(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202192891 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.02.04

(22) Дата подачи заявки
2020.04.23

(51) Int. Cl. ***A61K 39/395*** (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 47/6801 (2006.01)

(54) ГЕТЕРОЛОГИЧНОЕ ВВЕДЕНИЕ АНТИ-ТАУ ВАКЦИН

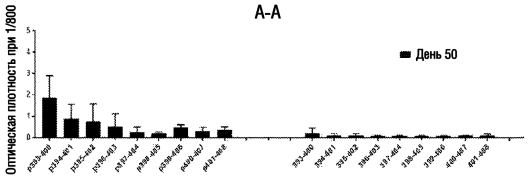
(31) **62/837,987**
(32) **2019.04.24**
(33) **US**
(86) **PCT/US2020/029477**
(87) **WO 2020/219646 2020.10.29**

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

(72) Изобретатель:
Рамсбург Элизабет Энн, Де Марко Доната, Чаккумкал 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 способы индукции иммунного ответа против тау-белка у субъекта, страдающего нейродегенеративным заболеванием, расстройством или состоянием, таким как болезнь Альцгеймера. Способы включают введение липосомальной примирующей композиции, содержащей пептиды тау, предпочтительно фосфорилированные пептиды тау, и конъюгированной бустерной композиции, содержащей пептиды тау, предпочтительно фосфорилированные пептиды тау, конъюгированные с иммуногенным носителем.



202192891 A1

202192891 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-571563EA/085

ГЕТЕРОЛОГИЧНОЕ ВВЕДЕНИЕ АНТИ-ТАУ ВАКЦИН

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0001] Настоящее изобретение относится к области медицины. Изобретение, в частности, относится к способам индукции иммунного ответа против тау-белка у субъекта, страдающего нейродегенеративным заболеванием, расстройством или состоянием, с помощью липосомальной примирующей композиции, содержащей пептид тау, и бустерной композиции на основе конъюгата, содержащей пептид тау, конъюгированный с иммуногенным носителем.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] Болезнь Альцгеймера (БА) представляет собой прогрессирующее изнуряющее нейродегенеративное заболевание, которым страдают примерно 44 миллиона человек во всем мире (Alzheimers.net). Доступная в настоящее время в клинических условиях терапия БА направлена на замедление прогрессирования клинических симптомов, но не на патогенные процессы, лежащие в основе заболевания. К сожалению, эти терапии эффективны в минимальной степени, поэтому существует острая необходимость в разработке и испытании дополнительных профилактических и терапевтических мер.

[0003] Отличительными патологиями болезни Альцгеймера является накопление внеклеточных бляшек, содержащих агрегированный бета-амилоидный белок и внутриклеточные «клубки» или скопления гиперфосфорилированного тау-белка. Молекулярные события, которые приводят к накоплению этих белков, плохо изучены. Относительно амилоида имеются предположения, что аберрантное расщепление белка-предшественника амилоида приводит к накоплению склонного к агрегации фрагмента, содержащего аминокислоты 1-42. Относительно тау-белка предполагается, что к аберрантному фосфорилированию тау приводит нарушение регуляции либо киназ, либо фосфатаз, либо и тех, и других. Когда тау становится гиперфосфорилированным, он теряет способность эффективно связывать и стабилизировать микротрубочки и вместо этого накапливается в цитоплазме пораженного нейрона. Несвязанный и гиперфосфорилированный тау-белок, по-видимому, сначала формирует олигомеры, а затем агрегаты более высокого порядка, присутствие которых, как предполагается, оказывает отрицательное влияние на функцию нейрона, в котором они формируются, возможно, через прерывание нормального транспорта в аксонах.

[0004] В развитых странах людей, у которых диагностирована болезнь Альцгеймера или другие дементирующие таупатии, обычно лечат ингибиторами холинэстеразы (например, Aricept®) или мемантинами (например, Namenda™). Эти препараты, хотя и являются достаточно хорошо переносимыми, обладают очень скромной эффективностью. Например, Aricept® сдерживает ухудшение симптомов на 6-12 месяцев примерно у 50% пациентов, прошедших лечение. Остальная часть лечения является немедикаментозной и направлена на повышение способности пациентов справляться с повседневными задачами

по мере снижения их когнитивных способностей.

[0005] Несколько опубликованных исследований (Asuni AA et al., J Neurosci. 2007 Aug 22; 27(34):9115-29., Theunis C. et al., PLoS One. 2013; 8(8):e72301., Kontsekova E et al., Alzheimers Res Ther. 2014 Aug 1; 6(4):44) показали, что активные вакцины, содержащие пептиды тау, могут вызывать иммунные ответы против тау-белка у мышей или крыс; уменьшать накопление патологических агрегатов тау в головном мозге грызунов; и снижать скорость прогрессирования ухудшения когнитивных способностей на животных моделях болезни Альцгеймера. Было показано, что активная вакцина против патологических тау-белков является иммуногенной у людей с болезнью Альцгеймера (Novak P et al., Lancet Neurology 2017, 16:123-134). В WO2010/115843 и WO2019/084118 описан антигенный фосфопептид, имитирующий основной патологический фосфоэпитоп тау-белка, и родственные композиции для терапевтического и диагностического применения для лечения таупатий, включая болезнь Альцгеймера. Однако в настоящее время на рынке все еще отсутствуют одобренные эффективные вакцины, позволяющие предотвратить развитие тау-опосредованного заболевания. На рынке все еще не появились эффективные лекарственные средства, способные остановить или замедлить течение заболевания после его проявления. Поэтому существует острая необходимость в выявлении новых профилактических мер (например, вакцин), которые могут предотвратить развитие этих заболеваний.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] Настоящее изобретение основано на неожиданном открытии того, что гетерологичная вакцинация липосомальной композицией и композицией на основе конъюгата, каждая из которых содержит фосфопептид тау, увеличивает охват эпитопа антителами, специфическими к фосфопептиду тау. Кроме того, было обнаружено, что гетерологичная вакцинация липосомальной примирующей композицией вызывает более сильный иммунный ответ, чем вакцинация примирующей композицией на основе конъюгата.

[0007] В одном из общих аспектов изобретение относится к способу индукции иммунного ответа против тау-белка, предпочтительно индукции антител против по меньшей мере одного фосфорилированного тау-белка и обогащенных парных спиральных филаментов (ePHF) у нуждающегося в этом субъекта, предпочтительно субъекта, страдающего нейродегенеративным расстройством, включающему:

(i) введение субъекту примирующей композиции, содержащей иммунологически эффективное количество липосомы, содержащей:

a. первый фосфопептид тау;

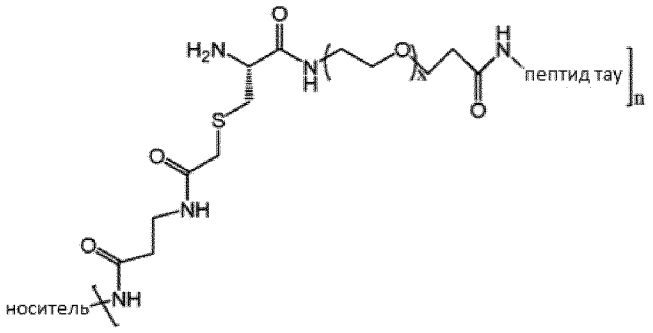
b. эпитоп хелперных Т-клеток;

c. липидированный олигонуклеотид CpG; и

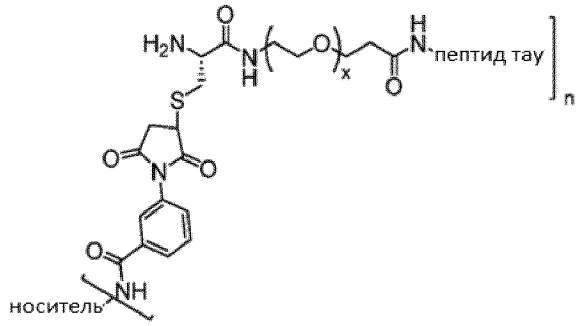
d. адъювант, содержащий лиганд толл-подобного рецептора 4;

где фосфопептид тау презентирован на поверхности липосомы, и примирующая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель; и

(ii) введение субъекту первой бустерной композиции, содержащей иммунологически эффективное количество конъюгата, содержащего второй фосфопептид тау и иммуногенный носитель, конъюгированный с ним через линкер, где конъюгат имеет структуру формулы (I):



или имеет структуру формулы (II):



,

в которой

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

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

пептид тау представляет собой второй фосфопептид тау; и

носитель представляет собой иммуногенный носитель, выбранный из группы, состоящей из гемоцианина лимфы улитки (KLH), столбнячного анатоксина, CRM197 и смеси белков внешней мембраны из *N. meningitidis* (OMP) или производное одного из них; и

первая бустерная композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель;

где первый фосфопептид тау и второй фосфопептид тау, каждый независимо, содержат аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 12.

[0008] В некоторых вариантах осуществления липосома содержит:

a. первый фосфопептид тау с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27 - SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 31 - SEQ ID NO: 38;

b. эпитоп хелперных Т-клеток с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 39 - SEQ ID NO: 44, предпочтительно эпитоп хелперных Т-клеток, состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из

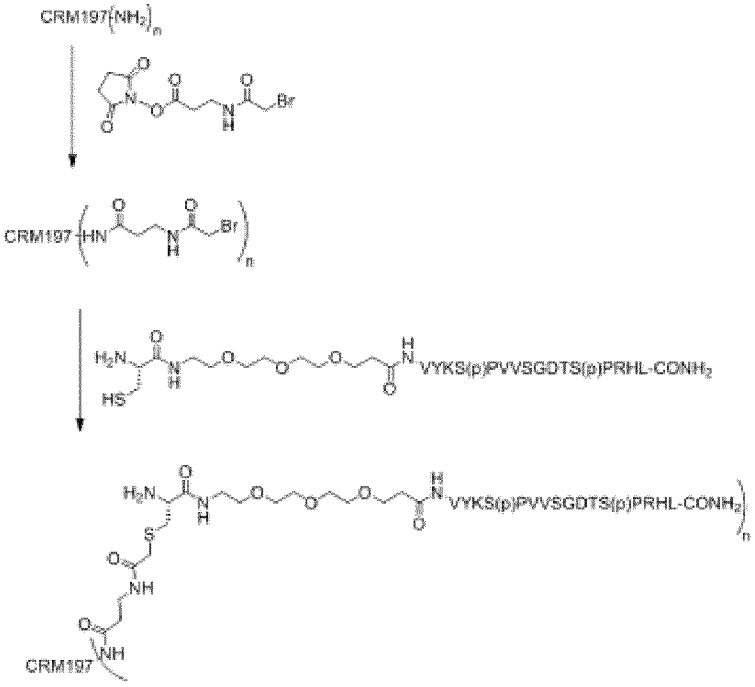
группы, состоящей из SEQ ID NO: 13 - SEQ ID NO: 17;

c. липидированный олигонуклеотид CpG с нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18 - SEQ ID NO: 22, где олигонуклеотид CpG содержит одну или более фосфоротиоатных межнуклеотидных связей, и где олигонуклеотид CpG ковалентно связан по меньшей мере с одним холестерином через линкер; и

d. монофосфориллипид A (MPLA); и

конъюгат содержит второй фосфопептид тау с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27 - SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 31 - SEQ ID NO: 38, конъюгированный с CRM197 через линкер.

[0009] В некоторых вариантах осуществления конъюгат имеет структуру:



где n представляет собой целое число от 3 до 7.

[00010] Согласно варианту осуществления изобретения способ индукции антител против по меньшей мере одного фосфорилированного тау-белка и обогащенных парных спиральных филаментов (ePHF) у нуждающегося в этом субъекта включает:

(i) введение субъекту примирующей композиции, содержащей иммунологически эффективное количество липосомы, содержащей:

a. первый фосфопептид тау с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27 - SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 31 - SEQ ID NO: 38;

b. эпитоп хелперных Т-клеток с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 39 - SEQ ID NO: 44, предпочтительно эпитоп хелперных Т-клеток, состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13 - SEQ ID NO: 17;

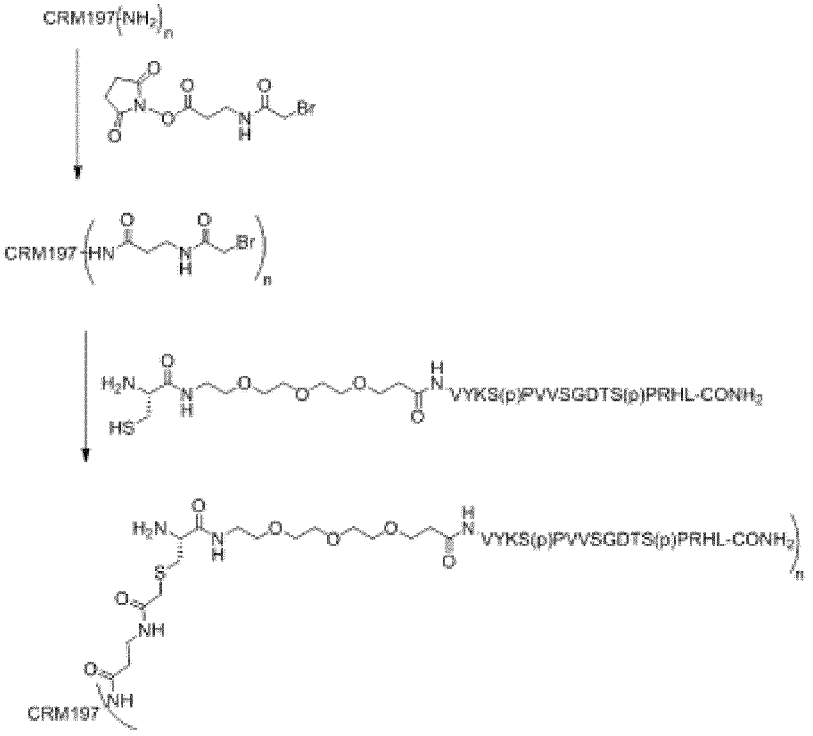
c. липидированный олигонуклеотид CpG с нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18 - SEQ ID NO: 22, где олигонуклеотид

CpG содержит одну или более фосфоротиоатных межнуклеотидных связей, и где олигонуклеотид CpG ковалентно связан по меньшей мере с одним холестерином через линкер; и

d. монофосфориллипид A (MPLA);

где первый фосфопептид тау презентирован на поверхности липосомы, и примирующая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель; и

(ii) введение субъекту первой бустерной композиции, содержащей иммунологически эффективное количество конъюгата, содержащего второй фосфопептид тау и иммуногенный носитель, конъюгированный с ним через линкер, где конъюгат имеет структуру:



где n представляет собой целое число от 3 до 7, и первая бустерная композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

[00011] Согласно другому варианту осуществления изобретения, способ индукции антител против по меньшей мере одного из фосфорилированного тау-белка и обогащенных парных спиральных филаментов (ePHF) у нуждающегося в этом субъекта включает:

(i) введение субъекту примирующей композиции, содержащей иммунологически эффективное количество липосомы, содержащей:

(1) первый фосфопептид тау с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28;

(2) агонист толл-подобного рецептора 4, содержащий 3-деацил монофосфорил-гексаацил-липид A;

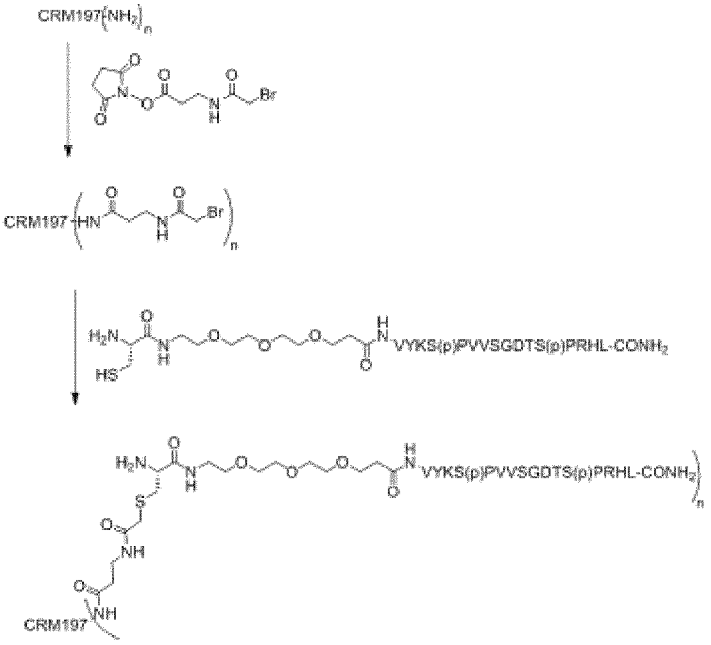
(3) эпитоп хелперных Т-клеток, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39;

(4) липидированный олигонуклеотид CpG, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 18; и

(5) по меньшей мере один липид, выбранный 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,

где первый фосфопептид тау презентирован на поверхности липосомы, и примирующая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель; и

(ii) введение субъекту первой бустерной композиции, содержащей иммунологически эффективное количество конъюгата, содержащего второй фосфопептид тау и иммуногенный носитель, конъюгированный с ним через линкер, где конъюгат имеет структуру:



где n представляет собой целое число от 3 до 7, и первая бустерная композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

[00012] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту первой бустерной композиции по меньшей мере один раз после первичного введения первой бустерной композиции.

[00013] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту второй бустерной композиции, содержащей иммунологически эффективное количество липосомы и фармацевтически приемлемый носитель. Вторую бустерную композицию можно вводить до или после первичного введения первой бустерной композиции.

[00014] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту второй бустерной композиции по меньшей мере один раз после первичного введения второй бустерной композиции.

[00015] Согласно одному из вариантов осуществления изобретения способ

индукции антител против по меньшей мере одного из фосфорилированного тау-белка и обогащенных парных спиральных филаментов (ePHF) у нуждающегося в этом субъекта включает:

(i) введение субъекту примирующей композиции, содержащей иммунологически эффективное количество липосомы, содержащей:

(1) первый фосфопептид тау с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28;

(2) агонист толл-подобного рецептора 4, содержащий 3-деацил монофосфорил-гексаацил-липид А;

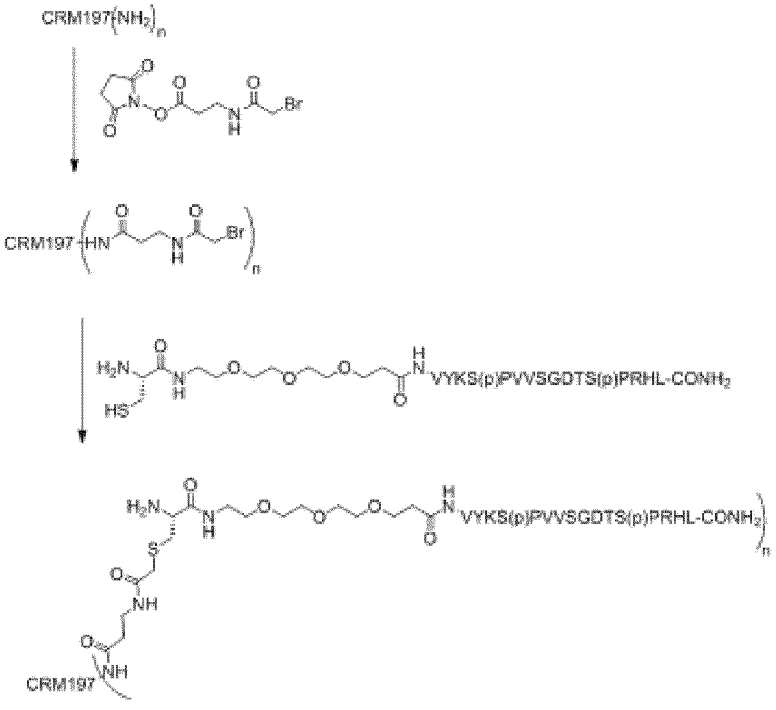
(3) эпитоп хелперных Т-клеток, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39;

(4) липидированный олигонуклеотид CpG, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 18; и

(5) по меньшей мере один липид, выбранный 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,

где первый фосфопептид тау презентирован на поверхности липосомы, и примирующая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель;

(ii) введение субъекту первой бустерной композиции, содержащей иммунологически эффективное количество конъюгата, содержащего второй фосфопептид тау и иммуногенный носитель, конъюгированный с ним через линкер, где конъюгат имеет структуру:



где n представляет собой целое число от 3 до 7, и первая бустерная композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель; и

(iii) введение субъекту первой бустерной композиции или второй бустерной композиции, содержащей иммунологически эффективное количество липосомы и фармацевтически приемлемый носитель.

[00016] В некоторых вариантах осуществления этап (ii) выполняют перед этапом (iii).

[00017] В других вариантах осуществления этап (ii) выполняют после этапа (iii).

[00018] В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту первой бустерной композиции по меньшей мере два раза для бустирования (усиления) иммунного ответа.

[00019] В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту второй бустерной композиции по меньшей мере один раз для бустирования иммунного ответа.

[00020] В некоторых вариантах осуществления первую бустерную композицию вводят примерно через 27-32 дня после введения примирующей композиции. Предпочтительно, способ дополнительно включает повторное введение первой бустерной композиции примерно через 82-87 дней после первичного введения примирующей композиции и, необязательно, дополнительно включает введение второй бустерной композиции примерно через 167-172 дней после введения примирующей композиции.

[00021] В некоторых вариантах осуществления первую бустерную композицию вводят примерно через 82-87 дней после введения примирующей композиции. Предпочтительно, способ дополнительно включает введение второй бустерной композиции примерно через 27-32 дня после введения примирующей композиции и, необязательно, дополнительно включает повторное введение первой бустерной композиции примерно через 167-172 дней после введения примирующей композиции.

[00022] В некоторых вариантах осуществления иммунологически эффективное количество липосомы содержит от примерно 25 нмоль до примерно 750 нмоль на дозу первого фосфопептида тау, например от примерно 29,7 нмоль до примерно 742,5 нмоль на дозу, предпочтительно от примерно 90 нмоль до примерно 715 нмоль на дозу, например от примерно 89,1 нмоль до примерно 712,8 нмоль на дозу, или от примерно 90 нмоль до примерно 535 нмоль на дозу, например от примерно 89,1 нмоль до примерно 534,6 нмоль на дозу, или от примерно 90 нмоль до примерно 275 нмоль на дозу, например от примерно 89,1 нмоль до примерно 267,3 нмоль на дозу первого фосфопептида тау, где первый фосфопептид тау презентирован на поверхности липосомы. В одном из вариантов осуществления эффективное количество липосомы содержит первый фосфопептид тау в количестве от примерно 265 до примерно 275 нмоль на дозу, например, примерно 265, примерно 266, примерно 267, примерно 268, примерно 269, примерно 270, примерно 271 нмоль, примерно 272, примерно 273, примерно 274 или примерно 275 нмоль на дозу или любое промежуточное значение, такое как примерно 267,3 нмоль на дозу. В другом варианте осуществления иммунологически эффективное количество липосомы содержит первый фосфопептид тау в количестве от примерно 530 до примерно 540 нмоль на дозу,

например, примерно 530, примерно 531, примерно 532, примерно 533, примерно 534, примерно 535, примерно 536, примерно 537, примерно 538, примерно 539 или примерно 540 нмоль на дозу или любое промежуточное значение, такое как примерно 534,6 нмоль на дозу. В другом варианте осуществления эффективное количество липосомы содержит первый фосфопептид тау в количестве от примерно 710 до примерно 720 нмоль на дозу, например, примерно 710, примерно 711, примерно 712, примерно 713, примерно 714, примерно 715, примерно 716, примерно 717, примерно 718, примерно 719 или примерно 720 нмоль на дозу или любое промежуточное значение, такое как примерно 712,8 нмоль на дозу.

[00023] В некоторых вариантах осуществления первый фосфопептид тау состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27 - SEQ ID NO: 29 и от SEQ ID NO: 31 до SEQ ID NO: 38, предпочтительно состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28. В одном из вариантов осуществления иммунологически эффективное количество липосомы содержит тетрапальмитоилированный фосфопептид тау, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28, где тетрапальмитоилированный фосфопептид тау презентирован на поверхности липосомы, и вводится в количестве примерно от 100 мкг до примерно 2500 мкг на дозу, что соответствует от примерно 29,7 нмоль до примерно 742,5 нмоль на дозу, предпочтительно от примерно 300 мкг до примерно 2400 мкг на дозу, что соответствует от примерно 89,1 нмоль до примерно 712,8 нмоль на дозу, например, примерно 300 мкг, примерно 900 мкг, примерно 1800 мкг или примерно 2400 мкг на дозу, что соответствует примерно 89,1 нмоль, примерно 267,3 нмоль, примерно 534,6 нмоль или примерно 712,8 нмоль на дозу.

[00024] В некоторых вариантах осуществления иммунологически эффективное количество липосомы включает эпитоп хелперных Т-клеток в количестве от примерно 2 нмоль до примерно 110 нмоль на дозу, например от примерно 4,02 нмоль до примерно 100,44 нмоль на дозу, или от примерно 4 нмоль до примерно 72 нмоль на дозу, например от примерно 4,02 нмоль до примерно 72,32 нмоль на дозу, или от примерно 10 нмоль до примерно 105 нмоль на дозу, например от примерно 12,06 нмоль до примерно 100,44 нмоль на дозу, или от примерно 70 до примерно 105 нмоль на дозу, например от примерно 72,32 нмоль до примерно 100,44 нмоль на дозу. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество липосомы содержит эпитоп хелперных Т-клеток, который предпочтительно представляет собой эпитоп Т50 хелперных Т-клеток, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13, в количестве от примерно 2 нмоль до примерно 110 нмоль, например от примерно 12,06 нмоль до примерно 100,44 нмоль.

[00025] Изобретение также относится к комбинации вакцин, такой как набор липосом и конъюгатов по изобретению для применения для индукции иммунного ответа против тау-белка у субъекта, страдающего нейродегенеративным расстройством, или для применения для лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания или расстройства у нуждающегося в этом субъекта.

[00026] Изобретение также относится к применению комбинации вакцин на основе липосом и конъюгатов по изобретению в производстве лекарственного средства для индукции иммунного ответа против тау-белка у субъекта, страдающего нейродегенеративным расстройством, или для лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания или расстройства у нуждающегося в этом субъекта.

[00027] Дополнительные аспекты, признаки и преимущества настоящего изобретения будут лучше оценены после прочтения приведенных ниже подробного описания изобретения и формулы изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[00028] Приведенное выше краткое изложение, а также приведенное ниже подробное описание предпочтительных вариантов осуществления настоящей заявки будет лучше понято при изучении вместе с прилагаемыми чертежами. Однако следует понимать, что заявка не ограничена точными вариантами осуществления, показанными на чертежах.

[00029] На фиг.1A-1C показан профиль распознавания эпитопа для антител, индуцированных гомологичной вакцинацией A-A (фиг.1A) или B-B (фиг.1B) или гетерологичной вакцинацией A-B (фиг.1C), определенный методом ELISA для картирования эпитопа короткими 8-мерными перекрывающимися пептидами, охватывающими SEQ ID NO: 2 фосфопептида и SEQ ID NO: 4 пептида;

[00030] На фиг.2 показан профиль распознавания эпитопа для антител, индуцированных после гетерологичной вакцинации A-B-B (день 162), по сравнению с профилем, индуцированным после гетерологичной вакцинации A-B-B-A (день 190) (где A представляет собой липосомальную вакцину, содержащую в качестве адъювантов лиганд TLR4 и липидированный олигонуклеотид CpG, 1800 мкг/дозу ацетата тетрапальмитоилированного фосфорилированного пептида тау с SEQ ID NO: 2, соответствующей SEQ ID NO: 28, и инкапсулированный эпитоп T50 хелперных Т-клеток, и B представляет собой вакцину на основе конъюгата, содержащую 15 мкг/дозу CRM197, конъюгированного с фосфорилированным пептидом тау с SEQ ID NO: 2 через линкер, причем вакцину на основе конъюгата инъецируют вместе с квасцами и олигонуклеотидом CpG), определенные методом ELISA для картирования эпитопа короткими 8-мерными перекрывающимися пептидами, покрывающими SEQ ID NO: 2 фосфопептида и SEQ ID NO: 4 пептида;

[00031] На Фиг.3 показаны титры IgG, специфических к обогащенным парным спиральным филаментам (ePHF), выделенные из мозга пациентов с болезнью Альцгеймера после его смерти в день 190 после гетерологичной вакцинации (A-B-B-A, A-A-B-B или B-B-A-A, где A представляет собой липосомальную вакцину, содержащую в качестве адъювантов лиганд TLR4 и липидированный олигонуклеотид CpG, 1800 мкг/дозу ацетата тетрапальмитоилированного фосфорилированного пептида тау SEQ ID NO: 2 и инкапсулированный эпитоп хелперных Т-клеток, и B представляет собой вакцину на основе конъюгата, содержащую 15 мкг/дозу CRM197, конъюгированного с фосфорилированным пептидом тау SEQ ID NO: 2 через линкер, причем вакцину на основе конъюгата

инъецируют вместе с квасцами и олигонуклеотидом CpG) или после гомологичной вакцинации (A-A-A-A) с графически отображенным кратным изменением относительно A-A-A-A;

[00032] На фиг.4A показаны измеренные с помощью ELISA титры IgG, специфических к фосфопептиду с последовательностью SEQ ID NO: 2 (T3.5), у макак-резусов в день 106 после режимов гомологичной (A-A-A) и гетерологичной (A-A-B и A-B-B) иммунизации с данными, представленными в виде титров конечных точек (EPT), а на фиг. 4B показаны титры ePHF-специфических IgG у макак-резусов в день 106 после гомологичных (A-A-A) и гетерологичных (A-A-B и A-B-B) режимов иммунизации, представленные в произвольных единицах (AU)/мл;

[00033] На фиг.5 показано качество ePHF-специфических IgG антител, индуцированных гетерологичными режимами A-B-B-A (фиг.5A) и A-A-B-B (фиг.5B), по сравнению с антителами, индуцированными гомологичным режимом A-A-A-A, измеренное по связыванию с ePHF в условиях ограниченного покрытия, с нанесенными на график титрами ePHF-специфических IgG, выраженными в AU/мл и измеренными с помощью MSD на ограниченном покрытии ePHF;

[00034] На фиг.6 показаны титры антител IgG, специфических к фосфопептиду с биотинилированной на N-конце последовательностью SEQ ID NO: 2, в спинномозговой жидкости (СМЖ, CSF) макак-резусов в день 183 после первой иммунизации, выполненной после гетерологичной вакцинации (A-B-B-A, A-A-B-B или B-B-A-A, где A представляет собой липосомальную вакцину, содержащую в качестве адъювантов лиганд TLR4 и липидированный олигонуклеотид CpG, 1800 мкг/дозу ацетата тетрапальмитоилированного фосфорилированного пептида тау с SEQ ID NO: 2 и эпитоп T50 инкапсулированных хелперных Т-клеток, и B представляет собой вакцину на основе конъюгата, содержащую 15 мкг/дозу CRM197, конъюгированного с фосфорилированным пептидом тау с SEQ ID NO: 2 через линкер, вводимую вместе с квасцами и олигонуклеотидом CpG), с графически отображенным кратным изменением относительно гомологичной вакцинации A-A-A-A; и

[00035] На фиг.7 показано измеренное с помощью ELISA отношение титров антител IgG, специфических к фосфопептиду с последовательностью SEQ ID NO: 2 (T3.5), к титрам антител IgG, специфических к пептиду T50, у макак-резусов в день 190 после первой иммунизации, выполненной после гомологичной (A-A-A-A) и гетерологичной (A-A-B-B и A-B-B-A) иммунизаций. Статистический анализ выполняли с помощью критерия Манна-Уитни (** $p<0,001$).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[00036] В уровне техники и в описании цитируются или описаны различные публикации, статьи и патенты; каждая из этих ссылок включена в настоящее описание полностью посредством ссылки. Целью обсуждения документов, актов, материалов, устройств, статей и т.п., которые включены в настоящее описание, является предоставление контекста для изобретения. Такое обсуждение не является признанием того, что некоторые или все эти вопросы составляют часть предшествующего уровня техники в отношении

любых раскрытых или заявленных изобретений.

[00037] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют такое же значение, в котором их обычно понимает специалист в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение. В противном случае некоторые используемые в настоящем описании термины имеют значения, приведенные в настоящем описании.

[00038] Следует отметить, что используемые в настоящем описании и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если из контекста в явном виде не следует иное.

[00039] Если не указано иное, любые числовые значения, такие как концентрация или диапазон концентраций, представленные в настоящем описании, следует понимать как модифицированные во всех случаях термином «примерно». Таким образом, числовое значение обычно включает ±10% от приведенного значения. Например, концентрация 1 мг/мл включает от 0,9 до 1,1 мг/мл. Аналогичным образом, диапазон концентраций от 1% до 10% (мас./об.) включает от 0,9% (мас./об.) до 11% (мас./об.). В данном контексте указание числового диапазона в явном виде включает все возможные поддиапазоны, все индивидуальные числовые значения в этом диапазоне, включая целые числа в таких диапазонах и доли значений, если из контекста в явном виде не следует иное.

[00040] Если не указано иное, термин «по меньшей мере», предшествующий серии элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу в серии. Специалисты в данной области смогут определить или способны установить путем всего лишь обычного экспериментирования многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления изобретения, описанных в настоящем описании. Предполагается, что такие эквиваленты входят в объем настоящего изобретения.

[00041] Используемые в настоящем описании термины «содержит», «содержащий», «включает», «включающий», «имеет», «имеющий», «состоит» или «состоящий» или любые другие их варианты следует понимать как включение указанного целого числа или группы целых чисел, но не исключение любого другого целого числа или группы целых чисел, и являются неисключающими или открытыми. Например, композиция, смесь, процесс, способ, изделие или устройство, которое содержит список элементов, не обязательно ограничены только этими элементами, но могут включать другие элементы, не указанные в явном виде или присущие такой композиции, смеси, процессу, способу, изделию или устройству. Кроме того, если в явном виде не указано иное, «или» относится к включающему или, а не к исключающему союзу или. Например, условие 1 или 2 удовлетворяется одним из следующих условий: 1 является истиной (или присутствует), и 2 является ложью (или отсутствует); 1 является ложью (или отсутствует), и 2 является истиной (или присутствует); и оба 1 и 2 являются истиной (или присутствуют).

[00042] Термины «примерно», «приблизительно», «в целом», «по существу» и аналогичные термины, используемые в настоящем описании при ссылке на размер или характеристику компонента предпочтительного изобретения, также следует понимать как

указывающие на то, что описанный размер/характеристика не является строгой границей или параметром и не исключает незначительных отклонений от указанного размера/характеристики, которые функционально являются одинаковыми или подобными, что является очевидным для специалиста в данной области техники. Ссылки, включающие числовой параметр, будут включать как минимум вариации, которые при использовании математических и промышленных принципов, применяемых в данной области (например, округления, измерения или других систематических ошибок, производственных допусков и т.д.), не приведут к изменению наименее значащей цифры.

[00043] Согласно вариантам осуществления изобретения эффективное количество липосом включает фосфопептид тау в количестве от примерно 25 нмоль до примерно 750 нмоль на дозу, например от примерно 29,7 нмоль до примерно 742,5 нмоль на дозу, предпочтительно от примерно 90 нмоль до примерно 715 нмолей на дозу, например от примерно 89,1 нмоль до примерно 712,8 нмоль на дозу, или от примерно 90 нмоль до примерно 535 нмоль на дозу, например от примерно 89,1 нмоль до примерно 534,6 нмоль на дозу, или от примерно 90 нмоль до примерно 275 нмоль на дозу, например от примерно 89,1 нмоль до примерно 267,3 нмоль на дозу фосфопептида тау, содержащего аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 1-3 или 5-12. Предпочтительно, фосфопептид тау состоит из аминокислотной последовательности одной из SEQ ID NO: 27 - SEQ ID NO: 38. Более предпочтительно, фосфопептид тау состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28. В одном из вариантов осуществления эффективное количество липосом включает агонист толл-подобного рецептора 4 и тетрапальмитоилированный фосфопептид тау, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28, в количестве от примерно 100 мкг до примерно 2500 мкг, предпочтительно от примерно 300 мкг до примерно 2400 мкг на дозу, что соответствует от примерно 29,7 нмоль до примерно 742,5 нмоль, предпочтительно от примерно 89,1 нмоль до примерно 712,8 нмоль.

[00044] Согласно вариантам осуществления изобретения эффективное количество липосом включает фосфопептид тау, такой как фосфопептид тау, содержащий аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 1-3 или 5-12, предпочтительно фосфопептид тау, состоящий из аминокислотной последовательности одной из SEQ ID NO: 27 - SEQ ID NO: 38, более предпочтительно SEQ ID NO: 28, в количестве от примерно 100 мкг до примерно 2500 мкг, от примерно 300 мкг до примерно 2400 мкг, от примерно 300 мкг до примерно 1800 мкг или от примерно 300 мкг до примерно 900 мкг на дозу, например, примерно 100 мкг, примерно 150 мкг, примерно 200 мкг, примерно 250 мкг, примерно 300 мкг, примерно 400 мкг, примерно 500 мкг, примерно 600 мкг, примерно 700 мкг, примерно 800 мкг, примерно 900 мкг, примерно 1000 мкг, примерно 1100 мкг, примерно 1200 мкг, примерно 1300 мкг, примерно 1400 мкг, примерно 1500 мкг, примерно 1600 мкг, примерно 1700 мкг, примерно 1800 мкг, примерно 1900 мкг, примерно 2000 мкг, примерно 2100 мкг, примерно 2200 мкг, примерно 2300 мкг, примерно 2400 мкг или примерно 2500 мкг, или любое промежуточное значение на дозу.

[00045] В некоторых вариантах осуществления эффективное количество липосом включает агонист толл-подобного рецептора 4 в количестве от примерно 30 мкг до примерно 900 мкг, предпочтительно от примерно 100 мкг до примерно 585 мкг на дозу. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество липосом включает агонист толл-подобного рецептора, 3-деацил монофосфорил-гексаацил-липид А, в количестве примерно 30 мкг, примерно 50 мкг, примерно 100 мкг, примерно 150 мкг, примерно 200 мкг, примерно 250 мкг, примерно 300 мкг, примерно 330 мкг, примерно 360 мкг, примерно 390 мкг, примерно 420 мкг, примерно 450 мкг, примерно 480 мкг, примерно 500 мкг, примерно 520 мкг, примерно 540 мкг, примерно 560 мкг, примерно 580 мкг, примерно 600 мкг, примерно 700 мкг, примерно 800 мкг или примерно 900 мкг на дозу.

[00046] В некоторых вариантах осуществления эффективное количество липосом включает липидированный олигонуклеотид CpG в количестве от примерно 50 мкг до примерно 1250 мкг, предпочтительно от примерно 150 мкг до примерно 800 мкг на дозу. Например, эффективное количество липосом может включать липидированный олигонуклеотид CpG в количестве примерно 50 мкг, примерно 100 мкг, примерно 150 мкг, примерно 200 мкг, примерно 250 мкг, примерно 300 мкг, примерно 350 мкг, примерно 400 мкг, примерно 450 мкг, примерно 500 мкг, примерно 550 мкг, примерно 600 мкг, примерно 650 мкг, примерно 700 мкг, примерно 750 мкг, примерно 800 мкг, примерно 850 мкг, примерно 900 мкг, примерно 950 мкг, примерно 1000 мкг, примерно 1050 мкг, примерно 1100 мкг, примерно 1200 мкг или примерно 1250 мкг на дозу. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество липосом включает олигонуклеотид CpG, состоящий из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 18, в количестве от примерно 50 мкг до примерно 1250 мкг, предпочтительно от примерно 150 мкг до примерно 800 мкг на дозу.

[00047] Согласно вариантам осуществления изобретения фосфопептид тау презентирован на поверхности липосом.

[00048] В контексте настоящего описания иммунологически эффективное количество конъюгата определяется количеством иммуногенного носителя, конъюгированного со вторым фосфопептидом тау в конъюгате. Например, 15 мкг конъюгата относится к композиции на основе конъюгата, содержащей 15 мкг иммуногенного носителя, который конъюгирован с фосфопептидом тау. С одним иммуногенным носителем может быть конъюгирован один или более фосфопептидов тау.

[00049] Согласно вариантам осуществления изобретения эффективное количество конъюгатов может быть определено способами, известными в данной области, например клиническими исследованиями, с учетом настоящего изобретения.

[00050] Фосфопептид тау содержит аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 1-3 или 5-12. Предпочтительно, фосфопептид тау, присутствующий в липосомах, состоит из аминокислотной последовательности одной из SEQ ID NO: 27 - SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 31 - SEQ ID NO: 38. Более предпочтительно, фосфопептид тау, присутствующий в липосомах, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID

NO: 28. Предпочтительно, фосфопептид тау, присутствующий в конъюгатах, состоит из аминокислотной последовательности одной из SEQ ID NO: 1-3 или 5-12, предпочтительно SEQ ID NO: 2.

[00051] Используемый в настоящем описании термин «тау» или «тау-белок», также известный как тау-белок, связанный с микротрубочками, MAPT, белок нейрофибриллярного клубка, парный спиральный филамент тау, PHF-тау, MAPTL, MTBT1, относится к белку, широко распространенному в центральной и периферической нервной системе, имеющему несколько изоформ. В центральной нервной системе человека (ЦНС) существует шесть основных изоформ тау размером от 352 до 441 аминокислоты, которые являются результатом альтернативного сплайсинга (Hanger et al., Trends Mol Med. 15:112-9, 2009). Примеры тау-белка включают, без ограничения, изоформы тау в ЦНС, такие как самая длинная изоформа тау, состоящая из 441 аминокислоты (4R2N), которая имеет четыре повтора и две вставки, и самая короткая по длине изоформа (фетальная) (3R0N), состоящая из 352 аминокислот, с тремя повторами и без 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-белка включают человеческий большой тау-белок, 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 человеческого большого тау-белка представлена в GenBank под номером доступа NP_058519.3. Используемый в настоящем описании термин «тау» включает гомологи тау-белка видов, отличных от человека, таких как Macaca Fascicularis (яванский макак) или Pan troglodytes (шимпанзе). Используемый в настоящем описании термин «тау» включает белки, содержащие мутации, например точечные мутации, фрагменты, вставки, делеции и варианты сплайсинга полноразмерного тау-белка дикого типа. Термин «тау» также охватывает посттрансляционные модификации аминокислотной последовательности тау-белка. Посттрансляционные модификации включают, без ограничения, фосфорилирование.

[00052] Используемый в настоящем описании термин «фосфорилированный тау» относится к тау-белку или его фрагменту или пептиду, который содержит по меньшей мере один фосфорилированный остаток.

[00053] Используемый в настоящем описании термин «обогащенный парный спиральный филамент» или «ePHF» относится к препарату, который обогащен тау-белком в парном спиральном филаменте. PHF является важным компонентом нейрофибриллярных клубков при болезни Альцгеймера.

[00054] В контексте настоящего описания термин «пептид» или «полипептид» относится к полимеру, состоящему из аминокислотных остатков, родственных им природных структурных вариантов и синтетических неприродных аналогов, связанных пептидными связями. Этот термин относится к пептиду любого размера, структуры или функции. Обычно пептид состоит из по меньшей мере трех аминокислот. Пептид может

быть природным, рекомбинантным, синтетическим или любой их комбинацией. Синтетические пептиды можно синтезировать, например, с помощью автоматического полипептидного синтезатора. Примеры пептидов тау включают любой пептид тау длиной от примерно 5 до примерно 30 аминокислот, предпочтительно длиной от примерно 10 до примерно 25 аминокислот, более предпочтительно длиной от примерно 16 до примерно 21 аминокислоты. В настоящем описании пептиды перечислены в направлении от N к С-концу с использованием стандартной трех- или однобуквенной аббревиатуры аминокислот, где фосфорные остатки обозначены буквой «р». Примеры используемых в изобретении пептидов тау включают, без ограничения, пептиды тау, содержащие аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-12, или пептиды тау с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 1-12.

[00055] В контексте настоящего описания термин «фосфопептид» или «фосфоэпитоп» относится к пептиду, который фосфорилирован по одному или более аминокислотным остаткам. Примеры фосфопептидов тау включают любой пептид тау, содержащий один или более фосфорилированных аминокислотных остатков. Примеры фосфопептидов тау, используемых в изобретении, включают, без ограничения, фосфопептиды тау, содержащие аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-3 или 5-12, или фосфопептиды тау с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 1-3 или 5-12.

[00056] Пептиды тау по настоящему изобретению можно синтезировать с помощью твердофазного пептидного синтеза или рекомбинантных систем экспрессии. Автоматические синтезаторы пептидов коммерчески доступны от множества поставщиков, таких как Applied Biosystems (Foster City, Calif.). Рекомбинантные системы экспрессии могут включать бактерии, такие как *E.coli*, дрожжи, клетки насекомых или клетки млекопитающих. Процедуры рекомбинантной экспрессии описаны Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (C.S.H.P. Press, NY 2nd ed., 1989).

[00057] Тау представляет собой человеческий «собственный» белок. Это означает, что, в принципе, все лимфоциты, несущие тау-специфический рецептор, должны быть удалены во время развития (центральная толерантность) или должны быть переведены в невосприимчивое состояние с помощью механизма периферической толерантности. Эта проблема оказалась серьезным препятствием при разработке вакцин против собственных или «измененных собственных» белков (например, опухолевых антигенов).

[00058] Для генерации высококачественных антител против антигена (собственного или инфекционного) требуется действие не только В-лимфоцитов, продуцирующих антитело, но также CD4+ хелперных Т-лимфоцитов. CD4+ Т-клетки обеспечивают важные для В-лимфоцитов сигналы выживания и созревания, и животные с дефицитом CD4+ Т-клеток являются в значительной степени иммуносупрессированными. CD4+ Т-клетки также подвержены механизмам толерантности, и дополнительным препятствием для

генерации сильных ответов аутореактивных антител (например, против тау-белка) является то, что тау-реактивные CD4+ Т-клетки, вероятно, также могут быть редкими и даже отсутствовать в репертуаре человека/животного.

[00059] Не ограничиваясь какой-либо теорией, предполагается, без ограничения объема настоящего изобретения, что эту проблему можно решить с помощью вакцинных композиций по настоящему изобретению.

[00060] В одном из вариантов осуществления получают липосому, содержащую пептид тау, а также эпитоп Т-клеток, способный связывать бо́льшую часть или все молекулы HLA DR (человеческого лейкоцитарного антигена - D родственного антигена). После этого эпитоп Т-клеток становится способным активировать CD4+ Т-клетки, которые обеспечивают важные для тау-специфических В-клеток сигналы созревания и выживания. В другом варианте осуществления получают конъюгат пептида тау с белком-носителем, который вызывает сильный ответ хелперных Т-клеток. В этом варианте осуществления используется «несвязанное распознавание», при котором специфические к носителю Т-клетки обеспечивают сигналы, необходимые для выживания и созревания аутореактивных В-клеток. Соответственно, тау-специфические В-клетки получают сигналы, важные для запуска созревания аффинности, переключения класса иммуноглобулинов, и создания пула долговременной памяти. Тау-липосомы и тау-конъюгаты можно использовать для создания высококачественных антител против тау-антигена в схемах гомологичной или гетерологичной иммунизации с использованием такой липосомы или конъюгата в первичной и/или бустерной иммунизации.

[00061] Липосомы

[00062] Согласно настоящему описанию липосомы используются в примирующих композициях и, необязательно, в бустерных композициях. Липосомы, применимые для способов по настоящему изобретению, включают:

пептид тау, предпочтительно представляющий собой фосфопептид тау; и

эпитоп хелперных Т-клеток,

где пептид тау презентирован на поверхности липосомы.

[00063] Липосомы согласно вариантам осуществления изобретения также упоминаются в настоящем описании как «улучшенные липосомы», «улучшенные липосомальные вакцины» или «липосомальные вакцины согласно вариантам осуществления изобретения» или «тау-липосомы» или «оптимизированные липосомальные вакцины» из «липосом 2-го поколения».

[00064] В контексте настоящего описания термин «липосома» обычно относится к липидной везикуле, которая состоит из материалов с высоким содержанием липидов, например фосфолипидов, холестерина. Липиды этих везикул обычно организованы в виде липидных бислоев. Липидные бислои обычно инкапсулируют объем, который либо диспергирован между множеством оболочек липидных бислоев, подобно луку, образуя многослойные липидные везикулы (MLV), либо содержится в аморфной центральной полости. Липидные везикулы, имеющие аморфную центральную полость, представляют

собой однослойные липидные везикулы, т.е. везикулы с одним периферическим бислоем, окружающим полость. Большие однослойные везикулы (LUV) обычно имеют диаметр от 100 нм до нескольких микрометров, например 100-200 нм или более, в то время как маленькие однослойные липидные везикулы (SUV) обычно имеют диаметр менее 100 нм, например 20-100 нм, обычно 15-30 мм.

[00065] Согласно конкретным вариантам осуществления липосома содержит один или более пептидов тау. Согласно конкретным вариантам осуществления пептиды тау в липосомах могут быть одинаковыми или разными.

[00066] В настоящем изобретении может быть использован любой подходящий пептид тау, известный специалистам в данной области, с учетом настоящего раскрытия. Согласно конкретным вариантам осуществления один или более пептидов тау содержат аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 1-12. В других вариантах осуществления один или более пептидов тау содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична аминокислотной последовательности одной из SEQ ID NO: 1-12, где ни один из аминокислотных остатков не фосфорилирован, или один или более аминокислотных остатков фосфорилированы.

[00067] Согласно конкретным вариантам осуществления, один или более пептидов тау представляют собой фосфопептид тау. Согласно конкретным вариантам осуществления один или более фосфопептидов тау содержат аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 1-3 или 5-12 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична аминокислотной последовательности одной из SEQ ID NO: 1-3 или 5-12, где один или более указанных аминокислотных остатков фосфорилированы. Предпочтительно фосфопептид тау содержит аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 1-3. С-конец пептида тау может быть амидирован.

[00068] Согласно вариантам осуществления изобретения пептид тау презентирован на поверхности липосомы. Пептид тау, предпочтительно фосфопептид тау, может быть презентирован на поверхности липосомы способами, известными в данной области, с учетом настоящего раскрытия. См., например, соответствующее раскрытие в патентах США №№ 8,647,631 и 9,687,447, содержание которых включено в настоящее описание посредством ссылки. Согласно конкретным вариантам осуществления один или более пептидов тау, включая фосфопептиды, дополнительно содержат одну или более модификаций, таких как пальмитоилирование или модификацию додецилом, которые обеспечивают презентацию пептидов тау на поверхности липосомы. Для облегчения модификации к пептиду тау могут быть добавлены дополнительные аминокислотные остатки, такие как Lys, Cys или иногда Ser или Thr. Имеются сообщения о том, что положение липидных якорей индуцирует различные конформации пептидной последовательности (Hickman et al., J. Biol. Chem. Vol. 286, NO.16, pp.13966-13976, April 22, 2011). Не ограничиваясь какой-либо теорией, считается, что добавление гидрофобных

фрагментов на обоих концах может увеличить патологическую конформацию бета-слоя пептида тау. Таким образом, один или более пептидов тау дополнительно содержат гидрофобные фрагменты на обоих концах. Модифицированный пептид тау может иметь амидированные С-концы. Предпочтительно пептид тау, презентированный на поверхности липосомы, состоит из аминокислотной последовательности одной из SEQ ID NO: 27 - SEQ ID NO: 38. Более предпочтительно, пептид представляет собой фосфопептид тау с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27 - SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 31 - SEQ ID NO: 38.

[00069] В контексте настоящего описания термин «эпитоп хелперной Т-клетки» относится к полипептиду, содержащему эпитоп, который может быть распознан хелперной Т-клеткой. Примеры эпитопов хелперных Т-клеток включают, без ограничения, столбнячный токсоид (например, эпитопы P2 и P30, также называемые, соответственно, T2 и T30), поверхностный антиген гепатита B, холерный токсин B, токсоид, дифтерийный токсоид, белок F вируса кори, белок большой внешней мембраны *Chlamydia trachomatis*, циркумспорозоитный T белок *Plasmodium falciparum*, антиген CS *P. falciparum*, триозофосфатизомеразу *Schistosoma mansoni*, *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, Pertusaria trachythallina, TraT *Escherichia coli* и гемагглютинин (HA) вируса гриппа.

[00070] В настоящем изобретении может быть использован любой подходящий эпитоп хелперных Т-клеток, известный специалистам в данной области, с учетом настоящего раскрытия. Согласно конкретным вариантам осуществления эпитоп хелперных Т-клеток содержит по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23 - SEQ ID NO: 26. Предпочтительно эпитоп хелперных Т-клеток содержит две или более аминокислотных последовательностей из SEQ ID NO: 23 - SEQ ID NO: 26, слитых вместе через линкер, такой как пептидный линкер, содержащий одну или более аминокислот, например Val (V), Ala (A), Arg (R), Gly (G), Ser (S), Lys (K). Длина линкера может варьировать, предпочтительно от 1 до 5 аминокислот. Предпочтительно, эпитоп хелперных Т-клеток 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 хелперных Т-клеток может иметь амидированный С-конец.

[00071] Согласно вариантам осуществления изобретения эпитопы хелперных Т-клеток могут быть встроены в поверхность липосомы, например заякорены ковалентно связанной гидрофобной группой, где указанный гидрофобный фрагмент 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 из вариантов осуществления изобретения гидрофобный фрагмент представляет собой пальмитиновую

кислоту. Альтернативно, эпитопы хелперных Т-клеток можно инкапсулировать в липосомы. Согласно конкретным вариантам осуществления эпитоп хелперных Т-клеток инкапсулирован в липосому.

[00072] Эпитоп хелперных Т-клеток может быть модифицирован в соответствии с желательным для него местоположением в липосомах известными в данной области техники способами с учетом настоящего раскрытия. Согласно конкретным вариантам осуществления эпитоп хелперных Т-клеток, применимый по изобретению, содержит аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 39 - SEQ ID NO: 44. Предпочтительно эпитоп хелперных Т-клеток состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13 - SEQ ID NO: 17.

[00073] Согласно конкретным вариантам осуществления липосома содержит пептид тау и эпитоп хелперных Т-клеток в массовом соотношении 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 или 6:1.

[00074] В одном из вариантов осуществления липосома дополнительно содержит по меньшей мере один адъювант, содержащий лиганд толл-подобного рецептора. Таким образом, в другом общем аспекте изобретение относится к липосоме, содержащей:

пептид тау, предпочтительно фосфопептид тау;

эпитоп хелперных Т-клеток; и

по меньшей мере один из

лиганда толл-подобного рецептора 9, и

лиганда толл-подобного рецептора 4.

[00075] Согласно настоящему описанию, термин «толл-подобный рецептор» или «TLR» относится к классу белков рецептора распознавания паттернов (PRR), которые играют ключевую роль во врожденном иммунном ответе. TLR распознают патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMP) микробных патогенов, таких как бактерии, грибы, паразиты и вирусы, которые можно отличить от молекул хозяина. TLR представляют собой трансмембранные 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 человеческих TLR, TLR1-TLR10, и по меньшей мере двенадцать членов семейства мышиных TLR, TLR1-TLR9 и TLR11-TLR13, которые различаются типами распознаваемых ими антигенов. Например, TLR4 распознает липополисахариды (LPS), компонент, присутствующий во многих грамотрицательных бактериях, а также вирусные белки, полисахариды и эндогенные белки, такие как липопротеины низкой плотности, бета-дефензины и белок теплового шока; и TLR9 является чувствительным к нуклеотидам TLR, который активируется неметилированными одноцепочечными или двухцепочечными цитозин-фосфат-гуаниновыми (CpG) динуклеотидами, многочисленными в геномах прокариот, но редкими в геномах позвоночных. Активация TLR приводит к ряду сигнальных событий, приводящих к продуцированию интерферонов типа I (IFN), воспалительных цитокинов и хемокинов, а также к индукции иммунных ответов. В конце концов, это воспаление также активирует

адаптивную иммунную систему, которая затем приводит к исчезновению вторгшихся патогенов и инфицированных клеток.

[00076] В контексте настоящего описания термин «лиганд» относится к молекуле, которая образует комплекс с биомолекулой (например, рецептором) для биологической цели. Согласно конкретным вариантам осуществления лиганд толл-подобного рецептора является агонистом толл-подобного рецептора.

[00077] В контексте настоящего описания термин «агонист» относится к молекуле, которая связывается с одним или более TLR и индуцирует опосредованный рецептором ответ. Например, агонист может индуцировать, стимулировать, увеличивать, активировать, облегчать, усиливать или повышать активность рецептора. Такие действия называются «агонистическими действиями». Например, агонист TLR4 или TLR9 может активировать или усиливать передачу клеточных сигналов через связанный рецептор. Агонисты включают, без ограничения, нуклеиновые кислоты, малые молекулы, белки, углеводы, липиды или любые другие молекулы, которые связываются или взаимодействуют с рецепторами. Агонисты могут имитировать активность природного лиганда рецептора. Агонисты могут иметь гомологичную таким природным лигандам рецепторов последовательность, конформацию, заряд или другие характеристики, благодаря чему они могут распознаваться рецепторами. Такое распознавание может приводить к физиологическим и/или биохимическим изменениям внутри клетки, благодаря которым клетка начинает реагировать на присутствие агониста таким же образом, как если бы присутствовал природный лиганд рецептора. Согласно конкретным вариантам осуществления агонист толл-подобного рецептора представляет собой по меньшей мере один из агониста толл-подобного рецептора 4 и агониста толл-подобного рецептора 9.

[00078] В контексте настоящего описания термин «агонист толл-подобного рецептора 4» относится к любому соединению, которое действует как агонист TLR4. В изобретении можно использовать любой подходящий агонист толл-подобного рецептора 4, известный специалистам в данной области, с учетом настоящего раскрытия. Примеры лиганда толл-подобного рецептора 4, применимого в изобретении, включают агонист TLR4, включая, без ограничения, монофосфориллипид А (MPLA). В контексте настоящего описания термин «монофосфориллипид А» или «MPLA» относится к модифицированной форме липида А, который является биологически активной частью эндотоксина, липополисахарида грамотрицательных бактерий (LPS). MPLA менее токсичен, чем LPS, но сохраняет иммуностимулирующую активность. В качестве адъюванта вакцины MPLA стимулирует как клеточные, так и гуморальные ответы на антиген вакцины. Примеры MPLA включают, без ограничения, 3-О-дезацил-4'-монофосфориллипид А, 3-деацил монофосфорил-гексаацил-липид А, монофосфорил-3-деацил-липид А и их структурно родственные варианты. MPLA, полезный для изобретения, может быть получен способами, известными в данной области или из коммерческого источника, такого как 3D-(6-ацил) PHAD®, PHAD®, PHAD®-504, 3D-PHAD® от Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, USA) или MPL™ из различных коммерческих источников. Согласно конкретным вариантам

осуществления агонист толл-подобного рецептора 4 представляет собой MPLA.

[00079] В контексте настоящего описания термин «агонист толл-подобного рецептора 9» относится к любому соединению, которое действует как агонист TLR9. В изобретении можно использовать любой подходящий агонист толл-подобного рецептора 9, известный специалистам в данной области, с учетом настоящего раскрытия. Примеры лиганда толл-подобного рецептора 9, применимого по изобретению, включают агонист TLR9, включая, без ограничения, олигонуклеотиды CpG.

[00080] В контексте настоящего описания термин «олигонуклеотид CpG», «олигодезоксинуклеотид CpG» или «CpG ODN» относится к олигонуклеотиду, содержащему по меньшей мере один мотив CpG. В контексте настоящего описания термины «олигонуклеотид», «олигодезоксинуклеотид» или «ODN» относятся к полинуклеотиду, образованному из множества связанных нуклеотидных единиц. Такие олигонуклеотиды могут быть получены из существующих источников нуклеиновых кислот или могут быть получены синтетическими методами. В контексте настоящего описания термин «мотив CpG» относится к нуклеотидной последовательности, которая содержит неметилированные цитозин-фосфат-гуаниновые (CpG) динуклеотиды (т.е. цитозин (C), за которым следует гуанин (G)), связанные фосфатной связью или фосфодиэфирным остовом или другими межнуклеотидными связями.

[00081] Согласно конкретным вариантам осуществления олигонуклеотид CpG является липидированным, т.е. конъюгированным (ковалентно связанным) с липидным фрагментом.

[00082] В контексте настоящего описания термин «липидный фрагмент» относится к фрагменту, содержащему липофильную структуру. Липидные фрагменты, 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 усилить связывание с белками плазмы и, следовательно, увеличивать период полужизни гидрофильных молекул в кровотоке. Кроме того, было показано, что связывание с некоторыми белками плазмы, такими как липопротеины, увеличивает захват в определенных тканях, экспрессирующих соответствующие рецепторы липопротеинов (например, рецептор ЛПНП, рецептор ЛПВП или скавенджер-рецептор SR-B1). В частности, липидный фрагмент, конъюгированный с фосфопептидами и/или олигонуклеотидом CpG, позволяет заякорить указанные пептиды и/или олигонуклеотиды в мембране липосомы через гидрофобный фрагмент.

[00083] Согласно конкретным вариантам осуществления, с учетом настоящего раскрытия, олигонуклеотид CpG может содержать любые подходящие межнуклеотидные связи.

[00084] В контексте настоящего описания термин «межнуклеотидная связь» относится к химической связи, соединяющей два нуклеотида через их сахара, состоящие 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 (rp) связи. Фосфоротиоат, фосфородитиоат, метилфосфонат и метилфосфоротиоат стабилизируют межнуклеотидные связи, в то время как фосфодиэфир представляет собой естественную межнуклеотидную связь. Фосфоротиоаты олигонуклеотидов обычно синтезируют в виде случайной рацемической смеси фосфоротиоатных связей Rp и Sp.

[00085] В изобретении может быть использован любой подходящий олигонуклеотид CpG, известный специалистам в данной области, с учетом настоящего раскрытия. Примеры таких олигонуклеотидов CpG включают, без ограничения, CpG2006 (также известный как CpG 7909), CpG 1018, CpG2395, CpG2216, CpG1826 или CpG2336.

[00086] Олигонуклеотид CpG может быть липидирован способами, известными в данной области техники, с учетом настоящего описания. В некоторых вариантах осуществления 3'-конец олигонуклеотида CpG ковалентно связан с молекулой холестерина через фосфатную связь, необязательно через линкер ПЭГ. Другой липофильный фрагмент также может быть ковалентно связан с 3'-концом олигонуклеотида CpG. Например, олигонуклеотид CpG может быть ковалентно связан с липидным якорем той же длины, что и фосфолипиды липосомы: одной цепью пальмитиновой кислоты (с использованием Pal-OH или аналогичной группы, активированной для связывания) или двумя пальмитиновыми кислотами (например, с использованием 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-(сукцинила) или аналогичного соединения, активированного для связывания), необязательно через линкер ПЭГ. См., например, соответствующее описание в патенте США № 7,741,297, содержание которого включено в настоящее описание посредством ссылки. Длина ПЭГ может варьировать, например, от 1 до 5 единиц ПЭГ.

[00087] Для ковалентного связывания олигонуклеотида CpG с липофильной группой (такой как молекула холестерина) также могут быть использованы другие линкеры, примеры которых включают, без ограничения, алкильный спейсер, содержащий от 3 до 12 атомов углерода. В качестве аминодиола необходим короткий линкер, совместимый с химией олигонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления для ковалентного связывания линкер не используется. См., например, Ries et al., «Convenient synthesis and application of versatile nucleic acid lipid membrane anchors in the assembly and fusion of loposomes», Org. Biomol. Chem., 2015, 13, 9673, соответствующее описание которой включено в настоящее описание посредством ссылки.

[00088] Согласно конкретным вариантам осуществления липидированный олигонуклеотид CpG, применимый по изобретению, содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18 - SEQ ID NO: 22, где нуклеотидная последовательность содержит одну или более фосфоротиоатных межнуклеотидных связей, где нуклеотидная последовательность ковалентно связана по меньшей мере с одним холестерином через линкер. Для ковалентного связывания олигонуклеотида CpG с молекулой холестерина можно использовать любые подходящие линкеры. Предпочтительно линкер содержит полиэтиленгликоль (ПЭГ).

[00089] Согласно конкретным вариантам осуществления липосома содержит:

фосфопептид тау;

эпитоп хелперных Т-клеток;

липидированный олигонуклеотид CpG; и

лиганд толл-подобного рецептора 4;

где фосфопептид тау презентирован на поверхности липосомы, и эпитоп хелперных Т-клеток инкапсулирован в липосому.

[00090] Согласно конкретным вариантам осуществления липосома содержит:

пептид тау с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27 - SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 31 - SEQ ID NO: 38;

эпитоп хелперных Т-клеток с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 39 - SEQ ID NO: 44, предпочтительно эпитоп хелперных Т-клеток, состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13 - SEQ ID NO: 17;

липидированный олигонуклеотид CpG с нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18 - SEQ ID NO: 22, где олигонуклеотид CpG содержит одну или более фосфоротиоатных межнуклеотидных связей, и олигонуклеотид CpG ковалентно связан по меньшей мере с одним холестерином через линкер; и

монофосфориллипид A (MPLA).

[00091] Согласно конкретным вариантам осуществления липосома 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.

[00092] Согласно конкретным вариантам осуществления липосома дополнительно содержит буфер. В изобретении можно использовать любой подходящий буфер, известный специалистам в данной области, с учетом настоящего описания. В одном из вариантов осуществления липосома содержит забуференный фосфатом физиологический раствор. Согласно конкретным вариантам осуществления буфер содержит гистидин и сахарозу.

[00093] Согласно конкретным вариантам осуществления липосома содержит DMPC, DMPG, холестерин, фосфопептид тау и эпитоп хелперных Т-клеток в молярном соотношении 9:1:7:0,07:0,04.

[00094] Липосомы по изобретению могут быть получены способами, известными в данной области техники, с учетом настоящего раскрытия.

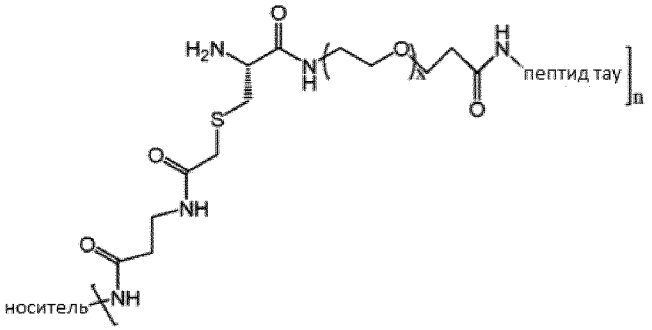
[00095] Иллюстративная липосома по настоящему изобретению включает тетрапальмитоилированный фосфопептид тау (пептид pTau T3, SEQ ID NO: 28), презентированный на поверхности липосомы посредством двух пальмитиновых кислот на каждом конце пептида тау; лиганд TLR-9, содержащий липидированный CpG (адъювант CpG7909-Chol), включенный в липосомную мембрану посредством ковалентно связанного холестерина; лиганд TLR-4 (адъювант 3D-(6-ацил) PHAD®), встроенный в мембрану; и

инкапсулированный эпитоп хелперных Т-клеток (PAN-DR связывающий агент Т50).

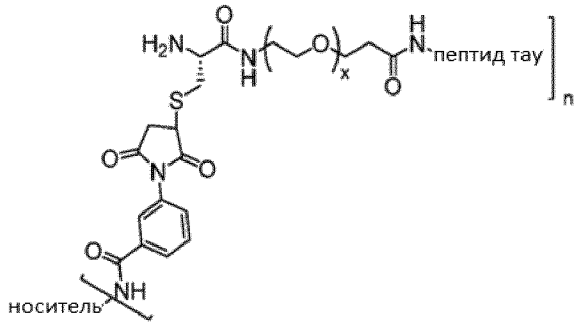
[00096] Конъюгаты

[00097] В бустерных композициях по изобретению используются конъюгаты. Конъюгаты, используемые в способах по настоящему изобретению, содержит пептид тау, предпочтительно фосфопептид тау, и конъюгированный с ним иммуногенный носитель.

[00098] Согласно конкретным аспектам конъюгат имеет следующую структуру:



или имеет структуру формулы (II):



,

в которой

x представляет собой целое число от 0 до 10;

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

носитель представляет собой иммуногенный носитель; и

пептид тау представляет собой фосфопептид тау.

[00099] Согласно конкретным вариантам 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. Согласно конкретным вариантам осуществления x равно 3.

[000100] Согласно конкретным вариантам осуществления n находится в диапазоне от 2 до 15, от 3 до 11, от 3 до 9, от 3 до 8 или от 3 до 7.

[000101] Согласно конкретным вариантам осуществления конъюгат содержит один или более пептидов тау. Согласно конкретным вариантам осуществления пептиды тау конъюгата могут быть одинаковыми или разными.

[000102] Согласно конкретным вариантам осуществления, с учетом настоящего раскрытия, в изобретении можно использовать любые подходящие пептиды тау. Согласно конкретным вариантам осуществления один или более пептидов тау содержат аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 1-12 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична

аминокислотной последовательности одной из SEQ ID NO: 1-12, где ни один, один или более аминокислотных остатков являются фосфорилированными.

[000103] Согласно конкретным вариантам осуществления один или более пептидов тау представляют собой фосфопептид тау. Согласно конкретным вариантам осуществления один или более фосфопептидов тау содержат аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 1-3 или 5-12 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична аминокислотной последовательности одной из SEQ ID NO: 1-3 или 5-12, где один или более из указанных аминокислотных остатков фосфорилированы.

[000104] Согласно конкретным вариантам осуществления фосфопептид тау состоит из аминокислотной последовательности одной из SEQ ID NO: 1-3.

[000105] В контексте настоящего описания термин «иммуногенный носитель» относится к иммуногенному веществу, которое может быть связано с пептидом тау. Иммуногенный фрагмент, связанный с пептидом тау, может индуцировать иммунный ответ и вызывать продуцирование антител, которые могут специфически связываться с пептидом тау. Иммуногенные фрагменты представляют собой функциональные фрагменты, которые включают белки, полипептиды, гликопротеины, сложные полисахариды, частицы, нуклеиновые кислоты, полинуклеотиды и т.п., распознаваемые как чужеродные, тем самым вызывая иммунологический ответ у хозяина. В изобретении можно использовать любой подходящий иммуногенный носитель, известный специалистам в данной области, с учетом настоящего раскрытия. В соответствии с конкретными вариантами осуществления иммуногенный носитель представляет собой гемоцианин моллюска улитки (KLH), столбнячный анатоксин, CRM197 (нетоксичную форму дифтерийного токсина), смесь белков внешней мембраны из *N. meningitidis* (OMP) или их производное. Согласно конкретным вариантам осуществления иммуногенный носитель представляет собой KLH или CRM197.

[000106] Согласно конкретным вариантам осуществления пептид тау конъюгирован с носителем через линкер. В контексте настоящего описания термин «линкер» относится к химическому фрагменту, который соединяет иммуногенный носитель с пептидом тау. В изобретении можно использовать любой подходящий линкер, известный специалистам в данной области, с учетом настоящего раскрытия. Линкеры могут представлять собой, например, простую ковалентную связь, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкильный фрагмент, полиэтиленгликолевый (ПЭГ) линкер, пептидный линкер, линкер на основе сахара или расщепляемый линкер, такой как дисульфидная связь или сайт расщепления протеазой, или аминокислоту, или их комбинации. Примеры линкера могут включать один или более из полиэтиленгликоля (ПЭГ), сукцинимидил-3-(бромацетамидо)пропионата (SBAP), сложного эфира м-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимида (MBS) или одну или более аминокислот, таких как Cys, Lys или иногда Ser или Thr, или их комбинации.

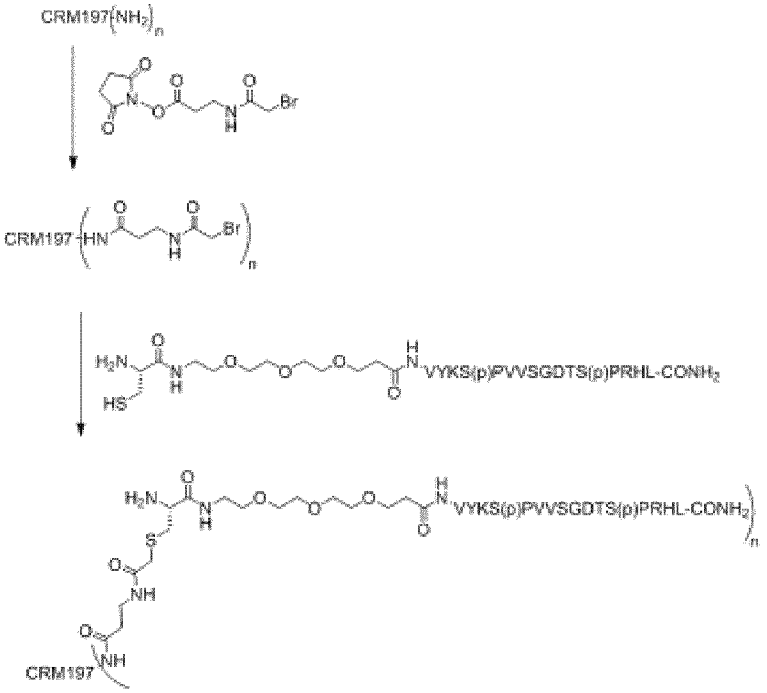
[000107] Согласно конкретным вариантам осуществления линкер содержит

$(C_2H_4O)_x$-цистеин-ацетамидопропионамид или сложный эфир м-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимид-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.

[000108] Согласно конкретным вариантам осуществления носитель ковалентно связан с N-концом пептида тау через линкер.

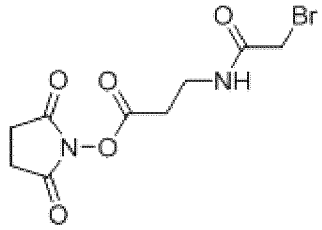
[000109] Согласно другим конкретным вариантам осуществления носитель ковалентно связан с C-концом пептида тау через линкер.

[000110] Согласно конкретным вариантам осуществления конъюгат имеет структуру:



где n представляет собой целое число от 2 до 15, предпочтительно от 3 до 11, более предпочтительно от 3 до 7.

[000111] Конъюгаты по изобретению могут быть получены способами, известными в данной области техники, с учетом настоящего раскрытия. Например, указанный выше конъюгат может быть образован путем взаимодействия сукцинимидил-3-(бромацетамидо)пропионата (SBAP):



с аминогруппой CRM197 с образованием амидной связи. Этот предшественник CRM197 может впоследствии взаимодействовать с пептидом тау (например, фосфорилированным пептидом тау с SEQ ID NO: 2), конъюгированным на N-конце или C-конце с ПЭГ-цистеиновым линкером, содержащим свободную нуклеофильную тиоловую группу, с образованием конъюгата фосфопептида тау.

[000112] Иллюстративный конъюгат согласно варианту осуществления настоящей заявки содержит множество фосфопептидов тау (пептид pTau T3.76), ковалентно связанных с белком-носителем CRM197.

[000113] Фармацевтические композиции

[000114] Липосомы и конъюгаты вводят субъекту в фармацевтических композициях. Фармацевтические композиции представляют собой композиции, содержащие терапевтически эффективное количество липосом, или композиции, содержащие терапевтически эффективное количество конъюгата по изобретению, вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Фармацевтически приемлемые носители включают наполнители и/или носители, известные в данной области техники (см. Remington's Pharmaceutical Science (15th ed.), 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 определены как несущие среды, обычно используемые для составления фармацевтических композиций для введения животным или человеку. Разбавитель подбирают так, чтобы он не влиял на биологическую активность комбинации. Примерами таких разбавителей являются дистиллированная вода, забуференный фосфатом физиологический раствор, растворы Рингера, раствор декстрозы и раствор Хэнка. Кроме того, фармацевтическая композиция или состав также может включать другие носители, адъюванты или нетоксичные, нетерапевтические, неиммуногенные стабилизаторы и т.п. Следует понимать, что характеристики носителя, наполнителя или разбавителя будут зависеть от пути введения для конкретного применения, например, внутримышечного, подкожного, перорального, внутрикожного, кожного, внутрислизистого (например, через кишечник), интраназального или внутрибрюшинного введения. Предпочтительно фармацевтически приемлемый носитель, включенный в фармацевтические композиции, подходит для внутримышечного введения.

[000115] Фармацевтические композиции могут быть составлены в виде вакцины (также называемой «иммуногенной композицией»), такой как примирующая композиция или бустерная композиция, способами, хорошо известными в данной области.

[000116] Фармацевтические композиции могут содержать смесь одного и того же иммуногенного пептида тау. Альтернативно фармацевтические композиции могут содержать смесь разных иммуногенных пептидов тау по настоящему изобретению.

[000117] Другая проблема, связанная с вакцинами против нейрональных заболеваний, заключается в том, что для обеспечения эффективности, вероятно, необходимы исключительно высокие титры антител. Это связано с тем, что целевой антиген вакцины находится в головном мозге. Мозг отделен от кровотока специальной клеточной структурой, называемой гематоэнцефалическим барьером (ГЭБ). ГЭБ ограничивает попадание веществ из кровотока в мозг. Это предотвращает попадание токсинов, микробов и т.д. в центральную нервную систему. Другим потенциально менее

желательным эффектом ГЭБ является предотвращение эффективного проникновения иммунных медиаторов (таких как антитела) в интерстициальную и спинномозговую жидкость, окружающую мозг.

[000118] Приблизительно 0,1% антител, присутствующих в большом круге кровообращения, пересекают ГЭБ и попадают в мозг. Это означает, что для получения эффективного эффекта в мозге системные титры, индуцированные вакциной, нацеленной на антиген ЦНС, должны быть по меньшей мере в 1000 раз больше минимального эффективного титра.

[000119] Согласно конкретным вариантам осуществления фармацевтические композиции по настоящему изобретению, следовательно, дополнительно содержат один или более подходящих адъювантов. Таким образом, пептиды тау по настоящему изобретению, присутствующие в липосоме или конъюгате, можно вводить в комбинации с подходящим адъювантом для достижения желаемого иммунного ответа у субъекта. Подходящие адъюванты можно вводить до, после или одновременно с введением липосомы или конъюгата по настоящему изобретению. Предпочтительные адъюванты усиливают естественный ответ на иммуноген, не вызывая конформационных изменений иммуногена, которые влияют на качественную форму ответа. Примерами адъювантов являются соли алюминия (квасцы), такие как гидроксид алюминия, фосфат алюминия и сульфат алюминия. Другие примеры адъювантов включают CpG, такой как CpG2006 (также известный как CpG 7909), CpG 1018, CpG2395, CpG2216, CpG1826 или CpG2336. Такие адъюванты можно использовать с другими специфическими иммуностимулирующими агентами или без них, такими как липид А класса MPLA (3 де-О-ацилированный монофосфориллипид А (MPL™), синтетический 3-деацил монофосфорил-гексаацил-липид А (3D-(6-ацил) PHAD®), PHAD™, PHAD®-504, 3D-PHAD®), полимерные или мономерные аминокислоты, такие как полиглутаминовая кислота или полилизин. Такие адъюванты можно использовать с другими специфическими иммуностимулирующими агентами или без них, такими 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-изоглу-L-Ala-дипальмитоксипропиламид (DTP-DPP) Theramide™) или другие компоненты бактериальной клеточной стенки. Эмульсии типа «масло-в-воде» включают MF59 (см. WO 90/14837), содержащую 5% сквалена, 0,5% Tween 80 и 0,5% Span 85 (необязательно содержащий различные количества MTP-PE), полученную в виде субмикронных частиц с помощью микрофлюидизатора; SAF, содержащую 10% сквалена, 0,4% Tween 80, 5% блокированного плюроником полимера L121 и thr-MDP, либо микрофлюидизированную до субмикронной эмульсии, либо перемешанную вихревым способом с получением эмульсии с более крупным размером частиц; и адъювантную систему Ribi™ (RAS) (Ribi ImmunoChem, Hamilton, Mont.), содержащую 0,2% Tween 80 и один или более компонентов бактериальной клеточной стенки, выбранных из группы,

состоящей из монофосфориллипида А (MPL™), димиколята трегалозы (TDM) и скелета клеточной стенки (CWS), предпочтительно MPL™+CWS (Detox™). Другие адъюванты включают полный адъювант Фрейнда (CFA) и цитокины, такие как интерлейкины (IL-1, IL-2 и IL-12), макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF) и фактор некроза опухоли (TNF).

[000120] В контексте настоящего описания термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству активного ингредиента или компонента, которое вызывает желаемый биологический или лекарственный ответ у субъекта. Терапевтически эффективное количество может быть определено эмпирически и обычным способом в соответствии с заявленной целью. Для определения диапазона оптимальных доз необязательно можно использовать, например, анализы *in vitro*. Выбор конкретной эффективной дозы может быть определен (например, посредством клинических испытаний) специалистами в данной области техники с учетом нескольких факторов, включая подлежащее лечению или профилактике заболевание, вовлеченные симптомы, массу тела пациента, состояние пациента, иммунный статус и другие факторы, известные квалифицированному специалисту. Точная доза, которую следует использовать в составе, также будет зависеть от пути введения и тяжести заболевания и должна определяться в соответствии с мнением практикующего врача и обстоятельствами каждого пациента. Эффективные дозы можно экстраполировать из кривых доза-ответ, полученных из тест-систем *in vitro* или на моделях животных.

[000121] В некоторых вариантах осуществления «терапевтически эффективное количество» представляет собой «иммунологически эффективное количество», что означает количество композиции, достаточное для индукции желаемого иммунного эффекта или иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта. В одном из вариантов осуществления иммуногенно эффективное количество означает количество, достаточное для индукции иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта. В другом варианте осуществления иммуногенно эффективное количество означает количество, достаточное для выработки иммунитета у нуждающегося в этом субъекта, например, для обеспечения терапевтического эффекта против нейродегенеративного заболевания, расстройства или состояния. Иммуногенно эффективное количество может меняться в зависимости от множества факторов, таких как физическое состояние субъекта, возраст, вес, состояние здоровья и т.д. Иммуногенно эффективное количество может быть легко определено специалистом в данной области техники с учетом настоящего раскрытия.

[000122] В одном из вариантов осуществления иммуногенная композиция представляет собой примирующую композицию, используемую для примирования иммунного ответа, которую следует вводить перед введением бустерной композиции. Согласно вариантам осуществления изобретения примирующая композиция содержит иммунологически эффективное количество липосом, раскрытых в настоящем описании. Согласно вариантам осуществления изобретения иммуногенная композиция представляет собой бустерную композицию, используемую для бустирования иммунного ответа,

которую следует вводить после введения бустерной композиции. Согласно вариантам осуществления изобретения бустерная композиция содержит иммунологически эффективное количество конъюгата, раскрытого в настоящем описании. В соответствии с вариантами осуществления изобретения иммуногенная композиция, содержащая иммунологически эффективное количество липосом, раскрытых в настоящем описании, может использоваться как в качестве примирующей композиции для примирования иммунного ответа, так и в качестве бустерной композиции для бустирования иммунного ответа. Примирующую композицию можно использовать в комбинации с одной или более бустерными композициями. Бустерные композиции можно вводить более одного раза.

[000123] В контексте настоящего описания термин «в комбинации», касательно введения субъекту двух или более видов терапии, относится к применению более чем одного вида терапии. Использование термина «в комбинации» не ограничено порядком введения нескольких видов терапии субъекту. Например, первый вид терапии (например, представленная в настоящем описании липосомальная композиция) может быть введена 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, 12 недель или более до), 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, 12 недель или более после) введения субъекту второго вида терапии (например, представленной в настоящем описании композиции на основе конъюгата).

[000124] Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть составлены в соответствии со способами, хорошо известными в данной области. Оптимальные соотношения каждого компонента в композициях могут быть определены методами, хорошо известными специалистам в данной области, с учетом настоящего раскрытия.

[000125] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит липосомы, раскрытые в настоящем описании, и буфер, содержащий одну или более аминокислот, таких как гистидин или глицин, и/или один или более углеводов, таких как глюкоза или сахароза.

[000126] В других вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит конъюгат, представленный в настоящем описании, и буфер, содержащий одну или более аминокислот, таких как гистидин или глицин, один или более углеводов, таких как глюкоза или сахароза, и/или поверхностно-активное вещество, такое как полисорбат 80, полисорбат 20 и т.д.

[000127] Способы применения

[000128] Согласно изобретению предлагается способ примирования и усиления иммунного ответа против тау-белка у субъекта, страдающего нейродегенеративным заболеванием, с помощью липосомальной вакцины, содержащей пептиды тау, и вакцины на основе конъюгата, содержащей пептиды тау, конъюгированные с иммуногенным

носителем.

[000129] В одном из общих аспектов способ индукции иммунного ответа против тау-белка у субъекта, страдающего нейродегенеративным расстройством, включает:

введение субъекту примирующей композиции, содержащей иммунологически эффективное количество липосомы, содержащей:

первый фосфопептид тау;

эпитоп хелперных Т-клеток;

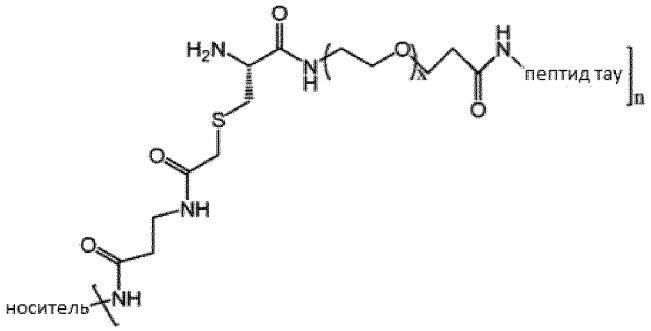
липидированный олигонуклеотид CpG; и

адъювант, содержащий лиганд толл-подобного рецептора 4;

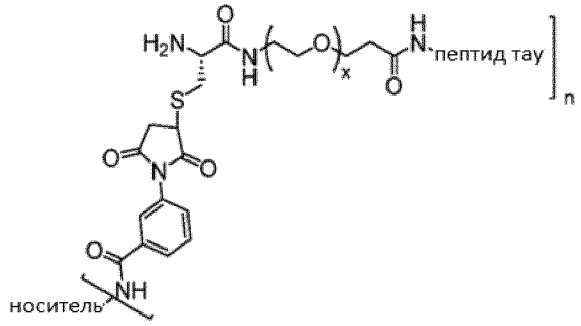
где фосфопептид тау презентирован на поверхности липосомы,

и где примирующая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель; и

введение субъекту первой бустерной композиции, содержащей иммунологически эффективное количество конъюгата, содержащего второй фосфопептид тау и иммуногенный носитель, конъюгированный с ним через линкер, где конъюгат имеет структуру формулы (I):



или имеет структуру формулы (II):



,

в которой

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

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

носитель представляет собой иммуногенный носитель, выбранный из группы, состоящей из гемоцианина лимфы улитки (KLH), столбнячного анатоксина, CRM197 и смеси белков внешней мембраны из *N. meningitidis* (OMP) или их производных; и

пептид тау представляет собой второй фосфопептид тау, и

где первая бустерная композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель,

где первый фосфопептид тау и второй фосфопептид тау, каждый независимо, имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 12.

[000130] В некоторых вариантах осуществления иммунологически эффективное количество конъюгата вводят вместе с одним или более адъювантами, такими как адъюванты, раскрытые в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления иммунологически эффективное количество конъюгата вводят с одной или более солями алюминия (квасцами), такими как гидроксид алюминия, фосфат алюминия и сульфат алюминия, и/или одним или более CpG, такими как CpG2006 (также известным как CpG 7909), CpG 1018, CpG2395, CpG2216, CpG1826 или CpG2336.

[000131] В некоторых вариантах осуществления первый фосфопептид тау и второй фосфопептид тау идентичны. В других вариантах осуществления первый фосфопептид тау и второй фосфопептид тау являются разными, предпочтительно они имеют по меньшей мере один общий эпитоп.

[000132] В определенном варианте осуществления способ дополнительно содержит введение субъекту второй бустерной композиции, содержащей иммуногенное эффективное количество липосомы.

[000133] Согласно конкретным аспектам, иммунный ответ индуцируется антителами против фосфорилированного тау-белка, предпочтительно ePHF.

[000134] В некоторых вариантах осуществления первую бустерную композицию вводят примерно через 27-32 дня, например, примерно через 27, 28, 29, 30, 21 или 32 дня после введения примирующей композиции. В некоторых вариантах осуществления первую бустерную композицию вводят повторно примерно через 82-87 дней, например, примерно через 82, 83, 84, 85, 86 или 87 дней после введения примирующей композиции. В некоторых вариантах осуществления вторую бустерную композицию, содержащую иммуногенно эффективное количество липосом, вводят примерно через 167-172 дня, например примерно через 167, 168, 169, 170, 171 или 172 дня после введения примирующей композиции.

[000135] В некоторых вариантах осуществления первую бустерную композицию вводят примерно через 82-87 дней, например, примерно через 82, 83, 84, 85, 86 или 87 дней после введения примирующей композиции. В некоторых вариантах осуществления вторую бустерную композицию вводят примерно через 27-32 дня, например примерно через 27, 28, 29, 30, 21 или 32 дня после введения примирующей композиции. В некоторых вариантах осуществления первую бустерную композицию вводят повторно примерно через 167-172 дня, например примерно через 167, 168, 169, 170, 171 или 172 дня после введения примирующей композиции.

[000136] Специалист в данной области способен менять точное время введения примирующих и бустерных композиций, частоту их введения, дозировку и т.д., основываясь на изложенных в настоящем описании принципах и клиническом опыте.

[000137] В способе индукции иммунного ответа против тау-белка у страдающего нейродегенеративным расстройством субъекта может быть использована любая из представленных в настоящем описании примирующих композиций и бустерных композиций. Варианты осуществления примирующей композиции; бустерной композиции; липосом; и/или конъюгатов и т.д., которые можно использовать в способах по изобретению, подробно обсуждаются выше, а также ниже в иллюстративных примерах.

[000138] В контексте настоящего описания термины «индуцировать» и «стимулировать» и их варианты относятся к любому измеримому увеличению клеточной активности. Индукция иммунного ответа может включать, например, активацию, пролиферацию или созревание популяции иммунных клеток, увеличение продукции цитокина и/или другого индикатора повышенной иммунной функции. В некоторых вариантах осуществления индукция иммунного ответа может включать увеличение пролиферации В-клеток, выработку антиген-специфических антител, увеличение пролиферации антиген-специфических Т-клеток, улучшение презентации антигена дендритных клеток и/или увеличение экспрессии определенных цитокинов, хемокинов и костимулирующих маркеров.

[000139] Способность индуцировать или стимулировать иммунный ответ против тау-белка при введении в организм животного или человека может быть оценена либо *in vitro*, либо *in vivo* с помощью различных анализов, которые являются стандартными в данной области. Общее описание доступных методов оценки возникновения и активации иммунного ответа см., например, в Coligan et al. (1992 и 1994, Current Protocols in Immunology; ed. J Wiley & Sons Inc., National Institute of Health). Измерение клеточного иммунитета может быть выполнено методами, хорошо известными в данной области, например, путем измерения профилей цитокинов, секретируемых активированными эффекторными клетками, включая клетки, полученные из CD4+ и CD8+ Т-клеток (например, количественное определение методом ELISPOT клеток, продуцирующих IL-4 или IFN гамма), путем определения статуса активации иммунных эффекторных клеток (например, с помощью анализов пролиферации Т-клеток, используя классический метод включения [^{3}H]тимидина), путем анализа антиген-специфических Т-лимфоцитов у сенсибилизированного субъекта (например, пептид-специфический лизис в анализе цитотоксичности и т.д.).

[000140] Способность стимулировать клеточный и/или гуморальный ответ может быть определена путем тестирования биологического образца (например, крови, плазмы, сыворотки, PBMC, мочи, слюны, фекалий, спинномозговой жидкости или лимфатической жидкости), полученного от субъекта, на наличие антител, направленных на иммуногенный(ые) пептид(ы) тау, вводимый в фармацевтической композиции (см., например, Harlow, 1989, Antibodies, Cold Spring Harbor Press). Например, титры антител, продуцируемых в ответ на введение композиции, обеспечивающей иммуноген, можно измерить с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), мезо-шкалы обнаружения (MSD), дот-блоттинга, гелей SDS-PAGE, ELISPOT или анализа

антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP).

[000141] Изобретение относится к способу лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания или расстройства у нуждающегося в этом субъекта с использованием липосомальной вакцины, содержащей пептиды тау, и вакцины на основе конъюгата, содержащей пептиды тау, конъюгированные с иммуногенным носителем.

[000142] Обычный специалист в данной области способен менять бустерные композиции, точное время введения примирующих и бустерных композиций, частоту их введения, дозировку и т.д., с учетом представленных в настоящем описании методов и клинических испытаний.

[000143] В способе лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания или расстройства у нуждающегося в этом субъекта можно использовать любую из представленных в настоящем описании примирующих и бустерных композиций. Варианты осуществления примирующей композиции; бустерной композиции; липосом; и/или конъюгатов и т.д., которые можно использовать в способах по изобретению, подробно обсуждаются выше, а также ниже в иллюстративных примерах.

[000144] В контексте настоящего описания термин «субъект» относится к животному. Согласно конкретным вариантам осуществления субъект представляет собой млекопитающее, включая неприматов (например, верблюда, осла, зебру, корову, свинью, лошадь, козу, овцу, кошку, собаку, крысу, кролика, морскую свинку или мышь) или приматов (например, обезьяну, шимпанзе или человека). Согласно конкретным вариантам осуществления субъектом является человек.

[000145] В контексте настоящего описания термины «лечить», «лечащий» и «лечение» предназначены для обозначения улучшения или инверсии по меньшей мере одного измеримого физического параметра, связанного с нейродегенеративным заболеванием, расстройством или состоянием, которое не обязательно проявлено, но может быть проявлено у субъектеа. Термины «лечить», «лечащий» и «лечение» также могут относиться к инициации регрессии, предотвращению прогрессирования или, по меньшей мере, замедлению прогрессирования заболевания, расстройства или состояния. В конкретном варианте осуществления «лечить», «лечащий» и «лечение» относятся к облегчению, предотвращению развития или проявления, или сокращению продолжительности одного или более симптомов, связанных с нейродегенеративным заболеванием, расстройством или состоянием. В конкретном варианте осуществления «лечить», «лечащий» и «лечение» относятся к предотвращению рецидива заболевания, расстройства или состояния. В конкретном варианте осуществления «лечить», «лечащий» и «лечение» относятся к увеличению выживаемости субъекта, страдающего заболеванием, расстройством или состоянием. В конкретном варианте осуществления «лечить», «лечащий» и «лечение» относятся к устранению заболевания, расстройства или состояния у субъекта.

[000146] Согласно конкретным вариантам осуществления, терапевтически эффективное количество относится к количеству терапевтического средства, которое

является достаточным для достижения одного, двух, трех, четырех или более из следующих эффектов: (i) уменьшения или облегчения тяжести заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (ii) сокращения продолжительности заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (iii) предотвращения прогрессирования заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (iv) обеспечения регрессии заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома,; (v) предотвращения развития или начала заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (vi) предотвращения рецидива заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (vii) уменьшение стационарного лечения субъекта, имеющего заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению, или связанного с ним симптома; (viii) сокращения продолжительности госпитализации субъекта, имеющего заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению, или связанного с ним симптома; (ix) увеличения выживаемости субъекта, имеющего заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению, или симптома, связанного с ним; (xi) ингибирования или уменьшения заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или симптома, связанного с ним, у субъекта; и/или (xii) усиления или улучшения профилактического или терапевтического эффекта(ов) другой терапии.

[000147] В контексте настоящего описания термин «нейродегенеративное заболевание, расстройство или состояние» включает любое нейродегенеративное заболевание, расстройство или состояние, известное специалистам в данной области, с учетом настоящего раскрытия. Примеры нейродегенеративных заболеваний, расстройств или состояний включают нейродегенеративные заболевания или расстройства, вызванные или связанные с образованием нейрофибриллярных поражений, такие как тау-ассоциированные заболевания, расстройства или состояния, называемые таупатиями. Согласно конкретным вариантам осуществления нейродегенеративное заболевание, расстройство или состояние включает любое из заболеваний или расстройств, которые характеризуются сосуществованием тау-белка и амилоидных патологий, включая, помимо прочего, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Крейтцфельда-Якоба, деменцию боксеров, синдром Дауна, болезнь Герстманна-Штреусслера-Шейнкера, миозит с тельцами включения, прион-протеинцеребральную амилоидную ангиопатию, черепно-мозговую травму, боковой амиотрофический склероз, комплекс паркинсонизма и деменции Гуама, болезнь моторных нейронов негуамского типа с нейрофибриллярными клубками, деменцию с аргирофильными гранулами, кортикобазальную дегенерацию, деменцию Леви, амиотрофический боковой склероз, диффузные нейрофибриллярные клубки с кальцификацией, лобно-височную деменцию, предпочтительно лобно-височную деменцию с паркинсонизмом, сцепленную с хромосомой 17 (FTDP-17), лобно-височную лобарную деменцию, болезнь Галлервордена-Шпатца, мультисистемную атрофию, болезнь Ниманна-Пика типа С, болезнь Пика, прогрессирующий субкортикальный глиоз, прогрессирующий

надъядерный паралич, подострый склерозирующий панэнцефалит, деменцию с преобладанием нейрофибриллярных клубков, постэнцефалитный паркинсонизм, миотоническую дистрофию, хроническую травматическую энцефалопатию (CTE), церебральную ангиопатию или деменцию с тельцами Леви (LBD). Согласно конкретным вариантам осуществления нейродегенеративное заболевание, расстройство или состояние представляет собой болезнь Альцгеймера или другую таупатию.

[000148] Клиническое течение болезни Альцгеймера можно разделить на стадии с прогрессирующей картиной когнитивных и функциональных нарушений. Стадии могут быть определены с помощью оценочных шкал, известных в данной области техники, включая, например, NIA-AA Research Framework. См., например, Dubois et al., Alzheimer's & Dementia 12(2016) 292-323, Dubois et al., Lancet Neurol 2014; 13:614-29, Jack et al., Alzheimer's & Dementia 14(2018) 535-562, содержание каждой из которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылок.

[000149] Согласно предпочтительным вариантам осуществления нейродегенеративное заболевание, расстройство или состояние представляет собой болезнь Альцгеймера на ранней стадии, легкое когнитивное нарушение (MCI), вызванное болезнью Альцгеймера, болезнь Альцгеймера легкой степени тяжести или болезнь Альцгеймера от легкой до умеренной степени тяжести.

[000150] В некоторых вариантах осуществления нуждающийся в лечении субъект является положительным относительно отложения амилоида в головном мозге, без проявления значительных когнитивных нарушений. Отложение амилоида в головном мозге может быть обнаружено с помощью методов, известных в данной области, таких как ПЭТ-сканирование, масс-спектрометрия и иммунопреципитация, или других методов.

[000151] Настоящее изобретение также относится к способу ускорения выведения агрегатов тау-белка из головного мозга субъекта, где указанный способ включает введение субъекту фармацевтической композиции в соответствии с вариантом осуществления изобретения в условиях, эффективных для ускорения выведения агрегатов тау-белка из головного мозга субъекта. Согласно конкретным вариантам осуществления агрегаты тау-белка представляют собой нейрофибриллярные клубки или их патологические предшественники тау-белка.

[000152] Настоящее изобретение также относится к способу замедления у субъекта прогрессирования поведенческого фенотипа, связанного с тау-патологией, где указанный способ включает введение субъекту фармацевтической композиции в соответствии с вариантом осуществления изобретения в условиях, эффективных для замедления прогрессирования поведенческого фенотипа, связанного с тау-патологией.

[000153] В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения введение пептида тау через введение фармацевтической композиции в соответствии с вариантом осуществления изобретения индуцирует активный иммунный ответ у субъекта на пептид тау и на патологическую форму тау, тем самым облегчая удаление связанных агрегатов тау-белка, замедляя прогрессирование поведения, связанного с тау-патологией,

и/или обеспечивая лечение лежащей в основе таупатии. В соответствии с этим аспектом настоящего изобретения иммунный ответ включает развитие полезного гуморального (опосредованного антителами) ответа, направленного против пептида тау, и клеточного (опосредованного антиген-специфическими Т-клетками или продуктами их секреции) ответа, направленного против эпитопа Т-клеток или иммуногенного носителя.

[000154] В данном контексте поведенческий фенотип, связанный с тау-патологией, включает, без ограничения, когнитивные нарушения, раннее изменение личности и расторможенность, апатию, абулию, мутизм, апраксию, персеверацию, стереотипные движения/поведение, гипероральность, дезорганизацию, неспособность планировать или организовать последовательные задачи, эгоизм/черствость, антисоциальные черты, отсутствие сочувствия, прерывистость, аграмматическую речь с частыми парафазными ошибками, но относительно сохраненным пониманием, нарушенное понимание и дефицит подбора слов, медленно прогрессирующую нестабильность походки, ретропульсии, замирание, частые падения, аксиальную ригидность, не связанную с леводопой, надъядерный паралич взора, прямоугольные подергивания, медленные вертикальные саккады, псевдобульбарный паралич, апраксию конечностей, дистонию, потерю чувствительности коры головного мозга и тремор.

[000155] При осуществлении способов по настоящему изобретению перед введением иммуногенных пептидов или антител по настоящему изобретению предпочтительно осуществлять выбор субъекта, страдающего или имеющего риск развития болезни Альцгеймера или другой таупатии, субъекта, имеющего агрегаты тау-белка в головном мозге, или субъекта, демонстрирующего связанный с клубочком поведенческий фенотип. Субъекты, подходящие для лечения, включают людей с риском развития болезни, но без проявления симптомов, а также пациентов, у которых в данный момент времени проявлены симптомы. В случае болезни Альцгеймера практически любой человек подвержен риску развития болезни Альцгеймера. Следовательно, способы по настоящему изобретению можно применять с целью профилактики среди населения в целом без необходимости какой-либо оценки риска для рассматриваемого пациента. Способы по изобретению особенно полезны для людей с известным генетическим риском развития болезни Альцгеймера. К таким лицам относятся те, у кого имеются родственники, перенесшие болезнь, и те, риск которых определен с помощью анализов с использованием генетических или биохимических маркеров.

[000156] У бессимптомных пациентов лечение можно начинать в любом возрасте (например, 10, 20, 30 лет). Однако, как правило, нет необходимости начинать лечение до достижения пациентом 40, 50, 60 или 70 лет. Лечение обычно предполагает прием нескольких доз в течение определенного периода времени. Лечение можно контролировать путем анализа антител или активированных Т-клеточных или В-клеточных ответов на терапевтический агент с течением времени. Если реакция уменьшается, назначают бустерную дозу.

[000157] В профилактических целях фармацевтические композиции, содержащие

пептиды тау, вводят пациенту с предрасположенностью к развитию болезни Альцгеймера или другой таупатии или с риском развития болезни, в количестве, достаточном для устранения или снижения риска, уменьшения тяжести или отсрочки начала болезни, включая биохимические, гистологические и/или поведенческие симптомы заболевания, его осложнения и промежуточные патологические фенотипы, проявляющиеся во время развития болезни. В терапевтических целях фармацевтические композиции, содержащие пептид тау, вводят пациенту с подозрением на такое заболевание или уже страдающему этим заболеванием, в количестве, достаточном для излечения или по меньшей мере частичного купирования симптомов заболевания (биохимических, гистологических и/или поведенческих), включая его осложнения и промежуточные патологические фенотипы при развитии болезни.

[000158] Эффективные дозы фармацевтической композиции по изобретению для профилактики и/или лечения нейродегенеративного заболевания, расстройства или состояния меняются в зависимости от многих различных факторов, включая способ введения, целевой участок, физиологическое состояние пациента, другие назначаемые лекарства, а также от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Количество фармацевтической композиции зависит от того, вводится ли также адъювант, при этом в отсутствие адъюванта требуются более высокие дозы. В способах по изобретению субъекту вводят примирующую композицию по меньшей мере один раз и бустерную композицию по меньшей мере один раз. Антигены в соответствующих примирующих и бустерных композициях, несмотря на многократное введение бустерных композиций, не обязательно должны быть идентичными, но должны иметь общие антигенные детерминанты или быть в значительной степени похожими друг на друга.

[000159] Специалисты в данной области техники легко поймут, что режим для примирования и бустирования может быть скорректирован на основе измеренных иммунных ответов после введений. Например, бустерные композиции обычно вводят через несколько недель или месяцев после введения примирующей композиции, например, через примерно 2 недели или примерно 3 недели, или примерно 4 недели, или примерно 8 недель, или примерно 12 недель, или примерно 16 недель, или примерно 20 недель, или примерно 24 недели, или примерно 26 недель, или примерно 28 недель, или примерно 30 недель, или примерно 32 недели, или примерно 36 недель, или через примерно от одного до двух лет после введения примирующей композиции.

[000160] Для профилактического и/или терапевтического лечения фармацевтические композиции можно вводить парентеральным, местным, внутривенным, пероральным, подкожным, внутриартериальным, внутричерепным, внутрибрюшинным, внутрикожным, интраназальным или внутримышечным способом введения. Наиболее типичным способом введения иммуногенного агента является подкожная или внутримышечная инъекция. Этот последний тип инъекции чаще всего выполняют в мышцы рук или ног.

[000161] При желании композиции могут быть представлены в наборе, упаковке или

дозаторе, которые могут содержать одну или более единичных дозированных форм, содержащих активный ингредиент. Набор, например, может содержать металлическую или пластиковую фольгу, такую как блистерная упаковка. К набору, упаковке или дозатору могут прилагаться инструкции по применению.

[000162] Согласно конкретным вариантам осуществления, набор содержит фармацевтическую композицию, содержащую липосомы согласно варианту осуществления изобретения, и фармацевтическую композицию, содержащую конъюгат согласно варианту осуществления изобретения.

ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[000163] Согласно изобретению также представлены следующие неограничивающие варианты осуществления.

[000164] Вариант осуществления 1 относится к способу индукции иммунного ответа против тау-белка, предпочтительно индукции антител против фосфопептида тау и/или ePHF, у страдающего нейродегенеративным расстройством субъекта, где способ включает:

введение субъекту примирующей композиции, содержащей иммунологически эффективное количество липосомы, содержащей:

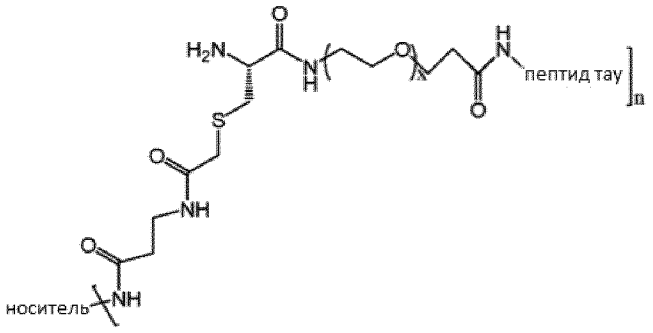
a. первый пептид тау; и

b. эпитоп хелперных Т-клеток;

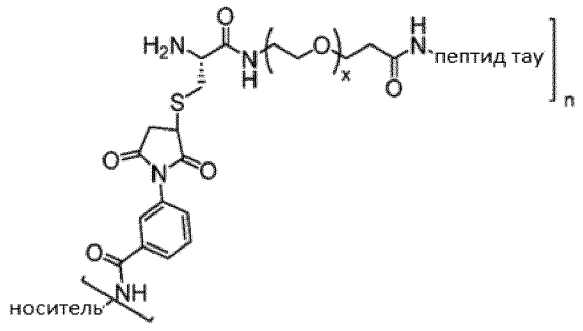
где пептид тау презентирован на поверхности липосомы,

и фармацевтически приемлемый носитель; и

введение субъекту первой бустерной композиции, содержащей иммунологически эффективное количество конъюгата, содержащего второй фосфопептид тау и иммуногенный носитель, конъюгированный с ним через линкер, где конъюгат имеет структуру формулы (I):



или имеет структуру формулы (II):



,

в которой

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;

носитель представляет собой иммумогенный носитель; где иммуногенный носитель предпочтительно выбирают из группы, состоящей из гемоцианина моллюска улитки (KLH), столбнячного анатоксина, CRM197 и смеси белков внешней мембраны из *N. meningitidis (OMP)* или их производных; и

где пептид тау представляет собой второй фосфопептид тау;

и первая бустерная композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

[000165] Вариант осуществления 2 относится к способу по варианту осуществления 1, где пептид тау липосомы представляет собой фосфопептид тау.

[000166] Вариант осуществления 3 относится к способу по варианту осуществления 1 или 2, где липосома дополнительно содержит лиганд толл-подобного рецептора.

[000167] Вариант осуществления 4 относится к способу по варианту осуществления 3, где лиганд толл-подобного рецептора содержит по меньшей мере один из лиганда толл-подобного рецептора 4 и лиганда толл-подобного рецептора 9.

[000168] Вариант осуществления 5 относится к способу по варианту осуществления 3 или 4, где лиганд толл-подобного рецептора является лигандом толл-подобного рецептора 4.

[000169] Вариант осуществления 6 относится к способу по варианту осуществления 5, где лиганд толл-подобного рецептора 4 содержит монофосфориллипид A (MPLA).

[000170] Вариант осуществления 7 относится к способу по варианту осуществления 3 или 4, где лиганд толл-подобного рецептора является лигандом толл-подобного рецептора 9.

[000171] Вариант осуществления 8 относится к способу по варианту осуществления 7, где лиганд толл-подобного рецептора 9 содержит липидированный олигонуклеотид CpG.

[000172] Вариант осуществления 9 относится к способу по варианту осуществления 1, где примирующая композиция содержит иммунологически эффективное количество липосомы, содержащей:

a. пептид тау;

b. эпитоп хелперных Т-клеток; и

c. по меньшей мере один из

i. лиганда толл-подобного рецептора 9, и

ii. лиганда толл-подобного рецептора 4.

[000173] Вариант осуществления 10 относится к способу по варианту осуществления 9, где пептид тау представляет собой фосфопептид тау.

[000174] Вариант осуществления 11 относится к способу по варианту осуществления 9 или 10, где лиганд толл-подобного рецептора 9 представляет собой

липидированный олигонуклеотид CpG.

[000175] Вариант осуществления 12 относится к способу по любому из вариантов осуществления 9-11, где липосома содержит лиганд толл-подобного рецептора 4 и лиганд толл-подобного рецептора 9.

[000176] Вариант осуществления 13 относится к способу по варианту осуществления 12, где лиганд толл-подобного рецептора 4 содержит монофосфориллипид А (MPLA).

[000177] Вариант осуществления 14 относится к способу по варианту осуществления 1, где примирующая композиция содержит иммунологически эффективное количество липосомы, содержащей:

фосфопептид тау;

эпитоп хелперных Т-клеток;

липидированный олигонуклеотид CpG; и

адъювант, содержащий лиганд толл-подобного рецептора 4;

где фосфопептид тау презентирован на поверхности липосомы.

[000178] Вариант осуществления 15 относится к способу по варианту осуществления 14, где лиганд толл-подобного рецептора 4 содержит монофосфориллипид А (MPLA).

[000179] Вариант осуществления 16 относится к способу по любому из вариантов осуществления 1-15, где эпитоп хелперных Т-клеток инкапсулирован в липосому.

[000180] Вариант осуществления 16a относится к способу по любому из вариантов осуществления 1-15, где эпитоп хелперных Т-клеток включен в мембрану липосомы.

[000181] Вариант осуществления 16b представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 1-15, где эпитоп Т-хелперных клеток презентирован на поверхности липосомы.

[000182] Вариант осуществления 17 относится к способу по вариантам осуществления 1-16b, где примирующая композиция содержит иммунологически эффективное количество липосомальной композиции, содержащей:

фосфопептид тау;

эпитоп хелперных Т-клеток;

липидированный олигонуклеотид CpG; и

монофосфориллипид А (MPLA);

где фосфопептид тау презентирован на поверхности липосомы, и

эпитоп Т-клеток инкапсулирован в липосому.

[000183] Вариант осуществления 17a относится к способу по варианту осуществления 17, где MPLA представляет собой 3-O-дезацил-4'-монофосфориллипид А, предпочтительно MPL™.

[000184] Вариант осуществления 17b относится к способу по варианту осуществления 17, где MPLA представляет собой 3-деацил монофосфорил-гексаацил-липид А, предпочтительно 3D-(6-ацил) PHAD®).

[000185] Вариант осуществления 17c относится к способу по варианту осуществления 17, где MPLA представляет собой монофосфорил-3-деацил-липид A, предпочтительно 3D-PHAD®.

[000186] Вариант осуществления 18 относится к способу по любому из вариантов осуществления 1-17c, где липосомальная композиция примирующей композиции 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.

[000187] Вариант осуществления 19 относится к способу по любому из вариантов осуществления 1-18, где пептид тау липосомы имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 12 или по меньшей мере на 85%, 90% или 95% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 12.

[000188] Вариант осуществления 19-1 относится к способу по варианту осуществления 19, где пептид тау липосомы представляет собой фосфопептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3 и 5-12.

[000189] Вариант осуществления 19-2 относится к способу по варианту осуществления 19-1, где фосфопептид тау липосомы содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

[000190] Вариант осуществления 19-3 относится к способу по варианту осуществления 19-1, где фосфопептид тау липосомы содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

[000191] Вариант осуществления 19-4 относится к способу по варианту осуществления 19-1, где фосфопептид тау липосомы содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

[000192] Вариант осуществления 19a относится к способу по любому из вариантов осуществления 19, 19-1, 19-2, 19-3 и 19-4, где аминокислотная последовательность дополнительно содержит одну или более модификаций, обеспечивающих презентацию пептида тау на поверхности липосомы.

[000193] Вариант осуществления 19b относится к способу по варианту осуществления 19a, где одна или более модификаций включают по меньшей мере одно из пальмитоилирования и модификации додецилом.

[000194] Вариант осуществления 19c относится к способу по варианту осуществления 19a или 19b, где пептид тау липосомы модифицирован на N-конце посредством одной или более модификаций.

[000195] Вариант осуществления 19d относится к способу по любому из вариантов осуществления 19a-19c, где пептид тау липосомы модифицирован на C-конце посредством одной или более модификаций.

[000196] Вариант осуществления 19e относится к способу по варианту

осуществления 19d, где пептид тау липосомы является пальмитоилированным как на N-конце, так и на С-конце.

[000197] Вариант осуществления 19f относится к способу по любому из вариантов осуществления 19a-19e, где пептид тау липосомы дополнительно содержит одну или более дополнительных аминокислот для облегчения осуществления одной или более модификаций.

[000198] Вариант осуществления 19g относится к способу по варианту осуществления 19f, где одну или более дополнительных аминокислот выбирают из группы, состоящей из Lys, Cys, Ser и Thr.

[000199] Вариант осуществления 19h относится к способу по любому из вариантов осуществления 19-19g, где пептид тау липосомы является амидированным на С-конце.

[000200] Вариант осуществления 19i относится к способу по любому из вариантов осуществления 19-19h, где пептид тау липосомы состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27 - SEQ ID NO: 38.

[000201] Вариант осуществления 19j относится к способу по любому из вариантов осуществления 19-19i, где пептид тау липосомы состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 27.

[000202] Вариант осуществления 19k относится к способу по любому из вариантов осуществления 19-19i, где пептид тау липосомы состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28.

[000203] Вариант 19l относится к способу по любому из вариантов осуществления 19-19i, где пептид тау липосомы состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29.

[000204] Вариант осуществления 20 относится к способу по любому из вариантов осуществления 1-19l, где эпитоп хелперных Т-клеток липосомы содержит по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23 - SEQ ID NO: 26.

[000205] Вариант осуществления 20a относится к способу по варианту осуществления 20, где эпитоп хелперных Т-клеток содержит по меньшей мере две аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23 - SEQ ID NO: 26.

[000206] Вариант осуществления 20b относится к способу по варианту осуществления 20, где эпитоп хелперных Т-клеток содержит по меньшей мере три аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23 - SEQ ID NO: 26.

[000207] Вариант осуществления 20c относится к способу по варианту осуществления 20, где эпитоп хелперных Т-клеток содержит четыре аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 23 - SEQ ID NO: 26.

[000208] Вариант осуществления 20d относится к способу по любому из вариантов осуществления 20a-20c, где две или более аминокислотные последовательности,

выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23 - SEQ ID NO: 26, ковалентно связаны линкером.

[000209] Вариант осуществления 20e относится к способу по варианту 20d осуществления, где линкер содержит одну или более аминокислот, выбранных из группы, состоящей из Val (V), Ala (A), Arg (R), Gly (G), Ser (S), Lys (K).

[000210] Вариант осуществления 20f относится к способу по варианту осуществления 20e, где линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из VVR, GS, RR и RK.

[000211] Вариант осуществления 20g относится к способу по любому из вариантов осуществления 20-20f, где эпитоп хелперных Т-клеток является амидированным на С-конце.

[000212] Вариант осуществления 20h относится к способу по любому из вариантов осуществления 20-20g, где эпитоп хелперных Т-клеток модифицирован для встраивания в мембрану липосомы, презентации на поверхности липосомы или инкапсуляции в липосому, в зависимости от предполагаемого расположение эпитопа хелперных Т-клеток.

[000213] Вариант осуществления 20i относится к способу по любому из вариантов осуществления 20-20h, где эпитоп хелперных Т-клеток состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13 - SEQ ID NO: 17.

[000214] Вариант осуществления 20j относится к способу по любому из вариантов осуществления 1-20i, где липосома содержит пептид тау и эпитоп Т-хелперных клеток в массовом соотношении 6:1.

[000215] Вариант осуществления 20k относится к способу по любому из вариантов осуществления 1-20i, где липосома содержит пептид тау и эпитоп хелперных Т-клеток в массовом соотношении 5:1.

[000216] Вариант осуществления 20l относится к способу по любому из вариантов осуществления 1-20i, где липосома содержит пептид тау и эпитоп Т-хелперных клеток в массовом соотношении 4:1.

[000217] Вариант осуществления 20m относится к способу по любому из вариантов осуществления 1-20i, где липосома содержит пептид тау и эпитоп хелперных Т-клеток в массовом соотношении 3:1.

[000218] Вариант осуществления 20n относится к способу по любому из вариантов осуществления 1-20i, где липосома содержит пептид тау и эпитоп Т-хелперных клеток в массовом соотношении 2:1.

[000219] Вариант осуществления 20o относится к способу по любому из вариантов осуществления 1-20i, где липосома содержит пептид тау и эпитоп хелперных Т-клеток в массовом соотношении 1:1.

[000220] Вариант 21 осуществления относится к способу по любому из вариантов осуществления 1-20o, где липидированный олигонуклеотид CpG содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18 - SEQ ID NO: 22.

[000221] Вариант осуществления 21a относится к способу по варианту

осуществления 21, где олигонуклеотид CpG имеет одну или более фосфоротиоатных межнуклеотидных связей.

[000222] Вариант осуществления 21b относится к способу по варианту осуществления 21a, где все межнуклеотидные связи олигонуклеотида CpG являются фосфоротиоатными.

[000223] Вариант осуществления 21c относится к способу по любому из вариантов осуществления 21-21b, где липидированный олигонуклеотид CpG включает олигонуклеотид CpG, ковалентно связанный по меньшей мере с одной липофильной группой через линкер.

[000224] Вариант осуществления 21d относится к способу по варианту осуществления 21c, где линкер содержит $(C_2H_4O)_n$, где n представляет собой целое число от 0 до 10.

[000225] Вариант осуществления 21e относится к способу по варианту осуществления 21c, где линкер содержит алкильный спейсер, содержащий от 3 до 12 атомов углерода.

[000226] Вариант осуществления 21f относится к способу по любому из вариантов осуществления 21-21e, где по меньшей мере одна липофильная группа представляет собой холестерин.

[000227] Вариант осуществления 21g относится к способу по любому из вариантов осуществления 21-21f, где липидированный олигонуклеотид CpG содержит 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.

[000228] Вариант осуществления 22 относится к способу индукции иммунного ответа против тау-белка у субъекта, страдающего нейродегенеративным расстройством, включающему:

введение субъекту примирующей композиции, содержащей иммунологически эффективное количество липосомы, содержащей:

первый фосфопептид тау с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27 - SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 31 - SEQ ID NO: 38;

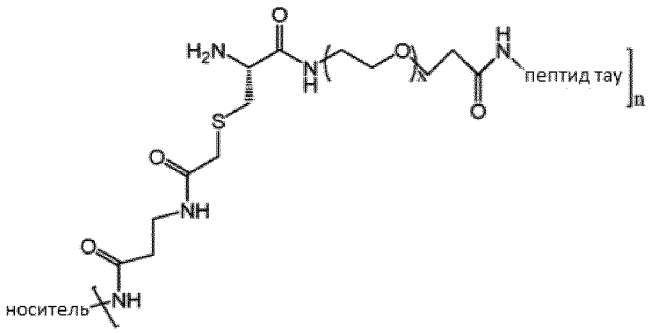
эпитоп хелперных Т-клеток с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 39 - SEQ ID NO: 44, предпочтительно эпитоп хелперных Т-клеток, состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13 - SEQ ID NO: 17;

липидированный олигонуклеотид CpG с нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18 - SEQ ID NO: 22, где олигонуклеотид CpG содержит одну или более фосфоротиоатных межнуклеотидных связей, и где олигонуклеотид CpG ковалентно связан по меньшей мере с одним холестерином через линкер; и

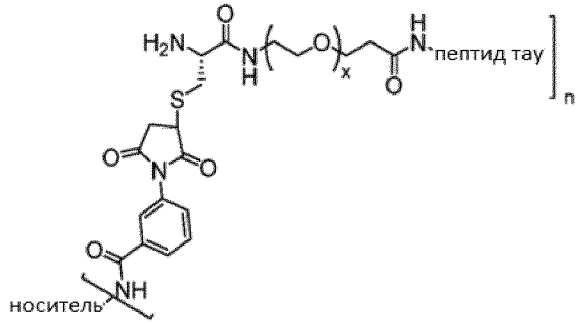
монофосфориллипид A (MPLA),

и фармацевтически приемлемый носитель; и

введение субъекту первой бустерной композиции, содержащей иммунологически эффективное количество конъюгата, содержащего второй фосфопептид тау и иммуногенный носитель, конъюгированный с ним через линкер, где конъюгат имеет структуру формулы (I):



или имеет структуру формулы (II):



,

в которой

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;

носитель представляет собой иммуногенный носитель;

пептид тау представляет собой второй фосфопептид тау;

и фармацевтически приемлемый носитель.

[000229] Вариант осуществления 22a относится к способу по варианту осуществления 22, где липосома содержит:

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

b. эпитоп хелперных Т-клеток, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13;

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

d. монофосфориллипид A (MPLA).

[000230] Вариант осуществления 22b относится к способу по варианту

осуществления 22 или 22a, где MPLA представляет собой 3-O-дезацил-4'-монофосфориллипид A, предпочтительно MPL™.

[000231] Вариант осуществления 22c относится к способу по варианту 22 или 22a, где MPLA представляет собой 3-деацил монофосфорил-гексаацил-липид A, предпочтительно 3D-(6-ацил) PHAD®.

[000232] Вариант осуществления 22d относится к способу по варианту осуществления 22 или 22a, где MPLA представляет собой монофосфорил-3-деациллипид A, предпочтительно 3D-PHAD®.

[000233] Вариант осуществления 23 относится к способу по любому из вариантов осуществления 22-22d, где эпитоп хелперных Т-клеток инкапсулирован в липосому.

[000234] Вариант осуществления 24 относится к способу по любому из вариантов осуществления 1-23, где x представляет собой целое число от 2 до 6.

[000235] Вариант осуществления 25 относится к способу по любому из вариантов осуществления 1-24, где x равно 3.

[000236] Вариант осуществления 26 относится к способу по любому из вариантов осуществления 1-25, где n находится в диапазоне от 3 до 7.

[000237] Вариант осуществления 27 относится к способу по любому из вариантов осуществления 1-26, где носитель представляет собой иммуногенный носитель, выбранный из группы, состоящей из гемоцианина моллюска улитки (KLH), столбнячного анатоксина, CRM197 и смеси белков внешней мембраны из *N. meningitidis* (OMP) или их производных.

[000238] Вариант осуществления 28 относится к способу по любому из вариантов осуществления 1-27, где второй фосфопептид тау конъюгата состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 12.

[000239] Вариант осуществления 28a относится к способу по варианту осуществления 28, где первый фосфопептид тау липосомы и второй фосфопептид тау конъюгата идентичны.

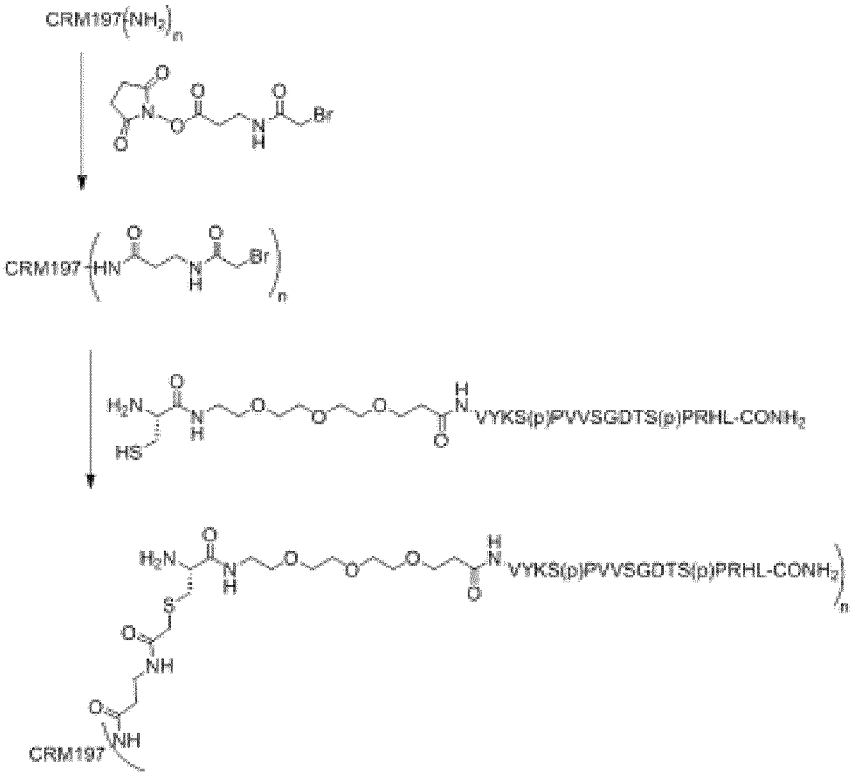
[000240] Вариант осуществления 28b относится к способу по варианту осуществления 28, где первый фосфопептид тау липосомы и второй фосфопептид тау конъюгата являются разными.

[000241] Вариант осуществления 28c относится к способу по варианту осуществления 28b, где первый фосфопептид тау липосомы и второй фосфопептид тау конъюгата имеют по меньшей мере один общий эпитоп.

[000242] Вариант осуществления 29 относится к способу по любому из вариантов осуществления 28-28c, где второй фосфопептид тау состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3.

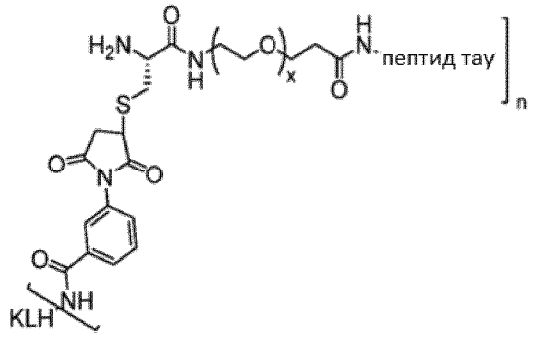
[000243] Вариант осуществления 30 относится к способу по любому из вариантов осуществления 1-29, где носителем является CRM197.

[000244] Вариант осуществления 31 относится к способу по любому из вариантов осуществления 1-30, где конъюгат имеет структуру:



где n находится в диапазоне от 3 до 7.

[000245] Вариант осуществления 32 относится к конъюгату по любому из вариантов осуществления 1-29, где конъюгат имеет структуру:



,

в которой

пептид тау состоит из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3;

x является целым числом от 0 до 10;

n является целым числом от 2 до 15;

пептид тау представляет собой фосфопептид тау; и

KLH представляет собой гемоцианин лимфы улитки.

[000246] Вариант осуществления 33 относится к способу по любому из вариантов осуществления 1-32, дополнительно включающему введение субъекту второй бустерной композиции, содержащей иммуногенно эффективное количество липосомы.

[000247] Вариант осуществления 33a относится к способу по варианту осуществления 33, где примирующая композиция, первая бустерная композиция и/или вторая бустерная композиция дополнительно содержат адъювант.

[000248] Вариант осуществления 33b относится к способу по варианту осуществления 33a, где адъювант содержит по меньшей мере один из лиганда TLR-4 и лиганда TLR-9.

[000249] Вариант осуществления 34 относится к способу по любому из вариантов осуществления 1-33b, где первую бустерную композицию вводят примерно через 27-32 дня, предпочтительно примерно через 29 дней после первичного введения примирующей композиции.

[000250] Вариант осуществления 35 относится к способу по варианту осуществления 34, дополнительно включающему повторное введение первой бустерной композиции примерно через 82-87 дней, предпочтительно примерно через 85 дней после первичного введения примирующей композиции.

[000251] Вариант осуществления 36 относится к способу по варианту осуществления 35, дополнительно включающему введение второй бустерной композиции примерно через 167-172 дня, предпочтительно примерно через 169 дней после первичного введения примирующей композиции.

[000252] Вариант осуществления 37 относится к способу по любому из вариантов осуществления 1-33b, где первую бустерную композицию вводят примерно через 82-87 дней, предпочтительно примерно через 85 дней после первичного введения примирующей композиции.

[000253] Вариант осуществления 38 относится к способу по варианту осуществления 37, дополнительно включающему введение второй бустерной композиции примерно через 27-32 дня, предпочтительно примерно через 29 дней после первичного введения примирующей композиции.

[000254] Вариант осуществления 39 относится к способу по варианту осуществления 35, дополнительно включающему повторное введение первой бустерной композиции примерно через 167-172 дня, предпочтительно примерно через 169 дней после первичного введения примирующей композиции.

[000255] Вариант осуществления 40 относится к способу лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания или расстройства у нуждающегося в этом субъекта, включающему:

введение субъекту примирующей композиции, содержащей иммунологически эффективное количество липосомы, содержащей:

первый фосфопептид тау с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27 - SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 31 - SEQ ID NO: 38;

эпитоп хелперных Т-клеток с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 39 - SEQ ID NO: 44, предпочтительно эпитоп хелперных Т-клеток, состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13 - SEQ ID NO: 17;

липидированный олигонуклеотид CpG с нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18 - SEQ ID NO: 22, где олигонуклеотид

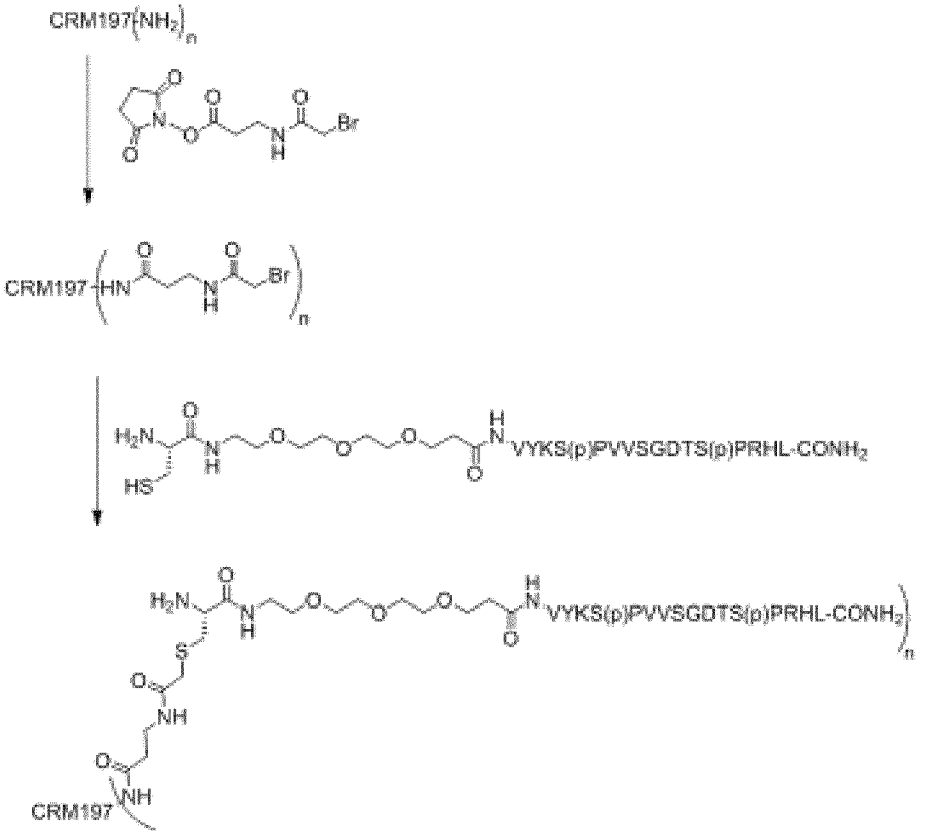
CpG содержит одну или более фосфоротиоатных межнуклеотидных связей, и где олигонуклеотид CpG ковалентно связан по меньшей мере с одним холестерином через линкер; и

монофосфориллипид A (MPLA);

где фосфопептид тау презентирован на поверхности липосомы,

и фармацевтически приемлемый носитель; и

введение субъекту первой бустерной композиции, содержащей иммунологически эффективное количество конъюгата, содержащего фосфопептид тау и иммуногенный носитель, конъюгированный с ним через линкер, где конъюгат имеет структуру:



где n представляет собой целое число от 3 до 7,

и фармацевтически приемлемый носитель.

[000256] Вариант осуществления 41 относится к способу по варианту осуществления 40, где первую бустерную композицию вводят примерно через 27-32 дня, предпочтительно примерно через 29 дней после первичного введения примирующей композиции.

[000257] Вариант осуществления 42 относится к способу по варианту осуществления 41, дополнительно включающему повторное введение первой бустерной композиции примерно через 82-87 дней, предпочтительно примерно через 85 дней после первичного введения примирующей композиции.

[000258] Вариант осуществления 43 относится к способу по варианту осуществления 42, дополнительно включающему введение второй бустерной композиции, содержащей иммуногенно эффективное количество липосомы, примерно через 167-172

дня, предпочтительно примерно через 169 дней после первичного введения примирующей композиции.

[000259] Вариант осуществления 44 относится к способу по варианту осуществления 40, где первую бустерную композицию вводят примерно через 82-87 дней, предпочтительно примерно через 85 дней после первичного введения примирующей композиции.

[000260] Вариант осуществления 45 относится к способу по варианту осуществления 44, дополнительно включающему введение второй бустерной композиции, содержащей иммуногенно эффективное количество липосомы, примерно через 27-32 дня, предпочтительно примерно через 29 дней после первичного введения примирующей композиции.

[000261] Вариант осуществления 46 относится к способу по варианту осуществления 45, дополнительно включающему повторное введение первой бустерной композиции примерно через 167-172 дня, предпочтительно примерно через 169 дней после первичного введения примирующей композиции.

[000262] Вариант осуществления 46a относится к способу по любому из вариантов осуществления 1-46, где иммунологически эффективное количество конъюгата вводят вместе с одним или более адъювантами.

[000263] Вариант осуществления 46b относится к способу по варианту осуществления 46a, где адъювант включает соль алюминия, такую как гидроксид алюминия, фосфат алюминия и сульфат алюминия.

[000264] Вариант осуществления 46c относится к способу по варианту осуществления 46a или 46b, где адъювант содержит CpG, такой как CpG2006 (также известный как CpG7909), CpG1018, CpG2395, CpG2216, CpG1826 или CpG2336.

[000265] Вариант осуществления 46d относится к способу по варианту осуществления 46c, где иммунологически эффективное количество конъюгата вводят вместе с солью алюминия, такой как гидроксид алюминия, фосфат алюминия и сульфат алюминия, и CpG, таким как CpG2006 (также известным как CpG7909), CpG1018, CpG2395, CpG2216, CpG1826 или CpG2336.

[000266] Вариант осуществления 46e относится к способу по варианту осуществления 46d, где иммунологически эффективное количество конъюгата вводят вместе с фосфатом алюминия и CpG1018.

[000267] Вариант осуществления 46f относится к способу по варианту осуществления 46d, где иммунологически эффективное количество конъюгата вводят вместе с гидроксидом алюминия и CpG7909.

[000268] Вариант осуществления 46g относится к способу по варианту осуществления 46d, где иммунологически эффективное количество конъюгата вводят вместе с сульфатом алюминия и CpG2395.

[000269] Вариант осуществления 46h относится к способу по варианту осуществления 46d, где иммунологически эффективное количество конъюгата вводят

вместе с гидроксидом алюминия и CpG1826.

[000270] Вариант осуществления 47 относится к способу по любому из вариантов осуществления 1-46h, где нейродегенеративное заболевание или расстройство вызвано или связано с образованием нейрофибриллярных поражений.

[000271] Вариант осуществления 48 относится к способу по любому из вариантов осуществления 1-47, где нейродегенеративное заболевание или расстройство представляет собой болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Крейтцфельда-Якоба, деменцию боксеров, синдром Дауна, болезнь Герстманна-Штреусслера-Шейнкера, миозит с тельцами включения, прион-протеинцеребральную амилоидную ангиопатию, черепно-мозговую травму, боковой амиотрофический склероз, комплекс паркинсонизма и деменции Гуама, болезнь моторных нейронов негуамского типа с нейрофибриллярными клубками, деменцию с аргирофильными гранулами, кортикобазальную дегенерацию, деменцию Леви, амиотрофический боковой склероз, диффузные нейрофибриллярные клубки с кальцификацией, лобно-височную деменцию, предпочтительно лобно-височную деменцию с паркинсонизмом, сцепленную с хромосомой 17 (FTDP-17), лобно-височную лобарную деменцию, болезнь Галлервордена-Шпатца, мультисистемную атрофию, болезнь Ниманна-Пика типа С, болезнь Пика, прогрессирующий субкортикальный глиоз, прогрессирующий надъядерный паралич, подострый склерозирующий панэнцефалит, деменцию с преобладанием нейрофибриллярных клубков, постэнцефалитный паркинсонизм, миотоническую дистрофию, хроническую травматическую энцефалопатию (CTE), церебральную ангиопатию или деменцию с тельцами Леви (LBD).

[000272] Вариант осуществления 49 относится к способу по любому из вариантов осуществления 1-48, где нейродегенеративное заболевание или расстройство представляет собой болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, синдром Дауна, прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП), лобно-височную деменцию с паркинсонизмом, сцепленную с хромосомой 17 (FTDP-17), болезнь Пика и PART (первичную возрастную таупатию), кортикобазальную дегенерацию, деменцию Леви, боковой амиотрофический склероз, миотоническую дисфазию, хроническую травматическую энцефалопатию (CTE), церебральную ангиопатию или деменцию с тельцами Леви (LBD).

[000273] Вариант осуществления 50 относится к способу по любому из вариантов осуществления 1-49, где нейродегенеративное заболевание или расстройство представляет собой болезнь Альцгеймера, прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП), лобно-височную деменцию с паркинсонизмом, сцепленную с хромосомой 17 (FTDP-17), или болезнь Пика и PART (первичную возрастную таупатию).

[000274] Вариант осуществления 51 относится к способу по любому из вариантов осуществления 1-50, где нейродегенеративное заболевание или расстройство представляет собой болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, синдром Дауна, лобно-височную деменцию с паркинсонизмом, сцепленную с хромосомой 17 (FTDP-17), кортикобазальную дегенерацию, деменцию Леви, боковой амиотрофический склероз, миотоническую дисфазию, хроническую травматическую энцефалопатию (CTE), церебральную

ангиопатию или деменцию с тельцами Леви (LBD).

[000275] Вариант осуществления 51a относится к способу по любому из вариантов осуществления 1-51, где нейродегенеративное заболевание или расстройтство представляет собой болезнь Альцгеймера на ранней стадии, легкое когнитивное нарушение (MCI), вызванное болезнью Альцгеймера, болезнь Альцгеймера легкой степени тяжести или болезнь Альцгеймера от легкой до умеренной степени тяжести.

[000276] Вариант осуществления 52 относится к комбинации, такой как набор, содержащий примирующую композицию и первую бустерную композицию, используемую в любом из вариантов осуществления 1-51a.

[000277] Вариант осуществления 53 относится к способу по любому из вариантов осуществления 1-51a или комбинации по варианту осуществления 52, где иммунологически эффективное количество липосомы включает от примерно 25 нмоль до примерно 750 нмоль на дозу, предпочтительно от примерно 90 нмоль до примерно 715 нмоль на дозу или от примерно 90 нмоль до примерно 535 нмоль на дозу, например примерно 25 нмоль, примерно 30 нмоль, примерно 35 нмоль, примерно 40 нмоль, примерно 45 нмоль, примерно 50 нмоль, примерно 55 нмоль, примерно 60 нмоль, примерно 65 нмоль, примерно 70 нмоль, примерно 75 нмоль, примерно 80 нмоль, примерно 85 нмоль, примерно 90 нмоль, примерно 95 нмоль, примерно 100 нмоль, примерно 125 нмоль, примерно 150 нмоль, примерно 175 нмоль, примерно 200 нмоль, примерно 225 нмоль, примерно 250 нмоль, примерно 275 нмоль, примерно 300 нмоль, примерно 325 нмоль, примерно 350 нмоль, примерно 375 нмоль, примерно 400 нмоль, примерно 425 нмоль, примерно 450 нмоль, примерно 475 нмоль, примерно 500 нмоль, примерно 525 нмоль, примерно 550 нмоль, примерно 575 нмоль, примерно 600 нмоль, примерно 625 нмоль, примерно 650 нмоль, примерно 675 нмоль, примерно 700 нмоль, примерно 725 нмоль, примерно 750 нмоль или любое промежуточное значение на дозу первого фосфопептида тау.

[000278] Вариант осуществления 53a относится к способу по любому из вариантов осуществления 1-51a или комбинации по варианту осуществления 52, где иммунологически эффективное количество липосомы содержит от примерно 25 нмоль до примерно 750 нмоль на дозу, например от примерно 29,7 нмоль до примерно 742,5 нмоль на дозу, предпочтительно от примерно 90 нмоль до примерно 715 нмоль на дозу, например от примерно 89,1 нмоль до примерно 712,8 нмоль на дозу, или от примерно 90 нмоль до примерно 535 нмоль на дозу, например от примерно 89,1 нмоль до примерно 534,6 нмоль на дозу, или от примерно 90 нмоль до примерно 268 нмоль на дозу, например от примерно 89,1 нмоль до примерно 267,3 нмоль на дозу первого фосфопептида тау.

[000279] Вариант осуществления 53b относится к способу или комбинации по варианту осуществления 53 или 53a, где иммунологически эффективное количество липосомы содержит от примерно 100 мкг до примерно 2500 мкг, предпочтительно от примерно 300 мкг до примерно 2400 мкг, например, примерно 100 мкг, примерно 150 мкг, примерно 200 мкг, примерно 250 мкг, примерно 300 мкг, примерно 400 мкг, примерно 500 мкг, примерно 600 мкг, примерно 700 мкг, примерно 800 мкг, примерно 900 мкг, примерно

1000 мкг, примерно 1100 мкг, примерно 1200 мкг, примерно 1300 мкг, примерно 1400 мкг, примерно 1500 мкг, примерно 1600 мкг, примерно 1700 мкг, примерно 1800 мкг, примерно 1900 мкг, примерно 2000 мкг, примерно 2100 мкг, примерно 2200 мкг, примерно 2300 мкг, примерно 2400 мкг, примерно 2500 мкг или любое промежуточное значение на дозу первого фосфопептида тау.

[000280] Вариант осуществления 53c относится к способу или комбинации по любому из вариантов осуществления 53-53b, где первый фосфопептид тау состоит из аминокислотной последовательности одной из SEQ ID NO: 27 - SEQ ID NO: 38.

[000281] Вариант осуществления 53d относится к способу или комбинации по варианту осуществления 53c, где первый фосфопептид тау состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28.

[000282] Вариант осуществления 54 относится к способу или комбинации по любому из вариантов осуществления 53-53d, где второй фосфопептид тау состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1-3 или 5-12.

[000283] Вариант осуществления 54a относится к способу или комбинации по варианту осуществления 54, где второй фосфопептид тау состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, 2 или 3.

ПРИМЕРЫ

Пример 1

Получение липосомальных вакцин

[000284] Получение контрольной липосомальной вакцины (метод инъекции этанола)

[000285] Контрольную липосомальную вакцину получали методом инъекции этанола (EtOH) с последующей экструзией. Сначала в смеси EtOH и трет-бутанола (t-BuOH) 20:1 (об./об.) при 60°C солюбилизировали DMPC (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Германия), DMPG (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Германия), холестерин (Dishman, Нидерланды) и MPLA (Avanti Polar Lipids, AL, США) в молярном соотношении 9:1:7:0,05. Раствор липида/этанола разбавляли в забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS), pH 7,4, при 60°C, поддерживая 10% концентрацию EtOH, что приводило к образованию многослойных липосомных везикул (MLV). Затем MLV экструдировали последовательно 5 раз через три расположенных друг за другом поликарбонатных фильтра (Whatman) с размером пор 0,08 мкм с помощью Emulsiflex-C5 (Avestin, Канада). Перед добавлением пептида тау полученные липосомы разбавляли PBS, pH 7,4, и нагревали до 60°C с получением раствора липосом.

[000286] Ацетат тетрапальмитоилированного фосфорилированного пептида тау с SEQ ID NO: 2 (Bachem AG, Швейцария), соответствующей SEQ ID NO: 28, называемого в настоящем описании активным фармацевтическим ингредиентом (API), растворяли в PBS при pH 11,4 с 2,0% октил-β-D-глюкопиранозидом (Sigma-Aldrich, США) в 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 путем

ультрафильтрации до заданного конечного объема, и во время диафильтрации выполняли замену буфера 10 раз, используя PBS, pH 7,4. Затем осуществляли стерильную фильтрацию полученных липосом с API, презентированным на поверхности липосом, последовательно пропуская через два поликарбонатных 0,2 мкм шприцевых фильтра, и конечный продукт хранили при 5°C.

[000287] Получение вакцин на основе липосом Z и Z+

[000288] Вакцины на основе липосом Z+ с конечной концентрацией API 1200 мкг/мл и конечной концентрацией T50 1200 мкг/мл получали методом инъекции этанола с последующей экструзией, и вакцины на основе липосом Z с конечной концентрацией API 400 мкг/мл и конечной концентрацией T50 100 мкг/мл получали методом гидратации тонких липидных пленок с последующей гомогенизацией и экструзией.

[000289] Получение вакцины на основе липосом Z методом гидратации тонкой липидной пленки

[000290] Вакцину на основе липосом Z получали методом гидратации тонких липидных пленок с последующей гомогенизацией и экструзией. Сначала в EtOH при 60°C солюбилизировали DMPC (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Германия), DMPG (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Германия), холестерин (Dishman, Нидерланды) и синтетический 3-деацил монофосфорил-гексаацил-липид A (3D-(6-ацил) PHAD®) (Avanti Polar Lipids, AL, США) при молярном соотношении 9:1:7:0,05. Этанол упаривали в вакуумном роторном испарителе с получением тонкой липидной пленки.

[000291] Липидную пленку регидратировали с помощью PBS, pH 7,4, 5% ДМСО (все Sigma-Aldrich), содержащего 0,15 мг/мл пептида T50 (Peptides & Elephants, Германия). Образец осторожно перемешивали в течение 15 минут и затем интенсивно встряхивали для растворения тонкой липидной пленки. Полученные многослойные везикулы подвергали 10 циклам замораживания-оттаивания (жидкий N_2 и водяная баня при 37°C) и гомогенизировали с последующей экструзией через поликарбонатные мембраны (Whatman, Великобритания) с размером пор 0,08 мкм. Оба этапа, гомогенизацию и экструзию, выполняли в EmulsiFlex-C5 (Avestin, Канада). Экструдированные липосомы с инкапсулированным пептидом T50 концентрировали ультрафильтрацией, и с помощью диафильтрации заменяли буфер на PBS, pH 7,4. Перед добавлением пептида тау и адъюванта полученные липосомы разбавляли PBS, pH 7,4, и нагревали до 60°C с получением раствора липосом.

[000292] CpG2006-Chol (CpG2006-Chol) (Microsynth, Швейцария) представляет собой ДНК-олигонуклеотид, у которого все межнуклеотидные связи находятся в виде тиофосфата, который модифицирован на 5'-конце молекулой холестерина через фосфатную связь с помощью спейсера ПЭГ. CpG2006-Chol (CpG2006-Chol) (Microsynth, Швейцария) растворяли в PBS, pH 7,4, при концентрации 1 мг/мл и инъецировали в растворы липосом с последующей инкубацией в течение 15 минут перед введением API.

[000293] API (Bachem AG, Швейцария) растворяли в PBS, pH 11,4, с 2% октил β-D-глюкопиранозидом (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 1 мг/мл, и в раствор липосом

вводили раствор пептида при 60°C с последующим перемешиванием в течение 30 мин при 60°C. Концентрирование осуществляли путем ультрафильтрации с получением целевого значения (400 мкг/мл API и 100 мкг/мл T50 для липосомы Z), и во время диафильтрации выполняли замену буфера 10 раз, используя PBS, pH 7,4. Затем выполняли стерильную фильтрацию полученных липосом с API, презентированным на поверхности липосом, пропуская через поликарбонатные 0,2 мкм шприцевые фильтры, и конечный продукт хранили при 5°C.

[000294] Получение вакцины на основе липосомы Z+ инъекцией этанола

[000295] Вакцину на основе липосом Z+ получали, используя процесс на основе инъекции этанола. Сначала в EtOH при 60°C солюбилизировали DMPC (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Германия), DMPG (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Германия), холестерин (Dishman, Нидерланды) и 3D-(6-ацил) PHAD® (Avanti Polar Lipids, AL, США) при молярном соотношение приблизительно 9:1:7:0,04. Пептид T50 (Bachem AG, Швейцария) растворяли в смеси 10 мМ His/270 мМ сахарозы (pH 5,8-6,0). Затем раствор липидов в этаноле вводили в раствор, содержащий пептид T50, и осторожно перемешивали в течение 15 мин, в результате чего получали многослойные везикулы (MLV). MLV подвергали гомогенизации (6 раз для липосомы Z+) с последующей последовательной экструзией через поликарбонатные мембраны (Whatman, UK) с размером пор 0,08 мкм (5 проходов для липосомы Z+). Оба этапа, гомогенизацию и экструзию, выполняли, используя EmulsiFlex-C5 (Avestin, Канада) для липосом Z+. Экструдированные липосомы концентрировали ультрафильтрацией, и с помощью диафильтрации заменяли буфер на 20 мМ His/145 мМ NaCl, pH 7,4. Перед добавлением API и адъюванта полученные липосомы с инкапсулированным пептидом T50 разводили в 20 мМ His/145 мМ NaCl, pH 7,4, и нагревали до 60°C с получением раствора липосом.

[000296] CpG2006-Chol (Microsynth, Швейцария для липосомы Z+) растворяли в 20 мМ His/145 мМ NaCl, pH 7,4, при 1 мг/мл и вводили в раствор липосом с последующей инкубацией в течение 15 минут перед введением API.

[000297] API (Bachem AG, Швейцария) растворяли в карбонатном буфере с pH 10,2 с 1% октил β-D-глюкопиранозидом (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 1 мг/мл, и раствор пептида вводили в раствор липосом Z+ при 60°C с последующим перемешиванием в течение 30 мин при 60°C. Раствор пептида смешивали с раствором липосом Z+ с использованием T-Line Mixing при 60°C с последующим перемешиванием в течение 30 мин при 60°C. Концентрирование осуществляли путем ультрафильтрации для получения целевого значения (1200 мкг/мл API и 1200 мкг/мл T50 для липосомы Z+), и во время диафильтрации выполняли замену буфера 10 раз, используя 10 мМ His/270 мМ сахарозы, pH 6,5. Затем полученные липосомы Z+ с API, презентированным на поверхности липосом, стерильно фильтровали, пропуская через поликарбонатные 0,2 мкм шприцевые/капсульные фильтры, и конечный продукт хранили при 5°C.

Пример 2

Получение вакцины на основе конъюгата

[000298] Пептиды и адъюванты

[000299] Фосфорилированные пептиды тау (SEQ ID NO: 2), используемые в этом исследовании, получали синтетическим путем (Pepscan, Нидерланды) с добавлением во время синтеза фосфо-остатков. Конъюгат, содержащий фосфорилированный пептид тау с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, ковалентно связанной с носителем CRM через линкер, в настоящем описании называется Конъюгатом X.

[000300] Вакцинные пептиды конъюгировали с белком-носителем CRM197 через линкер полиэтиленгликоль (ПЭГ)-цистеин-ацетамидопропионамид. Фосфорилированный пептид тау с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, получали синтетически (Polypeptide Laboratories SAS) с фосфо-остатками и спейсером ПЭГ3, которые добавляли во время синтеза. Конъюгат X получали путем конъюгирования белка-носителя CRM197 через линкер сукцинимидил-3-(бромацетамид)пропионат (SBAP) с цистеином на N-конце пептида. SBAP лигировали с первичными аминами (-NH_2) белка CRM197 с помощью химии реакции сложного эфира NHS. Избыток линкера SBAP удаляли с помощью ультрафильтрации и диафильтрации (UF/DF). Промежуточный продукт CRM197-SBAP конъюгировали с фосфорилированным пептидом тау, и после завершения реакции конъюгацию останавливали добавлением избыточного количества L-цистина для гашения реакции. Неочищенный продукт, конъюгированный с CRM197-пептидом, очищали методом хроматографии, используя колонку Capto Q ImpRes (GE Healthcare), и изократическим элюированием с солевым раствором. Затем очищенный пептидный продукт CRM197 помещали в буфер, содержащий Трис и сахарозу, такой как 20 мМ Трис, 250 мМ сахароза, при pH 8,1 с помощью UF/DF. Маточный раствор лекарственного вещества (DS), CRM197-пептид тау, получали путем добавления маточного раствора буфера на основе полисорбата 80 (PS80), такого как 10% маточный раствор PS80 буфера, до достижения конечной концентрации 0,01% PS80. Перед фильтрацией раствор тщательно перемешивали. Перед инъекцией маточный раствор разбавляли PBS и CpG/Alum, например, до первой концентрации CRM197-пептида тау 0,8 мг/мл, и затем дополнительно разбавляли PBS и CpG/Alum до конечной концентрации CRM197-пептида тау для инъекций 30 мкг/мл. Для примеров 3-7 маточный раствор CRM197-пептида тау поддерживали при концентрации 3,1 мг/мл в 10 мМ PBS (pH 7,3) и дополнительно разбавляли PBS до достижения желаемой рабочей концентрации. Затем добавляли олигонуклеотид CpG, квасцы и PBS до достижения конечной концентрации CRM197-пептида тау 30 мкг/мл, и перед инъекцией конечный состав тщательно перемешивали.

[000301] Одна из проблем при нацеливании на антиген ЦНС с помощью активной вакцины заключается в том, что неспецифическое или нецелевое воспаление может вызывать нежелательные нейропатологические изменения. Для изучения этого вопроса весь мозг мышей, иммунизированных композицией на основе конъюгата, собирали и окрашивали для визуализации периваскулярных или других клеточных инфильтратов. У всех иммунизированных животных отсутствовали какие-либо признаки нейровоспаления, клеточной инфильтрации или других нежелательных невропатологических изменений

(данные не показаны). Это позволяло предположить, что индуцированные вакциной антитела и врожденный иммунный ответ на вакцинацию не вызывали нейропатологических изменений у мышей.

[000302] Приведенные ниже примеры показывают различные аспекты иммунного ответа, индуцированного разными схемами вакцинации.

Пример 3

Гетерологичная вакцинация увеличивает покрытие эпитопа антителами, специфическими к фосфопептиду тау, у макак-резусов

[000303] Все эксперименты на животных были одобрены и проводились 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. На момент начала иммунизации животные находились в возрасте от двух до пяти лет с минимальным весом 2,5 кг. Подробное клиническое обследование выполняли до начала лечения и еженедельно после лечения. Кроме того, макак осматривали два раза в сутки, и клинические признаки регистрировали.

[000304] Липосомальные вакцины, например на основе липосомы Z или липосомы Z+ (обе содержащие тетрапальмитоилированный фосфорилированный пептид тау с SEQ ID NO: 2, 3D-(6-ацил) PHAD®, липидированный CpG-олигонуклеотид CpG 2006 и Т-клеточный пептид Т50), обозначены в описании как «А», в то время как вакцины на основе конъюгата, например Конъюгата X (фосфорилированный пептид тау с SEQ ID NO: 2, связанный с CRM197), обозначены как «В».

[000305] Группы макак-резусов (n=3 самца и 3 самки на группу) иммунизировали подкожно в дни 1 и 29: i) 1800 мкг ацетата тетрапальмитоилированного фосфорилированного пептида тау с SEQ ID NO: 2 на дозу вакцины на основе липосомы Z (режим А-А); ii) 15 мкг на дозу вакцины на основе конъюгата X (схема В-В); или iii) 1800 мкг ацетата тетрапальмитоилированного фосфорилированного пептида тау SEQ ID NO: 2 на дозу вакцины на основе липосомы Z в день 1 с последующим введением 15 мкг на дозу вакцины на основе конъюгата X в день 29 (схема А-В). Профиль распознавания эпитопов антител определяли методом ELISA для картирования эпитопов через три недели после второй иммунизации (день 50) с использованием библиотеки 8-мерных пептидов, биотинилированных на N-конце, смещенных на одну аминокислоту и покрывающих всю последовательность фосфопептида тау с SEQ ID NO: 2, а также последовательность SEQ ID NO: 4 (VYKSPVVSGDTSPRHL, нефосфорилированный пептид с SEQ ID NO: 2).

[000306] На фиг. 1А-1С показано, что обезьяны, иммунизированные липосомальной вакциной (на основе липосомы Z), продуцировали антитела IgG, которые связывались в основном с N-концевой частью пептида (режим А-А, фиг. 1А), тогда как обезьяны, иммунизированные конъюгированной вакциной (на основе Конъюгата X) генерировали антитела IgG, которые связывались в основном с С-концевой частью пептида (режим В-В, фиг. 1В) даже несмотря на то, что липосомальная вакцина и вакцина на основе конъюгата

содержали один и тот же фосфорилированный пептид тау с SEQ ID NO: 2. Гетерологичный режим индуцировали антителами, которые связывались как с N-, так и с С-концевой частью пептида (режим А-В, фиг. 1С), тем самым увеличивая покрытие эпитопа индуцированными антителами. Более того, IgG антитела, индуцированные у обезьян, иммунизированных липосомальной вакциной (на основе липосомы Z), не связывались с нефосфорилированной библиотекой, тогда как IgG антитела, индуцированные у обезьян, иммунизированных вакциной на основе конъюгата (Конъюгата X), также распознавали нефосфорилированный 8-мерный пептид. IgG антитела, индуцированные у обезьян, иммунизированных в гетерологичном режиме (А-В), показали промежуточное связывание с нефосфорилированной библиотекой.

Пример 4

Бустерирование липосомальной вакциной вызывало сдвиг в сторону «липосомоподобного» эпитопного профиля у макак-резусов (режим А-В-В-А)

[000307] Группы макак-резусов (n=3 самца и 3 самки на группу) иммунизировали подкожно в день 1 1800 мкг ацетата тетрапальмитоилированного фосфорилированного пептида тау с SEQ ID NO: 2 на дозу вакцины на основе липосом Z, а в дни 29 и 85 15 мкг на дозу вакцины на основе Конъюгата X и в день 169 снова 1800 мкг ацетата тетрапальмитоилированного фосфорилированного пептида тау SEQ ID NO: 2 на дозу вакцины на основе липосом Z (режим А-В-В-А). Профиль распознавания эпитопов индуцированных антител определяли, как описано в примере 6, методом ELISA для картирования эпитопов за одну неделю до (день 162, режим А-В-В) и через три недели (день 190, режим А-В-В-А) после последней иммунизации липосомальной вакциной. На фиг. 2 показано, что примирование липосомами и бустирование вакциной на основе конъюгата индуцировали комбинацию N- и С-концевых IgG антител (режим А-В-В), тогда как последнее бустрование липосомальной вакциной привело к сдвигу в сторону «липосомоподобного» профиля эпитопа у макак-резусов (режим А-В-В-А). Данные показывают высокую гибкость в индукции ответов антител против тау-белка с использованием стратегии гетерологичной вакцинации новыми вакцинами против тау-белка, представленными в настоящем описании.

[000308] Таким образом, исследования на макаках-резусах показали, что гетерологичная вакцинация с последовательным графиком иммунизации с использованием вакцин на основе липосом Z и конъюгата X не только индуцирует титры антител против pTau и патологического тау-белка, выделенного из мозга пациентов с БА, но также увеличивает покрытие эпитопа индуцированными антителами в антигенной последовательности, используемой в обеих вакцинах второго поколения.

Пример 5

Гетерологичная вакцинация липосомальной вакциной и вакциной на основе конъюгата индуцировала титры ePHF-специфических IgG в сыворотке и IgG антител, специфических к фосфопептиду тау, в спинномозговой жидкости (ЦСЖ) макак-резусов

[000309] Взрослых макак-резусов (n=3 самца и 3 самки в группе) иммунизировали

подкожно или внутримышечно: i) 1800 мкг ацетата тетрапальмитоилированного фосфорилированного пептида тау с SEQ ID NO: 2 на дозу вакцины на основе липосомы Z в дни 1, 29, 85 и 169 (режим A-A-A-A); ii) 1800 мкг ацетата тетрапальмитоилированного фосфорилированного пептида тау с SEQ ID NO: 2 на дозу вакцины на основе липосомы Z+ в дни 1, 29, 85 и 169 (схема A-A-A-A); iii) 1800 мкг ацетата тетрапальмитоилированного фосфорилированного пептида тау с SEQ ID NO: 2 на дозу вакцины на основе липосомы Z в день 1, 15 мкг на дозу вакцины на основе Конъюгата X, вводимой совместно с квасцами и CpG-олигонуклеотидом CpG 2006 в дни 29 и 85, и 1800 мкг ацетата тетрапальмитоилированного фосфорилированного пептида тау SEQ ID NO: 2 на дозу вакцины на основе липосомы Z в день 169 (режим A-B-B-A); iv) 1800 мкг ацетата тетрапальмитоилированного фосфорилированного пептида тау с SEQ ID NO: 2 на дозу вакцины на основе липосомы Z+ в дни 1 и 29 и 15 мкг на дозу вакцины на основе Конъюгата X в дни 85 и 169 (схема A-A-B-B); или v) 15 мкг на дозу вакцины на основе Конъюгата X в дни 1 и 29 и 1800 мкг ацетата тетрапальмитоилированного фосфорилированного пептида тау с SEQ ID NO: 2 на дозу вакцины на основе липосомы Z+ в дни 89 и 169 (схема B-B-A-A). Заборы крови выполняли в день 190 день, и выделяли сыворотку.

[000310] Препараты обогащенных парных спиральных филаментов (ePHF) готовили из посмертных тканей мозга, полученных от субъектов с гистологически подтвержденной БА, путем экстракции нерастворимого тау-белка саркозилом с помощью модифицированного метода Гринберга и Дэвиса (Greenberg and Davies, 1991, Proc Natl Acad. Sci USA, 87(15):5827-31). Титры ePHF-специфических антител оценивали с помощью платформы Mesoscale Discovery (MSD) и ePHF в качестве покрывающего антигена. Сыворотку иммунизированных обезьян серийно разводили в буфере для анализа (PBS, 0,05% Tween 20, 1% обезжиренное молоко) и наносили на 96-луночные планшеты MSD. После двух часов инкубации образцы удаляли, и планшеты промывали PBST (PBS, 0,05% Tween 20). Антитела детектировали с помощью SulfoTag-меченных антител к IgG человека/обезьяны с последующей стадией фиксации в 1% параформальдегиде (PFA) перед добавлением буфера T для считывания. Планшеты анализировали с помощью Sector Imager (MSD). Все образцы, а также образцы положительного и отрицательного контроля, включенные в каждый планшет, обрабатывали в восьми двукратных серийных разведениях. Для каждой отдельной обезьяны вычисляли титры антител, выраженные в произвольных единицах (AU) на мл. Изменение кратности относительно среднего геометрического титров, полученных в режиме A-A-A-A, для каждой липосомальной композиции представлено, соответственно, для каждой обезьяны, а также представлено среднее геометрическое для каждой группы.

[000311] Титры антител, специфических к фосфорилированному пептиду тау с SEQ ID NO: 2, оценивали с помощью платформы MSD. 96-луночные стрептавидиновые планшеты Gold Small Spot (MSD), предварительно обработанные 1% блокатором A в PBS, покрывали фосфорилированным пептидом тау с SEQ ID NO: 2, биотинилированным на N-конце последовательности. СМЖ, полученную от иммунизированных обезьян, серийно

разводили в буфере для анализа (PBS, 0,05% Tween 20, 1% блокатор A) и наносили на 96-луночные планшеты MSD. После двух часов инкубации образцы удаляли и планшеты промывали PBST (PBS, 0,05% Tween 20). Антитела детектировали с помощью SulfoTag-меченных антител к IgG человека/обезьяны перед добавлением буфера для T для считывания. Планшеты анализировали с помощью Sector Imager (MSD). Все образцы, а также образцы положительного и отрицательного контроля, включенные в каждый планшет, обрабатывали в восьми двукратных серийных разведениях. Титры антител, выраженные в AU/мл, вычисляли для каждой отдельной обезьяны. Изменение кратности относительно среднего геометрического титров, полученных в режиме A-A-A-A, соответственно для каждой липосомальной композиции представлено для каждой обезьяны, а также представлено среднее геометрическое для каждой группы. Образцы с высоким содержанием эритроцитов удаляли из анализа, чтобы избежать смещения титров антител из-за загрязнения кровью.

[000312] Как показано на фиг. 3, обезьяны, которых инъецировали, используя гомологичные режимы A-B-B-A и A-A-B-B (где A представляет собой липосомальную вакцину (с ацетат тетрапальмитоилированным фосфорилированным пептидом тау-белка с SEQ ID NO: 2) с инкапсулированным T50, лигандом TLR4 и липидированным олигонуклеотидом CpG, и B представляет собой вакцину на основе конъюгата (фосфопептид с SEQ ID NO: 2, связанный с CRM197), вводимую совместно с квасцами и олигонуклеотидом CpG), в день 190 (через три недели после четвертой инъекции) имели ePHF-специфические титры, которые были аналогичны или выше, чем титры у обезьян, получавшим гомологичное лечение (A-A-A-A) (кратность ≥1).

[000313] Однако все обезьяны, инъецированные в гетерологичном режиме B-B-A-A, имели более низкие ePHF-специфические титры, чем у обезьян, получавших гомологичное лечение (A-A-A-A) (кратность изменения ≤1).

[000314] На фиг. 6 показано, что аналогичные выводы можно сделать по результатам мониторинга ответа антител IgG в спинномозговой жидкости этих обезьян в день 183 (через две недели после четвертой инъекции). Обезьяны, инъецированные в гетерологичных режимах A-B-B-A и A-A-B-B (где A представляет собой липосомальную вакцину (с ацетат тетрапальмитоилированным фосфорилированным пептидом тау-белка с SEQ ID NO: 2, инкапсулированным T50 (лиганд TLR4) и липидированным олигонуклеотидом CpG), и B представляет собой вакцину на основе конъюгата (фосфопептид с SEQ ID NO: 2, связанный с CRM197), вводимую совместно с квасцами и олигонуклеотидом CpG), имели титры IgG, специфические к фосфорилированному пептиду тау с SEQ ID NO: 2, которые в целом были выше, чем у обезьян, получавших гомологичное лечение (A-A-A-A) (кратное изменение ≥1). Однако все обезьяны, инъецированные в гетерологичном режиме B-B-A-A, имели более низкие титры IgG, специфические к фосфорилированному пептиду тау с SEQ ID NO: 2, чем обезьяны, получавшие гомологичное лечение (A-A-A-A) (кратность изменения ≤1).

[000315] В целом, результаты этого исследования показывают, что гетерологичный режим с липосомальной вакциной в качестве примирующей композиции индуцировал

более высокие титры pTau-специфических IgG по сравнению с режимом, в котором в качестве примирующей композиции для системного, а также локального (в СМЖ) ответа антител использовали вакцину на основе конъюгата.

Пример 6

Гетерологичная вакцинация примирующей липосомальной вакциной индуцировала более высокие титры IgG, специфических к фосфопептиду тау и ePHF, у макак-резусов, чем при гомологичном режиме.

[000316] Взрослых макак-резусов (n=3 самца и 3 самки в группе) иммунизировали подкожно или внутримышечно i) 1800 мкг ацетата тетрапальмитоилированного фосфорилированного пептида тау с SEQ ID NO: 2 на дозу вакцины на основе липосомы Z в дни 1, 29 и 85 (режим A-A-A); ii) 1800 мкг ацетата тетрапальмитоилированного фосфорилированного пептида тау с SEQ ID NO: 2 на дозу вакцины на основе липосомы Z+ (схема A-A-A); iii) 1800 мкг ацетата тетрапальмитоилированного фосфорилированного пептида тау с SEQ ID NO: 2 на дозу вакцины на основе липосомы Z в день 1 и 15 мкг на дозу вакцины на основе конъюгата X в дни 29 и 85 (схема A-B-B); или iv) 1800 мкг ацетата тетрапальмитоилированного фосфорилированного пептида тау с SEQ ID NO: 2 на дозу вакцины на основе липосомы Z+ в дни 1 и 29 и 15 мкг на дозу вакцины на основе Конъюгата X в день 85 (схема A-A-B). Забор крови осуществляли в день 106, и выделяли сыворотку.

[000317] Титры антител IgG, специфических к фосфопептиду тау, определяли с помощью ELISA, используя фосфорилированный пептид тау с SEQ ID NO: 2 в качестве покрывающего антигена. Сыворотку иммунизированных обезьян серийно разводили в буфере для анализа (PBS, 0,05% Tween 20, 1% BSA) и наносили на 96-луночные планшеты, предварительно покрытые соответствующим пептидом. После двух часов инкубации образцы удаляли и планшеты промывали PBST (PBS, 0,05% Tween 20). Антитела детектировали с использованием конъюгированного с HRP анти-обезьяньего IgG, а затем субстрата ABTS (Roche). Все образцы, а также образцы положительного и отрицательного контроля, включенные в каждый планшет, обрабатывали в восьми двукратных серийных разведениях. Данные выражали в виде индивидуальных титров конечных точек (последнее разведение сыворотки, индуцирующее положительный ответ) вместе со средним геометрическим для каждой группы. Для статистического анализа использовали односторонний тест ANOVA с множественным сравнением Тьюки.

[000318] Титры ePHF-специфических антител оценивали с помощью платформы MSD. Стрептавидиновые 96-луночные планшеты Gold small spot (MSD), предварительно смоченные 1% BSA в PBS, покрывали биотинилированным антителом против тау-белка (HT7-биотин, ThermoScientific) перед инкубацией с ePHF, выделенным из мозга пациентов с болезнью Альцгеймера. Через час после инкубации планшеты промывали PBST, добавляли серийные разведения сывороток и инкубировали в течение двух часов. Связанные антитела детектировали с помощью SulfoTag-меченных антител к IgG человека/обезьяны с последующей стадией фиксации в 1% PFA перед добавлением буфера T для считывания. Планшеты анализировали с помощью Sector Imager (MSD). Все образцы,

а также образцы положительного и отрицательного контроля, включенные в каждый планшет, обрабатывали в восьми двукратных серийных разведениях. Результаты выражали в AU/мл для каждой отдельной обезьяны вместе со средним геометрическим для каждой группы. Представлены титры ePHF-специфических антител в день 106. Для статистического анализа использовали односторонний тест ANOVA с множественным сравнением Тьюки.

[000319] На фиг. 4A показано, что у макак-резусов гетерологичные режимы A-A-B и A-B-B статистически значимо индуцировали более высокие уровни антител IgG, специфических к фосфопептиду тау, чем гомологичный режим A-A-A.

[000320] На фиг. 4B показано, что у макак-резусов гетерологичный режим A-A-B статистически значимо индуцировал более высокие уровни ePHF-специфических антител IgG, чем гомологичный режим A-A-A, в то время как в случае режима A-B-B у макак-резусов наблюдалась тенденция к более высокому уровню титров ePHF-специфических IgG, чем при гомологичном режиме A-A-A.

[000321] В целом, данные показывают, что схемы гетерологичной иммунизации липосомальной вакциной (A) в качестве примирующей композиции индуцировали более высокие титры антител против фосфорилированного пептида тау с SEQ ID NO: 2 и ePHF, чем в случае гомологичного режима A-A-A.

Пример 7

Качество ePHF-специфических антител IgG, индуцированных гетерологичными режимами, у макак-резусов является аналогичным или лучше, чем в случае гомологичных режимов.

[000322] Взрослых макак-резусов (n=3 самца и 3 самки в группе) иммунизировали подкожно: i) 1800 мкг ацетата тетрапальмитоилированного фосфорилированного пептида тау с SEQ ID NO: 2 на дозу вакцины на основе липосомы Z в дни 1, 29, 85 и 169 (режима A-A-A-A) или ii) 1800 мкг ацетата тетрапальмитоилированного фосфорилированного пептида тау с SEQ ID NO: 2 на дозу вакцины на основе липосомы Z в день 1, 15 мкг на дозу вакцины на основе Конъюгата X в дни 29 и 85 и 1800 мкг ацетата тетрапальмитоилированного фосфорилированного пептида тау с SEQ ID NO: 2 на дозу вакцины на основе липосомы Z в день 169 (режим A-B-B-A), или внутримышечно iii) 1800 мкг ацетата тетрапальмитоилированного фосфорилированного пептида тау с SEQ ID NO: 2 на дозу вакцины на основе липосомы Z+ в дни 1, 29, 85 и 169 (схема A-A-A-A) или iv) 1800 мкг ацетата тетрапальмитоилированного фосфорилированного пептида тау с SEQ ID NO: 2 на дозу вакцины на основе липосомы Z+ в дни 1 и 29 и 15 мкг на дозу вакцины на основе конъюгата X в дни 85 и 169 (режим A-A-B-B). Забор крови осуществляли в день 190, и выделяли сыворотку.

[000323] Качество антител, специфических к обогащенным парным спиральным филаментам (ePHF), оценивали как связывание с ePHF при низкой концентрации покрывающего агента (которая также упоминается в настоящем описании как в условиях ограниченного покрытия) с помощью платформы MSD. Сыворотку иммунизированных

обезьян серийно разводили в буфере для анализа (PBS, 0,05% Tween 20, 1% обезжиренное молоко) и наносили на 96-луночные планшеты MSD. После двух часов инкубации образцы удаляли, и планшеты промывали PBST (PBS, 0,05% Tween 20). Антитела детектировали с помощью SulfoTag-меченных антител к IgG человека/обезьяны с последующей стадией фиксации в 1% PFA перед добавлением буфера T для считывания. Планшеты анализировали с помощью Sector Imager (MSD). Все образцы, а также образцы положительного и отрицательного контроля, включенные в каждый планшет, обрабатывали в восьми двукратных серийных разведениях. Титры антител, выраженные в AU/мл, рассчитывали для каждой отдельной обезьяны.

[000324] Титры антител IgG, специфических к фосфопептиду тау, определяли с помощью ELISA, используя фосфорилированный пептид тау с SEQ ID NO: 2 в качестве покрывающего антигена. Сыворотку иммунизированных обезьян серийно разводили в буфере для анализа (PBS, 0,05% Tween 20, 1% BSA) и наносили на 96-луночные планшеты, предварительно покрытые соответствующим пептидом. После двух часов инкубации образцы удаляли и планшеты промывали PBST (PBS, 0,05% Tween 20). Антитела детектировали с помощью конъюгированного с HRP анти-обезьяньего IgG, а затем субстрата ABTS (Roche). Все образцы, а также образцы положительного и отрицательного контроля, включенные в каждый планшет, обрабатывали в восьми двукратных серийных разведениях. Данные выражали в виде индивидуальных титров конечных точек (последнее разведение сыворотки, вызывающее положительный ответ) вместе со средним геометрическим для каждой группы.

[000325] Титры IgG-антител, специфических к универсальному Т-клеточному эпитопу (T50), определяли методом ELISA с использованием пептида T50 в качестве покрывающего антигена. Сыворотку иммунизированных обезьян серийно разводили в буфере для анализа (PBS, 0,05% Tween 20, 1% обезжиренное молоко) и наносили на 96-луночные планшеты, предварительно покрытые соответствующим пептидом. После двух часов инкубации образцы удаляли и планшеты промывали PBST (PBS, 0,05% Tween 20). Антитела детектировали с использованием конъюгированного с HRP анти-обезьяньего IgG, и затем субстрата ABTS (Roche). Все образцы, а также образцы положительного и отрицательного контроля, включенные в каждый планшет, обрабатывали в восьми двукратных серийных разведениях. Данные выражали в виде индивидуальных титров конечных точек (последнее разведение сыворотки, вызывающее положительный ответ) вместе со средним геометрическим для каждой группы.

[000326] Кратное изменение титров антител IgG, специфических к фосфопептиду тау, и титров антител IgG, специфических к универсальному Т-клеточному эпитопу (T50), представлено для каждой обезьяны, а также представлено среднее геометрическое значение для каждой группы. Для статистического анализа использовали критерий Манна-Уитни.

[000327] На фиг. 5A и 5B показаны титры ePHF-специфических IgG в условиях ограниченного покрытия, отражающие антитела с высокой связывающей способностью. На фиг. 5A показано, что режим A-B-B-A индуцировал несколько более высокие титры

антител, чем режим A-A-A-A, в то время как режим A-A-B-B индуцировал аналогичные титры IgG. Более того, как показано на фиг. 3, гетерологичные режимы A-B-B-A, а также A-A-B-B индуцировали в целом аналогичные или более высокие титры ePHF-специфических антител по сравнению с гомологичным режимом с использованием только липосомальной вакцины (режим A-A-A-A, кратность изменения ≥1). В целом, данные свидетельствуют о том, что у макак-резусов качество ePHF-специфических антител, индуцированных гетерологичной вакцинацией, аналогично или лучше, чем качество антител, индуцированных гомологичным режимом вакцинации A-A-A-A.

[000328] Не ограничиваясь теорией, считается, что гетерологичный режим, согласно настоящему изобретению, диверсифицирует ответ CD4 Т-клеток. Из-за ограниченного пространства в зародышевом центре, если продолжать иммунизацию одними и теми же эпитопами CD4 хелперных клеток/белком (например, против столбняка), специфические для столбняка B- и Т-клетки будут вытеснять тау-специфические B-клетки из зародышевого центра. С другой стороны, при чередовании CD4 стимулов они будут более доступны для тау-специфических B-клеток (которые также получают помощь от столбнячных или дифтерийных Т-клеток). В настоящем изобретении наблюдали, что при использовании режима A-A-A-A титры антител к хелперному пептиду T50 значительно увеличивались. При использовании гетерологичного режима A и B титры антител к хелперному пептиду T50 были намного ниже. На фиг. 7 показано, что соотношение между титрами антител IgG, направленных против фосфорилированного пептида тау с SEQ ID NO: 2, и титрами антител IgG, направленных против пептида T50, было выше в случае гетерологичного режима (A-B-B-A и A-A-B-B) по сравнению с соответствующим гомологичным режимом (A-A-A-A). Это является отражением разнообразия ответа CD4 Т-клеток, а также демонстрирует, что T50-специфический B-клеточный ответ не полностью доминирует над ответом против pTau.

[000329] Понятно, что примеры и варианты осуществления, представленные в настоящем описании, приведены исключительно с целью иллюстрации, и что в описанные выше варианты осуществления могут быть внесены любые изменения без отступления от широкой концепции изобретения. Следовательно, настоящее изобретение не ограничено конкретными раскрытыми вариантами осуществления, и охватывает модификации в пределах сущности и объема изобретения, определенного прилагаемой формулой изобретения.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO: 1 - фосфопептид тау (7.1)

GDRSGYS[pS]PG[pS]PG[pT]PGSRSRT

SEQ ID NO: 2 - фосфопептид тау (T3.5)

VYK[pS]PVVSGDT[pS]PRHL

SEQ ID NO: 3 - фосфопептид тау (22.1)

SSTGSIDMVD[pS]PQLA[pT]LA

SEQ ID NO: 4 - пептид тау

VYKSPVVSGDTSPRHL

SEQ ID NO: 5 - фосфопептид тау

RENAKAKTDHGAEIVYK[pS]PVVSGDT[pS]PRHL

SEQ ID NO: 6 - фосфопептид тау

RQEFEVMEDHAGT[pY]GL

SEQ ID NO: 7 - фосфопептид тау

PGSRSR[pT]P[pS]LPTPPTR

SEQ ID NO: 8 - фосфопептид тау

GYSSPG[pS]PG[pT]PGSRSR

SEQ ID NO: 9 - фосфопептид тау

GDT[pS]PRHL[pS]NVSSTGSID

SEQ ID NO: 10 - фосфопептид тау

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

SEQ ID NO: 11 - фосфопептид тау

HL[pS]NVSSTGSID

SEQ ID NO: 12 - фосфопептид тау

VSGDT[pS]PRHL

SEQ ID NO: 13 - эпитоп Т50 Т-клеток

AKFVAAWTLKAAAVVRQYIKANSKFIGITELVVRFNNFTVSFWLRVPKVSASHL
E-NH2

SEQ ID NO: 14 - эпитоп Т46 Т-клеток

AKFVAAWTLKAAAGSQYIKANSKFIGITELGSFNNFTVSFWLRVPKVSASHLEK(
Pal)K(Pal)-NH2

SEQ ID NO: 15 - эпитоп Т48 хелперных Т-клеток

AKFVAAWTLKAAAGSQYIKANSKFIGITELGSFNNFTVSFWLRVPKVSASHLEGS
LINSTKIYSYFPSVISKVNQ-NH2

SEQ ID NO: 16 - эпитоп Т51 хелперных Т-клеток

AKFVAAWTLKAAARRQYIKANSKFIGITELRRFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-
NH2

SEQ ID NO: 17 - эпитоп Т52 хелперных Т-клеток

AKFVAAWTLKAAARKQYIKANSKFIGITELRKFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-
NH2

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

5’-tcgtcgttttgtcgttttgtcgtt-3’

где нижний регистр означает фосфоротиоатные (ps) межнуклеотидные связи

SEQ ID NO: 19 - CpG 1018

5’-tgactgtgaacgttcgagatga-3’

где нижний регистр означает фосфоротиоатные межнуклеотидные связи

SEQ ID NO: 20 - CpG2395

5’-tcgtcgttttcggcgcgcgccg-3’

где нижний регистр означает фосфоротиоатные межнуклеотидные связи

SEQ ID NO: 21 - CpG2216

5’-ggGGGACGATCGTCgggggg-3’

где нижний регистр означают фосфоротиоатные межнуклеотидные связи, а заглавные буквы означают фосфодиэфирные (ро) связи

SEQ ID NO:22 - CpG2336

5’- gggGACGACGTCGTGgggggg-3’,

где нижний регистр означают фосфоротиоатные межнуклеотидные связи, а заглавные буквы означают фосфодиэфирные связи

SEQ ID NO:23 - пептид эпитопа Pan DR (PADRE)

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 фосфопептид тау (пальмитоилированный 7,1)

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

SEQ ID NO: 28 - пальмитоилированный фосфопептид тау (T3, пальмитоилированный T3.5, пальмитоилированный SEQ ID NO:2)

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

SEQ ID NO: 29 - пальмитоилированный фосфопептид тау (пальмитоилированный 22.1)

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

SEQ ID NO: 30 - пальмитоилированный фосфопептид тау

K(pal)K(pal)VYKSPVVSGDTSPRHLK(pal)K(pal)

SEQ ID NO: 31 - пальмитоилированный фосфопептид тау

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

SEQ ID NO: 32 - пальмитоилированный фосфопептид тау

K(pal)K(pal)RQEFEVMEDHAGT[pY]GLK(pal)K(pal)

SEQ ID NO: 33 - пальмитоилированный фосфопептид тау

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

SEQ ID NO: 34 - пальмитоилированный фосфопептид тау

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

SEQ ID NO: 35 - пальмитоилированный фосфопептид тау

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

SEQ ID NO: 36 - пальмитоилированный фосфопептид тау

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

SEQ ID NO: 37 - пальмитоилированный фосфопептид тау

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

SEQ ID NO: 38 - пальмитоилированный фосфопептид тау

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

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

AKFVAAWTLKAAAVVRQYIKANSKFIGITELVVRFNNFTVSFWLRVPKVSASHL
E

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

AKFVAAWTLKAAAGSQYIKANSKFIGITELGSFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE

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

AKFVAAWTLKAAAGSQYIKANSKFIGITELGSFNNFTVSFWLRVPKVSASHLEGS
LINSTKIYSYFPSVISKVNQ

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

AKFVAAWTLKAAARRQYIKANSKFIGITELRRFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE

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

AKFVAAWTLKAAARKQYIKANSKFIGITELRKFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE

SEQ ID NO: 44 - T57 (56, 57)

AKFVAAWTLKAAAVVRQYIKANSKFIGITELVVRFNNFTVSFWLRVPKVSASHL
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

Kontsekova 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

US7,741,297

US8,647,631

US9,687,447

WO90/14837

WO2010/115843

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ индукции антител к по меньшей мере одному из фосфорилированного тау-белка и обогащенных парных спиральных филаментов (ePHF) у нуждающегося в этом субъекта, включающий:

(i) введение субъекту примирующей композиции, содержащей иммунологически эффективное количество липосомы, содержащей:

a. первый фосфопептид тау;

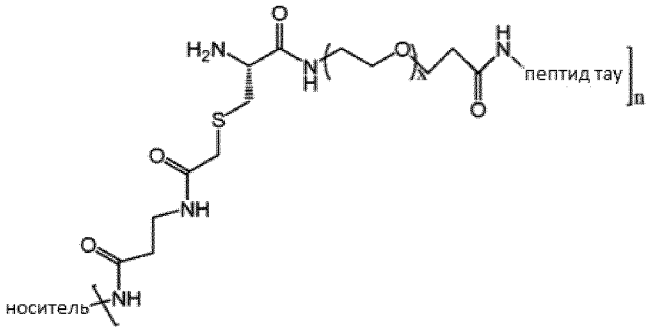
b. эпитоп хелперных Т-клеток;

c. липидированный олигонуклеотид CpG; и

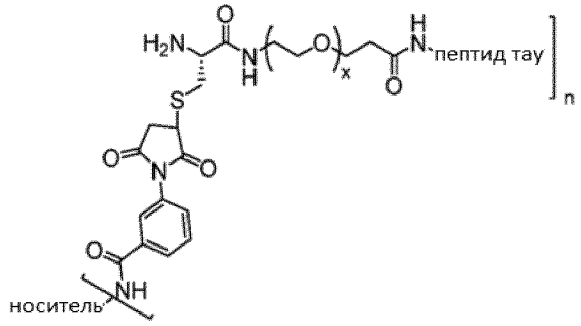
d. адъювант, содержащий лиганд толл-подобного рецептора 4;

где фосфопептид тау презентирован на поверхности липосомы, и примирующая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель; и

(ii) введение субъекту первой бустерной композиции, содержащей иммунологически эффективное количество конъюгата, содержащего второй фосфопептид тау и иммуногенный носитель, конъюгированный с ним через линкер, где конъюгат имеет структуру формулы (I):



или имеет структуру формулы (II):



,

в которой

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

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

пептид тау представляет собой второй фосфопептид тау; и

носитель представляет собой иммуногенный носитель, выбранный из группы, состоящей из гемоцианина лимфы улитки (KLH), столбнячного анатоксина, CRM197 и смеси белков внешней мембраны из *N. meningitidis* (OMP) или их производного; и

первая бустерная композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель;

где первый фосфопептид тау и второй фосфопептид тау, каждый независимо, содержат аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 12.

2. Способ по п.1, где:

липосома содержит:

a. первый фосфопептид тау с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27 - SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 31 - SEQ ID NO: 38;

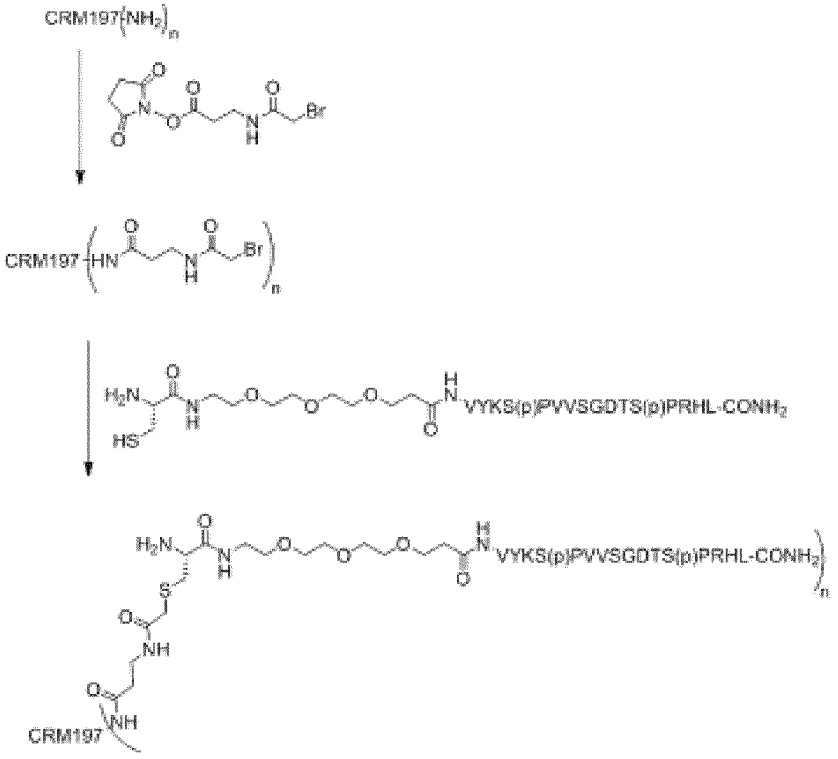
b. эпитоп хелперных Т-клеток с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 39 - SEQ ID NO: 44, предпочтительно эпитоп хелперных Т-клеток, состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13 - SEQ ID NO: 17;

c. липидированный олигонуклеотид CpG с нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18 - SEQ ID NO: 22, где олигонуклеотид CpG содержит одну или более фосфоротиоатных межнуклеотидных связей, и олигонуклеотид CpG ковалентно связан по меньшей мере с одним холестерином через линкер; и

d. монофосфориллипид A (MPLA); и

конъюгат содержит второй фосфопептид тау с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 12, конъюгированный с CRM197 через линкер.

3. Способ по п.1 или 2, где конъюгат имеет структуру:



где n представляет собой целое число от 3 до 7.

4. Способ индукции антител к по меньшей мере одному из фосфорилированного тау-белка и обогащенных парных спиральных филаментов (ePHF) у нуждающегося в этом субъекта, включающий:

(i) введение субъекту примирующей композиции, содержащей иммунологически эффективное количество липосомы, содержащей:

a. первый фосфопептид тау с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27 - SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 31 - SEQ ID NO: 38;

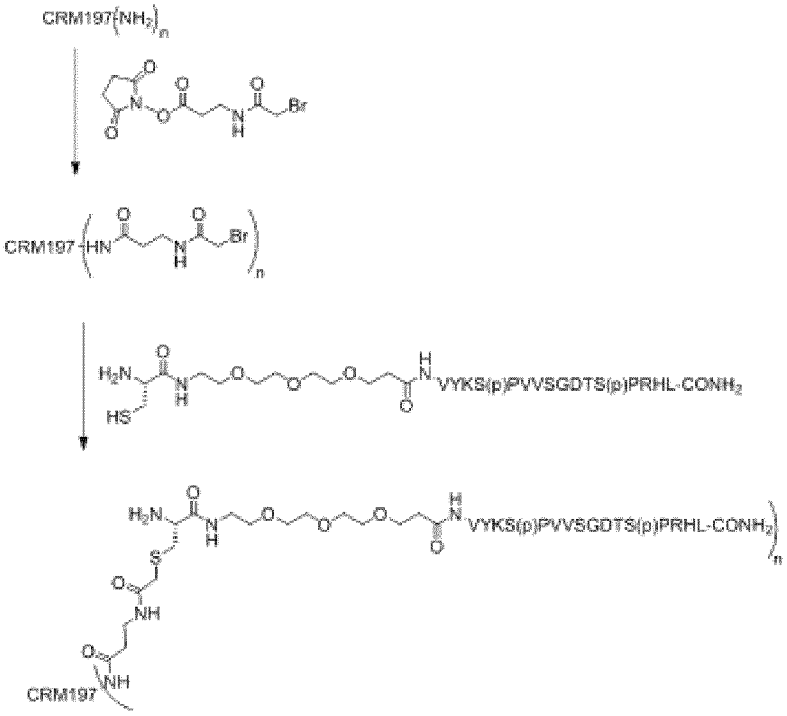
b. эпитоп хелперных Т-клеток с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 39 - SEQ ID NO: 44, предпочтительно эпитоп хелперных Т-клеток, состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13 - SEQ ID NO: 17;

c. липидированный олигонуклеотид CpG с нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18 - SEQ ID NO: 22, где олигонуклеотид CpG содержит одну или более фосфоротиоатных межнуклеотидных связей, и олигонуклеотид CpG ковалентно связан по меньшей мере с одним холестерином через линкер; и

d. монофосфориллипид A (MPLA);

где первый фосфопептид тау презентирован на поверхности липосомы, и примирующая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель; и

(ii) введение субъекту первой бустерной композиции, содержащей иммунологически эффективное количество конъюгата, содержащего второй фосфопептид тау и иммуногенный носитель, конъюгированный с ним через линкер, где конъюгат имеет структуру:



где n представляет собой целое число от 3 до 7, и первая бустерная композиция

дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

5. Способ индукции антител к по меньшей мере одному из фосфорилированного тау-белка и обогащенных парных спиральных филаментов (ePHF) у нуждающегося в этом субъекта, включающий

(i) введение субъекту примирующей композиции, содержащей иммунологически эффективное количество липосомы, содержащей:

(1) первый фосфопептид тау с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28;

(2) агонист толл-подобного рецептора 4, содержащий 3-деацил монофосфорил-гексаацил-липид А;

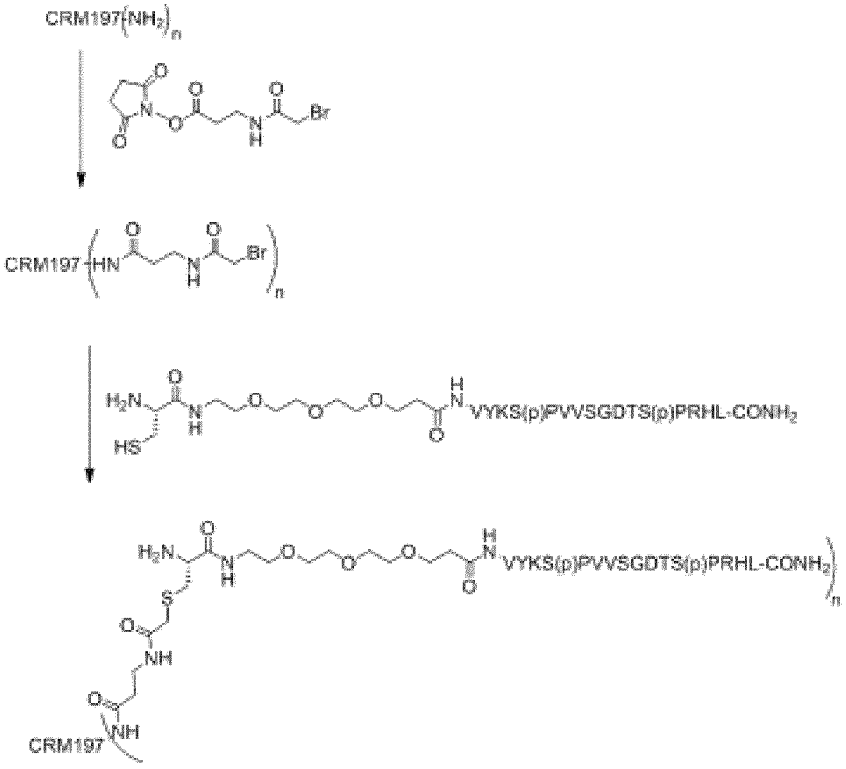
(3) эпитоп хелперных Т-клеток, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39;

(4) липидированный олигонуклеотид CpG, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 18; и

(5) по меньшей мере один липид, выбранный 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,

где первый фосфопептид тау презентирован на поверхности липосомы, и примирующая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель; и

(ii) введение субъекту первой бустерной композиции, содержащей иммунологически эффективное количество конъюгата, содержащего второй фосфопептид тау и иммуногенный носитель, конъюгированный с ним через линкер, где конъюгат имеет структуру:



где n представляет собой целое число от 3 до 7, и первая бустерная композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

6. Способ по любому из пп. 1-5, дополнительно включающий введение субъекту первой бустерной композиции по меньшей мере один раз после первичного введения первой бустерной композиции.

7. Способ по любому из пп. 1-6, дополнительно включающий введение субъекту второй бустерной композиции, содержащей иммунологически эффективное количество липосомы и фармацевтически приемлемый носитель.

8. Способ по п.7, дополнительно включающий введение субъекту второй бустерной композиции по меньшей мере один раз после первичного введения второй бустерной композиции.

9. Способ индукции антител к по меньшей мере одному из фосфорилированного тау-белка и обогащенных парных спиральных филаментов (ePHF) у нуждающегося в этом субъекта, включающий:

(i) введение субъекту примирующей композиции, содержащей иммунологически эффективное количество липосомы, содержащей:

(1) первый фосфопептид тау с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28;

(2) агонист толл-подобного рецептора 4, содержащий 3-деацил монофосфорил-гексаацил-липид А;

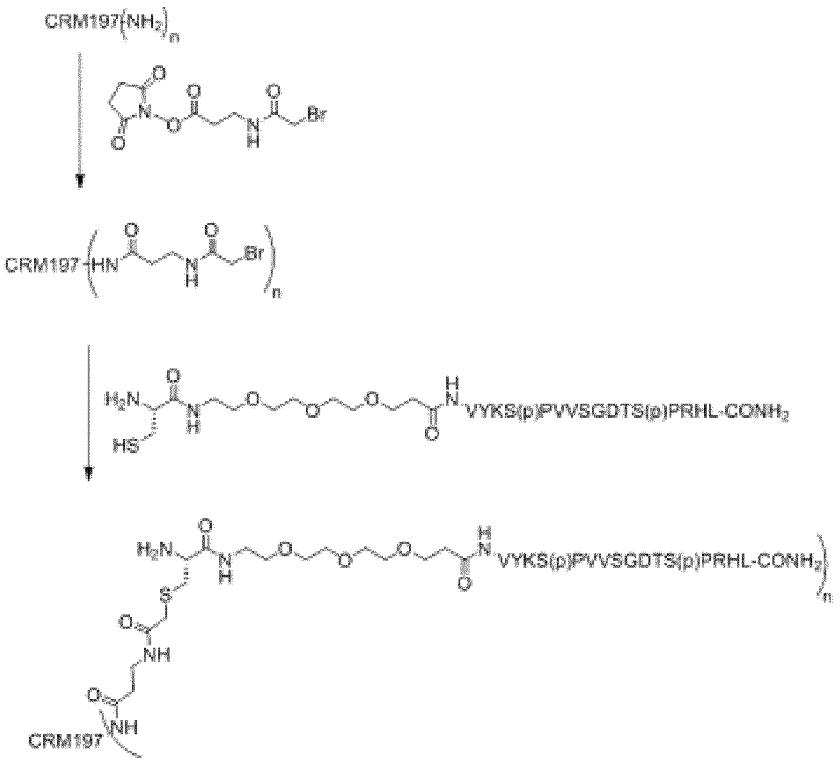
(3) эпитоп хелперных Т-клеток, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39;

(4) липидированный олигонуклеотид CpG, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 18; и

(5) по меньшей мере один липид, выбранный 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,

где первый фосфопептид тау презентирован на поверхности липосомы, и примирующая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель; и

(ii) введение субъекту первой бустерной композиции, содержащей иммунологически эффективное количество конъюгата, содержащего второй фосфопептид тау и иммуногенный носитель, конъюгированный с ним через линкер, где конъюгат имеет структуру:



где n представляет собой целое число от 3 до 7, и первая бустерная композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель; и

(iii) введение субъекту первой бустерной композиции или второй бустерной композиции, содержащей иммунологически эффективное количество липосомы и фармацевтически приемлемый носитель.

10. Способ по п.9, где (ii) выполняют перед (iii).

11. Способ по п.9, где (ii) выполняют после (iii).

12. Способ по любому из пп. 9-11, дополнительно включающий введение субъекту первой бустерной композиции по меньшей мере один раз после первичного введения первой бустерной композиции.

13. Способ по любому из пп. 9-12, включающий введение субъекту второй бустерной композиции по меньшей мере один раз.

14. Способ по любому из пп. 1-13, где субъект нуждается в лечении нейродегенеративного заболевания или расстройства, вызванного или связанного с образованием нейрофибриллярных поражений.

15. Способ по п.14, где нейродегенеративное заболевание или расстройство представляет собой болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Крейтцфельда-Якоба, деменцию боксеров, синдром Дауна, болезнь Герстманна-Штреусслера-Шейнкера, миозит с тельцами включения, прион-протеинцеребральную амилоидную ангиопатию, черепно-мозговую травму, боковой амиотрофический склероз, комплекс паркинсонизма и деменции Гуама, болезнь моторных нейронов негуамского типа с нейрофибриллярными клубками, деменцию с аргирофильными гранулами, кортикобазальную дегенерацию, деменцию Леви, амиотрофический боковой склероз, диффузные нейрофибриллярные клубки с кальцификацией, лобно-височную деменцию с паркинсонизмом, сцепленную с

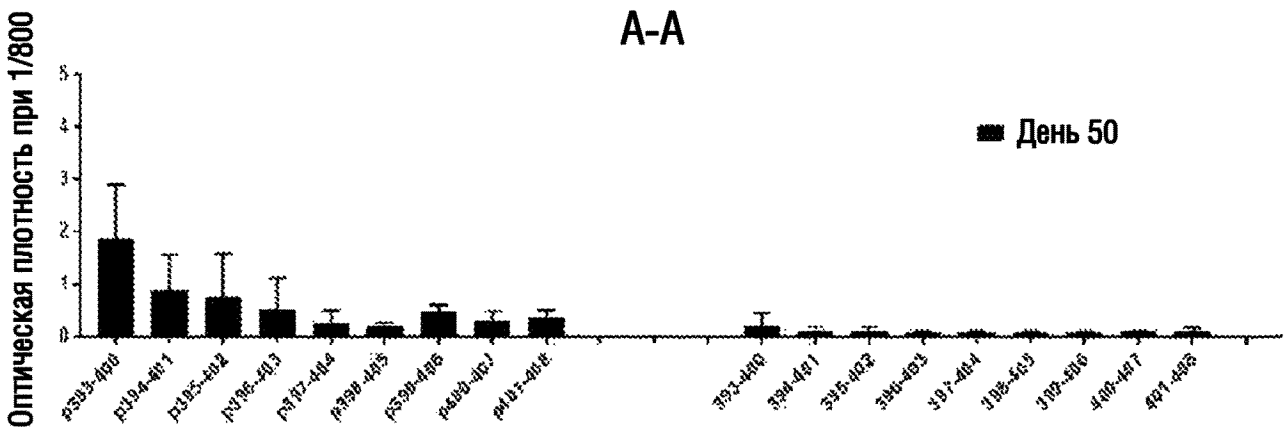
хромосомой 17 (FTDP-17), болезнь Галлервордена-Шпатца, мультисистемную атрофию, болезнь Ниманна-Пика типа С, болезнь Пика, прогрессирующий субкортикальный глиоз, прогрессирующий надъядерный паралич, подострый склерозирующий панэнцефалит, деменцию с преобладанием нейрофибриллярных клубков, постэнцефалитный паркинсонизм, миотоническую дистрофию, хроническую травматическую энцефалопатию (CTE), церебральную ангиопатию или деменцию с тельцами Леви (LBD).

16. Способ по п.15, где субъект нуждается в лечении болезни Альцгеймера, предпочтительно болезни Альцгеймера на ранней стадии, умеренного когнитивного нарушения (MCI), вызванного болезнью Альцгеймера, или болезни Альцгеймера от легкой до умеренной степени тяжести.

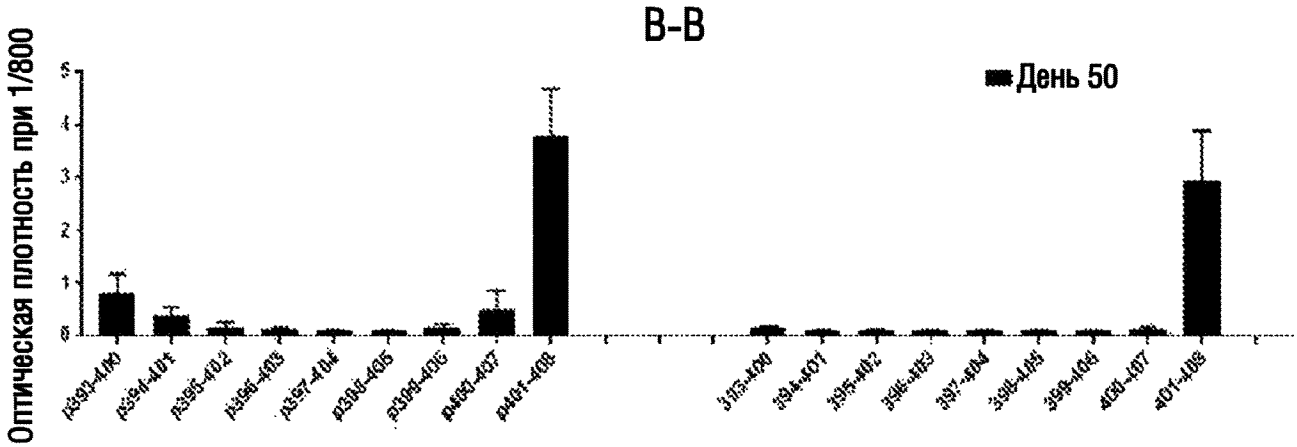
17. Способ по любому из пп. 1-16, где иммунологически эффективное количество липосомы включает первый фосфопептид тау в количестве от примерно 25 нмоль до примерно 750 нмоль на дозу, предпочтительно от примерно 90 нмоль до примерно 715 нмоль на дозу или от примерно 90 нмоль до примерно 535 нмоль на дозу.

18. Способ по любому из пп. 1-17, где иммунологически эффективное количество липосомы содержит первый фосфопептид тау в количестве от примерно 100 мкг до примерно 2500 мкг, предпочтительно от примерно 300 мкг до примерно 2400 мкг, например, примерно 100 мкг, примерно 150 мкг, примерно 200 мкг, примерно 250 мкг, примерно 300 мкг, примерно 400 мкг, примерно 500 мкг, примерно 600 мкг, примерно 700 мкг, примерно 800 мкг, примерно 900 мкг, примерно 1000 мкг, примерно 1100 мкг, примерно 1200 мкг, примерно 1300 мкг, примерно 1400 мкг, примерно 1500 мкг, примерно 1600 мкг, примерно 1700 мкг, примерно 1800 мкг, примерно 1900 мкг, примерно 2000 мкг, примерно 2100 мкг, примерно 2200 мкг, примерно 2300 мкг, примерно 2400 мкг, примерно 2500 мкг или любое промежуточное значение на дозу.

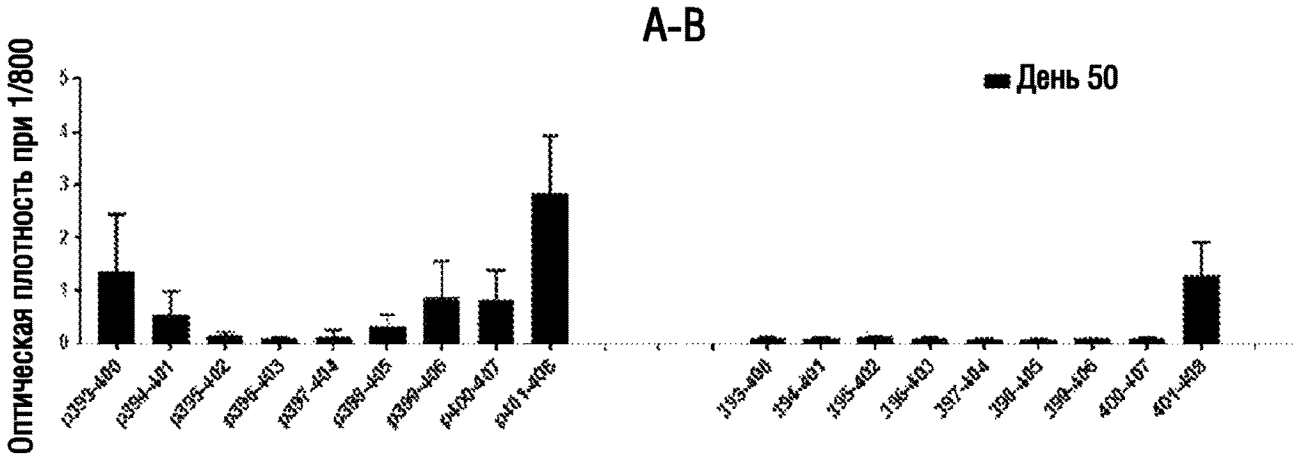
ФИГ.1А



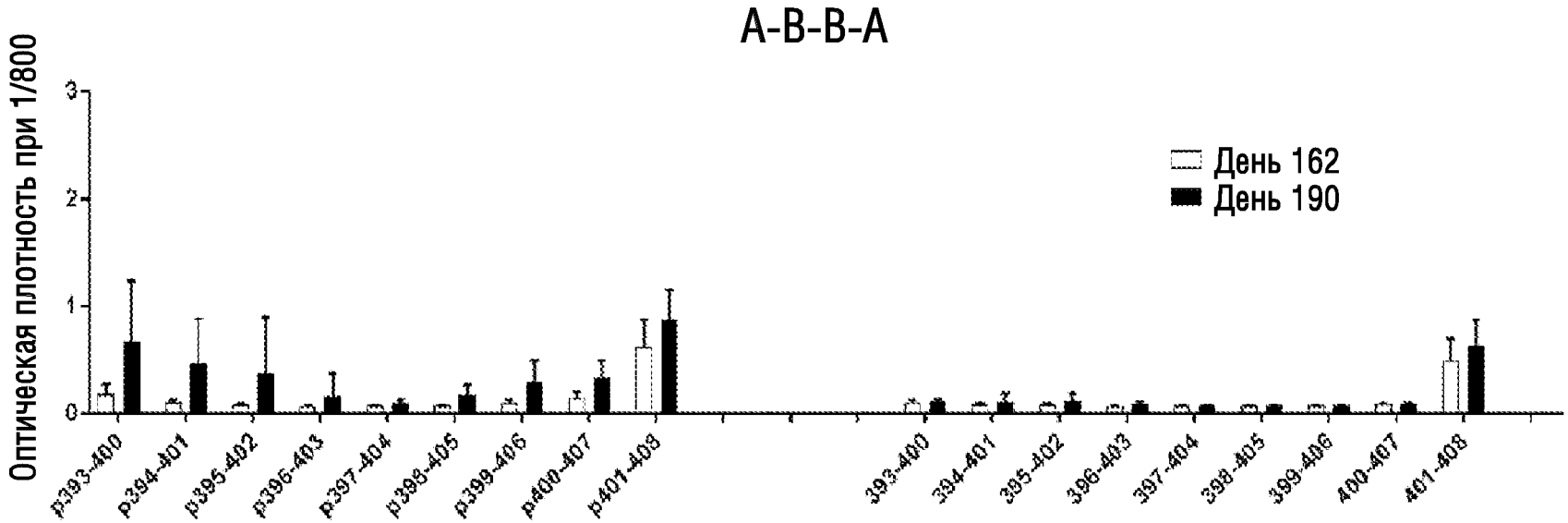
ФИГ.1В



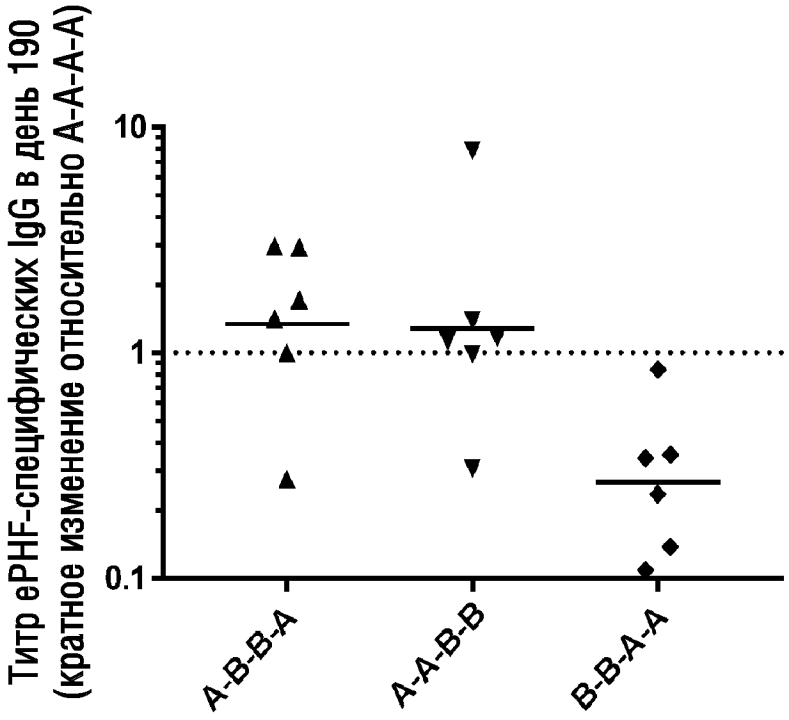
ФИГ.1С



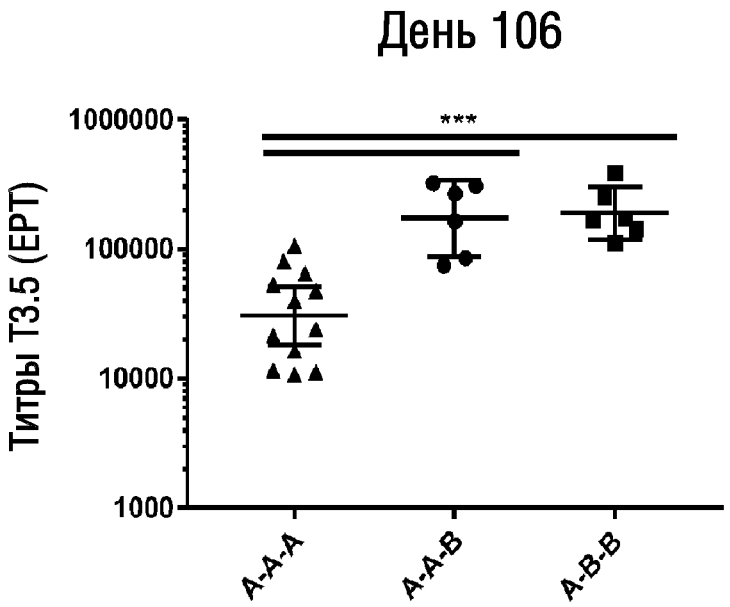
ФИГ.2


A-B-B-A
Оптическая плотность при 1/800
День 162
День 190
0
1
2
3
p393-400
p394-401
p395-402
p396-403
p397-404
p398-405
p399-406
p400-407
p401-408
393-400
394-401
395-402
396-403
397-404
398-405
399-406
400-407
401-408

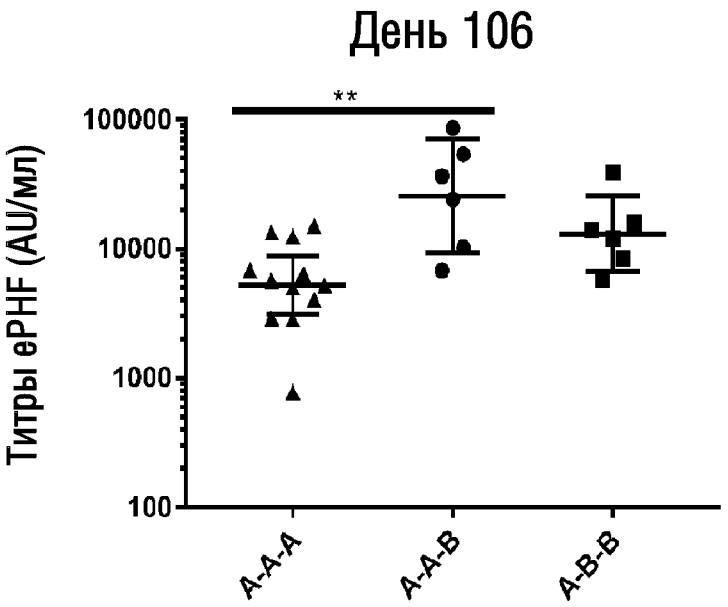
ФИГ.3


Титр ePHF-специфических IgG в день 190
(кратное изменение относительно A-A-A-A)
10
1
0.1
A-B-B-A
A-A-B-B
B-B-A-A

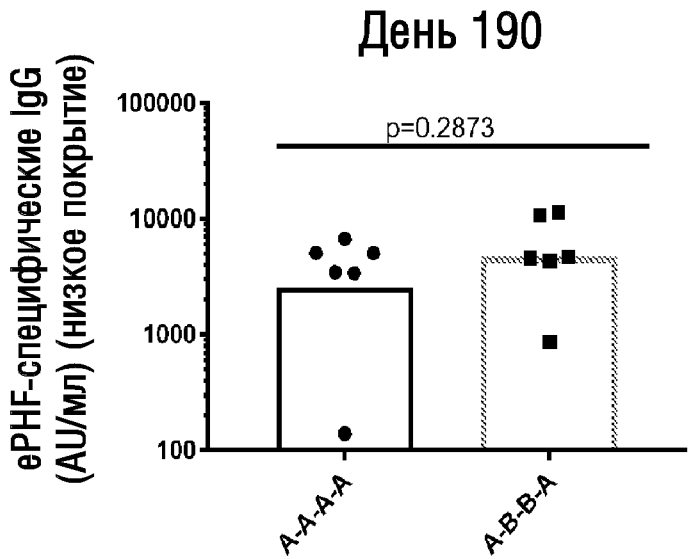
ФИГ.4А


День 106
Титры T3.5 (EPT)
1000000
100000
10000
1000
***
A-A-A
A-A-B
A-B-B

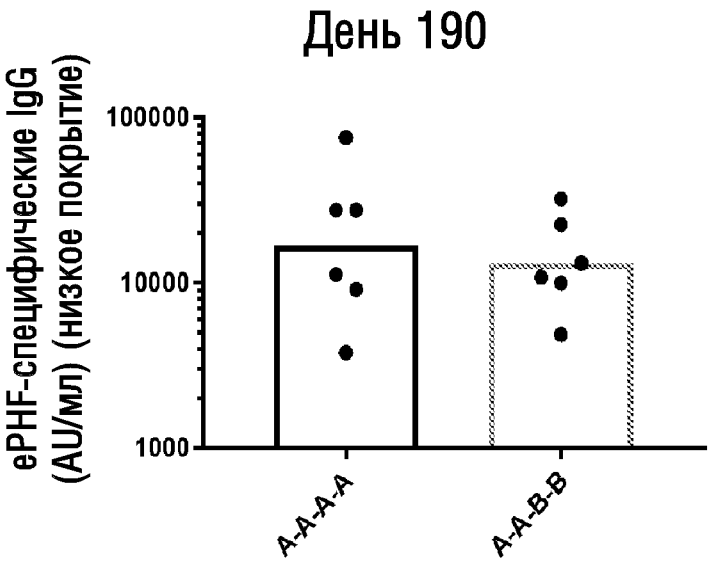
ФИГ.4В


День 106
Титры ePHF (AU/мл)
100000
10000
1000
100
**
A-A-A
A-A-B
A-B-B

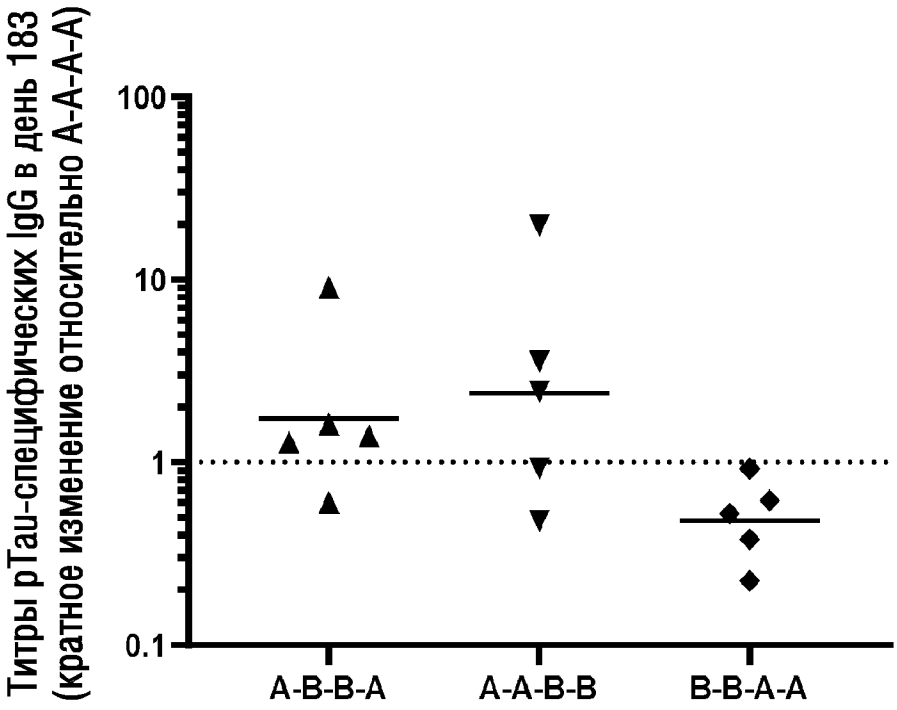
ФИГ.5А


День 190
ePHF-специфические IgG (AU/мл) (низкое покрытие)
100000
10000
1000
100
p=0.2873
A-A-A-A
A-B-B-A

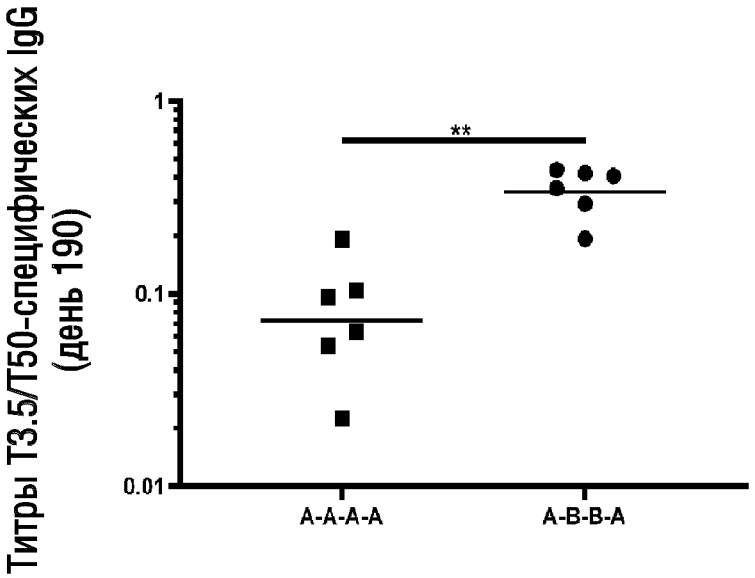
ФИГ.5В

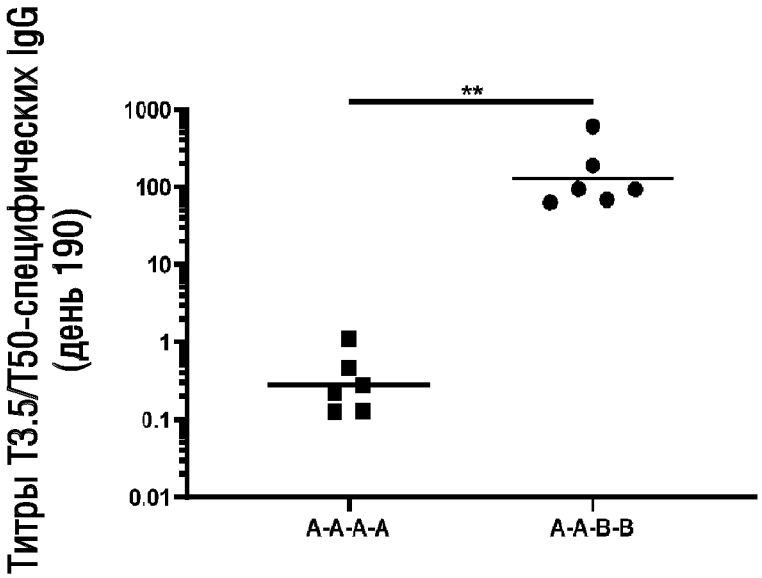

День 190
ePHF-специфические IgG (AU/мл) (низкое покрытие)
100000
10000
1000
A-A-A-A
A-A-B-B

ФИГ.6


Титры pTau-специфических IgG в день 183
(кратное изменение относительно A-A-A-A)
100
10
1
0.1
A-B-B-A
A-A-B-B
B-B-A-A

ФИГ.7


Титры T3.5/T50-специфических IgG
(день 190)
1
0.1
0.01
**
A-A-A-A
A-B-B-A


Титры T3.5/T50-специфических IgG
(день 190)
1000
100
10
1
0.1
0.01
**
A-A-A-A
A-A-B-B