Терапевтически эффективное количество может быть определено эмпирически и обычным образом в зависимости от заявленной цели. Например, анализы *in vitro* необязательно могут использоваться для помощи в определении оптимальных диапазонов доз. Выбор

конкретной эффективной дозы может быть определен (например, с помощью клинических испытаний) специалистами в данной области техники на основании рассмотрения нескольких факторов, включая заболевание, подвергаемое лечению или профилактике, вовлеченные в процесс симптомы, вес тела пациента, иммунный статус пациента и другие факторы, известные специалисту в данной области техники. Точная доза, которая будет использоваться в препарате, также будет зависеть от пути введения и тяжести заболевания, и ее следует выбирать в соответствии с мнением практикующего врача и обстоятельствами каждого пациента. Эффективные дозы могут быть экстраполированы из кривых зависимости ответа от дозы, полученных исходя из тест-систем *in vitro* или в моделях на животных.

[00138] Используемые здесь термины «лечить», «лечение» и «лечение», как предполагается, все относятся к улучшению или изменению на обратное по меньшей мере одного измеримого физического параметра, связанного с нейродегенеративным заболеванием, нарушением или состоянием, которое является необязательно явным у субъекта, но может быть различимым у субъекта. Термины «лечить», «лечение» и «лечение» могут также относиться к вызову регрессии, предотвращению прогрессирования или, по меньшей мере, замедлению прогрессирования заболевания, нарушения или состояния. В конкретном варианте осуществления термин «лечить», «лечение» и «лечение» относится к облегчению, предотвращению развития или возникновения или уменьшению продолжительности одного или более симптомов, связанных с нейродегенеративным заболеванием, нарушением или состоянием. В конкретном варианте осуществления «лечить», «лечение» и «лечение» относятся к предотвращению рецидива заболевания, нарушения или состояния. В конкретном варианте осуществления «лечить», «лечение» и «лечение» относятся к увеличению выживаемости субъекта, имеющего заболевание, нарушение или состояние. В конкретном варианте осуществления «лечить», «лечение» и «лечение» относятся к устранению заболевания, нарушения или состояния у субъекта.

[00139] В соответствии с конкретными вариантами осуществления терапевтически эффективное количество относится к количеству терапии, которое является достаточным для достижения одного, двух, трех, четырех или более следующих эффектов: (i) ослабления или уменьшения тяжести заболевания, нарушения или состояния, подвергаемого лечению, или связанного с ним симптома; (ii) уменьшения продолжительности заболевания, нарушения или состояния, подвергаемого лечению, или связанного с ним симптома; (iii) предотвращения прогрессирования заболевания, нарушения или состояния, подвергаемого лечению, или связанного с ним симптома; (iv) вызова регрессии заболевания, нарушения или состояния, подвергаемого лечению, или связанного с ним симптома; (v) предотвращения развития или возникновения заболевания, нарушения или состояния, подвергаемого лечению, или связанного с ним симптома; (vi) предотвращения рецидива заболевания, нарушения или состояния, подвергаемого лечению, или связанного с ним симптома; (vii) уменьшения случаев госпитализации субъекта, имеющего заболевание, нарушение или состояние, подвергаемое лечению, или связанный с ним симптом; (viii)

сокращения продолжительности госпитализации субъекта, имеющего заболевание, нарушение или состояние, подвергаемое лечению, или связанный с ним симптом; (ix) увеличения выживаемости субъекта с заболеванием, нарушением или состоянием, подвергаемым лечению, или со связанным с ним симптомом; (x) подавления или ослабления заболевания, нарушения или состояния, подвергаемого лечению, или связанного с ним симптома у субъекта; и/или (xi) усиления или улучшения профилактического или терапевтического действия(й) другой терапии.

[00140] Используемый здесь термин «нейродегенеративное заболевание, нарушение или состояние» включает любое нейродегенеративное заболевание, нарушение или состояние, известное специалистам в данной области техники с учетом настоящего раскрытия. Примеры нейродегенеративных заболеваний, нарушений или состояний включают нейродегенеративные заболевания или нарушения, вызванные или связанные с образованием нейрофибриллярных патологических изменений, такие как тау-ассоциированные заболевания, нарушения или состояния, называемые таупатиями. В соответствии с конкретными вариантами осуществления нейродегенеративное заболевание, нарушение или состояние включает любое из заболеваний или нарушений, которые сопровождаются сосуществованием тау- и амилоидных патологий, включая, но без ограничения этим, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Крейтцфельда-Якоба, деменцию боксеров, синдром Дауна, болезнь Герстмана-Штраусслера-Шейкнера, миозит с тельцами включения, прионный белок, церебральную амилоидную ангиопатию, черепно-мозговую травму, боковой амиотрофический склероз, паркинсонизм-деменцию - комплекс Гуама, негуаманскую болезнь двигательного нейрона с нейрофибриллярными клубками, деменцию, характеризующуюся появлением аргирофильных зерен, кортикобазальную дегенерацию, деменцию Леви, боковой амиотрофический склероз, диффузные нейрофибриллярные клубки с кальцификацией, лобно-височную деменцию, предпочтительно лобно-височную деменцию с паркинсонизмом, связанным с хромосомой 17 (FTDP-17), лобно-височную деменцию с поражением долей, болезнь Галлервордена-Шпатца, множественную системную атрофию, болезнь Ниманна-Пика типа C, болезнь Пика, прогрессирующий подкорковый глиоз, прогрессирующий надъядерный паралич, подострый склерозирующий панэнцефалит, деменцию с преобладанием нейрофибриллярных клубков, постэнцефалитический паркинсонизм, миотоническую дистрофию, хроническую травматическую энцефалопатию (СТЕ), первичную возрастную таупатию (PART) или деменцию с тельцами Леви (LBD). В соответствии с конкретными вариантами осуществления нейродегенеративное заболевание, нарушение или состояние представляет собой болезнь Альцгеймера или другую таупатию.

[00141] Настоящим изобретением также обеспечивается способ ускорения клиренса агрегатов тау из головного мозга субъекта, при этом указанный способ включает введение субъекту фармацевтической композиции в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения в условиях, эффективных для ускорения клиренса агрегатов тау из головного мозга субъекта. В соответствии с конкретными вариантами осуществления

агрегаты тау представляют собой нейрофибриллярные клубки или их патологические предшественники тау.

[00142] Настоящим изобретением также обеспечивается способ замедления прогрессирования поведенческого фенотипа, связанного с таупатологией, у субъекта, при этом указанный способ включает введение субъекту фармацевтической композиции в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения в условиях, эффективных для замедления прогрессирования поведенческого фенотипа, связанного с таупатологией, у субъекта.

[00143] В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения введение тау-пептида посредством введения фармацевтической композиции в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения индуцирует активный иммунный ответ у субъекта на тау-пептид и патологическую форму тау, тем самым содействуя клиренсу связанных агрегатов тау, замедляя прогрессирование поведения, связанного с таупатологией, и/или осуществляя лечение лежащей в основе таупатии. В соответствии с этим аспектом настоящего изобретения иммунный ответ включает развитие полезного гуморального (опосредованного антителами) ответа, направленного против тау-пептида, и клеточного (опосредованного антигенспецифическими Т-клетками или продуктами их секреции) ответа, направленного против распознаваемого Т-клетками эпитопа или иммуногенного носителя.

[00144] Как здесь используется, связанный с тау-патологией поведенческий фенотип включает, без ограничения, когнитивные нарушения, раннее изменение личности и растормаживание, апатию, абулию, мутизм, апраксию, персеверацию, стереотипные движения/поведение, гиперорализм, дезорганизацию, неспособность планировать или организовать последовательные задачи, эгоизм/черствость, антисоциальные черты, недостаток сочувствия, остановку, аграмматную речь с частыми парафазическими ошибками, но относительно сохраненным пониманием, нарушение понимания и затруднение в подборе слов, медленно прогрессирующую неустойчивость при походке, ретропульсии, замораживание, частые падения, не чувствительную к леводопе ригидность аксиальной мускулатуры, надъядерный парез взора, квадратно-волновые саккады, медленные вертикальные саккады, псевдобульбарный паралич, апраксию конечностей, дистонию, потеря корковой чувствительности и тремор.

[00145] При осуществлении способов по настоящему изобретению предпочтительно выбирать субъекта, имеющего или подверженного риску развития болезни Альцгеймера или другой таупатии, субъекта, имеющего агрегаты тау в головном мозге, или субъекта, проявляющего поведенческий фенотип, связанный с клубками, до введения иммуногенных пептидов или антител по настоящему изобретению. Субъекты, поддающиеся лечению, включают индивидуумов, подверженных риску развития заболевания, но не проявляющих симптомы, а также пациентов, в настоящий момент проявляющих симптомы. В случае болезни Альцгеймера практически любой человек подвержен риску страдания болезнью Альцгеймера. Следовательно, настоящие способы могут применяться профилактически к

общей популяции без необходимости какой-либо оценки риска у рассматриваемого пациента. Способы по настоящему изобретению особенно применимы для индивидуумов с известным генетическим риском развития болезни Альцгеймера. Такие индивидуумы включают индивидуумов, у которых есть родственники, которые перенесли заболевание, и индивидуумов, чей риск определяется путем анализа генетических или биохимических маркеров.

[00146] В случае бессимптомных пациентов лечение может начинаться в любом возрасте (например, 10, 20, 30 лет). Обычно, однако, нет необходимости начинать лечение, пока пациент не достигнет возраста 40, 50, 60 или 70 лет. Лечение, как правило, включает множество доз на протяжении определенного периода времени. Лечение можно контролировать с помощью анализа антител или активированных Т-клеточных или В-клеточных реакций на терапевтический агент с течением времени. Если реакция уменьшается, показана бустер-доза.

[00147] В случае профилактических применений фармацевтические композиции, содержащие тау-пептиды, вводят пациенту, восприимчивому или иным образом подверженному риску развития болезни Альцгеймера или другой таупатии, в количестве, достаточном для устранения или уменьшения риска, уменьшения тяжести или отсрочки начала заболевания, включая биохимические, гистологические и/или поведенческие симптомы заболевания, его осложнения и промежуточные патологические фенотипы, регистрируемые в ходе развития заболевания. В случае терапевтических применений фармацевтические композиции, содержащие тау-пептид, вводят пациенту, подозреваемому или уже страдающему таким заболеванием, в количестве, достаточном для излечения или, по меньшей мере, частичного подавления симптомов заболевания (биохимических, гистологических и/или поведенческих), включая его осложнения и промежуточные патологические фенотипы в ходе развития заболевания.

[00148] Эффективные дозы фармацевтической композиции по настоящему изобретению для профилактики и/или лечения нейродегенеративного заболевания, нарушения или состояния варьируют в зависимости от многих различных факторов, включая способ введения, место назначения, физиологическое состояние пациента, другие вводимые лекарственные средства и то, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Количество пептидов зависит от того, вводится ли адъювант, при этом в отсутствие адъюванта требуются более высокие дозы. Хронометраж инъекций может значительно варьироваться от одного раза в день до одного раза в год или одного раза в десятилетие. Типичная схема состоит из иммунизации с последующими повторными инъекциями с такими интервалами времени, как 6-недельные интервалы. Другая схема состоит из иммунизации с последующими повторными инъекциями спустя 1, 2, 6, 9 и 12 месяцев. Другая схема подразумевает инъекцию каждые два месяца до конца жизни. В качестве альтернативы, повторные инъекции могут быть нерегулярными, на что указывает мониторинг иммунного ответа.

[00149] Специалистам в данной области техники понятно, что схему для первичного

и повторных введений можно регулировать на основе определения иммунных ответов после введения. Например, бустер-композиции, как правило, вводят через недели или месяцы после введения первичной композиции, например, через 2-3 недели, или 4 недели, или 8 недель, или 16 недель, или 20 недель, или 24 недели, или 26 недель, или 28 недель, или 30 недель, или 32 недели, или 36 недель, или один-два года после введения первичной композиции.

[00150] Пептиды могут вводиться парентеральным, местным, внутривенным, пероральным, подкожным, внутриартериальным, внутричерепным, внутрибрюшинным, внутрикожным, интраназальным или внутримышечным способом для профилактического и/или терапевтического лечения. Наиболее типичным путем введения иммуногенного агента является подкожная или внутримышечная инъекция. Этот последний тип инъекции чаще всего выполняется в мышцы рук или ног.

[00151] В соответствии с конкретными аспектами может назначаться одна или более бустер-иммунизаций. Антигены в соответствующих первичной и бустерной композициях, однако используется множество бустерных композиций, необязательно должны быть идентичными, но должны иметь общие антигенные детерминанты или быть в существенной степени схожи друг с другом.

[00152] Композиция может, если желательно, быть представлена в наборе, упаковке или дозаторе, который может содержать одну или более стандартных лекарственных форм, содержащих активный ингредиент. Набор, например, может содержать металлическую фольгу или полимерную пленку, например блистерную упаковку. Набор, упаковка или дозатор могут сопровождаться инструкциями по введению.

[00153] В соответствии с конкретными вариантами осуществления набор содержит по меньшей мере одну из фармацевтической композиции, содержащей липосому в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения, и фармацевтической композиции, содержащей конъюгат в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения.

ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[00154] Настоящим изобретением также обеспечивается следующие неограничивающие варианты осуществления.

[00155] Вариант осуществления 1 представляет собой липосому, содержащую:

а. тау-пептид; и

б. эпитоп для Т-хелперов;

причем тау-пептид представлен на поверхности липосомы.

[00156] Вариант осуществления 2 представляет собой липосому по варианту осуществления 1, в которой тау-пептид представляет собой тау-фосфопептид.

[00157] Вариант осуществления 3 представляет собой липосому по варианту осуществления 1 или 2, дополнительно содержащую лиганд toll-подобного рецептора.

[00158] Вариант осуществления 4 представляет собой липосому по варианту осуществления 3, в которой лиганд toll-подобного рецептора включает по меньшей мере

один из лиганда toll-подобного рецептора 4 и лиганда toll-подобного рецептора 9.

[00159] Вариант осуществления 5 представляет собой липосому по варианту осуществления 3 или 4, в которой лиганд toll-подобного рецептора представляет собой лиганд toll-подобного рецептора 4.

[00160] Вариант осуществления 6 представляет собой липосому по варианту осуществления 5, в которой лиганд toll-подобного рецептора 4 включает монофосфориллипид А (MPLA).

[00161] Вариант осуществления 7 представляет собой липосому по варианту осуществления 3 или 4, в которой лиганд toll-подобного рецептора представляет собой лиганд toll-подобного рецептора 9.

[00162] Вариант осуществления 8 представляет собой липосому по варианту осуществления 7, в которой лиганд toll-подобного рецептора 9 включает липидированный CpG-олигонуклеотид.

[00163] Вариант осуществления 9 представляет собой липосому по варианту осуществления 1, содержащую:

- a. тау-пептид;
- b. эпитоп для Т-хелперов; и
- c. по меньшей мере один из
 - i. лиганда toll-подобного рецептора 9 и
 - ii. лиганда toll-подобного рецептора 4.

[00164] Вариант осуществления 10 представляет собой липосому по варианту осуществления 9, в которой тау-пептид представляет собой тау-фосфопептид.

[00165] Вариант осуществления 11 представляет собой липосому по варианту осуществления 9 или 10, в которой лиганд toll-подобного рецептора 9 представляет собой липидированный CpG-олигонуклеотид.

[00166] Вариант осуществления 12 представляет собой липосому по любому из вариантов осуществления 9-11, которая содержит лиганд toll-подобного рецептора 4 и лиганд toll-подобного рецептора 9.

[0167] Вариант осуществления 13 представляет собой липосому по варианту осуществления 12, в которой лиганд toll-подобного рецептора 4 включает монофосфориллипид А (MPLA).

[00168] Вариант осуществления 14 представляет собой липосому, содержащую:

- a. тау-фосфопептид;
 - b. эпитоп для Т-хелперов;
 - c. липидированный CpG-олигонуклеотид; и
 - d. адъювант, содержащий лиганд toll-подобного рецептора 4;
- причем тау-фосфопептид представлен на поверхности липосомы.

[00169] Вариант осуществления 15 представляет собой липосому по варианту осуществления 14, в которой лиганд toll-подобного рецептора 4 включает монофосфориллипид А (MPLA).

[00170] Вариант осуществления 16 представляет собой липосому по любому из вариантов осуществления 1-15, в которой эпитоп для Т-хелперов инкапсулирован в липосому.

[00171] Вариант осуществления 16а представляет собой липосому по любому из вариантов осуществления 1-15, в которой эпитоп для Т-хелперов включен в мембрану липосомы.

[00172] Вариант осуществления 16b представляет собой липосому по любому из вариантов осуществления 1-15, в которой эпитоп для Т-хелперов представлен на поверхности липосомы.

[00173] Вариант осуществления 17 представляет собой липосомную композицию, содержащую:

- a. тау-фосфопептид;
- b. эпитоп для Т-хелперов;
- c. липидированный CpG-олигонуклеотид; и
- d. монофосфориллипид А (MPLA);

причем тау-фосфопептид представлен на поверхности липосомы, а эпитоп для Т-хелперов инкапсулирован в липосому.

[00174] Вариант осуществления 17а представляет собой липосому по варианту осуществления 17, в которой MPLA представляет собой 3-О-деацил-4'-монофосфориллипид А, предпочтительно MPL™.

[00175] Вариант осуществления 17b представляет собой липосому по варианту осуществления 17, в которой MPLA представляет собой монофосфорилгексаациллипид А, 3-деацилилированный, предпочтительно 3D-(6-ацил)PHAD®.

[00176] Вариант осуществления 17с представляет собой липосому по варианту осуществления 17, в которой MPLA представляет собой монофосфорил-3-деациллипид А, предпочтительно 3D-PHAD®.

[00177] Вариант осуществления 18 представляет собой липосому по любому из вариантов осуществления 1-17с, дополнительно содержащую один или более липидов, выбранных из группы, состоящей из 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DMPC), 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфорил-3'-рац-глицерина (DMPG) и холестерина.

[00178] Вариант осуществления 19 представляет собой липосому по любому из вариантов осуществления 1-18, в которой тау-пептид имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:12 или на по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:12.

[00179] Вариант осуществления 19-1 представляет собой липосому по варианту осуществления 19, в которой тау-пептид представляет собой фосфопептид, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:1-3 и 5-12.

[00180] Вариант осуществления 19-2 представляет собой липосому по варианту

осуществления 19-1, в которой тау-фосфопептид включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1.

[00181] Вариант осуществления 19-3 представляет собой липосому по варианту осуществления 19-1, в которой тау-фосфопептид включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2.

[00182] Вариант осуществления 19-4 представляет собой липосому по варианту осуществления 19-1, в которой тау-фосфопептид включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3.

[00183] Вариант осуществления 19a представляет собой липосому по любому из вариантов осуществления 19, 19-1, 19-2, 19-3 и 19-4, в которой аминокислотная последовательность дополнительно содержит одну или более модификаций, чтобы позволить тау-пептиду быть представленным на поверхности липосомы.

[00184] Вариант осуществления 19b представляет собой липосому по варианту осуществления 19a, в которой одна или более модификаций включают, по меньшей мере, одну из пальмитоилирования и модификации с помощью додецила.

[00185] Вариант осуществления 19c представляет собой липосому по варианту осуществления 19a или 19b, в которой тау-пептид модифицирован на своем N-конце в результате одной или более модификаций.

[00186] Вариант осуществления 19d представляет собой липосому по любому из вариантов осуществления 19a-19c, в которой тау-пептид модифицирован на своем C-конце в результате одной или более модификаций.

[00187] Вариант осуществления 19e представляет собой липосому по варианту осуществления 19d, в которой тау-пептид пальмитоилирован как на своем N-конце, так и на своем C-конце.

[00188] Вариант осуществления 19f представляет собой липосому по любому из вариантов осуществления 19a-19e, в которой тау-пептид дополнительно содержит одну или более дополнительных аминокислот для содействия одной или более модификаций.

[00189] Вариант осуществления 19g представляет собой липосому по варианту осуществления 19f, в которой одна или более дополнительных аминокислот выбраны из группы, состоящей из Lys, Cys, Ser и Thr.

[00190] Вариант осуществления 19h представляет собой липосому по любому из вариантов осуществления 19-19g, в которой тау-пептид амидирован на своем C-конце.

[00191] Вариант осуществления 19i представляет собой липосому по любому из вариантов осуществления 19-19h, в которой тау-пептид состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:27-SEQ ID NO:38.

[0192] Вариант осуществления 19j представляет собой липосому по любому из вариантов осуществления 19-19i, в которой тау-пептид состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:27.

[00193] Вариант осуществления 19k представляет собой липосому по любому из вариантов осуществления 19-19i, в которой тау-пептид состоит из аминокислотной

последовательности SEQ ID NO:28.

[00194] Вариант осуществления 19i представляет собой липосому по любому из вариантов осуществления 19-19i, в которой тау-пептид состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:29.

[00195] Вариант осуществления 20 представляет собой липосому по любому из вариантов осуществления 1-19i, в которой эпитоп для Т-хелперов включает по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO:23-SEQ ID NO:26.

[00196] Вариант осуществления 20a представляет собой липосому по варианту осуществления 20, в которой эпитоп для Т-хелперов включает по меньшей мере две аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из: SEQ ID NO:23-SEQ ID NO:26.

[00197] Вариант осуществления 20b представляет собой липосому по варианту осуществления 20, в которой эпитоп для Т-хелперов включает по меньшей мере три аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из: от SEQ ID NO:23-SEQ ID NO:26.

[0198] Вариант осуществления 20c представляет собой липосому по варианту осуществления 20, в которой эпитоп для Т-хелперов включает четыре аминокислотные последовательности: SEQ ID NO:23-SEQ ID NO:26.

[00199] Вариант осуществления 20d представляет собой липосому по любому из вариантов осуществления 20a-20c, в которой две или более аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO:23-SEQ ID NO:26, ковалентно связаны с помощью линкера.

[00200] Вариант осуществления 20e представляет собой липосому по варианту осуществления 20d, в которой линкер включает одну или более аминокислот, выбранных из группы, состоящей из Val (V), Ala (A), Arg (R), Gly (G), Ser (S), Lys (K).

[0201] Вариант осуществления 20f представляет собой липосому по варианту осуществления 20e, в которой линкер включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из VVR, GS, RR и RK.

[00202] Вариант осуществления 20g представляет собой липосому по любому из вариантов осуществления 20-20f, в которой эпитоп для Т-хелперов является амидированным на своем С-конце.

[00203] Вариант осуществления 20h представляет собой липосому по любому из вариантов осуществления 20-20g, в которой эпитоп для Т-хелперов модифицирован для вставки в мембрану липосомы, представления на поверхности липосомы или инкапсуляции в липосому, в зависимости от предполагаемого расположения эпитопа для Т-хелперов.

[0204] Вариант осуществления 20i представляет собой липосому по любому из вариантов осуществления 20-20h, в которой эпитоп для Т-хелперов состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:13-SEQ ID NO:17.

[00205] Вариант осуществления. 20j представляет собой липосому по любому из вариантов осуществления 1-20i, которая содержит тау-пептид и эпитоп для Т-хелперов в весовом соотношении 6:1.

[00206] Вариант осуществления 20k представляет собой липосому по любому из вариантов осуществления 1-20i, которая содержит тау-пептид и эпитоп для Т-хелперов в весовом соотношении 5:1.

[00207] Вариант осуществления 20l представляет собой липосому по любому из вариантов осуществления 1-20i, которая содержит тау-пептид и эпитоп для Т-хелперов в весовом соотношении 4:1.

[00208] Вариант осуществления 20m представляет собой липосому по любому из вариантов осуществления 1-20i, которая содержит тау-пептид и эпитоп для Т-хелперов в весовом соотношении 3:1.

[00209] Вариант осуществления 20n представляет собой липосому по любому из вариантов осуществления 1-20i, которая содержит тау-пептид и эпитоп для Т-хелперов в весовом соотношении 2:1.

[0210] Вариант осуществления 20o представляет собой липосому по любому из вариантов осуществления 1-20i, которая содержит тау-пептид и эпитоп для Т-хелперов в весовом соотношении 1:1.

[00211] Вариант осуществления 21 представляет собой липосому по любому из вариантов осуществления 1-20o, в которой липидированный CpG-олигонуклеотид включает нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:18-SEQ ID NO:22.

[00212] Вариант осуществления 21a представляет собой липосому по варианту осуществления 21, в которой CpG-олигонуклеотид имеет одну или более фосфоротиоатных межнуклеотидных связей.

[00213] Вариант осуществления 21b представляет собой липосому по варианту осуществления 21a, в которой CpG-олигонуклеотид имеет все фосфоротиоатные межнуклеотидные связи.

[00214] Вариант осуществления 21c представляет собой липосому по любому из вариантов осуществления 21-21b, в которой липидированный CpG-олигонуклеотид включает CpG-олигонуклеотид, ковалентно связанный с по меньшей мере одной липофильной группой через линкер.

[00215] Вариант осуществления 21d представляет собой липосому по варианту осуществления 21c, в которой линкер содержит $(C_2H_4O)_n$, где n представляет собой целое число от 0 до 10.

[00216] Вариант осуществления 21e представляет собой липосому по варианту осуществления 21c, в которой линкер содержит алкильный спейсер, имеющий от 3 до 12 атомов углерода.

[0217] Вариант осуществления 21f представляет собой липосому по любому из вариантов осуществления 21-21e, в которой по меньшей мере одна липофильная группа

представляет собой холестерин.

[00218] Вариант осуществления 21g представляет собой липосому по любому из вариантов осуществления 21-21f, в которой липидированный CpG-олигонуклеотид включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:18 или SEQ ID NO:19, ковалентно связанную с молекулой холестерина через линкер, содержащий $(C_2H_4O)_n$, где n представляет собой целое число от 3 до 5.

[00219] Вариант осуществления 22 представляет собой липосому, содержащую:

a. тау-пептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:27-SEQ ID NO:38;

b. эпитоп для Т-хелперов, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:39-SEQ ID NO:44, предпочтительно эпитоп для Т-хелперов, состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:13-SEQ ID NO:17;

c. липидированный CpG-олигонуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:18-SEQ ID NO: 22, причем CpG-олигонуклеотид содержит одну или более фосфоротиоатных межнуклеотидных связей, и CpG-олигонуклеотид ковалентно связан с по меньшей мере одним холестерином через линкер; и

d. монофосфориллипид А (MPLA).

[00220] Вариант осуществления 22a представляет собой липосому по варианту осуществления 22, содержащую:

a. тау-фосфопептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28 или SEQ ID NO:29;

b. эпитоп для Т-хелперов, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:13

c. липидированный CpG-олигонуклеотид, состоящий из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:18 или SEQ ID NO:19, ковалентно связанный с холестерином через линкер, содержащий $(C_2H_4O)_n$, где n представляет собой целое число от 3 до 7; и

d. монофосфориллипид А (MPLA).

[00221] Вариант осуществления 22b представляет собой липосому по варианту осуществления 22 или 22a, в которой MPLA представляет собой 3-О-деацил-4'-монофосфориллипид А, предпочтительно MPLTM.

[00222] Вариант осуществления 22c представляет собой липосому по варианту осуществления 22 или 22a, в которой MPLA предпочтительно представляет собой 3D-(6-ацил)PHAD®.

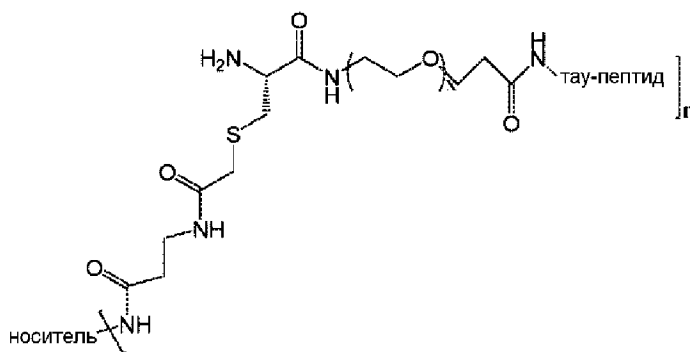
[00223] Вариант осуществления 22d представляет собой липосому по варианту осуществления 22 или 22a, в которой MPLA представляет собой предпочтительно 3D-PHAD®.

[00224] Вариант осуществления 23 представляет собой липосому по любому из

вариантов осуществления 22-22d, в которой эпитоп для Т-хелперов инкапсулирован в липосому.

[00225] Вариант осуществления 24 представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую липосому по любому из вариантов осуществления 1-23 и фармацевтически приемлемый носитель.

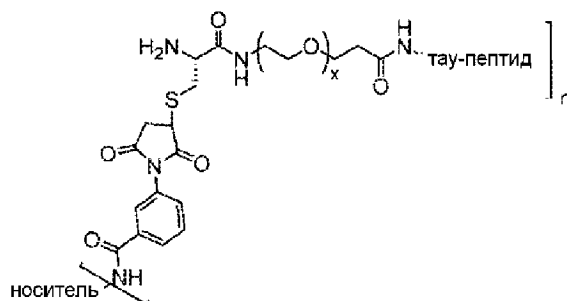
[00226] Вариант осуществления 25 представляет собой конъюгат, включающий тау-фосфопептид и иммуногенный носитель, конъюгированный с ним через линкер, имеющий следующую структуру:



где x представляет собой целое число от 0 до 10; и

n представляет собой целое число от 2 до 15.

[00227] Вариант осуществления 25a представляет собой конъюгат, включающий тау-фосфопептид и иммуногенный носитель, конъюгированный с ним через линкер, имеющий структуру формулы (II):



где x представляет собой целое число от 0 до 10; и

n представляет собой целое число от 2 до 15.

[00228] Вариант осуществления 26 представляет собой конъюгат по варианту осуществления 25 или 25a, в котором x представляет собой целое число от 2 до 6.

[00229] Вариант 27 осуществления представляет собой конъюгат по варианту осуществления 25 или 25a, в котором x равно 3.

[00230] Вариант осуществления 28 представляет собой конъюгат по любому из вариантов осуществления 25-25a, в котором n равно от 3 до 7.

[00231] Вариант осуществления 29 представляет собой конъюгат по любому из вариантов осуществления 25-28, в котором носитель представляет собой иммуногенный носитель, выбранный из группы, состоящей из гемоцианина лимфы улитки (KLH), столбнячного анатоксина, CRM197 и смеси белков наружной мембраны из *N. meningitidis*.

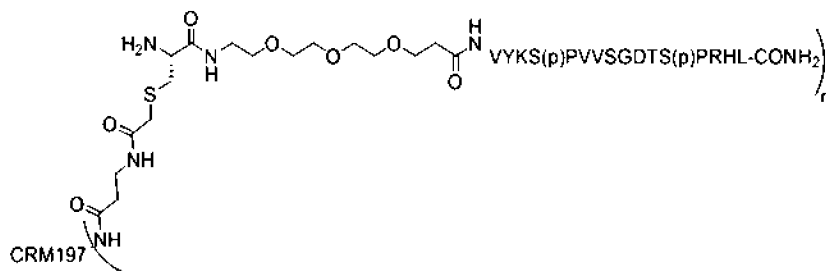
(ОМР) или их производного.

[00232] Вариант осуществления 30 представляет собой конъюгат по любому из вариантов осуществления 25-29, в котором тау-фосфопептид состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:12.

[00233] Вариант осуществления 30а представляет собой конъюгат по варианту осуществления 30, в котором тау-фосфопептид состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:3.

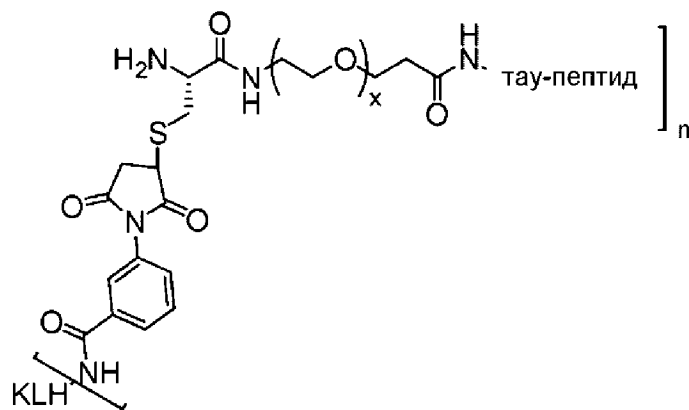
[00234] Вариант осуществления 31 представляет собой конъюгат по любому из вариантов осуществления 25-30, в котором носителем является CRM197

[00235] Вариант осуществления 32 представляет собой конъюгат по варианту осуществления 25, имеющий структуру:



где n равно 3-7.

[00236] Вариант осуществления 32а представляет собой конъюгат по варианту осуществления 25, который представляет собой KLN-[m-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидный эфир-цистеин-(C₂H₄O)_x-тау-пептид]_n



где тау-пептид состоит из SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:3;

x представляет собой целое число от 0 до 10; и

n представляет собой целое число от 2 до 15.

[00237] Вариант осуществления 33 представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую конъюгат любого из вариантов осуществления 25-32а и фармацевтически приемлемый носитель.

[00238] Вариант осуществления 33а представляет собой фармацевтическую композицию по п. 33, дополнительно содержащую адъювант.

[00239] Вариант осуществления 33b представляет собой фармацевтическую

композицию по п. 33, в которой адъювант включает по меньшей мере один из лиганда TLR-4 и лиганда TLR-9.

[00240] Вариант осуществления 34 представляет собой способ индукции иммунного ответа у субъекта, страдающего нейродегенеративным нарушением, включающий введение субъекту по меньшей мере одной из фармацевтических композиций по любому из вариантов осуществления 24 и 33-33b.

[0241] Вариант осуществления 35 представляет собой способ по варианту осуществления 34, включающий введение субъекту по меньшей мере одной из фармацевтических композиций по вариантам осуществления 24 и 33-33b для первичной иммунизации и введение субъекту по меньшей мере одной из фармацевтических композиций по вариантам осуществления 24 и 33-33b для бустер-иммунизации.

[00242] Вариант осуществления 36 представляет собой способ лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту по меньшей мере одной из фармацевтических композиций по варианту осуществления 24 или 33.

[00243] Вариант осуществления 37 представляет собой способ по варианту осуществления 36, включающий введение субъекту по меньшей мере одной из фармацевтических композиций по вариантам осуществления 24 и 33-33b для первичной иммунизации и введение субъекту по меньшей мере одной из фармацевтических композиций по вариантам осуществления 24 и 33-33b для бустер-иммунизации.

[00244] Вариант осуществления 38 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 34-37, в котором нейродегенеративное заболевание или нарушение вызвано или связано с образованием нейрофибриллярных патологических изменений.

[00245] Вариант осуществления 39 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 34-38, в котором нейродегенеративное заболевание или нарушение представляет собой болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Крейтцфельда-Якоба, деменцию боксеров, синдром Дауна, болезнь Герстмана-Штраусслера-Шейкнера, миозит с тельцами включения, прионный белок, церебральную амилоидную ангиопатию, черепно-мозговую травму, боковой амиотрофический склероз, паркинсонизм-деменцию - комплекс Гуама, негуаманскую болезнь двигательного нейрона с нейрофибриллярными клубками, деменцию, характеризующуюся появлением аргирофильных зерен, кортикобазальную дегенерацию, деменцию Леви, боковой амиотрофический склероз, диффузные нейрофибриллярные клубки с кальцификацией, лобно-височную деменцию, предпочтительно лобно-височную деменцию с паркинсонизмом, связанным с хромосомой 17 (FTDP-17), лобно-височную деменцию с поражением долей, болезнь Галлервордена-Шпатца, множественную системную атрофию, болезнь Ниманна-Пика типа C, болезнь Пика, прогрессирующий подкорковый глиоз, прогрессирующий надъядерный паралич, подострый склерозирующий панэнцефалит, деменцию с преобладанием нейрофибриллярных клубков, постэнцефалитический

паркинсонизм, миотоническую дистрофию, хроническую травматическую энцефалопатию (СТЕ), первичную возрастную таупатию (PART) или деменцию с тельцами Леви (LBD).

[00246] Вариант осуществления 40 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 34-39, в котором нейродегенеративное заболевание или нарушение представляет собой болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, синдром Дауна, прогрессирующий надъядерный паралич (PSP), лобно-височную деменцию и паркинсонизм, связанный с хромосомой 17 (FTDP-17), болезнь Пика, кортикобазальную дегенерацию, деменцию Леви, боковой амиотрофический склероз, миотоническую дисфазию, хроническую травматическую энцефалопатию (СТЕ), церебральную ангиопатию, первичную возрастную таупатию (PART) или деменция с тельцами Леви (LBD).

[00247] Вариант осуществления 40b представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 34-39, в котором нейродегенеративное заболевание или нарушение представляет собой болезнь Альцгеймера, прогрессирующий надъядерный паралич (PSP), лобно-височную деменцию и паркинсонизм, связанный с хромосомой 17 (FTDP-17), или болезнь Пика и PART (первичную возрастную таупатию).

[00248] Вариант осуществления 40c представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 34-39, в котором нейродегенеративное заболевание или нарушение представляет собой болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, синдром Дауна, лобно-височную деменцию и паркинсонизм, связанный с хромосомой 17 (FTDP-17), кортикобазальную дегенерацию, деменцию Леви, боковой амиотрофический склероз, миотоническую дисфазию, хроническую травматическую энцефалопатию (СТЕ), церебральную ангиопатию, первичную возрастную таупатию (PART) или деменция с тельцами Леви (LBD).

[00249] Вариант осуществления 41 представляет собой набор, содержащий по меньшей мере одну из фармацевтической композиции по варианту осуществления 24 и фармацевтической композиции по варианту осуществления 33, 33a или 33b.

[00250] Вариант осуществления 42 представляет собой эпитоп для Т-хелперов, состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:13-SEQ ID NO:17.

[00251] Вариант осуществления 43 представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую эпитоп для Т-хелперов по варианту осуществления 42.

[00252] Вариант осуществления 44 представляет собой способ усиления иммунного ответа на антиген у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту антигена вместе с фармацевтической композицией по варианту осуществления 43.

ПРИМЕРЫ

[00253] Следующие примеры настоящего изобретения служат для дополнительной иллюстрации сущности настоящего изобретения. Следует понимать, что следующие примеры не ограничивают настоящее изобретение, и что объем изобретения должен определяться прилагаемой формулой изобретения.

[00254] Экспериментальные методы, используемые в следующих примерах, если не указано иное, все являются обычными методами. Реагенты, используемые в следующих вариантах осуществления, если не указано иное, все закупаются у обычных поставщиков реагентов.

[00255] Пример 1. Приготовление вакцин на основе липосом

[00256] *Приготовление контрольной вакцины на основе липосомы (метод введения в этанол)*

[00257] Контрольную вакцину на основе липосомы получали методом введения в этанол этанола (EtOH) с последующей экструзией. Сначала DMPC (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Германия), DMPG (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Германия), холестерин (Dishman, Нидерланды) и MPLA (Avanti Polar Lipids, AL, США) солюбилизировали в молярном соотношении 9:1:7:0,05 в смеси EtOH и трет-бутанола (t-BuOH) в объемном соотношении 20:1 при 60°C. Раствор липида в этаноле разбавляли в фосфатно-солевом буфере (PBS) pH 7,4 при 60°C с установлением 10% концентрации EtOH, и это приводило к образованию многослойных везикул липосом (MLV). MLV затем подвергали 5 последовательным пропускam в ходе экструзии через три поликарбонатных фильтра (Whatman) с размером пор 0,08 мкм последовательно с использованием Emulsiflex-C5 (Avestin, Канада). Полученные липосомы разбавляли в PBS pH 7,4 и нагревали до 60°C с получением раствора липосом перед добавлением тау-пептида.

[00258] Ацетат тетрапальмитоилированного фосфорилированного тау-пептида SEQ ID NO:2 (Bachem AG, Швейцария), называемый здесь активным фармацевтическим ингредиентом (API), растворяли в PBS при pH 11,4 с 2,0% октил-β-D-глюкопиранозида (Sigma-Aldrich, США) до концентрации 1 мг/мл, и раствор пептида вводили в раствор липосом при 60°C с последующим перемешиванием в течение 30 минут при 60°C. Концентрирование осуществляли посредством ультрафильтрации до целевого конечного объема, и замену буфера осуществляли 10 раз с использованием PBS pH 7,4 во время диалитической ультрафильтрации. Полученные липосомы с API, представленным на поверхности липосом, затем подвергали стерилизации фильтрованием, последовательно пропуская через два поликарбонатных шприцевых фильтра с размером пор 0,2 мкм, и конечный продукт хранили при 5°C.

[00259] *Приготовление вакцин на основе липосом X, Y, Z и Z⁺*

[00260] Вакцины на основе липосом X и Y получали с использованием технологии тонких липидных пленок с последующей гомогенизацией и экструзией.

[00261] Вакцины на основе липосомы Z⁺ с конечной концентрацией API, составляющей 1200 мкг/мл, и конечной концентрацией T50, составляющей 1200 мкг/мл, получали методом введения в этанол с последующей экструзией, а вакцины на основе липосомы Z с конечной концентрацией API, составляющей 400 мкг/мл, и конечной концентрации T50, составляющей 100 мкг/мл, получали с помощью технологии тонких липидных пленок с последующей гомогенизацией и экструзией.

[00262] Вакцины на основе липосомы Z⁺⁺ с конечной концентрацией API,

составляющей 400 мкг/мл, и конечной концентрацией T50, составляющей 400 мкг/мл, получали с помощью технологии тонких липидных пленок с последующей гомогенизацией и экструзией.

[00263] Вакцины на основе липосомы Z^{+++} с конечной концентрацией API, составляющей 1200 мкг/мл, и конечной концентрацией T50, составляющей 300 мкг/мл, получали методом введения в этанол с последующей экструзией.

[00264] *Приготовление вакцин на основе липосом X, Y, Z и Z^{++} методом тонких липидных пленок.*

[00265] Вакцины на основе липосом X, Y, Z и Z^{++} получали с помощью технологии тонких липидных пленок с последующей гомогенизацией и экструзией. Сначала DMPC (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Германия), DMPG (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Германия), холестерин (Dishman, Нидерланды) и монофосфорилгексаацил-липид A 3-деацилированный синтетический (3D-(6-ацил)PHAD®) (Avanti Polar Lipids, AL, США) солюбилизировали в молярном соотношении 9:1:7:0,05 в EtOH при 60°C, за исключением липосомы Y, которая не содержала 3D-(6-ацил) PHAD®. Этанол выпаривали в вакууме в роторном испарителе с получением тонкой липидной пленки.

[00266] Липидную пленку регидратировали с использованием PBS pH 7,4, 5% DMSO (все Sigma-Aldrich), содержащего 0,15 мг/мл пептида T50 (Peptides & Elephants, Германия). Образец осторожно перемешивали в течение 15 минут и дополнительно энергично встряхивали для растворения тонкой липидной пленки. Получающиеся в результате многослойные везикулы подвергали 10 циклам замораживания-оттаивания (жидкий N_2 и водяная баня при 37°C) и подвергали гомогенизации с последующей последовательной экструзией через поликарбонатные мембраны (Whatman, Великобритания) с размером пор 0,08 мкм. Стадии гомогенизации, и экструзии выполняли в EmulsiFlex-C5 (Avestin, Канада). Экструдированные липосомы с инкапсулированным пептидом T50 концентрировали путем ультрафильтрации, и заменяли буфер на PBS pH 7,4 путем диализа. Полученные липосомы разбавляли в PBS pH 7,4 и нагревали до 60°C с получением раствора липосом перед добавлением тау-пептида и адьюванта.

[00267] CpG2006-холестерин (CpG2006-Chol) (Microsynth, Швейцария) представляет собой ДНК-олигонуклеотид со всеми межнуклеотидными связями в виде тиофосфата, который модифицирован на 5'-конце молекулой холестерина через фосфатную связь посредством спейсера, включающего PEG. CpG2006-холестерин (CpG2006-Chol) (Microsynth, Швейцария) растворяли в PBS pH 7,4 до 1 мг/мл и вводили в растворы липосом (за исключением липосомы X, которая не содержит CpG2006-Chol) с последующей инкубацией в течение 15 минут перед вставкой API.

[00268] API (Bachem AG, Швейцария) растворяли в PBS pH 11,4 с 2% октил-β-D-глюкопиранозидом (Sigma-Aldrich, США) до концентрации 1 мг/мл, и раствор пептида вливали в раствор липосом при 60°C с последующим перемешиванием в течение 30 мин при 60°C. Концентрирование проводили посредством ультрафильтрации для получения целевого значения (400 мкг/мл API и 100 мкг/мл T50 для липосомы X, Y, Z; и 400 мкг/мл

API и 400 мкг/мл T50 для липосомы Z^{++}), и замену буфера осуществляли 10 раз с использованием PBS pH 7,4 во время диафильтрации. Полученные липосомы с API, представленным на поверхности липосом, затем подвергали стерилизации фильтрованием, пропуская через 0,2 мкм поликарбонатные шприцевые фильтры, и конечный продукт хранили при 5°C.

[00269] *Получение липосомы O методом введения в этанол*

[00270] Вакцину на основе липосомы O получали методом введения в этанол (EtOH) с последующей экструзией. Сначала DMPC (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Германия), DMPG (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Германия), холестерин (Dishman, Нидерланды) и MPLA (Avanti Polar Lipids, AL, США) солюбилизировали в молярном соотношении 9:1:7:0,05 в смеси EtOH и трет-бутанола (t-BuOH) в объемном соотношении 20:1 при 60°C. Раствор липида в этаноле разбавляли в фосфатно-солевом буфере (PBS) pH 7,4 при 60°C с установлением 10% концентрации EtOH, и это приводило к образованию многослойных везикул липосом (MLV). MLV затем подвергали 5 последовательным пропускam в ходе экструзии через три поликарбонатных фильтра (Whatman) с размером пор 0,08 мкм последовательно с использованием Emulsiflex-C5 (Avestin, Канада). Полученные липосомы разбавляли в PBS pH 7,4 и нагревали до 60°C с получением раствора липосом перед добавлением тау-пептида.

[00271] Пептид T46 (Pepscan, Нидерланды) растворяли в PBS pH 7,4 до 1 мг/мл и вливали в растворы липосом с последующей инкубацией в течение 15 минут перед введением API.

[00272] API (Bachem, Швейцария) растворяли в PBS pH 11,4 с 2% октил- β -D-глюкопиранозидом (Sigma-Aldrich, США) с получением концентрации 1 мг/мл, и раствор пептида вливали в раствор липосом при 60°C с последующим перемешиванием в течение 30 мин при 60°C. Концентрирование осуществляли с помощью ультрафильтрации для получения целевого значения (400 мкг/мл API и 100 мкг/мл T46), и замену буфера проводили 10 раз с использованием PBS pH 7,4 во время диафильтрации. Полученные липосомы с API, представленным на поверхности липосом, затем подвергали стерилизации фильтрованием, пропуская через 0,2 мкм поликарбонатные шприцевые фильтры, и конечный продукт хранили при 5°C.

[00273] *Получение вакцин на основе липосомы Z^+ и липосомы Z^{+++} путем введения в этанол*

[00274] Вакцины на основе липосомы Z^+ и липосомы Z^{+++} получали с использованием процесса на основе введения в этанол. Сначала DMPC (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Германия), DMPG (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Германия), холестерин (Dishman, Нидерланды) и 3D-(6-ацил)PHAD® (Avanti Polar Lipids, AL, США) солюбилизировали в молярном соотношении приблизительно 9:1:7:0,04 в EtOH при 60°C. Пептид T50 (Bachem AG, Швейцария) растворяли в 10 mM His/270 mM сахарозе (pH 5,8-6,0). Затем раствор липида в этаноле вливали в раствор, содержащий пептид T50, и осторожно перемешивали в течение 15 минут, что приводило к образованию многослойных

везикул (MLV). MLV подвергали гомогенизации (6 раз в случае липосомы Z^+ и без гомогенизации в случае липосомы Z^{+++}) с последующей последовательной экструзией через поликарбонатные мембраны (Whatman, Великобритания) с размером пор 0,08 мкм (5 пропусков в случае липосомы Z^+ , 3-5 раз в случае липосомы Z^{+++}). Стадии гомогенизации, и экструзии выполняли в EmulsiFlex-C5 (Avestin, Канада) для липосомы Z^+ . Экструзию липосомы Z^{+++} проводили с использованием экструдера с фильтром LIPEX. Экструдированные липосомы концентрировали с помощью ультрафильтрации, и буфер заменяли на 20 mM His/145 mM NaCl pH 7,4 путем диафильтрации. Полученные липосомы с инкапсулированным пептидом T50 разводили в 20 mM His/145 mM NaCl pH 7,4 и нагревали до 60°C для получения раствора липосом перед добавлением API и адъюванта.

[00275] CpG2006-Chol (Microsynth, Швейцария для липосомы Z^+ ; Avecia, США для липосомы Z^{+++}) растворяли в 20 mM His/145 mM NaCl pH 7,4 до 1 мг/мл и вливали в раствор липосом с последующей инкубацией в течение 15 минут перед введением API.

[00276] API (Bachem AG, Швейцария) растворяли в карбонатном буфере pH 10,2 с 1% октил- β -D-глюкопиранозидом (Sigma-Aldrich, США) с получением концентрации 1 мг/мл, и раствор пептида вливали в раствор липосомы Z^+ при 60°C с последующим перемешиванием в течение 30 мин при 60°C. Раствор пептида смешивали с раствором липосомы Z^+ с использованием T-Line Mixing при 60°C с последующим перемешиванием в течение 30 минут при 60°C. Концентрирование осуществляли посредством ультрафильтрации для получения целевого значения (1200 мкг/мл API и 1200 мкг/мл T50 для липосомы Z^+ ; и 1200 мкг/мл API и 300 мкг/мл T50 для липосомы Z^{+++}), и замену буфера проводили 10 раз с использованием 10 mM His/270 mM сахарозы pH 6,5 во время диафильтрации. Полученные липосомы Z^+ с API, представленным на поверхности липосом, и полученные липосомы Z^{+++} с API, представленным на поверхности липосом, затем подвергали стерилизации фильтрованием, пропуская через 0,2 мкм поликарбонатные шприцевые фильтры, и конечный продукт хранили при 5°C.

[00277] *Получение вакцин на основе липосом L, M и N*

[00278] Вакцины на основе липосом L, M и N получали с помощью технологии тонких липидных пленок с последующей гомогенизацией и экструзией. Сначала DMPC (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Германия), DMPG (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Германия), холестерин (Dishman, Нидерланды) и MPLA (Avanti Polar Lipids, AL, США) сольбилизировали в молярном соотношении 9:1:7:0,05 в EtOH при 60°C. Этанол выпаривали в вакууме в ротаторном испарителе с получением тонкой липидной пленки.

[00279] Липидную пленку регидратировали с использованием PBS pH 7,4, 5% DMSO (все Sigma-Aldrich), содержащего либо:

- 0,15 мг/мл пептида T48 (Peptides & Elephants, Германия) - для липосомы M; или
- 0,13 мг/мл пептида T50 (Peptides & Elephants, Германия) - для липосомы L; или
- 0,15 мг/мл пептида T52 (Peptides & Elephants, Germany) - для липосомы N.

[00280] Образец осторожно перемешивали в течение 15 минут и дополнительно энергично встряхивали для растворения тонкой липидной пленки. Получающиеся в

результате многослойные везикулы подвергали 10 циклам замораживания-оттаивания (жидкий N₂ и водяная баня при 37°C) и подвергали гомогенизации с последующей последовательной экструзией через поликарбонатные мембраны (Whatman, Великобритания) с размером пор 0,08 мкм. Стадии и гомогенизации, и экструзии выполняли в EmulsiFlex-C5 (Avestin, Канада). Экструдированные липосомы концентрировали путем ультрафильтрации, и заменяли буфер на PBS pH 7,4 путем диафильтрации. Полученные липосомы с инкапсулированным пептидом T48, T50 или T52 разбавляли в PBS pH 7,4 и нагревали до 60°C с получением раствора липосом перед добавлением тау-пептида.

[00281] API (Bachem AG, Швейцария) растворяли в PBS pH 11,4 с 2% октил-β-D-глюкопиранозидом (Sigma-Aldrich, США) с получением концентрации 1 мг/мл, и раствор пептида вливали в раствор липосом при 60°C с последующим перемешиванием в течение 30 мин при 60°C. Концентрирование осуществляли посредством ультрафильтрации для получения целевого значения (400 мкг/мл API и 100 мкг/мл T48, T50 или T52), и 10 раз проводили замену буфера на PBS pH 7,4 во время диафильтрации. Полученные липосомы с API, представленным на поверхности липосом, затем подвергали стерилизации фильтрованием, пропуская через 0,2 мкм поликарбонатные шприцевые фильтры, и конечный продукт хранили при 5°C.

[00282] *Получение вакцин на основе липосом R, S и T*

[00283] Вакцины на основе липосом R, S и T получали с использованием процесса на основе введения в этанол с последующей экструзией. Сначала DMPC (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Германия), DMPG (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Германия), холестерин (Dishman, Нидерланды) и 3D-(6-ацил)PHAD® (Avanti Polar Lipids, AL, США) солюбилизировали в молярном соотношении 9:1:7:0,04 в EtOH при 60°C. Для липосом R и T вышеуказанный раствор липидов в этаноле смешивали с 10 mM гистидином pH 5,8, дополненным 270 mM сахарозой, для достижения 10% концентрации растворителя (EtOH) и затем инкубировали в течение 30 минут при 60°C. Для липосомы S пептид T50 (Bachem AG, Швейцария) растворяли в 10 mM His/270 mM сахарозе (pH 5,8-6,0). Смеси буфер-липиды, относящиеся к липосомам R, S и T, осторожно перемешивали в течение 15 минут, что приводило к образованию многослойных везикул (MLV). Полученные в результате многослойные везикулы подвергали экструзии через поликарбонатные мембраны (Whatman, Великобритания) с размером пор 0,08 мкм (5X) в системе высокого давления EmulsiFlex-C5 (Avestin, Канада).

[00284] Экструдированные липосомы концентрировали с помощью ультрафильтрации, и буфер заменяли на 20 mM His/145 mM NaCl pH 7,4 путем диафильтрации. Полученные липосомы с инкапсулированным T50 в случае липосомы S и полученные липосомы R и T дополнительно разбавляли в 20 mM His/145 mM NaCl pH 7,4 и нагревали до 60°C для получения раствора липосом перед добавлением API и T57 в случае липосомы T.

[00285] В случае липосомы T T57 растворяли до 1 мг/мл в 1% октил-β-D-

глюкопиранозиде (Sigma-Aldrich, США) в деионизированной дистиллированной воде и вводили в липосому с последующей инкубацией в течение 15 минут при 60°C перед введением API.

[00286] API (Bachem AG, Швейцария) растворяли в карбонатном буфере pH 10,2 с 1% октил- β -D-глюкопиранозидом (Sigma-Aldrich, США) с получением концентрации 1 мг/мл, и раствор пептида вносили в раствор липосом при 60°C с последующим перемешиванием в течение 30 мин при 60°C. Концентрирование осуществляли посредством ультрафильтрации для получения следующего целевого значения:

- 1200 мкг/мл API для липосомы R;
- 1200 мкг/мл API и 300 мкг/мл T50 для липосомы S; и
- 1200 мкг/мл API и 300 мкг/мл T57 для липосомы T;

[00287] Замену буфера осуществляли 10 раз с использованием 10 mM His/270 mM сахарозы pH 6,5 во время диафильтрации. Полученные липосомы с API, представленным на поверхности липосом, затем подвергали стерилизации фильтрованием, пропуская через 0,2 мкм поликарбонатные шприцевые фильтры, и конечный продукт хранили при 5°C.

[00288] Пример 2. Получение вакцины на основе конъюгата

[00289] *Пептиды и адъюванты*

[00290] Последовательности двух полифосфорилированных пептидных эпитопов (TAUVAC-p7.1 и TAUVAC-p22.1, которые имеют три и две фосфорилированные аминокислоты, соответственно), улучшали путем оптимизации длины таким образом, чтобы они могли лучше связываться с поверхностным иммуноглобулином В-клеток, и чтобы последовательности не содержали эпитопы, которые согласно предсказаниям связываются с молекулами HLA класса IA, B и C человека с высокой аффинностью. Последний критерий был важен, чтобы избежать индукции цитотоксической CD8⁺ Т-клеточной реакции на тау, которая потенциально может вызвать значительное повреждение нейронов. Используя инструмент для предсказания Т-клеточных эпитопов из базы данных иммунных эпитопов и ресурсы для анализа, в пептиде TAUVAC-p7.1 не выявлены предсказываемые эпитопы, способных связываться с молекулами HLA класса IA, B, C и HLA класса II человека с высокой аффинностью, в то время как было предсказано, что пептид TAUVAC-p22.1 содержит эпитопы, связывающиеся с молекулами HLA класса II DQ и DR со средней/высокой аффинностью (не представленные данные).

[00291] Фосфорилированные тау-пептиды (SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3), использованные в этом исследовании, получали синтетически (Pepscan, NL) с добавлением остатков фосфорной кислоты во время синтеза. Конъюгат, включающий фосфорилированный тау-пептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:3, ковалентно связанный с носителем KLN через линкер, здесь обозначается как конъюгат В или конъюгат С, соответственно. Конъюгат, включающий фосфорилированный тау-пептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2, ковалентно связанный с носителем CRM через линкер, здесь обозначается как конъюгат А.

[00292] Для получения конъюгатов В и С вакцинные пептиды конъюгировали с белком-носителем KLN через линкер в виде м-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидного эфира (MBS) и дополнительный цистеин на N-конце пептида. Несвязанный пептид удаляли с использованием колонки с Sephadex G25 перед концентрированием конъюгата. Конъюгаты перед инъекцией смешивали или с сильным многокомпонентным адъювантом (Sigma Adjuvant System, Sigma-Aldrich), или с однокомпонентным депо-адъювантом (гидроксидом алюминия, Alhydrogel®, Invivogen) в соответствии с инструкциями производителя.

[00293] Вакцинные пептиды конъюгировали с белком-носителем CRM197 через линкер в виде полиэтиленгликоль(PEG)-цистеин-ацетамидопропионамида. Фосфорилированный тау-пептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2, получали синтетически (Polypeptide Laboratories SAS) с добавлением остатков фосфорной кислоты и спейсера PEG3 во время синтеза. Конъюгат А получали путем конъюгирования белка-носителя CRM197 через линкер в виде сукцинимидил-3-(бромацетамид)пропионата (SBAP) с цистеином на N-конце пептида. SBAP лигировали с первичными аминами белка CRM197 (-NH₂) посредством химии реакции с активированным NHS-эфиром сшивающим агентом. Избыток линкера в виде SBAP удаляли с использованием ультрафильтрации и диафильтрации (UF/DF). Промежуточное соединение CRM197-SBAP конъюгировали с фосфорилированным тау-пептидом, и после завершения реакции реакцию конъюгации прекращали добавлением избыточного количества L-цистина для гашения реакции. Неочищенный конъюгированный продукт CRM197-пептид очищали с использованием хроматографической колонки Capto Q ImpRes (GE Healthcare) и элюировали с использованием изократического в отношении содержания соли метода. Очищенный продукт CRM197-пептид затем вводили в состав 20 mM Трис, 250 mM сахарозы, pH 8,1 до концентрации 0,5 мг/мл с использованием ультрафильтрации/диафильтрации. Лекарственное вещество (DS) CRM197-тау-пептид получали добавлением основного буфера 10% PS80 для достижения конечной концентрации=0,01% PS80. Раствор тщательно перемешивали перед фильтрованием.

[00294] Пример 3: Индуцированные вакциной антитела класса IgG, специфические для тау-пептида.

[00295] Все эксперименты на животных были разрешены и проведены в соответствии с местным законодательством об экспериментах на животных. Макак-резусов (*Macaca mulatta*) получали из Kunming Biomed International Ltd, Китай, Yunnan Yinmore Bio-Tech Co. LTD, Китай и Yunnan Laboratory Primates Inc., Китай. Животным было от двух до пяти лет в начале иммунизации, и их минимальный вес составлял 2,5 кг. Детальное клиническое обследование проводили до начала лечения и еженедельно после него. Кроме того, макак наблюдали дважды в день, и регистрировали клинические признаки.

[00296] Взрослых макак-резусов (n=3 самца и 3 самки в каждой группе) иммунизировали подкожно с использованием 1800 мкг ацетата тетрапальмитоилированного фосфорилированного тау-пептида SEQ ID NO:2 на дозу

контрольной вакцины на основе липосомы (липосомы с тетрапальмитоилированным фосфорилированным тау-пептидом SEQ ID NO:2 и MPLA) или вакцины на основе липосомы в соответствии с вариантом осуществления настоящей заявки, например липосомы Z (липосомы с тетрапальмитоилированным фосфорилированным тау-пептидом SEQ ID NO:2, 3D-(6-ацил)PHAD®, липидированным CpG-олигонуклеотидом CpG 2006 и распознаваемым Т-клетками пептидом T50) или 15 мкг на дозу вакцины на основе конъюгата в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения (например, конъюгата А, фосфорилированного тау-пептида SEQ ID NO:2, связанного с CRM197), вводимой вместе с квасцами и CpG-олигонуклеотидом CpG 2006 в дни 1, 29 и 85. Спуски крови выполняли до иммунизации и в дни 8, 22, 36, 50, 64, 78, 92, 106, 120, 134 и 148, и выделяли сыворотки.

[00297] Титры специфических антител класса IgG определяли с помощью ELISA, используя фосфорилированный тау-пептид SEQ ID NO:2 в качестве антигена для покрытия. Сыворотку от отдельной иммунизированной обезьяны последовательно разводили в буфере для анализа (PBS, 0,05% Tween 20, 1% BSA) и вносили в 96-луночные планшеты, которые были покрыты соответствующим пептидом. После двухчасовой инкубации образцы удаляли, и планшеты промывали в PBST (PBS, 0,05% Tween 20). Антитела детектировали с использованием конъюгированного с HRP антиобезьяньего IgG (KPL), а затем субстрата ABTS (Roche). Все образцы проверяли в восьми двукратных разведениях, с положительным и отрицательным контрольными образцами, включенными в каждый планшет. Данные представляли в виде среднего геометрического значения конечных точек титрования (последнего разведения сыворотки, показывающего положительную реакцию) для каждой группы.

[00298] Как показано на фиг. 4, и вакцина на основе липосомы Z, и конъюгат А индуцировали более высокие титры фосфопептид-специфических антител класса IgG по сравнению с контрольной вакциной на основе липосомы.

[00299] Пример 4: Индуцированные вакциной антитела, специфические для патологических структур тау в головном мозге человека.

[00300] Все ткани головного мозга были получены из Netherlands Brain Bank (NBB) и собраны от доноров после подписания информированного согласия на аутопсию головного мозга и использование образцов, а также клинической информации о них для исследовательских целей. Использовали парафиновые срезы головного мозга от контролей без деменции (здоровых), доноров с болезнью Альцгеймера (AD), лобно-височной деменцией с тау-патологией (FTD-tau), болезнью Пика, первичной возрастной таупатией (PART) и прогрессирующим надъядерным параличом (PSP). Области головного мозга включали теменную кору, среднюю лобную извилину, гиппокамп или хвостатое ядро.

[00301] В частности, фиксированные формалином залитые в парафин срезы теменной коры от контрольного являющегося человеком субъекта (здорового) и являющегося человеком субъекта, страдающего болезнью Альцгеймера (AD Braak V/VI), окрашивали постиммунной сывороткой макака, разведенной 1:100 в стандартном разбавителе для

антител (иммунологическом). Затем срезы промывали и окрашивали козым антиобезьяньим антителом, конъюгированным с HRP (Abcam). В конце концов, окрашивание визуализировали с использованием 3,3'-диаминобензида (DAB; Dako), который оставляет коричневое специфическое пятно в присутствии пероксидазы хрена (HRP). Предметные стекла контрастировали с использованием гематоксилина, обезживали и заливали гистологической средой Quick D (Klinipath). Снимки были сделаны с помощью микроскопа Leica DC500.

[00302] Результаты на фиг. 5 показывают, что постиммунные сыворотки макак-резусов, иммунизированных липосомой Z (липосомой с тетрапальмитоилированным фосфорилированным тау-пептидом SEQ ID NO:2, 3D-(6-ацил)PHAD®, липидированным CpG-олигонуклеотидом CpG 2006 и распознаваемым Т-клетками пептидом T50) окрашивали патологические структуры тау в срезах головного мозга человека. Сыворотку собирали у макак-резусов в день 106 после первичной иммунизации улучшенными липосомами. Этого макака иммунизировали трижды за 0, 1 и 3 месяца до сбора сыворотки. На левой панели (AD Braak V/VI) показано окрашивание теменной коры от донора Braak стадии V. Стрелки указывают на окрашивание клубков тау. Правая (здоровый донор) панель показывает окрашивание теменной коры от донора Braak стадии 0. Сыворотку наносили на срезы в разведении 1:100 с последующим добавлением козьего антиобезьяньего антитела в разведении 1:100, и окрашивание визуализировали с использованием проявителя DAB.

[00303] Результаты на фиг. 6 показывают, что сыворотка макак-резусов, иммунизированных конъюгатом А, который содержит фосфорилированный тау-пептид SEQ ID NO:2 плюс растворимый CpG и гидроксид алюминия, связывается с патологическими структурами тау в срезах головного мозга человека с болезнью Альцгеймера (AD). Сыворотку собирали в день 106 после первичной иммунизации вакциной на основе конъюгата с CRM. Этих макак иммунизировали трижды за 0, 1 и 3 месяца до сбора сыворотки. Верхние (AD) панели показывают окрашивание теменной коры, включая тау-клубки, от донора Braak стадии V. Нижние (CTRL) панели показывают окрашивание теменной коры от донора Braak стадии 0. Сыворотку наносили на срезы в разведении 1:100 с последующим добавлением козьего антиобезьяньего антитела в разведении 1:100, и окрашивание визуализировали с использованием проявителя DAB.

[00304] Пример 5. Вакцины на основе липосом с одним или двумя адъювантами

[00305] Добавление двух адъювантов в улучшенную вакцину на основе липосомы увеличивает уровень титров специфических для тау-фосфопептида антител класса IgG, а также постоянство гуморального ответа между индивидуумами.

[00306] Взрослых макак-резусов (n=3 самца и 3 самки в каждой группе) иммунизировали подкожно в дни 1, 29, 85 и 169 с использованием 1800 мкг ацетата тетрапальмитоилированного фосфорилированного тау-пептида SEQ ID NO:2 на дозу контрольной вакцины на основе липосомы или улучшенной вакцины на основе липосомы с инкапсулированным, распознаваемым Т-клетками эпитопом T50, содержащей или только

адъювант 3D-(6-ацил)PHAD® (липосомы X, фиг. 7A), только адъювант липидированный олигонуклеотид CpG 2006 (липосомы Y, фиг. 7B), или как 3D-(6-ацил)PHAD®, так и липидированный олигонуклеотид CpG 2006 в качестве адъювантов (липосомы Z, фиг. 7C). Спуски крови выполняли до иммунизации и в дни 8, 22, 36, 50, 64, 78, 92, 106, 120, 134, 148, 162, 176 и 190, и выделяли сыворотки. Титры специфических антител класса IgG в сыворотках определяли с помощью ELISA, используя фосфорилированный тау-пептид SEQ ID NO: 2 в качестве антигена для покрытия и второе антитело против обезьяньего IgG. Полученные уровни антител представлены в виде конечных точек титрования (последнего разведения сыворотки, показывающего положительную реакцию) для каждой отдельной обезьяны с течением времени. Каждая группа иммунизации представлена на одной панели (фиг. 7A-C). Среднее геометрическое значение конечных точек титрования для каждой группы $\pm$ 95% доверительный интервал представлено на фиг. 7D. Таким образом, на фиг. 7A-D показано, что включение двух адъювантов в вакцину на основе липосомы, содержащей инкапсулированный T50, улучшало уровень и постоянство гуморального ответа на тау-фосфопептид, что приводило к меньшей вариабельности гуморального ответа у отдельных обезьян. Конкретнее, как показано на фиг. 7D, улучшенные вакцины на основе липосом с фосфорилированным тау-пептидом SEQ ID NO:2, распознаваемым Т-клетками эпитоп T50 (липосомы X, Y и Z) и 1 или 2 адъювантами индуцировали более высокие титры антител против тау-фосфопептида, чем контрольная вакцина на основе липосомы без распознаваемого Т-клетками эпитопа. Все обезьяны отвечали при введении каждой из улучшенных вакцин на основе липосом, тогда как 4 из 6 животных отвечали на контрольную вакцину на основе липосомы.

[00307] Пример 6. Индуцированные вакциной антитела, специфические для обогащенных спаренных спиральных нитей (ePHF).

[00308] Группы макак-резусов (n=3 самца и 3 самки в каждой группе) иммунизировали подкожно путем вакцинации в день 1 и день 29 с использованием (i) улучшенной вакциной на основе липосомы, содержащей распознаваемый Т-клетками эпитоп T50 и только адъювант 3D-(6-ацил)PHAD® (липосомы X), (ii) улучшенной вакциной на основе липосомы, содержащей распознаваемый Т-клетками эпитоп T50 и только адъювант липидированный CpG 2006 (липосомы Y), (iii) улучшенной вакциной на основе липосомы, содержащей распознаваемый Т-клетками эпитоп T50 и два адъюванта (3D-(6-ацил)PHAD® и липидированный CpG 2006, липосомы Z) или (iv) вакциной на основе конъюгата (фосфорилированного тау-пептида SEQ ID NO:2, связанного с CRM197), вводимой вместе с квасцами и CpG-олигонуклеотидом CpG 2006 (конъюгата A).

[00309] Препараты обогащенных спаренных спиральных нитей (ePHF) получали из тканей головного мозга после смерти пациентов с гистологически подтвержденной AD путем саркозильной экстракции нерастворимых тау, используя модифицированный метод Greenberg и Davies (Greenberg and Davies, 1991, Proc Natl Acad Sci USA, 87 (15):5827-31). Титры антител, специфических для обогащенных спаренных спиральных нитей (ePHF), оценивали с использованием платформы Mesoscale Discovery (MSD). Планшеты со

стрептавидином MSD покрывали биотинилированным антителом, захватывающим тау (HT7-биотин, ThermoScientific), перед инкубацией с ePHF, выделенным от пациентов с болезнью Альцгеймера, в то время как антитела класса IgG, специфические для ePHF, дополнительно детектировали с использованием меченного SulfoTag антитела против IgG человека, которое перекрестно реагирует с антителами IgG обезьяны. Конкретнее, ePHF добавляли в 96-луночные планшеты (MSD) со стрептавидином в небольших участках MSD Gold, предварительно заблокированные 1% BSA и покрытые биотинилированным HT-7 (Thermo Scientific). После одночасовой инкубации планшеты промывали PBST, добавляли последовательные разведения сывороток и инкубировали в течение двух часов. Связанные антитела детектировали с использованием меченного SulfoTag антитела против IgG человека с последующей стадией фиксации в 1% PFA перед добавлением буфера для считывания T. Планшеты анализировали с использованием Sector Imager (MSD). Результаты представляли в произвольных единицах на миллилитр (AU/мл) для каждой отдельной обезьяны вместе со средним геометрическим значением для группы. Представлены титры антител, специфических для ePHF, в день 50 после первой иммунизации.

[00310] Фиг. 8 показывает, что все вакцины индуцировали высокие титры ePHF-специфических антител класса IgG.

[00311] Аналогичные результаты с высокими титрами ePHF-специфических антител класса IgG были также получены с другими липосомами, такими как липосома Z⁺, введенными макакам-резусам с помощью внутримышечного введения.

[00312] Пример 7: Степень специфичности тау-фосфопептид-специфического антитела, индуцированного вакциной на основе липосомы и вакциной на основе конъюгата у макак-резусов.

Группы макак-резусов (n=3 самца и 3 самки в каждой группе) иммунизировали подкожно в день 1 и день 29 с использованием (i) улучшенной вакциной на основе липосомы, содержащей инкапсулированный T50 и два адъюванта: лиганд TLR4 (3D-(6-ацил) PHAD®) и липидированный олигонуклеотид CpG 2006 (липосомы Z), и (ii) вакциной на основе конъюгата (фосфорилированного тау-пептид) SEQ ID NO:2, связанного с CRM (конъюгата A), вводимой вместе с квасцами и CpG-олигонуклеотидом CpG 2006. Профиль распознавания эпитопов антителами определяли с помощью картирования эпитопов с использованием ELISA через три недели после второй иммунизации (в день 50), используя библиотеку биотинилированных на N-конце 8-мерных пептидов, сдвинутых на одну аминокислоту и охватывающих последовательность фосфорилированного тау-пептида SEQ ID NO:2, а также последовательность SEQ ID NO:4 (VYKSPVVS GDTSPRHL, нефосфорилированного тау-пептида, имеющего такую же аминокислотную последовательность как и SEQ ID NO:2), и соответствующие биотинилированные полноразмерные пептиды.

[00313] Фиг. 9 показывает, что обезьяны, иммунизированные липосомой Z, продуцировали антитела класса IgG, которые связываются в основном с N-концевой частью

фосфорилированного пептида SEQ ID NO:2 (фиг. 9A), тогда как обезьяны, иммунизированные вакциной на основе конъюгата (фосфорилированного тау-пептида SEQ ID NO:2, связанного с CRM), продуцировали антитела класса IgG, которые связываются главным образом с С-концевой частью тау-пептида SEQ ID NO:2 (фиг. 9B).

[00314] Пример 8. Повышенные титры антител класса IgG, специфические для тау-фосфопептида, индуцированные вакциной на основе липосомы с инкапсулированным, распознаваемым Т-клетками эпитопом.

[00315] Три группы мышей C57BL/6J (n=10 в каждой группе) иммунизировали подкожно в дни 0 и 14 (i) вакциной на основе липосомы, содержащей агонист TLR4 (3D-(6-ацил)PHAD®), (липосомы R), (ii) вакциной на основе липосомы, содержащей инкапсулированный, распознаваемый Т-клетками эпитоп T50 и лиганд TLR4 (3D-(6-ацил)PHAD®) в качестве адъюванта, (липосомы S) или (iii) вакциной на основе липосомы, содержащей заякоренный, распознаваемый Т-клетками эпитоп T57 на поверхности липосомы (т.е. дипальмитоилированный T50) и лиганд TLR4 (3D-(6-ацил)PHAD®) в качестве адъюванта, (липосомы T). Уровень антител класса IgG, специфических для фосфорилированного тау-пептида SEQ ID NO:2, измеряли через 21 и 35 дней после первой инъекции в плазме мышей с помощью ELISA; результаты представлены в виде значений для отдельных мышей вместе со средним геометрическим значением для группы $\pm$ 95% CI, представленным в произвольных единицах (AU) на мл. Как показано на фиг. 10A, вакцинация вакциной на основе липосомы, содержащей инкапсулированный T50, (липосомы S) индуцировала значительно более высокие титры антител, чем контрольной вакциной на основе липосомы (липосомы R) и вакциной на основе липосомы, содержащей заякоренный, распознаваемый Т-клетками эпитоп, (липосомы T) через 21 день после первой иммунизации (тест Крускала-Уоллиса: $p=0,0089$ и $p=0,0002$, соответственно), а также более высокие титры антител, чем при вакцинации контрольной вакциной на основе липосомы, и значительно более высокие титры антител, чем при вакцинации вакциной на основе липосомы, содержащей заякоренный, распознаваемый Т-клетками эпитоп, через 35 дней после первой иммунизации (критерий Крускала-Уоллиса: $p=0,7591$ и $p=0,0053$, соответственно) (фиг. 10B).

[00316] Пример 9: Индуцированная вакцинами на основе липосом Т-клеточная реакция, специфическая для включенного эпитопа для Т-клеток.

[00317] Три группы мышей C57BL/6J (n=5 в каждой группе) иммунизировали подкожно в дни 0, 14 и 28 (i) улучшенной вакциной на основе липосомы с инкапсулированным распознаваемым Т-клетками пептидом T48 (содержащим распознаваемые Т-клетками эпитопы PADRE, T2, T30 и T17, разделенные линкером GS) и агонистом TLR4 в качестве адъюванта (MPLA), (липосомы M), (ii) улучшенной вакциной на основе липосомы с инкапсулированным T52 (содержащим распознаваемые Т-клетками эпитопы PADRE, T2 и T30, разделенные линкером RK) и агонистом TLR4 (MPLA) в качестве адъюванта (липосомы N) или (iii) PBS. Селезенки мышей собирали через 42 дня после первой иммунизации для анализа Т-клеточных реакций с помощью специфической

для IL-4 и IFN- γ ELISPOT. Суспензии отдельных клеток инкубировали со средой, пептидом T48 или T52 в концентрации 10 мкг/мл в течение 48 часов. Планшеты инкубировали с биотинилированными моноклональными антителами против IL-4 или IFN- γ мыши и со стрептавидин-щелочной фосфатазой (AP). «Ореолы» проявляли путем добавления субстрата AP. Фиг. 11 показывает, что рестимуляция спленоцитов мыши тем же пептидом, что и инкапсулированный в липосому, стимулировала клетки, образующие «ореолы» IL-4 (фиг. 11B) и IFN- γ (фиг. 11A), тогда как спленоциты мышей, которым инъецировали PBS, не подвергались стимуляции. Это подтверждало, что добавление распознаваемого Т-клетками эпитопа в вакцину вызывало активацию специфических Т-клеток, позволяя им дополнительно оказывать помощь тау-специфическим В-клеткам в выработке антител.

[00318] Пример 10. Вакцины на основе липосомы, содержащей инкапсулированный распознаваемый Т-клетками эпитоп и заякоренный, распознаваемый Т-клетками эпитоп.

[00319] Группы макак-резусов (n=6 в каждой группе) иммунизировали подкожно в дни 1, 29, 85 и 169 (i) вакциной на основе липосомы, содержащей инкапсулированный, распознаваемый Т-клетками эпитоп T50 и лиганд TLR4 (MPLA) в качестве адъюванта, (липосомы L), (ii) вакциной на основе липосомы, содержащей заякоренный, распознаваемый Т-клетками эпитоп T46 и лиганд TLR4 (MPLA) в качестве адъюванта (липосомы O) и (iii) контрольной вакциной на основе липосомы, содержащей лиганд TLR4 (MPLA) в качестве адъюванта и не содержащей эпитоп для Т-клеток. Спуски крови выполняли до иммунизации (в день -14) и в дни 8, 22, 36, 50, 64, 78, 92, 106, 120, 134, 148, 162, 176 и 190, и выделяли сыворотки. Титры специфических антител класса IgG определяли методом ELISA с использованием фосфорилированного тау-пептида SEQ ID NO:2 в качестве антигена для покрытия и второго антитела против обезьяньего IgG. Полученные уровни антител рассчитывали как конечные точки титрования (последнее разведение сыворотки, показывающее положительную реакцию), и данные представляли в виде среднего геометрического значения для каждой группы. Как показано на фиг. 12, вакцина на основе липосомы, содержащей инкапсулированный распознаваемый Т-клетками эпитоп, (липосомы L) и вакцина на основе липосомы, содержащей заякоренный, распознаваемый Т-клетками эпитоп, (липосомы O), каждая, индуцировала более высокие титры специфических для тау-фосфопептида антител, чем контрольная вакцина на основе липосомы без эпитопа для Т-клеток.

[00320] Пример 11. Гуморальный ответ у мышей, индуцированный вакциной на основе конъюгата.

[00321] Самок мышей BALB/c (14 мышей в каждой группе) иммунизировали конъюгатом В или конъюгатом С (содержащим SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:3, ковалентно связанную с KLH) в соответствии со схемой, представленной на фиг. 13А, и с использованием вакцин-кандидатов, в которые добавлен либо сильный многокомпонентный адъювант (Sigma Adjuvant System®, Sigma-Aldrich, отныне называемый Ribi), либо однокомпонентный депо-адъювант (Alhydrogel®, адъювант 2% или гель гидроксида алюминия, InvivoGen, отныне называемый квасцами). Аминокислотная

последовательность SEQ ID NO:1 содержит лишь одно различие аминокислот по сравнению с белком мыши, в то время как последовательность SEQ ID NO:3 является на 100% консервативной между людьми и мышами. Таким образом, выбранные эпитопы могут обоснованно считаться «собственными» белками в случае мышей, и мыши должны быть соответствующей моделью для исследования ограничений, которые иммунная толерантность может накладывать на иммуногенность».

[00322] В качестве первого показателя иммуногенности вакцины была использована проточная цитометрия для измерения индукции фолликулярных Т-клеток-хелперов (T_H) в шейных лимфатических узлах, дренирующих место введения вакцины (четыре мыши в каждой группе). T_H представляют собой специализированную популяцию CD4⁺ Т-клеток, характеризующуюся экспрессией CXCR5, PD-1 и ICOS среди других молекул. Количество T_H увеличивается после воздействия вакцины или других иммунных стимулов, и T_H поддерживают созревание аффинности В-клеток в зародышевом центре (Crotty, 2011, *Annual Reviews of Immunology*. Vol 29:p621-663). Количество стимулированных T_H положительно коррелирует с протективной эффективностью вакцин у людей (Bentebibel et al., 2013, *Sci Transl Med.*, 5(176):176ra32; Spensieri et al., 2013, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 110(35):14330-5) и небольших животных. Как показано на фиг. 13В обе вакцины, а также контрольная иммунизация KLH плюс адъювант, приводили к измеримым T_H у вакцинированных мышей. Кроме того, у всех животных, получавших активную вакцину (в группах иммунизации конъюгатом В и конъюгатом С) или активное плацебо (KLH) плюс квасцы, было значительно больше T_H, чем у животных, которым давали неактивное плацебо (в группе иммунизации PBS), когда дренирующие шейные лимфатические узлы собирали через семь дней после первой иммунизации ($P=0,0044$ для KLH-TAUVAC-p7,1; $P=0,0482$ для KLH-TAUVAC-p22,1; $P=0,0063$ для KLH, используя дисперсионный анализ (ANOVA) с последующей корректировкой по Даннетту для множественных сравнений).

[00323] ELISA проводили для определения сывороточного титра антител, связывающихся с тау-фосфопептидами и с KLH, в день 0 и в четыре дополнительных момента времени после иммунизации (дни 14, 28, 56 и 84, смотрите фиг. 13С, D, G и H). Как показано на фиг. 13С, иммунизация конъюгатом В индуцировала связывающие антитела, реагирующие с соответствующим вакцинным пептидом. Для животных, иммунизированных конъюгатом В и адъювантом Ribi, титры связывающих антител против вакцинного пептида были значительно выше, чем титры связывающих антител, индуцированных активным плацебо (сравните конъюгат В плюс Ribi с KLH плюс Ribi) во всех определенных моментах времени ($P<0,0001$, используя дисперсионный анализ с последующей корректировкой Тьюки для множественных сравнений). Для группы, получавшей квасцы в качестве адъюванта, разница была значимой только в дни 56 и 84 ($p=0,001$ и $0,012$, соответственно).

[00324] Выработка тау-специфических антител в ответ на конъюгат С (фиг. 13D) имела в целом меньшую величину, чем выработка в ответ на конъюгат В, хотя различия в анализах (различный пептид для покрытия) препятствуют проведению прямого

статистического сравнения между двумя вакцинами. Тем не менее, титры антител против конъюгата С были значительно выше у мышей, вакцинированных конъюгатом С плюс Ribi, чем у мышей, получавших активный плацебо KLN плюс Ribi, в дни 28 и 84 ($P=0,001$ и $0,008$, соответственно) после иммунизации; титры в группе, получавшей квасцы в качестве адъюванта, значительно не отличались от титров в случае активного плацебо.

[00325] Хотя белок-носитель в некоторой степени защищает фосфопептид от деградации *in vivo*, вполне вероятно, что расщепление фосфатазой пептидных антигенов *in vivo* могло привести к экспонированию некоторого количества нефосфорилированного пептида иммунной системе. С целью определения, привело ли это экспонирование к выработке антител, способных связывать нефосфорилированный пептид в конъюгате В и конъюгате С, проводили ELISA с использованием нефосфорилированных пептидов в качестве антигена для покрытия. Как показано на фиг. 13E-F, ответ на нефосфорилированные тау-пептиды был слабым, сравнимым с ответом в случае активного плацебо на тот же нефосфорилированный пептид. Кроме того, у животных, иммунизированных конъюгатом В и Ribi, титры связывающих антител против фосфорилированного пептида были значительно выше, чем титры связывающих антител против нефосфорилированного пептида во все определенные моменты времени ($P=0,009$ в день 14; $P<0,0001$ в день 28, 56 и 84, используя дисперсионный анализ). Для группы, получавшей квасцы в качестве адъюванта, разница была значимой только в дни 56 и 84 ($P=0,0002$ и $0,001$, соответственно). Для животных, иммунизированных конъюгатом С, ответы на фосфорилированный пептид были выше только при использовании адъюванта Ribi ($P<0,0001$ в день 28; $P=0,0001$ в день 56 и 84).

[00326] Пример 12. Антитела, индуцированные вакцинами на основе конъюгатов, связываются с физиологически релевантными формами измененного тау.

[00327] С целью дополнительного определения, могут ли индуцированные вакциной антитела связываться с физиологически релевантными формами измененного тау, авторы настоящего изобретения использовали постиммунные сыворотки от вакцинированных мышей для окрашивания срезов головного мозга, собранного после смерти либо от пациентов с болезнью Альцгеймера (5 случаев AD), от пациентов, пораженных другими таупатиями (3 случая PART, FTD, болезни Пика и PSP), либо от подобранных по возрасту здоровых животных в качестве контролей (5 контрольных случаев, CTRL). Как и ожидалось, сыворотки от контрольных животных (групп иммунизации PBS и активным плацебо) не связывались со срезами головного мозга, в то время как AT8, моноклональное антитело, которое связывается с pTau [pSer202, pThr 205], полученное из мышинового клона, проявляло сильную иммунореактивность в случае тау-патологии в соседнем срезе ткани соответствующей области (фиг. 14). Сыворотки от животных, иммунизированных активными вакцинами, конъюгатом В и конъюгатом С, связывали патологические структуры тау не только в срезах от пациентов с AD (не представленные данные), но также и в случае других таупатий (фиг. 14). Антитела, индуцированные конъюгатом В, реагировали с (пре)клубками, нейропильными нитями и сенильными бляшками в случаях

AD. Эти постиммунные сыворотки были также способны иммунореагировать с нейрофибриллярными клубками и нейропильными нитями в ткани головного мозга пациентов с PART, телами включения в нейронах и нейропильными нитями в ткани пациента с FTD-tau (МАРТ Р301S), телами включения и астроцитами в некоторых случаях болезни Пика и, наконец, с телами включения в нейронах, нейропильными нитями и астроцитами, характерными для PSP. Индуцированные конъюгатом С поликлональные сывороточные антитела также реагировали с патологическими структурами тау, характерными для каждой таупатии. В случаях AD, окрашивание было в основном сосредоточено в нейрофибриллярных клубках и в меньшей степени в сенильных бляшках и нейропильных нитях. Меньшее увеличение соответствующих областей показало аналогичные результаты (данные не известны).

[00328] Пример 13: Индуцированные вакциной антитела являются функционирующими у мышей.

[00329] Протективную эффективность вакцины на основе конъюгата В тестировали на модели таупатии с использованием инъекции (Peeraer et al, 2015, Neurobiol Dis., 73:83-95). В этой модели мыши, подвергшиеся таупатии посредством генетической мутации (Р301L), получают интрацеребральную инъекцию обогащенных РНФ, выделенных из головного мозга пациента с AD, в соответствии с временными рамками, указанными на фиг. 15А. Инъекция, которая выполняется перед возникновением индуцируемой трансгеном таупатии, ускоряет развитие таупатии у этих животных. И наоборот, когда «источник» eРНФ предварительно смешивают с антителом, способным подавлять активность «источника» тау, таким как AT8, индукция таупатии уменьшается (неопубликованные данные, не представлены).

[00330] Следуя схеме на фиг. 15А, авторы настоящего изобретения оценили развитие таупатии после стереотаксической инъекции обогащенных РНФ человека, предварительно смешанных с IgG, очищенным из сыворотки животных, иммунизированных конъюгатом В, Ribі или активным контролем KLН плюс Ribі. Через два месяца после инъекции головной мозг этих мышей собирали, и определяли количество агрегированных тау в общей и нерастворимой в саркозиде фракциях с использованием стандартного биохимического анализа. Полученные данные показали, что, когда мышам инъекцировали eРНФ, которые были предварительно смешаны с IgG от мышей, вакцинированных конъюгатом В, было значительно меньше агрегированного фосфо-тау как в общей (фиг. 15В), так и в саркозид-нерастворимой (фиг. 15С) фракции по сравнению животными, получавшими контрольную инъекцию ($p < 0,0001$ KLН Ribі в сравнение с KLН-TAUVAC-p7.1 плюс Ribі, используя дисперсионный анализ с последующей коррекцией по Холму-Бонферрони для множественных сравнений). Общепринято, что нерастворимый в саркозиде тау коррелирует с патологическими признаками таупатии, поэтому этот результат демонстрирует, что антитела, индуцированные вакцинацией KLН-TAUVAC-p7.1, являются протективными in vivo.

[00331] Пример 14: Индуцированные вакциной антитела являются

функционирующими у приматов, не являющихся людьми.

[00332] Макак-резусов иммунизировали конъюгатом В с квасцами и CpG-олигонуклеотидом в качестве адъювантов (n=6) или KLH (n=2) в день 1, 29, 85 и 169. Кровь собирали каждые 14 дней, и сыворотки животных, иммунизированных конъюгатом В, тестировали на реактивность с иммунизирующим пептидом, используя ELISA (фиг. 16А), и ePHF человека, используя MSD (фиг. 16В). Иммунизация конъюгатом В приводила к длительному и стойкому гуморальному ответу на вакцинный фосфопептид. Более того, все животные имели измеримые уровни антител против ePHF человека, при этом 3 из 6 животных показали высокую реактивность с этим антигеном. Сыворотки, собранные от животных через 50 дней после первичной иммунизации, наносили на срезы головного мозга от здоровых индивидуумов или от пациентов с AD (фиг. 16С). Постиммунные сыворотки от группы иммунизации конъюгатом В окрашивали патологических структур тау, а именно нейрофибриллярные клубки, нейропиллярные нити и сенильные бляшки, в ткани головного мозга пациентов с AD, в то время как сыворотки от мышей, иммунизированных KLH, не демонстрировали какую-либо реактивность. Окрашивание контрольной ткани не наблюдалось. При тестировании в анализе иммунодеплеции тау у животных, получавших конъюгат В, были антитела, способные связывать и истощать «источники» тау ($p=0,03$ в день 50, используя дисперсионный анализ с последующей корректировкой по Даннетту для множественных сравнений), хотя иммунизация KLH не инициировала продукцию таких антител (фиг. 16D). Сыворотки до и после иммунизации также тестировали в анализе нейтрализации в виде последовательно разведенных отдельных образцов (фиг. 16Е). Изменения по сравнению с исходным уровнем (CFB) рассчитывали как разницу между значениями FRET (резонансного переноса энергии флуоресценции) для показаний в день -14 до вакцинации (исходный уровень) и в дни 50, 106 и 190 после вакцинации, соответственно. Ответ в определенный день после вакцинации (день_i) затем рассчитывали следующим образом:

Ответ = % FRET_день_i - % FRET_исходный уровень.

[00333] Общая линейная смешанная модель для вышеупомянутых ответов, со случайным эффектом на животных, применялась с переменными: группами вакцинации, днем и уровнями в сыворотке, рассматриваемыми как категориальные переменные, и всеми их взаимодействиями. Учитывая исследовательский характер исследования, многократная корректировка тестирования не рассматривалась. Проверка гипотез была выполнена на 5% уровне значимости.

[00334] Пример 15: Мыши, иммунизированные вакциной на основе конъюгата в комбинации с квасцами и CpG-олигонуклеотидом в качестве адъювантов, давали более высокие титры антител против вакцинного пептида.

[00335] Взрослых самок мышей C57BL/6 (n=5-6 в каждой группе) иммунизировали внутримышечно с использованием либо 2 мкг (фиг. 17А), либо 0,2 мкг (фиг. 17В) вакцины на основе конъюгата А. Вакцину на основе конъюгата вводили либо отдельно (без адъюванта), с гидроксидом алюминия, с CpG-олигонуклеотидом, либо с комбинацией

квасцов с CpG-олигонуклеотидом. Всех мышей подвергали первичной иммунизации в день 0 исследования, а затем однократной бустер-иммунизации в день 28. Доза квасцов в качестве адъюванта составляла 500 мкг/мышь на инъекцию, а доза CpG-олигонуклеотида в качестве адъюванта составляла 20 мкг/мышь на инъекцию. Графики на фиг. 17 показывают результаты связывания ELISA с использованием сыворотки, собранной от мышей до иммунизации (день 0) и в два момента времени после иммунизации (день 28 и 42) вакцинным пептидом T3.5, использованным в качестве антигена для покрытия. На графики наносили средние конечные точки титрования T3.5-специфических антител, с «усами», представляющими среднеквадратическую ошибку. В таблицах представлен статистический анализ результатов, в случае которого титры антител сравнивались с использованием непараметрического критерия Крускала-Уоллиса, а попарные сравнения групп оценивались с использованием знакового критерия Уилкоксона по результатам, полученным с помощью критерия Крускала-Уоллиса.

[00336] Представленные на фиг. 17 результаты показывают, что в обеих дозах вакцина без адъюванта не индуцировала сильный иммунный ответ. Использование квасцов или CpG-олигонуклеотида или их комбинации улучшало величину гуморального ответа ($p < 0,0152$). Более того, в случае животных, иммунизированных 2 мкг вакцины, комбинация адъювантов давала значительно более высокие титры антител, чем отдельные адъюванты в день 28 ($p = 0,0028$). Комбинация квасцов и CpG-олигонуклеотида также показала лучшие результаты, чем только CpG-олигонуклеотид, в случае животных, иммунизированных 0,2 мкг вакцины, в день 42 ($p = 0,0497$). Эти данные поддерживают использование комбинации адъювантов квасцов и CpG-олигонуклеотида.

[00337] Пример 16: Вакцины на основе липосом с различными соотношениями Тау-пептида и распознаваемых Т-клетками эпитопов индуцируют высокий и устойчивый уровень титров специфических для тау-фосфопептида антител класса IgG

[00338] Взрослых макаков-резусов ($n=6$ в каждой группе) иммунизировали подкожно в дни 1, 29, 85 и 169 с использованием 1800 мкг ацетата тетрапальмитоилированного фосфорилированного тау-пептида SEQ ID NO:2 на дозу в улучшенной вакцине на основе липосомы с инкапсулированным, распознаваемым Т-клетками эпитопом T50, содержащей как 3D-(6-ацил)PHAD®, так и липидированный олигонуклеотид CpG 2006 в качестве адъювантов, с: i) 400 мкг/мл фосфорилированного тау-пептида SEQ ID NO:2 и 100 мкг/мл T50 (липосомой Z), ii) 1200 мкг/мл фосфорилированного тау-пептида SEQ ID NO:2 и 1200 мкг/мл T50 (липосомой Z⁺), iii) 400 мкг/мл фосфорилированного тау-пептида SEQ ID NO:2 и 400 мкг/мл T50 (липосомой Z⁺⁺), iv) 1200 мкг/мл фосфорилированного тау-пептида SEQ ID NO:2 и 300 мкг/мл T50 (липосомой Z⁺⁺). Сливы крови выполняли до иммунизации и в дни 8, 22, 36, 50, 64, 78, 92, 106, 120, 134, 148, 162, 176 и 190, и выделяли сыворотки. Титры специфических антител класса IgG в сыворотках определяли с помощью ELISA с использованием фосфорилированного тау-пептида SEQ ID NO:2 в качестве антигена для покрытия и второго антитела против обезьяньего IgG. Полученные уровни антител рассчитывали как конечные точки титрования (последнее разведение сыворотки,

показывающее положительную реакцию) для каждой отдельной обезьяны с течением времени. Среднее геометрическое значение конечных точек титрования для каждой группы $\pm 95\%$ доверительный интервал представлено на фиг. 18, показывающей, что все четыре протестированные вакцины на основе липосом индуцировали высокие и устойчивые титры антител против тау-фосфопептида.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO:1 - фосфо-тау-пептид (7.1)

GDRSGYS[pS]PG[pS]PG[pT]PGSRRT

SEQ ID NO:2 - фосфо-тау-пептид (T3.5)

VYK[pS]PVVSGDT[pS]PRHL

SEQ ID NO:3 - фосфо-тау-пептид (22.1)

SSTGSIDMVD[pS]PQLA[pT]LA

SEQ ID NO:4 - тау-пептид

VYKSPVSGDTSPRHL

SEQ ID NO:5 - фосфо-тау-пептид

RENAKAKTDHGAIEIVYK[pS]PVVSGDT[pS]PRHL

SEQ ID NO:6 - фосфо-тау-пептид

RQEFVEMEDHAGT[pY]GL

SEQ ID NO:7 - фосфо-тау-пептид

PGSRSR[pT]P[pS]LPTPPTR

SEQ ID NO:8 - фосфо-тау-пептид

GYSSPG[pS]PG[pT]PGSRSR

SEQ ID NO:9 - фосфо-тау-пептид

GDT[pS]PRHL[pS]NVSSTGSID

SEQ ID NO:10 - фосфо-тау-пептид

PG[pS]PG[pT]PGSRSR[pT]P[pS]LP

SEQ ID NO:11 - фосфо-тау-пептид

HL[pS]NVSSTGSID

SEQ ID NO:12 - фосфо-тау-пептид

VSGDT[pS]PRHL

SEQ ID NO:13 - распознаваемый T-клетками эпитоп T50

AKFVAAWTLKAAAVVRQYIKANSKFIGITELVVRFNFTVSFWLRVPKVSASHL

E-NH₂

SEQ ID NO:14 - распознаваемый T-клетками эпитоп T46

AKFVAAWTLKAAAGSQYIKANSKFIGITELGSFNNFTVSFWLRVPKVSASHLEK(

Pal)K(Pal)-NH₂

SEQ ID NO:15 - распознаваемый T-хелперами эпитоп T48

AKFVAAWTLKAAAGSQYIKANSKFIGITELGSFNNFTVSFWLRVPKVSASHLEGS

LINSTKIYSYFSPVISKVNQ-NH₂

SEQ ID NO:16 - распознаваемый T-хелперами эпитоп T51

AKFVAAWTLKAAARRQYIKANSKFIGITELRRFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-
NH₂

SEQ ID NO:17 - распознаваемый Т-хелперами эпитоп T52

AKFVAAWTLKAAARKQYIKANSKFIGITELRKFNFTVSFWLRVPKVSASHLE-
NH₂

SEQ ID NO:18 - CpG 2006 (также известный как CpG 7909)

5'-tcgtcgttttgtcgttttgtcggtt-3'

где строчная буква означает фосфоротиоатные (ps) межнуклеотидные связи

SEQ ID NO: 19 - CpG 1018

5'-tgactgtgaacgttcgagatga-3'

где строчная буква означает фосфоротиоатные межнуклеотидные связи

SEQ ID NO:20 - CpG2395

5'-tcgtcgttttcggcgcgcgcgcg-3'

где строчная буква означает фосфоротиоатные межнуклеотидные связи

SEQ ID NO:21 - CpG2216

5'-ggGGGACGATCGTCggggggg-3'

где строчная буква означает фосфоротиоатные межнуклеотидные связи, а заглавные буквы означают фосфодиэфирные (po) связи

SEQ ID NO:22 - CpG2336

5'- gggGACGACGTCGTGggggggg -3',

где строчная буква означает фосфоротиоатные межнуклеотидные связи, а заглавные буквы означают фосфодиэфирные связи.

SEQ ID NO:23 - Pan-DR-связывающий эпитоп (PADRE) в виде пептида

AKFVAAWTLKAAA

SEQ ID NO:24 - P2

QYIKANSKFIGITEL

SEQ ID NO:25 - P30

FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE

SEQ ID NO:26 - TT₅₈₆₋₆₀₅

LINSTKIYSYFPSVISKVNQ

SEQ ID NO:27 - пальмитоилированный фосфо-тау-пептид
(пальмитоилированный 7.1)

K(pal)K(pal)GDRSGYS[pS]PG[pS]PG[pT]PGSRRTK(pal)K(pal)

SEQ ID NO:28 - пальмитоилированный фосфо-тау-пептид (T3,
пальмитоилированный T3.5)

K(pal)K(pal)VYK[pS]PVVSGDT[pS]PRHLK(pal)K(pal)

SEQ ID NO:29 - пальмитоилированный фосфо-тау-пептид
(пальмитоилированный 22.1)

K(pal)K(pal)SSTGSIDMVD[pS]PQLA[pT]LAK(pal)K(pal)

SEQ ID NO:30 - пальмитоилированный тау-пептид

K(pal)K(pal)VYKSPVVS GDTSPRHLK(pal)K(pal)

SEQ ID NO:31 - пальмитоилированный фосфо-тау-пептид

K(pal)K(pal)RENAKAKTDHGAEIVYK[pS]PVVSGDT[pS]PRHLK(pal)K(pal)

SEQ ID NO:32 - пальмитоилированный фосфо-тау-пептид

K(pal)K(pal)RQEFVME DHAGT[pY]GLK(pal)K(pal)

SEQ ID NO:33 - пальмитоилированный фосфо-тау-пептид

K(pal)K(pal)PGSRSR[pT]P[pS]LTPPTRK(pal)K(pal)

SEQ ID NO:34 - пальмитоилированный фосфо-тау-пептид

K(pal)K(pal)GYSSPG[pS]PG[pT]PGSRSRK(pal)K(pal)

SEQ ID NO:35 - пальмитоилированный фосфо-тау-пептид

K(pal)K(pal)GDT[pS]PRHL[pS]NVSSTGSIDK(pal)K(pal)

SEQ ID NO:36 - пальмитоилированный фосфо-тау-пептид

K(pal)K(pal)PG[pS]PG[pT]PGSRSR[pT]P[pS]LPK(pal)K(pal)

SEQ ID NO:37 - пальмитоилированный фосфо-тау-пептид

K(pal)K(pal)HL[pS]NVSSTGSIDK(pal)K(pal)

SEQ ID NO:38 - пальмитоилированный фосфо-тау-пептид

K(pal)K(pal)VSGDT[pS]PRHLK(pal)K(pal)

SEQ ID NO:39 - T50 без C-концевого амида

AKFVAAWTLKAAAVVRQYIKANSKFIGITELVVRFNFTVSFWLRVPKVSASHL

E

SEQ ID NO:40 - T46 без -Lys(Pal)-Lys(Pal)-NH₂ на C-конце

AKFVAAWTLKAAAGSQYIKANSKFIGITELGSFNFTVSFWLRVPKVSASHLE

SEQ ID NO:41 - T48 без C-концевого амида

AKFVAAWTLKAAAGSQYIKANSKFIGITELGSFNFTVSFWLRVPKVSASHLEGS

LINSTKIYSYFSPVISKVNQ

SEQ ID NO:42 - T51 без C-концевого амида

AKFVAAWTLKAAARRQYIKANSKFIGITELRRFNFTVSFWLRVPKVSASHLE

SEQ ID NO:43 - T52 без C-концевого амида

AKFVAAWTLKAAARKQYIKANSKFIGITELRKFNFTVSFWLRVPKVSASHLE

SEQ ID NO:44 - T57

AKFVAAWTLKAAAVVRQYIKANSKFIGITELVVRFNFTVSFWLRVPKVSASHL

E-K(Pal)K(Pal)-NH₂

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Asuni AA et al., J Neurosci. 2007 Aug 22;27(34):9115-29

Bentebibel et al., 2013, Sci Transl Med., 5(176):176ra32

Crotty, 2011, Annual Reviews of Immunology. Vol 29:p621-663

Friedhoff et al., Biochimica et Biophysica Acta 1502 (2000) 122-132

Greenberg and Davies, 1991, Proc Natl Acad Sci U S A, 87(15):5827-31

Hanger et al., Trends Mol Med. 15:112-9, 2009

Hickman et al., J. Biol. Chem. vol. 286, NO. 16, pp. 13966-13976, April 22, 2011

Kontseikova E et al., *Alzheimers Res Ther.* 2014 Aug 1;6(4):44
Novak P et al., *Lancet Neurology* 2017, 16:123-134
Peeraer et al., 2015, *Neurobiol Dis.*, 73:83-95
Ries et al., 2015, *Org. Biomol. Chem.*, 13:9673
Spensieri et al., 2013, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 110(35):14330-5
Theunis C et al., *PLoS One.* 2013; 8(8): e72301
Патент США с № 7741297
Патент США с № 8647631
Патент США с № 9687447
WO90/14837
WO2010/115843

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Липосома, содержащая:
 - a. тау-пептид и
 - b. эпитоп для Т-клеток-хелперов,
 причем тау-пептид представлен на поверхности липосомы.
2. Липосома по п. 1, которая дополнительно содержит по меньшей мере один из лиганда toll-подобного рецептора 4 и лиганда toll-подобного рецептора 9.
3. Липосома, содержащая:
 - a. тау-фосфопептид,
 - b. эпитоп для Т-хелперов;
 - c. липидированный CpG-олигонуклеотид; и
 - d. адъювант, содержащий лиганд toll-подобного рецептора 4;
 причем тау-фосфопептид представлен на поверхности липосомы.
4. Липосома по любому из п.п. 1-3, которая дополнительно содержит один или более липидов, выбранных из группы, состоящей из 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DMPC), 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфорил-3'-рац-глицерина (DMPG) и холестерина.
5. Липосома по любому из п.п. 1-4, в которой тау-пептид имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:12,

причем аминокислотная последовательность дополнительно содержит одну или более модификаций, чтобы позволить тау-пептиду быть представленным на поверхности липосомы.
6. Липосома по любому из п.п. 1-5, в которой эпитоп для Т-хелперов включает по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:23-SEQ ID NO:26.
7. Липосома по любому из п.п. 1-6, содержащая липидированный CpG-олигонуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:18-SEQ ID NO:22, причем CpG-олигонуклеотид имеет одну или более фосфоротиоатных межнуклеотидных связей, и CpG-олигонуклеотид ковалентно связан с по меньшей мере одной липофильной группой.
8. Липосома по любому из п.п. 1-7, в которой лиганд toll-подобного рецептора 4 представляет собой монофосфорилипид А (MPLA).
9. Липосома, содержащая:
 - a. тау-пептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:27-SEQ ID NO:38;
 - b. эпитоп для Т-хелперов, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:39-SEQ ID NO:44, предпочтительно эпитоп для Т-хелперов, состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:13-SEQ ID NO:17;
 - c. липидированный CpG-олигонуклеотид, имеющий нуклеотидную

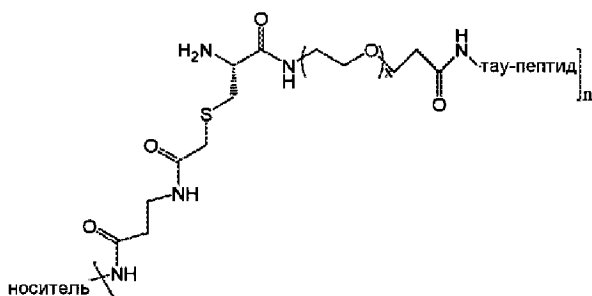
последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:18-SEQ ID NO:22, причем CpG-олигонуклеотид включает одну или более фосфоротиоатных межнуклеотидных связей, и CpG-олигонуклеотид ковалентно связан с по меньшей мере одним холестерином через линкер; и

d. монофосфориллипид A (MPLA).

10. Фармацевтическая композиция, содержащая липосому по любому из п.п. 1-9 и фармацевтически приемлемый носитель.

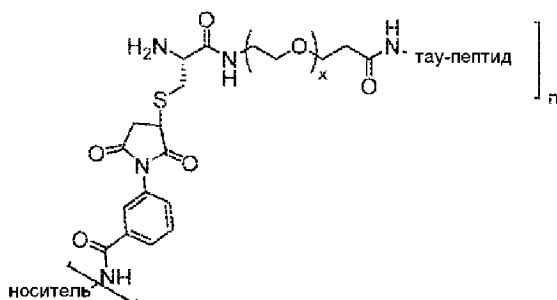
11. Конъюгат, включающий тау-фосфопептид и конъюгированный с ним через линкер иммуногенный носитель, при этом конъюгат имеет структуру:

(i) формулы (I):



или

(ii) формулы (II):



где

x представляет собой целое число от 0 до 10, предпочтительно от 2 до 6, наиболее предпочтительно 3; и

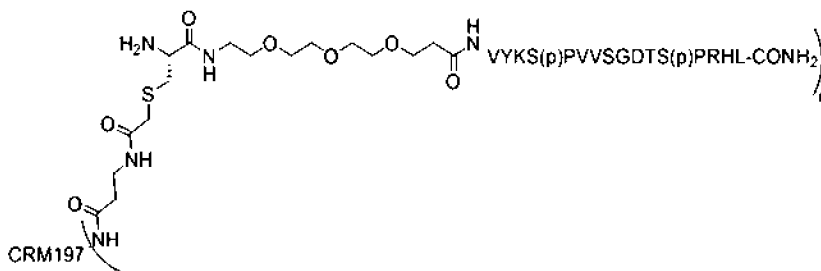
n представляет собой целое число от 3 до 15, предпочтительно от 3 до 12.

12. Конъюгат по п. 11, в котором иммуногенный носитель выбран из группы, состоящей из гемоцианина лимфы улитки (KLH), столбнячного анатоксина (TT), CRM197 и смеси белков наружной мембраны из *N. meningitidis* (OMP) или их производного.

13. Конъюгат по п. 11 или 12, в котором тау-пептид имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:12.

14. Конъюгат по п. 13, который имеет структуру формулы (I), и в котором иммуногенным носителем является CRM197.

15. Конъюгат по п. 14, имеющий структуру:



где n представляет собой целое число от 3 до 7.

16. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат по любому из п.п. 11-15 и фармацевтически приемлемый носитель.

17. Способ индукции иммунного ответа у субъекта, страдающего нейродегенеративным нарушением, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п. 10 или фармацевтической композиции по п. 16.

18. Способ лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п. 10 или фармацевтической композиции по п. 16.

19. Способ по п. 17 или 18, в котором нейродегенеративное заболевание или нарушение вызвано или связано с образованием нейрофибриллярных патологических изменений.

20. Способ по п. 19, в котором нейродегенеративное заболевание или нарушение представляет собой болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Крейтцфельдта-Якоба, деменцию боксеров, синдром Дауна, болезнь Герстмана-Штраусслера-Шейкнера, миозит с тельцами включения, прионный белок, церебральную амилоидную ангиопатию, черепно-мозговую травму, боковой амиотрофический склероз, паркинсонизм-деменцию - комплекс Гуама, негуаманскую болезнь двигательного нейрона с нейрофибриллярными клубками, деменцию, характеризующуюся появлением аргирофильных зерен, кортикобазальную дегенерацию, деменцию Леви, боковой амиотрофический склероз, диффузные нейрофибриллярные клубки с кальцификацией, лобно-височную деменцию с паркинсонизмом, связанным с хромосомой 17 (FTDP-17), болезнь Галлервордена-Шпатца, множественную системную атрофию, болезнь Ниманна-Пика типа C, болезнь Пика, прогрессирующий подкорковый глиоз, прогрессирующий надъядерный паралич, подострый склерозирующий панэнцефалит, деменцию с преобладанием нейрофибриллярных клубков, постэнцефалитический паркинсонизм, миотоническую дистрофию, хроническую травматическую энцефалопатию (СТЕ), первичную возрастную таупатию (PART) или деменцию с тельцами Леви (LBD).

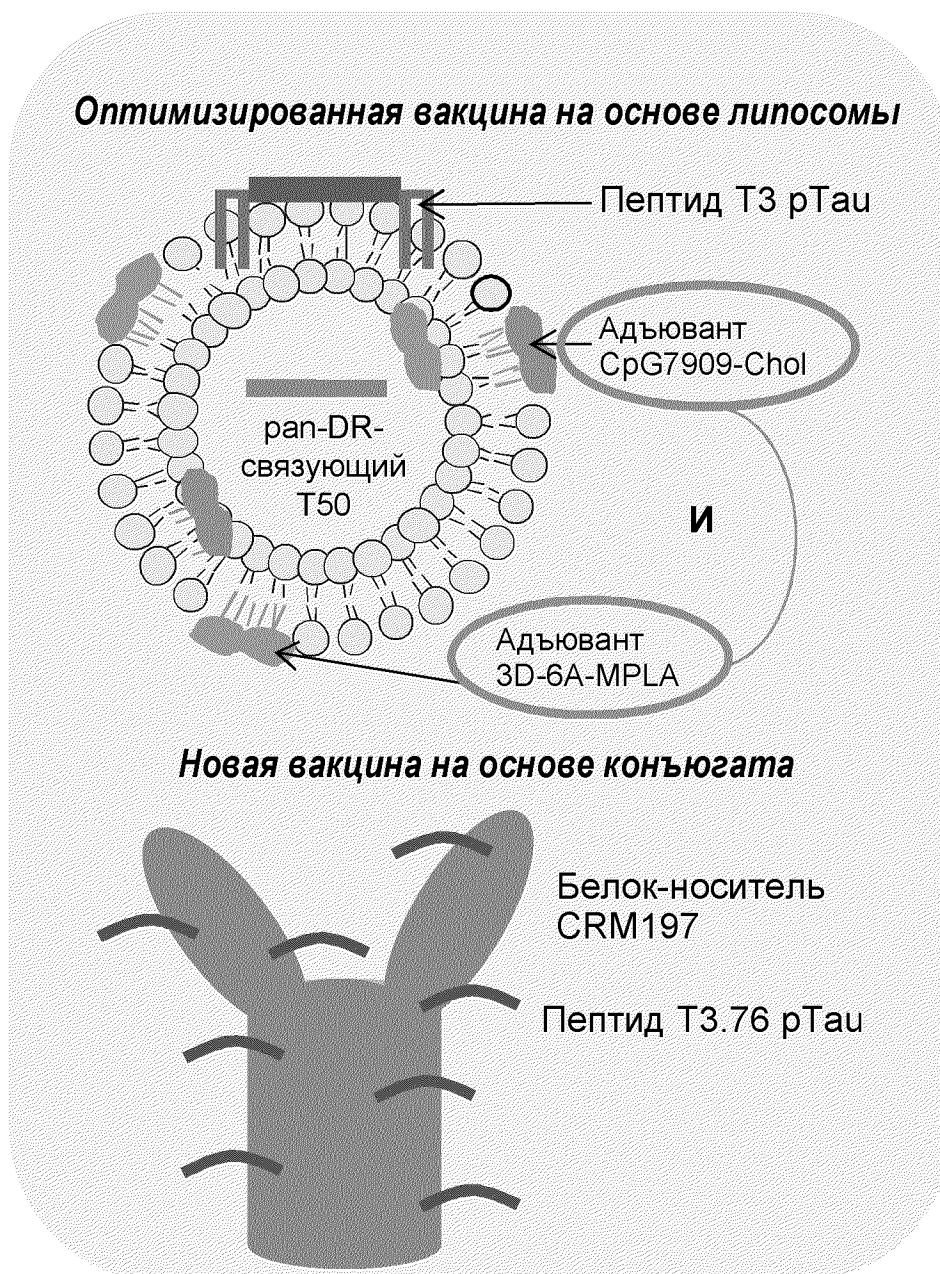
21. Способ по любому из п.п. 17-20, в котором нейродегенеративное заболевание или нарушение представляет собой болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, синдром Дауна, лобно-височную деменцию и паркинсонизм, связанный с хромосомой 17 (FTDP-17), кортикобазальную дегенерацию, деменцию Леви, боковой амиотрофический склероз, миотоническую дисфазию, хроническую травматическую энцефалопатию (СТЕ), церебральную ангиопатию, первичную возрастную таупатию (PART) или деменция с

тельцами Леви (LBD).

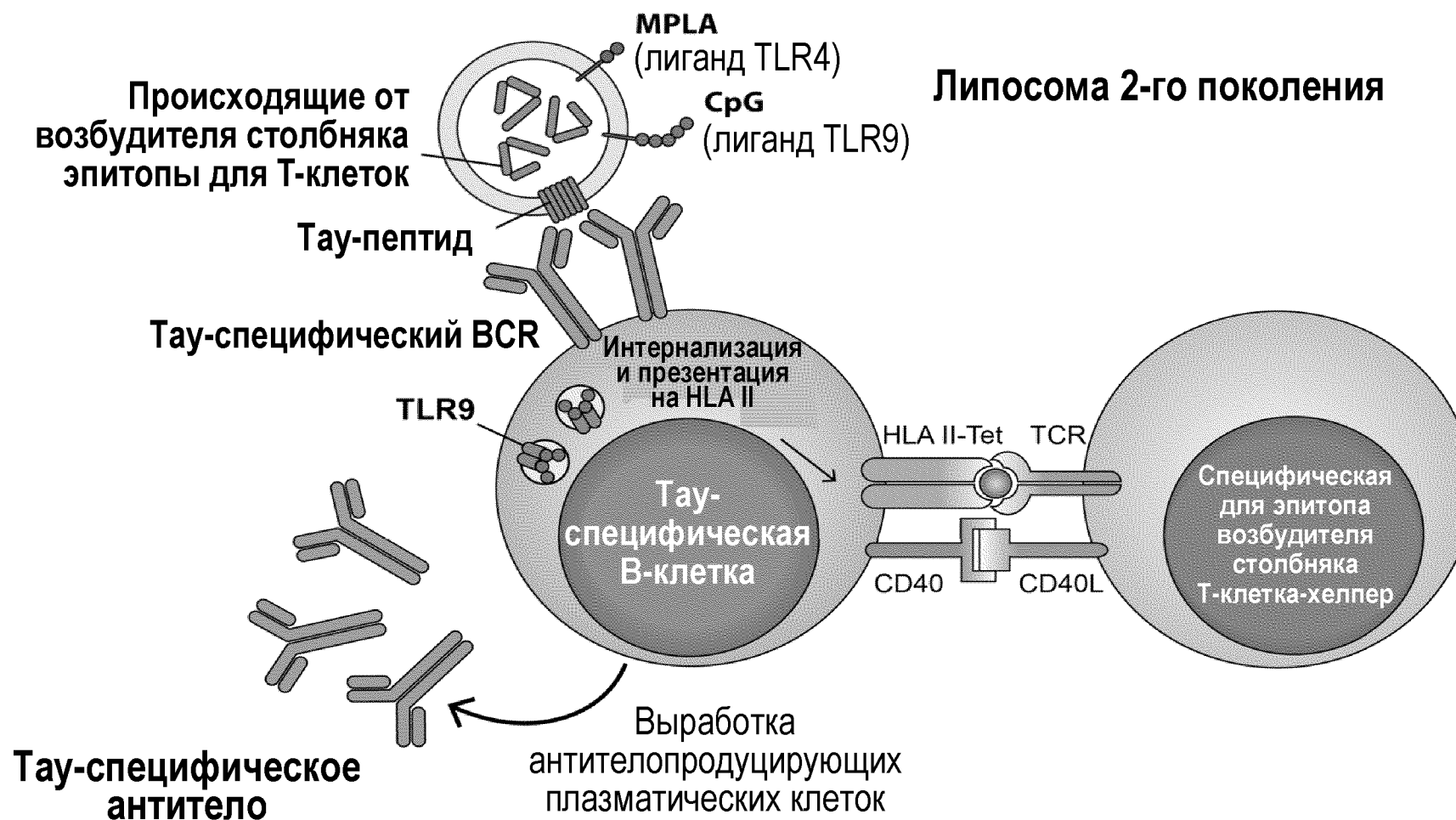
22. Набор, содержащий по меньшей мере одну из фармацевтической композиции по п. 10 и фармацевтической композиции по п. 16 для применения в лечении или профилактике нейродегенеративного заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом.

По доверенности

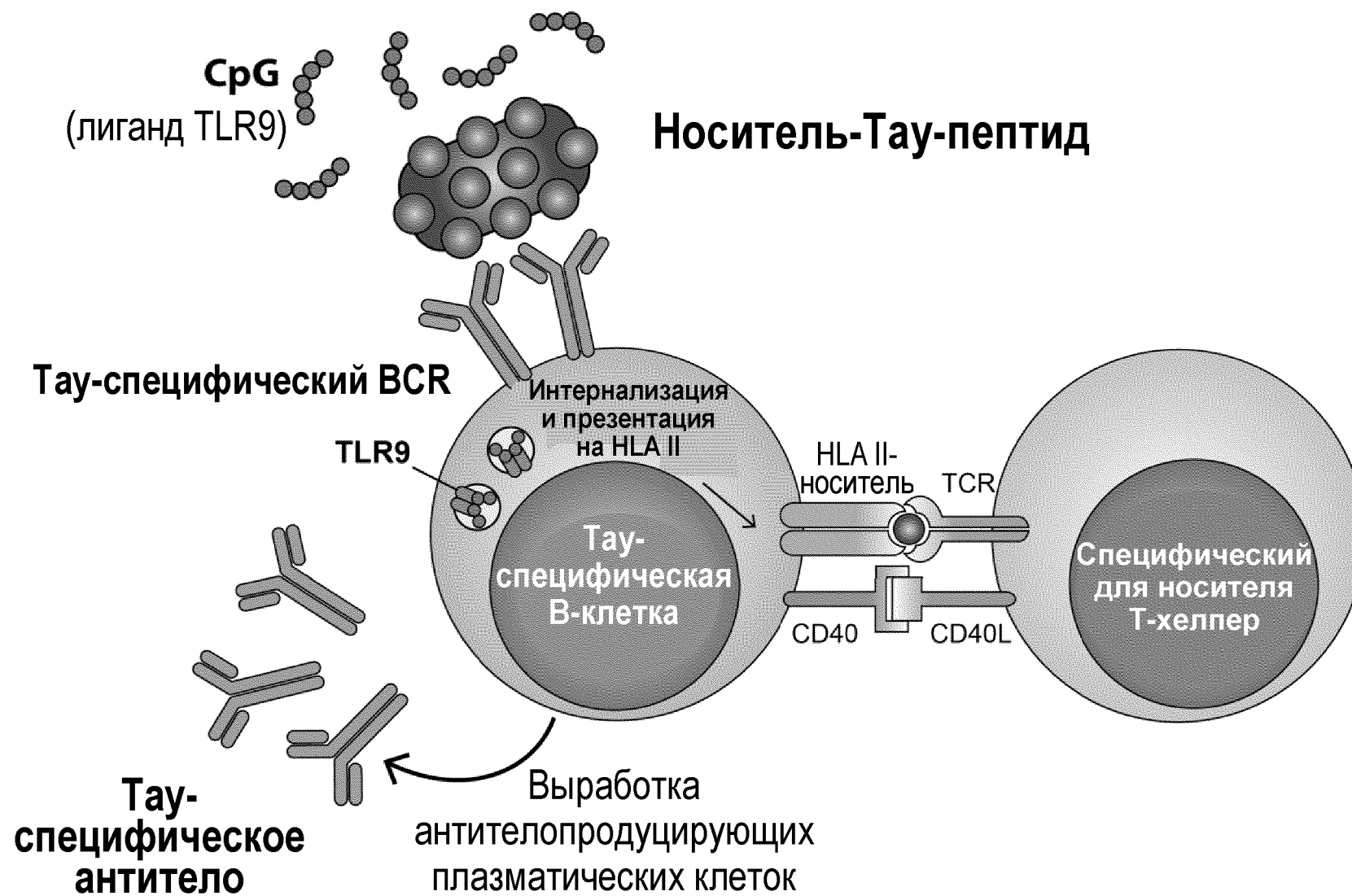
ФИГ.1



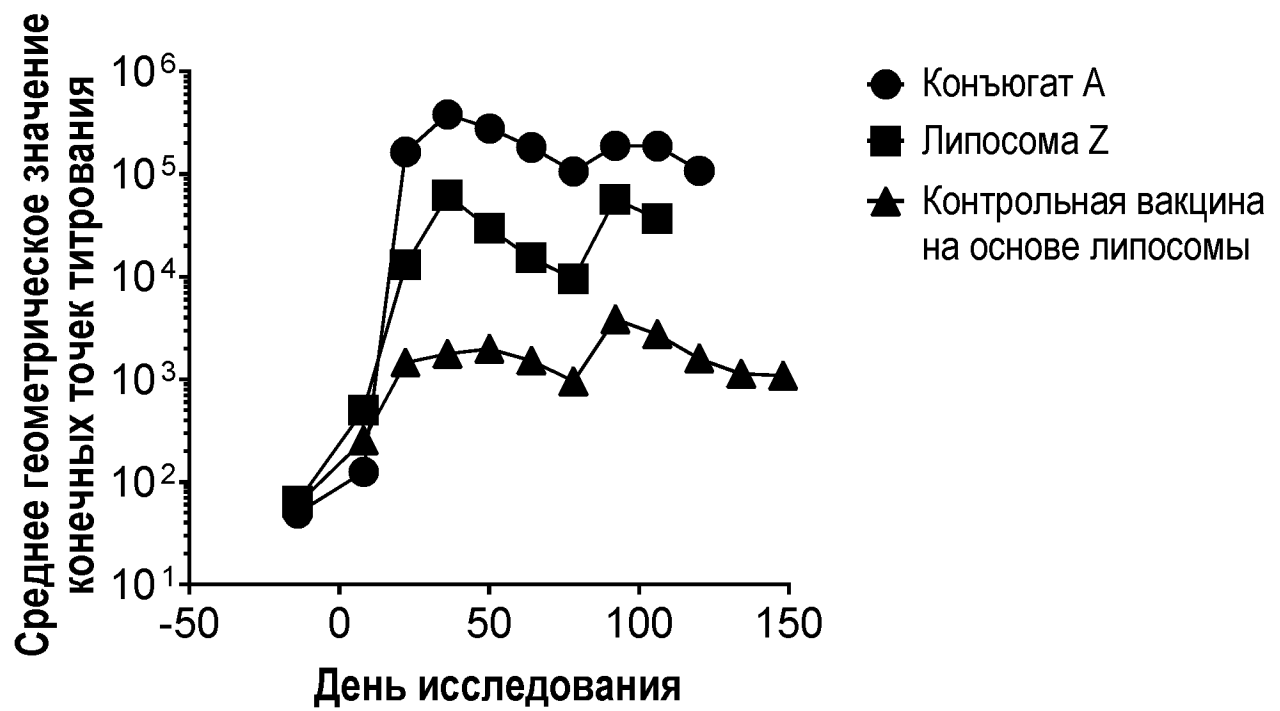
ФИГ.2



ФИГ.3

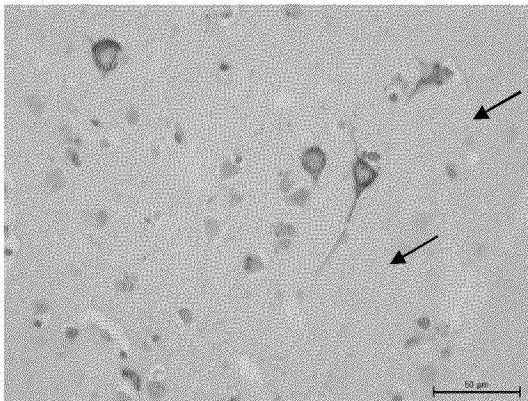


ФИГ.4

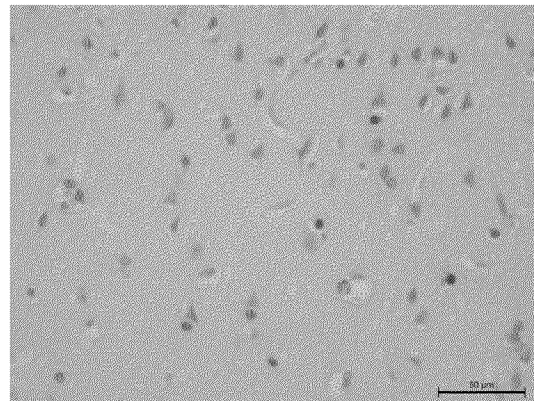


ФИГ.5

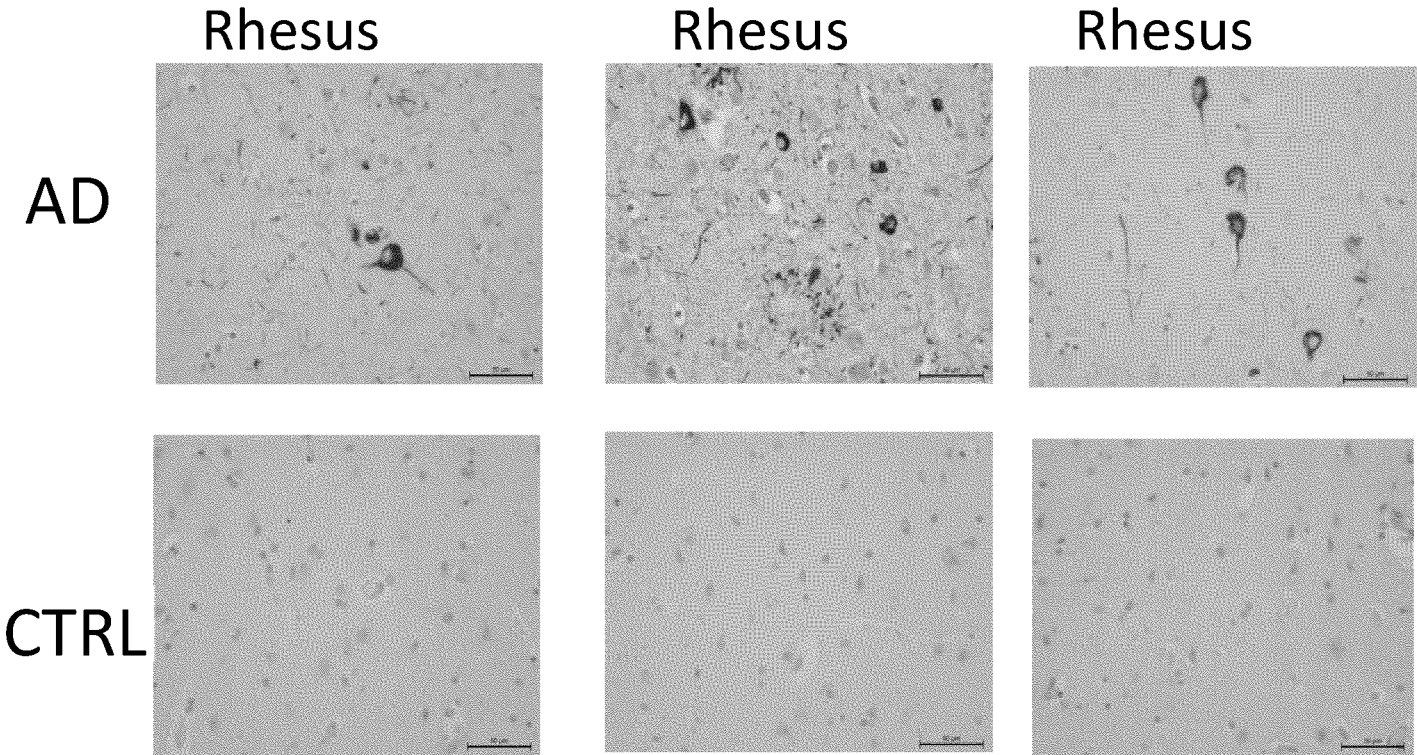
AD Braak V/VI



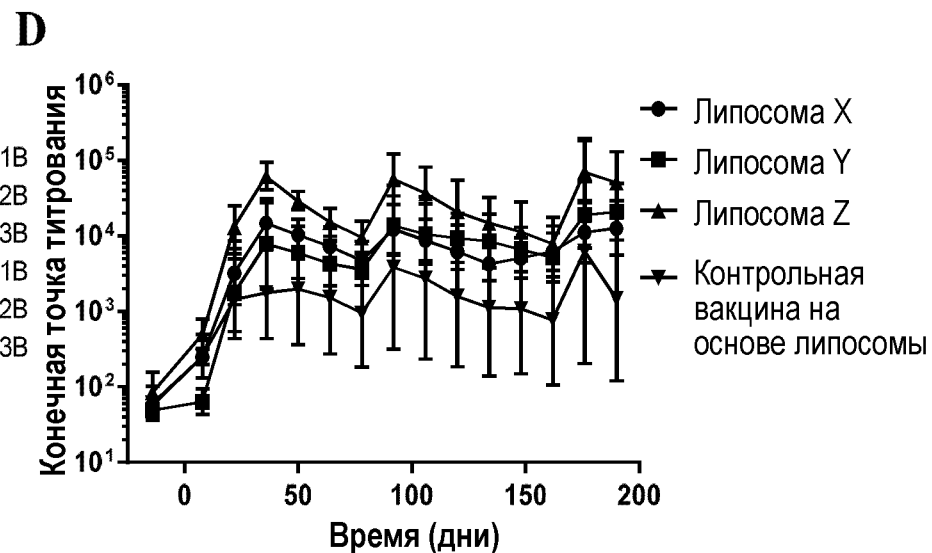
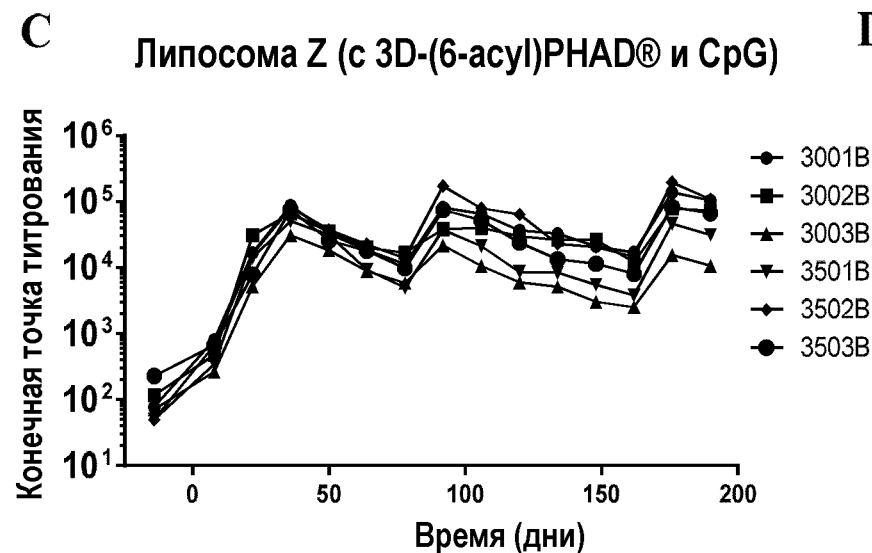
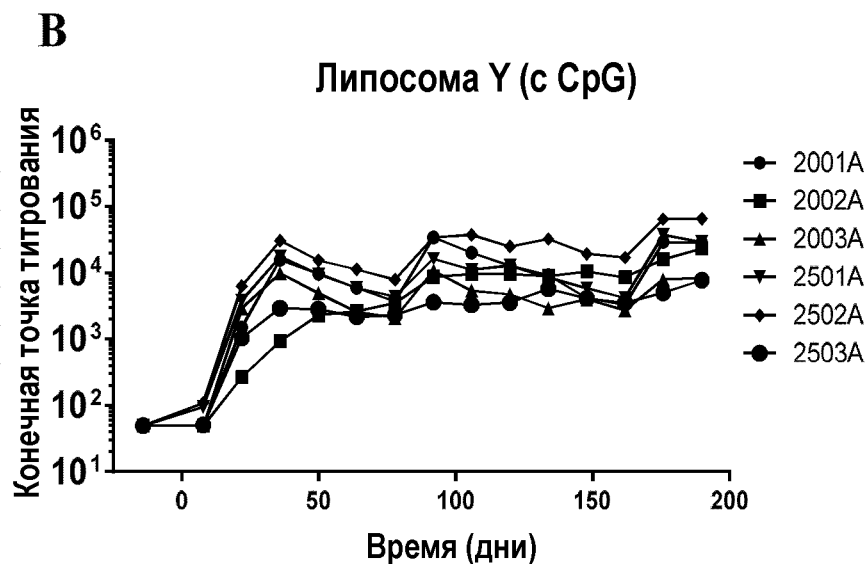
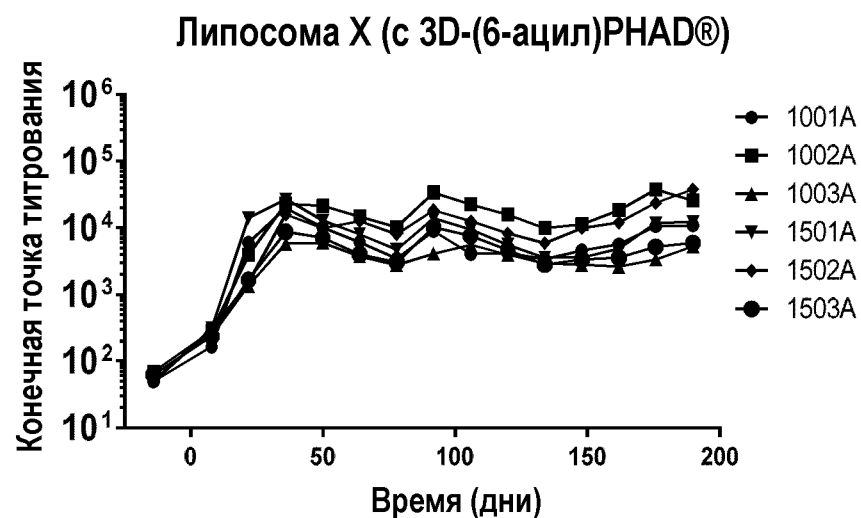
Здоровый донор



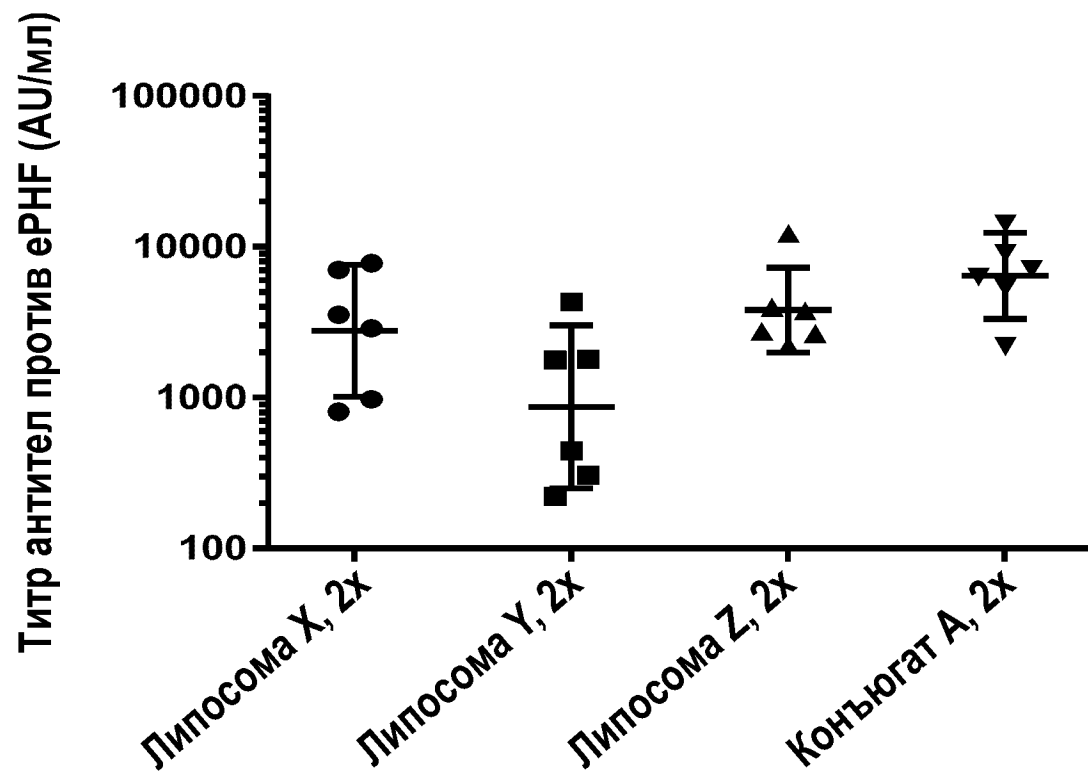
ФИГ.6



ФИГ.7

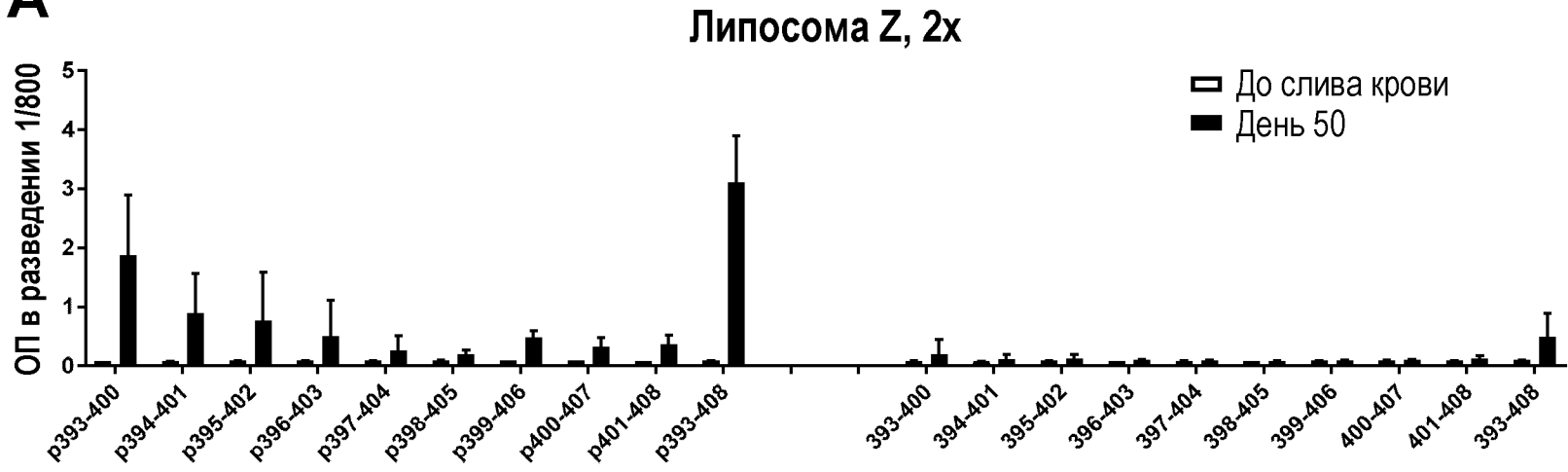


ФИГ.8

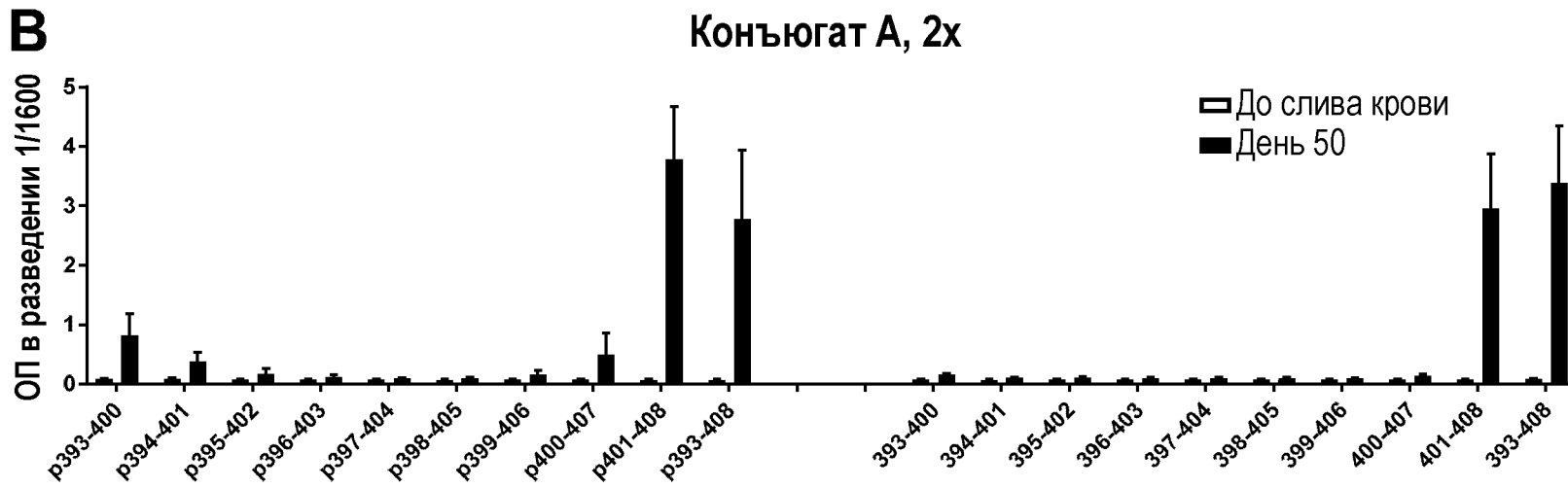


ФИГ.9

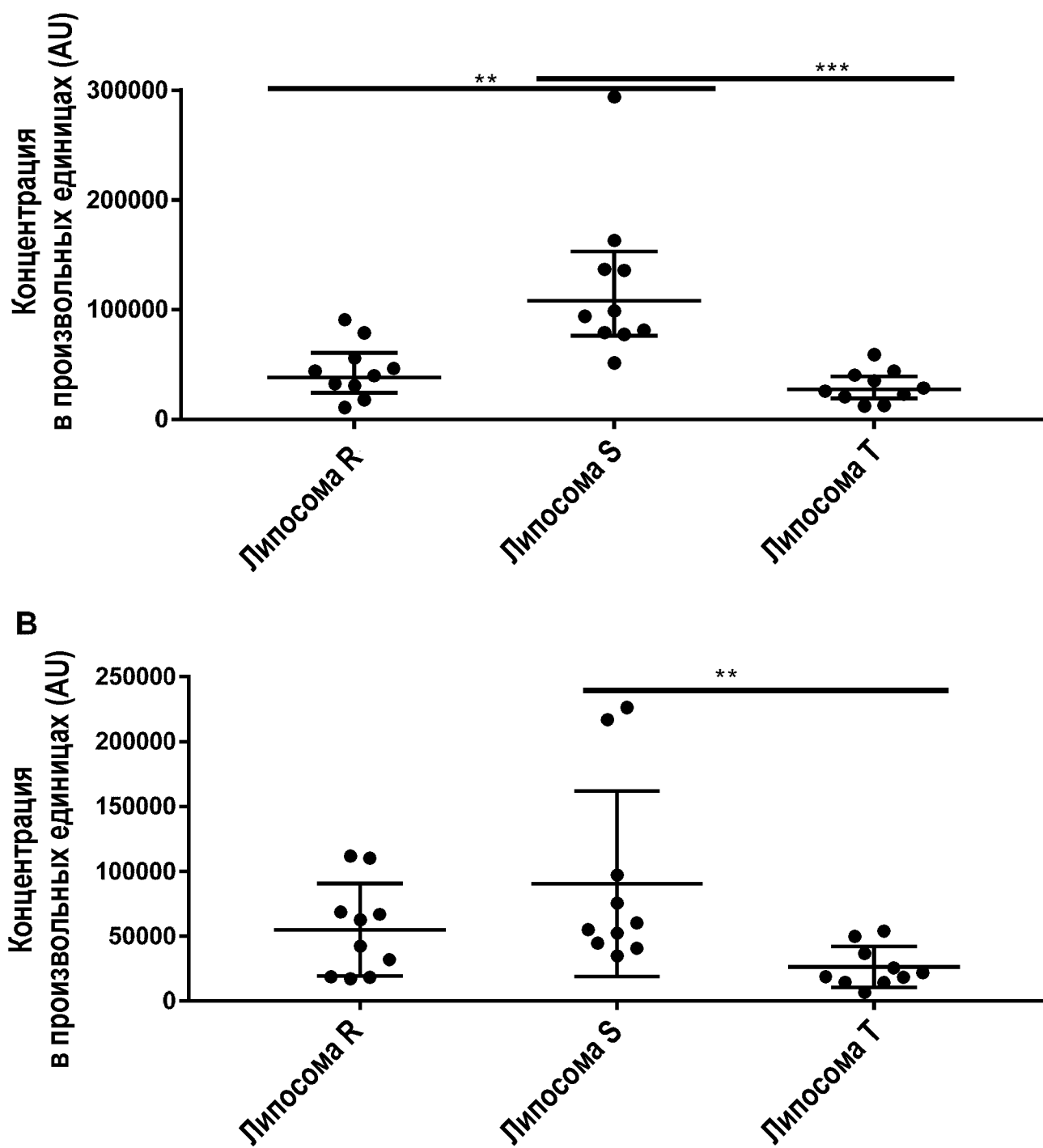
A



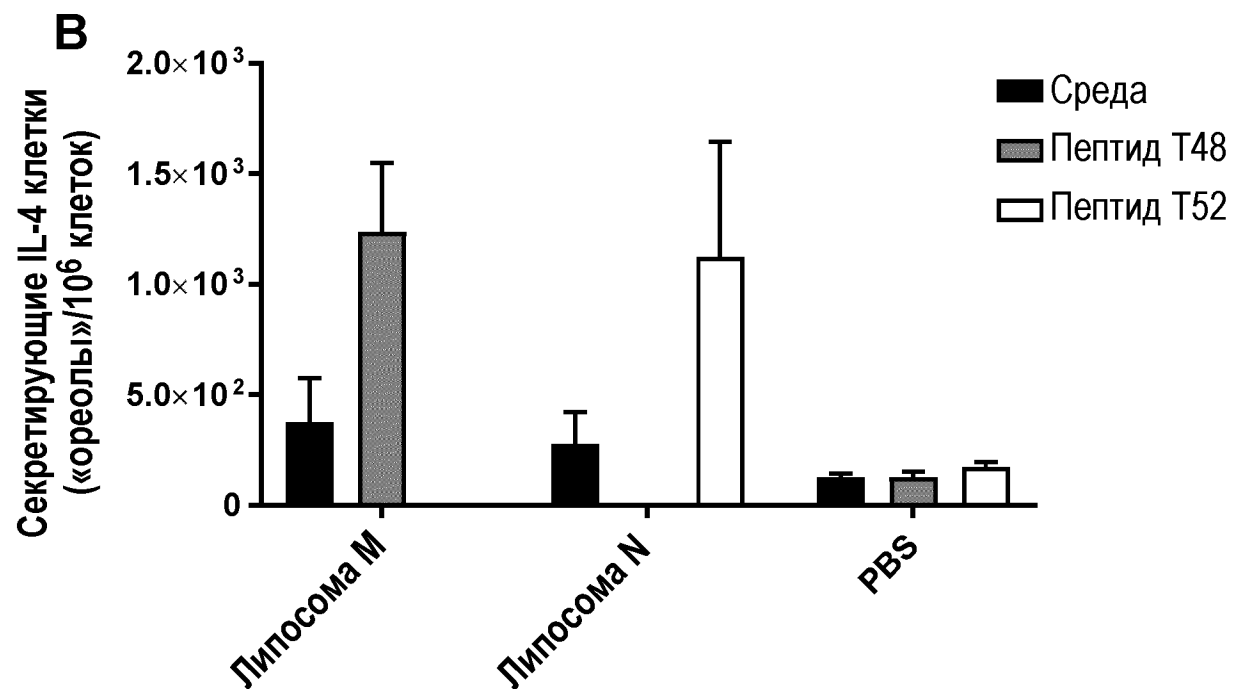
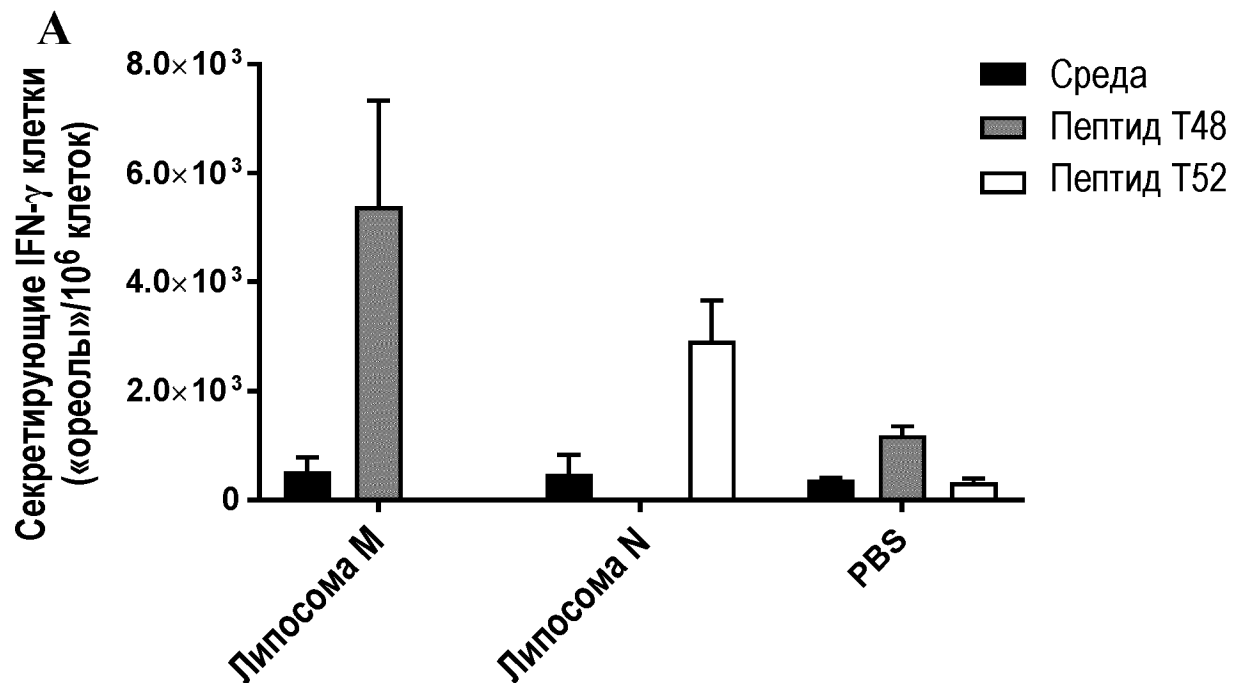
B



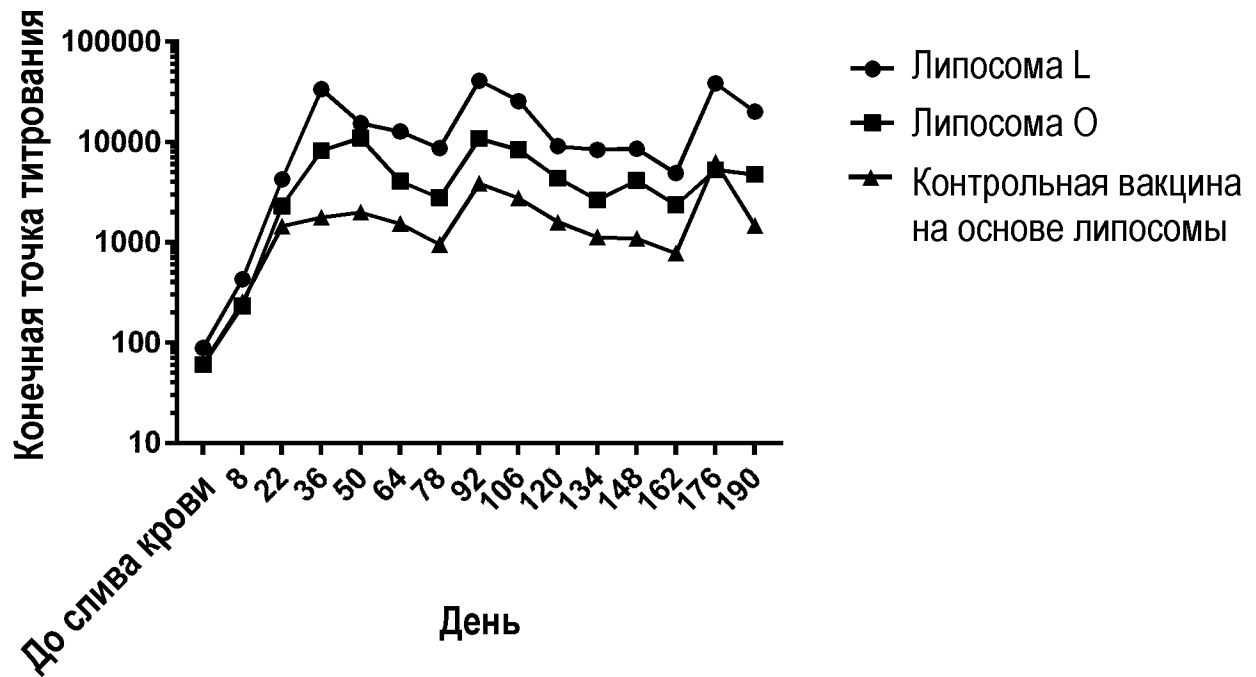
ФИГ.10



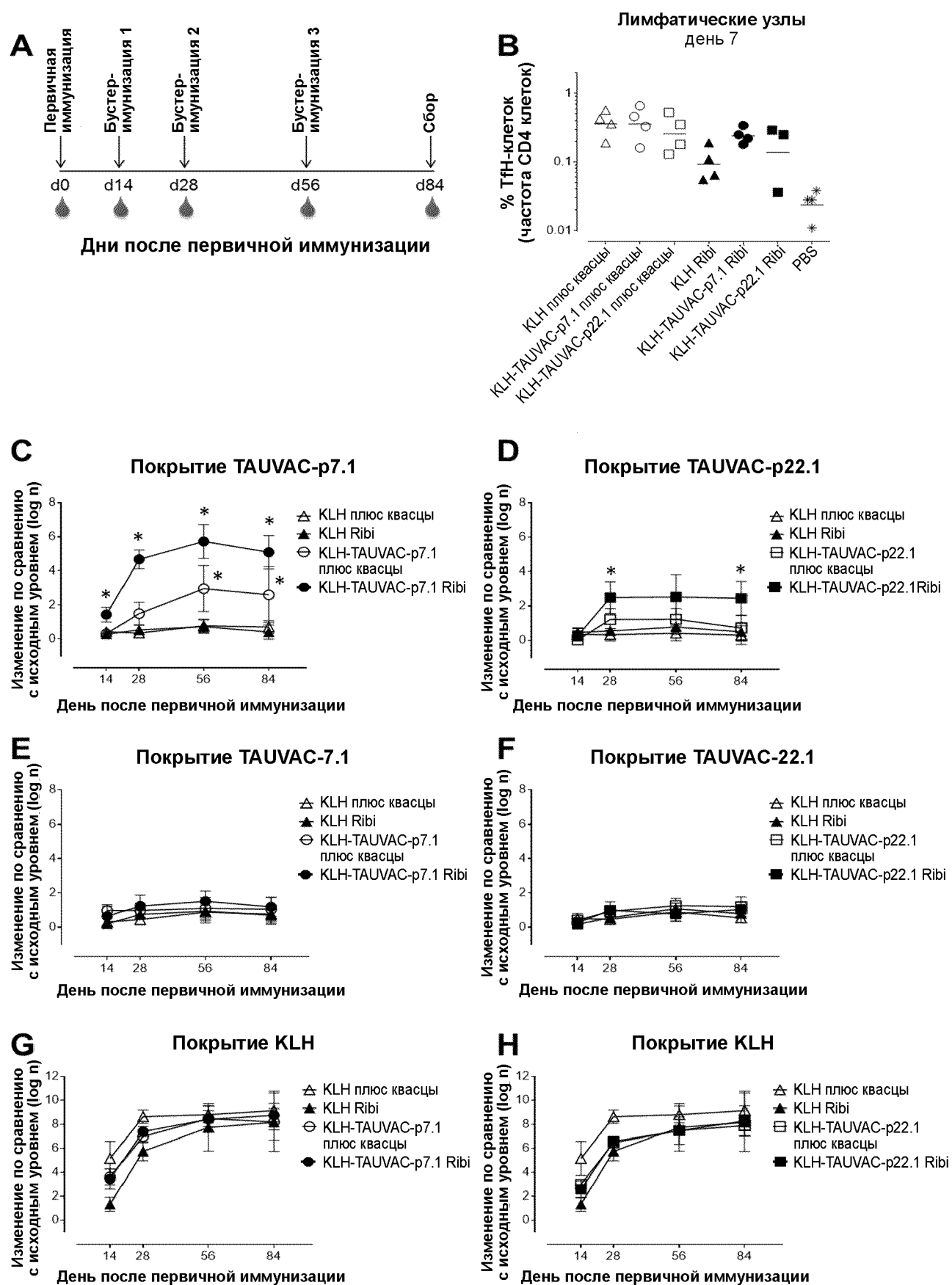
ФИГ.11



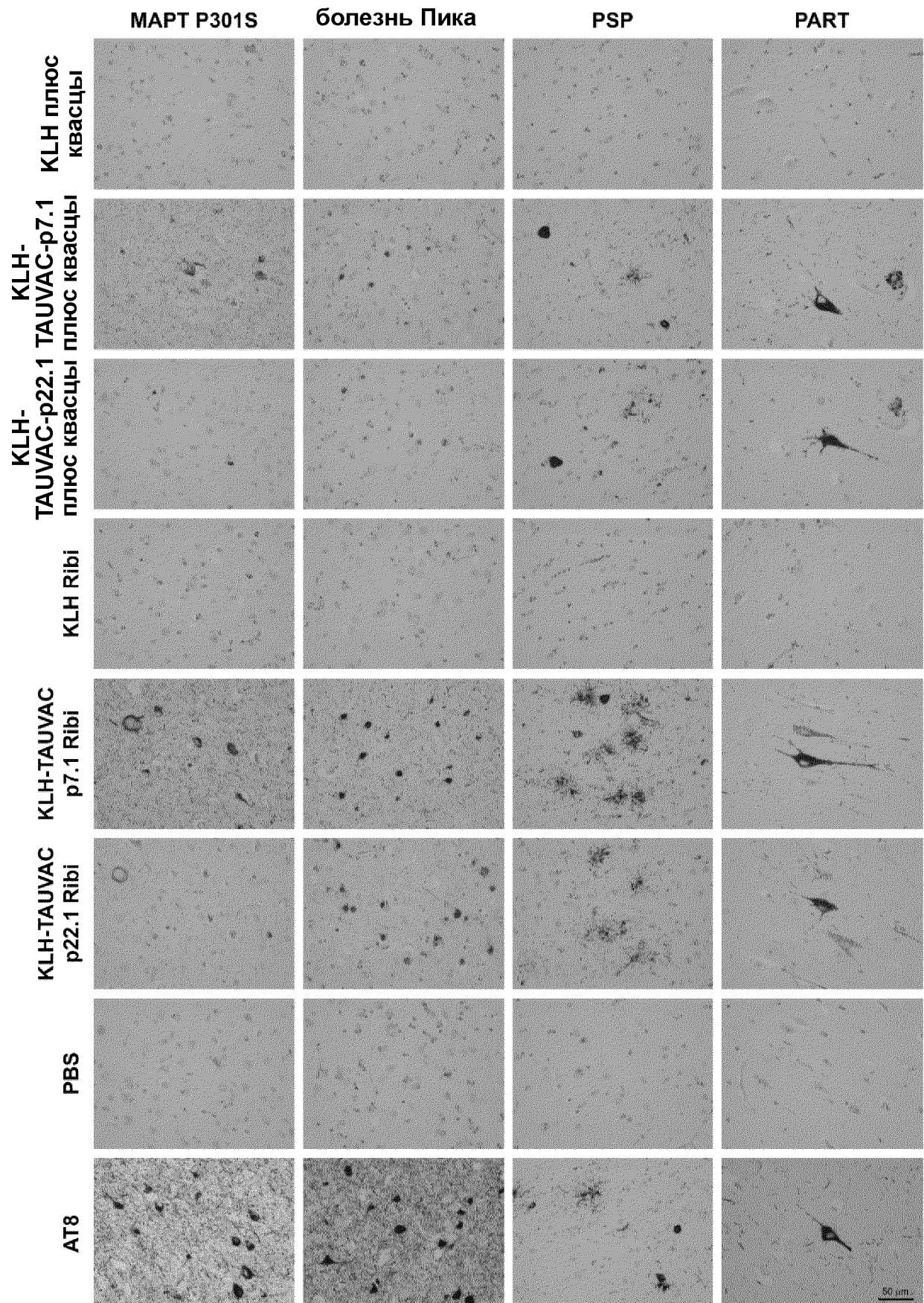
ФИГ.12



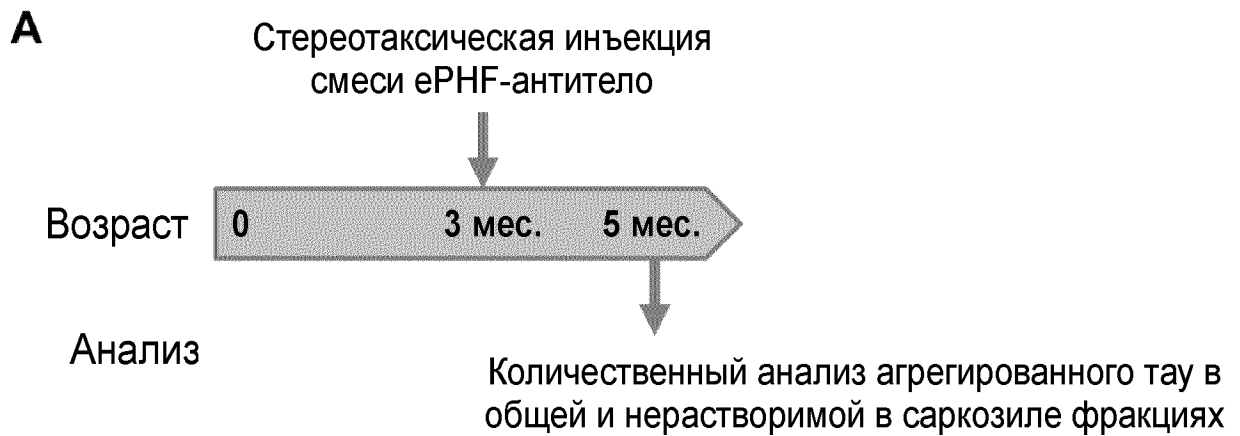
ФИГ.13



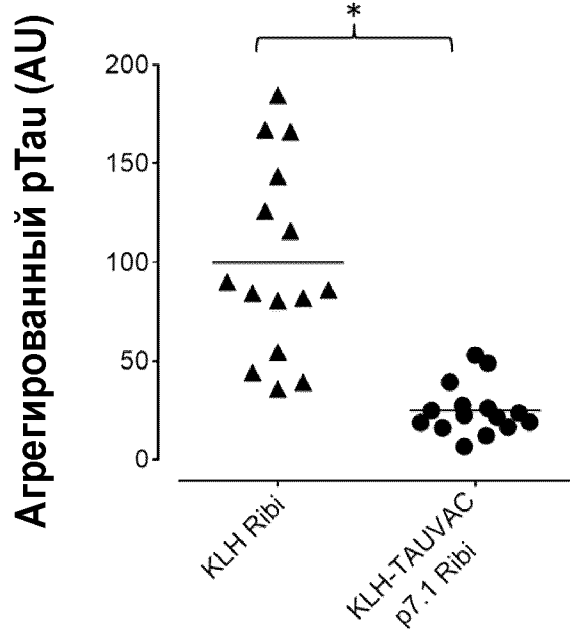
ФИГ.14



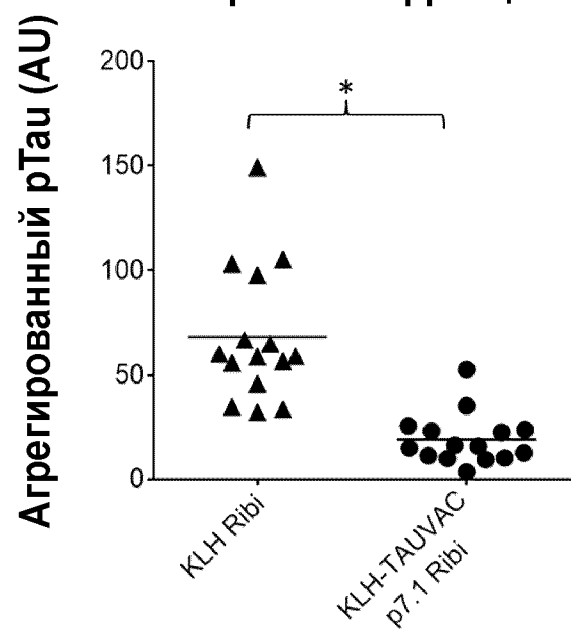
ФИГ.15



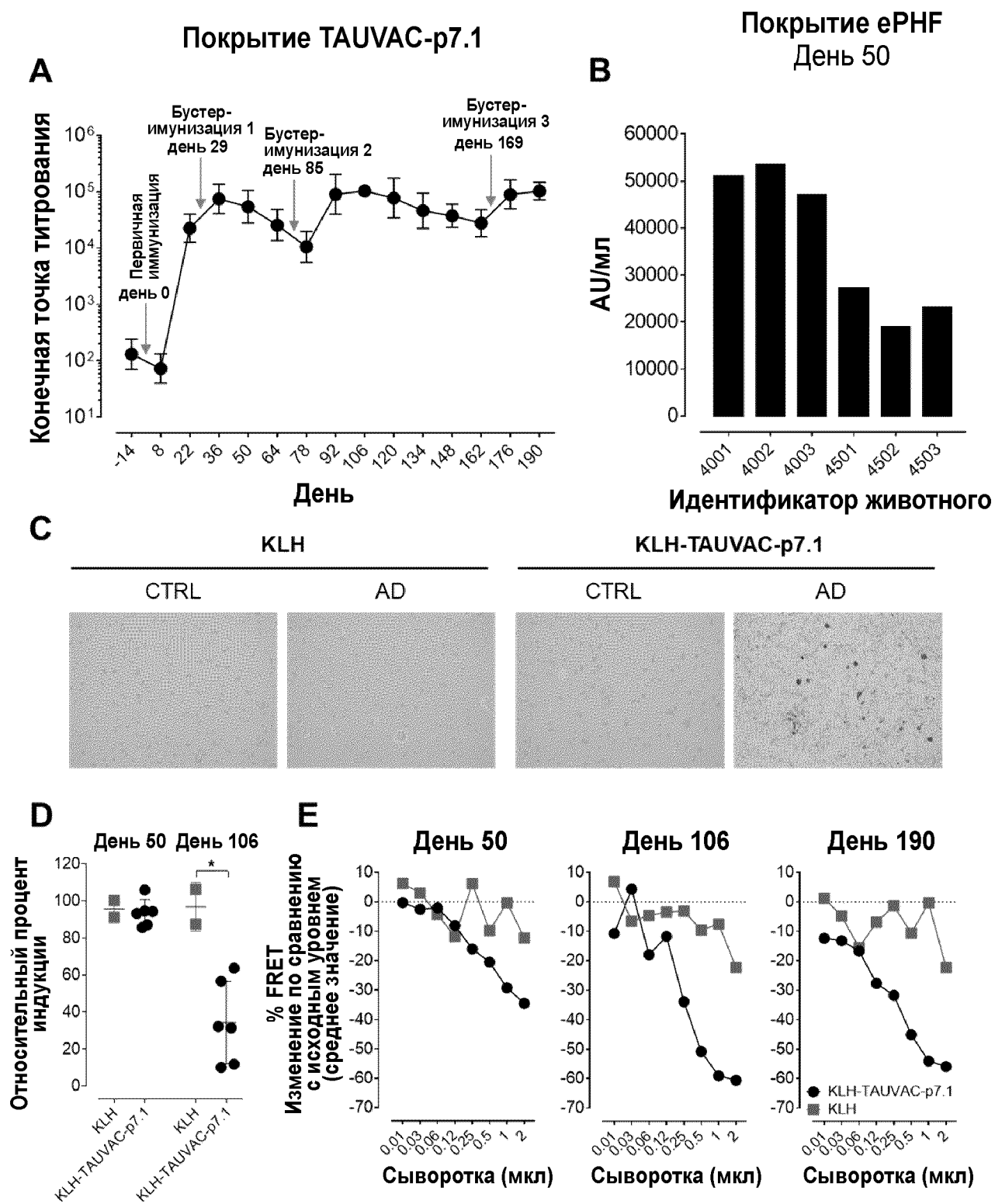
B Анализ MSD общей фракции



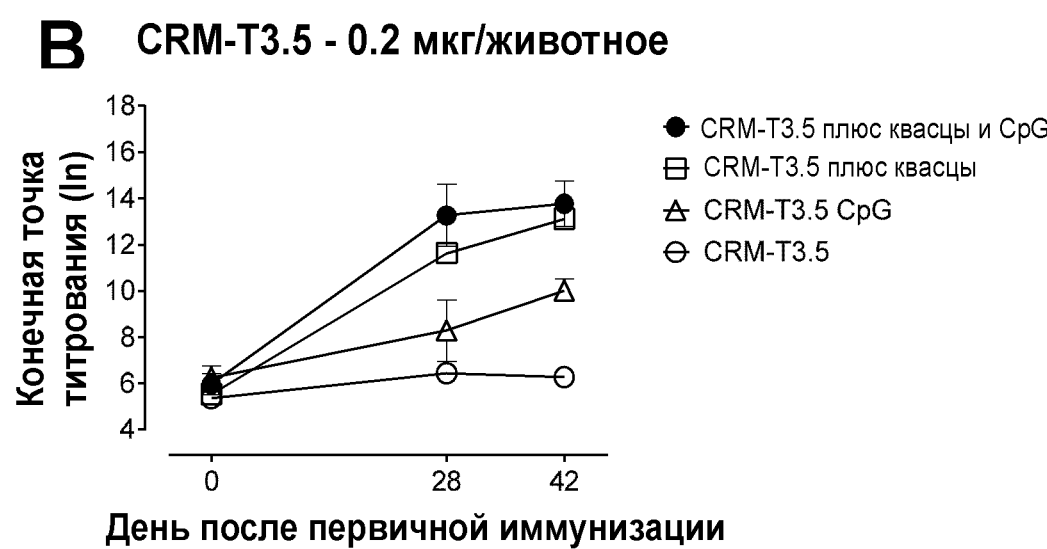
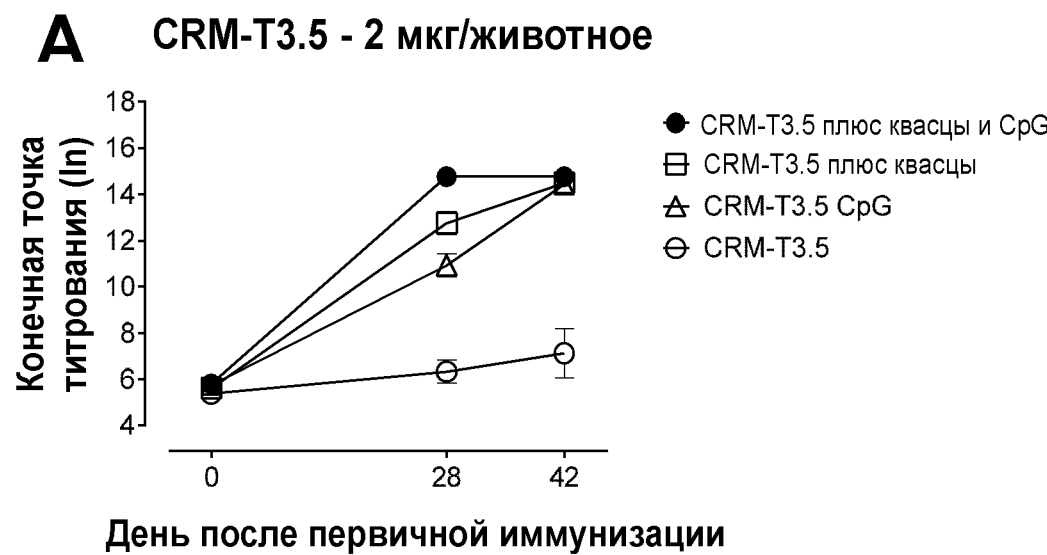
C Анализ MSD нерастворимой в саркозиде фракции



ФИГ.16



ФИГ.17



Сравнение групп

Группа 1	Группа 2	Не скорректир. р-значение
ДЕНЬ 28		
CRM-T3.5 плюс квасцы	CRM-T3.5	0.0022
CRM-T3.5 CpG	CRM-T3.5	0.0022
CRM-T3.5 плюс квасцы и CpG	CRM-T3.5	0.0028
CRM-T3.5 плюс квасцы и CpG	CRM-T3.5 плюс квасцы	0.0028
CRM-T3.5 плюс квасцы и CpG	CRM-T3.5 CpG	0.0028
ДЕНЬ 42		
CRM-T3.5 плюс квасцы	CRM-T3.5	0.0075
CRM-T3.5 CpG	CRM-T3.5	0.0075
CRM-T3.5 плюс квасцы и CpG	CRM-T3.5	0.0039
CRM-T3.5 плюс квасцы и CpG	CRM-T3.5 плюс квасцы	0.0740
CRM-T3.5 плюс квасцы и CpG	CRM-T3.5 CpG	0.0740

ДЕНЬ 28		
CRM-T3.5 плюс квасцы	CRM-T3.5	0.0022
CRM-T3.5 CpG	CRM-T3.5	0.1320
CRM-T3.5 плюс квасцы и CpG	CRM-T3.5	0.0152
CRM-T3.5 плюс квасцы и CpG	CRM-T3.5 плюс квасцы	0.0649
CRM-T3.5 плюс квасцы и CpG	CRM-T3.5 CpG	0.1994
ДЕНЬ 42		
CRM-T3.5 плюс квасцы	CRM-T3.5	0.0022
CRM-T3.5 CpG	CRM-T3.5	0.0043
CRM-T3.5 плюс квасцы и CpG	CRM-T3.5	0.0043
CRM-T3.5 плюс квасцы и CpG	CRM-T3.5 плюс квасцы	0.0609
CRM-T3.5 плюс квасцы и CpG	CRM-T3.5 CpG	0.0497

ФИГ.18

