

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045311**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.11.15

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

(21) Номер заявки
202192203

(22) Дата подачи заявки
2020.02.07

(54) СПОСОБ БЕЗОПАСНОГО ВВЕДЕНИЯ ВАКЦИНЫ ФОСФОРИЛИРОВАННОГО ПЕПТИДА TAU

(31) 62/802,870

(32) 2019.02.08

(33) US

(43) 2021.10.20

(86) PCT/US2020/017235

(87) WO 2020/163730 2020.08.13

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**АЦ ИММУНЕ СА (СН); ЯНССЕН
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Пфайфер Андреа, Мус Андреас,
Пильгрэн Бош Мария, Вукицевиц
Вергилле Мария, Пио Николя,
Гимире Сародж Радж (СН), Рамсбург
Элизабет Энн, Де Марко Доната,
Садака Шарлотт (US)**

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

(56) CLARA THEUNIS ET AL: "Efficacy and Safety of A Liposome-Based Vaccine against Protein Tau, Assessed in Tau.P301L Mice That Model Tauopathy", PLOS ONE, vol. 8, no. 8, 19 August 2013 (2013-08-19), page e72301, XP055531427, DOI: 10.1371/journal.pone.0072301 *** page 2 left col. ***

HANGER D P ET AL: "Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease", TRENDS IN MOLECULAR MEDICINE, ELSEVIER CURRENT TRENDS, GB, vol. 15, no. 3, 1 March 2009 (2009-03-01), pages 112-119, XP025980665, ISSN: 1471-4914, DOI: 10.1016/J.MOLMED.2009.01.003 [retrieved on 2009-02-24] *** page 114, Table 1 ***

NEHA S. GANDHI ET AL: "A Phosphorylation-Induced Turn Defines the Alzheimer's Disease AT8 Antibody Epitope on the Tau Protein", ANGEWANDTE CHEMIE, INTERNATIONAL EDITION, vol. 54, no. 23, 16 April 2015 (2015-04-16), pages 6819-6823, XP055690026, DE ISSN: 1433-7851, DOI: 10.1002/anie.201501898 *** page 6820, left col., peptide 1 ***

US-A1-2010316564
US-A1-2012183599

(57) Описаны способы индукции антител к фосфорилированному белку Тау без индукции серьезного нежелательного эффекта у людей. Способы включают введение субъекту эффективного количества липосом, содержащих агонист толл-подобного рецептора 4 и фосфопептид Тау, презентированный на поверхности липосомы.

B1

045311

**045311
B1**

Ссылка на перечень последовательностей, представленный в электронном виде

Эта заявка содержит список последовательностей, который предоставлен в электронном виде через EFS-Web в форме списка последовательностей в формате ASCII с названием файла "Список последовательностей 689001_66U1", созданным 7 февраля 2020 г., размером 22 КБ. Список последовательностей, представленный через EFS-Web, является частью описания и полностью включен в настоящее описание посредством ссылки.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области медицины. В частности, изобретение относится к липосомам фосфорилированных пептидов Тау (pTau) и их применению для профилактики или лечения таупатии, такой как болезнь Альцгеймера.

Уровень техники

Болезнь Альцгеймера (БА) представляет собой прогрессирующее изнурительное нейродегенеративное заболевание, которым, по оценкам, страдают 44 миллиона человек во всем мире (Alzheimers.net). В настоящее время коммерциализированные способы лечения БА направлены на устранение клинических симптомов, но не на патогенные процессы, лежащие в основе заболевания (болезнь модифицирующий эффект). К сожалению, существующие способы лечения имеют минимальную эффективность, и поэтому существует острая необходимость в разработке и испытании дополнительных профилактических и терапевтических мер.

Отличительными патологиями болезни Альцгеймера является накопление внеклеточных бляшек, содержащих заметно агрегированный белок бета-амилоид и внутриклеточные "клубки" или скопления гиперфосфорилированного белка Тау. Молекулярные события, которые приводят к накоплению этих белков, плохо изучены. Что касается амилоида, предполагается, что aberrantное расщепление белка-предшественника амилоида приводит к накоплению склонного к агрегации фрагмента, содержащего аминокислоты 1-42. Касательно белка Тау, предполагается, что нарушение регуляции либо киназ, либо фосфатаз, либо обоих приводит к aberrantному фосфорилированию белка Тау. Когда Тау становится гиперфосфорилированным, он теряет способность эффективно связывать и стабилизировать микротрубочки и вместо этого накапливается в цитоплазме пораженного нейрона. Несвязанный и гиперфосфорилированный белок Тау, по-видимому, сначала формирует олигомеры, а затем агрегаты более высокого порядка, присутствие которых предположительно отрицательно влияет на функцию нейрона, в котором они формируются, возможно, посредством прерывания нормального аксонного транспорта.

В развитых странах людей, у которых диагностирована болезнь Альцгеймера или другие дементирующие таупатии, обычно лечат ингибиторами холинэстеразы (например, Aricept®) или мемантином (например, Namenda™). Эти лекарственные средства, хотя и достаточно хорошо переносятся, обладают весьма умеренной эффективностью. Например, Aricept® задерживает ухудшение симптомов на 6-12 месяцев приблизительно 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.

В настоящее время разрабатываются иммунотерапевтические средства для профилактики и лечения БА. Активная иммунизация антигеном, связанным с БА, может потенциально стимулировать ответ как иммунитета против БА, обусловленного антителами, так и клеточно-опосредованный иммунитета. Однако оценка первой широко протестированной человеческой вакцины против бета-амилоида была прекращена в 2002 году. В клинических исследованиях активного иммунотерапевтического агента AN-1792, направленного на Aβ, у пациентов с БА наблюдался менингоэнцефалит, тип воспаления центральной нервной системы, который может привести к летальному исходу (Orgogozo et al., 2003). Считается, что энцефалитные реакции, которые наблюдались у 6% пациентов, подвергшихся воздействию AN-1792, были вызваны нежелательной активацией Aβ-специфических Т-клеток.

На сегодняшний день проведено несколько исследований по изучению агентов, специфически нацеленных на тау-патологию. В настоящее время Тау-иммунотерапевтические агенты проходят клинические испытания, но эта область все еще находится в зачаточном состоянии, и пока еще отсутствует достаточно четкое механистическое понимание эффективности и безопасности различных подходов (Sigurdsson, Neurodegener Dis. 2016; 16(0):34-38). Также имеются сообщения об энцефалите, воспалении головного мозга у мышей, иммунизированных против полноразмерного белка Тау. Однако отсутствуют сообщения о побочных эффектах у животных, иммунизированных однократной инъекцией фосфорилированного пептида Тау в провоспалительную среду в ЦНС (Rosenmann H., 2013. Curr. Alzheimer Res. 10, 217-228).

Недавно был опубликован профиль долгосрочной безопасности вакцины на основе нефосфорилированного пептида Тау (AADvac1) у людей с болезнью Альцгеймера от легкой до умеренной степени тяжести (Novak et al., Alzheimer's Research & Therapy (2018) 10:108). Вакцина содержит синтетический пептид, полученный из аминокислот с 294 по 305 последовательности белка, Тау связанный с гемоглином лимфы улитки (KLH) через N-концевой цистеин. Его вводили в дозах 40 мкг пептида (CKDNIKHPGGGS), связанного с KLH, с адьювантом гидроксидом алюминия (содержащим 0,5 мг Al³⁺) в

0,3 мл фосфатного буфера. Наблюдаемые нежелательные явления (НЯ) у 26 включенных в исследование пациентов, связанные с лечением AADvac1 в исследовании фазы 1 (исследование FUNDAMENT), представляли собой реакции в месте инъекции (эритема, отек, тепло, зуд, боль, узелок). У 50% пациентов, получавших лечение AADvac1, наблюдали одно или более из этих НЯ. Реакции в месте инъекции были обратимыми и преимущественно легкими по форме. Наблюдали шесть серьезных нежелательных явлений (СНЯ) (ущемленная грыжа живота, обезвоживание, острый психоз, поведенческие и психиатрические симптомы деменции, атриовентрикулярная блокада второй степени и синусовая брадикардия). Исследователи решили, что ни одно из этих СНЯ не связано с лечением AADvac1. Аллергических или анафилактических реакций не наблюдалось. Лабораторные исследования (коагуляция, биохимия крови, гематология и анализ мочи), оценка жизненно важных функций или неврологическое и физикальное обследование не выявили никаких сигналов по безопасности. МРТ оценка также не выявила сигналов по безопасности. Отечных изменений не произошло. Менингеальные изменения и менингоэнцефалит не наблюдались. Новые микрокровоизлияния наблюдали в одной гомозиготе ApoE4, и поверхностный гемосидерин детектировали в одной гетерозиготе ApoE4, оба явления были клинически незаметными и были оценены как согласующиеся с фоновой частотой таких поражений в популяции пациентов с БА.

Однако сообщения о профиле безопасности вакцины фосфорилированного пептида Тау у людей отсутствуют. Существует потребность в безопасном и эффективном лечении дегенеративного заболевания нейронов, такого как болезнь Альцгеймера.

Сущность изобретения

Изобретение основано на результатах клинических исследований липосомальной вакцины, содержащей фосфорилированный пептид Тау, презентированный на поверхности липосомы. Вакцина оказалась хорошо переносимой людьми. Было показано, что в дозе, намного превышающей дозу, использованную в испытании Тау-конъюгированной вакцины AADvac1, липосомальная вакцина пептида pTau индуцировала антитела к фосфорилированному Тау у людей, не вызывая серьезного нежелательного явления.

Соответственно, в одном из общих аспектов изобретение относится к способу индукции антител к фосфорилированному Тау без индукции серьезного нежелательного явления, такого как энцефалит, у нуждающегося в этом человека, включающему введение субъекту эффективного количества липосом, содержащих агонист толл-подобного рецептора 4 и фосфопептид Тау, содержащего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 12, где фосфопептид Тау вводят в количестве от приблизительно 25 нмоль до приблизительно 750 нмоль на дозу, например от приблизительно 29,7 нмоль до приблизительно 742,5 нмоль на дозу, предпочтительно от приблизительно 90 нмоль до приблизительно 715 нмоль, например от приблизительно 89,1 нмоль до приблизительно 712,8 нмоль на дозу или от приблизительно 90 нмоль до приблизительно 535 нмоль на дозу, например от приблизительно 89,1 нмоль до приблизительно 534,6 нмоль на дозу, или от приблизительно 90 нмоль до приблизительно 275 нмоль на дозу, например от приблизительно 89,1 нмоль до приблизительно 267,3 нмоль на дозу, и где фосфопептид Тау презентирован на поверхности липосомы. В некоторых вариантах осуществления фосфопептид Тау состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27 - SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 31 - SEQ ID NO: 38, предпочтительно из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28. В одном из вариантов осуществления эффективное количество липосом содержит агонист толл-подобного рецептора 4 и тетрапальмитоилированный фосфопептид Тау, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28, где тетрапальмитоилированный фосфопептид Тау презентирован на поверхности липосомы и вводится в количестве от 100 мкг до 2500 мкг на дозу, что соответствует от 29,7 нмоль до 742,5 нмоль на дозу, предпочтительно от 300 мкг до 2400 мкг на дозу, что соответствует от 89,1 нмоль до 712,8 нмоль на дозу, например 300 мкг, 900 мкг, 1800 мкг или 2400 мкг на дозу, что соответствует 89,1 нмоль, 267,3 нмоль, 534,6 нмоль или 712,8 нмоль на дозу.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу индукции антител к фосфорилированному Тау без индукции серьезного нежелательного явления, такого как энцефалит, у нуждающегося в этом человека, включающему введение субъекту эффективного количества липосом, содержащих агонист толл-подобного рецептора 4 и фосфопептид Тау, презентированный на поверхности липосомы, где фосфопептид Тау содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 12, и фосфопептид Тау вводят в количестве от приблизительно 25 нмоль до приблизительно 750 нмоль на дозу, причем фосфопептид Тау предпочтительно представляет собой тетрапальмитоилированный фосфопептид Тау, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28, который вводят в количестве приблизительно 300 мкг, приблизительно 900 мкг, приблизительно 1800 мкг или приблизительно 2400 мкг на дозу или любом промежуточном количестве.

В некоторых вариантах осуществления способ индукции антител к фосфорилированному Тау без индукции серьезного нежелательного явления, такого как энцефалит, у нуждающегося в этом человека, включающий введение субъекту эффективного количества липосом, содержащих агонист толл-подобного рецептора 4 и фосфопептид Тау, презентированный на поверхности липосомы, где фосфопеп-

тид Тау содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27 - SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 31 - SEQ ID NO: 38, причем фосфопептид Тау вводят в количестве от приблизительно 90 нмоль до приблизительно 715 нмоль на дозу, например приблизительно 29,7 нмоль, приблизительно 267,3 нмоль, приблизительно 534,6 нмоль или приблизительно 712,8 нмоль на дозу, или любом промежуточном количестве. В одном из вариантов осуществления эффективное количество липосом содержит фосфопептид Тау в количестве от 265 до 275 нмоль на дозу, например 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274 или 275 нмоль на дозу или любом промежуточном количестве, например приблизительно 267,3 нмоль на дозу. В другом варианте осуществления эффективное количество липосом содержит фосфопептид Тау в количестве от 530 до 540 нмоль на дозу, например 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539 или 540 нмоль на дозу или любом промежуточном количестве, например 534,6 нмоль на дозу. В другом варианте осуществления эффективное количество липосом содержит фосфопептид Тау в количестве от 710 до 720 нмоль на дозу, например 710, 711, 712, 713, 714, 715, 716, 717, 718, 719 или 720 нмоль на дозу или любом промежуточном количестве, например 712,8 нмоль на дозу.

В некоторых вариантах осуществления липосомы вводят подкожно.

В некоторых вариантах осуществления липосомы вводят внутримышечно.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту второй дозы эффективного количества липосом через 1-24 недели после первоначального введения.

В некоторых вариантах осуществления липосома дополнительно содержит по меньшей мере одно из эпитопа хелперных Т-клеток и липидированного олигонуклеотида CpG. В некоторых вариантах осуществления липидированный олигонуклеотид CpG имеет нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18 - SEQ ID NO: 22, предпочтительно нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 18, причем олигонуклеотид CpG имеет одну или более фосфоротиоатных межнуклеотидных связей, и олигонуклеотид CpG ковалентно связан по меньшей мере с одной липофильной группой через линкер, предпочтительно через линкер ПЭГ.

В некоторых вариантах 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'-гас-глицерина (DMPG) и холестерина.

В некоторых вариантах осуществления эпитоп Т-хелперных клеток содержит по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23 - SEQ ID NO: 26, предпочтительно содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 23-25.

В некоторых вариантах осуществления агонист толл-подобного рецептора 4 представляет собой монофосфориллипид А (MPLA).

В некоторых вариантах осуществления эффективное количество липосом содержит агонист толл-подобного рецептора 4 в количестве от 30 мкг до 900 мкг, предпочтительно от 100 мкг до 585 мкг на дозу. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество липосом содержит монофосфорилгексаацил-липид А, 3-деацил, агонист толл-подобного рецептора, в количестве от 30 мкг до 900 мкг, предпочтительно от 100 мкг до 585 мкг на дозу.

В некоторых вариантах осуществления эффективное количество липосом содержит эпитоп хелперных Т-клеток в количестве от 25 мкг до 625 мкг, предпочтительно от 75 мкг до 450 мкг на дозу. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество липосом содержит эпитоп хелперных Т-клеток T50, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13, в количестве от 25 мкг до 625 мкг, предпочтительно от 75 мкг до 450 мкг на дозу.

В некоторых вариантах осуществления эффективное количество липосом содержит эпитоп хелперных Т-клеток в количестве от приблизительно 2 нмоль до приблизительно 110 нмоль на дозу, например от приблизительно 4,02 нмоль до приблизительно 100,44 нмоль на дозу, или от приблизительно 4 нмоль до приблизительно 75 нмоль на дозу, например от приблизительно 4,02 нмоль до приблизительно 72,32 нмоль на дозу, или от приблизительно 10 нмоль до приблизительно 105 нмоль на дозу, например от приблизительно 12,06 нмоль до приблизительно 100,44 нмоль на дозу, или от приблизительно 70 до приблизительно 105 нмоль на дозу, например от приблизительно 72,32 нмоль до приблизительно 100,44 нмоль на дозу. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество липосом содержит эпитоп хелперных Т-клеток T50, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13, в количестве от приблизительно 3 нмоль до приблизительно 105 нмоль на дозу, предпочтительно от приблизительно 10 нмоль до приблизительно 105 нмоль на дозу, например от приблизительно 12,06 нмоль до приблизительно 100,44 нмоль на дозу. В одном из вариантов осуществления эффективное количество липосом содержит эпитоп хелперных Т-клеток в количестве от 2 до 5 нмоль на дозу, например, 2, 3, 4 или 5 нмоль на дозу или любом промежуточном количестве, например приблизительно 3,82, 3,92, 4,02 или 4,12 нмоль на дозу. В другом варианте осуществления эффективное количество липосом содержит эпитоп хелперных Т-клеток в количестве от 10 до 15 нмоль на дозу, например 10, 11, 12, 13, 14 или 15 нмоль на дозу, или любом промежуточном количестве, например 11,86, 11,96, 12,06, 12,16 нмоль на дозу. В другом варианте осуществления эффективное количество липосом содержит эпитоп хелперных Т-клеток в количестве от 70 до 75 нмоль на дозу, например 70, 71, 72, 73, 74 или 75 нмоль на

дозу, или любом промежуточном количестве, например 72,02, 72,12, 72,22, 72,32, 72,42. В еще одном варианте осуществления эффективное количество липосом содержит эпитоп хелперных Т-клеток в количестве от 98 до 103 нмоль на дозу, например 98, 99, 100, 101, 102 или 103 нмоль на дозу, или любом промежуточном количестве, например 100,24, 100,34, 100,44, 100,54 или 100,64 нмоль на дозу.

В некоторых вариантах осуществления эффективное количество липосом содержит липидированный олигонуклеотид CpG в количестве от 50 мкг до 1250 мкг, предпочтительно от 150 мкг до 800 мкг на дозу. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество липосом содержит олигонуклеотид CpG, состоящий из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 18, в количестве от 50 мкг до 1250 мкг, предпочтительно от 150 мкг до 800 мкг на дозу.

В некоторых вариантах осуществления липосома содержит:

- (1) фосфопептид Тау, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28;
- (2) агонист толл-подобного рецептора 4, содержащий монофосфорил-гексаацил-липид А, 3-деацил;
- (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'-гас-глицерина (DMPG) и холестерина.

В некоторых вариантах осуществления субъект нуждается в лечении болезни Альцгеймера, такой как болезнь Альцгеймера на ранней стадии, легкое когнитивное нарушение (MCI), вызванное болезнью Альцгеймера, болезнь Альцгеймера легкой степени или болезнь Альцгеймера от легкой до умеренной степени. В других вариантах осуществления у субъекта головной мозг является амилоид-положительным, но у него еще не проявляются значительные когнитивные нарушения.

Изобретение также относится к вакцинной комбинации для использования для индукции антител к фосфорилированному Тау без индукции серьезного нежелательного явления, такого как энцефалит, у нуждающегося в этом человека, причем вакцинная комбинация содержит праймер-вакцину и бустер-вакцину согласно вариантам осуществления изобретения. Изобретение также относится к применению вакцинной комбинации при производстве лекарственного средства для индукции антител к антифосфорилированному Тау без индукции серьезного нежелательного явления, такого как энцефалит, у нуждающегося в этом человека, причем вакцинная комбинация содержит праймер-вакцину и бустер-вакцину согласно вариантам осуществления изобретения. Все аспекты и варианты осуществления изобретения, представленные в настоящем описании в отношении способов индукции антител к фосфорилированному Тау без индукции у человека серьезного нежелательного явления, такого как энцефалит, могут быть применены к вакцинным комбинациям для применения и/или применений вакцинной комбинации при производстве лекарственного средства для индукции антител к антифосфорилированному Тау без индукции серьезного нежелательного явления, такого как энцефалит, у нуждающегося в этом человека.

Дополнительные аспекты, признаки и преимущества настоящего изобретения станут более понятными после изучения приведенного ниже подробного описания изобретения и формулы изобретения.

Краткое описание чертежей

Представленное выше краткое описание изобретения, а также приведенное ниже подробное описание предпочтительных вариантов осуществления настоящей заявки можно лучше понять в комбинации с прилагаемыми чертежами. Однако следует понимать, что заявка не ограничивается точными вариантами осуществления, показанными на чертежах.

На фиг. 1 показаны титры IgG к pTau после трех внутримышечных введений ACI-35.030 один раз в две недели в количестве 35 и 80 мкг/дозу самкам мышей C57BL/6; представлено среднее геометрическое+95% CI на группу из 10 мышей.

На фиг. 2 показано, что ACI-35.030 в количестве 1200 мкг/доза и 2400 мкг/доза индуцировала устойчивый титр антител к антифосфорилированному Тау у макаки резус; представлено среднее геометрическое значение титров антител на группу, выраженное в AU/мл, измеренное методом ELISA.

На фиг. 3 показано, что четыре инъекции ACI-35.030 в количестве 2400 мкг/доза индуцировали антитела, которые связываются с Тау клубками, как видно на срезе мозга, пораженного БА (панель В), без перекрестной реактивности, как видно на срезе толстой кишки (панель D). Образцы до обработки не продемонстрировали связывание ни на срезе головного мозга, пораженного БА (панель А), ни на срезе толстой кишки (панель С).

На фиг. 4 показано, что внутримышечная инъекция ACI-35.030 в количестве 1800 мкг/доза индуцировала титры анти-ePHF IgG-антител с более низкой внутригрупповой вариабельностью по сравнению с подкожной инъекцией той же вакцины в такой же дозе.

Подробное описание изобретения

В разделе Уровень техники и по всему описанию процитированы или описаны различные публикации, статьи и патенты; каждая из этих ссылок включена в настоящее описание во всей своей полноте посредством ссылки. Обсуждение документов, актов, материалов, устройств, статей и т.п., которые включены в настоящее описание, предоставлены в контексте 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.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют такое же значение, в котором их обычно понимают специалисты в области, к которой относится настоящее изобретение. В противном случае некоторые используемые в настоящем описании термины имеют значения, приведенные в описании.

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

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 "приблизительно". Таким образом, числовое значение обычно включает $\pm 10\%$ 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 контексте настоящего описания использование числового диапазона в явном виде включает все возможные поддиапазоны, все отдельные числовые значения этого диапазона, включая целые числа в таких диапазонах и доли значений, если из контекста в явном виде не следует иное.

Если не указано иное, термин "по меньшей мере", предшествующий серии элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу в серии. Специалисты в данной области поймут или смогут установить с помощью не более чем рутинного экспериментирования многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления изобретения, представленных в настоящем описании. Подразумевается, что такие эквиваленты входят в объем настоящего изобретения.

Следует понимать, что в контексте настоящего описания термины "содержит", "содержащий", "включает", "включающий", "имеет", "имеющий", "состоит" или "состоящий" или любые другие их вариации означают включение указанного целого числа или группы целых чисел, но не исключение любого другого целого числа или группы целых чисел, и представляют неисчерпывающие или открытые списки. Например, композиция, смесь, процесс, способ, изделие или устройство, которое содержит список элементов, не обязательно ограничивается только этими элементами, но может 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 союзу или, а не исключающему союзу или. Например, условию А или В удовлетворяет одно из следующих условий: А истинно (или присутствует), а В ложно (или отсутствует), А ложно (или отсутствует), а В истинно (или присутствует), и оба А и В истинны (или присутствуют).

Также следует понимать, что термины "приблизительно", "приблизительно", "в целом", "по существу" и аналогичные термины, используемые в настоящем описании при ссылке на размер или характеристику компонента предпочтительного изобретения, указывают на то, что описанный размер/характеристика не является строгой границей или параметром и не исключает незначительных отклонений, которые являются функционально одинаковыми или подобными, как было бы понятно специалисту в данной области техники. Как минимум, такие ссылки, которые включают числовой параметр, будут включать вариации, которые, используя математические и промышленные принципы, принятые в данной области (например, округление, измерение или другие систематические ошибки, производственные допуски и т.д.), не будут изменять наименее значащую цифру.

В изобретении предложен способ индукции антител к фосфорилированному Тау без индукции серьезного нежелательного явления, такого как энцефалит, у нуждающегося в этом человека. В конкретных вариантах осуществления способ включает введение субъекту эффективного количества липосом, содержащих фосфопептид Тау, презентированный на поверхности липосомы, и агонист толл-подобного рецептора 4.

В контексте настоящего описания термин "антитело к фосфорилированному Тау" относится к антителу, которое связывается с Тау, фосфорилированным по аминокислотному остатку в одном или более местах аминокислотной последовательности Тау. Фосфорилированные аминокислотные остатки могут быть, например, серином (Ser), треонином (Thr) или тирозином (Tyr). Участок на фосфорилированном Тау, с которым связывается антитело к антифосфорилированному Тау, предпочтительно представляет собой участок, который специфически фосфорилируется при нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезнь Альцгеймера. Примеры участков фосфорилированного Тау, с которыми связывается антитело к антифосфорилированному Тау, включают, например, Tyr18, Ser199, Ser202, Thr205, Thr212, Ser214, Ser396, Ser404, Ser409, Ser422, Thr427. Используемые в настоящей заявке, аминокислотные положения даны со ссылкой на последовательность человеческой изоформы 2 белка Тау, ассоциированного с микротрубочками, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в GenBank Accession No. NP_005901.2.

Способность индуцировать антитела к антифосфорилированному Тау при введении может быть определена путем тестирования биологического образца (например, крови, плазмы, сыворотки, РВМС, мочи, слюны, фекалий, спинномозговой жидкости или лимфатической жидкости), полученной от субъекта, на наличие антител, например антител IgG или IgM, направленных на иммуногенный(ые) пептид(ы) Тау,

вводимый(ые) 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), других анализов на основе ELISA (например, MSD-Meso Scale Discovery), дот-блотов, SDS-PAGE гелей, ELISPOT или анализа антитело-зависимого клеточного фагоцитоза (ADCP).

В контексте настоящего описания термин "нежелательное явление" (НЯ) относится к любому нежелательному медицинскому проявлению у пациента, которому вводят фармацевтический продукт, которое не обязательно находится в причинно-следственной связи с лечением. Согласно вариантам осуществления изобретения НЯ оценивают по 3-х балльной шкале увеличения тяжести согласно следующему определению: легкое (степень 1), относящиеся к НЯ, которое легко переносится субъектом, вызывает минимальный дискомфорт и не мешает заниматься повседневными делами; умеренное (степень 2), относящиеся к НЯ, которое вызывает достаточный дискомфорт, чтобы мешать нормальной повседневной деятельности, и может потребоваться вмешательство; тяжелое (степень 3), относящиеся к НЯ, которое мешает нормальной повседневной деятельности, и обычно требуется лечение или другое вмешательство. Серьезным НЯ (СНЯ) может быть любое НЯ, возникающее при любой дозе, которое приводит к любому из следующих клинических исходов: смерть, когда смерть является результатом, а не событием; угроза для жизни, относящаяся к событию, при котором пациент находится под угрозой смерти во время события; не относится к событию, которое гипотетически могло бы вызвать смерть, если бы это событие было более серьезным; при госпитализации пациента, т.е. внеплановой госпитализации на ночь или продлении существующей госпитализации; стойкая или значительная нетрудоспособность или существенное нарушение способности выполнять нормальные жизненные функции; врожденная аномалия/врожденный порок; важное медицинское событие (по мнению исследователя), которое может представлять опасность для пациентов или может потребовать медицинского или хирургического вмешательства для предотвращения одного из других исходов, перечисленных выше (например, интенсивное лечение в отделении неотложной помощи или дома аллергического бронхоспазма или дискразий крови или судорог, которые не приводят к госпитализации). Госпитализация - это официальная госпитализация. Госпитализация или продление госпитализации являются критериями серьезности НЯ; однако сама по себе она не считается СНЯ. При отсутствии НЯ участвующий исследователь не должен регистрировать госпитализацию или продление госпитализации как НЯ. Это может иметь место в следующих ситуациях: госпитализация или продление госпитализации необходимо для процедуры, требуемой протоколом; или госпитализация или продление госпитализации является частью стандартной процедуры, проводимой центром (например, удаление стента после операции). Это должно быть записано в файле исследования. Госпитализация для планового лечения ранее существовавшего состояния, которое не ухудшилось во время исследования, не считается НЯ.

Осложнения, возникающие во время госпитализации, являются НЯ. Если осложнение продлевает госпитализацию или соответствует любому из других критериев СНЯ, то событие является СНЯ.

В контексте настоящего описания термин "энцефалит" относится к воспалению головного мозга, которое может быть результатом инфекционных и неинфекционных причинных факторов. В контексте настоящего описания термин "менингоэнцефалит" относится к состоянию, характеризующемуся инфекцией или воспалением мозговых оболочек и головного мозга. Диагноз энцефалит или менингоэнцефалит может быть установлен методами, известными специалистам в данной области, с учетом настоящего раскрытия, например, клиническими, неврологическими и психиатрическими обследованиями, отбором биологических образцов, включая образцы крови и спинномозговой жидкости, МРТ сканированием и электроэнцефалографией (ЭЭГ).

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 перемежается между многочисленными, наподобие лука, оболочками липидных бислоев, образуя многослойные липидные везикулы (MLV), либо содержится в аморфной центральной полости. Липидные везикулы, имеющие аморфную центральную полость, представляют собой однослойные липидные везикулы, т.е. пузырьки 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 нм.

В контексте настоящего описания термин "Тау" или "белок Тау", также известный как ассоциированный с микротрубочками белок Тау, MAPT, белок, образующий нейрофибрилярные клубки, белок Тау с парными спиральными нитями, PHF Тау, MAPTL, MTBT1, относится к распространенному в центральной и периферической нервной системе белку, имеющему несколько изоформ. В центральной нервной системе (ЦНС) человека существует шесть основных изоформ белка Тау размером от 352 до 441 аминокислоты, образуемых в результате альтернативного сплайсинга (Hanger et al., Trends Mol Med. 15:112-9, 2009). Примеры белка Тау включают, без ограничения, изоформы белка Тау в ЦНС, такие как самая длинная изоформа белка Тау, состоящая из 441 аминокислоты (4R2N), также называемая изофор-

мой 2 ассоциированного с микротрубочками белка Тау, которая имеет четыре повтора и две вставки, например изоформа 2 белка Тау человека, имеющая аминокислотную последовательность, представленную в GenBank Accession No. NP_005901.2. Другие примеры белка Тау включают самую короткую (фетальную) изоформу (3R0N), состоящую из 352 аминокислот, также называемую изоформой 4 ассоциированного с микротрубочками Тау, которая имеет три повтора и не содержит вставок, например изоформа 4 белка Тау человека, имеющая аминокислотную последовательность, представленную в GenBank Accession No. NP_058525.1. Примеры белка Тау также включают изоформу "большого Тау", экспрессируемую в периферических нервах, которая содержит 300 дополнительных остатков (экзон 4а). Friedhoff et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 1502(2000) 122-132. Примеры белка Тау включают большой белок Тау человека, который представляет собой белок длиной 758 аминокислот, кодируемый транскриптом мРНК длиной 6762 нуклеотида (NM_016835.4), или его изоформу. Аминокислотная последовательность приведенного в качестве примера большого белка Тау человека представлена в GenBank Accession No. NP_058519.3. В контексте настоящего описания термин "Тау" включает гомологи белка Тау из видов, отличных от человека, таких как *Mascas Fascicularis* (яванский макак), макак-резус или *Pan troglodytes* (шимпанзе). Используемый в настоящем описании термин "Тау" включает белки, содержащие мутации, например точечные мутации, фрагменты, вставки, делеции и варианты сплайсинга полноразмерного белка Тау дикого типа. Термин "Тау" также включает посттрансляционные модификации аминокислотной последовательности белка Тау. Посттрансляционные модификации включают, без ограничения, фосфорилирование.

В контексте настоящего описания термин "пептид" или "полипептид" относится к полимеру, состоящему из аминокислотных остатков, родственных природных структурных вариантов и его синтетических неприродных аналогов, связанных пептидными связями. Термин относится к пептиду любого размера, структуры или функции. Обычно пептид состоит по меньшей мере из трех аминокислот. Пептид может быть природным, рекомбинантным, синтетическим или любой их комбинацией. Синтетические пептиды можно синтезировать, например, с помощью автоматического синтезатора полипептидов. Примеры пептидов Тау включают любой пептид белка Тау длиной от приблизительно 5 до приблизительно 30 аминокислот, предпочтительно от приблизительно 10 до приблизительно 25 аминокислот, более предпочтительно от приблизительно 16 до приблизительно 21 аминокислоты. В настоящем описании пептиды перечислены в направлении от N к C-концу с использованием стандартной трех- или однобуквенной аббревиатуры аминокислот, где фосфорные остатки обозначены буквой "p". Примеры пептидов Тау, используемых в настоящем изобретении, включают, без ограничения, пептиды Тау, содержащие аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-12, или пептиды Тау, имеющие аминокислотную последовательность, которая идентична аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 1-12 на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90% или 95%.

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.

Пептиды Тау по настоящему изобретению можно синтезировать с помощью твердофазного пептидного синтеза или систем экспрессии рекомбинантных белков. Автоматические синтезаторы пептидов являются коммерчески доступными от множества поставщиков, таких как Applied Biosystems (Foster City, Calif.). Системы экспрессии рекомбинантных белков 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 2-е изд., 1989).

Согласно конкретным вариантам осуществления липосома содержит один или более пептидов Тау. Согласно конкретным вариантам осуществления пептиды Тау в липосомах могут быть одинаковыми или разными. В 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 идентична аминокислотной последовательности одной из SEQ ID NO: 1-12 на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90% или 95%, причем ни один из аминокислотных остатков не является фосфорилированным, или один или более аминокислотных остатков являются фосфорилированными.

Согласно конкретным вариантам осуществления один или более пептидов Тау представляют собой фосфопептиды 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 идентична аминокислотной последовательности одной из SEQ ID NO: 1-3 или 5-12 на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 95%, причем один или более указанных аминокислотных остатков являются фосфорилированными. Предпочтительно фосфопептид Тау содержит аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 1-3. C-конец пептида Тау может быть амидирован.

Согласно вариантам осуществления заявка пептид Тау презентирован на поверхности липосомы.

Пептид Тау, предпочтительно фосфопептид Тау, может быть презентирован на поверхности липосомы способами, известными в данной области техники, с учетом настоящего раскрытия. См., например, соответствующее раскрытие патентов США №№ 8,647,631 и 9,687,447 и международной патентной заявки № PCT/US 18/57286, 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 додецил модификация, которые позволяют презентировать пептиды 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, 22 апреля 2011 г.). Не ограничиваясь какой-либо теорией, считается, что добавление гидрофобных фрагментов на обоих концах может усилить патологическую конформацию бета-слоя пептида Тау. Таким образом, один или более пептидов Тау дополнительно содержат гидрофобные фрагменты на обоих концах. С-конец модифицированного пептида Тау может быть амидирован. Предпочтительно пептид Тау, презентированный на поверхности липосомы, состоит из аминокислотной последовательности одной из SEQ ID NO: 27 - SEQ ID NO: 38.

Примеры Тау липосом, применимых для настоящего изобретения, включают, без ограничения, Тау липосомы, описанные в патентах США №№8,647,631 и 9,687,447, и международной заявке на патент № PCT/US18/57286, описание каждого из которых включено в настоящее описание во всей своей полноте посредством ссылки.

В контексте настоящего описания термин "эффективное количество" относится к количеству активного ингредиента или компонента, которое вызывает желаемый биологический или лекарственный ответ у субъекта. Выбор конкретной эффективной дозы может быть определен (например, в ходе клинических испытаний) специалистами в данной области техники на основании рассмотрения нескольких факторов, включая заболевание, подлежащее лечению или профилактике, 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 способа введения, пути введения, целевого участка, физиологического состояния пациента, других вводимых лекарственных средств и тяжести заболевания, и ее следует определять в соответствии с заключением практикующего врача и обстоятельств каждого пациента. Например, эффективное количество фосфопептида Тау также зависит от того, вводится ли также адъювант, причем в отсутствие адъюванта требуются более высокие дозировки. Эффективные дозы можно экстраполировать из кривых доза-ответ, полученных из тест-систем *in vitro* или на моделях животных.

Согласно вариантам осуществления заявки эффективное количество липосом содержит количество фосфопептида Тау, достаточное для повышения уровня антител к антифосфорилированному Тау, не вызывая серьезных нежелательных явлений, таких как энцефалит. В конкретных вариантах осуществления эффективное количество липосом содержит фосфопептид Тау в количестве от приблизительно 25 нмоль до приблизительно 750 нмоль на дозу, например от приблизительно 29,7 нмоль до приблизительно 742,5 нмоль на дозу, предпочтительно от приблизительно 90 нмоль до приблизительно 715 нмоль на дозу, например от приблизительно 89,1 нмоль до приблизительно 712,8 нмоль на дозу, или от приблизительно 90 нмоль до приблизительно 535 нмоль на дозу, например от приблизительно 89,1 нмоль до приблизительно 534,6 нмоль на дозу, или от приблизительно 90 нмоль до приблизительно 275 нмоль на дозу, например от приблизительно 89,1 нмоль до приблизительно 267,3 нмоль на дозу. Количество вводимого фосфопептида Тау также может быть выражено по массе. Например, 29,7 нмоль на дозу соответствует 100 мкг на дозу тетрапальмитоилированного фосфопептида Тау, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28, 742,5 нмоль на дозу соответствует 2500 мкг на дозу тетрапальмитоилированного фосфопептида Тау, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28, 89,1 нмоль на дозу соответствует 300 мкг на дозу тетрапальмитоилированного фосфопептида Тау, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28, 712,8 нмоль на дозу соответствует 2400 мкг на дозу тетрапальмитоилированного фосфопептида Тау, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28, и 534,6 нмоль на дозу соответствует 1800 мкг на дозу тетрапальмитоилированного фосфопептида Тау, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28. Тетрапальмитоилированный фосфопептид Тау имеет четыре липидные цепи, благодаря которым возможна презентация фосфопептида Тау на поверхности липосом. Дозы 300, 900, 1800 мкг тетрапальмитоилированного фосфопептида Тау, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28, соответствуют 169, 508, 1016 мкг, соответственно, соответствующего "голого" пептида, не содержащего липидные цепи.

Согласно вариантам осуществления заявки эффективное количество липосом содержит фосфопептид Тау в количестве от приблизительно 25 нмоль до приблизительно 750 нмоль на дозу, например приблизительно 25 нмоль, приблизительно 30 нмоль, приблизительно 35 нмоль, приблизительно 40 нмоль, приблизительно 45 нмоль, приблизительно 50 нмоль, приблизительно 55 нмоль, приблизительно 60 нмоль, приблизительно 65 нмоль, приблизительно 70 нмоль, приблизительно 75 нмоль, приблизительно 80 нмоль, приблизительно 85 нмоль, приблизительно 90 нмоль, приблизительно 95 нмоль, приблизительно

100 нмоль, приблизительно 125 нмоль, приблизительно 150 нмоль, приблизительно 175 нмоль, приблизительно 200 нмоль, приблизительно 225 нмоль, приблизительно 250 нмоль, приблизительно 275 нмоль, приблизительно 300 нмоль, приблизительно 325 нмоль, приблизительно 350 нмоль, приблизительно 375 нмоль, приблизительно 400 нмоль, приблизительно 425 нмоль, приблизительно 450 нмоль, приблизительно 475 нмоль, приблизительно 500 нмоль, приблизительно 525 нмоль, приблизительно 550 нмоль, приблизительно 575 нмоль, приблизительно 600 нмоль, приблизительно 625 нмоль, приблизительно 650 нмоль, приблизительно 675 нмоль, приблизительно 700 нмоль, приблизительно 725 нмоль, приблизительно 750 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.

Согласно вариантам осуществления заявки эффективное количество липосом содержит тетрапальмитоилированный фосфопептид Тау в количестве от 2500 мкг, от 300 мкг до 2400 мкг, от 300 мкг до 1800 мкг или от 300 мкг до 900 мкг на дозу, например 100 мкг, 150 мкг, 200 мкг, 250 мкг, 300 мкг, 400 мкг, 500 мкг, 600 мкг, 700 мкг, 800 мкг, 900 мкг, 1000 мкг, 1100 мкг, 1200 мкг, 1300 мкг, 1400 мкг, 1500 мкг, 1600 мкг, 1700 мкг, 1800 мкг, 1900 мкг, 2000 мкг, 2100 мкг, 2200 мкг, 2300 мкг, 2400 мкг или 2500 мкг на дозу.

Согласно вариантам осуществления заявки фосфопептид Тау презентирован на поверхности липосом. Согласно вариантам осуществления заявки фосфопептид Тау содержит 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.

Согласно другим вариантам осуществления изобретения эффективное количество липосом дополнительно содержит агонист толл-подобного рецептора 4 в количестве от 30 мкг до 900 мкг, предпочтительно от 100 мкг до 585 мкг на дозу. Например, эффективное количество липосом может содержать агонист толл-подобного рецептора 4 в количестве 30 мкг, 50 мкг, 100 мкг, 150 мкг, 200 мкг, 250 мкг, 300 мкг, 330 мкг, 360 мкг, 390 мкг, 420 мкг, 450 мкг, 480 мкг, 500 мкг, 520 мкг, 540 мкг, 560 мкг, 580 мкг, 600 мкг, 700 мкг, 800 мкг или 900 мкг на дозу.

Согласно вариантам осуществления изобретения толл-подобный рецептор 4 содержит 3D-(6-ацил) PHAD®.

Согласно другим вариантам осуществления заявки эффективное количество липосом дополнительно содержит эпитоп хелперных Т-клеток в количестве от 25 мкг до 625 мкг, предпочтительно от 75 мкг до 450 мкг на дозу. Например, эффективное количество липосом может содержать эпитоп хелперных Т-клеток в количестве 25 мкг, 50 мкг, 75 мкг, 100 мкг, 125 мкг, 150 мкг, 175 мкг, 200 мкг, 225 мкг, 250 мкг, 275 мкг, 300 мкг, 325 мкг, 350 мкг, 375 мкг, 400 мкг, 425 мкг, 450 мкг, 475 мкг, 500 мкг, 525 мкг, 550 мкг, 575 мкг, 600 мкг или 625 мкг на дозу.

Согласно другим вариантам осуществления заявки эффективное количество липосом дополнительно содержит эпитоп хелперных Т-клеток в количестве от приблизительно 3 нмоль до приблизительно 105 нмоль на дозу, например приблизительно 4 нмоль, приблизительно 5 нмоль, приблизительно 6 нмоль, приблизительно 7 нмоль, приблизительно 8 нмоль, приблизительно 9 нмоль, приблизительно 10 нмоль, приблизительно 15 нмоль, приблизительно 20 нмоль, приблизительно 25 нмоль, приблизительно 30 нмоль, приблизительно 35 нмоль, приблизительно 40 нмоль, приблизительно 45 нмоль, приблизительно 50 нмоль, приблизительно 55 нмоль, приблизительно 60 нмоль, приблизительно 65 нмоль, приблизительно 70 нмоль, приблизительно 75 нмоль, приблизительно 80 нмоль, приблизительно 85 нмоль, приблизительно 90 нмоль, приблизительно 95 нмоль, приблизительно 100 нмоль или приблизительно 105 нмоль на дозу.

Согласно вариантам осуществления заявки эпитоп хелперных Т-клеток представляет собой эпитоп хелперных Т-клеток T50, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13, эпитоп хелперных Т-клеток T46, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14, эпитоп хелперных Т-клеток T48, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15, эпитоп хелперных Т-клеток T51, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16, или эпитоп хелперных Т-клеток T52, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17, предпочтительно эпитоп хелперных Т-клеток представляет собой эпитоп хелперных Т-клеток T50, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13.

В некоторых вариантах осуществления эффективное количество липосом дополнительно содержит липидированный олигонуклеотид CpG в количестве от 50 мкг до 1250 мкг, предпочтительно от 150 мкг до 800 мкг на дозу. Например, эффективное количество липосом может содержать липидированный олигонуклеотид CpG в количестве 50 мкг, 100 мкг, 150 мкг, 200 мкг, 250 мкг, 300 мкг, 350 мкг, 400 мкг, 450 мкг, 500 мкг, 550 мкг, 600 мкг, 650 мкг, 700 мкг, 750 мкг, 800 мкг, 850 мкг, 900 мкг, 950 мкг, 1000 мкг, 1050 мкг, 1100 мкг, 1200 мкг или 1250 мкг на дозу.

Согласно вариантам осуществления заявки липидированный олигонуклеотид CpG представляет собой олигонуклеотид CpG, содержащий нуклеотидную последовательность одной из SEQ ID NO: 18-22,

предпочтительно липидированный олигонуклеотид CpG представляет собой олигонуклеотид CpG, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 18. Согласно вариантам осуществления заявки липидированный олигонуклеотид CpG представляет собой олигонуклеотид CpG, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 18, которая имеет одну или более фосфоротиоатных межнуклеотидных связей и ковалентно связана с холестерином через линкер, содержащий полиэтиленгликоль (ПЭГ).

Согласно вариантам осуществления эффективное количество липосом составляет 50 мкг, 100 мкг, 150 мкг, 200 мкг, 250 мкг, 300 мкг, 350 мкг, 400 мкг, 450 мкг, 500 мкг, 550 мкг, 600 мкг, 650 мкг, 700 мкг, 750 мкг, 800 мкг, 850 мкг, 900 мкг, 950 мкг, 1000 мкг, 1050 мкг, 1100 мкг, 1200 мкг или 1250 мкг на дозу олигонуклеотида CpG, ковалентно связанного с холестерином через линкер ПЭГ.

Согласно конкретным вариантам осуществления, человек нуждается в лечении нейродегенеративного заболевания, расстройства или состояния.

В контексте настоящего описания термин "нейродегенеративное заболевание, расстройство или состояние" включает любое нейродегенеративное заболевание, расстройство или состояние, известное специалистам в данной области техники, с учетом настоящего раскрытия. Примеры нейродегенеративных заболеваний, расстройств или состояний включают нейродегенеративные заболевания или расстройства, вызванные или связанные с образованием нейрофибриллярных поражений, таких 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 демонстрируют сосуществование белка Тау 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, церебральную амилоидную ангиопатию, связанную с прионом, черепно-мозговую травму, боковой амиотрофический склероз, гуамский комплекс паркинсонизм-деменция, болезнь моторных нейронов с нейрофибриллярными сплетениями не Гуам-типа, деменцию с зерном (аргирофильную зерновую болезнь), кортикобазальную дегенерацию, деменцию Леви, боковой амиотрофический склероз, диффузные нейрофибриллярные сплетения с кальцификацией, лобно-височную деменцию, предпочтительно лобно-височную деменцию с паркинсонизмом, связанным с хромосомой 17 (FTDP-17), лобно-височную долевою деменцию, болезнь Галлервордена-Шпатца, множественную системную атрофию, болезнь Ниманна-Пика тип С, болезнь Пика, прогрессирующий подкорковый глиоз, прогрессирующий надъядерный паралич, подострый склерозирующий панэнцефалит, деменцию с преобладанием нейрофибриллярных клубков, постэнцефалитный паркинсонизм, миотоническую дистрофию, хроническую травматическую энцефалопатию (СТЕ), первичную возрастную таупатию (РАТ), церебральную ангиопатию или деменцию с тельцами Леви (LBD). Согласно конкретным вариантам осуществления нейродегенеративное заболевание, расстройство или состояние представляет собой болезнь Альцгеймера или другую таупатию. Согласно предпочтительным вариантам осуществления нейродегенеративное заболевание, расстройство или состояние представляет собой болезнь Альцгеймера.

Клиническое течение болезни Альцгеймера можно разделить на стадии с прогрессирующей картиной когнитивных и функциональных нарушений. Этапы 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 каждого из которых включено в настоящее описание во всей своей полноте посредством ссылок.

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 или болезнь Альцгеймера от легкой до умеренной степени.

В некоторых вариантах осуществления у субъекта, нуждающегося в лечении головной мозг является амилоид-положительным, но у него еще не наблюдаются значительные когнитивные нарушения. Отложение амилоида в головном мозге может быть обнаружено с помощью методов, известных в данной области техники, таких как ПЭТ-сканирование, иммунопреципитация, масс-спектрометрия или другие методы.

В контексте настоящего описания термин "толл-подобный рецептор" или "TLR" относится к классу белков паттерн-распознающих рецепторов (PRR), которые играют ключевую роль во врожденном иммунном ответе. TLR распознают ассоциированные с патогенами молекулярные структуры (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 антиген-презентирующие дендритные клетки и фагоцитарные макрофаги. Существует по меньшей мере десять членов семейства TLR человека, TLR1 - TLR10, и по меньшей мере двенадцать членов семейства TLR мыши, TLR1 - TLR9 и TLR11 - TLR13; они различаются типами антигенов, которые распознают. Например, TLR4 распознает липополисахариды (LPS), компонент, присутствующий во многих грамотрица-

тельных бактериях, а также вирусные белки, полисахариды и эндогенные белки, такие как липопротейн низкой плотности, бета-дефензины и белок теплового шока; и TLR9 представляет собой чувствительный к нуклеотидам TLR, который активируется неметилованными одноцепочечными или двухцепочечными динуклеотидами цитозин-фосфат-гуанин (CpG), которых много в геномах прокариот, но которые редко встречаются 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 конечном итоге, это воспаление также активирует адаптивную иммунную систему, которая затем приводит к элиминации вторгшихся патогенов и инфицированных клеток.

В контексте настоящего описания термин "агонист" относится к молекуле, которая связывается с одним или более TLR и индуцирует рецептор-опосредованный ответ. Например, агонист может индуцировать, стимулировать, увеличивать, активировать, облегчать, усиливать или повышать регуляцию активности 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 лиганда природного рецептора. Агонисты могут быть гомологичны этим природным лигандам рецепторов по последовательности, конформации, заряду или другим характеристикам настолько, что они могут распознаваться рецепторами. Это распознавание может приводить к физиологическим и/или биохимическим изменениям внутри клетки, таким что 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 одно из: агониста толл-подобного рецептора 4 и агониста толл-подобного рецептора 9.

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, усиление продуцирования цитокинов и/или другой индикатор повышенной иммунной функции. В некоторых вариантах осуществления индукция иммунного ответа может включать усиление пролиферации В-клеток, выработку антиген-специфических антител, усиление пролиферации антиген-специфических Т-клеток, улучшение презентации антигена дендритными клетками и/или увеличение экспрессии определенных цитокинов, хемокинов и костимулирующих маркеров.

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 для изобретения, включают агонист TLR4, включая, без ограничения, монофосфориллипид А (MPLA). В контексте настоящего описания "монофосфориллипид А" или "MPLA" относится к модифицированной форме липида А, который является биологически активной частью эндотоксина, липополисахарида (LPS), грамотрицательных бактерий. MPLA менее токсичен, чем LPS, но сохраняет иммуностимулирующую активность. В качестве адъюванта вакцины MPLA стимулирует как клеточные, так и гуморальные ответы на вакцинный антиген. Примеры MPLA включают, без ограничения, 3-О-деацил-4'-монофосфориллипид А, монофосфорил-гексаацил-липид А, 3-деацил (синтетический) (также называемый 3D-(6-ацил) PHAD®), монофосфорил-3-деацил-липид А и их структурно родственные варианты. MPLA, полезный для изобретения, может быть получен с помощью способов, известных в данной области, или из коммерчески доступного 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. Согласно конкретным вариантам осуществления липосома, содержащая фосфопептид Тау и агонист толл-подобного рецептора 4, также содержит эпитоп хелперных Т-клеток, который способен связываться с большинством или всеми молекулами HLA DR (лейкоцитарный антиген человека, D-связанный). После этого эпитоп хелперных Т-клеток способен активировать CD⁺ Т-клетки и обеспечивать необходимые сигналы созревания и выживания Тау-специфическим В-клеткам. Тау липосомы можно использовать для генерации высококачественных антител к антигену рТау в схемах гомологичной или гетерологичной иммунизации с липосомами, используемыми в прайм- и/или буст-иммунизации.

В контексте настоящего описания термин "эпитоп Т-хелперной клетки" относится к полипептиду, содержащему эпитоп, который способен распознаваться хелперной Т-клеткой. Примеры эпитопов хелперных Т-клеток включают, без ограничения, столбнячный токсин (например, эпитопы P2 и P30, также называемые, соответственно, T2 и T30), поверхностный антиген гепатита В, холерный токсин В, токсин дифтерийный токсин, белок F вируса кори, главный белок наружной мембраны Chlamydia trachomatis, циркумспорозит T Plasmodium falciparum, антиген CS P. falciparum, триозофосфатизомеразу Schistosoma mansoni, Bordetella pertussis, Clostridium tetani, Pertusaria trachythallina, TraT Escherichia coli, геммаглоти-

нин вируса гриппа кишечной (НА).

В 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 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 меняться, 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. С-конец эпитопа хелперных Т-клеток может быть амидирован.

Согласно вариантам осуществления заявки эпитопы хелперных Т-клеток могут быть включены 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 липосоме.

Эпитоп хелперных Т-клеток может быть модифицирован применительно к его желаемому местоположению в липосомах способами, известными в данной области техники, с учетом настоящего раскрытия. Согласно конкретным вариантам осуществления эпитоп хелперных Т-клеток, применимый для изобретения, 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.

Согласно конкретным вариантам осуществления липосома, содержащая фосфопептид Тау и агонист толл-подобного рецептора 4, также содержит агонист толл-подобного рецептора 9. 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 для изобретения, включают агонист TLR9, включая, без ограничения, олигонуклеотиды CpG.

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 динуклеотиды цитозин-фосфат-гуанин (CpG) (т.е. цитозин (C), за которым следует гуанин (G)), связанные фосфатной связью или фосфодиэфирным остовом или другими межнуклеотидными связями.

Согласно конкретным вариантам осуществления олигонуклеотид CpG является липидированным, то есть конъюгированным (ковалентно связанным) с липидным фрагментом.

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, может значительно усиливать связывание с белками плазмы и, следовательно, увеличивать период полужизни гидрофильных молекул в циркулирующей крови. Кроме того, было показано, что связывание с определенными белками плазмы, такими как липопротеины, увеличивает захват в определенных тканях, экспрессирующих соответствующие рецепторы липопротеинов (например, LDL-рецептор, HDL-рецептор или фагоцитарный рецептор SR-B1). В частности, липидный фрагмент, конъюгированный с фосфопептидами и/или олигонуклеотидом CpG, позволяет закрепить указанные пептиды и/или олигонуклеотиды в мембране липосомы с помощью гидрофобного фрагмента.

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

В контексте настоящего описания термин "межнуклеотидная связь" относится к химической связи, соединяющей два нуклеотида через свои сахара, состоящие из атома фосфора и заряженной или ней-

тральной группы между соседними нуклеозидами. Примеры межнуклеотидной связи включают фосфодизфирную (po), фосфоротиоатную (ps), фосфородитиоатную (ps₂), метилфосфонатную (mp) и метилфосфоротиоатную (tp). Фосфоротиоатные, фосфородитиоатные, метилфосфонатные и метилфосфоротиоатные связи стабилизируют межнуклеотидные связи, в то время как фосфодизфирная связь представляет собой естественную межнуклеотидную связь. Фосфоротиоатные олигонуклеотиды обычно синтезируют в виде случайной рацемической смеси фосфоротиоатных связей Rp и Sp.

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) (SEQ ID NO: 18), CpG 1018 (SEQ ID NO: 19), CpG2395 (SEQ ID NO: 20), CpG2216 (SEQ ID NO: 21) или CpG2336 (SEQ ID NO: 22).

Олигонуклеотид CpG можно подвергнуть липидированию способами, известными в данной области техники, с учетом настоящего раскрытия. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид CpG ковалентно связан непосредственно с молекулой холестерина. В некоторых вариантах осуществления 3'-конец олигонуклеотида CpG ковалентно связан с молекулой холестерина через фосфатную связь, необязательно через линкер ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления 5'-конец олигонуклеотида CpG ковалентно связан с молекулой холестерина через фосфатную связь, необязательно через линкер ПЭГ. Другой липофильный фрагмент также может быть ковалентно связан с 5'- или 3'-концом олигонуклеотида CpG. Например, олигонуклеотид CpG может быть ковалентно связан с липидным якорем такой же длины, что и фосфолипиды из липосомы: одна цепь пальмитиновой кислоты (например, с использованием Pal-OH или аналогичной, активированной для связывания) или две пальмитиновые кислоты (например, с использованием 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-(сукцинил) или аналогичного, активированного для связывания), необязательно через линкер ПЭГ. См., например, соответствующее раскрытие в патенте США № 7,741,297, содержание которого включено в настоящее описание посредством ссылки. Длина ПЭГ может меняться, например, от 1 до 5 единиц ПЭГ.

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 не используется линкер. См., например, Ries et al., "Convenient synthesis and application of versatile nucleic acid lipid membrane anchors in the assembly and fusion of liposomes", *Org. Biomol. Chem.*, 2015, 13, 9673, соответствующее описание которого включено в настоящее описание посредством ссылки.

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

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'-гас-глицерина (DMPG) и холестерина.

Согласно конкретным вариантам осуществления липосома дополнительно содержит буфер. В изобретении можно использовать любой подходящий буфер, известный специалистам в данной области, с учетом настоящего раскрытия. В одном из вариантов осуществления липосома содержит забуференный фосфатном солевой раствор. Согласно конкретным вариантам осуществления буфер содержит гистидин и сахарозу.

Иллюстративная липосома, используемая в настоящем изобретении, включает тетрапальмитоилированный фосфопептид Тау (pTau-пептид T3, SEQ ID NO: 28), который презентирован на поверхности липосомы посредством двух пальмитиновых кислот на каждом конце пептида Тау; лиганд TLR-9, содержащий липидированный CpG (адъювант CpG7909-Chol; SEQ ID NO: 18), встроенный в липосомную мембрану посредством молекулы холестерина, ковалентно связанной с CpG через линкер ПЭГ; лиганд TLR-4 (монофосфориллипид А (например, 3D-(6-ацил) PHAD®)), встроенный в мембрану; инкапсулированный эпитоп хелперных Т-клеток (PAN-DR связывающее вещество T50; SEQ ID NO: 13); и 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DMPC), 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-[фосфорац-(1-глицерин)]натриевую соль (DMPG) и холестерин в качестве липидных компонентов липосомы.

Липосомы по настоящему изобретению могут быть получены способом, известным в данной области техники, с учетом настоящего раскрытия. Оптимальные соотношения каждого компонента липосом могут быть определены методами, известными специалистам в данной области, с учетом настоящего раскрытия.

Липосомы можно вводить подходящими способами для профилактического и/или терапевтического лечения. Согласно предпочтительным вариантам осуществления липосомы вводят путем подкожной или внутримышечной инъекции. Внутримышечную инъекцию чаще всего осуществляют в мышцы рук или ног.

В одном общем аспекте изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим терапевтически эффективное количество липосом вместе с фармацевтически приемлемым наполнителем и/или носителем. Фармацевтически приемлемые наполнители и/или носители хорошо известны в данной области (см. Remington's Pharmaceutical Science (15-е изд.), Mack Publishing Company, Easton, PA, 1980). Предпочтительный состав фармацевтической композиции зависит от предполагаемого способа введения и терапевтического применения. Композиции могут включать фармацевтически приемлемые нетоксичные носители или разбавители, которые определяют как несущие среды, обычно используемые для составления фармацевтических композиций для введения животным или человеку. Подбирают такой разбавитель, который не влияет 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.

Целевой антиген для вакцины находится в головном мозге, и мозг отделен от кровотока специальной клеточной структурой, называемой гематоэнцефалическим барьером (BBB). BBB ограничивает попадание веществ из кровотока в мозг. Это предотвращает попадание токсинов, микробов и т.д. в центральную нервную систему. BBB также имеет потенциально менее желательный эффект предотвращения эффективного проникновения иммунных медиаторов (таких как антитела) в интерстициальную и спинномозговую жидкость, окружающую мозг.

Приблизительно 0,1% антител, присутствующих в большом круге кровообращения, пересекают BBB и попадают в мозг. Это предполагает, что системные титры, индуцированные вакциной, нацеленной на антиген ЦНС, должны быть по меньшей мере в 1000 раз больше, чем минимальный эффективный титр, чтобы быть эффективными в мозге. Минимальные титры антител в сыворотке, необходимые для обеспечения позитивного эффекта, не всегда очевидны. Кроме того, необходимо учитывать не только количество, но и качество иммунного ответа (например, avidность) для безопасной и эффективной иммунотерапии, направленной на расстройство ЦНС, такое как нейродегенеративное заболевание, расстройство или состояние.

Следовательно, согласно конкретным вариантам осуществления фармацевтические композиции по настоящему изобретению дополнительно содержат один или более подходящих адъювантов для достижения желаемого иммунного ответа у субъекта. Подходящие адъюванты можно вводить до, после или одновременно с введением липосом. Предпочтительные адъюванты усиливают истинный ответ на иммуноген, не вызывая конформационных изменений иммуногена, влияющих на качественную форму ответа. Примерами адъювантов являются соли алюминия (квасцы), такие как гидроксид алюминия, фосфат алюминия и сульфат алюминия. Такие адъюванты можно использовать с другими специфическими иммуностимулирующими агентами или без них, такими как класс MPLA (3-де-О-ацилированный монофосфорилипид А (MPL™), монофосфорил-гексаацил-липид А, 3-деацил синтетический (3D-(6-ацил) PHAD®, PHAD™, PHAD®-504, 3D-PHAD®) липид А), 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-ацетил-нормурамил-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-ацетилглюкозамин-N-ацетилмурамил-L-Al-D-изоглу-L-Ala-дипальмитоксипропиламид (DTP-DPP) Theramide™) или другие компоненты бактериальной клеточной стенки. Эмульсии типа "масло-в-воде" включают состав MF59 (см. WO 90/14837), содержащий 5% сквалена, 0,5% твин-80 и 0,5% спан-85 (необязательно содержащий различные количества MTP-PE), приготовленный в виде субмикронных частиц с помощью микрофлюидайзера; SAF, содержащий 10% сквалена, 0,4% твин-80, 5% Pluronic блоксополимер L121 и thr-MDP, либо микрофлюидизированный в субмикронную эмульсию, либо полученный в виде эмульсии с частицами большего размера путем встряхивания; и адъювантную систему Ribit™ (RAS) (Ribi ImmunoChem, Hamilton, Mont.), содержащую 0,2% Твин-80 и один или более компонентов бактериальной клеточной стенки, выбранных из группы, состоящей из монофосфорилипид А (MPL™), трегалозодимиколата (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 колониальный-стимулирующий фактор (M-CSF) и фактор некроза опухоли (TNF).

В контексте настоящего описания термин "в комбинации" в контексте введения субъекту двух или более терапевтических средств относится к применению более чем одного терапевтического средства.

Использование термина "в комбинации" не ограничивает порядок, в котором терапевтические средства вводятся к субъекту. Например, первое терапевтическое средство (например, представленная в настоящем описании композиция) может быть введена (например, за 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 16 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель), до, одновременно или (например, через 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 16 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель) после введения субъекту второго терапевтического средства.

Время введения может меняться в значительных пределах от одного раза в сутки до одного раза в год и одного раза в десять лет. Типичный режим состоит из иммунизации с последующими повторными инъекциями через определенные промежутки времени, например, от 1 до 24 недель. Другой режим состоит из иммунизации с последующими повторными инъекциями через 1, 2, 4, 6, 8, 10 и 12 месяцев. Другой режим предполагает введение каждые два месяца пожизненно. В качестве альтернативы повторные инъекции могут быть нерегулярными, согласно показателям мониторинга иммунного ответа.

Специалисты в данной области легко поймут, что режимы введения праймирующих и бустерных доз могут быть скорректированы на основе измеренных иммунных ответов после введений. Например, бустерные композиции обычно вводят через несколько недель или месяцев после введения праймирующей композиции, например, приблизительно через 1 неделю или 2 недели, или 3 недели, или 4 недели, или 8 недель, или 16 недель, или 20 недель, или 24 недели, или 28 недель, или 32 недели, или 36 недель, или 40 недель, или 44 недели, или 48 недель, или 52 недели, или 56 недель, или 60 недель, или 64 недели, или 68 недель, или 72 недель, или 76 недель, или одного-двух лет после введения праймирующей композиции.

Согласно конкретным аспектам, можно выполнить одну или более бустерных иммунизаций. Антигены в соответствующих праймирующих и бустерных композициях, несмотря на использование большого количества бустерных композиций, не обязательно должны быть идентичными, но должны иметь общие антигенные детерминанты или быть в значительной степени похожими друг на друга.

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

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения введение пептида Тау путем введения 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 агрегатов родственных Тау, замедляя прогрессирование поведения, связанного с Тау-патологией, и/или обеспечивая лечение лежащей в основе таупатии.

Тау представляет собой "собственный" белок человека. Это означает, что, в принципе, все лимфоциты, несущие рецептор, специфичный для белка Тау, должны быть удалены во время развития (центральная толерантность) или стать невосприимчивыми посредством механизма периферической толерантности. Эта проблема оказалась серьезным препятствием на пути к разработке вакцин против собственных или "измененных собственных" белков (например, опухолевых антигенов). Создание высококачественных антител к антигену (собственному или инфекционному) требует действия не только В-лимфоцитов, которые продуцируют антитело, но также и хелперных CD4⁺ Т-лимфоцитов. CD4⁺ Т-клетки обеспечивают критические сигналы выживания и созревания для В-лимфоцитов, а животные с дефицитом CD4⁺ Т-клеток являются в значительной степени иммуносупрессированными. CD4⁺ Т-клетки также подвержены механизмам толерантности, и дополнительным препятствием для создания сильных ответов аутореактивных (например, против белка Тау) антител является то, что Тау-реактивные CD4⁺ Т-клетки также, вероятно, будут редкими или отсутствовать в репертуаре человека/животного.

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 Т-клеточного эпитопа или иммуногенного носителя.

В данном контексте поведенческий фенотип, связанный с Тау-патологией, включает, без ограничения, когнитивные расстройства, раннее изменение личности и расторможенность, апатию, абулию, мутизм, апраксию, персеверацию, стереотипные движения/поведение, гипероральность, дезорганизацию, неспособность планировать или организовать последовательные задания, эгоизм/черствость, антисоциальные черты, отсутствие эмпатии, сбивчивость, аграмматическая 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 взгляда, "прямоугольные" подергивания, медленные вертикальные саккады, псевдобульбарный паралич, апраксию конечностей, дистонию, потерю чувствительности коры головного мозга и тремор.

При осуществлении способов по настоящему изобретению в соответствии с конкретными вариан-

тами осуществления изобретения предпочтительно выбирать субъекта, имеющего или подверженного риску развития болезни Альцгеймера или другой таупатии, субъекта, имеющего агрегаты белка Тау в головном мозге, или субъекта, демонстрирующего поведенческий фенотип, связанный с клубками, до введения иммуногенных пептидов или антител по настоящему изобретению. Субъекты, поддающиеся лечению, включают людей с риском развития заболевания, у которых еще не проявлены симптомы, а также пациентов, у которых уже проявлены симптомы. В случае болезни Альцгеймера практически любой человек подвержен риску развития болезни Альцгеймера. Следовательно, настоящие способы можно применять для профилактики среди населения в целом без необходимости какой-либо оценки риска для рассматриваемого пациента. Способы по изобретению особенно полезны для людей, имеющих известный генетический риск развития болезни Альцгеймера. К таким лицам относятся те, у кого имеются родственники, перенесшие это заболевание, и те, риск которых определен анализом генетических или биохимических маркеров. В предпочтительных вариантах осуществления субъект нуждается в лечении болезни Альцгеймера, предпочтительно болезнью Альцгеймера на ранней стадии, легкого когнитивного нарушения (МСИ), вызванного болезнью Альцгеймера, болезни Альцгеймера легкой степени или болезни Альцгеймера от легкой до умеренной степени.

У бессимптомных пациентов лечение можно начинать в любом возрасте (например, 10, 20, 30 лет). Однако обычно 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.

В профилактических целях фармацевтические композиции, содержащие пептиды Тау, вводят пациенту, предрасположенному к болезни Альцгеймера или другой таупатии или имеющему риск развития другого заболевания, в количестве, достаточном для устранения или уменьшения риска его развития, уменьшения степени тяжести или задержки развития начала заболевания, включая биохимические, гистологические и/или поведенческие симптомы заболевания, его осложнения и промежуточные патологические фенотипы, проявляемые во время развития заболевания. В терапевтических целях фармацевтические композиции, содержащие пептид Тау, вводят пациенту с подозрением на такое заболевание или уже страдающему таким 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 в развитии заболевания.

При желании композиция может быть представлена в наборе, упаковке или дозаторе, которые могут содержать одну или несколько единичных дозированных форм, содержащих активный ингредиент. Набор, например, может включать металлическую или пластиковую фольгу, такую как блистерная упаковка. К набору, упаковке или дозатору могут прилагаться инструкции по применению.

Варианты осуществления

Также представлены следующие неограничивающие варианты осуществления изобретения.

Вариант 1 осуществления представляет собой способ индукции антител к фосфорилированному Тау без индукции серьезного нежелательного явления у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества липосом, содержащих фосфопептид Тау, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 12, в количестве от приблизительно 25 нмоль до приблизительно 750 нмоль на дозу, предпочтительно от приблизительно 90 нмоль до приблизительно 715 нмоль на дозу, от приблизительно 90 нмоль до приблизительно 535 нмоль на дозу или от приблизительно 90 нмоль до приблизительно 275 нмоль на дозу, например приблизительно 25 нмоль, приблизительно 30 нмоль, приблизительно 35 нмоль, приблизительно 40 нмоль, приблизительно 45 нмоль, приблизительно 50 нмоль, приблизительно 55 нмоль, приблизительно 60 нмоль, приблизительно 65 нмоль, приблизительно 70 нмоль, приблизительно 75 нмоль, приблизительно 80 нмоль, приблизительно 85 нмоль, приблизительно 90 нмоль, приблизительно 95 нмоль, приблизительно 100 нмоль, приблизительно 125 нмоль, приблизительно 150 нмоль, приблизительно 175 нмоль, приблизительно 200 нмоль, приблизительно 225 нмоль, приблизительно 250 нмоль, приблизительно 275 нмоль, приблизительно 300 нмоль, приблизительно 325 нмоль, приблизительно 350 нмоль, приблизительно 375 нмоль, приблизительно 400 нмоль, приблизительно 425 нмоль, приблизительно 450 нмоль, приблизительно 475 нмоль, приблизительно 500 нмоль, приблизительно 525 нмоль, приблизительно 550 нмоль, приблизительно 575 нмоль, приблизительно 600 нмоль, приблизительно 625 нмоль, приблизительно 650 нмоль, приблизительно 675 нмоль, приблизительно 700 нмоль, приблизительно 725 нмоль, приблизительно 750 нмоль на дозу или любое промежуточное количество, и агонист толл-подобного рецептора 4, где фосфопептид Тау презентирован на поверхности липосомы.

Вариант осуществления 1а представляет собой способ индукции антител к фосфорилированному белку Тау без индукции энцефалита у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества липосом, содержащих от 100 мкг до 2500 мкг, предпочтительно от 300 мкг до 2400 мкг, 300 мкг до 1800 мкг или от 300 мкг до 900 мкг на дозу, например 100 мкг, 150 мкг, 200 мкг,

250 мкг, 300 мкг, 400 мкг, 500 мкг, 600 мкг, 700 мкг, 800 мкг, 900 мкг, 1000 мкг, 1100 мкг, 1200 мкг, 1300 мкг, 1400 мкг, 1500 мкг, 1600 мкг, 1700 мкг, 1800 мкг, 1900 мкг, 2000 мкг, 2100 мкг, 2200 мкг, 2300 мкг, 2400 мкг, 2500 мкг или любое промежуточное количество на дозу тетрапальмитоилированного фосфопептида Тау, презентированного на поверхности липосом, и агониста толл-подобного рецептора 4, где фосфопептид Тау содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 12.

Вариант осуществления 2 представляет собой способ по варианту осуществления 1 или 1а, где фосфопептид Тау состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27 - SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 31 - SEQ ID NO: 38.

Вариант осуществления 3а представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 1-2, где фосфопептид Тау состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 27.

Вариант осуществления 3б представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 1-2, где фосфопептид Тау состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28.

Вариант осуществления 3с представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 1-2, где фосфопептид Тау состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29.

Вариант осуществления 3д представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 1-2, где фосфопептид Тау состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 31.

Вариант осуществления 3е представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 1-2, где фосфопептид Тау состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 32.

Вариант осуществления 3ф представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 1-2, где фосфопептид Тау состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 33.

Вариант осуществления 3г представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 1-2, где фосфопептид Тау состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 34.

Вариант осуществления 3г представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 1-2, где фосфопептид Тау состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 34.

Вариант осуществления 3и представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 1-2, где фосфопептид Тау состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 35.

Вариант осуществления 3и представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 1-2, где фосфопептид Тау состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 35.

Вариант осуществления 3к представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 1-2, где фосфопептид Тау состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 38.

Вариант осуществления 4 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 1-3к, где липосомы вводят подкожно.

Вариант осуществления 5 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 1-3к, где липосомы вводят внутримышечно.

Вариант осуществления 6 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 1-5, дополнительно включающий введение субъекту второй дозы эффективного количества липосом через 1-24 недели после первоначального введения.

Вариант осуществления 7 представляет собой способ по любому из вариантов 1-6, где липосома дополнительно содержит по меньшей мере одно из следующего: эпитопа хелперных Т-клеток и липидированного олигонуклеотида CpG, предпочтительно эпитоп хелперных Т-клеток и липидированный олигонуклеотид CpG.

Вариант осуществления 7а представляет собой способ по варианту осуществления 7, где эффективное количество липосом содержит агонист толл-подобного рецептора 4 в количестве от 30 мкг до 900 мкг, предпочтительно от 100 мкг до 585 мкг, например 30 мкг, 50 мкг, 100 мкг, 150 мкг, 200 мкг, 250 мкг, 300 мкг, 330 мкг, 360 мкг, 390 мкг, 420 мкг, 450 мкг, 480 мкг, 500 мкг, 520 мкг, 540 мкг, 560 мкг, 580 мкг, 600 мкг, 700 мкг, 800 мкг или 900 мкг или любое промежуточное количество на дозу.

Вариант осуществления 7б представляет собой способ по варианту осуществления 7 или 7а, где агонист толл-подобного рецептора 4 представляет собой монофосфорил-гексаацил-липид А, 3-деацил.

Вариант осуществления 7с представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 7-7б, где эффективное количество липосом содержит эпитоп хелперных Т-клеток в количестве от 25 мкг до 625 мкг, предпочтительно от 75 мкг до 450 мкг, например 25 мкг, 50 мкг, 75 мкг, 100 мкг, 125 мкг, 150 мкг, 175 мкг, 200 мкг, 225 мкг, 250 мкг, 275 мкг, 300 мкг, 325 мкг, 350 мкг, 375 мкг, 400 мкг, 425 мкг, 450 мкг, 475 мкг, 500 мкг, 525 мкг, 550 мкг, 575 мкг, 600 мкг или 625 мкг или любое промежуточное количество на дозу.

Вариант осуществления 7д представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 7-7с, где эпитоп хелперных Т-клеток представляет собой эпитоп хелперных Т-клеток Т50, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13, эпитоп хелперных Т-клеток Т46, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14, эпитоп хелперных Т-клеток Т48, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15, эпитоп хелперных Т-клеток Т51, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16, или эпитоп хелперных Т-клеток Т52, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17.

Вариант осуществления 7e представляет собой способ по варианту осуществления 7d, где эпитоп хелперных Т-клеток представляет собой эпитоп хелперных Т-клеток T50, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13.

Вариант осуществления 7f представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 7-7e, где эффективное количество липосом содержит липидированный олигонуклеотид CpG в количестве от 50 мкг до 1250 мкг, предпочтительно от 150 мкг до 800 мкг, например, 50 мкг, 100 мкг, 150 мкг, 200 мкг, 250 мкг, 300 мкг, 350 мкг, 400 мкг, 450 мкг, 500 мкг, 550 мкг, 600 мкг, 650 мкг, 700 мкг, 750 мкг, 800 мкг, 850 мкг, 900 мкг, 950 мкг, 1000 мкг, 1050 мкг, 1100 мкг, 1200 мкг или 1250 мкг или любое промежуточное количество на дозу.

Вариант осуществления 8 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 7-7f, где липидированный олигонуклеотид CpG имеет нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18 - SEQ ID NO: 22.

Вариант осуществления 9a представляет собой способ по варианту осуществления 8, где олигонуклеотид CpG имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 18.

Вариант осуществления 9b представляет собой способ по варианту осуществления 8, где олигонуклеотид CpG имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 19.

Вариант осуществления 9c представляет собой способ по варианту осуществления 8, где олигонуклеотид CpG имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20.

Вариант осуществления 9d представляет собой способ по варианту осуществления 8, где олигонуклеотид CpG имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 21.

Вариант осуществления 9e представляет собой способ по варианту осуществления 8, где олигонуклеотид CpG имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 22.

Вариант осуществления 10 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 8-9e, где олигонуклеотид CpG имеет одну или более фосфоротиоатных межнуклеотидных связей.

Вариант осуществления 11 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 8-10, где олигонуклеотид CpG ковалентно связан с по меньшей мере одной липофильной группой.

Вариант осуществления 11a представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 8-10, где олигонуклеотид CpG ковалентно связан с по меньшей мере одной липофильной группой через линкер ПЭГ.

Вариант осуществления 12 представляет собой способ по варианту осуществления 11 или 11a, где олигонуклеотид CpG ковалентно связан с группой холестерина.

Вариант осуществления 12a представляет собой способ по варианту осуществления 12, где олигонуклеотид CpG ковалентно связан с группой холестерина через линкер ПЭГ.

Вариант 13 осуществления представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 1-12a, где 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'-гас-глицерина (DMPG) и холестерина.

Вариант осуществления 14 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 1-13, где эпитоп хелперных Т-клеток содержит по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23 - SEQ ID NO: 26.

Вариант осуществления 15 представляет собой способ по варианту осуществления 14, где эпитоп хелперных Т-клеток содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 25.

Вариант осуществления 16 представляет собой способ по варианту осуществления 14 или 15, где эпитоп хелперных Т-клеток содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13-17 и 39-44.

Вариант осуществления 17 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 1-16, где агонист толл-подобного рецептора 4 представляет собой монофосфорилипид А (MPLA).

Вариант осуществления 18 представляет собой способ индукции антител к фосфорилированному белку Тау без индукции серьезного нежелательного явления у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества липосом, содержащих от приблизительно 25 нмоль до приблизительно 750 нмоль, предпочтительно от приблизительно 90 нмоль до около 715 нмоль на дозу или от приблизительно 90 нмоль до приблизительно 535 нмоль на дозу, или от приблизительно 90 нмоль до приблизительно 275 нмоль на дозу, например приблизительно 25 нмоль, приблизительно 30 нмоль, приблизительно 35 нмоль, приблизительно 40 нмоль, приблизительно 45 нмоль, приблизительно 50 нмоль, приблизительно 55 нмоль, приблизительно 60 нмоль, приблизительно 65 нмоль, приблизительно 70 нмоль, приблизительно 75 нмоль, приблизительно 80 нмоль, приблизительно 85 нмоль, приблизительно 90 нмоль, приблизительно 95 нмоль, приблизительно 100 нмоль, приблизительно 125 нмоль, приблизительно 150 нмоль, приблизительно 175 нмоль, приблизительно 200 нмоль, приблизительно 225 нмоль, приблизительно 250 нмоль, приблизительно 275 нмоль, приблизительно 300 нмоль, приблизительно 325 нмоль, приблизительно 350 нмоль, приблизительно 375 нмоль, приблизительно 400 нмоль, приблизительно 425 нмоль, приблизительно 450 нмоль, приблизительно 475 нмоль, приблизительно

500 нмоль, приблизительно 525 нмоль, приблизительно 550 нмоль, приблизительно 575 нмоль, приблизительно 600 нмоль, приблизительно 625 нмоль, приблизительно 650 нмоль, приблизительно 675 нмоль, приблизительно 700 нмоль, приблизительно 725 нмоль, приблизительно 750 нмоль или любое промежуточное количество на дозу или от 300 мкг до 2400 мкг, например от 300 мкг до 1800 мкг, или от 300 мкг до 900 мкг на дозу, например 100 мкг, 150 мкг, 200 мкг, 250 мкг, 300 мкг, 400 мкг, 500 мкг, 600 мкг, 700 мкг, 800 мкг, 900 мкг, 1000 мкг, 1100 мкг, 1200 мкг, 1300 мкг, 1400 мкг, 1500 мкг, 1600 мкг, 1700 мкг, 1800 мкг, 1900 мкг, 2000 мкг, 2100 мкг, 2200 мкг, 2300 мкг, 2400 мкг, 2500 мкг или любое промежуточное количество на дозу тетрапальмитоилированного фосфопептида Тау, презентированного на поверхности липосом, где фосфопептид Тау содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 12, и липосомы дополнительно содержат монофосфориллипид А (MPLA), 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DMPC), 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфорил-3'-гас-глицерин (DMPG), холестерин и буфер.

Вариант осуществления 18а представляет собой способ индукции антител к фосфорилированному белку Тау без индукции энцефалита у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества липосом, содержащих от приблизительно 25 нмоль до приблизительно 750 нмоль, предпочтительно от приблизительно 90 нмоль до приблизительно 715 нмоль на дозу или от приблизительно 90 нмоль до приблизительно 535 нмоль на дозу или от приблизительно 90 нмоль до приблизительно 275 нмоль на дозу, например приблизительно 25 нмоль, приблизительно 30 нмоль, приблизительно 35 нмоль, приблизительно 40 нмоль, приблизительно 45 нмоль, приблизительно 50 нмоль, приблизительно 55 нмоль, приблизительно 60 нмоль, приблизительно 65 нмоль, приблизительно 70 нмоль, приблизительно 75 нмоль, приблизительно 80 нмоль, приблизительно 85 нмоль, приблизительно 90 нмоль, приблизительно 95 нмоль, приблизительно 100 нмоль, приблизительно 125 нмоль, приблизительно 150 нмоль, приблизительно 175 нмоль, приблизительно 200 нмоль, приблизительно 225 нмоль, приблизительно 250 нмоль, приблизительно 275 нмоль, приблизительно 300 нмоль, приблизительно 325 нмоль, приблизительно 350 нмоль, приблизительно 375 нмоль, приблизительно 400 нмоль, приблизительно 425 нмоль, приблизительно 450 нмоль, приблизительно 475 нмоль, приблизительно 500 нмоль, приблизительно 525 нмоль, приблизительно 550 нмоль, приблизительно 575 нмоль, приблизительно 600 нмоль, приблизительно 625 нмоль, приблизительно 650 нмоль, приблизительно 675 нмоль, приблизительно 700 нмоль, приблизительно 725 нмоль, приблизительно 750 нмоль на дозу или любое промежуточное количество, или от 100 мкг до 2500 мкг или от 300 мкг до 2400 мкг, например от 300 мкг до 1800 мкг или от 300 мкг до 900 мкг на дозу, например, 100 мкг, 150 мкг, 200 мкг, 250 мкг, 300 мкг, 400 мкг, 500 мкг, 600 мкг, 700 мкг, 800 мкг, 900 мкг, 1000 мкг, 1100 мкг, 1200 мкг, 1300 мкг, 1400 мкг, 1500 мкг, 1600 мкг, 1700 мкг, 1800 мкг, 1900 мкг, 2000 мкг, 2100 мкг, 2200 мкг, 2300 мкг, 2400 мкг, 2500 мкг на дозу или любое промежуточное количество тетрапальмитоилированного фосфопептида Тау, презентированного на поверхности липосом, где фосфопептид Тау содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 12, и липосомы дополнительно содержат монофосфориллипид А (MPLA), 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DMPC), 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфорил-3'-гас-глицерин (DMPG), холестерин и буфер.

Вариант осуществления 19 представляет собой способ по варианту осуществления 18 или 18а, где липосомы дополнительно содержат эпитоп хелперных Т-клеток и олигонуклеотид CpG, ковалентно связанный с группой холестерина.

Вариант осуществления 19а представляет собой способ по варианту осуществления 19, где олигонуклеотид CpG ковалентно связан с группой холестерина через линкер ПЭГ.

Вариант осуществления 19b представляет собой способ по варианту осуществления 19 или 19а, где эпитоп хелперных Т-клеток содержит аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 25.

Вариант осуществления 19с представляет собой способ по варианту осуществления 19 или 19а, где эпитоп хелперных Т-клеток содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13-17 и 39-44.

Вариант осуществления 19d представляет собой способ по варианту осуществления 19 или 19а, где эпитоп хелперных Т-клеток содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39.

Вариант осуществления 19е представляет собой способ по варианту осуществления 19 или 19а, где эпитоп хелперных Т-клеток содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

Вариант осуществления 19f представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 19-19е, где олигонуклеотид CpG имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 18.

Вариант осуществления 19g представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 19-19е, где олигонуклеотид CpG имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 19.

Вариант осуществления 20а представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 18-19g, где фосфопептид Тау состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 27.

Вариант осуществления 20b представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 18-19g, где фосфопептид Тау состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28.

Вариант осуществления 20с представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 18-19g, где фосфопептид Тау состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29.

Вариант осуществления 21a представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 18-20с, где буфер содержит фосфатный буфер.

Вариант осуществления 21b представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 18-20с, где буфер содержит по меньшей мере одно из гистидина и сахарозы.

Вариант осуществления 22a представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 18-21b, где MPLA содержит монофосфорилилипид А (например, 3D-(6-ацил) PHAD®).

Вариант осуществления 23 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 1-22a, где субъект нуждается в лечении болезни Альцгеймера.

Вариант осуществления 24 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 1-22a, где субъект нуждается в профилактике болезни Альцгеймера.

Вариант осуществления 25 представляет собой способ по варианту осуществления 23, где субъект нуждается в лечении болезни Альцгеймера на ранней стадии, умеренного когнитивного нарушения (MCI), вызванного болезнью Альцгеймера, болезни Альцгеймера легкой степени или болезни Альцгеймера от легкой до умеренной степени.

Вариант осуществления 26 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 1-25, где субъект является человеком.

Примеры

Приведенные ниже примеры изобретения предназначены для дополнительной иллюстрации сущности изобретения. Следует понимать, что приведенные ниже примеры не ограничивают изобретение и что объем изобретения должен определяться прилагаемой формулой изобретения.

Все экспериментальные методы, используемые в приведенных ниже примерах, если не указано иное, являются обычными методами. Все реагенты, используемые в приведенных ниже вариантах осуществления, если не указано иное, закуплены у обычных поставщиков реагентов.

Во всех описанных ниже примерах ACI-35.030 представляет собой липосомальный состав в соответствии с вариантами осуществления изобретения, который содержит фосфорилированный пептид Тау, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, в количестве 1200 мкг/мл, MPLA (3D-(6-ацил) PHAD®), DMPC, DMPG, холестерин, эпитоп хелперных Т-клеток SEQ ID NO: 13 в концентрации 300 мкг/мл, олигонуклеотид CpG, ковалентно связанный с группой холестерина через линкер ПЭГ, и буфер, причем ACI-35 представляет собой липосомальный состав согласно вариантам осуществления изобретения, который содержит фосфорилированный пептид Тау, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, MPLA, DMPC, DMPG, холестерин и буфер.

Пример 1: Доза-ответ у мышей C57BL/6J на ACI-35.030.

Цель: оценить иммуногенность вакцины ACI-35.030 при внутримышечной инъекции самкам мышей C57BL/6.

Методы: схема исследования приведена в табл. 1.

Таблица 1

Схема исследования примера 1

Группа	Генотип	Мыши	Лечение	Путь введения	Теоретическая концентрация пептида на мышиную дозу
1	C57BL/6	10	ACI-35.030	Внутримышечно	80 мкг
2	C57BL/6	10	ACI-35.030	Внутримышечно	35 мкг

Дозу вводили 3 раза со следующими интервалами: в дни 1, 15 и 29.

Образцы крови для определения антител отбирали через следующие интервалы: в дни - 7, 8, 22 и 36.

Измеряли специфические ответы антител IgG, направленные против фосфорилированного пептида Тау (определенные с помощью ELISA).

Результаты/выводы:

Иммунизация целевой дозой 35 и 80 мкг Т3 в вакцине ACI-35.030 (1200:300) индуцировала антитела, направленные против пептида Т3.5, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 (см. фиг. 1).

Пример 2: Оценка ответа IgG, индуцированного вакцинами ACI-35.030 (тетрапальмитоилированный фосфопептид Тау Т3, MPLA (3D-(6-ацил) PHAD®) и CpG7909-Chol на поверхности липосом, с инкапсулированным Т50), у макак-резус.

Цели: Оценить иммуногенность вакцины ACI-35.030 (тетрапальмитоилированный фосфопептид Тау Т3, MPLA (3D-(6-ацил) PHAD®) и CpG7909-Chol на поверхности липосом, с инкапсулированным Т50), вводимой в виде подкожной или внутримышечной инъекции самцам и самкам макак-резус, для определения таким образом оптимального пути введения и концентрации вакцины.

Методы: схема исследования приведена в табл. 2.

Таблица 2

Схема исследования примера 2

Группы	Кол-во животных	Путь введения	Описание вакцины
			Теоретическое отношение пептидов (Т3:Т50) (в мкг/мл)
1	3♂ + 3♀ Макак-резус	подкожно	АСИ-35.030 неконцентрированная (Т3:Т50=400:400)
2	3♂ + 3♀ Макак-резус	подкожно	АСИ-35.030 неконцентрированная (Т3:Т50=1200:1200)
3	3♂ + 3♀ Макак-резус	внутримышечно	АСИ-35.030 неконцентрированная (Т3:Т50=1200:1200)

Теоретическая доза липосомальных вакцин содержала 1800 мкг тетрапальмитоилированного фосфопептида (Т3) и 1800 мкг пептида Т50 на животное.

Дозу вводили 4 раза со следующими интервалами: в дни 1, 29, 85 и 169. Образцы крови для определения антител отбирали через следующие интервалы: в дни - 14, 8, 22, 36, 50, 64, 78, 92, 106, 120, 134, 148, 162, 176 и 190.

Измеряли специфические ответы антител IgG, направленные против фосфорилированных и нефосфорилированных пептидов Тау (Т3,5 и Т3,6 соответственно; определенные с помощью ELISA), полно-размерного фосфобелка Тау (рТау) (определенные с помощью ELISA) и патологической формы белка Тау, выделенные из человеческого мозга пациента с болезнью Альцгеймера (PHF человека; определенные с помощью MSD). Клинические признаки (состояние здоровья, изменения поведения и т.д.) регистрировали у животных два раза в сутки на протяжении всего исследования, начиная со дня их поступления. Вес тела регистрировали у всех животных по меньшей мере один раз до начала лечения и ежедневно после начала лечения.

Результаты/выводы:

В целом, после иммунизации любым режимом вакцинации не наблюдались ни системные побочные эффекты, ни стойкая чувствительность кожи в месте инъекции.

Вакцина АСИ-35.030, как концентрированная (1200:1200) так и неконцентрированная (400:400), индуцировала аналогичные титры IgG к Т3.5 и IgG к человеческому PHF. При подкожном и внутримышечном введениях одного и того же вакцинного состава титры IgG к Т3.5 и IgG к человеческому PHF не показали никаких различий.

Пример 3: Изучение токсичности повторных доз после восьми подкожных инъекций АСИ-35 каждые две недели мышам C57BL/6 с последующим двухнедельным периодом без лечения (GLP).

Цель: оценить потенциальную токсичность АСИ-35 после подкожных инъекций каждые две недели в течение 14 недель у мышей C57BL/6. По завершении периода лечения указанных животных содержали в течение двухнедельного периода без лечения, чтобы оценить обратимость любых результатов. Кроме того, в ходе исследования оценивали иммуногенность АСИ-35.

Методы: схема исследования приведена в табл. 3.

Таблица 3

Схема исследования примера 3

Группа	Кол-во животных	Путь введения	Доза - объем (мкл/инъекция)	Доза-объем (мкг пептида/ инъекция)
1	18♂ + 18♀ мышей C57BL/6	подкожно	800	0 (PBS)
2	12♂ + 12♀ мышей C57BL/6		800	0 (АСИ-35-Empty*)
3	12♂ + 12♀ мышей C57BL/6		50	24
4	12♂ + 12♀ мышей C57BL/6		200	98
5	18♂ + 18♀ мышей C57BL/6		800	390

* = АСИ-35-Empty указывает на то, что введенная вакцина не содержит активного пептида Т3.

Дозу вводили восемь раз со следующими интервалами: в дни 1, 15, 29, 43, 57, 71, 85 и 99.

Образцы крови отбирали через следующие промежутки времени: недели - 2, 4, 6, 8, 19, 12, 14, 16 и 17. Последних 6♂ + 6♀ мышей из групп 1 и 5 в конце исследования содержали в течение двухнедель-

ного периода без лечения.

Результаты/выводы:

Повторная инъекция ACI-35-Empty или ACI-35 при самом высоком уровне дозы 390 мкг/инъекция вызывала уменьшение соотношения альбумин/глобулин (A/G) после восьми инъекций. Это изменение, которое обычно наблюдается у иммунизированных животных, может соответствовать приросту глобулиновой фракции (антител) в плазме, и это объясняется тем, что все животные, обработанные ACI-35, вырабатывали антитела (в классах IgM и IgG). Как правило, титры IgG были выше, чем титры IgM после повторных инъекций, и у самок наблюдалась тенденция к выработке более высокого уровня антител, чем у самцов.

В местах инъекций в группах, получавших ACI-35 в дозе 98 или 390 мкг пептида, наблюдали местные и временные реакции (утолщение). При этих дозах регистрировали увеличение веса селезенки и печени и уменьшение веса тимуса у обоих полов и увеличение веса почек только у самок. Макроскопические изменения наблюдали в местах инъекций в основном для ACI-35 в дозах 98 и 390 мкг/инъекция. Микроскопический анализ показал, что введение PBS-контроля, ACI-35-Empty или ACI-35 в дозе 24 мкг/инъекция хорошо переносилось без каких-либо реакций в месте инъекции. Пенистые макрофаги и мононуклеарные воспалительные инфильтраты, связанные с пустыми липосомами, наблюдали при всех уровнях доз с дозозависимой степенью тяжести, но не в контрольной группе PBS. Подострые воспалительные реакции с фиброзом и случайной дегенерацией/некрозом подкожной клетчатки были немного увеличены при применении ACI-35 в дозе 390 мкг/инъекция.

Введение ACI-35-Empty или ACI-35 в дозе 390 мкг/инъекция индуцировало экстрамедуллярный гемопоэз в селезенке и печени и увеличивало количество миелоидных клеток в костном мозге, что было связано с введением пустых липосом. Кроме того, во многих системных органах наблюдали инфильтраты мононуклеарных воспалительных клеток главным образом у самок при введении ACI-35 в дозе 390 мкг/инъекция и в меньшей степени при ACI-35-Empty. Это явление рассматривали как форму ответа, который можно ожидать у этих животных, относящихся к линии мышей, которая, как хорошо известно, имеет легко индуцируемую иммунную систему и, следовательно, не имеет клинического значения. Единственным системным результатом после введения ACI-35 в дозе 98 мкг/инъекция было экстрамедуллярное кроветворение в селезенке и печени. Системных изменений после введения ACI-35 в дозе 24 мкг/инъекция не наблюдали.

Ни один из этих результатов не считался неблагоприятным в соответствии с определением исследования с точки зрения степени тяжести от легкой до умеренной, полного или частичного выздоровления через две недели и отсутствия коррелятов значимой клинической или клинической патологии. Следовательно, в экспериментальных условиях этого исследования уровень дозы ACI-35 в 390 мкг пептида, вводимый самцам и самкам мышей C57BL/6J каждые две недели в течение трех месяцев, считался NOAEL (без признаков системной токсичности, с отсутствующими неблагоприятными признаками на локальном уровне).

Пример 4: Шестимесячное исследование токсичности ACI-35 подкожным введением у яванских макаков с последующим четырехнедельным периодом восстановления (GLP).

Цель: оценить кумулятивную токсичность ACI-35 после семи подкожных введений яванским макакам один раз в четыре недели. У некоторых животных после периода лечения в течение четырехнедельного периода восстановления оценивали обратимость или прогрессирование связанных с лечением изменений или любую отсроченную токсичность.

Методы: схема исследования приведена в табл. 4.

Таблица 4

Схема исследования примера 4

Группа	Кол-во животных	Путь введения	Доза-объем (мл/инъекция)	Доза-объем (мкг пептид/ инъекция)
1	5♂ + 5♀ яванских макаков	подкожное	3	0 (PBS)
2	3♂ + 3♀ яванских макаков		0,75	358
3	3♂ + 3♀ яванских макаков		1,5	716
4	5♂ + 5♀ яванских макаков		3	1431

Дозу вводили семь раз со следующими интервалами: в дни 1, 29, 57, 85, 113, 141 и 169.

Образцы крови отбирали через следующие интервалы: в дни 15, 43, 71, 99, 127, 155, 183 и 208.

Последних 2♂ + 2♀ макаков из групп 1 и 4 в конце исследования содержали в течение четырехнедельного периода без лечения.

Результаты/выводы:

Подкожное введение ACI-35 яванским макакам в дозах 358, 716 и 1431 мкг/инъекция один раз каж-

дые 28 дней в течение шести месяцев хорошо переносилось всеми животными.

Хотя связь с лечением нельзя было исключить, небольшое увеличение количества нейтрофилов и небольшое снижение уровня глюкозы не считалось неблагоприятным, поскольку все значения находились в пределах фоновых статистических данных, и значения предварительного тестирования не показали никаких существенных изменений.

Все группы, получавшие тестируемые средства, вырабатывали антитела. Иммунный ответ через две недели после первого введения был одинаковым во всех группах, получавших тестируемые средства. После этого средние титры анти-rTau антител увеличивались в период лечения, следуя тенденции зависимости доза-эффект. Животные, прошедшие четырехнедельное выздоровление, показали явное снижение уровней антител, зарегистрированное через две недели после седьмого введения.

Основываясь на полученных результатах и в условиях этих исследований, доза 1431 мкг/инъекция, вводимая один раз каждые 28 дней в течение шести месяцев, считалась в этом исследовании NOAEL (без наблюдаемого уровня нежелательных явлений).

Пример 5: Трехмесячное исследование токсичности ACI-35.030 при внутримышечном введении у макак-резус с последующим четырехнедельным периодом восстановления (GLP).

Цель: Целью этого исследования было оценить потенциальную токсичность ACI-35.030 при внутримышечном введении три раза в месяц наивным самцам и самкам макак-резус. Обратимость возможных связанных с лечением изменений оценивали у 2 обезьян/пол из контрольной группы и в группах с высокими дозами в течение четырехнедельного периода восстановления.

План: Применяемый протокол исследования был следующим (табл. 5).

Таблица 5

Схема исследования примера 5

Группа	Лечение	Количество животных [#]	Путь введения	Доза-объем (мл/инъекция)	Доза-уровень (мкг пептид/инъекция)
1	АСИ-Е.030*	5♂ + 5♀ макаки резус	внутримышечно	2	0
2	АСИ-35.030	3♂ + 3♀ макаки резус		1	1200
3	АСИ-35.030	5♂ + 5♀ макаки резус		2	2400

[#] 2♂ + 2♀ обезьян из групп 1 и 3 содержали в течение четырехнедельного периода без лечения.

* АСИ-Е.030 липосомальный состав, содержащий те же компоненты, что и в АСИ-35.030, за исключением того, что он не содержит пептид Тау

Тестируемые и контрольные элементы вводили путем однократной внутримышечной инъекции в дни 1, 29 и 85 в 3 различных участка бедра. На протяжении всего исследования всех животных наблюдали не менее двух раз в сутки на жизнеспособность/смертность и наличие клинических признаков. Каждый раз в день введения животных оценивали на наличие местных реакций (шкала Дрейза) в месте дозирования перед дозированием и через 6, 24 и 48 ч после введения дозы.

В ходе исследования в каждой клетке количественно оценивали потребление корма. Массу тела оценивали еженедельно, начиная с периода акклиматизации и до конца исследования. Офтальмоскопию выполняли один раз во время предварительного тестирования и через три/четыре дня после последнего введения. Электрокардиограммы (отведения от конечностей I, II и III и дополненные отведения aVR (усиленное отведение от правой верхней конечности), aVL (усиленное отведение от левой верхней конечности) и aVF (усиленное отведение от нижних конечностей)) записывали для каждого животного один раз во время предварительного тестирования и приблизительно через 24 часа после последнего введения.

Оценку клинической патологии (гематологию, клиническую химию, коагуляцию и анализ мочи) выполняли у всех животных один раз до тестирования и через 2 дня после последней инъекции (день 87), и у всех выживших животных один раз в конце периода восстановления (125 день).

Образцы крови для сыворотки для определения анти-rTau и анти-T50 с помощью ELISA собирали в дни - 14, 8, 22, 36, 50, 64, 78, 92, 99, 106, 120 и 127 (в дни 106, 120 и 127 собирали только у выздоровевших животных).

РВМС собирали в день - 14, через две недели после последней иммунизации во всех группах и до вскрытия трупа в группе восстановления. ELISPOT-анализы IL-4 и IFN-γ выполняли для определения Тау-специфического Т-клеточного ответа.

Иммунофенотипирование оценивали у всех животных по образцам крови, взятым один раз перед тестированием и при аутопсии.

Кровь собирали для РМВС (ELISpot для Т-клеточного ответа против T3.5) в дни -14 и 99 (основной и восстановление) и в день 127 (восстановление).

Образцы спинномозговой жидкости (CSF) собирали под седацией у всех животных перед тестиро-

ванием и перед каждым патологоанатомическим исследованием для цитологической оценки.

После завершения запланированных периодов лечения или восстановления все животные были подвергнуты аутопсии, и различные органы взвешены. Гистопатологическое исследование выполняли на головном мозге, местах инъекций и лимфатических узлах всех исследуемых животных.

Потенциальную связывающую активность антител, индуцированных АСИ-35.030, оценивали посредством иммуногистохимических методов (ИНС) по сравнению с различными тканями человека в специальной фазе исследования, в которой перекрестная реактивность индуцированных АСИ-35.030 антител у обезьян против тканей человека оценивали на панели из 42 замороженных тканей человека и мазков крови трех неродственных индивидуумов с использованием сыворотки животных при дозе 2400 мкг Т3, взятой на 99 день.

Результаты:

Смертельные случаи, а также эффекты АСИ-35.030 связанные с массой тела, изменения в организме, изменение аппетита, изменения в офтальмологических показателях, электрокардиографии, клиническую патологию (гематологию, коагуляцию, клиническую биохимию и анализ мочи) или иммунофенотипирование отсутствовали.

Временные признаки раздражения кожи от слабых до умеренных (эритема и отек) в местах инъекции наблюдали у нескольких животных во всех группах после иммунизации. Временный сильный местный отек наблюдали в обработанной задней конечности у 1 из 5 самок, которым вводили 2400 мкг Т3/инъекция через 48 ч на 29-й день и на 87-й день. Однако через сутки (30-й день и 88-й день) отек исчезал.

Между контрольной группой и группами, получавшими дозу исследуемого средства, наблюдали некоторые различия в средней массе органов, не связанные с дозой. При макроскопическом анализе наблюдали изменения паховых, подвздошных и тазовых лимфатических узлов наблюдали в случайной выборке в виде увеличения во всех группах, включая контрольную, которые, согласно микроскопическому анализу, часто коррелировали с гиперцеллюлярностью лимфоидных органов, и в основном восстанавливались после 4-недельного периода восстановления, и были интерпретированы как возникающие, по всей вероятности, в результате стимуляции вакциной/адьювантом вакцины. Микроскопический анализ скелетных мышц в месте инъекции и в дерме, и/или подкожной клетчатке выявил воспаление от минимального до умеренного, сопровождающееся минимальной дегенерацией и/или регенерацией скелетных мышц во всех группах, включая контрольную. Воспаление считалось вызванным, по всей вероятности, комбинацией инъекционных процедур, связанных с проколом иглы, и местного иммунного ответа на введенный материал. Эти изменения не считались неблагоприятными и ожидалось, что после 4-недельного периода восстановления они исчезнут.

Никаких микроскопических изменений в мозге, связанных с введением АСИ-35.030, не наблюдали.

АСИ-35.030 индуцировала устойчивые титры анти-рТau IgG как при 1200 мкг/дозу, так и при 2400 мкг/дозу (фиг. 2).

Тau-специфического Т-клеточного ответа в конце лечения не наблюдали, что свидетельствует о низком риске токсичности, связанной с активацией Т-клеток, такой как менингоэнцефалит.

Иммуногистохимическое исследование 42 замороженных тканей человека и мазков крови трех неродственных индивидуумов показало, что индуцированные АСИ-35.030 обезьяньи антитела, исследованные при 1/300 и 1/100, специфически окрашивали клубки Тау в срезах головного мозга при БА (фиг. 3, панель А, до обработки АСИ-35.030, панель В: после 3 инъекций АСИ-35.030 в дозе 2400 мкг/доза, сыворотка, разведенная 1/100), но не вызвали ни специфического, ни неспецифического окрашивания тестируемых контрольных тканей. В качестве примера окрашивание среза толстой кишки сывороткой до и после лечения (панель С и панель D, соответственно) показано на фиг. 3.

Заключение:

В целом, из-за отсутствия изменений, связанных с АСИ-35, после иммунизации в дни 1, 29 и 85, самый высокий уровень дозы 2400 мкг Т3 считали уровнем без наблюдаемого эффекта (NOEL).

Пример 6: EpiScreen™ анализ иммуногенности пептидов.

Цель:

Два 16-мерных пептида, Тау 393-408 [pS396/pS404] (Т3.5 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2) и Тау393-408 (Т3.6 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4) тестировали с помощью Т-клеточных анализов EpiScreen™ с течением времени на способность индуцировать CD4⁺ Т-клеточный ответ у 51 человека-донора.

План:

EpiScreen™ кинетические анализы пролиферации Т-клеток и ELISPOT анализы IL-2.

PBMC от 51 человека-донора стимулировали любым пептидом с конечной концентрацией 5 мкМ. Тестирование каждого донора также включало контроль воспроизводимости (клетки, инкубированные с 100 мкг/мл KLH), эталонный клинический контроль (клетки, инкубированные с 0,3 мкМ гуманизированного А33) и лунку только с культуральной средой. Проллиферацию и продуцирование IL-2 оценивали через разные моменты времени.

EpiScreen™ анализ данных.

Для анализа пролиферации и ELISPOT анализа IL-2 ранее был установлен эмпирический порог индекса стимуляции (SI), равный или превышающий два ($SI \geq 2,00$), в связи с чем образцы, вызывающие ответы выше этого порога, считались положительными, тогда как $SI \geq 1,90$ считались пограничными респондерами.

Предыдущие EpiScreen™ кинетические анализы Т-клеток с рядом биологических средств показали четкую корреляцию между процентом наблюдаемых ответов донорских Т-клеток в EpiScreen™ анализе и уровнем иммуногенности, наблюдаемым в клинике. Как правило, протеиновые терапевтические средства, которые вызывали >10% положительных ответов в EpiScreen™ анализе, связаны со значительным риском иммуногенности в клинике.

Результаты:

Общая корреляция между пролиферацией и ELISPOT анализами IL-2 была высокой (98% для KLN), и, таким образом, доноров с ответом определяли как субъектов с положительным ответом на каждый образец как в ELISPOT анализе IL-2, так и в анализе пролиферации. Анализ объединенных наборов данных этих двух анализов показал, что один из 51 (2%) донора ответил на Тау 393-408 [pS396/pS404], а два из 51 (4%) донора ответили на Тау 393-408. Принимая во внимание пограничные ответы и доноров с ответами только в одном из двух тестов, четыре из 51 донора (8%) ответили на белок Тау 393-408 [pS396/pS404], и четыре из 51 донора (8%) ответили на белок Тау 393-408. Таким образом, общая частота и величина ответов были низкими для обоих пептидов: ответили максимум 8% доноров.

Заключение:

Способность тестируемых пептидов (Тау 393-408 [pS396/pS404] и Тау 393-408) индуцировать CD4⁺ Т-клеточные ответы, измеренные по уровню пролиферации и секреции IL-2, тестировали в когорте из 51 HLA-типизированного донора. Данные исследования показали, что общий относительный риск индукции CD4⁺ Т-клеточных ответов был низким (2-8%) для обоих пептидов.

По сравнению с белковыми терапевтическими средствами, испытанными в EpiScreen™ анализах, данные этого исследования показывают, что оба пептида могут рассматриваться как имеющие низкий потенциальный риск индукции CD4⁺ Т-клеточных ответов у человека.

Пример 7: Безопасность и эффективность АСИ-35 у людей.

Безопасность, переносимость и иммуногенность вакцины АСИ-35 (АСИ-35) оценивали в клиническом исследовании фазы Ib, проведенном с участием пациентов с легкой и средней степенью БА в Великобритании и Финляндии (АСИ-35-1201: фаза Ib многоцентрового, двойного слепого рандомизированного плацебо-контролируемого исследования по оценке безопасности, переносимости и иммуногенности АСИ-35 у пациентов с болезнью Альцгеймера от легкой до умеренной степени).

Цель: Выполнить предварительную оценку АСИ-35, вводимую в 3 дозах и 3 режимах дозирования, у пациентов с БА от легкой до умеренной степени на безопасность и переносимость, а также на индукцию титра анти-фосфо-Тау (pТау) иммуноглобулина G (IgG) в сыворотке.

Методы: каждая из 5 когорт получала отличную от других дозу (300 мкг, 900 мкг или 1800 мкг тетрапальмитоилированного фосфопептида (пептида pТау T3, SEQ ID NO: 28)) и/или режим дозирования в течение 6 месяцев (2, 3 или 5 доз) с последующей повторной инъекцией через 12-16 месяцев (когорта 1) или 6 месяцев (когорты 2-5) после последней инъекции, как описано в табл. 6.

Таблица 6

Схема исследования примера 7

Когорта	N	Доза, мкг	W0	W4	W8	W12	W24	+W48 (доза, мкг)	+W48-W76 (доза, мкг)
1	4	300	X	X	X	X	X		X (900)
2	8	900	X	X	X	X	X	X (900)	
3	4	900	X	X			X	X (900)	
4	4	1800	X	X			X	X (1800)	
5	4	1800	X				X	X (1800)	

Двадцать четыре пациента были рандомизированы и получили по меньшей мере 1 дозу вакцины исследуемого лекарственного вещества. Средний возраст пациентов составлял $73,6 \pm 5,88$ года, а средний балл по шкале MMSE при скрининге составлял $23,3 \pm 2,71$. Были рандомизированы 15 женщин и 9 мужчин. Двадцать два пациента завершили исследование. Два пациента из когорты 2 (один принимал 900 мкг, один плацебо) прекратили исследование из-за серьезного медицинского состояния, не связанного с приемом АСИ-35, которое затруднило проведение исследования или сделало завершение исследования невозможным.

Критерии включения были следующими:

1. Вероятная болезнь Альцгеймера (БА) в соответствии с критериями Национального института неврологических и коммуникативных заболеваний и инсульта - Ассоциации болезни Альцгеймера и свя-

занных с инсультом - и связанных патологий.

2. Возраст от 60 до 85 лет.

3. 18-28 баллов по краткой шкале оценки психического состояния (MMSE) во время скрининга.

4. Пациент должен был получать стабильную дозу ингибиторов ацетилхолинэстеразы не менее 3 месяцев до скрининга.

5. Пациент, находящийся на попечении надежного супруга или другого лица, осуществляющего за уход за больным и проживающего с ним, который может дать письменное согласие на оказание помощи в проведении клинических обследований и сообщить о проблемах безопасности.

6. Пациент, который, по мнению исследователя, способен понять и подписать письменное информированное согласие и соблюдать все процедуры исследования (обратите внимание, что согласие необходимо получить до проведения любых процедур, связанных с исследованием).

7. Женщины должны находиться в состоянии постменопаузы не менее 1 года и/или быть хирургически стерилизованными.

8. Партнерша пациентов мужского пола, не находящаяся в состоянии постменопаузы или не являющаяся хирургически стерилизованной, должна использовать надежные средства контрацепции, например двойную барьерную контрацепцию или гормональную контрацепцию.

Результаты/выводы:

В целом, АСІ-35 оказалась безопасной и хорошо переносимой при всех дозах и схемах лечения, испытанных на людях, при этом инъекция приводила к быстрой индукции анти-рТau антител вскоре после первой инъекции во всех исследуемых группах. В этом исследовании наиболее частыми связанными с лекарственным веществом нежелательными явлениями (ТЕАЕ) были эритема в месте инъекции, реакции в месте инъекции и утомляемость. Отсутствовали какие-либо клинические, лабораторные или радиологические показатели, свидетельствующих о развитии воспаления ЦНС. За исключением реакций в месте инъекции, ни один паттерн АЕ в сравнении с плацебо не предполагал связи с исследуемым лекарственным средством. Реакции в месте инъекции, которые, как правило, были легкими и самоограничивающимися, чаще наблюдались при более высоких дозах и были зарегистрированы у всех пациентов в когортах 4 и 5, принимавших активное лекарственное средство. Бессимптомная гипогликемия чаще наблюдалась при приеме активного лекарственного средства, чем при приеме плацебо, но ее связь с исследуемым лекарственным средством остается неопределенной, учитывая известное спонтанное появление этого явления. Было зарегистрировано пять СНЯ, причем все наблюдались у пациентов из когорты 2, при этом 1 пациент получал плацебо и также перенес 2 СНЯ (уросепсис и пиелонефрит). Эти 2 СНЯ не были связаны с исследуемым лекарственным средством. Три, СНЯ, которые возможно были связаны с исследуемым лекарственным средством (острый пиелонефрит, дисфункция синусового узла и головокружение), были зарегистрированы у 2 пациентов, получавших АСІ-35, и они были единственной наблюдаемой нежелательной реакцией. В этом исследовании не были зарегистрированы смертельные случаи.

Пример 7: Безопасность и эффективность АСІ-35.030 у людей.

Безопасность, переносимость и иммуногенность вакцины АСІ-35.030 (АСІ-35.030) оценивают в многоцентровом, двойном слепом, рандомизированном, плацебо-контролируемом исследовании фазы Іb/Іа у пациентов с ранней стадией БА (легкое когнитивное нарушение (МСІ), вызванное БА, и легкая форма БА) в Европе (исследование АСІ-35-1802).

Цель: Выполнить предварительную оценку АСІ-35.030 безопасности и переносимости участниками с БА на ранней стадии (например, с легким когнитивным нарушением (МСІ), вызванным БА, и легкой формой БА) при приеме до 3 доз, и способности индуцировать иммунный ответ против аномальной формы белка Тau, включая индукцию анти-фосфо-Тau (анти-рТau) в сыворотке, в течение 74 недель.

Вторичные цели: дальнейшая оценка иммуногенности исследуемых вакцин путем оценки, например индукции титров ІgG против Тau и титров ІgM против рТau и Тau в сыворотке; и оценка авидности антител, вызванных иммунизацией, в течение 74 недель.

Цели исследования: выполнить 74 недельное изучение влияния исследуемых вакцин на предполагаемые биомаркеры прогрессирования БА, т.е. на концентрацию общего белка Тau и белка рТau в крови и/или спинномозговой жидкости; влияния исследуемых вакцин на активацию Т-клеток в крови; влияния исследуемых вакцин на воспалительные цитокины крови (например, ІL-1 β , ІL-2, ІL-6, ІL-8, ІL-10, ІFN- γ и TNF- α); и влияния исследуемых вакцин на поведение, когнитивные и функциональные возможности.

Методы: Каждая из 3 когорты пациентов получает разные дозы АСІ-35.030 из расчета количества пептида рТau T3 в композиции (300 мкг, 900 мкг или 1800 мкг пептида T3, тетрапальмитоилированного фосфопептида рТau, SEQ ID NO: 28) в течение 48 недель (введение дозы в 0-ую, 8-ую, 24-ую и 48-ую недели) с последующим 24-х недельным (6 месяцев) периодом наблюдения для анализа безопасности.

Двадцать четыре пациента рандомизируют в 3 подгруппы, причем в каждой подгруппе 2 пациента получают плацебо, а 6 пациентов получают АСІ-35.030. Дозы вводят внутримышечно.

Оценку безопасности выполняют сразу после каждого введения дозы и через 48-72 ч после введения у всех исследуемых пациентов по телефону. В каждой подгруппе первую дозу вводят первым 4 пациентам через 48-72 часа после осуществления оценки безопасности у предыдущего пациента, чтобы

подтвердить отсутствие клинически значимой проблемы безопасности исследуемой вакцины, с точки зрения главного исполнителя исследования.

Все получившие лечение пациенты проходят период наблюдения для анализа безопасности в течение 24 недель (6 месяцев) после окончания периода лечения. В течение этого периода пациентов просят осуществить первый контрольный визит через 19 недель после последнего введения и последний визит в конце периода наблюдения (через 26 недель после последнего введения). Безопасность участников контролируют на протяжении всего исследования с регулярным анализом данных по безопасности Советом по мониторингу данных и безопасности (DSMB).

Промежуточные анализы выполняют следующим образом:

Первый промежуточный анализ выполняют после того, как все пациенты когорты 1 завершили посещение 4 (неделя 10), т.е. через 2-4 недели после второй инъекции. Цель состоит в сборе к этому моменту времени данных по безопасности, переносимости и иммуногенности для определения, следует ли начинать введение когорте 2.

Второй промежуточный анализ выполняют после того, как все пациенты когорты 2 завершили посещение 4 (неделя 10), т.е. через 2-4 недели после второй инъекции. Цель состоит в сборе к этому моменту времени данных по безопасности, переносимости и иммуногенности для определения, следует ли начинать введение когорте когорту 3.

Третий промежуточный анализ выполняют после того, как все пациенты из когорты 3 завершили посещение 6 (неделя 26), т.е. через 2-4 недели после третьей инъекции. Цель состоит в принятии решения о расширении когорты 1, 2 или 3 для сбора дополнительных данных по безопасности/переносимости дозы, имеющей наиболее благоприятный профиль с точки зрения иммуногенности, безопасности и переносимости.

Четвертый промежуточный анализ выполняют в конце периода лечения (т.е. через 2-4 недели после 4-й инъекции). Цель состоит в анализе к этому моменту времени данных по безопасности/переносимости и иммуногенности, включая данные, полученные от пациентов расширенной подгруппы, если применимо. Результаты по биомаркерам могут быть включены в качестве вспомогательных данных исследования. Результаты сравнивают с результатами, полученными впоследствии для других когорт, для отбора когорт для дальнейшей клинической разработки наилучшей стратегии среди всех исследуемых.

Пятый промежуточный анализ выполняют в конце периода наблюдения для анализа безопасности, т.е. после того, как все пациенты когорты 1 завершили визит 11 (неделя 74). Цель та же, что и в четвертом промежуточном анализе, и впоследствии результаты сравнивают по всем когортам.

Возраст исследуемой популяции составляет 50-75 лет (мужчины и женщины) с диагнозом легкой БА или МСИ, вызванного БА, в соответствии с критериями NIA-AA.

Критерии включения следующие:

1. Мужчина или женщина в возрасте от 50 до 75 лет, включительно.
2. Легкое когнитивное нарушение (МСИ), вызванное БА, или легкая БА в соответствии с критериями NIA-AA и 0,5 или 1 балл по общей шкале оценки клинической деменции (CDR).
3. 22 балла или выше по краткой шкале оценки психического состояния (MMSE).
4. Уровни амилоида бета 42 (A β 42) в спинномозговой жидкости и фосфорилированного Тау при скрининге соответствуют критериям NIA-AA 2018 для патологии БА. В пограничных случаях уровней A β 42 в спинномозговой жидкости могут быть учтены другие результаты, позволяющие определить положительный амилоид, например отношение A β 42/A β 40 и, в каждом конкретном случае, наличие положительных результатов ПЭТ-сканирования на амилоид или положительный уровень A β 42 в спинномозговой жидкости. В каждом конкретном случае применимы результаты отбора проб спинномозговой жидкости, проведенного в течение 3 месяцев до скрининга, при условии, что они соответствуют наличию амилоидной патологии и возможности использовать соответствующий образец спинномозговой жидкости в исследовании для тестирования.
5. Пациенты, которые либо не принимают никаких препаратов для лечения БА, либо получали стабильную дозу ингибитора ацетилхолинэстеразы и/или мемантина в течение как минимум 3 месяцев до этапа включения.
6. Пациенты, за которыми ухаживает надежный информатор или лицо, обеспечивающее уход, чтобы гарантировать соблюдение режима лечения, осуществлять помощь по оценке клинических показаний и сообщать о проблемах безопасности.
7. Женщины должны находиться в постменопаузе не менее одного года и/или быть стерилизованными хирургическим путем. Женщины детородного возраста или не находящиеся в постменопаузе должны иметь отрицательный тест на беременность при скрининге и быть готовы к использованию высокоэффективных методов контрацепции с момента скринингового визита до конца своего участия. Повторный анализ мочи на беременность выполняют в течение всего периода лечения для определения возможности дальнейшего введения субъекту исследуемой вакцины. Пациенты мужского пола с партнерами детородного возраста должны быть готовы использовать соответствующие меры контрацепции во время исследования.

8. Пациент, который, по мнению исследователя, способен понять и дать письменное информированное согласие.

9. Пациенты и информатор или опекун должны свободно владеть одним из языков исследования и быть в состоянии соблюдать все процедуры исследования, включая люмбальные проколы.

Критерии исключения следующие:

1. Участие в ранее проводимых клинических испытаниях препаратов для лечения БА и/или неврологических расстройств с применением активной иммунизации, если нет задокументированных доказательств того, что пациент получал только плацебо, и не ожидается, что композиция плацебо способна вызывать какой-либо специфический иммунный ответ.

2. Участие в ранее проводимых клинических испытаниях препаратов для лечения БА и/или неврологических расстройств с применением любой пассивной иммунизации в течение последних 12 месяцев до момента скрининга, если нет задокументированных доказательств того, что субъект получал только плацебо, и не ожидается, что композиция плацебо способна вызывать какой-либо специфический иммунный ответ.

3. Участие в ранее проводимых клинических испытаниях препаратов для лечения БА и/или неврологических расстройств с применением любого низкомолекулярного препарата, включая ингибиторы ВАСЕ-1, в течение последних 3 месяцев до момента скрининга.

4. Параллельное участие в любом другом клиническом исследовании с применением экспериментальных или одобренных лекарственных средств или методов лечения.

5. Наличие положительных титров антиядерных антител (ANA) при разведении не менее 1/160 у пациентов без клинических симптомов аутоиммунного заболевания.

6. Активное или в анамнезе аутоиммунного заболевания или клинических симптомов, соответствующих наличию аутоиммунного заболевания.

7. Подавление иммунитета, включая, помимо прочего, использование иммунодепрессантов или системных стероидов, если они не были прописаны временно более чем за 3 месяца до момента скрининга.

8. Наличие в анамнезе тяжелой аллергической реакции (например, анафилаксии), включая, помимо прочего, тяжелую аллергическую реакцию на ранее вводимые вакцины и/или лекарственные средства.

9. Наличие в анамнезе клинически значимых эпизодов гипогликемии.

10. Злоупотребление или зависимость от наркотиков или алкоголя в настоящее время или в течение последних пяти лет согласно критериям Руководства по диагностике и статистике психических расстройств-V (DSM-V).

11. Любое клинически значимое заболевание, которое может препятствовать оценке безопасности и переносимости исследуемого лечения и/или соблюдению полного графика посещений в рамках исследования.

12. Любое клинически значимое заболевание, которое может повлиять на иммунную систему и/или потенциально ухудшить эффективность иммунизации исследуемой вакцины у пациентов (например, любое приобретенное или врожденное иммунодепрессивное расстройство в анамнезе).

13. Использование гидралазина, прокаинамида, хинидина, изониазида, ингибиторов TNF, миноциклина в течение последних 12 месяцев перед скринингом.

14. Использование дилтиазема, если только стабильная доза не принималась по меньшей мере за 3 месяца до скрининга.

15. Высокий риск суицида определяют по Колумбийской шкале оценки тяжести суицида, когда субъект отвечает "да" на вопросы 4 или 5 о суицидальных мыслях или отвечает "да" на суицидальное поведение в течение последних 12 месяцев.

16. Сопутствующие психические или неврологические расстройства, кроме тех, которые считаются связанными с БА (например, травма головы с потерей сознания, симптоматический инсульт, болезнь Паркинсона, тяжелое окклюзионное заболевание сонных артерий, ТИА).

17. В анамнезе или происходящие в настоящее время неконтролируемые припадки. При наличии припадков в анамнезе требуется хороший контроль, демонстрирующий отсутствие припадков в течение 2 лет до момента включения в исследование. Прием противосудорожных препаратов в стабильной дозе разрешен в течение по меньшей мере 3 месяцев до момента скрининга.

18. В анамнезе менингоэнцефалит в пределах последних 10 лет до обследования.

19. Пациенты с геморрагическим и/или негеморрагическим инсультом в анамнезе.

20. Наличие или в анамнезе периферической невропатии.

21. В анамнезе воспалительные неврологические расстройства с потенциальным поражением ЦНС.

22. МРТ сканирование при скрининге, свидетельствующее о наличии структурных показателей альтернативной патологии, не соответствующей БА, которая могла бы вызвать симптомы у пациента. Признаки наличия пространственных образований, отличных от доброкачественной менингиомы диаметром менее 1 см, более двух лакунарных инфарктов или одного единичного инфаркта диаметром более 1 см, или любой отдельной области поверхностного сидероза или свидетельства предшествующего макрокровоизлияния ≥ 10 мм. 10 максимально допустимых микрокровоизлияний на T2* МРТ, независимо от местоположения.

23. Противопоказания к МРТ обследованию по любой причине, включая, помимо прочего, металлические имплантаты, противопоказанные для МРТ и/или тяжелую клаустрофобию.

24. Значительное нарушение слуха или зрения или другие проблемы, которые исследователь сочтет важными, которые мешают соблюдать протокол и оценивать результаты.

25. Клинически значимые инфекции или серьезная хирургическая операция в течение 3 месяцев до обследования. Запланированная операция, которую предполагается провести во время участия в исследовании, должна быть рассмотрена и одобрена медицинским наблюдателем при скрининге.

26. Любая вакцина, полученная в течение последних 2 месяцев до момента включения в исследование, включая вакцину против гриппа.

27. Клинически значимые аритмии или другие клинически значимые отклонения на ЭКГ при скрининге.

28. Инфаркт миокарда в течение одного года до момента включения в исследование, нестабильная стенокардия или серьезная ишемическая болезнь сердца.

29. Пациенты с раком в анамнезе в течение последних 5 лет, кроме получавших лечение плоскоклеточной карциномы, базальноклеточной карциномы и меланомы *in situ*, или рака предстательной железы *in situ* или рака груди *in situ*, которые были полностью удалены и считаются излеченными.

30. По мнению исследователя, клинически значимые отклонения от нормальных значений гематологических параметров, функциональных тестов печени и других биохимических показателей, которые считаются клинически значимыми.

31. Женщины-субъекты беременны, что подтверждено анализом сыворотки при скрининге, или планируют беременность или кормление грудью.

32. Пациент, получающий любой антикоагулянт или антитромбоцитарный препарат, за исключением аспирина в дозах ниже 100 мг в сутки (во избежание риска кровотечения во время плановой или внеплановой люмбальной пункции).

33. Пациенты, получающие антипсихотические препараты, за исключением стабильно низких доз для лечения бессонницы.

34. Пациенты, сдавшие кровь или продукты крови в течение 30 дней до момента скрининга или планирующие сдать кровь во время участия в исследовании.

35. Положительный результат VDRL (лаборатория исследования венерических заболеваний), соответствующий активному сифилису, при скрининге.

36. Пациенты с положительным результатом теста на ВИЧ при скрининге.

37. Пациенты с активным гепатитом В и/или С по результатам тестирования при скрининге.

38. Пациенты с креатинином, превышающим верхний предел нормы, аномальными показателями функции щитовидной железы, превышающими более чем в 1,5 раза, или клинически значимым снижением уровня В12 или фолиевой кислоты в сыворотке (примечание: все пероральные дозы заместителей тиреоида, В12 или фолиевой кислоты должны быть стабильными в течение по меньшей мере 3 месяцев до скрининга).

Результаты/выводы:

Выполняют оценку следующих основных конечных точек:

Безопасность и переносимость - нежелательные явления, немедленная и отсроченная реактогенность (например, анафилаксия, местная и системная реактогенность, включая боль, покраснение, иммунное комплексное заболевание, отек, лихорадку); глобальная оценка переносимости; суицидальные мысли (C-SSRS); поведение (NPI); оценки когнитивных и функциональных способностей (RBANS, CDR-SB) для оценки безопасности; жизненно важные признаки; МРТ; ЭКГ; рутинный гематологический и биохимический анализ крови и мочи; оценка аутоиммунных антител в крови, включая антитела к ДНК; маркеры воспаления в крови и спинномозговой жидкости.

Иммунный ответ - титры анти-pTau IgG в сыворотке (среднее геометрическое, отклонение от исходного уровня, частота ответа, пик и площадь под кривой).

Выполняют оценку следующих вторичных конечных точек:

Иммунный ответ - титры анти-Tau IgG, анти-pTau и анти-Tau IgM в сыворотке (среднее геометрическое, изменение от исходного уровня, частота ответа, пик и площадь под кривой), определение профиля ответа IgG с помощью тестирования авидности.

Выполняют оценку следующих конечных точек исследования:

Изменение титров биомаркеров в крови и/или спинномозговой жидкости по сравнению с исходным уровнем (например, общего белка Tau и белка pTau), изменение уровня активации Т-клеток в крови относительно исходного уровня, изменение уровня воспалительного цитокина (например, IL-1B, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IFN-γ и TNF-α) в крови относительно исходного уровня, изменение частоты суицидальных мыслей (C-SSRS), поведения (NPI), баллов по шкале оценки когнитивных и функциональных способностей (RBANS, CDR-SB) относительно исходного уровня.

Пример 8: Внутримышечная инъекция вызвала более однородный иммунный ответ, чем подкожная инъекция.

Группы макаков-резус (n=3 самца и 3 самки в группе) иммунизировали внутримышечно или подкожно

но путем вакцинации в день 1, день 29, день 85 и день 169 АСИ-35.030 в количестве 1800 мкг/доза.

Препараты обогащенных парных спиральных филаментов (ePHF) получали из посмертных тканей мозга гистологически подтвержденных субъектов с БА путем саркозильной экстракции нерастворимого Tau с помощью модифицированного метода Гринберга и Дэвиса (Greenberg and Davies) (1991, Proc Natl Acad Sci USA, 87(15):5827-31). Титры антител, специфичные для обогащенных парных спиральных филаментов (ePHF), оценивали с помощью платформы Mesoscale Discovery (MSD). Планшеты со стрептавидином MSD покрывали биотинилированным анти-Tau антителом методом захвата (HT7-биотин, ThermoScientific) перед инкубацией с ePHF, полученным от пациентов с БА, при этом также выполняли детектирование ePHF-специфичных антител IgG с использованием SulfoTag-меченных антител к человеческому IgG, которые перекрестно реагируют с антителами IgG обезьяны. Более конкретно, ePHF добавляли в 96-луночные планшеты MSD Gold Small Spot со стрептавидином (MSD), предварительно насыщенные 1% BSA и покрытые биотинилированным HT-7 (Thermo Scientific). После инкубации в течение одного часа планшеты промывали PBST, добавляли серийные разведения сывороток и инкубировали в течение двух часов. Связанные антитела детектировали с помощью SulfoTag-меченых антител к человеческому IgG с последующей стадией фиксации в 1% PFA перед добавлением буфера Read Buffer T. Планшеты анализировали с помощью Sector Imager (MSD). Результаты выражали в произвольных единицах на миллилитр (AU/мл) для каждой отдельной обезьяны вместе со средним геометрическим значением на группу (фиг. 4). Представлены титры ePHF-специфичных антител на 50-й, 106-й и 190-й день после первой иммунизации.

На фиг. 4 показано, что липосомальная вакцина индуцировала высокие титры ePHF-специфичных IgG и что внутримышечные инъекции вызывали более гомогенные ответы антител, чем подкожные инъекции.

Список последовательностей

SEQ ID NO: 1 - фосфопептид Tau (7.1)
 GDRSGYS[pS]PG[pS]PG[pT]PGRSRRT
 SEQ ID NO: 2 - фосфопептид Tau (T3.5)
 VYK[pS]PVVSGDT[pS]PRHL
 SEQ ID NO: 3 - фосфопептид Tau 22.1)
 SSTGSIDMVD[pS]PQLA[pT]LA
 SEQ ID NO: 4 - пептид Tau (T3.6)
 VYKSPVSGDTSRHL
 SEQ ID NO: 5 - фосфопептид Tau
 RENAKAKTDHGAEIVYK[pS]PVVSGDT[pS]PRHL
 SEQ ID NO: 6 - фосфопептид Tau
 RQEFVEMEDHAGT[pY]GL
 SEQ ID NO: 7 - фосфопептид Tau
 PGRSR[pT]P[pS]LPTPPTR
 SEQ ID NO: 8 - фосфопептид Tau
 GYSSPG[pS]PG[pT]PGRSR
 SEQ ID NO: 9 - фосфопептид Tau
 GDT[pS]PRHL[pS]NVSSTGSID
 SEQ ID NO: 10 - фосфопептид Tau
 PG[pS]PG[pT]PGRSR[pT]P[pS]LP
 SEQ ID NO: 11 - фосфопептид Tau
 HL[pS]NVSSTGSID
 SEQ ID NO: 12 - фосфопептид Tau
 VSGDT[pS]PRHL
 SEQ ID NO: 13 - Т-клеточный эпитоп T50
 AKFVAAWTLKAAAVVRQYIKANSKFIGITELVVRFNFTVSWLWVVKVSASHL
 E-NH₂
 SEQ ID NO: 14 - Т-клеточный эпитоп T46
 AKFVAAWTLKAAAGSQYIKANSKFIGITELGSFNNFTVSWLWVVKVSASHLEK(
 Pal)K(Pal)-NH₂
 SEQ ID NO: 15 - эпитоп хелперных Т-клеток T48
 AKFVAAWTLKAAAGSQYIKANSKFIGITELGSFNNFTVSWLWVVKVSASHLEGS
 LINSTKIYSYFPSVISKVNQ-NH₂
 SEQ ID NO: 16 - эпитоп хелперных Т-клеток T51

AKFVAAWTLKAAARRQYIKANSKFIGITELRRFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-
NH₂
SEQ ID NO: 17 - эпитоп хелперный Т-клеток Т52
AKFVAAWTLKAAARKQYIKANSKFIGITELRKFNFTVSFWLRVPKVSASHLE-
NH₂
SEQ ID NO: 18 - CpG 2006 (также известный как CpG 7909)
5'-tcgctgttttcgctgtt-3'
где строчные буквы означают фосфоротиоатные (ps) межнуклеотидные связи
SEQ ID NO: 19 - CpG 1018
5'-tgactgtgaacgttcgagatga-3'
где строчные буквы означают фосфоротиоатные межнуклеотидные связи
SEQ ID NO: 20 - CpG2395
5'-tcgctgttttcggcgcgcgccg-3'
где строчные буквы означают фосфоротиоатные межнуклеотидные связи
SEQ ID NO: 21 - CpG2216
5'-ggGGGACGATCGTCgggggg-3'
где строчные буквы означают фосфоротиоатные межнуклеотидные связи, а
заглавные буквы означают фосфодиэфирные (po) связи.
SEQ ID NO: 22 - CpG2336
5'-gggGACGACGTCGTGgggggg-3',
где строчные буквы означают фосфоротиоатные межнуклеотидные связи, а
заглавные буквы означают фосфодиэфирные связи.
SEQ ID NO: 23 - пептид Рап DR-эпитопа (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]PGSRRTK(pal)K(pal)
SEQ ID NO: 28 - пальмитоилированный фосфопептид Тау (Т3,
пальмитоилированный Т3.5)
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 пептид Тау

K(pal)K(pal)VYKSPVSGDTPRHLK(pal)K(pal)
 SEQ ID NO: 31 - пальмитоилированный фосфопептид Тау
 K(pal)K(pal)RENAKAKTDHGAEIVYK[pS]PVVSGDTPRHLK(pal)K(pal)
 SEQ ID NO: 32 - пальмитоилированный фосфопептид Тау
 K(pal)K(pal)RQEFVEMEDHAGT[pY]GLK(pal)K(pal)
 SEQ ID NO: 33 - пальмитоилированный фосфопептид Тау
 K(pal)K(pal)PGSRSR[pT]P[pS]LPTPTRK(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]NVSTGSIDK(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]NVSTGSIDK(pal)K(pal)
 SEQ ID NO: 38 - пальмитоилированный фосфопептид Тау
 K(pal)K(pal)VSGDTPRHLK(pal)K(pal)
 SEQ ID NO: 39 - T50 без C-концевого амида
 AKFVAAWTLKAAAVVRQYIKANSKFIGITELVVRFNFTVSFWLRVPKVSASHL

E

SEQ ID NO: 40 - T46 без -Lys(Pal)-Lys(Pal)-NH₂ на C-конце
 AKFVAAWTLKAAAGSQYIKANSKFIGITELGSFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE
 SEQ ID NO: 41 - T48 без C-концевого амида
 AKFVAAWTLKAAAGSQYIKANSKFIGITELGSFNNFTVSFWLRVPKVSASHLEGS
 LINSTKIYSYFPSVISKVNQ
 SEQ ID NO: 42 - T51 без C-концевого амида
 AKFVAAWTLKAAARRQYIKANSKFIGITELRRFNFTVSFWLRVPKVSASHLE
 SEQ ID NO: 43 - T52 без C-концевого амида
 AKFVAAWTLKAAARKQYIKANSKFIGITELRKFNFTVSFWLRVPKVSASHLE
 SEQ ID NO: 44 - T57
 AKFVAAWTLKAAAVVRQYIKANSKFIGITELVVRFNFTVSFWLRVPKVSASHL

E-K(Pal)K(Pal)-NH₂

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ индукции антител к фосфорилированному Тау без индукции серьезного нежелательного явления у нуждающегося в этом субъекта-человека, включающий введение липосомы, содержащей:

- а) агонист толл-подобного рецептора 4;
- б) хелперный Т-клеточный эпитоп;
- в) липидированный олигонуклеотид CpG; и
- д) фосфопептид тау;

где хелперный Т-клеточный эпитоп содержит по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23 - SEQ ID NO: 26, липидированный олигонуклеотид CpG, содержащий нуклеотидную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 18 - SEQ ID NO: 22, где олигонуклеотид CpG имеет одну или несколько фосфоротиоатных межнуклеотидных связей, и олигонуклеотид CpG, ковалентно связан по меньшей мере с одной липофильной группой, необязательно через линкер PEG; и тау-фосфопептид, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 12, где липосому вводят субъекту-человеку в эффективном количестве, содержащем от приблизительно 25 нмоль до приблизительно 750 нмоль на дозу фосфопептида Тау, а фосфопептид Тау презентирован на поверхности липосомы.

2. Способ по п.1, в котором фосфопептид Тау состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27 - SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 31 - SEQ ID NO: 38, предпочтительно фосфопептид Тау состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28.

3. Способ по п.1 или 2, в котором эффективное количество липосомы находится в пределах от 100 до 2500 мкг на дозу фосфопептида Тау, предпочтительно от 300 до 2400 мкг на дозу, от 300 до 1800 мкг на дозу или от 300 до 900 мкг на дозу фосфопептида Тау.

4. Способ по п.3, в котором эффективное количество липосом составляет 300 мкг на дозу, 900 мкг на дозу, 1800 мкг на дозу или 2400 мкг на дозу фосфопептида Тау.

5. Способ по любому из пп.1-4, в котором липосому вводят подкожно.

6. Способ по любому из пп.1-4, в котором липосому вводят внутримышечно.

7. Способ по любому из пп.1-6 дополнительно включает введение субъекту второй дозы эффектив-

ного количества липосомы через 1-24 недели после первоначального введения.

8. Способ по любому из пп.1-7, в котором 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'-гас-глицерина (DMPG) и холестерина.

9. Способ по любому из пп.1-8, в котором эпитоп хелперных Т-клеток содержит по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13 - SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 23 - SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 39 - SEQ ID NO: 44.

10. Способ по любому из пп.1-9, в котором эффективное количество липосом содержит эпитоп хелперных Т-клеток в количестве от приблизительно 2 нмоль до приблизительно 110 нмоль на дозу.

11. Способ по любому из пп.1-10, в котором эффективное количество липосом содержит эпитоп хелперных Т-клеток, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13 - SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 23 - SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 39 - SEQ ID NO: 44 в количестве от 25 до 620 мкг на дозу, предпочтительно от 75 до 450 мкг на дозу, и предпочтительно эпитоп хелперных Т-клеток представляет собой эпитоп хелперных Т-клеток, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13.

12. Способ по любому из пп.1-11, в котором эффективное количество липосом содержит агонист толл-подобного рецептора 4 в количестве от 30 до 900 мкг на дозу, предпочтительно от 100 до 585 мкг на дозу, и предпочтительно агонист толл-подобного рецептора 4 представляет собой монофосфорил-гексаацил-липид А, 3-деацил.

13. Способ по любому из пп.1-12, в котором эффективное количество липосом содержит липидированный олигонуклеотид CpG в количестве от 50 до 1250 мкг на дозу, предпочтительно от 150 до 800 мкг на дозу, и предпочтительно липидированный олигонуклеотид CpG состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 18.

14. Способ по любому из пп.1-13, в котором липосома содержит:

(1) фосфопептид Тау, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28;

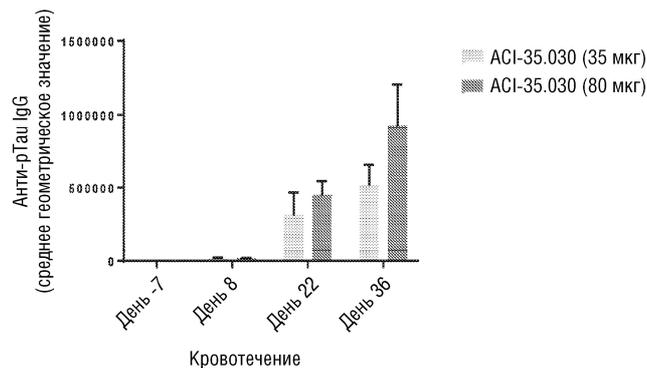
(2) агонист толл-подобного рецептора 4, содержащий монофосфорил-гексаацил-липид А, 3-деацил;

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

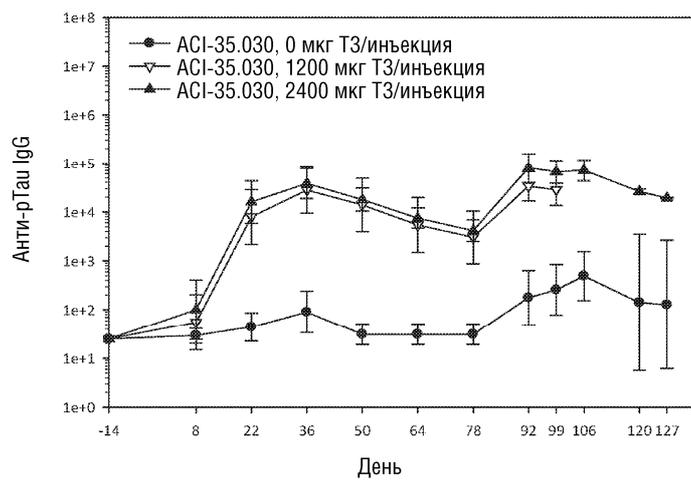
(4) липидированный олигонуклеотид CpG, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 18; и

(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'-гас-глицерина (DMPG) и холестерина.

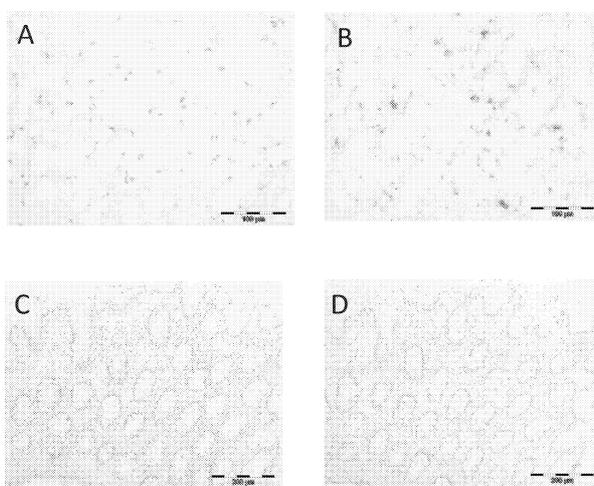
15. Способ по любому из пп.1-14, в котором субъект нуждается в лечении болезни Альцгеймера, предпочтительно болезни Альцгеймера на ранней стадии, умеренного когнитивного нарушения (MCI), вызванного болезнью Альцгеймера, или болезни Альцгеймера от легкой до умеренной степени.



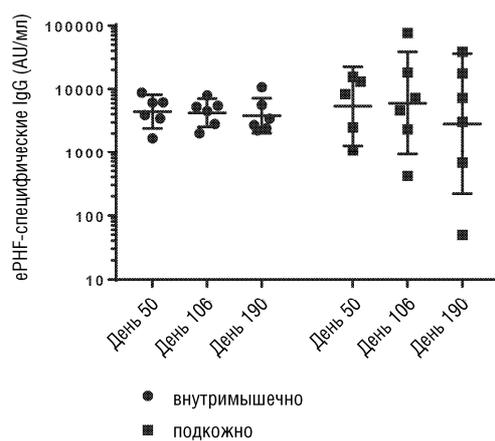
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

