

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202293369 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.03.13

(22) Дата подачи заявки
2021.05.19

(51) Int. Cl. *A61K 38/12* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
C07K 7/64 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)

(54) МУЛЬТИЭПИТОПНАЯ ВАКЦИНА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

(31) 63/027,150; 63/062,903; 63/140,917

(32) 2020.05.19; 2020.08.07; 2021.01.24

(33) US

(86) PCT/US2021/033222

(87) WO 2021/236809 2021.11.25

(88) 2021.12.30

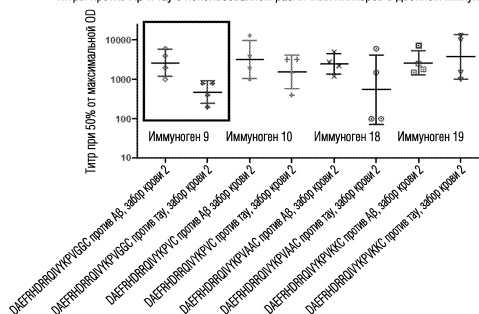
(71) Заявитель:
ОЗЕР ПРОТЕНА ЛИМИТЕД (IE)

(72) Изобретатель:
Барбур Робин, Кинни Джин, Заго
Вагнер, Ниджар Тарлочан С. (US)

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

(57) Изобретение относится к пептидным композициям и иммунотерапевтическим композициям, содержащим бета-амилоидный (A β) пептид и тау-пептид. Изобретение также относится к способам лечения или осуществления профилактики болезни Альцгеймера или других заболеваний с отложением бета-амилоида у субъекта, включая способы удаления отложений, ингибирования или снижения агрегации A β и/или тау, блокирования захвата нейронами, удаления амилоида и ингибирования размножения гранул тау у субъекта, страдающего или подверженного риску развития болезни Альцгеймера или других заболеваний, включающих накопление тау и/или бета-амилоида. Способы включают введение таким пациентам композиций, содержащих бета-амилоидный (A β) пептид и тау-пептид.

Титры против A β и тау с использованием различных линкеров в двойном иммуногене



A1

202293369

202293369

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-576553ЕА/032

МУЛЬТИЭПИТОПНАЯ ВАКЦИНА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 63/140917, поданной 24 января 2021 г., по предварительной заявке на патент США № 63/062903, поданной 7 августа 2020 г., и по предварительной заявке на патент США № 63/027150, поданной 19 мая 2020 г., каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

ЗАЯВЛЕНИЕ О СПИСКАХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Компьютерная форма списков последовательностей подается вместе с настоящей заявкой путем подачи в электронном виде и полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки. Список последовательностей содержится в файле, созданном 19 мая 2021 г., с названием «20-050-WO_Sequence-Listing_ST25.txt» и размером 183 КБ.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0003] Настоящее изобретение относится к областям иммунологии и медицины и, в частности, к лечению болезни Альцгеймера и других заболеваний, связанных с неправильным сворачиванием белков.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Болезнь Альцгеймера (БА) представляет собой прогрессирующее заболевание, приводящее к старческому слабоумию. В целом заболевание можно разделить на две категории: с поздним началом, которое возникает в пожилом возрасте (65+ лет), и с ранним началом, которое возникает задолго до старческого периода, т. е. между 35 и 60 годами. При обоих типах заболевания патология одинакова, но аномалии имеют тенденцию быть более тяжелыми и обширными в случае начала в более раннем возрасте. Заболевание характеризуется по меньшей мере двумя типами поражений головного мозга: нейрофибриллярными клубками и сенильными бляшками. Нейрофибриллярные клубки представляют собой внутриклеточные отложения ассоциированного с микротрубочками тау-белка, которые состоят из двух филаментов, попарно скрученных друг с другом. Сенильные бляшки (то есть амилоидные бляшки) представляют собой участки дезорганизованного нейропиля до 150 мкм в поперечнике с внеклеточными отложениями амилоида в центре, которые видны при микроскопическом анализе срезов ткани головного мозга. Накопление амилоидных бляшек в центральной нервной системе также связано с синдромом Дауна и другими когнитивными расстройствами, церебральной амилоидной ангиопатией (ЦАА) и возрастной макулярной дегенерацией сетчатки.

[0005] Основным компонентом бляшек является пептид, называемый А β или β -амилоидный пептид. Пептид А β представляет собой внутренний фрагмент размером 4 кДа, состоящий из 38-43 аминокислот более крупного трансмембранного гликопротеина, называемого белком-предшественником амилоида (APP). В результате протеолитического

процессинга APP различными секретазами, Аβ в основном обнаруживается как в короткой форме длиной 40 аминокислот, так и в длинной форме длиной от 42 до 43 аминокислот. Часть гидрофобного трансмембранного домена APP находится на карбокси-конце Аβ и может объяснять способность Аβ агрегировать в бляшки, особенно в случае длинной формы. Накопление амилоидных бляшек в головном мозге в итоге приводит к гибели нейронов. Когнитивные и физические симптомы, связанные с этим типом нарушения нервной системы, характерны для болезни Альцгеймера.

[0006] Другим белком, который, как сообщается, встречается в повышенных количествах у пациентов с болезнью Альцгеймера по сравнению с общей популяцией, является тау, основной компонент нейрофибриллярных клубков, которые вместе с амилоидными бляшками являются характерным признаком болезни Альцгеймера. Тау-клубки образуют аномальные фибриллы диаметром 10 нм, закрученные парами в спираль с периодичностью 80 нм. Тау-белок в нейрофибриллярных клубках аномально фосфорилирован (гиперфосфорилирован) фосфатными группами, присоединенными к определенным участкам молекулы. Скопление нейрофибриллярных клубков наблюдается в нейронах слоя II энторинальной коры, СА1 и субикулярных областях гиппокампа, миндалевидном теле и более глубоких слоях (слои III, V и внешний VI) неокортекса при болезни Альцгеймера. Известно, что патологии тау коррелируют со снижением когнитивных функций.

[0007] Соответственно, существует потребность в новых терапевтических средствах и реагентах для профилактики или лечения болезни Альцгеймера, в частности, в терапевтических средствах и реагентах, способных вызывать иммунный ответ на Аβ и тау, присутствующие у пациентов.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0008] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к полипептиду, содержащем первый пептид, содержащий 3-10 аминокислот из остатков 1-10 SEQ ID NO:01, связанный со вторым пептидом, включающим 3-13 аминокислот из остатков 244-400 SEQ ID NO:02. Например, второй пептид может относиться к области связывания микротрубочек (MTBR) тау (остатки 244-372 SEQ ID NO:02). Первый пептид может являться N-концевым относительно второго пептида, или первый пептид может являться C-концевым относительно второго пептида. Кроме того, первый пептид может включать аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 3-38 или SEQ ID NO: 1002-1057, а второй пептид может включать аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 39-56, 83-86 или 146-996. Например, первый полипептид может представлять собой DAEFRHD (SEQ ID NO:06), DAEFR (SEQ ID NO:08) или EFRHD (SEQ ID NO:21), а второй полипептид может представлять собой 5-13 аминокислот, например, QIVYKPV (SEQ ID NO:39), EIVYKSV (SEQ ID NO:42), EIVYKSP (SEQ ID NO:43), EIVYKPV (SEQ ID NO:44), NIKHVP (SEQ ID NO:48), VKSKIGST (SEQ ID NO:801), SKIGSTEN (SEQ ID NO:817), TENLKHQP (SEQ ID NO:695), ENLKHQPG (SEQ ID NO:689), SKIGSTDNIKH (SEQ ID NO:985), SKIGSKDNIKH (SEQ ID NO:986) или

SKIGSLDNIKH (SEQ ID NO:988).

[0009] В других вариантах осуществления первый пептид и второй пептид могут быть связаны расщепляемым линкером, который может представлять собой аминокислотную последовательность. Расщепляемый пептидный линкер, если он присутствует, может иметь длину 1-10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит примерно 1-10 аминокислот, примерно 1-9 аминокислот, примерно 1-8 аминокислот, примерно 1-7 аминокислот, примерно 1-6 аминокислот, примерно 1-5 аминокислот, примерно 1-4 аминокислоты, примерно 1-3 аминокислоты, примерно 2 аминокислоты или одну (1) аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый пептидный линкер представляет собой 1 аминокислоту, 2 аминокислоты, 3 аминокислоты, 4 аминокислоты, 5 аминокислот, 6 аминокислот, 7 аминокислот, 8 аминокислот, 9 аминокислот или 10 аминокислот. Например, линкер может представлять собой аргинин-аргинин (Arg-Arg), аргинин-валин-аргинин-аргинин (Arg-Val-Arg-Arg (SEQ ID NO:69)), валин-цитруллин (Val-Cit), валин-аргинин (Val-Arg), валин-лизин (Val-Lys), валин-аланин (Val-Ala), фенилаланин-лизин (Phe-Lys), глицин-аланин-глицин-аланин (Gly-Ala-Gly-Ala, SEQ ID NO:80), Ala-Gly-Ala-Gly (SEQ ID NO:81) или Lys-Gly-Lys-Gly (SEQ ID NO:82). В конкретных вариантах осуществления полипептид может представлять собой DAEFRHDDRQIVYKPV (SEQ ID NO:57), DAEFRHDDRREIVYKSV (SEQ ID NO:58), DAEFRHDDRRVKSIGSTGGC (SEQ ID NO:997), DAEFRHDDRRSKIGSTENGGC (SEQ ID NO:998), DAEFRHDDRTENLKHQPGGC (SEQ ID NO:999), DAEFRHDDRRENLKHQPGGGC (SEQ ID NO:1000) или DAEFRHDDRRSKIGSKDNIKHGGC (SEQ ID NO:1001).

[0010] В дополнительных вариантах осуществления полипептид может включать линкер к носителю на С-концевом участке полипептида или на N-концевом участке полипептида. Линкер, если он присутствует, может иметь длину от 1 до 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит примерно 1-10 аминокислот, примерно 1-9 аминокислот, примерно 1-8 аминокислот, примерно 1-7 аминокислот, примерно 1-6 аминокислот, примерно 1-5 аминокислот, примерно 1-4 аминокислоты, примерно 1-3 аминокислоты, примерно 2 аминокислоты или одну (1) аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой 1 аминокислоту, 2 аминокислоты, 3 аминокислоты, 4 аминокислоты, 5 аминокислот, 6 аминокислот, 7 аминокислот, 8 аминокислот, 9 аминокислот или 10 аминокислот. Например, линкер может включать аминокислотную последовательность GG, GGG, AA, AAA, KK, KKK, SS и SSS. Кроме того, линкер к носителю, если он присутствует на С-конце, может включать С-концевой цистеин (C). В альтернативном варианте линкер к носителю, если он присутствует на N-конце, может включать N-концевой цистеин (C). Например, полипептид может включать аминокислотную последовательность DAEFRHDDRQIVYKPVXXC (SEQ ID NO:70), где XX и C независимо друг от друга являются необязательными, и, если присутствует, XX может представлять собой GG, AA, KK, SS, GAGA (SEQ ID NO: 80), AGAG (SEQ ID NO:81) или KGKG (SEQ ID NO:82).

Например, полипептид может включать аминокислотную последовательность DAEFRHDRREIVYKSVXXC (SEQ ID NO:79), где XX и C независимо друг от друга являются необязательными, и, если присутствует, XX может представлять собой GG, AA, KK, SS, GAGA (SEQ ID NO: 80), AGAG (SEQ ID NO:81) и KGKG (SEQ ID NO:82).

[0011] В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к иммунотерапевтической композиции, включающей полипептиды по настоящему изобретению, где полипептид может быть связан с носителем. Носитель может включать сывороточные альбумины, молекулы иммуноглобулина, тиреоглобулин, овальбумин, столбнячный анатоксин (ТТ), дифтерийный анатоксин (ДТ), генетически модифицированный перекрестно реагирующий мутант (CRM) дифтерийного токсина, CRM197, менингококковый белковый комплекс наружной мембраны (ОМРС) и белок D (HiD) *H. influenzae*, rEPA (экзотоксин A из *Pseudomonas aeruginosa*), KLN (гемоцианин лимфы улитки) и флагеллин.

[0012] Кроме того, варианты осуществления настоящего изобретения относятся к фармацевтическому составу, включающему полипептиды или иммунотерапевтические композиции по настоящему изобретению и включающему по меньшей мере один адъювант. Адъювант может представлять собой гидроксид алюминия, фосфат алюминия, сульфат алюминия, 3-О-деацилированный монофосфориллипид A (MPL), QS-21, QS-18, QS-17, QS-7, TQL1055, полный адъювант Фрейнда (CFA), неполный адъювант Фрейнда (IFA), эмульсии масло-в-воде (такие как сквален или арахисовое масло), CpG, полиглутаминовую кислоту, полилизин, AddaVax™, MF59® и их комбинации. Кроме того, состав может включать липосомальный состав, разбавитель или мультиантигенпредставляющую систему (MAP). MAP может включать один или более дендритных каркасов на основе Lys, хелперные Т-клеточные эпитопы, иммуностимулирующие липофильные фрагменты, проникающие в клетку пептиды, индуцированную радикалами полимеризацию, самособирающиеся наночастицы в качестве антигенпредставляющих платформ и наночастицы золота.

[0013] Кроме того, варианты осуществления настоящего изобретения относятся к иммунотерапевтической композиции, включающей первую пептидную последовательность, содержащую 3-10 аминокислотных остатков из первых десяти N-концевых остатков SEQ ID NO:01, и вторую пептидную последовательность, содержащую 3-13 аминокислот из остатков 244-400 SEQ ID NO:02. Первый пептид может включать аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 3-38 или SEQ ID NO: 1002-1057, и второй пептид может включать аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 39-56, SEQ ID NO:83-86 или SEQ ID NO:146-996. Каждый из первого пептида и второго пептида может включать линкер к носителю на С-концевом участке полипептида или на N-концевом участке полипептида. При наличии, линкер может включать аминокислотную последовательность, выбранную из GG, GGG, AA, AAA, KK, KKK, SS, SSS, GAGA (SEQ ID NO:80), AGAG (SEQ ID NO:81) и KGKG (SEQ ID NO:82) и может включать С-концевой цистеин (C). В некоторых вариантах осуществления, где С-

концевые остатки в иммуногене представляют собой IVYKPV (SEQ ID NO:194), VYKPV (SEQ ID NO:195), YKPV (SEQ ID NO:196), KPV или PV, линкер представляет собой аминокислотный линкер, который не имеет N-концевого глицина (например, GG, GAGA (SEQ ID NO:80)). Носитель может включать сывороточные альбумины, молекулы иммуноглобулина, тиреоглобулин, овальбумин, столбнячный анатоксин (ТТ), дифтерийный анатоксин (ДТ), генетически модифицированный перекрестно реагирующий мутант (CRM) дифтерийного токсина, CRM197, менингококковый белковый комплекс наружной мембраны (ОМРС) и белок D (HiD) *H. influenzae*, rЕРА (экзотоксин А из *Pseudomonas aeruginosa*), КЛН (гемоцианин лимфы улитки) и флагеллин.

[0014] Кроме того, иммунотерапевтическая композиция может включать по меньшей мере один фармацевтически приемлемый разбавитель и/или мультиантигенпредставляющую систему (МАР). МАР может включать один или более дендритных каркасов на основе Lys, хелперные Т-клеточные эпитопы, иммуностимулирующие липофильные фрагменты, проникающие в клетку пептиды, индуцированную радикалами полимеризацию, самособирающиеся наночастицы в качестве антигенпредставляющих платформ и наночастицы золота.

[0015] Иммунотерапевтическая композиция может быть включена в фармацевтическую композицию, включающую иммунотерапевтическую композицию и по меньшей мере один адъювант, такой как гидроксид алюминия, фосфат алюминия, сульфат алюминия, 3-О-деацилированный монофосфориллипид А (МРЛ), QS-21, QS-18, QS-17, QS-7, TQL1055, полный адъювант Фрейнда (CFA), неполный адъювант Фрейнда (IFA), эмульсии масло-в-воде (например, сквален или арахисовое масло), CpG, полиглутаминовая кислота, полилизин, AddaVax™, MF59® и их комбинации.

[0016] Варианты осуществления настоящего изобретения также относятся к последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим полипептиды и иммунотерапевтические композиции по настоящему изобретению. Нуклеиновые кислоты могут быть включены в иммунотерапевтическую композицию на основе нуклеиновых кислот, включающую нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один адъювант.

[0017] Кроме того, варианты осуществления настоящего изобретения относятся к способам лечения или осуществления профилактики болезни Альцгеймера у субъекта, а также к способам ингибирования или снижения агрегации по меньшей мере одного из A β и тау у субъекта, имеющего или подверженного риску развития болезни Альцгеймера. Способы включают введение субъекту иммунотерапевтической композиции, иммунотерапевтической композиции на основе нуклеиновых кислот или фармацевтического состава по настоящему изобретению.

[0018] Способы по настоящему изобретению могут включать в себя повторное введение по меньшей мере второй раз, по меньшей мере третий раз, по меньшей мере четвертый раз, по меньшей мере пятый раз или по меньшей мере шестой раз и могут включать повторное введение с интервалом от примерно 21 до примерно 28 дней.

[0019] Кроме того, способы по настоящему изобретению направлены на индукцию

иммунного ответа у животного. Способы включают введение животному полипептида, иммунотерапевтической композиции, фармацевтического состава или иммунотерапевтической композиции на основе нуклеиновых кислот по настоящему изобретению по схеме, эффективной для генерирования иммунного ответа, включая антитела, которые специфично связываются с Аβ, тау или как с Аβ, так и с тау. Иммунный ответ может включать антитела, которые специфично связываются с N-концевой областью Аβ и/или областью связывания микротрубочек тау.

[0020] В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к набору для иммунизации, включающему иммунотерапевтическую композицию по настоящему изобретению, и может включать адъювант, где иммунотерапевтическая композиция может находиться в первом контейнере, а адъювант может находиться во втором контейнере.

[0021] Кроме того, настоящее изобретение относится к набору, включающему иммунотерапевтическую композицию на основе нуклеиновых кислот по настоящему изобретению, и может включать адъювант. Нуклеиновая кислота может находиться в первом контейнере, а адъювант может находиться во втором контейнере.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0022] На фиг. 1 показаны результаты эксперимента по сравнению средних геометрических титров сыворотки морской свинки для иммуногена DAEFRHDDRQIVYKPV (SEQ ID NO:57) против аминокислот 1-28 мономерного Аβ (DAEFRHDSGYEVHHQKLFFAEDVGSNKG; SEQ ID NO:67), растворимых агрегатов Аβ (Аβ 42), полноразмерного тау и MTBR-эпитопа тау, содержащего GGGSVQIVYKPV DLS (SEQ ID NO:68), содержащих N-концевой биотин.

[0023] На фиг. 2А показаны результаты эксперимента по сравнению титров сыворотки морской свинки для иммуногена с одним пептидом и иммуногенов с двумя пептидами по настоящему изобретению против всех форм Аβ и полноразмерного тау-белка (DAEFRHD представляет собой SEQ ID NO:6; QIVYKPV представляет собой SEQ ID NO: 39; DAEFRHDDRQIVYKPV представляет собой SEQ ID NO: 57).

[0024] На фиг. 2В показаны результаты эксперимента по сравнению титров сыворотки морской свинки для иммуногена с одним пептидом и иммуногенов с двумя пептидами по настоящему изобретению против всех формы Аβ и полноразмерного тау-белка (DAEFRHD представляет собой SEQ ID NO:6; QIVYKPV представляет собой SEQ ID NO:39; EIVYKSP представляет собой SEQ ID NO:43; DAEFRHDDRQIVYKPV представляет собой SEQ ID NO:57).

[0025] На фиг. 3А показано окрашивание патологических Аβ и тау в свежемороженой ткани головного мозга человека с БА с использованием сыворотки (разведение 1:300) морской свинки, иммунизированной иммуногеном 9 (DAEFRHDDRQIVYKPVGGC; SEQ ID NO:59).

[0026] На фиг. 3В показано окрашивание патологических Аβ и тау в свежемороженой ткани головного мозга человека с БА с использованием сыворотки

(разведение 1:300) морской свинки, иммунизированной иммуногеном 9 (DAEFRHDDRQIVYKPVGGC; SEQ ID NO:59).

[0027] На фиг. 3C показано окрашивание патологических A β и тау в свежемороженой ткани головного мозга человека с БА с использованием сыворотки (разведение 1:1500) морской свинки, иммунизированной иммуногеном 9 (DAEFRHDDRQIVYKPVGGC; SEQ ID NO:59).

[0028] На фиг. 3D показано отсутствие окрашивания патологических A β и тау в свежемороженой ткани головного мозга человека с БА с использованием сыворотки (разведение 1:300) неиммунизированной морской свинки.

[0029] На фиг. 3E показано отсутствие окрашивания патологических A β и тау в свежемороженой ткани головного мозга человека с БА с использованием сыворотки (разведение 1:300) неиммунизированной морской свинки.

[0030] На фиг. 3F показано отсутствие окрашивания патологических A β и тау в свежемороженой ткани головного мозга человека с БА с использованием сыворотки (разведение 1:1500) неиммунизированной морской свинки.

[0031] На фиг. 4A показано, что сыворотка морской свинки от животных, иммунизированных двойным иммуногенным пептидом, DAEFRHDDRQIVYKPVGGC (SEQ ID NO: 59; иммуноген 9), ингибировала связывание растворимых агрегатов A β с первичными нейронами дозозависимым образом.

[0032] На фиг. 4B показаны примеры окрашивания антителами первичных нейронов в присутствии или в отсутствие сыворотки морской свинки от животных, иммунизированных двойным иммуногенным пептидом, DAEFRHDDRQIVYKPVGGC (SEQ ID NO:59; иммуноген 9).

[0033] На фиг. 5A показано, что мыши, иммунизированные дупептидными антигенами с различными линкерами, продуцируют сходные титры к A β и тау.

[0034] На фиг. 5B показано, что мыши, иммунизированные дупептидными антигенами с последовательностью тау EIVYKSP (SEQ ID NO:43), продуцируют титры к A β и тау.

[0035] На фиг. 6A показано окрашивание патологических A β и тау в свежемороженой ткани головного мозга человека с БА с использованием сыворотки (разведение 1:1000) мыши, иммунизированной иммуногеном 19.

[0036] На фиг. 6B показано окрашивание патологических A β и тау в свежемороженой ткани головного мозга человека с БА с использованием сыворотки (разведение 1:1000) мыши, иммунизированной иммуногеном 19.

[0037] На фиг. 6C показано отсутствие окрашивания патологических A β и тау в свежемороженой ткани головного мозга человека с БА с использованием сыворотки (разведение 1:1000) неиммунизированной мыши.

[0038] На фиг. 6D показано окрашивание патологического тау в свежемороженой ткани головного мозга человека с БА с использованием антитела против тау, m6H3 (0,1 мкг/мл).

[0039] На фиг. 6Е показано сравнимое окрашивание патологического тау в свежемороженой ткани головного мозга человека с БА с использованием сыворотки (разведение 1:1500) морской свинки, иммунизированной иммуногеном 9 (DAEFRHDDRQIVYKPVGGC; SEQ ID NO:59).

[0040] На фиг. 7А и 7В показаны титры для двойного иммуногена к Аβ-тау при двух схемах инъекций. Титры к Аβ1-28, полноразмерному тау-белку и белку-носителю, CRM, при двух схемах введения ((фиг. 7А) показаны 0, 4, 12 и 24 недели; (фиг. 7В) показаны 0, 8 и 24 недели) в течение эксперимента выражены как средний титр +/- SEM.

[0041] На фиг. 8А показаны титры у отдельных животных к Аβ и тау через две недели после каждой инъекции для схемы инъекций, показанной на фиг. 7А, т.е. на 2-й, 6-й, 14-й и 26-й неделе.

[0042] На фиг. 8В показаны титры у отдельных животных к Аβ и тау через две недели после каждой инъекции для схемы инъекций, показанной на фиг. 7В, т.е. на 2-й, 14-й и 26-й неделе.

[0043] На фиг. 9А показано окрашивание патологических Аβ и тау в свежемороженой ткани головного мозга человека с БА с использованием сыворотки от 26-й недели (разведение 1:300) яванского макака № 1001, иммунизированного иммуногеном 15 (DAEFRHDDRQIVYKPVGGC; SEQ ID NO: 59) по схеме иммунизации с четырьмя инъекциями.

[0044] На фиг. 9В показано увеличенное изображение прямоугольника, указывающего на окрашивание патологического Аβ на фиг. 9А.

[0045] На фиг. 9С показано увеличенное изображение прямоугольника, указывающего на окрашивание патологического тау на фиг. 9А.

[0046] На фиг. 10А показано окрашивание патологического Аβ в свежемороженой ткани головного мозга человека с БА с использованием сыворотки (разведение 1:300) яванского макака № 1003, иммунизированного иммуногеном 15 (DAEFRHDDRQIVYKPVGGC; SEQ ID NO: 59).

[0047] На фиг. 10В показано незначительное окрашивание патологического тау в свежемороженой ткани головного мозга человека с БА с использованием сыворотки (разведение 1:300) яванского макака № 1003.

[0048] На фиг. 11А показано окрашивание патологического Аβ в свежемороженой ткани головного мозга человека с БА с использованием сыворотки (разведение 1:300) яванского макака № 1501, иммунизированного иммуногеном 15 (DAEFRHDDRQIVYKPVGGC; SEQ ID NO: 59).

[0049] На фиг. 11В показано минимальное окрашивание патологического тау в свежемороженой ткани головного мозга человека с БА с использованием сыворотки (разведение 1:300) яванского макака № 1501.

[0050] На фиг. 12А показано окрашивание патологического Аβ в свежемороженой ткани головного мозга человека с AD с использованием сыворотки (разведение 1:300) яванского макака № 2501, иммунизированного иммуногеном 15

(DAEFRHDDRQIVYKPVGGC; SEQ ID NO: 59).

[0051] На фиг. 12B показано отсутствие окрашивания патологического тау в свежемороженой ткани головного мозга человека с БА с использованием сыворотки (разведение 1:300) яванского макака № 2501.

[0052] На фиг. 13 показаны титры у животных к Аβ и тау через 9 недель после инъекции в день 0, через 4 недели и через 8 недель для двойных конструкций Аβ-тау: DAEFRHDRVKSKIGSTGGC (SEQ ID NO:997), DAEFRHRRSKIGSTENGGC (SEQ ID NO:998), DAEFRHDDRRTENLKHQPGGC (SEQ ID NO:999), DAEFRHDDRENLKHQPGGGC (SEQ ID NO:1000) и DAEFRHRRSKIGSKDNIKHGGC (SEQ ID NO:1001).

[0053] На фиг. 14 показано блокирование связывания тау с гепарином сывороткой после иммунизации конструкциями Аβ-тау: DAEFRHDRVKSKIGSTGGC (SEQ ID NO:997), DAEFRHRRSKIGSTENGGC (SEQ ID NO:998), DAEFRHDDRRTENLKHQPGGC (SEQ ID NO:999), DAEFRHDDRENLKHQPGGGC (SEQ ID NO:1000) и DAEFRHRRSKIGSKDNIKHGGC (SEQ ID NO:1001).

[0054] На фиг. 15A показана конкуренция тау с сывороткой после иммунизации конструкцией DAEFRHDRVKSKIGSGTGGC (SEQ ID NO:997).

[0055] На фиг. 15B показана конкуренция тау с сывороткой после иммунизации конструкцией DAEFRHRRSKIGSTENGGC (SEQ ID NO:998).

[0056] На фиг. 15C показана конкуренция тау с сывороткой после иммунизации конструкцией DAEFRHDDRRTENLKHQPGGC (SEQ ID NO:999).

[0057] На фиг. 15D показана конкуренция тау с сывороткой после иммунизации конструкцией DAEFRHDDRENLKHQPGGGC (SEQ ID NO:1000).

[0058] На фиг. 15E показана конкуренция тау с сывороткой после иммунизации конструкцией DAEFRHRRSKIGSKDNIKHGGC (SEQ ID NO:1001).

[0059] На фиг. 15F показана конкуренция тау с сывороткой из контролей.

[0060] На фиг. 15G показана конкуренция тау с сывороткой после иммунизации конструкцией DAEFRHRRSKIGSKDNIKHGGC (SEQ ID NO:1001).

[0061] На фиг. 16A показаны результаты для сыворотки мышей, иммунизированных двойной вакциной Abeta/Tau 2.3_031521 (1:300), пример окрашивания сывороткой после иммуногена DAEFRHDRVKSKIGTGGC (SEQ ID NO:997).

[0062] На фиг. 16B показаны результаты для сыворотки мышей, иммунизированных двойной вакциной Abeta/Tau 3.1_031521 (1:300), пример окрашивания сывороткой после иммуногена DAEFRHRRSKIGSTENGGC (SEQ ID NO:998).

[0063] На фиг. 16C показаны результаты для сыворотки мышей, иммунизированных двойной вакциной Abeta/Tau 8.4_031521 (1:300), пример окрашивания сывороткой после иммуногена DAEFRHDDRRTENLKHQPGC (SEQ ID NO:999).

[0064] На фиг. 16D показаны результаты для сыворотки мышей, иммунизированных двойной вакциной Abeta/Tau 9.2_031521 (1:300), пример окрашивания сывороткой после иммуногена DAEFRHDDRENLKHQPGGGC (SEQ ID NO:1000).

[0065] На фиг. 16E показаны результаты для сыворотки мышей, иммунизированных двойной вакциной Abeta/Tau 11.1_031521 (1:300), пример окрашивания сывороткой после иммуногена DAEFRHRRSKIGSKDNIKHGGC (SEQ ID NO: 1001).

ОПИСАНИЕ

[0066] Настоящее изобретение относится к пептидным композициям и иммунотерапевтическим композициям, содержащим бета-амилоидный пептид (A β) и тау-пептид. В изобретении также предложены способы лечения или осуществления профилактики болезни Альцгеймера или других заболеваний с отложением бета-амилоида у субъекта, включая способы устранения и предотвращения образования отложений, ингибирования или снижения агрегации A β и/или тау, блокирования связывания и/или поглощения A β и/или тау нейронами, ингибирования передачи молекул тау между клетками и ингибирования распространения патологии между областями мозга у субъекта, имеющего или подверженного риску развития болезни Альцгеймера или других заболеваний, включающих накопление тау и/или бета-амилоида. Способы включают введение таким пациентам композиций, содержащих бета-амилоидный (A β) пептид и тау-пептид.

[0067] Ряд терминов определен ниже. Используемые в настоящем документе формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если из контекста явно не следует иное. Например, термин «соединение» или «по меньшей мере одно соединение» может включать множество соединений, включая их смеси.

[0068] Если иное не следует из контекста, термин «примерно» включает незначительные вариации, такие как значения в пределах стандартной погрешности измерения (например, SEM) заявленного значения. Например, термин «примерно», используемый в данном документе применительно к измеримому значению, такому как параметр, количество, время, может охватывать вариации +/-10% или меньше, +/-5% или меньше или +/-1% или меньше от указанного значения. Диапазон значений включает все целые числа в пределах диапазона или его границы и все поддиапазоны, определяемые целыми числами в пределах диапазона. В данном контексте статистическая значимость означает $p \leq 0,05$.

[0069] Композиции или способы, «содержащие» или «включающие» один или более перечисленных элементов, могут включать другие элементы, конкретно не указанные. Например, композиция, которая «содержит» или «включает» полипептидную последовательность, может содержать последовательность отдельно или в сочетании с другими последовательностями или ингредиентами.

[0070] Индивидуум подвергается повышенному риску заболевания, если у субъекта есть по меньшей мере один известный фактор риска (например, возраст, генетика, биохимия, семейный анамнез и ситуационное воздействие), который обуславливает у индивидуумов с этим фактором риска статистически значимый больший риск развития заболевания, чем у лиц без фактора риска.

[0071] Термин «пациент» включает людей и других млекопитающих, которые получают либо профилактическое, либо терапевтическое лечение, включая субъектов, ранее не получавших лечения. Используемые в настоящем документе термины «субъект» или «пациент» относятся к любому отдельному субъекту, для которого требуется лечение, включая других субъектов-млекопитающих, таких как люди, крупный рогатый скот, собаки, морские свинки, кролики и т.д. Также предполагается, что в качестве субъекта включаются любые субъекты, участвующие в клинических исследованиях, не демонстрирующие каких-либо клинических признаков заболевания, или субъекты, участвующие в эпидемиологических исследованиях, или субъекты, используемые в качестве контроля.

[0072] Термин «заболевание» относится к любому аномальному состоянию, которое нарушает физиологическую функцию. Термин используется в широком смысле, чтобы охватить любое нарушение, заболевание, аномалию, патологию, недомогание, состояние или синдром, при котором физиологические функции нарушены, независимо от характера этиологии.

[0073] Термин «симптом» относится к субъективному признаку заболевания, такому как изменение походки, воспринимаемому субъектом. «Признак» относится к объективным признакам заболевания, наблюдаемым врачом.

[0074] Используемые в настоящем документе термины «лечить» и «лечение» относятся к облегчению или улучшению одного или более симптомов или эффектов, связанных с заболеванием, предотвращению, ингибированию или задержке появления одного или более симптомов или эффектов заболевания, уменьшению тяжести или частоты одного или более симптомов или эффектов заболевания и/или усилению или тенденции к достижению желаемых результатов, описанных в настоящем документе.

[0075] Термины «профилактика», «предотвращать» или «предотвращение», используемые в настоящем документе, относятся к контакту (например, введению) пептидных или иммунотерапевтических композиций по настоящему изобретению субъекту до начала заболевания с уже присутствующей патологией Аβ и/или тау или без них (первичная и вторичная профилактика), в результате чего задерживается появление клинических симптомов и/или облегчаются симптомы заболевания после начала заболевания по сравнению с тем, когда субъект не контактирует с пептидными или иммунотерапевтическими композициями, и не относится к полному предотвращению начала заболевания. В некоторых случаях профилактика может иметь место в течение ограниченного времени после введения пептидных или иммунотерапевтических композиций по настоящему изобретению. В других случаях профилактика может иметь место в течение всего периода лечения, включающего введение пептидных или иммунотерапевтических композиций по настоящему изобретению.

[0076] Термины «уменьшение», «уменьшать» или «уменьшающий», используемые в данном документе, относятся к уменьшению количества Аβ и/или тау, присутствующего у субъекта или в ткани субъекта, или к подавлению увеличения количества Аβ и/или тау,

присутствующего у субъекта или в ткани субъекта, что включает снижение или подавление увеличения (например, снижение скорости увеличения) количества Аβ и/или тау, присутствующего, накапливаемого, агрегированного или депонированного у субъекта или в ткани субъекта. В некоторых вариантах осуществления уменьшение или подавление увеличения (например, снижение скорости увеличения) количества Аβ и/или тау, присутствующего, накапливаемого, агрегированного или депонированного у субъекта, относится к количеству Аβ и/или тау, присутствующего, накапливаемого, агрегированного или депонированного в центральной нервной системе (ЦНС) субъекта. В некоторых вариантах осуществления уменьшение или подавление увеличения (например, снижение скорости увеличения) количества Аβ и/или тау, присутствующего, накапливаемого, агрегированного или депонированного у субъекта, относится к количеству Аβ и/или тау, присутствующего, накапливаемого, агрегированного или депонированного в периферической области (например, в периферической системе кровообращения) субъекта. В некоторых вариантах осуществления уменьшение или подавление увеличения (например, снижение скорости увеличения) количества Аβ и/или тау, присутствующего, накапливаемого, агрегированного или депонированного у субъекта, относится к количеству Аβ и/или тау, присутствующего, накапливаемого, агрегированного или депонированного в мозге субъекта. В некоторых вариантах осуществления уменьшение Аβ и/или тау относится к патологической(им) форме(ам) Аβ (например, отложению внеклеточных бляшек β-амилоидного пептида (Аβ), нейритным амилоидным бляшкам) и/или тау (например, нейрофибриллярным клубкам тау, дистрофическим нейритам). В других вариантах осуществления снижаются патологические индикаторы нейродегенеративного заболевания.

[0077] Термины «эпитоп» или «антигенная детерминанта» относятся к участку антигена, на который реагируют В- и/или Т-клетки, или к участку антигена, с которым связывается антитело. Эпитопы могут формироваться как смежными аминокислотами, так и несмежными аминокислотами, сближающимися в результате третичной укладки белка. Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, обычно сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные в результате третичной укладки, обычно теряются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп обычно включает по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12 или по меньшей мере 13 аминокислот в уникальной пространственной конфигурации. Методы определения пространственной конформации эпитопов включают, например, рентгеновскую кристаллографию и двумерный ядерно-магнитный резонанс. См., например, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996).

[0078] «Иммуногенный агент» или «иммуноген», или «антиген» способен индуцировать иммунологический ответ против самого себя или модифицированных/процессированных версий самого себя при введении животному,

необязательно в сочетании с адъювантом. Термины «иммуногенный агент», «иммуноген» или «антиген» относятся к соединению или композиции, содержащим пептид, полипептид или белок, которые являются «антигенными» или «иммуногенными» при введении в соответствующем количестве («иммуногенно эффективное количество»), т.е. способном индуцировать, вызывать, увеличивать или усиливать клеточный и/или гуморальный иммунный ответ и распознаваться продуктами этого ответа (Т-клетками, антителами). Иммуноген может представлять собой пептид или комбинацию двух или более одинаковых или различных пептидов, которые включают по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12 или по меньшей мере 13 аминокислот в линейной или пространственной конформации.

[0079] Иммуноген может быть эффективным при введении отдельно или в комбинации, или в сочетании или в слитом виде с другим веществом (которое можно вводить одновременно или через несколько интервалов). Иммуногенный агент или иммуноген может включать антигенный пептид или полипептид, который связан с носителем, как описано в настоящем документе.

[0080] Нуклеиновая кислота, такая как ДНК или РНК, которая кодирует антигенный пептид или полипептид, называется «иммуногенная ДНК [или РНК]», поскольку кодируемый пептид или полипептид экспрессируется *in vivo* после введения ДНК или РНК. Пептид или полипептид можно рекомбинантно экспрессировать на основе вакцинного вектора, который может представлять собой «голую» ДНК или РНК, содержащую последовательность, кодирующую пептид или полипептид, функционально связанную с промотором, например, экспрессионным вектором или кассетой, как описано в настоящем документе.

[0081] Термин «адъювант» относится к соединению, которое при введении в сочетании с антигеном усиливает иммунный ответ на антиген, но при введении отдельно не вызывает иммунного ответа на антиген. Адъюванты могут усиливать иммунный ответ несколькими механизмами, включая рекрутирование лимфоцитов, стимуляцию В- и/или Т-клеток и стимуляцию макрофагов. Адъювант может представлять собой природное соединение, модифицированную версию или производное природного соединения или синтетическое соединение.

[0082] Термины «пептид» и «полипептид» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к цепи из двух или более последовательных аминокислот. При возникновении различий между этими двумя терминами, смысл будет ясен из контекста. Например, если два или более пептидов, описанных в настоящем документе, соединяются для получения димерного или мультимерного пептида, полипептид может использоваться для обозначения «поли» или «более одного» пептида.

[0083] Термин «фармацевтически приемлемый» означает, что носитель, разбавитель, эксципиент, адъювант или вспомогательное вещество совместимы с другими ингредиентами фармацевтического состава и не оказывают существенного вредного

воздействия на реципиента.

[0084] Термины «иммунотерапия» или «иммунный ответ» относятся к развитию полезного гуморального (опосредованного антителами) и/или клеточного (опосредованного антиген-специфичными Т-клетками или продуктами их секреции) ответа, направленного против Аβ и/или тау-пептида у реципиента. Такой ответ может быть активным ответом, индуцированным введением иммуногена (например, Аβ и/или тау-пептида). Клеточный иммунный ответ вызывается презентацией полипептидных эпитопов в ассоциации с молекулами МНС класса I или класса II для активации антиген-специфичных CD4⁺ Т-хелперных клеток и/или CD8⁺ цитотоксических Т-клеток. Ответ может также включать активацию моноцитов, макрофагов, NK-клеток, базофилов, дендритных клеток, астроцитов, клеток микроглии, эозинофилов или других компонентов врожденного иммунитета. Наличие клеточно-опосредованного иммунологического ответа можно определить с помощью анализа пролиферации (CD4⁺ Т-клетки) или анализа ЦТЛ (цитотоксических Т-лимфоцитов). Относительный вклад гуморального и клеточного ответов в защитный или терапевтический эффект иммуногена можно определить путем отдельного выделения антител и Т-клеток из иммунизированного сингенного животного и измерения защитного или терапевтического эффекта у второго субъекта.

[0085] Бета-амилоид (Аβ)

[0086] Пептид Аβ (также называемый в данном документе бета-амилоидным пептидом или Abeta) представляет собой внутренний фрагмент приблизительно 4 кДа из 38-43 аминокислот APP (Аβ39, Аβ40, Аβ41, Аβ42 и Аβ43). Аβ40, например, состоит из остатков 672-711 APP, а Аβ42 состоит из остатков 673-713 APP. В результате протеолитического процессинга APP различными ферментами секретазами *in vivo* или *in situ* Аβ обнаруживается как в «короткой форме», состоящей из 40 аминокислот, так и в «длинной форме», состоящей из 42-43 аминокислот в длину. Эпитопы или антигенные детерминанты, описанные в настоящем документе, расположены на N-конце пептида Аβ и включают остатки в пределах аминокислот 1-10 и 12-25 Аβ, например, остатки 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7 или 3-7, 2-4, 2-5, 2-6, 2-7 или 2-8 Аβ, остатки 3-5, 3-6, 3-7, 3-8 или 3-9 Аβ, или остатки 4-7, 4-8, 4-9 или 4-10, остатки 12-24, 12-23, 12-22, 13-25, 13-24, 13-23, 13-22, 14-25, 14-24, 14-23, 14-22, 15-25, 15-24, 15-23 или 15-22 Аβ. Например, остатки 12-17, 12-18, 12-19, 12-20, 12-21, 13-17, 13-18, 13-19, 13-20, 13-21, 13-22, 14-17, 14-18, 14-19, 14-20, 14-21, 14-22, 14-23, 15-17, 15-18, 15-19, 15-20, 15-21, 15-22, 15-23 или 15-24 Аβ42. Дополнительные примеры эпитопов или антигенных детерминант включают остатки 16-18, 16-19, 16-20, 16-21, 16-22, 16-23, 16-24, 16-25, 17-19, 17-20, 17-21, 17-22, 17-23, 17-24 или 17-25 Аβ42. Другие примеры эпитопов или антигенных детерминант включают остатки 18-20, 18-21, 18-22, 18-23, 18-24, 18-25, 19-21, 19-22, 19-23, 19-24, 19-25, 20-22, 20-23, 20-24, 20-25, 21-23, 21-24 или 21-25 Аβ42.

[0087] Аβ (Abeta) является основным компонентом характерных бляшек при болезни Альцгеймера. Аβ образуется путем процессинга более крупного белка APP двумя ферментами, называемыми бета- и гамма-секретазами. Известные мутации APP,

связанные с болезнью Альцгеймера, возникают вблизи сайта расщепления бета- или гамма-секретазой или внутри Аβ. Часть гидрофобного трансмембранного домена APP находится на карбокси-конце Аβ и может объяснять способность Аβ агрегировать в бляшки, особенно в случае длинной формы. Накопление амилоидных бляшек в головном мозге в итоге приводит к гибели нейронов. Физические симптомы, связанные с этим типом повреждения нервной системы, характерны для болезни Альцгеймера.

[0088] **Tau**

[0089] Tau представляет собой белок с молекулярной массой около 50000, который обычно присутствует в нервных аксонах и т.п. и способствует стабильности микротрубочек. Тау-белки (или τ-белки) представляют собой группу из шести высокорастворимых изоформ белков, полученных путем альтернативного сплайсинга гена MART (ассоциированный с микротрубочками белок тау). Они играют роль прежде всего в поддержании стабильности микротрубочек в аксонах и в избытке присутствуют в нейронах центральной нервной системы (ЦНС). Они менее распространены в других местах, но также экспрессируются на очень низком уровне в астроцитах и олигодендроцитах ЦНС. Патологии и деменции нервной системы, такие как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона, связаны с тау-белками, которые превратились в гиперфосфорилированные нерастворимые агрегаты, называемые нейрофибриллярными клубками. Патогенные виды тау вызывают токсические эффекты за счет прямого связывания с клетками и/или накопления внутри клеток и/или инициирования процессов неправильной укладки (затравки) и могут распространяться от одной клетки к другой путем передачи от клетки к клетке. Токсичность также может быть вызвана нейрофибриллярными клубками (NFT), что приводит к гибели клеток и снижению когнитивных функций. Другие таупатии включают, например, прогрессирующий надъядерный паралич, кортико-базальный синдром, некоторые виды лобно-височной деменции и хроническую травматическую энцефалопатию.

[0090] **Полипептиды Аβ/Tau иммуногена**

[0091] Агент, используемый для активной иммунизации, может индуцировать у пациента иммунный ответ и может служить иммунотерапевтическим средством. Агенты, используемые для активной иммунизации, могут быть, например, такими же типами иммуногенов, которые используются для получения моноклональных антител у лабораторных животных, и могут включать 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 или большее количество смежных аминокислот из области Аβ и/или тау-пептида. В каждом из вариантов осуществления пептидов, описанных в настоящем документе, пептиды могут содержать, состоять или по существу состоять из указанных последовательностей.

[0092] В некоторых вариантах осуществления изобретения иммуноген Аβ/тау может включать пептид Аβ, содержащий 3-10 аминокислот из остатков 1-10 или 12-25 N-концевой последовательности Аβ (SEQ ID NO:01), связанный с тау-пептидом, содержащим 3-10 аминокислот из остатков 244-400 длинной формы тау (SEQ ID NO:02). Например, тау-пептид может содержать 3-13 аминокислот из области связывания

микротрубочек тау-белка (остатки 344-372 SEQ ID NO:02).

[0093] В некоторых вариантах осуществления изобретения пептид A β может включать 3-10 аминокислот из остатков 1-10 или 12-25 DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGGVIA (SEQ ID NO:01).

Например, пептид A β выбирают из нижеследующего:

DAEFRHDSGY	(SEQ ID NO:03),
DAEFRHDSG	(SEQ ID NO:04),
DAEFRHDS	(SEQ ID NO:05),
DAEFRHD	(SEQ ID NO:06),
DAEFRH	(SEQ ID NO:07),
DAEFR	(SEQ ID NO:08),
DAEF	(SEQ ID NO:09),
DAE	(SEQ ID NO:10),
AEFRHDSGY	(SEQ ID NO:11),
AEFRHDSG	(SEQ ID NO:12),
AEFRHDS	(SEQ ID NO:13),
AEFRHD	(SEQ ID NO:14),
AEFRH	(SEQ ID NO:15),
AEFR	(SEQ ID NO:16),
AEF	(SEQ ID NO:17),
EFRHDSGY	(SEQ ID NO:18),
EFRHDSG	(SEQ ID NO:19),
EFRHDS	(SEQ ID NO:20),
EFRHD	(SEQ ID NO:21),
EFRH	(SEQ ID NO:22),
EFR	(SEQ ID NO:23),
FRHDSGY	(SEQ ID NO:24),
FRHDSG	(SEQ ID NO:25),
FRHDS	(SEQ ID NO:26),
FRHD	(SEQ ID NO:27),
FRH	(SEQ ID NO:28),
RHDSGY	(SEQ ID NO:29),
RHDSG	(SEQ ID NO:30),
RHDS	(SEQ ID NO:31),
RHD	(SEQ ID NO:32),

HDSGY	(SEQ ID NO:33),
HDSG	(SEQ ID NO:34),
HDS	(SEQ ID NO:35),
DSGY	(SEQ ID NO:36),
DSG	(SEQ ID NO:37),
SGY	(SEQ ID NO:38),
VHHQKLVFFA	(SEQ ID NO:1002),
VHHQKLVFF	(SEQ ID NO:1003),
VHHQKLVF	(SEQ ID NO:1004),
VHHQKLV	(SEQ ID NO:1005),
VHHQKL	(SEQ ID NO:1006),
HHQKLVFFAE	(SEQ ID NO:1007),
HHQKLVFFA	(SEQ ID NO:1008),
HHQKLVFF	(SEQ ID NO:1009),
HHQKLVF	(SEQ ID NO:1010),
HHQKLV	(SEQ ID NO:1011),
HHQKL	(SEQ ID NO:1012),
HQKLVFFAED	(SEQ ID NO:1013),
HQKLVFFAE	(SEQ ID NO:1014),
HQKLVFFA	(SEQ ID NO:1015),
HQKLVFF	(SEQ ID NO:1016),
HQKLVF	(SEQ ID NO:1017),
HQKLV	(SEQ ID NO:1018),
HQKL	(SEQ ID NO:1019),
QKLVFFAEDV	(SEQ ID NO:1020),
QKLVFFAED	(SEQ ID NO:1021),
QKLVFFAE	(SEQ ID NO:1022),
QKLVFFA	(SEQ ID NO:1023),
QKLVFF	(SEQ ID NO:1024),
QKLVF	(SEQ ID NO:1025),
QKLV	(SEQ ID NO:1026),
QKL	(SEQ ID NO:1027),
KLVFFAEDVG	(SEQ ID NO:1028),
KLVFFAEDV	(SEQ ID NO:1029),
KLVFFAED	(SEQ ID NO:1030),

KLVFFAE	(SEQ ID NO:1031),
KLVFFA	(SEQ ID NO:1032),
KLVFF	(SEQ ID NO:1033),
KLVF	(SEQ ID NO:1034),
KLV	(SEQ ID NO:1035),
LVFFAEDVG	(SEQ ID NO:1036),
LVFFAEDV	(SEQ ID NO:1037),
LVFFAED	(SEQ ID NO:1038),
LVFFAE	(SEQ ID NO:1039),
LVFFA	(SEQ ID NO:1040),
LVFF	(SEQ ID NO:1041),
LVF	(SEQ ID NO:1042),
VFFAEDVG	(SEQ ID NO:1043),
VFFAEDV	(SEQ ID NO:1044),
VFFAED	(SEQ ID NO:1045),
VFFAE	(SEQ ID NO:1046),
VFFA	(SEQ ID NO:1047),
VFF	(SEQ ID NO:1048),
FFAEDVG	(SEQ ID NO:1049),
FFAEDV	(SEQ ID NO:1050),
FFAED	(SEQ ID NO:1051),
FFAE	(SEQ ID NO:1052),
FFA	(SEQ ID NO:1053),
FAEDVG	(SEQ ID NO:1054),
FAEDV	(SEQ ID NO:1055),
FAED	(SEQ ID NO:1056) и
FAE	(SEQ ID NO:1057).

[0094] В некоторых вариантах осуществления пептид Aβ представляет собой DAEFRHD (SEQ ID NO:06), DAEFR (SEQ ID NO:08) или EFRHD (SEQ ID NO:21).

[0095] Тау-пептид может соответствовать пептиду, содержащему 3-13 аминокислот из остатков 244-400 SEQ ID NO:02. В некоторых вариантах осуществления фрагмент является нефосфорилированным. В некоторых вариантах осуществления фрагмент фосфорилирован. В некоторых вариантах осуществления тау-пептид содержит аминокислотную последовательность, представленную консенсусным мотивом (Q/E)IVYK(S/P) (SEQ ID NO:996). В некоторых вариантах осуществления тау-пептид содержит аминокислотную смесь, представленную консенсусным мотивом

KXXSXXNX(K/H)H (SEQ ID NO: 995), где X представляет собой любую аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления тау-пептид выбирают из SEQ ID NO: 146-996. В некоторых вариантах осуществления тау-пептид выбирают из нижеследующего:

QIVYKPV	(SEQ ID NO:39),
QIVYKP	(SEQ ID NO:40),
QIVYKSV	(SEQ ID NO:41),
EIVYKSV	(SEQ ID NO:42),
QIVYKS	(SEQ ID NO:83),
EIVYKSP	(SEQ ID NO:43),
EIVYKS	(SEQ ID NO:84),
EIVYKPV	(SEQ ID NO:44),
EIVYKP	(SEQ ID NO:85),
IVYKSPV	(SEQ ID NO:45),
IVYK	(SEQ ID NO:46),
CNIKHVPG	(SEQ ID NO:86),
CNIKHVP	(SEQ ID NO:47),
NIKHVP	(SEQ ID NO:48),
HVPGGG	(SEQ ID NO:49),
HVPGG	(SEQ ID NO:50),
HKPGGG	(SEQ ID NO:51),
HKPGG	(SEQ ID NO:52),
KHVPGGG	(SEQ ID NO:53),
KHVPGG	(SEQ ID NO:54),
HQPGGG	(SEQ ID NO:55),
HQPGG	(SEQ ID NO:56)
VKSKIGST	(SEQ ID NO:801),
SKIGSTEN	(SEQ ID NO:817),
TENLKHQP	(SEQ ID NO:695),
ENLKHQPG	(SEQ ID NO:689),
SKIGSTDNIKH	(SEQ ID NO:985),
SKIGSKDNIKH	(SEQ ID NO:986) и
SKIGSLDNIKH	(SEQ ID NO:988).

В каждом из этих вариантов осуществления пептид может содержать, состоять или по существу состоять из указанных последовательностей.

[0096] В некоторых вариантах осуществления пептиды A β и тау связаны с образованием двойного полипептида A β /тау. Пептиды A β и тау могут быть связаны

внутрипептидным линкером. Например, полипептидный линкер расположен между С-концом первого пептида и N-концом второго пептида. С внутрипептидным линкером или без него пептид Аβ и тау-пептид могут быть расположены в двойном полипептиде Аβ/тау в любом порядке. Например, пептид Аβ может быть расположен в N-концевом участке двойного полипептида, а тау-пептид может быть расположен в С-концевом участке двойного полипептида. Или тау-пептид может быть расположен на N-концевом участке двойного полипептида, а пептид Аβ может быть расположен на С-концевом участке двойного полипептида. Ссылка на первый пептид или второй пептид в настоящем документе не предназначена для того, чтобы предложить порядок пептидов Аβ или тау в полипептиде иммуногенов.

[0097] Кроме того, С-концевая часть пептида Аβ, тау-пептида или двойного полипептида Аβ-тау может включать линкер для конъюгации пептидов или полипептида с носителем. Линкеры, которые связывают пептиды или двойной полипептид с носителем, могут включать, например, GG, GGG, KK, KKK, AA, AAA, SS, SSS, GAGA (SEQ ID NO:80), AGAG (SEQ ID NO:81), KGKG (SEQ ID NO:82) и т.п. между пептидами или двойным полипептидом и носителем и могут дополнительно включать С-концевой или N-концевой цистеин для получения короткого пептидного линкера (например, G-G-C-, K-K-C-, A-A-C- или S-S-C-). В некоторых вариантах осуществления, где С-концевые остатки в иммуногене представляют собой IVYKPV (SEQ ID NO:194), VYKPV (SEQ ID NO:195), YKPV (SEQ ID NO:196), KPV или PV, линкер представляет собой аминокислотный линкер, который не имеет N-концевого глицина (например, GG, GAGA (SEQ ID NO:80)). В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, любую из AA, AAA, KK, KKK, SS, SSS, AGAG (SEQ ID NO:81), GG, GGG, GAGA (SEQ ID NO:80) и KGKG (SEQ ID NO:82). В некоторых вариантах осуществления любой из пептида Аβ, тау-пептида и двойного полипептида Аβ/тау может включать С-концевой цистеин без спейсера. В некоторых вариантах осуществления любой из пептида Аβ, тау-пептида и двойного полипептида Аβ/тау может включать N-концевой цистеин без спейсера.

[0098] Когда полипептиды Аβ и тау соединены, образуя двойной полипептид Аβ/тау, линкер может представлять собой расщепляемый линкер. Используемый в настоящем документе термин «расщепляемый линкер» относится к любому линкеру между антигенными пептидами, который способствует или иным образом делает пептид Аβ и тау-пептид более восприимчивыми к отделению друг от друга путем расщепления (например, эндопептидазами, протеазами, низким pH или любым другим способом, который может осуществляться внутри или вокруг антигенпредставляющей клетки) и, таким образом, процессироваться антигенпредставляющей клеткой, чем эквивалентные пептиды, не имеющие такого расщепляемого линкера. В некоторых композициях расщепляемый линкер представляет собой чувствительный к протеазам дипептидный или олигопептидный расщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер чувствителен к расщеплению протеазами трипсинового семейства

протеаз. В некоторых композициях расщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аргинин-аргинина (Arg-Arg), аргинин-валин-аргинин-аргинина (Arg-Val-Arg-Arg; SEQ ID NO: 69), валин-цитруллина (Val-Cit), валин-аргинина (Val-Arg), валин-лизина (Val-Lys), валин-аланина (Val-Ala), фенилаланин-лизина (Phe-Lys), GAGA (SEQ ID NO:80), AGAG (SEQ ID NO:81) и KGKG (SEQ ID NO:82). В некоторых композициях расщепляемый линкер представляет собой аргинин-аргинин (Arg-Arg).

[0099] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения двойной полипептид Аβ/тау содержит, состоит или по существу состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из DAEFRHDDRQIVYKPV (SEQ ID NO:57) или DAEFRHDRREIVYKSV (SEQ ID NO:58), или DAEFRHDDRQIVYKPVXXC (SEQ ID NO:70), где XX и С-концевой цистеин, каждый независимо, являются необязательными, или DAEFRHDRREIVYKSVXXC (SEQ ID NO:79), где XX и С независимо являются необязательными, и, если присутствует, XX может представлять собой GG, AA, KK, SS, GAGA (SEQ ID NO:80), AGAG (SEQ ID NO:81) и KGKG (SEQ ID NO:82).

[00100] В некоторых вариантах осуществления двойной полипептид Аβ/тау представляет собой нижеследующее:

[первый пептид]-[линкер 1]-[второй пептид]-[линкер 2]-[Cys],

где, если [первый пептид] представляет собой пептид Аβ, то [второй пептид] представляет собой тау-пептид, и если [первый пептид] представляет собой тау-пептид, то [второй пептид] представляет собой пептид Аβ, каждый из [линкера 1], [линкера 2] и [Cys] являются необязательными, а [линкер 1] и [линкер 2] являются одинаковыми или разными линкерами.

[00101] В некоторых вариантах осуществления двойной полипептид Аβ/тау представляет собой нижеследующее:

[Cys]-[линкер 2]-[первый пептид]-[линкер 1]-[второй пептид]

где, если [первый пептид] представляет собой пептид Аβ, то [второй пептид] представляет собой тау-пептид, и если [первый пептид] представляет собой тау-пептид, то [второй пептид] представляет собой пептид Аβ, и каждый из [линкера 1], [линкера 2] и [Cys] являются необязательными, а [линкер 1] и [линкер 2] являются одинаковыми или разными линкерами.

[00102] Примеры пептида Аβ включают любую SEQ ID NO:3-38 или SEQ ID NO:1002-1057.

[00103] Примеры тау-пептида включают любую из SEQ ID NO: 39-56, 83-86 или 146-996.

[00104] [Линкер 1] является необязательным и, если присутствует, может представлять собой расщепляемый линкер. Расщепляемый линкер, если он присутствует, может иметь длину 1-10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит примерно 1-10 аминокислот, примерно 1-9 аминокислот, примерно 1-8 аминокислот, примерно 1-7 аминокислот, примерно 1-6 аминокислот, примерно 1-5

аминокислот, примерно 1-4 аминокислоты, примерно 1-3 аминокислоты, примерно 2 аминокислоты или одну (1) аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер представляет собой 1 аминокислоту, 2 аминокислоты, 3 аминокислоты, 4 аминокислоты, 5 аминокислот, 6 аминокислот, 7 аминокислот, 8 аминокислот, 9 аминокислот или 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер может представлять собой расщепляемый линкер, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аргинин-аргинина (Arg-Arg), аргинин-валин-аргинин-аргинина (Arg-Val-Arg-Arg; SEQ ID NO:69), валин-цитруллина (Val-Cit), валин-аргинина (Val-Arg), валин-лизина (Val-Lys), валин-аланина (Val-Ala), фенилаланин-лизина (Phe-Lys), глицин-аланин-глицин-аланина (Gly-Ala-Gly-Ala; SEQ ID NO:80), аланин-глицин-аланин-глицина (Gly-Ala-Gly-Ala; SEQ ID NO:81) и лизин-глицин-лизин-глицина (Lys-Gly-Lys-Gly; SEQ ID NO:82).

[00105] [Линкер 2] является необязательным и, если присутствует, представляет собой линкер, который связывает полипептид с носителем. Линкер, если он присутствует, может иметь длину от 1 до 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит примерно 1-10 аминокислот, примерно 1-9 аминокислот, примерно 1-8 аминокислот, примерно 1-7 аминокислот, примерно 1-6 аминокислот, примерно 1-5 аминокислот, примерно 1-4 аминокислоты, примерно 1-3 аминокислоты, примерно 2 аминокислоты или одну (1) аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой 1 аминокислоту, 2 аминокислоты, 3 аминокислоты, 4 аминокислоты, 5 аминокислот, 6 аминокислот, 7 аминокислот, 8 аминокислот, 9 аминокислот или 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления аминокислотный состав линкера может имитировать состав линкеров, обнаруженных в природных многодоменных белках, где некоторые аминокислоты представлены в избытке, недостаточно представлены или в равной степени представлены в природных линкерах по сравнению с их содержанием в полноразмерном белке. Например, треонин (Thr), серин (Ser), пролин (Pro), глицин (Gly), аспарагиновая кислота (Asp), лизин (Lys), глутамин (Gln), аспарагин (Asn), аргинин (Arg), фенилаланин (Phe), глутаминовая кислота (Glu) и аланин (Ala) преобладают в природных линкерах. Напротив, изолейцин (Ile), тирозин (Tyr), триптофан (Trp) и цистеин (Cys) представлены недостаточно. Как правило, сверхпредставленные аминокислоты представляли собой полярные незаряженные или заряженные остатки, которые составляют примерно 50% кодируемых в природе аминокислот, а Pro, Thr и Gln были наиболее предпочтительными аминокислотами для природных линкеров. В некоторых вариантах осуществления аминокислотный состав линкера может имитировать состав линкеров, обычно встречающихся в рекомбинантных белках, которые обычно можно классифицировать как гибкие или жесткие линкеры. Например, гибкие линкеры, обнаруженные в рекомбинантных белках, обычно состоят из небольших неполярных (например, Gly) или полярных (например, Ser или Thr) аминокислот, небольшой размер которых обеспечивает гибкость и обеспечивает подвижность соединяющих функциональных доменов. Включение, например, Ser или Thr может поддерживать

стабильность линкера в водных растворах за счет образования водородных связей с молекулами воды и, следовательно, может уменьшить взаимодействие между линкером и иммуногенами. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит цепочки остатков Gly и Ser (линкер «GS»). Примером широко используемого гибкого линкера является (Gly-Gly-Ser)_n, (Gly-Gly-Gly-Ser)_n (SEQ ID NO:1062) или (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_n (SEQ ID NO:1063), где n=1-3. Регулировка количества копий «n» может оптимизировать линкер для достижения достаточного разделения функциональных доменов иммуногена, чтобы, например, максимизировать иммуногенный ответ. Многие другие гибкие линкеры были разработаны для рекомбинантных слитых белков, которые можно использовать в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления линкеры могут быть обогащены небольшими или полярными аминокислотами, такими как Gly и Ser, но также могут содержать дополнительные аминокислоты, такие как Thr и Ala, для сохранения гибкости, а также полярные аминокислоты, такие как Lys и Glu, для улучшения растворимости. См., например, Chen, X. et al., “Fusion Protein Linkers: Property, Design and Functionality” *Adv Drug Deliv Rev.*, 15; 65(10): 1357-1369 (2003). В некоторых вариантах осуществления линкер, если он присутствует, может представлять собой аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из GG, GGG, KK, KKK, AA, AAA, SS, SSS, G-A-G-A (SEQ ID NO:80), A-G-A-G (SEQ ID NO:81) и K-G-K-G (SEQ ID NO:82).

[00106] [Cys] является необязательным и может быть полезным для конъюгации полипептида с носителем. Если Cys присутствует, то он может находиться в С-концевом участке полипептида или в N-концевом участке полипептида.

[00107] Примеры двойного полипептида Aβ/тау [первый пептид]-[линкер 1]-[второй пептид]-[линкер 2]-[Cys] по настоящему изобретению включают нижеследующее:

Таблица 1

Лабораторный номер (ID) иммуногена	Последовательность Abeta	Abeta SEQ ID NO.	Эндопептидазный линкер	Последовательность тау	Тау, SEQ ID NO.	С-концевой линкер	Cys	Иммуноген, SEQ ID NO
9	DAEFRH D	06	RR	QIVYKP V	39	GG	C	59
10	DAEFRH D	06	RR	QIVYKP V	39	None	C	60
18	DAEFRH D	06	RR	QIVYKP V	39	AA	C	61
19	DAEFRH D	06	RR	QIVYKP V	39	KK	C	62
20	DAEFRH D	06	RR	EIVYKSP	43	GG	C	63
21	DAEFRH D	06	RR	EIVYKSP	43	AA	C	64
22	DAEFRH	06	RR	EIVYKSP	43	None	C	65

	D							
23	DAEFRH D	06	RR	EIVYKSP	43	KK	C	66
12	DAEFRH D	06	RR	NIKHVP	48	GG	C	78

[00108] Полипептидные иммуногены

[00109] Пептид Аβ, тау-пептид и двойной полипептид Аβ/тау являются иммуногенами в соответствии с изобретением. В некоторых вариантах осуществления пептиды и двойной полипептид Аβ-тау могут быть связаны с подходящим носителем, чтобы помочь вызвать иммунный ответ. Соответственно, один или более пептидов и двойных полипептидов Аβ-тау по настоящему изобретению могут быть связаны с носителем. Например, каждый из пептида Аβ, тау-пептида и полипептида Аβ-тау может быть связан с носителем спейсерными аминокислотами или без них (например, Gly-Gly, Gly-Gly-Gly, Ala-Ala, Ala-Ala-Ala, Lys-Lys, Lys-Lys-Lys, Ser-Ser, Ser-Ser-Ser, Gly-Ala-Gly-Ala (SEQ ID NO:80), Ala-Gly-Ala-Gly (SEQ ID NO:81) или Lys-Gly-Lys-Gly (SEQ ID NO:82)). В некоторых вариантах осуществления двойной полипептид Аβ-тау может быть связан с подходящим носителем с использованием С-концевого цистеина для получения линкера между пептидом(ами) и носителем или двойным полипептидом Аβ/тау и носителем. В некоторых вариантах осуществления двойной полипептид Аβ-тау может быть связан с подходящим носителем с использованием N-концевого цистеина для обеспечения линкера между пептидом(ами) и носителем. В некоторых вариантах осуществления, где С-концевые остатки в иммуногене представляют собой IVYKPV (SEQ ID NO:194), VYKPV (SEQ ID NO:195), YKPV (SEQ ID NO:196), KPV или PV, линкер представляет собой аминокислотный линкер, который не имеет N-концевого глицина (например, GG, GAGA (SEQ ID NO:80)).

[00110] Подходящие носители включают, но не ограничиваются ими, сывороточные альбумины, гемоцианин лимфы улитки, молекулы иммуноглобулина, тиреоглобулин, овальбумин, столбнячный анатоксин или анатоксин из других патогенных бактерий, таких как дифтерия (например, CRM197), E. coli, холера, или H.pylori, или ослабленное производное токсина. Эпитопы Т-клеток также являются подходящими молекулами-носителями. Некоторые конъюгаты могут быть получены путем связывания пептидных иммуногенов по изобретению с молекулой иммуностимулирующего полимера (например, трипальмитоил-S-глицеринцистеином (Pam3Cys), маннаном (полимером маннозы) или глюканом (β-(1,2)-глюканом)), цитокинами (например, IL-1, IL-1 альфа- и β-пептидами, IL-2, γ-INF, IL-10, GM-CSF) и хемокинами (например, MIP1-α и β, и RANTES). К дополнительным носителям относятся вирусоподобные частицы. В некоторых композициях иммуногенные пептиды также могут быть связаны с носителями путем химической сшивки. Методы связывания иммуногена с носителем включают образование дисульфидных связей с использованием N-сукцинимидил-3-(2-пиридилтио)пропионата (SPDP) и сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-

карбоксилата (SMCC) (если пептид не имеет сульфгидрильной группы, это может быть обеспечено добавлением остатка цистеина). Эти реагенты создают дисульфидную связь между собой и остатком цистеина на одном белке и амидную связь через эpsilon-аминогруппу на лизине или другую свободную аминогруппу в других аминокислотах. В некоторых вариантах осуществления химическая сшивка может включать использование SBAP (сукцинимидил-3-(бромацетиламино)пропионата), который представляет собой короткий (6,2 ангстрем) сшивающий агент для конъюгации амина с сульфгидрилом через N-гидроксисукцинимидный эфир (NHS) и реакционноспособные бромацетильные группы. Набор таких образующих дисульфид/амид агентов описан Jansen et al., "Immunotoxins: Hybrid Molecules Combining High Specificity and Potent Cytotoxicity" *Immunological Reviews* 62:185-216 (February 1982). Другие бифункциональные связывающие агенты образуют тиоэфирную, а не дисульфидную связь. Многие из этих тиоэфирообразующих агентов имеются в продаже и включают реакционноспособные эфиры 6-малеимидокапроновой кислоты, 2-бромуксусной кислоты и 2-йодоуксусной кислоты, 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоновой кислоты. Карбоксильные группы можно активировать, объединяя их с натриевой солью сукцинимидила или 1-гидрокси-2-нитро-4-сульфоновой кислоты. Вирусоподобные частицы (ВПЧ), также называемые псевдовирioнами или частицами вирусного происхождения, представляют собой субъединичные структуры, состоящие из множества копий вирусного капсида и/или белка оболочки, способные к самосборке в ВПЧ с определенной сферической симметрией *in vivo*. (Powilleit, et al., (2007) *PLoS ONE* 2(5):e415). В альтернативном варианте, пептидные иммуногены могут быть связаны по меньшей мере с одним искусственным Т-клеточным эпитопом, способным связывать большую часть молекул МНС класса II, таким как пан-DR эпитоп («PADRE»). Пан-DR-связывающие пептиды (PADRE) описаны в US 5736142, WO 95/07707 и Alexander, et al, *Immunity*, 1:751-761 (1994).

[00111] Активные иммуногены могут быть представлены в мультимерной форме, в которой множественные копии иммуногена (пептида или полипептида) представлены на носителе в виде одной ковалентной молекулы. В некоторых вариантах осуществления носитель включает различные формы двойного полипептида Аβ/тау. Например, двойной полипептид Аβ/тау иммуногена может включать полипептиды, которые содержат антиген Аβ и антиген тау в разном порядке, или могут содержать или не содержать внутрипептидный линкер и/или линкер к носителю.

[00112] В некоторых композициях иммуногенные пептиды также могут быть экспрессированы в виде белков, слитых с носителями. В некоторых композициях иммуногенные пептиды могут быть связаны с носителем на аминоконце, карбоксильном конце или во внутренней области. В некоторых композициях носителем является CRM197. В некоторых композициях носителем является дифтерийный анатоксин.

[00113] **Нуклеиновые кислоты**

[00114] В описании дополнительно представлены нуклеиновые кислоты, кодирующие любой из бета-амилоидных (Аβ) пептидов и тау-пептидов по настоящему

изобретению. Иммунотерапевтические композиции на основе нуклеиновых кислот по настоящему изобретению содержат, состоят из или по существу состоят из последовательности первой нуклеиновой кислоты, кодирующей бета-амилоидный пептид (Аβ), и последовательности второй нуклеиновой кислоты, кодирующей тау-пептид по настоящему изобретению. Например, пептид Аβ представляет собой последовательность длиной 3-10 аминокислотных остатков и из первых десяти N-концевых остатков SEQ ID NO:01, а тау-пептид представляет собой последовательность длиной 3-13 аминокислотных остатков и из остатков 244-400 SEQ ID NO:02. Соответственно, нуклеиновая кислота, кодирующая любую из SEQ ID NO: 3-38 или SEQ ID NO: 1002-1057, может быть объединена с нуклеиновой кислотой, кодирующей любую из SEQ ID NO: 39-56, 83-86 или 146-996, обеспечивая иммуноген и компонент фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Аналогично, одна или более нуклеиновых кислот, кодирующих любую из последовательностей Аβ и тау, могут включать кодоны для N-концевого RR- или C-концевого -RR дипептида. В некоторых вариантах осуществления последовательности Аβ и тау-пептида могут кодироваться одной и той же последовательностью нуклеиновой кислоты или отдельными последовательностями нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления последовательности нуклеиновой кислоты могут также кодировать линкер к носителю и/или C-концевой цистеин, описанные в настоящем документе. Кроме того, когда одна последовательность нуклеиновой кислоты кодирует оба пептида, эта последовательность может также кодировать внутривептидный линкер, описанный в настоящем документе. Описанные в настоящем документе композиции нуклеиновых кислот (фармацевтические композиции) можно использовать в способах лечения или осуществления профилактики и/или предупреждения болезни Альцгеймера. В другом варианте осуществления композиции для иммунотерапии нуклеиновыми кислотами по настоящему изобретению представляют собой композиции для снижения содержания патогенных форм Аβ и/или тау у субъекта и/или в ткани субъекта. В некоторых вариантах осуществления Аβ и/или тау, содержание которого снижается с помощью иммунотерапевтических композиций, представляет собой патологическую(ые) форму(ы) Аβ (например, отложения внеклеточных бляшек β-амилоидного пептида (Аβ); нейритные амилоидные бляшки) и/или тау (факелообразные нейрофибриллярные клубки тау; нейрофибриллярные клубки тау). В еще одном варианте осуществления патологические индикаторы нейродегенеративного заболевания уменьшаются с помощью иммунотерапевтических композиций на основе нуклеиновых кислот. В другом варианте осуществления иммунотерапевтические композиции на основе нуклеиновых кислот по настоящему изобретению обеспечивают композиции для снижения содержания Аβ в головном мозге и тау-белка в головном мозге.

[00115] Нуклеиновая кислота, такая как ДНК, которая кодирует иммуноген и используется в качестве вакцины, может называться «ДНК-иммуноген» или «ДНК-вакцина», поскольку кодируемые полипептиды экспрессируются *in vivo* после введения ДНК. ДНК-вакцины предназначены для индукции антител против представляющих

интерес белков, которые они кодируют у субъекта, посредством: интеграции ДНК, кодирующей представляющие интерес белки, в вектор (плазмиду или вирус); введения вектора субъекту; и экспрессии представляющих интерес белков у субъекта, которому был введен вектор, для стимуляции иммунной системы субъекта. ДНК-вакцина остается в организме субъекта в течение длительного времени после введения и продолжает медленно продуцировать закодированные белки. Таким образом можно избежать чрезмерного иммунного ответа. ДНК-вакцины также можно модифицировать с помощью методов генной инженерии. Необязательно, такие нуклеиновые кислоты дополнительно кодируют сигнальный пептид и могут экспрессироваться вместе с сигнальным пептидом, связанным с пептидом. Кодирующие последовательности нуклеиновых кислот могут быть функционально связаны с регуляторными последовательностями для обеспечения экспрессии кодирующих последовательностей, такими как промотор, энхансер, сайт связывания рибосомы, сигнал терминации транскрипции и т.п. Нуклеиновые кислоты, кодирующие А β и тау, могут встречаться в выделенной форме или могут быть клонированы в один или более векторов. Нуклеиновые кислоты могут быть синтезированы, например, твердофазным синтезом или ПЦР с использованием перекрывающихся олигонуклеотидов. Нуклеиновые кислоты, кодирующие пептиды и полипептиды А β и тау с линкерами или расщепляемыми линкерами или без них, а также с нашими носителями на основе белков, могут быть объединены в одну непрерывную нуклеиновую кислоту, например, в векторе экспрессии.

[00116] ДНК является более стабильной, чем РНК, но ее использование сопряжено с некоторыми потенциальными рисками безопасности, такими как индукция антител против ДНК, поэтому в некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота может представлять собой РНК. Нуклеиновая кислота РНК, которая кодирует иммуноген и используется в качестве вакцины, может обозначаться как «РНК-иммуноген», или «РНК-вакцина», или «мРНК-вакцина», поскольку кодируемые полипептиды экспрессируются *in vivo* после введения РНК. Вакцины на основе рибонуклеиновой кислоты (РНК) могут безопасно управлять клеточными механизмами субъекта для производства одного или более представляющих интерес полипептидов. В некоторых вариантах осуществления РНК-вакцина может представлять собой нереплицирующуюся мРНК (информационную РНК) или самоамплифицирующуюся РНК вирусного происхождения. Вакцины на основе мРНК кодируют представляющие интерес антигены и содержат 5'- и 3'-нетранслируемые области (UTR), тогда как самоамплифицирующиеся РНК кодируют не только антигены, но и компоненты механизма вирусной репликации, который обеспечивает внутриклеточную амплификацию РНК и высокую экспрессию белка. Транскрибируемая *in vitro* мРНК может быть получена на основе матричной линейной ДНК с использованием РНК-полимеразы фагов Т7, Т3 или Spб. Полученный продукт может содержать открытую рамку считывания, которая кодирует представляющие интерес пептиды, раскрытые в настоящем документе, фланкирующие последовательности 5'- и 3'-UTR, 5'-кэп и поли(А)-хвост. В некоторых вариантах осуществления РНК-вакцина может

содержать трансамплифицирующую РНК (например, см. Beissert et al., *Molecular Therapy* January 2020 28(1):119-128). В некоторых вариантах осуществления РНК-вакцины кодируют пептид Аβ и тау-пептид, раскрытые в настоящем документе, и способны экспрессировать пептиды Аβ и тау, в частности, при переносе в клетку, такую как незрелая антигенпредставляющая клетка. РНК также может содержать последовательности, кодирующие другие полипептидные последовательности, такие как иммуностимулирующие элементы. В некоторых вариантах осуществления РНК в РНК-вакцине может представлять собой модифицированную РНК. Термин «модифицированный» в контексте РНК может включать любую модификацию РНК, которая в природе не присутствует в РНК. Например, модифицированная РНК может относиться к РНК с 5'-кэпом; однако РНК может содержать дополнительные модификации. 5'-кэп можно модифицировать, чтобы он обладал способностью стабилизировать РНК при присоединении к нему. В некоторых вариантах осуществления дополнительная модификация может представлять собой удлинение или укорочение встречающегося в природе поли(А)-хвоста или изменение 5'- или 3'-нетранслируемых областей (UTR). В некоторых вариантах осуществления РНК, например мРНК-вакцина, входит в состав в количестве, эффективном для получения антиген-специфического иммунного ответа у субъекта. Например, состав РНК-вакцины вводят субъекту для стимуляции гуморальной и/или клеточной иммунной системы субъекта против антигенов Аβ и тау, и поэтому состав может дополнительно содержать один или более адъювантов, разбавителей, носителей и/или эксципиентов, и вводится субъекту любым подходящим путем, чтобы вызвать защитную и/или терапевтическую иммунную реакцию против антигенов Аβ и тау.

[00117] Основные источники, в которых раскрыты общие способы молекулярной биологии, которые все включены посредством ссылки, включают: Sambrook, J et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; Ausubel, F M et al. *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 2, Wiley-Interscience, New York, (current edition); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); Glover, D M, ed, *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II, IRL Press, 1985; Albers, B. et al., *Molecular Biology of the Cell*, 2nd Ed., Garland Publishing, Inc., New York, N.Y. (1989); Watson, J D et al., *Recombinant DNA*, 2nd Ed., Scientific American Books, New York, 1992; и Old, R W et al., *Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering*, 2nd Ed., University of California Press, Berkeley, Calif. (1981).

[00118] Методы манипуляций с нуклеиновыми кислотами, такие как, например, создание мутаций в последовательностях, субклонирование, мечение зондов, секвенирование, гибридизация и т.п., подробно описаны в научной и патентной литературе. См., например, Sambrook, ed., *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL* (2ND ED.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989); *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, Ausubel, ed. John Wiley & Sons, Inc., New York

(1997); LABORATORY TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY: HYBRIDIZATION WITH NUCLEIC ACID PROBES, Part I. Tijssen, ed. Elsevier, N.Y. (1993).

[00119] Нуклеиновые кислоты, векторы, капсиды, полипептиды и т.п. можно анализировать и количественно определять любым из ряда общих способов, хорошо известных специалистам в данной области. К ним относятся, например, аналитические биохимические методы, такие как ЯМР, спектрофотометрия, рентгенография, электрофорез, капиллярный электрофорез, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), тонкослойная хроматография (ТСХ) и гипердиффузионная хроматография, различные иммунологические способы, в т.ч. реакции преципитации в жидкости или геле, иммунодиффузия, иммуноэлектрофорез, радиоиммуноанализ (RIA), твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), иммунофлуоресцентный анализ, Саузерн-анализ, Нозерн-анализ, дот-блот-анализ, гель-электрофорез (например, SDS-PAGE), ОТ-ПЦР, количественная ПЦР, другие методы амплификации нуклеиновых кислот или мишеней или сигналов, радиоактивное мечение, измерения сцинтилляционным методом и аффинная хроматография.

[00120] **Фармацевтические композиции**

[00121] Каждый из пептидов и иммуногенов, описанных в настоящем документе, может быть представлен в фармацевтической композиции, которую вводят с фармацевтически приемлемыми адъювантами и фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами. Адъювант увеличивает титр индуцированных антител и/или аффинность связывания индуцированных антител по сравнению с ситуацией, когда пептид использовали отдельно. Для индукции иммунного ответа можно использовать различные адъюванты в сочетании с иммуногеном по настоящему изобретению. Некоторые адъюванты усиливают внутренний ответ на иммуноген, не вызывая конформационных изменений в иммуногене, влияющих на качественную форму ответа. Адъювант может представлять собой природное соединение, модифицированную версию или производное природного соединения или синтетическое соединение.

[00122] Некоторые адъюванты включают соли алюминия, такие как гидроксид алюминия и фосфат алюминия, 3-О-деацилированный монофосфорилипид А (MPL™) (см. GB 2220211 (RIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton, Montana, теперь часть Corixa). Используемый в настоящем документе термин MPL относится к природным и синтетическим версиям MPL. Примеры синтетических версий включают PHAD®, 3D-PHAD® и 3D(6A)-PHAD® (Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama).

[00123] QS-21 представляет собой тритерпеновый гликозид или сапонин, выделенный из коры дерева *Quillaja saponaria* Molina, произрастающего в Южной Америке (см. Kensil et al., Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995)) Продукты QS-21 включают Stimulon® (Antigenics, Inc., New York, NY; теперь Agenus, Inc., Lexington, MA) и вакцинный адъювант QS-21 (Desert King, San Diego, CA). QS-21 раскрыт, охарактеризован и оценен в US 5057540 и US

8034348, описание которых включено в настоящий документ в качестве ссылки. Кроме того, QS-21 был оценен в многочисленных клинических испытаниях в различных дозировках. См. NCT00960531 (clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00960531), Hüll et al., *Curr Alzheimer Res.* 2017 Jul; 14(7): 696-708 (оценено 50 мкг QS-21 с различными дозами вакцины ACC-001); Gilman et al., “Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial” *Neurology*. 2005 May 10; 64(9):1553-62; Wald et al., “Safety and immunogenicity of long HSV-2 peptides complexed with rhHsc70 in HSV-2 seropositive persons” *Vaccine* 2011; 29(47):8520-8529; и Cunningham et al., “Efficacy of the Herpes Zoster Subunit Vaccine in Adults 70 Years of Age or Older.” *NEJM*. 2016 Sep 15; 375(11):1019-32. QS-21 используется в одобренных FDA вакцинах, включая SHINGRIX. SHINGRIX содержит 50 мкг QS-21. В некоторых вариантах осуществления количество QS-21 составляет от примерно 10 мкг до примерно 500 мкг.

[00124] TQL1055 является аналогом QS-21 (Adjuvance Technologies, Lincoln, NE). Полусинтетический TQL1055 был охарактеризован по сравнению с QS-21 как имеющий высокую чистоту, повышенную стабильность, улучшенную местную переносимость, улучшенную системную переносимость. TQL1055 раскрыт, охарактеризован и оценен в документах US 20180327436 A1, WO 2018191598 A1, WO 2018200656 A1 и WO 2019079160 A1, описание которых включено в настоящий документ путем ссылки. В US 20180327436 A1 указано, что 2,5-кратное увеличение количества TQ1055 превосходило 20 мкг QS-21, но улучшения после 50 мкг TQ1055 не наблюдалось. Однако, в отличие от QS-21, не наблюдалось ни усиления потери веса, ни гемолиза эритроцитов при увеличении дозы TQL1055. В WO 2018200656 A1 указано, что при оптимальном количестве TQ1055 можно снизить количество антигена и достичь более высоких титров. В некоторых вариантах осуществления количество TQL1055 составляет от примерно 10 мкг до примерно 500 мкг.

[00125] Другие адъюванты представляют собой эмульсии масло-в-воде (такие как сквален или арахисовое масло), необязательно в комбинации с иммуностимуляторами, такими как монофосфорилипид А (см. Stoute et al., *N. Engl. J. Med.* 336, 86-91 (1997)), полимеры плуроника и убитые микобактерии. Адъюванты Ribi представляют собой эмульсии масло-в-воде. Ribi содержит метаболизируемое масло (сквален), эмульгированное физиологическим раствором, содержащим Tween 80. Ribi также содержит рафинированные продукты микобактерий, которые действуют как иммуностимуляторы, и бактериальный монофосфорил липид А. Другими адъювантами могут быть олигонуклеотиды CpG (см. WO 98/40100), цитокины (например, IL-1, IL-1 альфа- и β-пептиды, IL-2, γ-INF, IL-10, GM-CSF), хемокины (например, MIP1-α и β и RANTES), сапонины, РНК и/или TLR агонисты (например, агонисты TLR4, такие как MPL и синтетические молекулы MPL), аминоктилглюкозаминидфосфат и другие агонисты TLR. Адъюванты можно вводить как компонент терапевтической композиции с активным агентом или их можно вводить отдельно - до, одновременно или после введения терапевтического агента.

[00126] В различных вариантах осуществления изобретения адъювант представляет собой QS-21 (Stimulon™). В некоторых композициях адъювантом является MPL. В некоторых вариантах осуществления количество MPL составляет от примерно 10 мкг до примерно 500 мкг. В некоторых композициях адъювантом является TQL1055. В некоторых вариантах осуществления количество TQL1055 составляет от примерно 10 мкг до примерно 500 мкг. В некоторых композициях адъювантом является QS21. В некоторых вариантах осуществления количество QS21 составляет от примерно 10 мкг до примерно 500 мкг. В некоторых композициях адъювант представляет собой комбинацию MPL и QS-21. В некоторых композициях адъювант представляет собой комбинацию MPL и TQL1055. В некоторых композициях адъювант может присутствовать в липосомальном составе.

[00127] Кроме того, некоторые варианты осуществления настоящего изобретения могут включать мультиантигенпредставляющую систему (MAP). Мультиантигенпредставляющие пептидные вакцинные системы были разработаны, чтобы избежать побочных эффектов, связанных с обычными вакцинами (т. е. живыми аттенуированными, убитыми или инактивированными патогенами), белками-носителями и цитотоксическими адъювантами. Для разработки мультиантигенпредставляющих пептидных вакцинных систем с использовались два основных подхода: (1) добавление функциональных компонентов, например, Т-клеточных эпитопов, проникающих в клетку пептидов и липофильных фрагментов; и (2) синтетические подходы с использованием наноматериалов определенного размера, например, самособирающихся пептидов, непептидных дендримеров и золотых наночастиц, в качестве платформ, представляющих антиген. Использование мультиантигенпредставляющей пептидной (MAP) системы может улучшить иногда низкую иммуногенность субъединичных пептидных вакцин. В MAP-системе несколько копий антигенных пептидов одновременно связаны с α - и ϵ -аминогруппами неиммуногенного дендритного каркаса на основе Lys, помогая придать устойчивость к деградации, тем самым усиливая молекулярное распознавание иммунными клетками и индукцию более сильного иммунного ответа по сравнению с небольшими антигенными пептидами. В некоторых композициях MAP содержит один или более дендритных каркасов на основе Lys, хелперные Т-клеточные эпитопы, иммуностимулирующие липофильные фрагменты, проникающие в клетку пептиды, индуцированную радикалами полимеризацию, самособирающиеся наночастицы в качестве антигенпредставляющих платформ и наночастицы золота.

[00128] Фармацевтические композиции для парентерального введения предпочтительно являются стерильными и по существу изотоническими и производятся в соответствии с требованиями GMP. Фармацевтические композиции могут быть предоставлены в виде стандартной лекарственной формы (т.е. дозировки для однократного введения). Фармацевтические композиции могут быть составлены с использованием одного или более физиологически приемлемых носителей, разбавителей, эксципиентов или вспомогательных веществ. Состав зависит от выбранного пути

введения. Для инъекции пептиды по настоящему изобретению могут быть приготовлены в виде водных растворов, предпочтительно в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Хенкса, раствор Рингера или физиологический раствор или ацетатный буфер (для уменьшения дискомфорта в месте инъекции). Раствор может содержать рецептурные агенты, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. В качестве альтернативы, пептидные композиции могут быть представлены в лиофилизированной форме для разбавления перед использованием подходящим носителем, например стерильной апиrogenной водой.

[00129] Пептиды (и необязательно носитель, слитый с пептидом(ами)) также можно вводить в форме нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид(ы) и экспрессируемой *in situ* у субъекта. Сегмент нуклеиновой кислоты, кодирующий иммуноген, обычно связан с регуляторными элементами, такими как промотор и энхансер, которые обеспечивают экспрессию сегмента ДНК в предполагаемых клетках-мишенях субъекта. Для экспрессии в клетках крови, что желательно для индукции иммунного ответа, для прямой экспрессии подходят промоторные и энхансерные элементы из, например, генов легкой или тяжелой цепей иммуноглобулина или главного немедленно-раннего промотора и энхансера CMV. Связанные регуляторные элементы и кодирующие последовательности часто клонируют в вектор.

[00130] ДНК и РНК можно доставлять в «голом» виде (т.е. без коллоидных или инкапсулирующих материалов). В качестве альтернативы можно использовать ряд вирусных векторных систем, включая ретровирусные системы (см., например, Boris-Lawrie and Teumin, *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3(1):102-109 (1993)); аденовирусные векторы (см., например, Bett et al, *J. Virol.* 67(10):5911-21 (1993)); аденоассоциированные вирусные векторы (см., например, Zhou et al., *J. Exp. Med.* 179(6):1867-75 (1994)), вирусные векторы из семейства оспы, включая вирус осповакцины и вирусы оспы птиц, вирусные векторы из рода альфа-вирусов, такие как полученные из вирусов Синдбис и леса Семлики (см., например, Dubensky et al., *J. Virol.* 70(1):508-519 (1996)), вирус венесуэльского лошадиного энцефалита (см. 5643576) и рабдовирусы, такие как вирус везикулярного стоматита (см. WO 96/34625) и папилломавирусы (WO 94/12629; Ohe et al., *Human Gene Therapy* 6(3):325-333 (1995); и Xiao & Brandsma, *Nucleic Acids. Res.* 24(13):2620-2622 (1996)).

[00131] ДНК и РНК, кодирующие иммуноген, или вектор, содержащий их, могут быть упакованы в липосомы, наночастицы или липопротеиновые комплексы. Подходящие другие полимеры включают, например, протаминовые липосомы, полисахаридные частицы, катионную наноэмульсию, катионный полимер, катионную полимерную липосому, катионные липидные наночастицы, катионный липид, наночастицы холестерина, катионный липид-холестерин, наночастицы ПЭГ или дендримерные наночастицы. Дополнительные подходящие липиды и родственные аналоги описаны в патентах US 5208036, US 5264618, US 5279833 и US 5283185, каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Векторы и ДНК,

кодирующие иммуноген, также могут быть адсорбированы или связаны с носителями в виде частиц, примеры которых включают полиметилметакрилатные полимеры и полилактиды и поли(лактид-со-гликолиды) (см., например, McGee et al., J. Micro Encap. Mar-Apr 1997; 14(2):197-210).

[00132] Фармацевтически приемлемые композиции-носители также могут включать добавки, включая, но не ограничиваясь ими, воду, фармацевтически приемлемые органические растворители, коллаген, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, карбоксивиниловые полимеры, карбоксиметилцеллюлозу натрия, полиакрилат натрия, альгинат натрия, водорастворимый декстран, карбоксиметилкрахмал натрия, пектин, метилцеллюлозу, этилцеллюлозу, ксантановую камедь, гуммиарабик, казеин, агар, полиэтиленгликоль, диглицерин, глицерин, пропиленгликоль, вазелин, парафин, стеариловый спирт, стеариновую кислоту, сывороточный альбумин человека, маннит, сорбит, лактозу и поверхностно-активные вещества, приемлемые в качестве фармацевтических добавок.

[00133] **Субъекты, подлежащие лечению**

[00134] Наличие бляшек Аβ и/или нейрофибриллярных клубков было обнаружено при нескольких заболеваниях, включая болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, легкие когнитивные нарушения, церебральную амилоидную ангиопатию, первичную возрастную таупатию, постэнцефалитический паркинсонизм, посттравматическую деменцию или dementia pugilistica, болезнь Пика, болезнь Ниманна-Пика типа С, надъядерный паралич, лобно-височную деменцию, лобно-височную дегенерацию, аргирофильную зернистость, глобулярную глиальную таупатию, боковой амиотрофический склероз/паркинсонизм, деменционный комплекс Гуама, кортикобазальную дегенерацию (КБД), деменцию с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви (LBVAD), хроническую травматическую энцефалопатию (СТЕ), глобулярную глиальную таупатию (GGT), болезнь Паркинсона, прогрессирующий надъядерный паралич (PSP), сухую возрастную дегенерацию желтого пятна (AMD) и миозит с включениями.

[00135] Композиции и способы по настоящему изобретению можно использовать для лечения или профилактики любого из этих заболеваний. Из-за широко распространенной связи между неврологическими заболеваниями и Аβ и/или тау, композиции и способы по настоящему изобретению могут быть использованы для лечения или профилактики у любого субъекта, у которого наблюдаются повышенные уровни Аβ и/или тау (например, в спинномозговой жидкости) по сравнению со средним значением у лиц без неврологических заболеваний. Композиции и способы по настоящему изобретению также можно использовать для лечения или профилактики неврологических заболеваний у лиц, имеющих мутацию Аβ и/или тау, связанную с неврологическим заболеванием. Способы особенно подходят для лечения или профилактики болезни Альцгеймера.

[00136] Субъекты, подходящие для лечения, включают лиц с риском заболевания, но не имеющих симптомов, а также пациентов, у которых в настоящее время проявляются

симптомы, включая субъектов, ранее не получавших лечения от заболевания. Субъекты, подверженные риску заболевания, включают лиц из старческой популяции, бессимптомных субъектов с патологиями Аβ и/или тау и имеющих известную генетическую предрасположенность к заболеванию. К таким лицам относятся те, у кого есть родственники, перенесшие это заболевание, и те, чья предрасположенность определяется анализом генетических или биохимических маркеров. Генетические маркеры предрасположенности включают мутации в Аβ и/или тау, а также мутации в других генах, связанных с неврологическими заболеваниями. Например, аллель ApoE4 в гетерозиготной и тем более в гомозиготной форме ассоциирован с риском развития болезни Альцгеймера. Другие маркеры риска болезни Альцгеймера включают мутации в гене APP, особенно мутации в положении 717 и положениях 670 и 671, называемые мутациями Hardy и Swedish соответственно, мутации в генах пресенилина, PS1 и PS2, семейный анамнез БА, гиперхолестеринемию или атеросклероз. Лица, страдающие в настоящее время болезнью Альцгеймера, могут быть распознаны с помощью ПЭТ-изображений по характерной деменции, а также по наличию факторов риска, описанных выше. Кроме того, существует ряд диагностических тестов для выявления лиц с БА. Они включают измерение уровней тау- или фосфо-тау в спинномозговой жидкости или крови и Аβ42. Повышенный уровень тау- или фосфо-тау и сниженный уровень Аβ42 указывают на наличие БА. Некоторые мутации связаны с болезнью Паркинсона, например, Ala30Pro или Ala53Thr в гене синуклеина, или с болезнью Паркинсона связаны мутации в других генах, таких как киназа с богатыми лейцином повторами (LRRK2 или PARK8). У субъектов также может быть диагностировано любое из указанных выше неврологических заболеваний по критериям DSM IV TR.

[00137] У бессимптомных субъектов лечение можно начинать в любом возрасте (например, в 10, 20, 30 лет или в более старшем возрасте). Однако обычно нет необходимости начинать лечение до достижения субъектом 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90 лет. Лечение обычно заключается в многократном введении в течение определенного периода времени. Лечение можно контролировать, анализируя уровни антител с течением времени. Если ответ падает, показана бустерная доза. В случае потенциальных пациентов с синдромом Дауна лечение можно начинать антенатально, вводя терапевтическое средство матери или вскоре после рождения.

[00138] Способы лечения и применения

[00139] В настоящем изобретении предложены способы ингибирования или уменьшения агрегации Abeta и/или тау у субъекта, страдающего нейродегенеративным заболеванием или подверженного риску его развития (например, болезни Альцгеймера). Способы включают введение субъекту описанных в настоящем документе композиций. Терапевтически эффективное количество представляет собой дозу, при приеме которой в течение эффективного периода времени достигается желаемый иммунологический или клинический эффект. Схемы введения могут быть скорректированы для обеспечения оптимального терапевтического ответа. Например, можно вводить несколько дробных доз

через установленные промежутки времени (например, еженедельно, ежемесячно), или доза может быть пропорционально уменьшена в зависимости от остроты терапевтической ситуации.

[00140] В профилактических целях композиции, описанные в настоящем документе, можно вводить субъекту, предрасположенному к заболеванию или иным образом подвергающемуся риску заболевания (например, болезни Альцгеймера) по схеме (доза, частота и способ введения), эффективной для снижения риска, уменьшения тяжести или задержки появления хотя бы одного признака или симптома заболевания. В частности, схема эффективна для ингибирования или задержки образования бляшек Аβ и/или ингибирования или задержки тау или фосфо-тау и парных филаментов, образованных из него в головном мозге, и/или ингибирования или задержки его токсических эффектов и/или ингибирования/или задержки развития поведенческих нарушений. При терапевтическом применении композиции, описанные в настоящем документе, вводят субъекту с подозрением на заболевание или пациенту, уже страдающему заболеванием (например, болезнью Альцгеймера), по схеме (доза, частота и способ введения), эффективной для облегчения или, по меньшей мере, замедления дальнейшего ухудшения хотя бы одного признака или симптома заболевания. В частности, схема предпочтительно эффективна для снижения или по меньшей мере ингибирования дальнейшего повышения содержания бляшек Аβ и/или тау, фосфо-тау-или парных филаментов, образованных из него, связанных с ними токсичности и/или поведенческих нарушений.

[00141] Схема считается терапевтически или профилактически эффективной, если у получавшего лечение индивидуума достигается более благоприятный исход, чем средний исход в контрольной популяции сопоставимых субъектов, не получавших лечения способами по изобретению, или если более благоприятный исход продемонстрирован у получавших лечение субъектов по сравнению с контрольными субъектами в контролируемом клиническом испытании (например, в фазе II, фазе II/III или фазе III испытания) на уровне $p < 0,05$, или 0,01, или даже 0,001.

[00142] Эффективные дозы варьируются в зависимости от многих различных факторов, таких как способ введения, участок-мишень, физиологическое состояние пациента, является ли пациент носителем ApoE, является ли пациент человеком или животным, другими вводимыми лекарствами, и является ли лечение профилактическим или терапевтическим.

[00143] В некоторых вариантах осуществления эффективное количество представляет собой общую дозу от 25 мкг до 1000 мкг или от 50 мкг до 1000 мкг. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество составляет общую дозу 100 мкг. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество представляет собой дозу 25 мкг, вводимую субъекту всего два раза. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество представляет собой дозу 100 мкг, вводимую субъекту всего два раза. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество представляет собой

дозу 400 мкг, вводимую субъекту всего два раза. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество представляет собой дозу 500 мкг, вводимую субъекту всего два раза. В некоторых вариантах осуществления РНК-вакцину (например, мРНК) вводят субъекту внутривенно, внутримышечно или интраназально.

[00144] В некоторых вариантах осуществления количество агента для активной иммунотерапии варьируется от 1 до 1000 мкг (мкг), или от 0,1-500 мкг, или от 10 до 500 мкг, или от 50 до 250 мкг на пациента и может составлять 1-100 или 1-10 мкг на инъекцию для введения человеку. Время инъекций может значительно варьироваться от одного раза в день до одного раза в неделю, одного раза в месяц, одного раза в год и одного раза в декаду. Типичная схема состоит из иммунизации с последующими повторными инъекциями через определенные промежутки времени, такие как интервалы в 6 недель или два месяца. Другая схема состоит из иммунизации с последующей одной или более ревакцинациями через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев спустя. Другая схема включает инъекции каждые два месяца на протяжении всей жизни. В качестве альтернативы бустерные инъекции могут проводиться нерегулярно по результатам мониторинга иммунного ответа. Частота введения может быть однократной или многократной, пока побочные эффекты находятся в пределах клинически приемлемого диапазона.

[00145] В некоторых вариантах осуществления композиции или способы, раскрытые в настоящем документе, включают введение субъекту вакцины на основе нуклеиновой кислоты, содержащей один или более полинуклеотидов ДНК или РНК, имеющих открытую рамку считывания, кодирующую первый пептид и второй пептид, при этом доза составляет от 10 мкг/кг до 400 мкг/кг вакцины на основе нуклеиновой кислоты, которую вводят субъекту. В некоторых вариантах осуществления доза полинуклеотида РНК составляет 1-5 мкг, 5-10 мкг, 10-15 мкг, 15-20 мкг, 10-25 мкг, 20-25 мкг, 20-50 мкг, 30-50 мкг, 40-50 мкг, 40-60 мкг, 60-80 мкг, 60-100 мкг, 50-100 мкг, 80-120 мкг, 40-120 мкг, 40-150 мкг, 50-150 мкг, 50-200 мкг, 80-200 мкг, 100-200 мкг, 120-250 мкг, 150-250 мкг, 180-280 мкг, 200-300 мкг, 50-300 мкг, 80-300 мкг, 100-300 мкг, 40-300 мкг, 50-350 мкг, 100-350 мкг, 200-350 мкг, 300-350 мкг, 320-400 мкг, 40-380 мкг, 40-100 мкг, 100-400 мкг, 200-400 мкг или 300-400 мкг на дозу. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновую кислоту вводят субъекту посредством внутривенной или внутримышечной инъекции. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновую кислоту вводят субъекту в нулевой день. В некоторых вариантах осуществления вторую дозу нуклеиновой кислоты вводят субъекту на седьмой, или четырнадцатый, или двадцать первый день.

[00146] Композиции, описанные в настоящем документе, предпочтительно вводить периферическим путем (т. е. таким, при котором вводимая композиция вызывает сильный иммунный ответ и/или индуцированная популяция антител преодолевает гематоэнцефалический барьер для достижения намеченного участка в головном мозге, спинном мозге или в глазу). При периферических заболеваниях индуцированные антитела покидают сосудистую сеть и достигают намеченных периферических органов. Пути

введения включают пероральный, подкожный, интраназальный, внутрикожный или внутримышечный. Некоторые способы активной иммунизации - подкожные и внутримышечные. Внутримышечное введение и подкожное введение можно осуществлять в одно или более мест. Внутримышечная инъекция чаще всего выполняется в мышцу руки или ноги. В некоторых методах агенты вводятся непосредственно в конкретную ткань, где скопились отложения.

[00147] Количество вводимых доз может быть скорректировано, чтобы обеспечить более сильный иммунный ответ (например, более высокие титры). При острых заболеваниях или обострениях хронического заболевания часто бывает достаточно от 1 до 10 доз. Иногда при остром заболевании или обострении хронического заболевания бывает достаточно однократной болюсной дозы, необязательно, в дробной форме. При хронических заболеваниях вакцинацию/иммунотерапию, описанную в настоящем документе, можно вводить с регулярными интервалами, например, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно, ежеквартально, каждые шесть месяцев в течение по меньшей мере 1, 5 или 10 лет или на протяжении всей жизни пациента.

[00148] Эффективное количество иммуногена, кодируемого ДНК или РНК, может составлять от примерно 1 нанограмма до примерно 1 грамма на килограмм массы тела реципиента, или от примерно 0,1 мкг/кг до примерно 10 мг/кг, или от примерно 0,1 мкг/кг до примерно 10 мг/кг, или от примерно 1 мкг/кг до примерно 1 мг/кг. Лекарственные формы, подходящие для внутреннего введения, предпочтительно содержат (для последнего диапазона доз) примерно от 0,1 мкг до 100 мкг активного ингредиента на лекарственную единицу. Активный ингредиент может варьироваться от 0,5 до 95% по массе в расчете на общую массу композиции. В альтернативном варианте, эффективная доза дендритных клеток, нагружаемых антигеном, составляет примерно от 10^4 до 10^8 клеток. Специалисты в области иммунотерапии смогут корректировать эти дозы без избыточных экспериментов.

[00149] Композиции нуклеиновых кислот можно вводить удобным способом, например, инъекцией удобным и эффективным путем. Пути могут включать внутрикожную доставку с использованием «генной пушки» или внутримышечную инъекцию, но не ограничиваются ими. Модифицированные дендритные клетки вводят подкожно, внутривенно или внутримышечно. Другие возможные пути включают пероральное, интратекальное, ингаляционное, трансдермальное введение или ректальное введение.

[00150] В зависимости от пути введения композиция может быть покрыта материалом для защиты соединения от действия ферментов, кислот и других внешних воздействий, которые могут инактивировать соединение. Таким образом, может быть необходимо покрыть композицию оболочкой или ввести композицию совместно с материалом для предотвращения ее инактивации. Например, с ингибиторами нуклеаз или протеаз (например, панкреатическим ингибитором трипсина, диизопропилфторфосфатом и трасилолом) или в подходящем носителе, таком как липосомы (включая эмульсии вода-

в-масле-в-воде), а также обычные липосомы (Strejan et al., J. Neuroimmunol 7(1):27-41, 1984).

[00151] Иммунотерапевтические композиции, раскрытые в настоящем документе, также можно использовать в сочетании с другими видами лечения заболеваний, связанных с накоплением Аβ или тау, например, анти-Аβ антителами, такими как антитела, которые специфически связываются с любым из эпитопов Аβ, раскрытых в настоящем документе. Например, адуканумаб или любое из антител, раскрытых, например, в публикации патента США № 20100202968 и патенте США № 8906367, и/или антитела против тау, такие как антитела, которые специфично связываются с любым из эпитопов тау, раскрытых в настоящем документе, ABBV-8E12, Gosuranemab, Zagotenemab, RG-6100, BPIB076 или любое из антител, раскрытых в WO2014/165271, US 10501531, WO2017/191559, WO2017/191560, WO2017/1915159, US2017/191560, WO2017/19156114, US2017/191560, WO2017/19156114. В некоторых способах комбинированной терапии пациент получает пассивную иммунотерапию до раскрытых в настоящем документе способов активной иммунотерапии. При других методах пациент получает пассивную и активную иммунотерапию в течение одного и того же периода лечения. В качестве альтернативы пациенты могут получать активную иммунотерапию до пассивной иммунотерапии. Комбинации могут также включать терапию низкомолекулярными соединениями и неиммуногенную терапию, такую как с использованием RAZADYNE® (галантамин), EXELON® (ривастигмин) и ARICEPT® (донепезил) и других композиций, которые улучшают функцию нервных клеток в головном мозге.

[00152] Композиции по настоящему изобретению могут быть использованы в производстве лекарственных средств для описанных в настоящем документе схем лечения.

[00153] Схемы лечения

[00154] Желаемые результаты способов лечения, раскрытых в настоящем документе, варьируются в зависимости от заболевания и профиля пациента и могут быть определены специалистами в данной области. К желаемым результатам относится улучшение состояния здоровья пациента. Как правило, желаемые результаты включают измеримые показатели, такие как уменьшение или удаление патологических амилоидных фибрилл, снижение или ингибирование агрегации амилоида и/или отложение амилоидных фибрилл и усиление иммунного ответа на патологические и/или агрегированные амилоидные фибриллы. Желаемые результаты также включают улучшение симптомов, характерных для амилоидного заболевания. Используемые в настоящем документе относительные термины, такие как «улучшить», «увеличить» или «уменьшить», обозначают значения относительно контроля, такого как измерение у того же индивидуума до начала лечения, описанного в настоящем документе, или измерение у контрольного индивидуума или группы. Контрольный индивидуум - это индивидуум, страдающий тем же амилоидным заболеванием, что и индивидуум, который получает

лечение, и примерно того же возраста, что и индивидуум, который получает лечение (чтобы обеспечить сопоставимость стадий заболевания у получающего лечение индивидуума и контрольного индивидуума), но который не получал лечения с использованием описанных составов иммунотерапии/вакцины. В качестве альтернативы контрольный индивидуум представляет собой здорового индивидуума примерно того же возраста, что и индивидуум, который получает лечение. Изменения или улучшения в ответ на терапию, как правило, статистически значимы и описываются значением p , меньшим или равным 0,1, меньше 0,05, меньше 0,01, меньше 0,005 или меньше 0,001, которое можно считать значимым.

[00155] Эффективные дозы композиций для лечения субъекта, раскрытых в настоящем документе, варьируются в зависимости от многих различных факторов, включая способ введения, участок-мишень, физиологическое состояние пациента, является ли пациент человеком или животным, другие назначенные лекарства, если таковые имеются, и является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Терапевтические дозы можно титровать для оптимизации безопасности и эффективности. Количество иммуногена также может зависеть от того, вводится ли также адъювант, причем в отсутствие адъюванта требуются более высокие дозы. Количество иммуногена для введения иногда варьируется от 1 до 500 мкг на пациента и чаще от 5 до 500 мкг на инъекцию для введения человеку. Иногда используется более высокая доза 1-2 мг на дозу. Обычно для каждой дозы для человека используется около 10, 20, 50 или 100 мкг. Периодичность введения может значительно варьироваться от одного раза в день до одного раза в год и одного раза в декаду. В любой день, когда вводится доза иммуногена, доза составляет более 1 мкг/пациента и обычно более 10 мкг/пациента, если также вводят адъювант, и более 10 мкг/пациента и обычно более 100 мкг/пациента в отсутствие адъюванта. Типичная схема состоит из иммунизации, за которой следует ревакцинация(и) с 6-недельными интервалами. Другая схема состоит из иммунизации с последующей ревакцинацией через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев спустя. Другая схема включает введение каждые два месяца на протяжении всей жизни. В качестве альтернативы бустерное введение может быть нерегулярным по результатам мониторинга иммунного ответа.

[00156] При введении в сочетании со вторым средством для лечения болезни Альцгеймера, таким как Razadyne® (галантамин), Exelon® (ривастигмин) и Aricept® (донепезил), второе терапевтическое средство можно вводить в соответствии с предписанием для продукта или по мере необходимости в связи с лечением композициями по настоящему изобретению.

[00157] **Наборы**

[00158] В описании дополнительно представлены наборы (например, контейнеры), содержащие композиции, раскрытые в настоящем документе, и сопутствующие материалы, такие как инструкции по применению (например, вкладыш в упаковку). Инструкции по применению могут содержать, например, инструкции по введению

композиций и необязательно одного или более дополнительных агентов. Контейнеры с композициями пептидов и/или нуклеиновых кислот могут представлять собой стандартные дозы, большие упаковки (например, многодозовые упаковки) или дробные дозы.

[00159] Вкладыш в упаковку относится к инструкциям, обычно включаемым в коммерческие упаковки терапевтических продуктов, которые содержат информацию о показаниях, использовании, дозировке, введении, противопоказаниях и/или предупреждениях, касающихся использования таких терапевтических продуктов. Наборы могут также включать второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическая вода для инъекций (BWFI), физиологический раствор с фосфатным буфером, раствор Рингера и раствор декстрозы. Набор также может включать другие материалы, желательные с коммерческой точки зрения и с точки зрения пользователя, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

[00160] **Применение**

[00161] Каждый из пептидов, полипептидов, иммуногенов и фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе, может быть использован для лечения одного или более заболеваний, описанных в настоящем документе. Кроме того, каждый из пептидов, полипептидов, иммуногенов и фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе, может быть использован в способах лечения одного или более заболеваний, описанных в настоящем документе. Каждый из пептидов, полипептидов, иммуногенов и фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе, можно использовать в способе изготовления лекарственного средства для лечения или применения при лечении одного или более заболеваний, описанных в настоящем документе.

[00162] Нижеследующие примеры представлены только в целях иллюстрации и не предназначены для ограничения объема изобретения, описанного выше в общих чертах.

[00163] Все патентные заявки США и международные патенты, указанные в данном документе, полностью включены путем ссылки.

Примеры

[00164] **Пример 1: иммунизация морских свинок**

[00165] Морским свинкам внутримышечно вводили 50 мкг тестируемого иммуногена, 25 мкг QS21 в 200 мкл Addavax в 0-й, 21-й, 49-й и 77-й день. Забор крови проводили через 7 дней после иммунизации. Тестируемые пептиды включали DAEFRHD (SEQ ID NO:06), QIVYKPV (SEQ ID NO:39) и DAEFRHRRQIVYKPV (SEQ ID NO:57). Специфичными иммуногенами являлись DAEFRHDC (SEQ ID NO:71), QIVYKPVGGC (SEQ ID NO:72) и DAEFRHRRQIVYKPVGGC (SEQ ID NO:59). Пептиды связывали через С-концевой цистеин с CRM-197 малеимидной связью.

[00166] Самкам морских свинок в начале исследования было не менее 5 недель, и они имели приблизительную массу тела 350-500 г. Надлежащее содержание животных и исследовательские процедуры по содержанию и уходу за животными проводились в

аккредитованном учреждении в соответствии с руководящими принципами Министерства сельского хозяйства США (USDA) и Международной организации оценки и аккредитации содержания лабораторных животных (AAALAC).

[00167] Концентрация иммуногена составляла 0,5 мг/мл. Перед каждым введением испытуемого иммуногена участок площадью примерно 3 см² на каждой задней конечности выбривали и протирали этанолом для визуализации места инъекции. Каждое животное получало тестовую дозу иммуногена 200 мкл (0,25 мкг/мкл) двумя инъекциями по 100 мкл в два отдельных участка (т. е. животные получали 50 мкг иммуногена в 100 мкл PBS+25 мкг QS21 в 100 мкл MF59). Иглу 25G-27G вводили внутримышечно в заднюю конечность на глубину примерно 0,25-0,5 см и вводили по 100 мкл на участок. Места инъекций чередовали при каждом введении между четырьмя отдельными участками на задней конечности, и места инъекции были отдалены друг от друга по меньшей мере на 2 см.

[00168] Пример 2: измерение титров антител

[00169] Образцы цельной крови собирали в пробирки с активатором свертывания через яремную вену в количестве 250-350 мкл на 1-й, 4-й и 8-й неделе. Максимальный объем цельной крови собирали в пробирки с активатором свертывания через пункцию сердца в конце недели 12. Всем образцам крови давали свернуться при комнатной температуре в течение более 30 минут, центрифугировали при температуре окружающей среды (примерно 20-25°C) при 3000 об/мин в течение 10-15 минут, и супернатант сыворотки переносили по отдельности в чистые криопробирки. Супернатант сыворотки хранили в замороженном виде при температуре -80°C (±12°C).

[00170] Титр крови морской свинки против растворимых агрегатов Аβ

[00171] 2,5 мкг/мл препарата растворимого агрегата Аβ (HFIP-пленку Аβ 42 ресуспендировали и инкубировали в течение ночи при встряхивании, затем центрифугировали для удаления нерастворимых агрегатов) наносили на лунки планшета, внося в лунку по 100 мкл полученного препарата в PBS и инкубируя в течение ночи при комнатной температуре. Планшеты блокировали на 1 час 1%-м BSA в PBS. Жидкость из лунок удаляли аспиратором, и в лунки 1-4 ряда А добавляли по 200 мкл 0,1%-го BSA в PBS-Tween. В 1-ю лунку добавляли отрицательную сыворотку GP в разведении 1/100, в то время как лунки 2-4 содержали тестируемую сыворотку в разведении 1/100. Ряды В-Н содержали по 100 мкл 0,1%-го BSA в PBS-Tween. Проводили серийные разведения 1:2 вниз по планшету, получая разведение от 1/100 до 1/12800. Лунки инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре, затем промывали, и приготавливали разведение 1/5000 меченных HRP вторичных антител против IgG морской свинки в 0,1%-м BSA в PBS-Tween, а затем добавляли по 100 мкл в промытые лунки. Лунки инкубировали в течение 1 часа и промывали. Субстрат OPD готовили с использованием таблеток OPD от Thermo Fisher из расчета 1 таблетка на 10 мл. Добавляли субстратный буфер Thermo Fisher в соотношении 1/10, в каждую лунку добавляли по 100 мкл и инкубировали в течение 15 минут. Для остановки реакции добавляли 50 мкл 2N H₂SO₄, и оптическую плотность (OD)

в лунках планшета измеряли на Molecular Devices Spectromax при 490 нМ. Титр определяли как разведение, дающее 50% максимальной OD, и экстраполировали, если оно попадало между разведениями.

[00172] Титр крови морской свинки к тау

[00173] 2 мкг/мл рекомбинантного WT Tau 4R2N наносили на планшет, используя по 100 мкл на лунку в PBS и инкубируя в течение ночи при комнатной температуре. Планшеты блокировали 1 час 1%-м BSA в PBS. Жидкость из лунок удаляли аспиратором, и в лунки ряда А добавляли по 200 мкл 0,1%-го BSA в PBS-Tween. В столбец 1 добавляли отрицательную сыворотку GP в разведении 1/100, в то время как остальная часть рядов содержала тестируемые сыворотки в разведении 1/100. Проводили серийные разведения 1:2 вниз по планшету, получая разведение от 1/100 до 1/12800. Лунки инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре, затем промывали, и приготавливали разведение 1/5000 меченных HRP вторичных антител против IgG морской свинки в 0,1%-м BSA в PBS-Tween, а затем добавляли по 100 мкл в промытые лунки. Лунки инкубировали в течение 1 часа и промывали. Субстрат OPD готовили с использованием таблеток OPD от Thermo Fisher из расчета 1 таблетка на 10 мл. Добавляли субстратный буфер Thermo Fisher в соотношении 1/10, в каждую лунку добавляли по 100 мкл и инкубировали в течение 15 минут. Для остановки реакции добавляли 50 мкл 2N H₂SO₄, и оптическую плотность (OD) в лунках планшета измеряли на Molecular Devices Spectromax при 490 нМ. Титр определяли как разведение, дающее 50% максимальной OD, и экстраполировали, если оно попадало между разведениями.

[00174] Титр крови морской свинки к Aβ 1-28 или Aβ 1-15

[00175] Aβ 1-15 и Aβ 1-28 использовали в разных частях исследования. Оба этих пептида не образуют агрегаты. 2 мкг/мл мономеров Aβ наносили на лунки планшета по 100 мкл на лунку в PBS и инкубировали в течение ночи при комнатной температуре. Планшеты блокировали 1 час 1%-м BSA в PBS. Жидкость из лунок удаляли аспиратором, и в лунки ряда А добавляли по 200 мкл 0,1%-го BSA в PBS-Tween. В столбец 1 добавляли отрицательную сыворотку GP в разведении 1/100, в то время как остальная часть рядов содержала тестируемые сыворотки в разведении 1/100. Проводили серийные разведения 1:2 вниз по планшету, получая разведение от 1/100 до 1/12800. Лунки инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре, затем промывали, и приготавливали разведение 1/5000 меченных HRP вторичных антител против IgG морской свинки в 0,1%-м BSA в PBS-Tween, а затем добавляли по 100 мкл в промытые лунки. Лунки инкубировали в течение 1 часа и промывали. Субстрат OPD готовили с использованием таблеток OPD от Thermo Fisher из расчета 1 таблетка на 10 мл. Добавляли субстратный буфер Thermo Fisher в соотношении 1/10, в каждую лунку добавляли по 100 мкл и инкубировали в течение 15 минут. Для остановки реакции добавляли 50 мкл 2N H₂SO₄, и оптическую плотность (OD) в лунках планшета измеряли на Molecular Devices Spectromax при 490 нМ. Титр определяли как разведение, дающее 50% максимальной OD, и экстраполировали, если оно попадало между разведениями.

[00176] Титрование тау против пептида, содержащего его эпитоп

[00177] Планшеты Thermofisher с нейтравидином регидратировали 0,05%-м Tween в TBS, и жидкость удаляли аспирацией. Раствор пептида GGGSVQIVYKPV DLS (SEQ ID NO:68), содержащий биотин, готовили в разведении 1/500 в 0,1%-м BSA в PBS-Tween. Добавляли по 100 мкл на лунку и инкубировали в течение 1 часа и затем промывали. В ряд А планшета добавляли по 200 мкл 0,1%-го BSA в PBS-Tween. В столбец 1 добавляли отрицательную сыворотку GP в разведении 1/100, в то время как остальная часть рядов содержала тестируемые сыворотки в разведении 1/100. Проводили серийные разведения 1:2 вниз по планшету, получая разведение от 1/100 до 1/12800. Лунки инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре, затем промывали, и приготавливали разведение 1/5000 меченных HRP вторичных антител против IgG морской свинки в 0,1%-м BSA в PBS-Tween, а затем добавляли по 100 мкл в промытые лунки. Лунки инкубировали в течение 1 часа и промывали. Субстрат OPD готовили с использованием таблеток OPD от Thermo Fisher из расчета 1 таблетка на 10 мл. Добавляли субстратный буфер Thermo Fisher в соотношении 1/10, в каждую лунку добавляли по 100 мкл и инкубировали в течение 15 минут. Для остановки реакции добавляли 50 мкл 2N H₂SO₄, и оптическую плотность (OD) в лунках планшета измеряли на Molecular Devices Spectromax при 490 нМ. Титр определяли как разведение, дающее 50% максимальной OD, и экстраполировали, если оно попадало между разведениями.

[00178] На фиг. 1 показаны результаты сравнения средних геометрических титров сыворотки морской свинки для иммуногена DAEFRHRRQIVYKPV (SEQ ID NO:57), которую титровали против мономерного A β 1-28, растворимых агрегатов A β , полноразмерного тау-белка и эпитопа тау-белка, MTBR, содержащего GGGSVQIVYKPV DLS (SEQ ID NO:68).

[00179] На фиг. 2 показаны результаты для однопептидного иммуногена A β и тау-пептидов (DAEFRHD (SEQ ID NO:06) и QIVYKPV (SEQ ID NO:39)) по сравнению с двухпептидным иммуногеном DAEFRHRRQIVYKPV (SEQ ID NO:57) против A β 1-28 и полноразмерного тау.

[00180] Пример 3: окрашивание ткани мозга при болезни Альцгеймера сывороткой морских свинок, иммунизированных вакциной, описанной в настоящем документе.

[00181] Блоки свежзамороженной ткани головного мозга человека после вскрытия (~0,5 г) заливали соединением для оптимальной температуры резки (OCT compound) и приготавливали срезы толщиной 10 мкм с использованием криостата для получения срезов. Срезы помещали в раствор глюкозооксидазы и бета-D-глюкозы в присутствии азида натрия для блокирования эндогенной пероксидазы. После приготовления срезов ткани, окрашивание указанной сывороткой морских свинок, иммунизированных вакциной по настоящему изобретению проводили в двух разведениях (1:300 и 1:1500) с использованием вторичных кроличьих антител против антител морской свинки и набора DAKO DAB Detection в соответствии с инструкциями производителя. Окрашивание

проводили с использованием устройства для автоматического окрашивания, Leica Bond Stainer. Результаты показывают, что сыворотка морских свинок, иммунизированных вакциной по настоящему изобретению, содержит антитела, специфичные к A β и тау в ткани головного мозга пациентов с болезнью Альцгеймера (см. фиг. 3A-3F).

[00182] Пример 4: сыворотка иммунизированных животных блокирует связывание растворимых агрегатов A β с нейронами.

[00183] Первичные нейроны гиппокампа крысы E18 культивировали, как описано ранее (Zago, et al. "Neutralization of Soluble, Synaptotoxic Amyloid β Species by Antibodies Is Epitope Specific," J Neurosci. 2012 Feb 22; 32(8): 2696-2702). Растворимый агрегат A β предварительно инкубировали с сывороткой вакцинированной морской свинки или без нее на культуре DIV14-21, чтобы заблокировать связывание растворимого A β с нейритами. Сыворотку морской свинки выделяли из животных, иммунизированных двойным иммуногенным пептидом: DAEFRHRRQIVYKPVGGC (SEQ ID NO:59; иммуноген 9). Свежий немеченый, биотинилированный или растворимый (9:1) A β готовили за день до этого и инкубировали в течение ночи при 4°C. Каждый разведенный образец сыворотки (1:1000, 1:300 и 1:100) и раствор растворимого A β готовили в 2-кратной конечной концентрации в половине конечного объема с использованием нейробазальной среды без фенолового красного (NB-NPR). Половину конечного объема 2x растворимого A β объединяли с половиной конечного объема 2x разведенной сыворотки вакцинированной морской свинки, получая 1x конечную концентрацию в общем конечном реакционном объеме, который хорошо перемешивали, а затем преинкубировали 30 минут при 37°C. Нейроны E18 промывали NB-NPR в количестве 150 мкл на лунку перед добавлением реакционного объема. Сыворотку морской свинки от иммунизированных животных/растворимый A β добавляли к нейронам E18 в количестве 60 мкл на лунку, а затем инкубировали в течение 30 минут при 37°C при стандартных условиях инкубации (5% CO₂; 9% O₂). Клетки дважды промывали, используя 150 мкл NB-NPR на лунку, а затем фиксировали в 4%-м параформальдегиде в 1x DPBS в течение 20 минут. Клетки пермеабелизовали с использованием 0,1 TX-100 в течение 5 минут и блокировали с помощью 10%-й нормальной козьей сыворотки (NGS) в течение 1 часа при комнатной температуре (КТ). Клетки инкубировали с первичными антителами к MAP2 и NeuN (100 мкл/лунку в 1x DPBS, содержащем 1% BSA+1% NGS) в течение ночи при 4°C. На следующий день клетки дважды промывали по 150 мкл/лунку 1x DPBS по 5 минут на каждую промывку. Вторичные антитела (100 мкл/лунку в 1x DPBS+1% BSA+1% NGS) добавляли на 1 час при комнатной температуре. Для количественной оценки связывания растворимого агрегата A β с нейритами был проведен анализ высококонтрастной визуализации (HCI) с использованием инструмента Operetta HCI CLS (Perkin Elmer; модифицированный алгоритм Neurite Outgrowth: объектив 40x H₂O; 40 полей на лунку; (n=3) на образец; данные показаны как среднее (+/-) SD); нейрональные маркеры MAP2 и NeuN (Abcam) использовались для отслеживания каждого нейритного выроста и подсчета количества тел клеток в оптическом поле; участки нейритных растворимых агрегатов A β

обнаруживали с помощью стрептавидина-488 или поликлонального антитела к A β (Thermo; Millipore); и данные представляли в виде участков растворимых агрегатов A β /нейрон (или в виде интегрированной интенсивности)).

[00184] Для каждого тестируемого образца анализировали приблизительно по 80-150 нейронов на лунку. Результаты демонстрируют, что сыворотка морской свинки от животных, иммунизированных двойным иммуногенным пептидом, DAEFRHDDRQIVYKPVGGC (SEQ ID NO: 59; иммуноген 9), ингибировала связывание A β с нейронами дозозависимым образом (см. фиг. 4).

[00185] **Пример 5: мыши, иммунизированные двупептидными антигенами, продуцируют титры к A β и тау.**

[00186] Самкам мышей Swiss Webster в 0-й, 14-й и 28-й день вводили инъекцией по 25 мкг двупептидного иммуногена (таблица 2) и 25 мкг QS21 (Desert King) в PBS, всего 200 мкл/инъекцию. Каждой мыши подкожно вводили по 200 мкл. У мышей брали кровь на 21-й и 35-й день.

Таблица 2.

Иммуноген	Последовательность двупептидного иммуногена (SEQ ID NO.)
9	DAEFRHDDRQIVYKPVGGC (SEQ ID NO:59)
10	DAEFRHDDRQIVYKPV (SEQ ID NO:60)
18	DAEFRHDDRQIVYKPVAAAC (SEQ ID NO:61)
19	DAEFRHDDRQIVYKPVKKC (SEQ ID NO:62)
20	DAEFRHDDRREIVYKSPGGC (SEQ ID NO:63)
21	DAEFRHDDRREIVYKSPAAC (SEQ ID NO:64)
22	DAEFRHDDRREIVYKSPC (SEQ ID NO:65)
23	DAEFRHDDRREIVYKSPKKC (SEQ ID NO:66)

[00187] Иммуногены, содержащие тау-пептид EIVYKSP (SEQ ID NO:43); см. фиг. 5B) показали большую вариабельность в целом в титрах к тау (за исключением иммуногена 23), чем те, у которых была последовательность MTBR тау-белка, QIVYKPV (SEQ ID NO:39); поэтому также тестировали пептид основной области связывания микротрубочек (MTBR), содержащий DAEFRHDDRQIVYKPV (SEQ ID NO:57) (фиг. 5A). Титры для трех иммуногенов с разными линкерами (без линкера, AA и KK) по сравнению с линкером GGC показаны на фиг. 5.

[00188] Титры, наблюдаемые при втором заборе крови, представлены в таблицах 3 и 4:

Таблица 3

Титр против Aβ 1-28 (при 50% максимальной OD)

Иммуноген, №	Мышь, №				Геометрическое среднее	Геометрическое стандартное отклонение
	1	2	3	4		
9	4000	2000	6000	1000	2632,15	2,20
10	13000	2000	4000	1000	3193,44	2,98
18	2000	2800	1200	5000	2407,6	1,80
19	7200	2500	1500	1800	2640,34	2,02
20	4000	2000	6000	1000	2470	1,96
21	13000	2000	4000	1000	1665	2,71
22	300	7000	2000	7000	2329	4,43
23	350	3400	4000	7000	2403	3,74

Таблица 4

Титр против тау (при 50% максимальной OD)						
Иммуноген, №	Мышь, №				Геометрическое среднее	Геометрическое стандартное отклонение
	1	2	3	4		
9	400	800	200	800	475,7	1,94
10	400	3200	3200	1500	1574,4	2,67
18	1500	100	6000	100	547,7	7,72
19	10000	1000	13000	1500	3738,9	3,68
20	300	3200	Нет титра	1000	313	12,07
21	1500	100	6000	100	278,3	7,75
22	100	4000	Нет титра	13000	477,5	27,33
23	300	3000	1300	500	874,8	2,78

[00189] Титры, наблюдаемые у морских свинок, иммунизированных иммуногеном 9, DAEFRHDDRQIVYKPVGGC (SEQ ID NO:59), представлены в таблице 5 ниже.

Таблица 5

Морская свинка	Титр против Abeta 1-28	Титр против растворимых агрегатов Abeta	Титр против тау	Титр против биотин-GGSQIVYKPV DLS (SEQ ID NO:73)
1	3100	1500	1600	1000
2	3200	4000	6400	6400
3	3300	2000	3200	4000

[00190] **Пример 6: сыворотка иммунизированных животных окрашивает бляшки Aβ и патологические формы тау-белка в ткани головного мозга человека.**

[00191] Свежезамороженные ткани головного мозга доноров с болезнью

Альцгеймера или здоровых контролей после аутопсии помещали в среду OCT и разрезали в криостате для получения замороженных срезов толщиной 10 мкм. Срезы ткани инкубировали в растворе глюкозооксидазы и бета-D-глюкозы в присутствии азиды натрия для блокирования эндогенной пероксидазы. Окрашивание проводили сывороткой иммунизированных мышей. Мышей вакцинировали следующими двойными антигенными пептидами: DAEFRHRRQIVYKPVGGC (SEQ ID NO:59, иммуноген 9); DAEFRHRRQIVYKPVVC (SEQ ID NO:60, иммуноген 10); DAEFRHRRQIVYKPVAAAC (SEQ ID NO:61, иммуноген 18); и DAEFRHRRQIVYKPVKKC (SEQ ID NO:62, иммуноген 19), или использовали отрицательную сыворотку от контрольных мышей. Затем проводили окрашивание в разведении 1:1000 с использованием устройства для автоматического окрашивания Leica Bond Rx Stainer (Leica Biosystems). Связывание антител определяли с использованием набора Bond Polymer Refine Detection Kit (DS9800, Leica Biosystems), основанного на обнаружении мышиных антител с использованием полимера, визуализации DAB и контрастном окрашивании ядер гематоксилином. После установки покровных стекол окрашенные предметные стекла визуализировали в цифровом виде с помощью сканера слайдов Hamamatsu NanoZoomer 2.0HT (Hamamatsu Corporation) с программным обеспечением NDP.scan, 2.5.85. Оцифрованные изображения просматривали и анализировали с помощью программного обеспечения NDP.view, 2.7.43.0.

[00192] Результаты демонстрируют, что бляшки A β и нейрофибриллярные клубки тау были идентифицированы на основании их типичных гистопатологических характеристик. В тканях, инкубированных с контрольной мышинной сывороткой, такие патологии отсутствовали. Также, не пораженная болезнью ткань не имела такого патологического окрашивания после инкубации с сывороткой иммунизированных мышей. На фигурах 6A-E и в таблице 6 обобщены результаты окрашивания A β и тау с использованием мышинной сыворотки от животных, иммунизированных двойными антигенными пептидами (разведение 1:1000 сыворотки, используемой для окрашивания тканей головного мозга пациентов с БА).

Таблица 6

Идентификационный номер сыворотки (ID)	Окрашивание A β	Патологические формы тау	Фон
9-1	+		Прозрачный
9-2	+		Темный
9-3	+++++		Прозрачный
9-4	++		Прозрачный
10-1	+++++		ОК
10-2	+++		Прозрачный
10-3	++++	*	ОК
10-4	++++	*	Темный

18-1	++		Темный
18-3	+		Прозрачный
19-1	+++++	+++	ОК
19-2	++	*	ОК
19-3	+	++	Темный
19-4	++		ОК
9: DAEFRHDDRQIVYKPVGGC (SEQ ID NO:59) 10: DAEFRHDDRQIVYKPVC (SEQ ID NO:60) 18: DAEFRHDDRQIVYKPVAAC (SEQ ID NO:61) 19: DAEFRHDDRQIVYKPVKKC (SEQ ID NO:62) * Возможная патологическая форма тау, слишком слабое окрашивание, чтобы явно идентифицировать окрашивание, как тау			

[00193] Пример 7: иммунизация и определение титров у яванских макаков.

[00194] Исследование, описанное в этом примере, было разработано для оценки наработки титров к Аβ и тау у яванских макаков с использованием пептида с двойным антигеном DAEFRHDDRQIVYKPVGGC (SEQ ID NO:59). Авторы изобретения также оценили две схемы введения и постоянство титров.

[00195] Иммунизация

[00196] Для двойных линейных Аβ-тау-иммуногенов с сайтом расщепления в дендритных клетках проводили скрининг на мышах на предмет сбалансированного титра к белкам Аβ и тау (см. пример 5 выше). Набор иммуногенов дополнительно оценивали на морских свинках (см. примеры 1-5 выше) и яванских макаках (данный пример). Две группы из четырех обезьян иммунизировали внутримышечно 50 мкг иммуногена (SEQ ID NO:59; DAEFRHDDRQIVYKPVGGC), связанного с белком-носителем CRM197, и 50 мкг адьюванта QS21. Группе 1 вводили инъекции на 0-й, 4-й, 12-й и 24-й неделе с забором крови каждые 2 недели до 38-й недели. Группе 2 вводили инъекции на 0-й, 8-й, 24-й неделе с забором крови каждые 2 недели до 38-й недели. Титры в сыворотке определяли относительно Аβ и полноразмерного тау. Свежемороженые срезы головного мозга человека с БА или контрольные срезы окрашивали сывороткой иммунизированных и контрольных животных. Активность иммунной сыворотки морских свинок также оценивали по связыванию растворимого олигомера Аβ в первичных нейронах гиппокампа крысы.

[00197] Протокол определения титра

[00198] Измерение титра антител к Аβ 1-28 у яванского макака

[00199] Кровь яванского макака титровали с помощью метода твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Лунки планшетов покрывали в течение ночи 2 мкг/мл Аβ 1-28 (SEQ ID NO:67) в фосфатно-солевом буфере (PBS), и затем блокировали 1 час 1%-м бычьим сывороточным альбумином (BSA) в PBS. В качестве отрицательного контроля использовали яванского макака до забора крови, в то время как известную положительную антисыворотку из предыдущих исследований на мышах использовали в

качестве положительного контроля при тех же разведениях тестируемой сыворотки. Кровь разводили в PBS/0,1% BSA/0/1% Tween 20 (PBS/BSA/T), начиная с 1/100, и серийно разводили 1:2 вниз по планшету. Планшеты промывали TBS/Tween 20 и добавляли меченые пероксидазой хрена (HRP) козьи антитела к обезьяньему иммуноглобулину G (IgG) (тяжелой и легкой цепи) (IgG [H+L] HRP; Invitrogen) и инкубировали 1 час при комнатной температуре. Планшеты промывали в TBS/Tween 20 и определяли связывание антител с субстратом о-фенилендиаминдигидрохлоридом (OPD) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) в соответствии с инструкциями производителя. Оптическую плотность (OD) в лунках планшета измеряли на Molecular Devices Spectromax при 490 нМ. Титр определяли как разведение, дающее 50% максимальной OD, или 4-кратное превышение над фоном (определенным на графиках и в таблицах), если титр попадал между разведениями, то использовали экстраполяцию.

[00200] Измерение титра антител к тау у яванских макаков

[00201] Кровь яванских макаков титровали с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) против полноразмерного рекомбинантного тау-белка (Proteos, Kalamazoo, MI; SEQ ID NO:02). Лунки планшетов покрывали в течение ночи 2 мкг/мл тау в фосфатно-солевом буфере (PBS), а затем блокировали 1 час 1%-м бычьим сывороточным альбумином (BSA) в PBS. Сыворотку морской свинки до забора крови использовали в качестве отрицательного контроля, в то время как известную положительную антисыворотку из предыдущих исследований на мышах использовали в качестве положительного контроля при тех же разведениях тестируемой сыворотки. Кровь разводили в PBS/0,1% BSA/0/1% Tween 20 (PBS/BSA/T), начиная с 1/100, и серийно разводили 1:2 вниз по планшету. Планшеты промывали TBS/Tween 20 и добавляли меченые пероксидазой хрена (HRP) козьи антитела к обезьяньему иммуноглобулину G (IgG) (тяжелой и легкой цепи) (IgG [H+L] HRP; Invitrogen) и инкубировали 1 час при комнатной температуре. Планшеты промывали в TBS/Tween 20 и определяли связывание антител с субстратом о-фенилендиаминдигидрохлоридом (OPD) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) в соответствии с инструкциями производителя. Оптическую плотность (OD) в лунках планшета измеряли на Molecular Devices Spectromax при 490 нМ. Титр определяли как разведение, дающее 50% максимальной OD, или 4-кратное превышение над фоном (определенным на графиках и в таблицах), если титр попадал между разведениями, то использовали экстраполяцию.

[00202] Титр крови яванского макака к белку-носителю CRM197

[00203] Кровь яванских макаков титровали с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) против белка-носителя CRM197 (FinaBio, Мэриленд). Лунки планшетов покрывали в течение ночи 2 мкг/мл тау в фосфатно-солевом буфере (PBS), а затем блокировали 1 час 1%-м бычьим сывороточным альбумином (BSA) в PBS. Сыворотку морской свинки до забора крови использовали в качестве отрицательного контроля, в то время как известную положительную антисыворотку из предыдущих исследований на мышах использовали в качестве положительного контроля

при тех же разведениях тестируемой сыворотки. Кровь разводили в PBS/0,1% BSA/0/1% Tween 20 (PBS/BSA/T), начиная с 1/100, и серийно разводили 1:2 вниз по планшету. Планшеты промывали TBS/Tween 20 и добавляли меченые пероксидазой хрена (HRP) козы антигела к обезьяньему иммуноглобулину G (IgG) (тяжелой и легкой цепи) (IgG [H+L] HRP; Invitrogen) и инкубировали 1 час при комнатной температуре. Планшеты промывали в TBS/Tween 20 и определяли связывание антител с субстратом о-фенилендиаминдигидрохлоридом (OPD) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) в соответствии с инструкциями производителя. Оптическую плотность (OD) в лунках планшета измеряли на Molecular Devices Spectromax при 490 нМ. Титр определяли как разведение, дающее 50% максимальной OD, или 4-кратное превышение над фоном (определенным на графиках и в таблицах), если титр попадал между разведениями, то использовали экстраполяцию.

[00204] **Результаты**

[00205] Уровни титров были сходными для A β и тау. Обезьяны, иммунизированные по схеме 1, имели титры с большей площадью под кривой, чем у обезьян группы 2, но не продемонстрировали значительного улучшения максимального титра в этих условиях (фиг. 7A, фиг. 7B). Общие уровни титров были ниже, чем в описанном выше исследовании на морских свинках. Это изменение может быть связано с заменой адъюванта с QS21 в ADDVAX у морских свинок на QS21 в забуференном фосфатом солевом растворе (PBS) у яванских макаков, чтобы соответствовать одобренным вакцинам. Постоянство титра было умеренным как для схемы вакцинации с четырьмя инъекциями, так и для схемы вакцинации с тремя инъекциями (фиг. 8A, фиг. 8B). Эти результаты демонстрируют, что эти иммуногены могут генерировать сбалансированный иммунный ответ на A β и тау у приматов. Оптимизация схемы дозирования и/или состава может улучшить уровни и устойчивость титров.

[00206] **Пример 8: иммуногистохимическое окрашивание срезов головного мозга пациентов с БА и контрольных срезов**

[00207] Сыворотку иммунизированных обезьян оценивали на способность связывать патологические бляшки A β и клубки тау в ткани головного мозга человека с БА. Ожидается, что связывание как бляшек A β , так и клубков тау уменьшит нагрузку на бляшки и уменьшит передачу тау, что, в свою очередь, должно уменьшить признаки и симптомы БА.

[00208] Блоки свежзамороженной ткани головного мозга человека после вскрытия заливали соединением для оптимальной температуры резки (OCT compound) и приготавливали срезы толщиной 10 мкм с использованием криостата для получения срезов. Срезы помещали в раствор глюкозооксидазы и бета-D-глюкозы в присутствии азида натрия для блокирования эндогенной пероксидазы. После приготовления срезов ткани, проводили окрашивание указанной иммунной сывороткой яванского макака в двух разведениях (1:300 в 5%-й козьей сыворотке с 0,25%-м Triton в течение 1 часа при комнатной температуре). Связывание определяли с помощью очищенных немеченых

мышинных вторичных антител против обезьяньих IgG (Mybiosource, 3 мг/мл) в течение 1 часа при комнатной температуре, и козьих вторичных антител против мышинных IgG (Jackson, 1:200) в течение 1 часа при комнатной температуре, авидин-биотинового комплекса (ABC; Vector PK-4000) и набора для обнаружения DAB DAKO в соответствии с инструкциями производителя. Окрашивание проводилось с использованием устройства для автоматического окрашивания Leica Bond Stainer.

[00209] В таблице 7 приведены сводные данные по окрашиванию в исследовании на яванских макаках. Все животные, кроме 1002, давали положительное окрашивание Аβ. Только животное 1001 имело сильное окрашивание тау (фиг. 9А - фиг. 9С), при этом животные 1003 (фиг. 10А - фиг. 10В) и 1501 (фиг. 11А - фиг. 11В) демонстрировали умеренное окрашивание. Животное 2501, например, не давало значительного окрашивания тау (фиг. 12А - фиг. 12В). По-видимому, не наблюдается корреляция окрашивания тау с титрами к тау, о чем свидетельствует животное 1001, которое не имело сильного титра к тау, но сильно окрашивало тау.

Таблица 7

Животное, №	Окрашивание Аβ	Окрашивание тау	Титр к Аβ	Титр к тау
1001	+	++	800	150
1002	-	-	25	25
1003	+++	+	15000	6000
1501	+++	+/-	8000	3200
2001	+++	-	9000	350
2003	++	-	200	1500
2102	+++	-	8000	800
2501	+++	-	8000	1600

[00210] Иммуная сыворотка хорошо связывалась с бляшками Аβ и клубками тау в срезах головного мозга человека с БА при концентрациях, которые, как ожидается, достигаются в ЦНС в условиях *in vivo*. Сыворотка обезьян с самыми высокими титрами на 26-й неделе окрашивала Аβ, а сыворотка от одной обезьяны с титрами к тау от низкого до умеренного окрашивала как Аβ, так и тау.

[00211] Эти результаты демонстрируют, что связывание сывороточных антител при иммунном ответе яванского макака будет сбалансированным, и они будут связываться с патологическими бляшками Аβ и клубками тау.

[00212] Пример 9: блокирование сывороткой связывания растворимых агрегатов Аβ с нейронами и активности Т-клеток

[00213] Первичные нейроны гиппокампа, выделенные из крыс E18, культивировали, как описано выше. Свежий немеченый, биотинилированный или растворимый (9:1) Аβ готовили за день до анализа и инкубировали в течение ночи при

4°C. Нейроны промывали NB-NPR в количестве 150 мкл на лунку перед добавлением Аβ/сыворотки. Выделенные IgG из крови яванского макака от иммунизированных животных добавляли к нейронам E18 в количестве 60 мкл/лунку, а затем инкубировали в течение 30 минут при 37°C при стандартных условиях инкубации (5% CO₂; 9% O₂). Клетки дважды промывали, используя 150 мкл NB-NPR на лунку, а затем фиксировали в 4%-м параформальдегиде в 1x DPBS в течение 20 минут. Клетки пермеабилizировали с использованием 0,1 TX-100 в течение 5 минут и блокировали с помощью 10%-й нормальной козьей сыворотки (NGS) в течение 1 часа при комнатной температуре (КТ). Клетки инкубировали с первичными антителами к MAP2 и NeuN (100 мкл/лунку в 1x DPBS, содержащем 1% BSA+1% NGS) в течение ночи при 4°C.

[00214] На следующий день клетки дважды промывали по 150 мкл/лунку 1x DPBS по 5 минут на каждую промывку. Вторичные антитела (100 мкл/лунку в 1x DPBS+1% BSA+1% NGS) добавляли на 1 час при комнатной температуре. Участки нейритных растворимых агрегатов Аβ обнаруживали с помощью стрептавидина-488 или поликлонального антитела к Аβ (ThermoFisher; Millipore); для количественной оценки связывания растворимого агрегата Аβ с нейритами был проведен анализ высококонтрастной визуализации (HCI) с использованием инструмента Operetta HCI CLS (Perkin Elmer; модифицированный алгоритм Neurite Outgrowth: объектив 40x H₂O; 40 полей на лунку; (n=3) на образец; данные показаны как среднее (+/-) SD); нейрональные маркеры MAP2 и NeuN (Abcam) использовались для отслеживания каждого нейритного выроста и подсчета количества тел клеток в оптическом поле; данные по нейритам представляли в виде участков растворимых агрегатов Аβ/нейрон (или в виде интегрированной интенсивности)). Для каждого тестируемого образца анализировали приблизительно по 80-150 нейронов на лунку (Zago, et al., 2012).

[00215] Также исследовали реактивность Т-клеток. Иммунная сыворотка ингибировала связывание растворимых агрегатов Аβ с нейронами гиппокампа. Иммуногены не вызывали цитотоксических Т-клеточных ответов на Аβ или тау.

[00216] Пример 10: животные, иммунизированные дупептидными антигенами, продуцируют титры к Аβ и тау.

[00217] Исследование, описанное в этом примере, было разработано для оценки двойных антигенных пептидов Аβ и тау на мышах. Двойные конструкции Аβ-тау в этом примере эффективно продемонстрировали: высокие титры для обоих антигенов; блокирование связывания тау с гепарином; и окрашивание/связывание с пептидами Аβ и тау в ткани головного мозга пациентов с болезнью Альцгеймера. Кроме того, титры к тау для сконструированного иммуногена тау (конструкция двойного иммуногена с ID №11) были сопоставимы, а в некоторых случаях лучше, чем у других иммуногенов тау, несмотря на включение ненативной последовательности тау. Это демонстрирует, что сконструированные иммуногены можно использовать в вакцинных конструкциях.

Таблица 8

ID конструкции двойного иммуногена, #	Последовательность Abeta	Abeta, SEQ ID NO.	Эндопептидазный линкер	Последовательность тау	Tau, SEQ ID NO.	C-концевой линкер	Cys
2	DAEFRHD	06	RR	VKSKIGST	801	GG	C
3	DAEFRHD	06	RR	SKIGSTEN	817	GG	C
8	DAEFRHD	06	RR	TENLKHQP	695	GG	C
9	DAEFRHD	06	RR	ENLKHQPG	689	GG	C
11	DAEFRHD	06	RR	SKIGSKDNIKH	986	GG	C

Таблица 9

ID конструкции двойного иммуногена, #	Последовательность	SEQ ID NO:
2	DAEFRHDDR.VKSKIGSTGGC	997
3	DAEFRHDDR.SKIGSTENGGC	998
8	DAEFRHDDR.TENLKHQPGGC	999
9	DAEFRHDDR.ENLKHQPGGC	1000
11	DAEFRHDDR.SKIGSKDNIKHGGC	1001

[00218] **Конъюгация:** пептиды были изготовлены компанией Biopeptide (Сан-Диего, Калифорния). CRM-бромацетат был получен от Fina Biosolutions (Rockville, MD). Реакцию связывания пептидов с CRM проводили в соответствии с приведенным ниже протоколом.

[00219] 1M Tris HCL pH 8,0, деионизированную воду MilliQ и 50 mM бората, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA pH 8,5 стерильно фильтровали и дегазировали. 1 мг каждого пептида растворяли в 0,2 мл дегазированной воды, затем добавляли 0,1 мл дегазированного Tris_HCL. Затем добавляли 0,2 мл исходного CRM-бромацетата (всего 1 мг), наконец, добавляли 0,5 мл боратного буфера. Смесь инкубировали 24 часа при 4 градусах C на волновом шейкере, чтобы обеспечить перемешивание. Образцы обессоливали в PBS, и 5 мкл разгоняли в 10%-м трис-геле для подтверждения конъюгации.

[00220] **Инъекции животных:** в каждой группе использовали четырех (4) самок мышей Swiss Webster. Препарат иммуногена представлял собой 25 мкг иммуногена, 25 мкг QS21 и 150 мкл 0,02% Tween 80/PBS на инъекцию. Каждой мышке подкожно вводили по 200 мкл. Мышам вводили инъекции в 0-й день, через 4 недели после 0-го дня и через 8 недель после 0-го дня, кровь брали для определения титра через 5 недель после 0-го дня, животных умерщвляли, и терминальную кровь собирали через 9 недель от 0-го дня (см. фиг. 13).).

[00221] **Анализ титра:** мышиную сыворотку титровали с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Лунки планшетов покрывали в течение ночи либо Abeta 1-28 (Anaspec, Сан-Хосе, Калифорния), либо рекомбинантным тау-белком (Proteos, Kalamazoo, MI) в концентрации 2 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере (PBS), а затем блокировали 1 час 1%-м бычьим сывороточным альбумином (BSA) в PBS. В качестве отрицательного контроля использовалась нормальная мышинная сыворотка, в то время как известная положительная антисыворотка из предыдущих исследований на мышах использовалась в качестве положительного контроля в тех же разведениях, что и тестируемая сыворотка. Кровь разводили в PBS/0,1% BSA/0,1% Tween 20 (PBS/BSA/T), начиная с 1/100, и серийно разводили 1:2 вниз по планшету. Планшеты промывали TBS/Tween 20 и добавляли меченые пероксидазой хрена (HRP) козьи антитела к мышиному иммуноглобулину G (IgG) (тяжелой и легкой цепи) (ThermoFisher) в разведении 1/5000, и инкубировали 1 час при комнатной температуре. Планшеты промывали в TBS/Tween 20 и определяли связывание антител с субстратом о-фенилендиаминдигидрохлоридом (OPD) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) в соответствии с инструкциями производителя. Оптическую плотность (OD) в лунках планшета измеряли на Molecular Devices Spectromax при 490 нМ. Титр определяли как разведение, дающее 4-кратное превышение над фоном (определенное на графиках и в таблицах), если титр попадал между разведениями, то использовали экстраполяцию.

[00222] **Связывание с MTBR**

[00223] Некоторые антитела, которые связываются с MTBR, могут связываться с более чем одной областью MTBR из-за гомологии различных областей MTBR. Антисыворотку титруют на четырех участках MTBR с использованием пептидов MTBR 1-4, приобретенных у Anaspec (Сан-Хосе, Калифорния).

MTBR-пептид 1 QTAPVVPMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGK
(SEQ ID NO:1058)

MTBR-пептид 2 VQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGS
(SEQ ID NO:1059)

MTBR-пептид 3 VQIVYKPVDLSKVTSKCGSLGNIHNKPGGGQ
(SEQ ID NO:1060)

MTBR-пептид 4 VEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGN
(SEQ ID NO:1061)

[00224] Сыворотку мыши титруют с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Лунки планшетов покрывают в течение ночи каждым из различных пептидов MTBR в концентрации 2 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере (PBS), а затем блокируют 1 час 1%-м бычьим сывороточным альбумином (BSA) в PBS. Нормальная сыворотка мыши используется в качестве отрицательного контроля. Кровь разводят в PBS/0,1% BSA/0,1% Tween 20 (PBS/BSA/T), начиная с 1/100, и серийно разводят 1:2 вниз по планшету. Планшеты промывают TBS/Tween 20 и добавляют меченые пероксидазой хрена (HRP) козьи антитела к мышиному иммуноглобулину G (IgG) (тяжелой и легкой

цепи) (ThermoFisher) в разведении 1/5000, и инкубировали 1 час при комнатной температуре. Планшеты промывают в TBS/Tween 20 и определяют связывание антител с субстратом о-фенилендиаминдигидрохлоридом (OPD) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) в соответствии с инструкциями производителя. Оптическую плотность (OD) в лунках планшета измеряют на Molecular Devices Spectromax при 490 нМ. Титр определяют как разведение, дающее 4-кратное превышение над фоном (определенное на графиках и в таблицах), если титр попадает между разведениями, то используют экстраполяцию.

[00225] Блокирование связывания тау с гепарином

[00226] В качестве потенциального суррогатного маркера способности сыворотки блокировать поглощение тау клетками был разработан ELISA, измеряющий блокирование связывания тау с планшетами с гепарином. Рекомбинантный тау был биотинилирован авторами самостоятельно. Покрытые гепарином планшеты (Bioworld, Dublin, OH) блокировали 2% BSA/PBS в течение 1 часа. В отдельном полипропиленовом 96-луночном планшете с глубокими лунками (ThermoFisher) сыворотку разбавляли от 1/25 до 1/3200 в 2% BSA/PBS, всего 60 мкл, к этим 60 мкл добавляли 200 нг/мл биотинилированного тау-белка в 2% BSA/PBS до конечной концентрации сыворотки 1/50-1/6400 и тау 100 нг/мл. Смесь сыворотки и тау инкубировали в течение 2 часов, затем 100 мкл/лунку переносили на блокированные гепарином планшеты и инкубировали 1 час. Планшеты промывали 0,1% Tween 20/TBS и добавляли меченые пероксидазой хрена (HRP) козы антитела к мышиному иммуноглобулину G (IgG) (тяжелой и легкой цепи) (ThermoFisher) в разведении 1/5000, и инкубировали 1 час при комнатной температуре. Планшеты промывали TBS/Tween 20 и добавляли 100 мкл раствора TMB от ThermoFisher, инкубировали в течение 8 минут, останавливая реакцию H_2SO_4 , и оптическую плотность измеряли при 450 нм.

[00227] Иммуногистохимическое (IHC) связывание сыворотки

[00228] Блоки свежзамороженной ткани головного мозга человека после вскрытия заливали соединением для оптимальной температуры резки (OCT compound) и приготавливали срезы толщиной 10 мкм с использованием криостата для получения срезов. Срезы помещали в раствор глюкозооксидазы и бета-D-глюкозы в присутствии азид натрия для блокирования эндогенной пероксидазы. После приготовления срезов ткани, проводили окрашивание указанной иммунной сывороткой мыши в разведении 1:500 в 5%-й козьей сыворотке с 0,25%-м тритоном в течение 1 часа при комнатной температуре. Для визуализации связывания с бляшками и клубками биотин-SP-конъюгированные козы антитела к мышиным IgG от Jackson (партия № 115-065-166) в разведении 1:200 инкубировали со срезами. DAKO DAB Detection Kit использовали в соответствии с инструкциями производителя. Окрашивание проводилось с использованием инструмента для автоматического окрашивания, Leica Bond Stainer. Результаты показывают, что сыворотка морских свинок, иммунизированных вакциной, описанной в настоящем документе, содержит антитела, специфичные к Abeta и тау в ткани головного мозга пациентов с болезнью Альцгеймера.

[00229] Блокирование сывороткой связывания Aβ с нейронами

[00230] Первичные нейроны гиппокампа крысы E18 культивируют, как описано ранее (Zago, et al. "Neutralization of Soluble, Synaptotoxic Amyloid β Species by Antibodies Is Epitope Specific," J Neurosci. 2012 Feb 22; 32(8): 2696-2702). Растворимый агрегат Aβ предварительно инкубируют с вакцинной сывороткой или без нее на культуре DIV14-21, чтобы заблокировать связывание растворимого Aβ с нейритами. Свежий немеченый, биотинилированный или растворимый (9:1) Aβ готовят за день до этого и инкубируют в течение ночи при 4°C. Каждый разведенный образец сыворотки и раствор растворимого Aβ готовят в 2-кратной конечной концентрации в половине конечного объема с использованием нейробазальной среды без фенолового красного (NB-NPR). Половину конечного объема 2х растворимого Aβ объединяют с половиной конечного объема 2х разбавленной вакцинной сыворотки, получая 1х конечную концентрацию в общем конечном реакционном объеме, который хорошо перемешивают, а затем преинкубируют 30 минут при 37°C. Нейроны E18 промывают NB-NPR в количестве 150 мкл на лунку перед добавлением реакционного объема. Сыворотку от иммунизированных животных/растворимый Aβ добавляют к нейронам E18 в количестве 60 мкл на лунку, а затем инкубируют в течение 30 минут при 37°C при стандартных условиях инкубации (5% CO₂; 9% O₂). Клетки дважды промывают, используя 150 мкл NB-NPR на лунку, а затем фиксируют в 4%-м параформальдегиде в 1х DPBS в течение 20 минут. Клетки пермеабелизируют с использованием 0,1 TX-100 в течение 5 минут и блокируют с помощью 10%-й нормальной козьей сыворотки (NGS) в течение 1 часа при комнатной температуре (КТ). Клетки инкубируют с первичными антителами к MAP2 и NeuN (100 мкл/лунку в 1х DPBS, содержащем 1% BSA+1% NGS) в течение ночи при 4°C. На следующий день клетки дважды промывают по 150 мкл/лунку 1х DPBS по 5 минут на каждую промывку. Вторичные антитела (100 мкл/лунку в 1х DPBS+1% BSA+1% NGS) добавляют на 1 час при комнатной температуре. Для количественной оценки связывания растворимого агрегата Aβ с нейритами проводят анализ высококонтрастной визуализации (HCI) с использованием инструмента Operetta HCI CLS (Perkin Elmer; модифицированный алгоритм Neurite Outgrowth: объектив 40х H₂O; 40 полей на лунку; (n=3) на образец; данные показаны как среднее (+/-) SD); нейрональные маркеры MAP2 и NeuN (Abcam) используются для отслеживания каждого нейритного выроста и подсчета количества тел клеток в оптическом поле; участки нейритных растворимых агрегатов Aβ обнаруживают с помощью стрептавидина-488 или поликлонального антитела к Aβ (Thermo; Millipore); и данные представляют в виде участков растворимых агрегатов Aβ/нейрон (или в виде интегрированной интенсивности)). Для каждого тестируемого образца анализируют по 80-150 нейронов на лунку.

[00231] Результаты

[00232] Данные для титров Aβ и тау и окрашивания обобщены в таблице 10 и таблице 11.

Таблица 10

	Животное	Титр Abeta	Титр тау	50% блокирования связывания с тау	ИНС Abeta	ИНС тау
Двойная конструкция 2	2,1	35,000	35,000	1:300	++++	+
	2,2	21,000	75,000	1:225	++++	+
	2,3	12,000	21,000	1:550	+++	+++++
	2,4	20,000	7,000	1:200	++	+++++
Двойная конструкция 3	3,1	22,000	12,000	1:275	+++	++++
	3,2	20,000	2,000	1:200	~	++++
	3,3	7,000	40,000	1:125	++++	++
	3,4	1,000	25,000	1:200	+	++++
Двойная конструкция 8	8,1	15,000	100,000	1:275	++ (или+1/2)	++++½
	8,2	7,000	6,800	1:675	++ (или+1/2)	+++
	8,3	60,000	10,000	1:200	+++	-
	8,4	30,000	20,000	1:200	++++	++++
Двойная конструкция 9	9,1	150,000	50,000	1:525	+	++++½
	9,2	30,000	21,000	1:325	++	++++
	9,3	13,000	30,000	1:325	+++	++++
	9,4	72,000	30,000	1:625	+++	+++
Двойная конструкция 11	11,1	30,000	6,000	1:375	++++	++½
	11,2	10,000	40,000	1:875	~	++++
	11,3	11,000	20,000	1:325	++++½	++
	11,4	10,000	10,000	1:275	++++	+

Таблица 11

Мышиная сыворотка после иммунизации двойной конструкцией Abeta/тау	A-beta	тау		Примечания
		Тело клетки	Нейриты	
2,1	++++	+	+	
2,2	++++	++	+	Присутствие ядерного окрашивания
2,3	+++	+++++	+++	
2,4	++	+++++	++++	
3,1	+++	++++	+++++	
3,2	-	++++	+++++	

3,3	++++	++	+++	Сильное ядерное окрашивание
3,4	+	++++	++	
8,1	++	++++	++++	
8,2	++	+++	+++	
8,3	+++	-	-	
8,4	++++	++++	+++++	
9,1	+	++++	++++	
9,2	++	++++	+++	
9,3	+++	++++	++++	
9,4	+++	+++	++++	
11,1	++++	++	+++	
11,2	+	++++	+	
11,3	+++++	++	-	
11,4	++++	+	-	Некоторое ядерное окрашивание

[00233] Титры

[00234] Как видно на фиг. 13 и в таблицах 10-13, во всех группах большинство животных продуцировали высокие и сбалансированные титры Abeta и tau, хотя некоторые имели менее вариабельный ответ титра.

Таблица 12

Титры для двойных конструкций Abeta/tau.

	Abeta					tau			
Двойная конструкция 2	Мышь 1	Мышь 2	Мышь 3	Мышь 4		Мышь 1	Мышь 2	Мышь 3	Мышь 4
Забор крови 1	30000	25000	25000	12000		150	5000	3000	4000
Забор крови 2	35000	21000	12000	20000		35000	75000	21000	7000
Двойная конструкция 3	Мышь 1	Мышь 2	Мышь 3	Мышь 4		Мышь 1	Мышь 2	Мышь 3	Мышь 4
Забор крови 1	6400	800	15000	100		4000	6400	5000	2000
Забор крови 2	22000	22000	7000	1000		12000	2000	40000	2500
Двойная конструкция 8	Мышь 1	Мышь 2	Мышь 3	Мышь 4		Мышь 1	Мышь 2	Мышь 3	Мышь 4
Забор крови 1	1500	2000	20000	18000		10000	25000	200	8000

Забор крови 2	15000	7000	60000	30000		100000	6800	1000	20000
Двойная конструкция 9	Мышь 1	Мышь 2	Мышь 3	Мышь 4		Мышь 1	Мышь 2	Мышь 3	Мышь 4
Забор крови 1	2000	12000	13000	6400		800	6000	7000	2000
Забор крови 2	150000	30000	13000	72000		5000	21000	30000	30000
Двойная конструкция 11	Мышь 1	Мышь 2	Мышь 3	Мышь 4		Мышь 1	Мышь 2	Мышь 3	Мышь 4
Забор крови 1	6000	2000	5000	7000		6400	7000	2500	4000
	30000	10000	11000	10000		6000	40000	20000	10000

Таблица 13

Оставшийся связанный тау после инкубации сыворотки

Разведение	DAEFRHDRRVKSKIGSTGGC (SEQ ID NO:997)			
	Мышь 1	Мышь 2	Мышь 3	Мышь 4
50	19,57	29,12	16,66	12,70
100	28,93	38,25	26,51	25,21
200	41,16	53,48	29,64	46,53
400	59,88	89,43	43,15	81,31
800	95,14	139,21	65,00	134,97
Разведение	DAEFRHDDRRENLKHQPGGGC (SEQ ID NO:1000)			
	Мышь 1	Мышь 2	Мышь 3	Мышь 4
50	16,44	21,90	24,26	15,35
100	22,07	47,55	39,93	19,39
200	37,10	44,06	48,36	43,65
400	58,32	86,61	86,41	51,98
800	93,54	98,76	115,50	86,00
Разведение	DAEFRHDRRSKIGSTENGGC (SEQ ID NO:998)			
	Мышь 1	Мышь 2	Мышь 3	Мышь 4
50	16,84	27,29	28,01	28,56
100	25,18	39,02	53,18	42,60
200	55,66	73,61	93,32	75,38
400	92,87	120,00	131,15	125,27
800	110,16	132,77	130,90	135,93
Разведение	DAEFRHDRRSKIGSKDNIKHGGC (SEQ ID NO:1001)			
	Мышь 1	Мышь 2	Мышь 3	Мышь 4

50	15,25	13,15	14,73	17,81
100	19,45	11,20	26,64	37,79
200	37,65	14,59	56,17	54,57
400	74,17	39,69	78,69	91,10
800	90,35	62,16	96,30	109,00
Разведение	DAEFRHDDRRTENLKHQPGGC (SEQ ID NO:999)			
	Мышь 1	Мышь 2	Мышь 3	Мышь 4
50	20,01	12,36	35,04	42,63
100	37,62	28,44	44,45	47,62
200	54,86	47,97	66,72	61,84
400	114,93	48,51	91,94	87,67
800	110,60	81,25	100,01	97,15
Разведение	Negative Control			
	Мышь 1	Мышь 2	Мышь 3	Мышь 4
50	83,35	71,98	84,30	83,96
100	114,78	94,03	103,43	98,98
200	104,03	100,60	97,80	96,83
400	86,73	111,16	95,31	91,72
800	96,20	110,05	99,38	94,45

[00235] Блокирование связывания тау-белка с гепарином

[00236] Все конструкции продемонстрировали способность блокировать связывание тау-белка с гепарином, в частности, конструкция DAEFRHDDRVRKSKIGTGGC (SEQ ID NO:997) и конструкция DAEFRHDDRENLKHQPGGGC (SEQ ID NO:1000), показывающие наиболее надежное блокирование. См. фиг. 15, таблицу 10 и таблицу 11.

[00237] ИНС окрашивание мозга при болезни Альцгеймера

[00238] Большинство животных имели окрашивание патологических Abeta и тау, см. фиг. 16.

[00239] Пример 11: иммуногены

[00240] Иммуногены отбирали для оценки в вакцинных пептидных конструкциях. Конструкции включают иммуногены A β и иммуногены тау. Некоторые иммуногены содержат тау-пептид, состоящий из 3-10 аминокислот из тау. Другие иммуногены включают сконструированный тау-иммуноген.

[00241] Сконструированные тау-иммуногены

[00242] Некоторые иммуногенные пептиды были сконструированы и отобраны для (i) выработки антител, которые связываются внутри повторов участка связывания микротрубочек (MTBR) тау-белка человека, (ii) с меньшей вероятностью вызывают нежелательный аутоиммунный ответ, опосредованный Т-клетками, и (iii) менее вероятно образование антител, которые будут перекрестно реагировать с другими белками человека.

[00243] Сначала был проведен анализ последовательности и трехмерное моделирование MTBR тау-белка для идентификации аминокислотных остатков, которые могут быть важны для образования антител, связывающих MTBR. Результаты этих анализов использовали для конструирования синтетических иммуногенных пептидов тау с консервативными остатками и перетасованными промежуточными остатками. Полученные сконструированные синтетические пептиды перечислены в таблице 14.

Таблица 14

Сконструированные иммуногенные пептиды тау

Последовательность сконструированных иммуногенных пептидов тау	SEQ ID NO:
SKIGSTENLKH	978
SKIGSTENIKH	979
SKIGSKDNLKH	980
SKIGSKENIKH	981
SKIGSLENLKH	982
SKIGSLENIKH	983
SKIGSTDNLKH	984
SKIGSTDNIKH	985
SKIGSKDNIKH	986
SKIGSLDNLKH	987
SKIGSLDNIKH	988
SKIGSTGNLKH	989
SKIGSTGNIKH	990
SKIGSKGNLKH	991
SKIGSKGNIKH	992
SKIGSLGNLKH	993
SKIGSLGNIKH	994

[00244] Затем для оценки возможности нежелательного аутоиммунного ответа, опосредованного Т-клетками, сконструированные пептиды анализировали *in silico* для прогнозирования связывания МНС II с использованием IEDB (базы данных иммунных эпитопов) Национального института аллергии и инфекционных заболеваний/Института иммунологии Ла Хойи. Связывание МНС класса II считается хорошим индикатором последовательности, содержащей Т-клеточный эпитоп. Панель аллелей использовали для предсказания связывания с МНС II. Считали, что сконструированные пептиды с предсказанной половинной максимальной ингибирующей концентрацией (IC50) выше указанного порогового значения имеют низкую вероятность связывания МНС II, и они были выбраны для дальнейшего анализа.

[00245] Наконец, сконструированные пептиды с низким прогнозируемым связыванием МНС II оценивали, чтобы предсказать, могут ли антитела против MTBR тау-белка, которые будут вырабатываться пептидами, иметь нежелательную перекрестную реактивность с другими белками человека. Последовательности сконструированных пептидов подвергали биоинформатическому анализу по избыточной базе данных протеомов человека для определения гомологии с человеческими белками.

Сконструированные пептидные последовательности с низкой гомологией с секретирруемыми белками или белками клеточной поверхности были выбраны в качестве лучших кандидатов для использования в качестве антигенов. Наиболее перспективные сконструированные иммуногенные пептиды тау-белка перечислены в таблице 15.

Таблица 15

Лучшие кандидаты из сконструированных иммуногенных пептидов тау.

Последовательность сконструированных иммуногенных пептидов тау	SEQ ID NO:
SKIGSTDNIKH	985
SKIGSKDNIKH	986
SKIGSLDNIKH	988

[00246] Двойные конструкции Аβ-тау, содержащие сконструированный тау-иммуноген (например, двойной пептид № 11), продемонстрировали результаты, которые были сопоставимы, а в некоторых случаях и превышали результаты других тау-иммуногенов, несмотря на включение ненативной последовательности тау. На фиг. 13 показаны высокие титры антигенов Аβ и тау, включая сконструированную последовательность тау. На фиг. 14 показано блокирование связывания тау с гепарином. На фиг. 15G показано полученное в результате связывание антител к тау с пептидами области MTBR. На фиг. 16E показано окрашивание/связывание с пептидами Аβ и тау в ткани головного мозга пациентов с болезнью Альцгеймера. Это демонстрирует, что сконструированные иммуногены полезны в вакцинных конструкциях.

[00247] Заключение

[00248] Были разработаны вакцинные конструкции с двойным иммуногеном Аβ-тау, и было показано, что эти конструкции повышают сбалансированные титры к Аβ и тау у мышей, морских свинок и яванских макаков. Антитела проявляли иммунореактивность как в отношении бляшек Аβ, так и в отношении нейрофибриллярных клубков тау в срезах головного мозга человека с БА, и блокировали связывание растворимых агрегатов Аβ (олигомеров) с нейронами, не вызывая Т-клеточных ответов на Аβ или тау. Эти результаты подтверждают разработку однокомпонентной вакцины с двойным иммуногеном, способной воздействовать на патогенные формы Аβ и тау. Эти результаты подтверждают разработку двойной вакцины против Аβ-тау, способной воздействовать на патогенные Аβ и тау для профилактики и/или лечения болезни Альцгеймера.

[00249] Хотя в настоящем документе были описаны различные конкретные варианты осуществления настоящего изобретения, следует понимать, что изобретение не ограничено этими конкретными вариантами осуществления, и что специалист в данной области техники может внести в него различные изменения или модификации, не выходя за рамки объема и сущности изобретения.

[00250] В каждом из вариантов осуществления пептида, описанного в настоящем документе, пептид может содержать, состоять или по существу состоять из перечисленных последовательностей. Таким образом, в данное раскрытие (см. таблицу 16)

включены следующие последовательности, которые могут быть частью композиций, содержащих пептид-амилоид-бета (A β) и тау-пептид, раскрытые в настоящем документе.

Таблица 16. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID NO:01 – A β 1-42

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGGVIA

SEQ ID NO:02 - TAU (UNIPROTKB - P10636 (*Homo sapiens*))

>P10636-8 (Изоформа тау-F)

10	20	30	40	50
MAEPRQEFEV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKESPLQT
60	70	80	90	100
PTEDGSEEPG	SETSDAKSTP	TAEDVTAPLV	DEGAPGKQAA	AQPHTEIPEG
110	120	130	140	150
TTAEEAGIGD	TPSLEDEAAG	HVTQARMVSK	SKDGTGSDDK	KAKGADGKTK
160	170	180	190	200
IATPRGAAPP	GQKGQANATR	IPAKTPPAPK	TPPSSGEPPK	SGDRSGYSSP
210	220	230	240	250
GSPGTPGSRS	RTPSLPTPPT	REPKKVAVVR	TPPKSPSSAK	SRLQTAPVPM
260	270	280	290	300
PDLKNVYSKI	GSTENLKHQP	GGGKVQIINK	KLDLSNVQSK	CGSKDNIKHV
310	320	330	340	350
PGGGSVQIVY	KPVDLSKVTS	KCGSLGNIHH	KPGGGQVEVK	SEKLDFKDRV
360	370	380	390	400
QSKIGSLDNI	THVPGGGNKK	IETHKLTFRE	NAKAKTDHGA	EIVYKSPVVS
410	420	430	440	
GDTSPRHLSN	VSSTGSIDMV	DSPQLATLAD	EVSASLAKQG	L

Иммуногены A- β :

DAEFRHDSGY	(SEQ ID NO:03)
DAEFRHDSG	(SEQ ID NO:04)
DAEFRHDS	(SEQ ID NO:05)
DAEFRHD	(SEQ ID NO:06)
DAEFRH	(SEQ ID NO:07)
DAEFR	(SEQ ID NO:08)
DAEF	(SEQ ID NO:09)
DAE	(SEQ ID NO:10)
AEFRHDSGY	(SEQ ID NO:11)
AEFRHDSG	(SEQ ID NO:12)
AEFRHDS	(SEQ ID NO:13)
AEFRHD	(SEQ ID NO:14)
AEFRH	(SEQ ID NO:15)
AEFR	(SEQ ID NO:16)
AEF	(SEQ ID NO:17)
EFRHDSGY	(SEQ ID NO:18)

EFRHDSG	(SEQ ID NO:19)
EFRHDS	(SEQ ID NO:20)
EFRHD	(SEQ ID NO:21)
EFRH	(SEQ ID NO:22)
EFR	(SEQ ID NO:23)
FRHDSGY	(SEQ ID NO:24)
FRHDSG	(SEQ ID NO:25)
FRHDS	(SEQ ID NO:26)
FRHD	(SEQ ID NO:27)
FRH	(SEQ ID NO:28)
RHDSGY	(SEQ ID NO:29)
RHDSG	(SEQ ID NO:30)
RHDS	(SEQ ID NO:31)
RHD	(SEQ ID NO:32)
HDSGY	(SEQ ID NO:33)
HDSG	(SEQ ID NO:34)
HDS	(SEQ ID NO:35)
DSGY	(SEQ ID NO:36)
DSG	(SEQ ID NO:37)
SGY	(SEQ ID NO:38)
VHHQKLVFFA	(SEQ ID NO:1002)
VHHQKLVFF	(SEQ ID NO:1003)
VHHQKLVF	(SEQ ID NO:1004)
VHHQKLV	(SEQ ID NO:1005)
VHHQKL	(SEQ ID NO:1006)
HHQKLVFFAE	(SEQ ID NO:1007)
HHQKLVFFA	(SEQ ID NO:1008)
HHQKLVFF	(SEQ ID NO:1009)
HHQKLVF	(SEQ ID NO:1010)
HHQKLV	(SEQ ID NO:1011)
HHQKL	(SEQ ID NO:1012)
HQKLVFFAED	(SEQ ID NO:1013)
HQKLVFFAE	(SEQ ID NO:1014)
HQKLVFFA	(SEQ ID NO:1015)
HQKLVFF	(SEQ ID NO:1016)

HQKLVF	(SEQ ID NO:1017)
HQKLV	(SEQ ID NO:1018)
HQKL	(SEQ ID NO:1019)
QKLVFFAEDV	(SEQ ID NO:1020)
QKLVFFAED	(SEQ ID NO:1021)
QKLVFFAE	(SEQ ID NO:1022)
QKLVFFA	(SEQ ID NO:1023)
QKLVFF	(SEQ ID NO:1024)
QKLVF	(SEQ ID NO:1025)
QKLV	(SEQ ID NO:1026)
QKL	(SEQ ID NO:1027)
KLVFFAEDVG	(SEQ ID NO:1028)
KLVFFAEDV	(SEQ ID NO:1029)
KLVFFAED	(SEQ ID NO:1030)
KLVFFAE	(SEQ ID NO:1031)
KLVFFA	(SEQ ID NO:1032)
KLVFF	(SEQ ID NO:1033)
KLVF	(SEQ ID NO:1034)
KL	(SEQ ID NO:1035)
LVFFAEDVG	(SEQ ID NO:1036)
LVFFAEDV	(SEQ ID NO:1037)
LVFFAED	(SEQ ID NO:1038)
LVFFAE	(SEQ ID NO:1039)
LVFFA	(SEQ ID NO:1040)
LVFF	(SEQ ID NO:1041)
LVF	(SEQ ID NO:1042)
VFFAEDVG	(SEQ ID NO:1043)
VFFAEDV	(SEQ ID NO:1044)
VFFAED	(SEQ ID NO:1045)
VFFAE	(SEQ ID NO:1046)
VFFA	(SEQ ID NO:1047)
VFF	(SEQ ID NO:1048)
FFAEDVG	(SEQ ID NO:1049)
FFAEDV	(SEQ ID NO:1050)
FFAED	(SEQ ID NO:1051)

FFAE	(SEQ ID NO:1052)
FFA	(SEQ ID NO:1053)
FAEDVG	(SEQ ID NO:1054)
FAEDV	(SEQ ID NO:1055)
FAED	(SEQ ID NO:1056)
FAE	(SEQ ID NO:1057)

Иммуногены тау:

QIVYKPV	(SEQ ID NO:39)
QIVYKP	(SEQ ID NO:40)
QIVYKSV	(SEQ ID NO:41)
EIVYKSV	(SEQ ID NO:42)
QIVYKS	(SEQ ID NO:83)
EIVYKSP	(SEQ ID NO:43)
EIVYKS	(SEQ ID NO:84)
EIVYKPV	(SEQ ID NO:44)
EIVYKP	(SEQ ID NO:85)
IVYKSPV	(SEQ ID NO:45)
IVYK	(SEQ ID NO:46)
CNIKHVPG	(SEQ ID NO:86)
CNIKHVP	(SEQ ID NO:47)
NIKHVP	(SEQ ID NO:48)
HVPGGG	(SEQ ID NO:49)
HVPGG	(SEQ ID NO:50)
HKPGGG	(SEQ ID NO:51)
HKPGG	(SEQ ID NO:52)
KHVPGGG	(SEQ ID NO:53)
KHVPGG	(SEQ ID NO:54)
HQPGGG	(SEQ ID NO:55)
HQPGG	(SEQ ID NO:56)
VQIINK	(SEQ ID NO:146)
VQIINKK	(SEQ ID NO:147)
VQIINKKL	(SEQ ID NO:148)
QIINK	(SEQ ID NO:149)
QIINKK	(SEQ ID NO:150)
QIINKKL	(SEQ ID NO:151)

EAAGHVTQC	(SEQ ID NO:152)
EAAGHVTQAR	(SEQ ID NO:153)
AAGHVTQAC	(SEQ ID NO:154)
AGHVTQARC	(SEQ ID NO:155)
AGHVTQAR	(SEQ ID NO:156)
GYTMHQD	(SEQ ID NO:157)
QGGYTMHC	(SEQ ID NO:158)
QGGYTMHQD	(SEQ ID NO:159)
GGYTMHQC	(SEQ ID NO:160)
VPGGGSVQIV	(SEQ ID NO:161)
PGGGSVQIV	(SEQ ID NO:162)
GGGSVQIV	(SEQ ID NO:163)
GGSVQIV	(SEQ ID NO:164)
GSVQIV	(SEQ ID NO:165)
SVQIV	(SEQ ID NO:166)
VQIV	(SEQ ID NO:167)
QIV	(SEQ ID NO:168)
PGGGSVQIVY	(SEQ ID NO:169)
GGGSVQIVY	(SEQ ID NO:170)
GGSVQIVY	(SEQ ID NO:171)
GSVQIVY	(SEQ ID NO:172)
SVQIVY	(SEQ ID NO:173)
VQIVY	(SEQ ID NO:174)
QIVY	(SEQ ID NO:175)
IVY	(SEQ ID NO:176)
GGGSVQIVYK	(SEQ ID NO:177)
GGSVQIVYK	(SEQ ID NO:178)
GSVQIVYK	(SEQ ID NO:179)
SVQIVYK	(SEQ ID NO:180)
VQIVYK	(SEQ ID NO:181)
QIVYK	(SEQ ID NO:182)
VYK	(SEQ ID NO:183)
GGSVQIVYKP	(SEQ ID NO:184)
GSVQIVYKP	(SEQ ID NO:185)
SVQIVYKP	(SEQ ID NO:186)

VQIVYKP	(SEQ ID NO:187)
IVYKP	(SEQ ID NO:188)
VYKP	(SEQ ID NO:189)
YKP	(SEQ ID NO:190)
GSVQIVYKP	(SEQ ID NO:191)
SVQIVYKPV	(SEQ ID NO:192)
VQIVYKPV	(SEQ ID NO:193)
IVYKPV	(SEQ ID NO:194)
VYKPV	(SEQ ID NO:195)
YKPV	(SEQ ID NO:196)
KPV	(SEQ ID NO:197)
SVQIVYKPVD	(SEQ ID NO:198)
VQIVYKPVD	(SEQ ID NO:199)
QIVYKPVD	(SEQ ID NO:200)
IVYKPVD	(SEQ ID NO:201)
VYKPVD	(SEQ ID NO:203)
YKPVD	(SEQ ID NO:204)
KPVD	(SEQ ID NO:205)
PVD	(SEQ ID NO:206)
VQIVYKPVDL	(SEQ ID NO:207)
QIVYKPVDL	(SEQ ID NO:208)
IVYKPVDL	(SEQ ID NO:209)
VYKPVDL	(SEQ ID NO:210)
YKPVDL	(SEQ ID NO:211)
KPVDL	(SEQ ID NO:212)
PVDL	(SEQ ID NO:213)
VDL	(SEQ ID NO:214)
QIVYKPVCLS	(SEQ ID NO:215)
IVYKPVCLS	(SEQ ID NO:216)
VYKPVCLS	(SEQ ID NO:217)
YKPVCLS	(SEQ ID NO:218)
KPVCLS	(SEQ ID NO:219)
PVCLS	(SEQ ID NO:220)
VDLS	(SEQ ID NO:221)
DLS	(SEQ ID NO:222)

IVYKPVDLSK	(SEQ ID NO:223)
VYKPVDLSK	(SEQ ID NO:224)
YKPVDLSK	(SEQ ID NO:225)
KPVDLSK	(SEQ ID NO:226)
PVDLSK	(SEQ ID NO:227)
VDLSK	(SEQ ID NO:228)
DLSK	(SEQ ID NO:229)
LSK	(SEQ ID NO:230)
VYKPVDLSKV	(SEQ ID NO:231)
YKPVDLSKV	(SEQ ID NO:232)
KPVDLSKV	(SEQ ID NO:233)
PVDLSKV	(SEQ ID NO:234)
VDLSKV	(SEQ ID NO:235)
DLSKV	(SEQ ID NO:236)
LSKV	(SEQ ID NO:237)
SKV	(SEQ ID NO:238)
YKPVDLSKVT	(SEQ ID NO:239)
KPVDLSKVT	(SEQ ID NO:240)
PVDLSKVT	(SEQ ID NO:241)
VDLSKVT	(SEQ ID NO:242)
AKTDHGAEIV	(SEQ ID NO:243)
KTDHGAEIV	(SEQ ID NO:244)
TDHGAEIV	(SEQ ID NO:245)
DHGAEIV	(SEQ ID NO:246)
HGAEIV	(SEQ ID NO:247)
GAEIV	(SEQ ID NO:248)
AEIV	(SEQ ID NO:249)
EIV	(SEQ ID NO:250)
KTDHGAEIVY	(SEQ ID NO:251)
TDHGAEIVY	(SEQ ID NO:252)
DHGAEIVY	(SEQ ID NO:253)
HGAEIVY	(SEQ ID NO:254)
GAEIVY	(SEQ ID NO:255)
AEIVY	(SEQ ID NO:256)
EIVY	(SEQ ID NO:257)

IVY	(SEQ ID NO:258)
TDHGAEIVYK	(SEQ ID NO:259)
DHGAEIVYK	(SEQ ID NO:260)
HGAEIVYK	(SEQ ID NO:261)
GAEIVYK	(SEQ ID NO:262)
AEIVYK	(SEQ ID NO:263)
EIVYK	(SEQ ID NO:264)
IVYK	(SEQ ID NO:265)
DHGAEIVYKS	(SEQ ID NO:266)
HGAEIVYKS	(SEQ ID NO:267)
GAEIVYKS	(SEQ ID NO:268)
AEIVYKS	(SEQ ID NO:269)
EIVYKS	(SEQ ID NO:270)
IVYKS	(SEQ ID NO:271)
VYKS	(SEQ ID NO:272)
YKS	(SEQ ID NO:273)
HGAEIVYKSP	(SEQ ID NO:274)
GAEIVYKSP	(SEQ ID NO:275)
AEIVYKSP	(SEQ ID NO:276)
EIVYKSP	(SEQ ID NO:277)
IVYKSP	(SEQ ID NO:278)
VYKSP	(SEQ ID NO:279)
YKSP	(SEQ ID NO:280)
KSP	(SEQ ID NO:281)
GAEIVYKSPV	(SEQ ID NO:282)
AEIVYKSPV	(SEQ ID NO:283)
EIVYKSPV	(SEQ ID NO:284)
IVYKSPV	(SEQ ID NO:285)
VYKSPV	(SEQ ID NO:286)
YKSPV	(SEQ ID NO:287)
KSPV	(SEQ ID NO:288)
SPV	(SEQ ID NO:289)
AEIVYKSPVV	(SEQ ID NO:290)
EIVYKSPVV	(SEQ ID NO:291)
IVYKSPVV	(SEQ ID NO:292)

VYKSPVV	(SEQ ID NO:293)
YKSPVV	(SEQ ID NO:294)
KSPVV	(SEQ ID NO:295)
SPVV	(SEQ ID NO:296)
PVV	(SEQ ID NO:297)
EIVYKSPVVS	(SEQ ID NO:298)
IVYKSPVVS	(SEQ ID NO:299)
VYKSPVVS	(SEQ ID NO:300)
YKSPVVS	(SEQ ID NO:301)
KSPVVS	(SEQ ID NO:302)
SPVVS	(SEQ ID NO:303)
PVVS	(SEQ ID NO:304)
VVS	(SEQ ID NO:305)
IVYKSPVVSG	(SEQ ID NO:306)
VYKSPVVSG	(SEQ ID NO:307)
YKSPVVSG	(SEQ ID NO:308)
KSPVVSG	(SEQ ID NO:309)
SPVVSG	(SEQ ID NO:310)
PVVSG	(SEQ ID NO:311)
VVSG	(SEQ ID NO:312)
VSG	(SEQ ID NO:313)
VYKSPVVSGD	(SEQ ID NO:314)
YKSPVVSGD	(SEQ ID NO:315)
KSPVVSGD	(SEQ ID NO:316)
SPVVSGD	(SEQ ID NO:317)
PVVSGD	(SEQ ID NO:318)
VVSGD	(SEQ ID NO:319)
VSGD	(SEQ ID NO:320)
SGD	(SEQ ID NO:321)
YKSPVVSGDT	(SEQ ID NO:322)
KSPVVSGDT	(SEQ ID NO:323)
SPVVSGDT	(SEQ ID NO:324)
PVVSGDT	(SEQ ID NO:325)
VVSGDT	(SEQ ID NO:326)
VSGDT	(SEQ ID NO:327)

SGDT	(SEQ ID NO:328)
GDT	(SEQ ID NO:329)
KSPVVSGDTS	(SEQ ID NO:330)
SPVVSGDTS	(SEQ ID NO:331)
PVVSGDTS	(SEQ ID NO:332)
VVSGDTS	(SEQ ID NO:333)
VSGDTS	(SEQ ID NO:334)
SGDTS	(SEQ ID NO:335)
GDTs	(SEQ ID NO:336)
DTS	(SEQ ID NO:337)
SPVVSGDTSP	(SEQ ID NO:338)
PVVSGDTSP	(SEQ ID NO:339)
VVSGDTSP	(SEQ ID NO:340)
VSGDTSP	(SEQ ID NO:341)
SGDTSP	(SEQ ID NO:342)
GDTSP	(SEQ ID NO:343)
DTSP	(SEQ ID NO:344)
TSP	(SEQ ID NO:345)
PVVSGDTSPR	(SEQ ID NO:346)
VVSGDTSPR	(SEQ ID NO:347)
VSGDTSPR	(SEQ ID NO:348)
SGDTSPR	(SEQ ID NO:349)
GDTSPR	(SEQ ID NO:350)
DTSPR	(SEQ ID NO:351)
TSPR	(SEQ ID NO:352)
SPR	(SEQ ID NO:353)
HQPGGGKVQI	(SEQ ID NO:354)
QPGGGKVQI	(SEQ ID NO:355)
PGGGKVQI	(SEQ ID NO:356)
GGGKVQI	(SEQ ID NO:357)
GGKVQI	(SEQ ID NO:358)
GKVQI	(SEQ ID NO:359)
KVQI	(SEQ ID NO:360)
VQI	(SEQ ID NO:361)
QPGGGKVQII	(SEQ ID NO:362)

PGGGKVQII	(SEQ ID NO:363)
GGGKVQII	(SEQ ID NO:365)
GGKVQII	(SEQ ID NO:366)
GKVQII	(SEQ ID NO:367)
KVQII	(SEQ ID NO:368)
VQII	(SEQ ID NO:369)
QII	(SEQ ID NO:370)
PGGGKVQIIN	(SEQ ID NO:371)
GGGKVQIIN	(SEQ ID NO:372)
GGKVQIIN	(SEQ ID NO:373)
GKVQIIN	(SEQ ID NO:374)
KVQIIN	(SEQ ID NO:375)
VQIIN	(SEQ ID NO:376)
QIIN	(SEQ ID NO:377)
IIN	(SEQ ID NO:378)
GGGKVQIINK	(SEQ ID NO:379)
GGKVQIINK	(SEQ ID NO:380)
GKVQIINK	(SEQ ID NO:381)
KVQIINK	(SEQ ID NO:382)
IINK	(SEQ ID NO:383)
INK	(SEQ ID NO:384)
GGKVQIINKK	(SEQ ID NO:385)
GKVQIINKK	(SEQ ID NO:386)
KVQIINKK	(SEQ ID NO:387)
IINKK	(SEQ ID NO:388)
INKK	(SEQ ID NO:389)
NKK	(SEQ ID NO:390)
GKVQIINKKL	(SEQ ID NO:391)
KVQIINKKL	(SEQ ID NO:392)
IINKKL	(SEQ ID NO:393)
INKKL	(SEQ ID NO:394)
NKKL	(SEQ ID NO:395)
KKL	(SEQ ID NO:396)
KVQIINKKLD	(SEQ ID NO:397)
VQIINKKLD	(SEQ ID NO:398)

QIINKKLD	(SEQ ID NO:399)
IINKKLD	(SEQ ID NO:400)
INKKLD	(SEQ ID NO:401)
NKKLD	(SEQ ID NO:402)
KKLD	(SEQ ID NO:403)
KLD	(SEQ ID NO:404)
VQIINKKLDL	(SEQ ID NO:405)
QIINKKLDL	(SEQ ID NO:406)
IINKKLDL	(SEQ ID NO:407)
INKKLDL	(SEQ ID NO:408)
NKKLDL	(SEQ ID NO:409)
KKLDL	(SEQ ID NO:410)
KLDL	(SEQ ID NO:411)
LDL	(SEQ ID NO:412)
QIINKKLDLS	(SEQ ID NO:413)
IINKKLDLS	(SEQ ID NO:414)
INKKLDLS	(SEQ ID NO:415)
NKKLDLS	(SEQ ID NO:416)
KKLDLS	(SEQ ID NO:417)
KLDLS	(SEQ ID NO:418)
LDLS	(SEQ ID NO:419)
IINKKLDLSN	(SEQ ID NO:420)
INKKLDLSN	(SEQ ID NO:421)
NKKLDLSN	(SEQ ID NO:422)
KKLDLSN	(SEQ ID NO:423)
KLDLSN	(SEQ ID NO:424)
LDLSN	(SEQ ID NO:425)
DLSN	(SEQ ID NO:426)
LSN	(SEQ ID NO:427)
INKKLDLSNV	(SEQ ID NO:428)
NKKLDLSNV	(SEQ ID NO:429)
KKLDLSNV	(SEQ ID NO:430)
KLDLSNV	(SEQ ID NO:431)
LDLSNV	(SEQ ID NO:432)
DLSNV	(SEQ ID NO:433)

LSNV	(SEQ ID NO:434)
SNV	(SEQ ID NO:435)
NKKLDLSNVQ	(SEQ ID NO:436)
KKLDLSNVQ	(SEQ ID NO:437)
KLDLSNVQ	(SEQ ID NO:438)
LDLSNVQ	(SEQ ID NO:439)
DLSNVQ	(SEQ ID NO:440)
LSNVQ	(SEQ ID NO:441)
SNVQ	(SEQ ID NO:442)
NVQ	(SEQ ID NO:443)
KKLDLSNVQS	(SEQ ID NO:444)
KLDLSNVQS	(SEQ ID NO:445)
LDLSNVQS	(SEQ ID NO:446)
DLSNVQS	(SEQ ID NO:447)
LSNVQS	(SEQ ID NO:448)
SNVQS	(SEQ ID NO:449)
NVQS	(SEQ ID NO:450)
VQS	(SEQ ID NO:451)
SKCGSKDNIK	(SEQ ID NO:452)
KCGSKDNIK	(SEQ ID NO:453)
CGSKDNIK	(SEQ ID NO:454)
GSKDNIK	(SEQ ID NO:455)
SKDNIK	(SEQ ID NO:456)
KDNIK	(SEQ ID NO:457)
DNIK	(SEQ ID NO:458)
NIK	(SEQ ID NO:459)
KCGSKDNIKH	(SEQ ID NO:460)
CGSKDNIKH	(SEQ ID NO:461)
GSKDNIKH	(SEQ ID NO:462)
SKDNIKH	(SEQ ID NO:463)
KDNIKH	(SEQ ID NO:464)
DNIKH	(SEQ ID NO:465)
NIKH	(SEQ ID NO:466)
IKH	(SEQ ID NO:467)
CGSKDNIKHV	(SEQ ID NO:468)

GSKDNIKHV	(SEQ ID NO:469)
SKDNIKHV	(SEQ ID NO:470)
KDNIKHV	(SEQ ID NO:471)
DNIKHV	(SEQ ID NO:472)
NIKHV	(SEQ ID NO:473)
IKHV	(SEQ ID NO:474)
KHV	(SEQ ID NO:475)
GSKDNIKHVP	(SEQ ID NO:476)
SKDNIKHVP	(SEQ ID NO:477)
KDNIKHVP	(SEQ ID NO:478)
DNIKHVP	(SEQ ID NO:479)
IKHVP	(SEQ ID NO:480)
KHVP	(SEQ ID NO:481)
HVP	(SEQ ID NO:482)
SKDNIKHVPG	(SEQ ID NO:483)
KDNIKHVPG	(SEQ ID NO:484)
DNIKHVPG	(SEQ ID NO:485)
NIKHVPG	(SEQ ID NO:486)
IKHVPG	(SEQ ID NO:487)
KHVPG	(SEQ ID NO:488)
HVPG	(SEQ ID NO:489)
VPG	(SEQ ID NO:490)
KDNIKHVPGG	(SEQ ID NO:491)
DNIKHVPGG	(SEQ ID NO:492)
NIKHVPGG	(SEQ ID NO:493)
IKHVPGG	(SEQ ID NO:494)
KHVPGG	(SEQ ID NO:495)
VPGG	(SEQ ID NO:496)
PGG	(SEQ ID NO:497)
DNIKHVPGGG	(SEQ ID NO:498)
NIKHVPGGG	(SEQ ID NO:499)
IKHVPGGG	(SEQ ID NO:500)
VPGGG	(SEQ ID NO:501)
PGGG	(SEQ ID NO:502)
GGG	(SEQ ID NO:503)

NIKHVPGGGS	(SEQ ID NO:504)
IKHVPGGGS	(SEQ ID NO:505)
KHVPGGGS	(SEQ ID NO:506)
HVPGGGS	(SEQ ID NO:507)
VPGGGS	(SEQ ID NO:508)
PGGGS	(SEQ ID NO:509)
GGGS	(SEQ ID NO:510)
GGs	(SEQ ID NO:511)
IKHVPGGGSV	(SEQ ID NO:512)
KHVPGGGSV	(SEQ ID NO:513)
HVPGGGSV	(SEQ ID NO:514)
VPGGGSV	(SEQ ID NO:515)
PGGGSV	(SEQ ID NO:516)
GGGSV	(SEQ ID NO:517)
GGSV	(SEQ ID NO:518)
GSV	(SEQ ID NO:519)
KHVPGGGSVQ	(SEQ ID NO:520)
HVPGGGSVQ	(SEQ ID NO:521)
VPGGGSVQ	(SEQ ID NO:522)
PGGGSVQ	(SEQ ID NO:523)
GGGSVQ	(SEQ ID NO:524)
GGSVQ	(SEQ ID NO:525)
GSVQ	(SEQ ID NO:526)
SVQ	(SEQ ID NO:527)
HVPGGGSVQI	(SEQ ID NO:528)
VPGGGSVQI	(SEQ ID NO:529)
PGGGSVQI	(SEQ ID NO:530)
GGGSVQI	(SEQ ID NO:531)
GGSVQI	(SEQ ID NO:532)
GSVQI	(SEQ ID NO:533)
SVQI	(SEQ ID NO:534)
GGSVQIVYKS	(SEQ ID NO:535)
GSVQIVYKS	(SEQ ID NO:536)
SVQIVYKS	(SEQ ID NO:537)
VQIVYKS	(SEQ ID NO:538)

QIVYKS	(SEQ ID NO:539)
IVYKS	(SEQ ID NO:540)
VYKS	(SEQ ID NO:541)
YKS	(SEQ ID NO:542)
GSVQIVYKSV	(SEQ ID NO:543)
SVQIVYKSV	(SEQ ID NO:544)
VQIVYKSV	(SEQ ID NO:545)
QIVYKSV	(SEQ ID NO:546)
IVYKSV	(SEQ ID NO:547)
VYKSV	(SEQ ID NO:548)
YKSV	(SEQ ID NO:549)
SVQIVYKSVD	(SEQ ID NO:550)
VQIVYKSVD	(SEQ ID NO:551)
QIVYKSVD	(SEQ ID NO:552)
IVYKSVD	(SEQ ID NO:553)
VYKSVD	(SEQ ID NO:554)
YKSVD	(SEQ ID NO:555)
KSVD	(SEQ ID NO:556)
SVD	(SEQ ID NO:557)
VQIVYKSVDL	(SEQ ID NO:558)
QIVYKSVDL	(SEQ ID NO:559)
IVYKSVDL	(SEQ ID NO:560)
VYKSVDL	(SEQ ID NO:561)
YKSVDL	(SEQ ID NO:562)
KSVDL	(SEQ ID NO:563)
SVDL	(SEQ ID NO:564)
QIVYKSVDLS	(SEQ ID NO:565)
IVYKSVDLS	(SEQ ID NO:566)
VYKSVDLS	(SEQ ID NO:567)
YKSVDLS	(SEQ ID NO:568)
KSVDLS	(SEQ ID NO:569)
SVDLS	(SEQ ID NO:570)
IVYKSVDLSK	(SEQ ID NO:571)
VYKSVDLSK	(SEQ ID NO:572)
YKSVDLSK	(SEQ ID NO:573)

KSVDSLK	(SEQ ID NO:574)
SVDLSK	(SEQ ID NO:364)
VYKSVDSLKV	(SEQ ID NO:575)
YKSVDSLKV	(SEQ ID NO:576)
KSVDSLKV	(SEQ ID NO:577)
SVDLSKV	(SEQ ID NO:578)
YKSVDSLKVT	(SEQ ID NO:579)
KSVDSLKVT	(SEQ ID NO:580)
SVDLSKVT	(SEQ ID NO:581)
DLSKVT	(SEQ ID NO:582)
LSKVT	(SEQ ID NO:583)
SKVT	(SEQ ID NO:584)
KVT	(SEQ ID NO:585)
HGAEIVYKSV	(SEQ ID NO:586)
GAEIVYKSV	(SEQ ID NO:587)
AEIVYKSV	(SEQ ID NO:588)
GAEIVYKSVV	(SEQ ID NO:589)
AEIVYKSVV	(SEQ ID NO:590)
EIVYKSVV	(SEQ ID NO:591)
IVYKSVV	(SEQ ID NO:592)
VYKSVV	(SEQ ID NO:593)
YKSVV	(SEQ ID NO:594)
KSVV	(SEQ ID NO:595)
SVV	(SEQ ID NO:596)
AEIVYKSVVS	(SEQ ID NO:597)
EIVYKSVVS	(SEQ ID NO:598)
IVYKSVVS	(SEQ ID NO:599)
VYKSVVS	(SEQ ID NO:600)
YKSVVS	(SEQ ID NO:601)
KSVVS	(SEQ ID NO:602)
SVVS	(SEQ ID NO:603)
EIVYKSVVSG	(SEQ ID NO:604)
IVYKSVVSG	(SEQ ID NO:605)
VYKSVVSG	(SEQ ID NO:606)
YKSVVSG	(SEQ ID NO:607)

KSVVSG	(SEQ ID NO:608)
SVVSG	(SEQ ID NO:609)
VVSG	(SEQ ID NO:610)
VSG	(SEQ ID NO:611)
IVYKSVVSGD	(SEQ ID NO:612)
VYKSVVSGD	(SEQ ID NO:613)
YKSVVSGD	(SEQ ID NO:614)
KSVVSGD	(SEQ ID NO:615)
SVVSGD	(SEQ ID NO:616)
VVSGD	(SEQ ID NO:617)
VYKSVVSGDT	(SEQ ID NO:618)
YKSVVSGDT	(SEQ ID NO:619)
KSVVSGDT	(SEQ ID NO:620)
SVVSGDT	(SEQ ID NO:621)
YKSVVSGDTS	(SEQ ID NO:622)
KSVVSGDTS	(SEQ ID NO:623)
SVVSGDTS	(SEQ ID NO:624)
YKSVVSGDTS	(SEQ ID NO:625)
KSVVSGDTS	(SEQ ID NO:626)
SVVSGDTS	(SEQ ID NO:627)
VVSGDTS	(SEQ ID NO:628)
KSVVSGDTSP	(SEQ ID NO:629)
SVVSGDTSP	(SEQ ID NO:630)
SVVSGDTSPR	(SEQ ID NO:631)
DHGAEIVYKP	(SEQ ID NO:632)
HGAEIVYKP	(SEQ ID NO:633)
GAEIVYKP	(SEQ ID NO:634)
AEIVYKP	(SEQ ID NO:635)
HGAEIVYKPV	(SEQ ID NO:636)
GAEIVYKPV	(SEQ ID NO:637)
AEIVYKPV	(SEQ ID NO:638)
GAEIVYKPVV	(SEQ ID NO:639)
AEIVYKPVV	(SEQ ID NO:640)
EIVYKPVV	(SEQ ID NO:641)
IVYKPVV	(SEQ ID NO:642)

VYKPVV	(SEQ ID NO:643)
YKPVV	(SEQ ID NO:644)
KPVV	(SEQ ID NO:645)
AEIVYKPVVS	(SEQ ID NO:646)
EIVYKPVVS	(SEQ ID NO:647)
IVYKPVVS	(SEQ ID NO:648)
VYKPVVS	(SEQ ID NO:649)
YKPVVS	(SEQ ID NO:650)
KPVVS	(SEQ ID NO:651)
EIVYKPVVSG	(SEQ ID NO:652)
IVYKPVVSG	(SEQ ID NO:653)
VYKPVVSG	(SEQ ID NO:654)
YKPVVSG	(SEQ ID NO:655)
KPVVSG	(SEQ ID NO:656)
IVYKPVVSGD	(SEQ ID NO:657)
VYKPVVSGD	(SEQ ID NO:658)
YKPVVSGD	(SEQ ID NO:659)
KPVVSGD	(SEQ ID NO:660)
VYKPVVSGDT	(SEQ ID NO:661)
YKPVVSGDT	(SEQ ID NO:662)
KPVVSGDT	(SEQ ID NO:663)
YKPVVSGDTS	(SEQ ID NO:664)
KPVVSGDTS	(SEQ ID NO:665)
PVVSGDTS	(SEQ ID NO:666)
VVSGDTS	(SEQ ID NO:667)
KPVVSGDTSP	(SEQ ID NO:668)
CNIK	(SEQ ID NO:669)
CNIKH	(SEQ ID NO:670)
CNIKHV	(SEQ ID NO:671)
CNIKHVPGG	(SEQ ID NO:672)
CNIKHVPGGG	(SEQ ID NO:673)
CNIKHVPGGGS	(SEQ ID NO:674)
ENLKHQPGGG	(SEQ ID NO:675)
NLKHQPGGG	(SEQ ID NO:676)
LKHQPGGG	(SEQ ID NO:677)

KHQPGGG	(SEQ ID NO:678)
HQPGGG	(SEQ ID NO:679)
QPGGG	(SEQ ID NO:680)
TENLKHQPGG	(SEQ ID NO:681)
ENLKHQPGG	(SEQ ID NO:682)
NLKHQPGG	(SEQ ID NO:683)
LKHQPGG	(SEQ ID NO:684)
KHQP GG	(SEQ ID NO:685)
HQP GG	(SEQ ID NO:686)
QP GG	(SEQ ID NO:687)
TENLKHQPG	(SEQ ID NO:688)
ENLKHQPG	(SEQ ID NO:689)
NLKHQPG	(SEQ ID NO:690)
LKHQPG	(SEQ ID NO:691)
KHQP G	(SEQ ID NO:692)
HQP G	(SEQ ID NO:693)
QP G	(SEQ ID NO:694)
TENLKHQP	(SEQ ID NO:695)
ENLKHQP	(SEQ ID NO:696)
NLKHQP	(SEQ ID NO:697)
LKHQP	(SEQ ID NO:698)
KHQP	(SEQ ID NO:699)
HQP	(SEQ ID NO:700)
TENLKHQ	(SEQ ID NO:701)
ENLKHQ	(SEQ ID NO:702)
NLKHQ	(SEQ ID NO:703)
LKHQ	(SEQ ID NO:704)
KHQ	(SEQ ID NO:705)
TENLKH	(SEQ ID NO:706)
ENLKH	(SEQ ID NO:707)
NLKH	(SEQ ID NO:708)
LKH	(SEQ ID NO:709)
TENLK	(SEQ ID NO:710)
ENLK	(SEQ ID NO:711)
NLK	(SEQ ID NO:712)

TENL	(SEQ ID NO:713)
ENL	(SEQ ID NO:714)
TEN	(SEQ ID NO:715)
KDNIKHVPGGG	(SEQ ID NO:716)
KDNI	(SEQ ID NO:717)
KDN	(SEQ ID NO:718)
IKHVGGG	(SEQ ID NO:719)
IKHVGG	(SEQ ID NO:720)
IKHVG	(SEQ ID NO:721)
KHVGGG	(SEQ ID NO:722)
KHVGG	(SEQ ID NO:723)
KHVG	(SEQ ID NO:724)
LGNIHHKPGGG	(SEQ ID NO:725)
GNIHHKPGGG	(SEQ ID NO:726)
NIHHKPGGG	(SEQ ID NO:727)
IHHKPGGG	(SEQ ID NO:728)
HHKPGGG	(SEQ ID NO:729)
KPGGG	(SEQ ID NO:730)
LGNIHHKPGG	(SEQ ID NO:731)
GNIHHKPGG	(SEQ ID NO:732)
NIHHKPGG	(SEQ ID NO:733)
IHHKPGG	(SEQ ID NO:734)
HHKPGG	(SEQ ID NO:735)
KPGG	(SEQ ID NO:736)
LGNIHHKPG	(SEQ ID NO:737)
GNIHHKPG	(SEQ ID NO:738)
NIHHKPG	(SEQ ID NO:739)
IHHKPG	(SEQ ID NO:740)
HHKPG	(SEQ ID NO:741)
HKPG	(SEQ ID NO:742)
KPG	(SEQ ID NO:743)
LGNIHHKP	(SEQ ID NO:744)
GNIHHKP	(SEQ ID NO:745)
NIHHKP	(SEQ ID NO:746)
IHHKP	(SEQ ID NO:747)

HHKP	(SEQ ID NO:748)
HKP	(SEQ ID NO:749)
LGNIHHK	(SEQ ID NO:750)
GNIHHK	(SEQ ID NO:751)
NIHHK	(SEQ ID NO:752)
IHHK	(SEQ ID NO:753)
HHK	(SEQ ID NO:754)
LGNIHH	(SEQ ID NO:755)
GNIHH	(SEQ ID NO:756)
NIHH	(SEQ ID NO:757)
IHH	(SEQ ID NO:758)
LGNIH	(SEQ ID NO:759)
GNIH	(SEQ ID NO:760)
NIH	(SEQ ID NO:761)
LGNI	(SEQ ID NO:762)
GNI	(SEQ ID NO:763)
LGN	(SEQ ID NO:764)
LDNITHVPGGG	(SEQ ID NO:765)
DNITHVPGGG	(SEQ ID NO:766)
NITHVPGGG	(SEQ ID NO:767)
ITHVPGGG	(SEQ ID NO:768)
THVPGGG	(SEQ ID NO:769)
LDNITHVPGG	(SEQ ID NO:770)
DNITHVPGG	(SEQ ID NO:771)
NITHVPGG	(SEQ ID NO:772)
ITHVPGG	(SEQ ID NO:773)
THVPGG	(SEQ ID NO:774)
LDNITHVPG	(SEQ ID NO:775)
DNITHVPG	(SEQ ID NO:776)
NITHVPG	(SEQ ID NO:777)
ITHVPG	(SEQ ID NO:778)
THVPG	(SEQ ID NO:779)
LDNITHVP	(SEQ ID NO:780)
DNITHVP	(SEQ ID NO:781)
NITHVP	(SEQ ID NO:782)

ITHVP	(SEQ ID NO:783)
THVP	(SEQ ID NO:784)
LDNITHV	(SEQ ID NO:785)
DNITHV	(SEQ ID NO:786)
NITHV	(SEQ ID NO:787)
ITHV	(SEQ ID NO:788)
THV	(SEQ ID NO:789)
LDNITH	(SEQ ID NO:790)
DNITH	(SEQ ID NO:791)
NITH	(SEQ ID NO:792)
ITH	(SEQ ID NO:793)
LDNIT	(SEQ ID NO:794)
DNIT	(SEQ ID NO:795)
NIT	(SEQ ID NO:796)
LDNI	(SEQ ID NO:797)
LDN	(SEQ ID NO:798)
KNVSKIGST	(SEQ ID NO:799)
NVSKIGST	(SEQ ID NO:800)
VKSKIGST	(SEQ ID NO:801)
KSKIGST	(SEQ ID NO:802)
SKIGST	(SEQ ID NO:803)
KIGST	(SEQ ID NO:804)
IGST	(SEQ ID NO:805)
GST	(SEQ ID NO:806)
NVSKIGSTE	(SEQ ID NO:807)
VKSKIGSTE	(SEQ ID NO:808)
KSKIGSTE	(SEQ ID NO:809)
SKIGSTE	(SEQ ID NO:810)
KIGSTE	(SEQ ID NO:811)
IGSTE	(SEQ ID NO:812)
GSTE	(SEQ ID NO:813)
STE	(SEQ ID NO:814)
VKSKIGSTEN	(SEQ ID NO:815)
KSKIGSTEN	(SEQ ID NO:816)
SKIGSTEN	(SEQ ID NO:817)

KIGSTEN	(SEQ ID NO:818)
IGSTEN	(SEQ ID NO:819)
GSTEN	(SEQ ID NO:820)
STEN	(SEQ ID NO:821)
KSKIGSTENL	(SEQ ID NO:822)
SKIGSTENL	(SEQ ID NO:823)
KIGSTENL	(SEQ ID NO:824)
IGSTENL	(SEQ ID NO:825)
GSTENL	(SEQ ID NO:826)
STENL	(SEQ ID NO:827)
SKIGSTENLK	(SEQ ID NO:828)
KIGSTENLK	(SEQ ID NO:829)
IGSTENLK	(SEQ ID NO:830)
GSTENLK	(SEQ ID NO:831)
STENLK	(SEQ ID NO:832)
KIGSTENLKH	(SEQ ID NO:833)
IGSTENLKH	(SEQ ID NO:834)
GSTENLKH	(SEQ ID NO:835)
STENLKH	(SEQ ID NO:836)
IGSTENLKHQ	(SEQ ID NO:837)
GSTENLKHQ	(SEQ ID NO:838)
STENLKHQ	(SEQ ID NO:839)
GSTENLKHQP	(SEQ ID NO:840)
STENLKHQP	(SEQ ID NO:841)
STENLKHQPG	(SEQ ID NO:842)
SNVQSKCGSK	(SEQ ID NO:843)
NVQSKCGSK	(SEQ ID NO:844)
VQSKCGSK	(SEQ ID NO:845)
QSKCGSK	(SEQ ID NO:846)
SKCGSK	(SEQ ID NO:847)
KCGSK	(SEQ ID NO:848)
CGSK	(SEQ ID NO:849)
GSK	(SEQ ID NO:850)
NVQSKCGSKD	(SEQ ID NO:851)
VQSKCGSKD	(SEQ ID NO:852)

QSKCGSKD	(SEQ ID NO:853)
SKCGSKD	(SEQ ID NO:854)
KCGSKD	(SEQ ID NO:855)
CGSKD	(SEQ ID NO:856)
GSKD	(SEQ ID NO:857)
SKD	(SEQ ID NO:858)
VQSKCGSKDN	(SEQ ID NO:859)
QSKCGSKDN	(SEQ ID NO:860)
SKCGSKDN	(SEQ ID NO:861)
KCGSKDN	(SEQ ID NO:862)
CGSKDN	(SEQ ID NO:863)
GSKDN	(SEQ ID NO:864)
SKDN	(SEQ ID NO:865)
QSKCGSKDNI	(SEQ ID NO:866)
SKCGSKDNI	(SEQ ID NO:867)
KCGSKDNI	(SEQ ID NO:868)
CGSKDNI	(SEQ ID NO:869)
GSKDNI	(SEQ ID NO:870)
SKDNI	(SEQ ID NO:871)
SKVTSKCGSL	(SEQ ID NO:872)
KVTSKCGSL	(SEQ ID NO:873)
VTSKCGSL	(SEQ ID NO:874)
TSKCGSL	(SEQ ID NO:875)
SKCGSL	(SEQ ID NO:876)
KCGSL	(SEQ ID NO:877)
CGSL	(SEQ ID NO:878)
GSL	(SEQ ID NO:879)
KVTSKCGSLG	(SEQ ID NO:880)
VTSKCGSLG	(SEQ ID NO:881)
TSKCGSLG	(SEQ ID NO:882)
SKCGSLG	(SEQ ID NO:883)
KCGSLG	(SEQ ID NO:884)
CGSLG	(SEQ ID NO:885)
GSLG	(SEQ ID NO:886)

SLG	(SEQ ID NO:887)
VTSKCGSLGN	(SEQ ID NO:888)
TSKCGSLGN	(SEQ ID NO:889)
SKCGSLGN	(SEQ ID NO:890)
KCGSLGN	(SEQ ID NO:891)
CGSLGN	(SEQ ID NO:892)
GSLGN	(SEQ ID NO:893)
SLGN	(SEQ ID NO:894)
TSKCGSLGNI	(SEQ ID NO:895)
SKCGSLGNI	(SEQ ID NO:896)
KCGSLGNI	(SEQ ID NO:897)
CGSLGNI	(SEQ ID NO:898)
GSLGNI	(SEQ ID NO:899)
SLGNI	(SEQ ID NO:900)
SKCGSLGNIH	(SEQ ID NO:901)
KCGSLGNIH	(SEQ ID NO:902)
CGSLGNIH	(SEQ ID NO:903)
GSLGNIH	(SEQ ID NO:904)
SLGNIH	(SEQ ID NO:905)
KCGSLGNIHH	(SEQ ID NO:906)
CGSLGNIHH	(SEQ ID NO:907)
GSLGNIHH	(SEQ ID NO:908)
SLGNIHH	(SEQ ID NO:909)
CGSLGNIHHK	(SEQ ID NO:910)
GSLGNIHHK	(SEQ ID NO:911)
SLGNIHHK	(SEQ ID NO:912)
GSLGNIHHKP	(SEQ ID NO:913)
SLGNIHHKP	(SEQ ID NO:914)
SLGNIHHKPG	(SEQ ID NO:915)
DRVQSKIGSL	(SEQ ID NO:916)
RVQSKIGSL	(SEQ ID NO:917)
VQSKIGSL	(SEQ ID NO:918)
QSKIGSL	(SEQ ID NO:919)
SKIGSL	(SEQ ID NO:920)
KIGSL	(SEQ ID NO:921)

IGSL	(SEQ ID NO:922)
RVQSKIGSLD	(SEQ ID NO:923)
VQSKIGSLD	(SEQ ID NO:924)
QSKIGSLD	(SEQ ID NO:925)
SKIGSLD	(SEQ ID NO:926)
KIGSLD	(SEQ ID NO:927)
IGSLD	(SEQ ID NO:928)
GSLD	(SEQ ID NO:929)
SLD	(SEQ ID NO:930)
VQSKIGSLDN	(SEQ ID NO:931)
QSKIGSLDN	(SEQ ID NO:932)
SKIGSLDN	(SEQ ID NO:933)
KIGSLDN	(SEQ ID NO:934)
IGSLDN	(SEQ ID NO:935)
GSLDN	(SEQ ID NO:936)
SLDN	(SEQ ID NO:937)
QSKIGSLDNI	(SEQ ID NO:938)
SKIGSLDNI	(SEQ ID NO:939)
KIGSLDNI	(SEQ ID NO:940)
IGSLDNI	(SEQ ID NO:941)
GSLDNI	(SEQ ID NO:942)
SKIGSLDNIT	(SEQ ID NO:943)
KIGSLDNIT	(SEQ ID NO:944)
IGSLDNIT	(SEQ ID NO:945)
GSLDNIT	(SEQ ID NO:946)
SLDNIT	(SEQ ID NO:947)
KIGSLDNITH	(SEQ ID NO:948)
IGSLDNITH	(SEQ ID NO:949)
GSLDNITH	(SEQ ID NO:950)
SLDNITH	(SEQ ID NO:951)
IGSLDNITHV	(SEQ ID NO:952)
GSLDNITHV	(SEQ ID NO:953)
SLDNITHV	(SEQ ID NO:954)
GSLDNITHVP	(SEQ ID NO:955)
SLDNITHVP	(SEQ ID NO:956)

SLDNITHVPG	(SEQ ID NO:957)
PDLKNVKS	(SEQ ID NO:958)
DLKNVSKS	(SEQ ID NO:959)
LKNVFSKI	(SEQ ID NO:960)
KNVFSKIG	(SEQ ID NO:961)
NVFSKIGS	(SEQ ID NO:962)
DLSNVQSK	(SEQ ID NO:963)
LSNVQSKC	(SEQ ID NO:964)
SNVQSKCG	(SEQ ID NO:965)
NVQSKCGS	(SEQ ID NO:966)
VDLSKVTS	(SEQ ID NO:967)
DLSKVTSK	(SEQ ID NO:968)
LSKVTSKC	(SEQ ID NO:969)
SKVTSKCG	(SEQ ID NO:970)
KVTSKCGS	(SEQ ID NO:971)
LDFKDRVQ	(SEQ ID NO:972)
DFKDRVQS	(SEQ ID NO:973)
FKDRVQSK	(SEQ ID NO:974)
KDRVQSKI	(SEQ ID NO:975)
DRVQSKIG	(SEQ ID NO:976)
RVQSKIGS	(SEQ ID NO:977)
SKIGSTENLKH	(SEQ ID NO:978)
SKIGSTENIKH	(SEQ ID NO:979)
SKIGSKDNLKH	(SEQ ID NO:980)
SKIGSKENIKH	(SEQ ID NO:981)
SKIGSLENLKH	(SEQ ID NO:982)
SKIGSLENIKH	(SEQ ID NO:983)
SKIGSTDNLKH	(SEQ ID NO:984)
SKIGSTDNIKH	(SEQ ID NO:985)
SKIGSKDNIKH	(SEQ ID NO:986)
SKIGSLDNLKH	(SEQ ID NO:987)
SKIGSLDNIKH	(SEQ ID NO:988)
SKIGSTGNLKH	(SEQ ID NO:989)
SKIGSTGNIKH	(SEQ ID NO:990)
SKIGSKGNLKH	(SEQ ID NO:991)

SKIGSKGNIKH	(SEQ ID NO:992)
SKIGSLGNLKH	(SEQ ID NO:993)
SKIGSLGNIKH	(SEQ ID NO:994)

Lys Xaa₁ Xaa₂ Ser Xaa₃ Xaa₄ Asn Xaa₅ Xaa₆ His (SEQ ID NO:995), где

Xaa₁ представляет собой I или C;

Xaa₂ представляет собой G;

Xaa₃ представляет собой T, K или L;

Xaa₄ представляет собой E, D или G;

Xaa₅ представляет собой L или I;

Xaa₆ представляет собой K, H или T.

(Q/E)IVYK(S/P) (SEQ ID NO: 996)

DAEFRHDDRQIVYKPV (SEQ ID NO:57)

DAEFRHDDRREIVYKSV (SEQ ID NO:58)

DAEFRHDDRQIVYKPVGGC (SEQ ID NO:59)

DAEFRHDDRQIVYKPVC (SEQ ID NO:60)

DAEFRHDDRQIVYKPVAAC (SEQ ID NO:61)

DAEFRHDDRQIVYKPVKKC (SEQ ID NO:62)

DAEFRHDDRREIVYKSPGGC (SEQ ID NO:63)

DAEFRHDDRREIVYKSPAAC (SEQ ID NO:64)

DAEFRHDDRREIVYKSPC (SEQ ID NO:65)

DAEFRHDDRREIVYKSPKKC (SEQ ID NO:66)

DAEFRHDSGYEVHHQKLFFAEDVGS (SEQ ID NO:67)

NKG

GGGSVQIVYKPV DLS (SEQ ID NO:68)

Arg-Val-Arg-Arg (RVRR; SEQ ID NO:69)

Gly-Ala-Gly-Ala (GAGA; SEQ ID NO:80)

Ala-Gly-Ala-Gly (AGAG; SEQ ID NO:81)

Lys-Gly-Lys-Gly (KGKG; SEQ ID NO:82)

DAEFRHDDRQIVYKPVXXC (SEQ ID NO:70)

Если присутствует, XX может представлять собой GG или AA, или KK, или SS.

DAEFRHDDRREIVYKSVXXC (SEQ ID NO:79)

Если присутствует, XX может представлять собой GG или AA, или KK, или SS.

DAEFRHDC (SEQ ID NO:71)

QIVYKPVGGC (SEQ ID NO:72)

GGSQIVYKPV DLS (SEQ ID NO:73)

DAEFRHDDRREIVYKSVGGC (SEQ ID NO:74)

DAEFRHDDRREIVYKSVAAC	(SEQ ID NO:75)
DAEFRHDDRREIVYKSVC	(SEQ ID NO:76)
DAEFRHDDRREIVYKSVKCC	(SEQ ID NO:77)
DAEFRHDDRNIKHVPGGC	(SEQ ID NO:78)
DAEFRHDDRNVKSKIGSTGGC	(SEQ ID NO:997)
DAEFRHDDRNSKIGSTENGGC	(SEQ ID NO:998)
DAEFRHDDRRTENLKHQPGGC	(SEQ ID NO:999)
DAEFRHDDRRENLKHQPGGGC	(SEQ ID NO:1000)
DAEFRHDDRNSKIGSKDNIKHGGC	(SEQ ID NO:1001)

MTBR-пептид 1 QTAPVPMPLKKNVSKIGSTENLKHQPGGGK
(SEQ ID NO:1058)

MTBR-пептид 2 VQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGS
(SEQ ID NO:1059)

MTBR-пептид 3 VQIVYKPVDLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQ
(SEQ ID NO:1060)

MTBR-пептид 4 VEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGN
(SEQ ID NO:1061)

GGGS (SEQ ID NO:1062)

GGGGS (SEQ ID NO:1063)

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид, содержащий первый пептид, содержащий 3-10 аминокислот из остатков 1-10 SEQ ID NO:01, связанный со вторым пептидом, содержащим 3-13 аминокислот из остатков 244-400 SEQ ID NO:02.

2. Полипептид по п. 1, где второй пептид происходит из области связывания микротрубочек (MTBR) тау-белка (остатки 244-372 SEQ ID NO:02).

3. Полипептид по п. 1, где первый пептид является N-концевым по отношению ко второму пептиду.

4. Полипептид по п. 1, где первый пептид является C-концевым по отношению ко второму пептиду.

5. Полипептид по любому из пп. 1-4, где:

(а) первый пептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

DAEFRHDSGY (SEQ ID NO:03),

DAEFRHDSG (SEQ ID NO:04),

DAEFRHDS (SEQ ID NO:05),

DAEFRHD (SEQ ID NO:06),

DAEFRH (SEQ ID NO:07),

DAEFR (SEQ ID NO:08),

DAEF (SEQ ID NO:09),

DAE (SEQ ID NO:10),

AEFRHDSGY (SEQ ID NO:11),

AEFRHDSG (SEQ ID NO:12),

AEFRHDS (SEQ ID NO:13),

AEFRHD (SEQ ID NO:14),

AEFRH (SEQ ID NO:15),

AEFR (SEQ ID NO:16),

AEF (SEQ ID NO:17),

EFRHDSGY (SEQ ID NO:18),

EFRHDSG (SEQ ID NO:19),

EFRHDS (SEQ ID NO:20),

EFRHD (SEQ ID NO:21),

EFRH (SEQ ID NO:22),

EFR (SEQ ID NO:23),

FRHDSGY (SEQ ID NO:24),

FRHDSG (SEQ ID NO:25),

FRHDS (SEQ ID NO:26),

FRHD (SEQ ID NO:27),

FRH (SEQ ID NO:28),

RHDSGY (SEQ ID NO:29),

RHDSG (SEQ ID NO:30),
 RHDS (SEQ ID NO:31),
 RHD (SEQ ID NO:32),
 HDSGY (SEQ ID NO:33),
 HDSG (SEQ ID NO:34),
 HDS (SEQ ID NO:35),
 DSGY (SEQ ID NO:36),
 DSG (SEQ ID NO:37) и
 SGY (SEQ ID NO:38); и

(b) второй пептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

QIVYKPV (SEQ ID NO:39),
 QIVYKP (SEQ ID NO:40),
 QIVYKSV (SEQ ID NO:41),
 EIVYKSV (SEQ ID NO:42),
 QIVYKS (SEQ ID NO:83),
 EIVYKSP (SEQ ID NO:43),
 EIVYKS (SEQ ID NO:84),
 EIVYKPV (SEQ ID NO:44),
 EIVYKP (SEQ ID NO:85),
 IVYKSPV (SEQ ID NO:45),
 IVYK (SEQ ID NO:46),
 CNIKHVPG (SEQ ID NO:86),
 CNIKHVP (SEQ ID NO:47),
 NIKHVP (SEQ ID NO:48),
 HVPGGG (SEQ ID NO:49),
 HVPGG (SEQ ID NO:50),
 HKPGGG (SEQ ID NO:51),
 HKPGG (SEQ ID NO:52),
 KHVPGGG (SEQ ID NO:53),
 KHVPGG (SEQ ID NO:54),
 HQPGGG (SEQ ID NO:55),
 HQPGG (SEQ ID NO:56),
 VKSKIGST (SEQ ID NO:801),
 SKIGSTEN (SEQ ID NO:817),
 TENLKHQP (SEQ ID NO:695),
 ENLKHQPG (SEQ ID NO:689),
 SKIGSTDNIKH (SEQ ID NO:985),
 SKIGSKDNIKH (SEQ ID NO:986),
 SKIGSLDNIKH (SEQ ID NO:988) и

SEQ ID NO:146-996.

6. Полипептид по любому из пп. 1-5, где первый пептид и второй пептид связаны расщепляемым линкером.

7. Полипептид по п.6, где расщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность.

8. Полипептид по п. 7, где аминокислотная последовательность включает аргинин-аргинин (Arg-Arg), аргинин-валин-аргинин-аргинин (Arg-Val-Arg-Arg, SEQ ID NO:69), валин-цитруллин (Val-Cit), валин-аргинин (Val-Arg), валин-лизин (Val-Lys), валин-аланин (Val-Ala), фенилаланин-лизин (Phe-Lys), глицин-аланин-глицин-аланин (Gly-Ala-Gly-Ala, SEQ ID NO:80), аланин-глицин-аланин-глицин (Ala-Gly-Ala-Gly, SEQ ID NO:81) или лизин-глицин-лизин-глицин (Lys-Gly-Lys-Gly, SEQ ID NO:82).

9. Полипептид по любому из пп. 1-8, дополнительно содержащий линкер к носителю либо на С-концевом участке полипептида, либо на N-концевом участке полипептида.

10. Полипептид по п. 9, где линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из GG, GGG, AA, AAA, KK, KKK, SS, SSS, GAGA (SEQ ID NO:80), AGAG (SEQ ID NO:81) и KGKG (SEQ ID NO:82).

11. Полипептид по любому из пп. 1-10, где полипептид или линкер к носителю, если он присутствует, дополнительно содержит С-концевой цистеин (C).

12. Полипептид по любому из пп. 1-11, где первый пептид представляет собой DAEFRHD (SEQ ID NO:06).

13. Полипептид по любому из пп. 1-11, где первый пептид представляет собой DAEFR (SEQ ID NO:08).

14. Полипептид по любому из пп. 1-11, где первый пептид представляет собой EFRHD (SEQ ID NO:21).

15. Полипептид по любому из пп. 1-11, где второй пептид содержит 5-10 аминокислот.

16. Полипептид по любому из пп. 1-11, где второй пептид содержит аминокислотную последовательность QIVYKPV (SEQ ID NO:39).

17. Полипептид по любому из пп. 1-11, где второй пептид содержит аминокислотную последовательность EIVYKSP (SEQ ID NO:43).

18. Полипептид по любому из пп. 1-11, где второй пептид содержит аминокислотную последовательность NIKHVP (SEQ ID NO:48).

19. Полипептид по любому из пп. 1-11, где второй пептид содержит аминокислотную последовательность VKSKIGST (SEQ ID NO:801).

20. Полипептид по любому из пп. 1-11, где второй пептид содержит аминокислотную последовательность SKIGSTEN (SEQ ID NO:817).

21. Полипептид по любому из пп. 1-11, где второй пептид содержит аминокислотную последовательность TENLKHQP (SEQ ID NO:803).

22. Полипептид по любому из пп. 1-11, где второй пептид содержит

аминокислотную последовательность ENLKHQPG (SEQ ID NO:689).

23. Полипептид по любому из пп. 1-11, где второй пептид содержит аминокислотную последовательность SKIGSTDNIKH (SEQ ID NO:985).

24. Полипептид по любому из пп. 1-11, где второй пептид содержит аминокислотную последовательность SKIGSKDNIKH (SEQ ID NO:986).

25. Полипептид по любому из пп. 1-11, где второй пептид содержит аминокислотную последовательность SKIGSLDNIKH (SEQ ID NO:988).

26. Полипептид по п. 1, содержащий аминокислотную последовательность DAEFRHDDRQIVYKPV (SEQ ID NO:57).

27. Полипептид по п. 1, содержащий аминокислотную последовательность DAEFRHDDRREIVYKSV (SEQ ID NO:58).

28. Полипептид по п. 1, содержащий аминокислотную последовательность DAEFRHDDRQIVYKPVGGC (SEQ ID NO:59).

29. Полипептид по п. 1, содержащий аминокислотную последовательность DAEFRHDDRQIVYKPVC (SEQ ID NO:60).

30. Полипептид по п. 1, содержащий аминокислотную последовательность DAEFRHDDRQIVYKPVAAC (SEQ ID NO:61).

31. Полипептид по п. 1, содержащий аминокислотную последовательность DAEFRHDDRQIVYKPVKKC (SEQ ID NO: 62).

32. Полипептид по п. 1, содержащий аминокислотную последовательность DAEFRHDDRREIVYKSPGGC (SEQ ID NO:63).

33. Полипептид по п. 1, содержащий аминокислотную последовательность DAEFRHDDRREIVYKSPAAC (SEQ ID NO:64).

34. Полипептид по п. 1, содержащий аминокислотную последовательность DAEFRHDDRREIVYKSPC (SEQ ID NO:65).

35. Полипептид по п. 1, содержащий аминокислотную последовательность DAEFRHDDRREIVYKSPKC (SEQ ID NO:66).

36. Полипептид по п. 1, содержащий аминокислотную последовательность DAEFRHDDRNIKHVPGGC (SEQ ID NO:78).

37. Полипептид по п. 1, содержащий аминокислотную последовательность DAEFRHDRVKSKIGTGGC (SEQ ID NO:997).

38. Полипептид по п. 1, содержащий аминокислотную последовательность DAEFRHDDRSKIGSTENGGC (SEQ ID NO:998).

39. Полипептид по п. 1, содержащий аминокислотную последовательность DAEFRHDDRRTENLKHQPGGC (SEQ ID NO:999).

40. Полипептид по п. 1, содержащий аминокислотную последовательность DAEFRHDDRENLKHQPGGGC (SEQ ID NO:1000).

41. Полипептид по п. 1, содержащий аминокислотную последовательность DAEFRHDDRSKIGSKDNKHGGC (SEQ ID NO:1001).

42. Полипептид по п. 1, содержащий аминокислотную последовательность

DAEFRHDDRQIVYKPVXXC (SEQ ID NO:70), где XX и C независимо являются необязательными, и, если присутствует, XX может представлять собой GG, AA, KK, SS, GAGA (SEQ ID NO:80), AGAG (SEQ ID NO:81) или KGKG (SEQ ID NO:82).

43. Иммунотерапевтическая композиция, содержащая полипептид по любому из пп. 1-42, где полипептид связан с носителем.

44. Иммунотерапевтическая композиция по п. 43, где носитель содержит сывороточные альбумины, молекулы иммуноглобулинов, тиреоглобулин, овальбумин, столбнячный анатоксин (ТТ), дифтерийный анатоксин (ДТ), генетически модифицированный перекрестно реагирующий материал (CRM) дифтерийного токсина, CRM197, белковый комплекс внешней мембраны менингококка (OMPС) и белок D H. influenzae (HiD), rEPA (экзотоксин A *Pseudomonas aeruginosa*), KLN (гемоцианин лимфы улитки) и флагеллин.

45. Иммунотерапевтическая композиция по п. 44, где носитель представляет собой CRM197.

46. Иммунотерапевтическая композиция по п. 44, где носитель представляет собой дифтерийный анатоксин.

47. Фармацевтическая композиция, содержащая (а) полипептид по любому из пп. 1-42 или иммунотерапевтическую композицию по любому из пп. 43-46 и (b) по меньшей мере один адъювант.

48. Фармацевтическая композиция по п. 47, где адъювант выбирают из группы, состоящей из гидроксида алюминия, фосфата алюминия, сульфата алюминия, 3-О-деацилированного монофосфориллипида А (MPL), QS-21, TQL1055, QS-18, QS-17, QS-7, полного адъюванта Фрейнда (CFA), неполного адъюванта Фрейнда (IFA), эмульсий масло-в-воде (например, сквалена или арахисового масла), CpG, полиглутаминовой кислоты, полилизина, AddaVax™, MF59® и их комбинаций.

49. Фармацевтическая композиция по п. 48, где адъювант представляет собой QS-21 или TQL1055.

50. Фармацевтическая композиция по п. 48, где адъювант представляет собой MPL.

51. Фармацевтическая композиция по п. 48, где адъювант представляет собой комбинацию MPL и QS-21 или комбинацию MPL и TQL1055.

52. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 47-51, где адъювант представляет собой липосомальную композицию.

53. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 47-52, где композиция содержит по меньшей мере один фармацевтически приемлемый разбавитель.

54. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 47-53, содержащая мультиантигенпредставляющую систему (MAP).

55. Фармацевтическая композиция по п. 54, где MAP содержит один или более из дендритного каркаса на основе Lys, хелперных Т-клеточных эпитопов, иммуностимулирующих липофильных фрагментов, проникающих в клетку пептидов, радикал-индуцированной полимеризации, самособирающихся наночастиц в качестве

антигенпредставляющей платформы и наночастиц золота.

56. Иммунотерапевтическая композиция, содержащая первую пептидную последовательность, содержащую 3-10 аминокислотных остатков из первых десяти N-концевых остатков SEQ ID NO:01, и вторую пептидную последовательность, содержащую 3-13 аминокислот из остатков 244-400 SEQ ID NO:02.

57. Иммунотерапевтическая композиция по п. 56, где:

(а) первая пептидная последовательность содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

DAEFRHDSGY (SEQ ID NO:03),

DAEFRHDSG (SEQ ID NO:04),

DAEFRHDS (SEQ ID NO:05),

DAEFRHD (SEQ ID NO:06),

DAEFRH (SEQ ID NO:07),

DAEFR (SEQ ID NO:08),

DAEF (SEQ ID NO:09),

DAE (SEQ ID NO:10),

AEFRHDSGY (SEQ ID NO:11),

AEFRHDSG (SEQ ID NO:12),

AEFRHDS (SEQ ID NO:13),

AEFRHD (SEQ ID NO:14),

AEFRH (SEQ ID NO:15),

AEFR (SEQ ID NO:16),

AEF (SEQ ID NO:17),

EFRHDSGY (SEQ ID NO:18),

EFRHDSG (SEQ ID NO:19),

EFRHDS (SEQ ID NO:20),

EFRHD (SEQ ID NO:21),

EFRH (SEQ ID NO:22),

EFR (SEQ ID NO:23),

FRHDSGY (SEQ ID NO:24),

FRHDSG (SEQ ID NO:25),

FRHDS (SEQ ID NO:26),

FRHD (SEQ ID NO:27),

FRH (SEQ ID NO:28),

RHDSGY (SEQ ID NO:29),

RHDSG (SEQ ID NO:30),

RHDS (SEQ ID NO:31),

RHD (SEQ ID NO:32),

HDSGY (SEQ ID NO:33),

HDSG (SEQ ID NO:34),

HDS (SEQ ID NO:35),
 DSGY (SEQ ID NO:36),
 DSG (SEQ ID NO:37) и
 SGY (SEQ ID NO:38); и

(b) вторая пептидная последовательность содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

QIVYKPV (SEQ ID NO:39),
 QIVYKP (SEQ ID NO:40),
 QIVYKSV (SEQ ID NO:41),
 QIVYKS (SEQ ID NO:83),
 EIVYKSP (SEQ ID NO:43),
 EIVYKS (SEQ ID NO:84),
 EIVYKPV (SEQ ID NO:44),
 EIVYKP (SEQ ID NO:85),
 IVYKSPV (SEQ ID NO:45),
 IVYK (SEQ ID NO:46),
 CNIKHVPG (SEQ ID NO:86),
 CNIKHVP (SEQ ID NO:47),
 NIKHVP (SEQ ID NO:48),
 HVPGGG (SEQ ID NO:49),
 HVPGG (SEQ ID NO:50),
 HKPGGG (SEQ ID NO:51),
 HKPGG (SEQ ID NO:52),
 KHVPGGG (SEQ ID NO:53),
 KHVPGG (SEQ ID NO:54),
 HQPGGG (SEQ ID NO:55),
 HQPGG (SEQ ID NO:56),
 VKSKIGST (SEQ ID NO:801),
 SKIGSTEN (SEQ ID NO:817),
 TENLKHQP (SEQ ID NO:695),
 ENLKHQPG (SEQ ID NO:689),
 SKIGSTDNIKH (SEQ ID NO:985),
 SKIGSKDNIKH (SEQ ID NO:986),
 SKIGSLDNIKH (SEQ ID NO:988) и
 SEQ ID NO:146-996,

где каждая из первой пептидной последовательности и второй пептидной последовательности может необязательно содержать С-концевой цистеин.

58. Иммунотерапевтическая композиция по любому из пп. 56-57, где по меньшей мере один из первого пептида и второго пептида дополнительно содержит линкер к носителю либо на С-концевом участке полипептида, либо на N-концевом участке

полипептида.

59. Иммунотерапевтическая композиция по п. 58, где линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из GG, GGG, AA, AAA, KK, KKK, SS, SSS, GAGA (SEQ ID NO:80), AGAG (SEQ ID NO:81) и KGKG (SEQ ID NO:82).

60. Иммунотерапевтическая композиция по п. 59, где линкер к носителю может необязательно содержать С-концевой цистеин (С).

61. Иммунотерапевтическая композиция по любому из пп. 59-60, где носитель содержит сывороточные альбумины, молекулы иммуноглобулинов, тиреоглобулин, овальбумин, столбнячный анатоксин (ТТ), дифтерийный анатоксин (ДТ), генетически модифицированный перекрестно реагирующий материал (CRM) дифтерийного токсина, CRM197, белковый комплекс внешней мембраны менингококка (OMPС) и белок D H. influenzae (HiD), rЕРА (экзотоксин A Pseudomonas aeruginosa), KLN (гемоцианин лимфы улитки) и флагеллин.

62. Иммунотерапевтическая композиция по п. 61, где носитель представляет собой CRM197.

63. Иммунотерапевтическая композиция по п.61, где носитель представляет собой дифтерийный анатоксин.

64. Иммунотерапевтическая композиция по любому из пп. 56-63, дополнительно содержащая по меньшей мере один фармацевтически приемлемый разбавитель.

65. Иммунотерапевтическая композиция по любому из пп. 56-64, дополнительно содержащая мультиантигенпредставляющую систему (MAP).

66. Иммунотерапевтическая композиция по п. 65, где MAP содержит один или более из дендритного каркаса на основе Lys, хелперных Т-клеточных эпитопов, иммуностимулирующих липофильных фрагментов, проникающих в клетку пептидов, радикал-индуцированной полимеризации, самособирающихся наночастиц в качестве антигенпредставляющей платформы и наночастиц золота.

67. Фармацевтическая композиция, содержащая иммунотерапевтическую композицию по любому из пп. 56-66 и по меньшей мере один адъювант.

68. Фармацевтическая композиция по п. 67, где адъювант выбирают из группы, состоящей из гидроксида алюминия, фосфата алюминия, сульфата алюминия, 3-О-деацилированного монофосфориллипида А (MPL), QS-21, TQL1055, QS-18, QS-17, QS-7, полного адъюванта Фрейнда (CFA), неполного адъюванта Фрейнда (IFA), эмульсий масло-в-воде (например, сквалена или арахисового масла), CpG, полиглутаминовой кислоты, полилизина, AddaVax™, MF59® и их комбинаций.

69. Фармацевтическая композиция по п. 68, где адъювант представляет собой QS-21 или TQL1055.

70. Фармацевтическая композиция по п. 68, где адъювант представляет собой MPL.

71. Фармацевтическая композиция по п. 68, где адъювант представляет собой комбинацию MPL и QS-21 или комбинацию MPL и TQL1055.

72. Нуклеиновая кислота, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид по любому из пп. 1-42 иммунотерапевтической композиции по пп. 56-60.

73. Иммунотерапевтическая композиция на основе нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеиновую кислоту по п.72 и по меньшей мере один адъювант.

74. Способ лечения или осуществления профилактики болезни Альцгеймера у субъекта, включающий в себя введение субъекту иммунотерапевтической композиции по любому из пп. 43-46 и 56-66 или фармацевтических составов по любому из пп. 47-55 и 67-71.

75. Способ ингибирования или снижения агрегации по меньшей мере одного из A β и тау у субъекта, страдающего или подверженного риску развития болезни Альцгеймера, включающий в себя введение субъекту иммунотерапевтической композиции по любому из пп. 43-46 и 56-66 или фармацевтических составов по любому из пп. 47-55 и 67-71.

76. Способ лечения или осуществления профилактики болезни Альцгеймера у субъекта, включающий в себя введение субъекту иммунотерапевтической композиции на основе нуклеиновой кислоты по п. 73.

77. Способ ингибирования или снижения агрегации по меньшей мере одного из A β и тау у субъекта, страдающего или подверженного риску развития болезни Альцгеймера, включающий в себя введение субъекту иммунотерапевтической композиции на основе нуклеиновой кислоты по п. 73.

78. Способ по любому из пп. 74-77, дополнительно включающий повторное введение по меньшей мере во второй раз, по меньшей мере в третий раз, по меньшей мере в четвертый раз, по меньшей мере в пятый раз или по меньшей мере в шестой раз.

79. Способ по п.78, дополнительно включающий повторное введение с интервалом от примерно 21 до примерно 28 дней.

80. Способ индукции иммунного ответа у животного, включающий в себя введение животному любого из полипептидов по пп. 1-42, иммунотерапевтической композиции по пп. 43-46 и 56-66, фармацевтических составов по пп. 47-55 и 67-71, или иммунотерапевтической композиции на основе нуклеиновой кислоты по п. 73 по схеме, эффективной для формирования иммунного ответа, включающего антитела, которые специфично связываются с A β , тау или как с A β , так и с тау.

81. Способ по п. 80, где иммунный ответ включает антитела, которые специфично связываются с A β , и антитела, которые специфично связываются с тау.

82. Способ по любому из пп. 80-81, где индукция иммунного ответа включает антитела, которые специфично связываются с N-концевой областью A β и/или областью связывания микротрубочек тау-белка.

83. Набор для иммунизации, содержащий иммунотерапевтическую композицию по любому из пп. 43-46 и 56-66.

84. Набор по п. 83, дополнительно содержащий адъювант.

85. Набор по п.84, где иммунотерапевтическая композиция находится в первом

контейнере, а адъювант находится во втором контейнере.

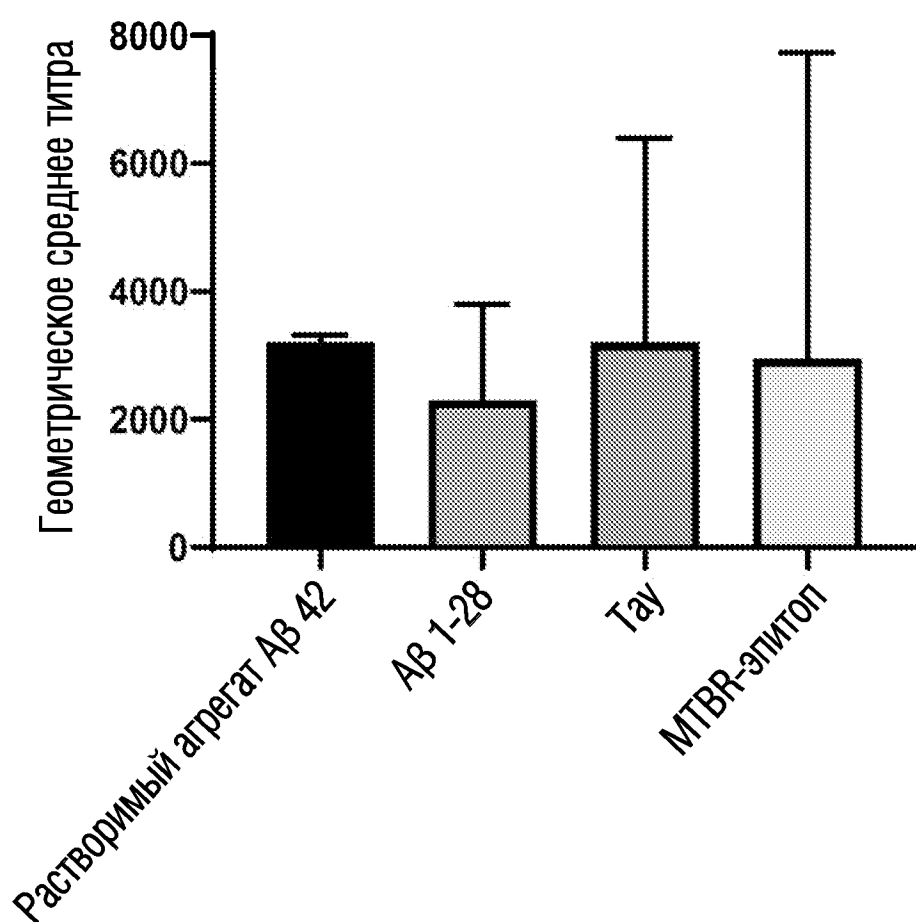
86. Набор, содержащий иммунотерапевтическую композицию на основе нуклеиновой кислоты по п. 73.

87. Набор по п.86, дополнительно содержащий адъювант.

88. Набор по п. 87, где нуклеиновая кислота находится в первом контейнере, а адъювант находится во втором контейнере.

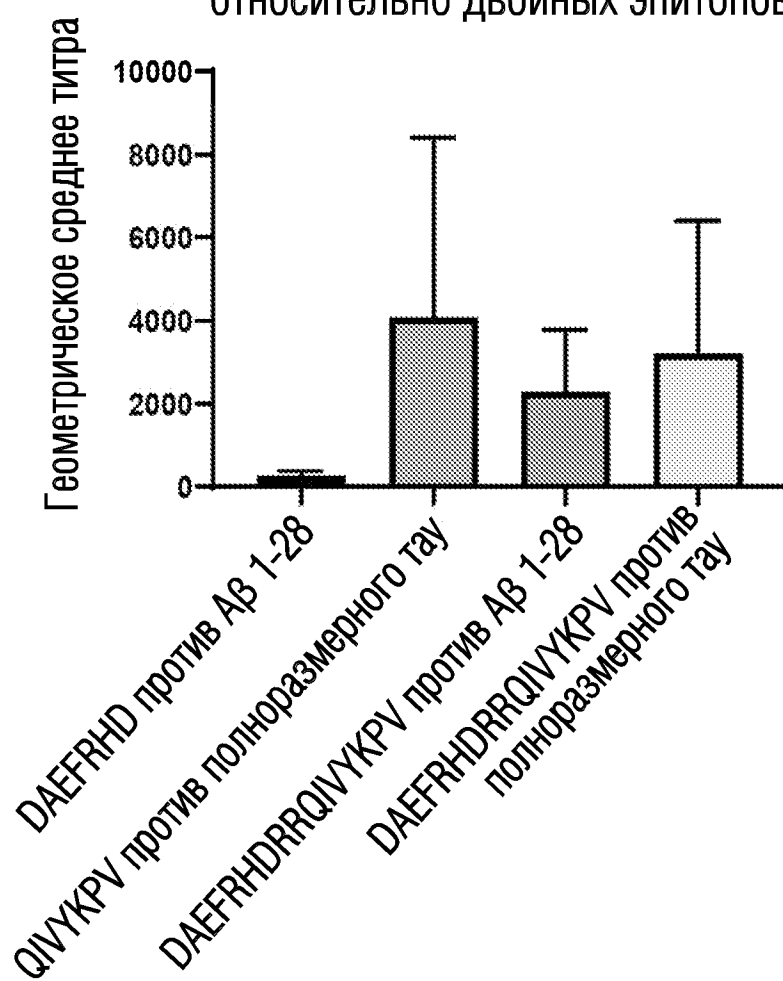
По доверенности

ФИГ. 1



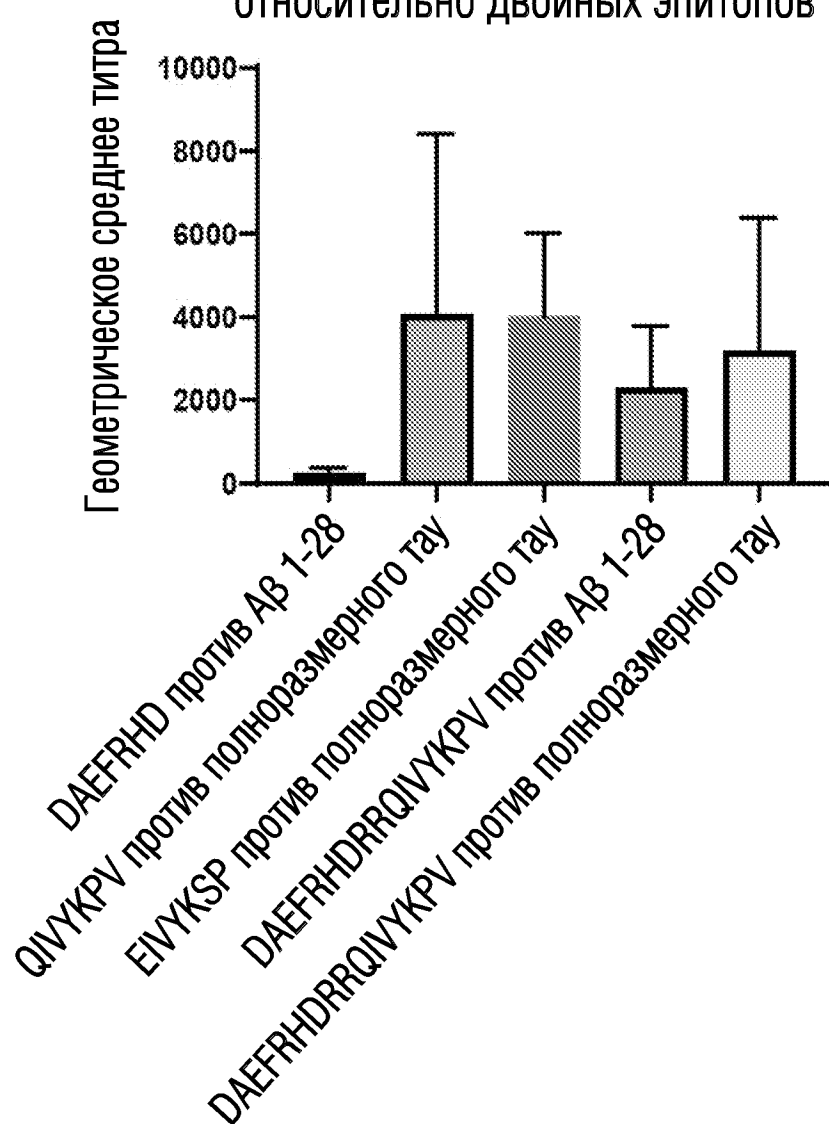
ФИГ. 2А

Сравнение титров антител, полученных на моноэпитопы
относительно двойных эпитопов



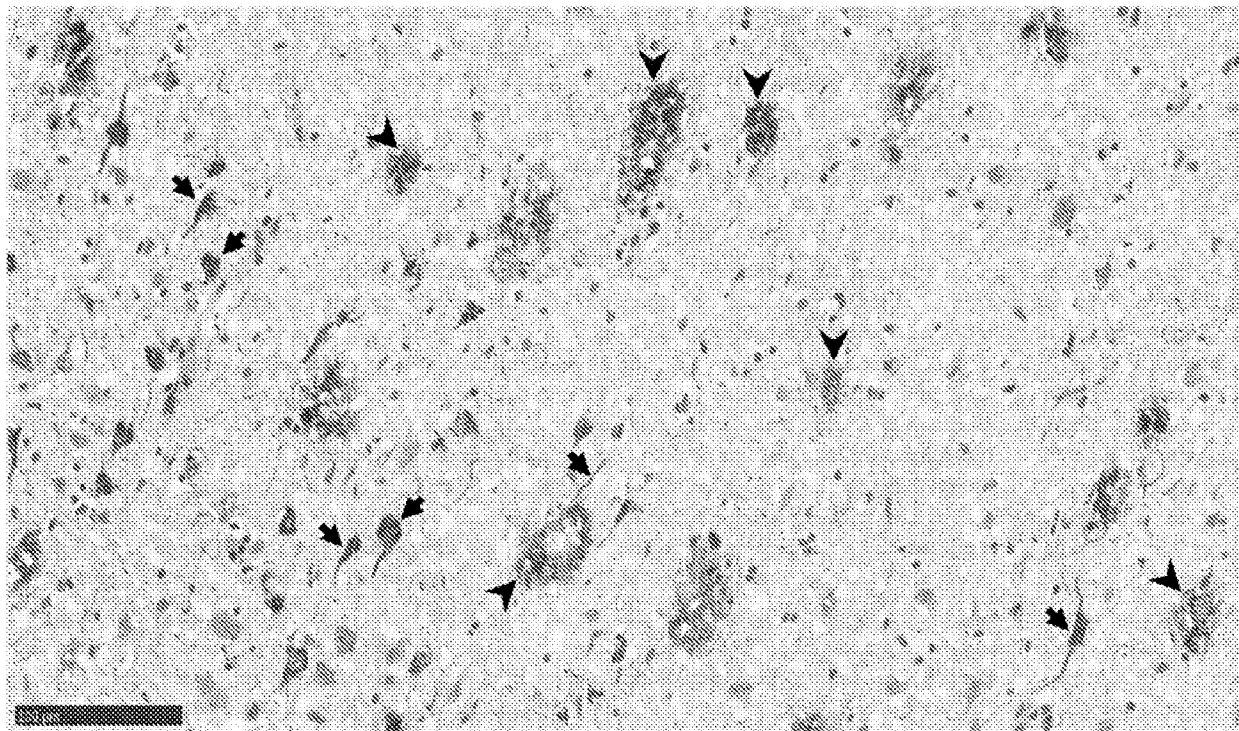
ФИГ. 2В

Сравнение титров антител, полученных на моноэпитопы
относительно двойных эпитопов



ФИГ. 3А

Мозг пациента с БА (04-33) – Вакцинная сыворотка 2 – Разведение 1:300



Стрелки: патологический тау

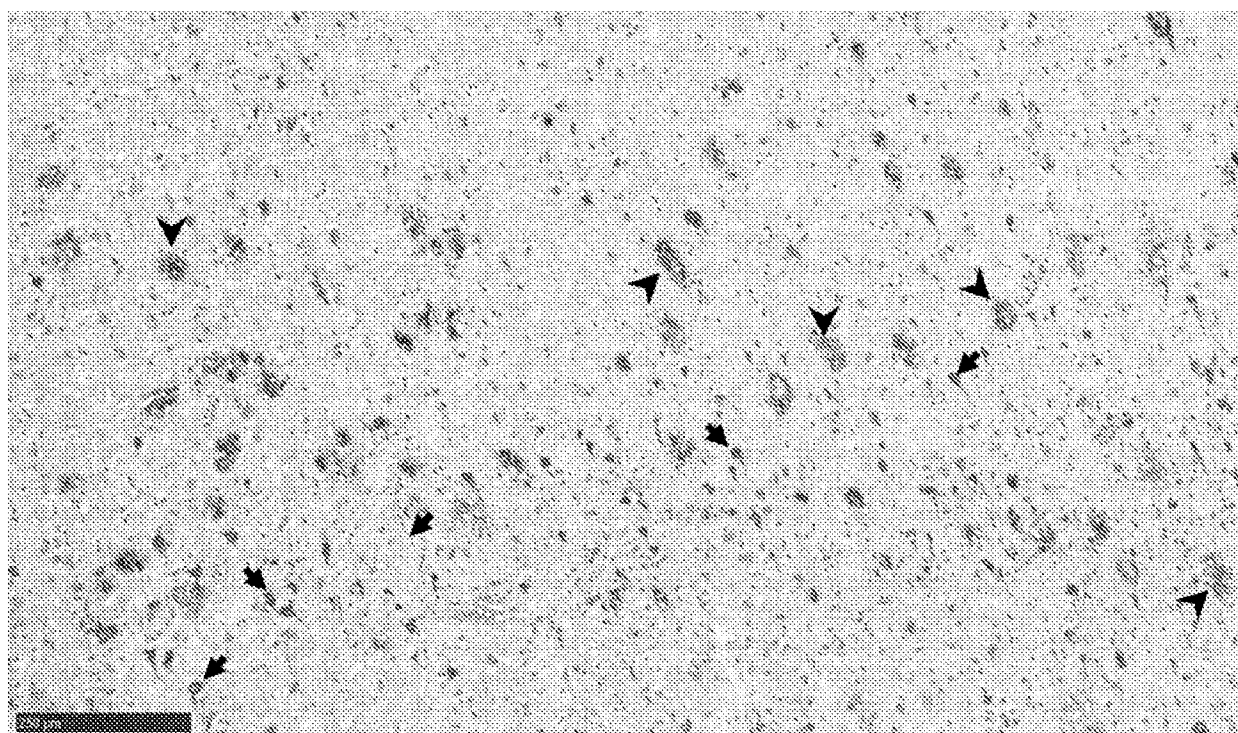
Концы стрелок: патологический Аβ

Вакцинная сыворотка 2: сыворотка от вакцинированной морской свинки 2

Иммуноген 9 DAEFRHRRQIVYKPVGGC

ФИГ. 3В

Мозг пациента с БА (04-33) — Вакцинная сыворотка 2 — Разведение 1:300



Стрелки: патологический тау

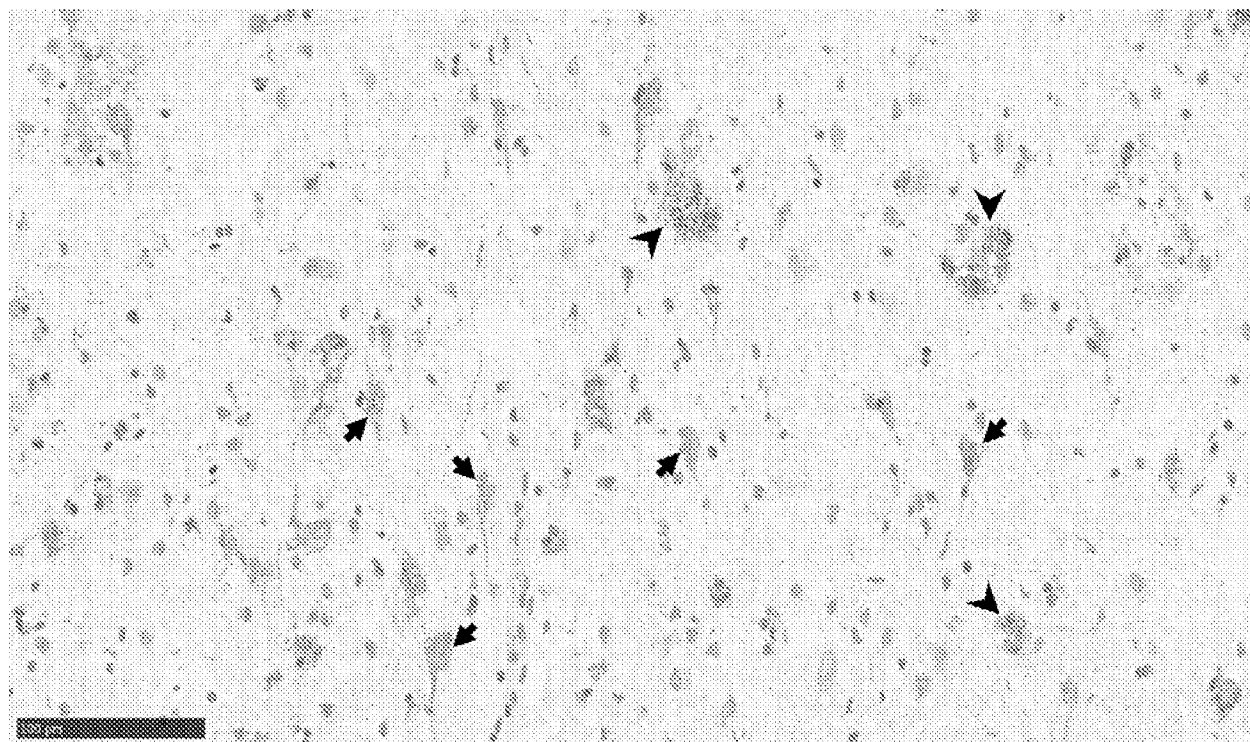
Концы стрелок: патологический Аβ

Вакцинная сыворотка 2: сыворотка от вакцинированной морской свинки 2

Иммуноген 9 DAEFRHDDRQIVYKPVGGC

ФИГ. 3С

Мозг пациента с БА (04-33) – Вакцинная сыворотка 2 – Разведение 1:1500



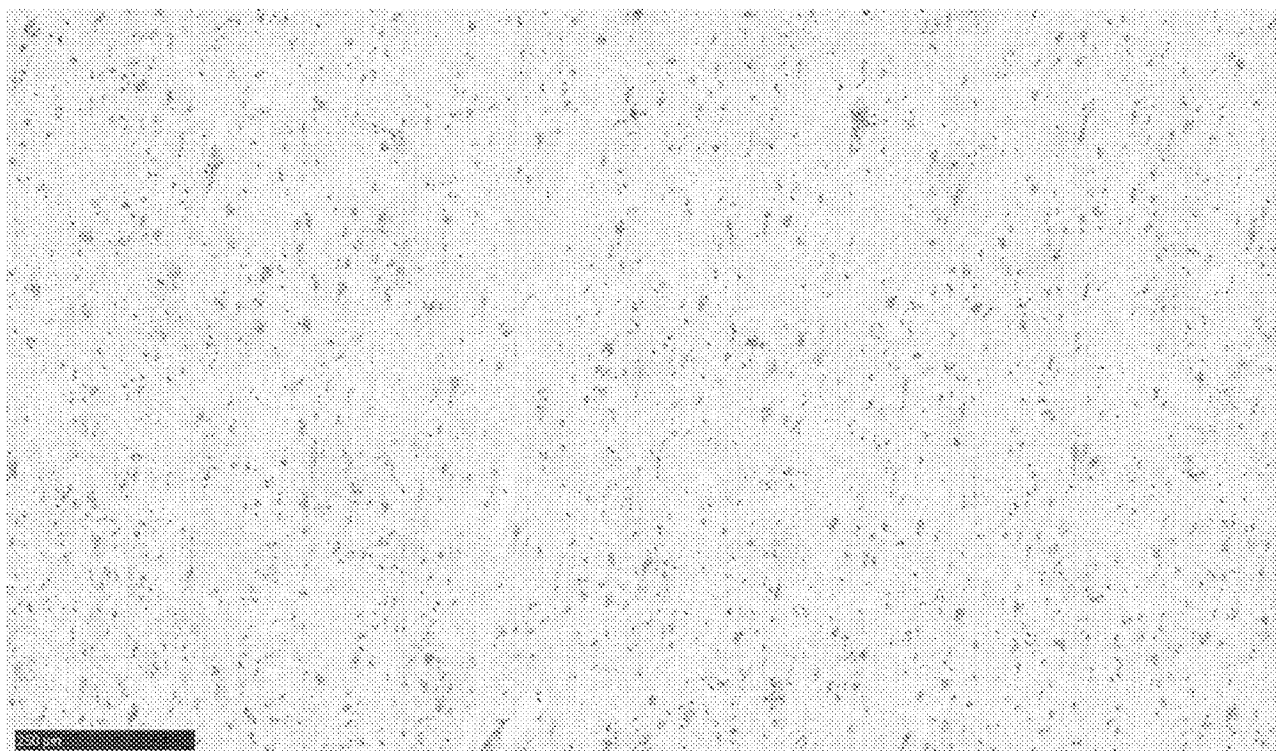
Стрелки: патологический тау

Концы стрелок: патологический Aβ

Вакцинная сыворотка 2: сыворотка от вакцинированной морской свинки 2

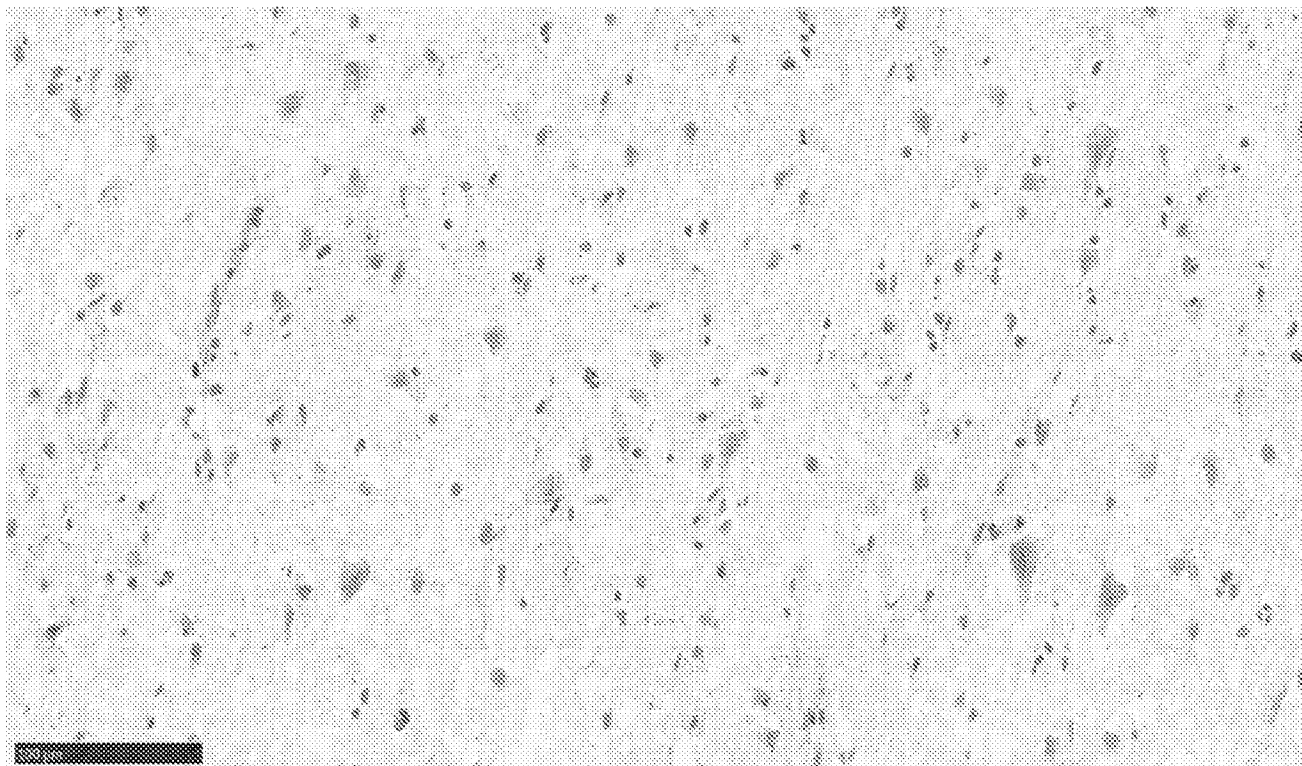
ФИГ. 3D

Мозг пациента с БА (04-33) – Контрольная сыворотка – Разведение 1:300



ФИГ. 3Е

Мозг пациента с БА (04-33) – Контрольная сыворотка – Разведение 1:300

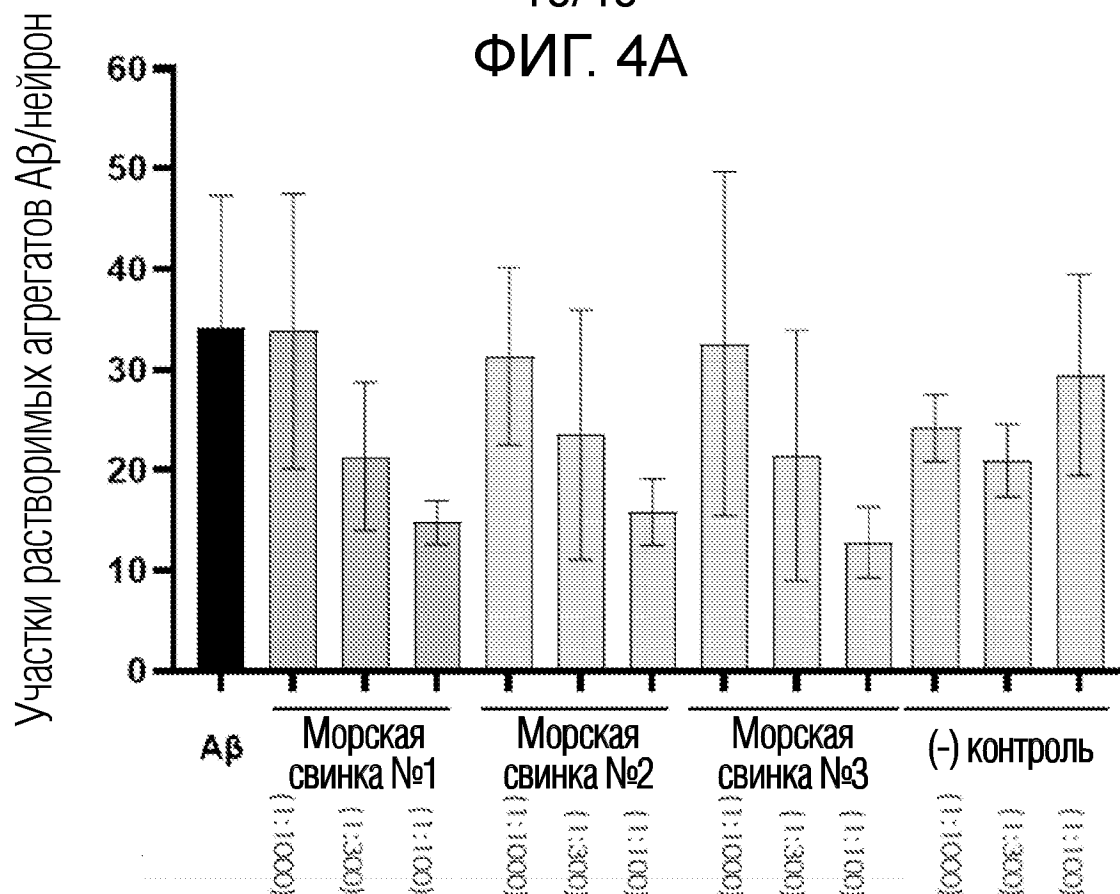


ФИГ. 3F

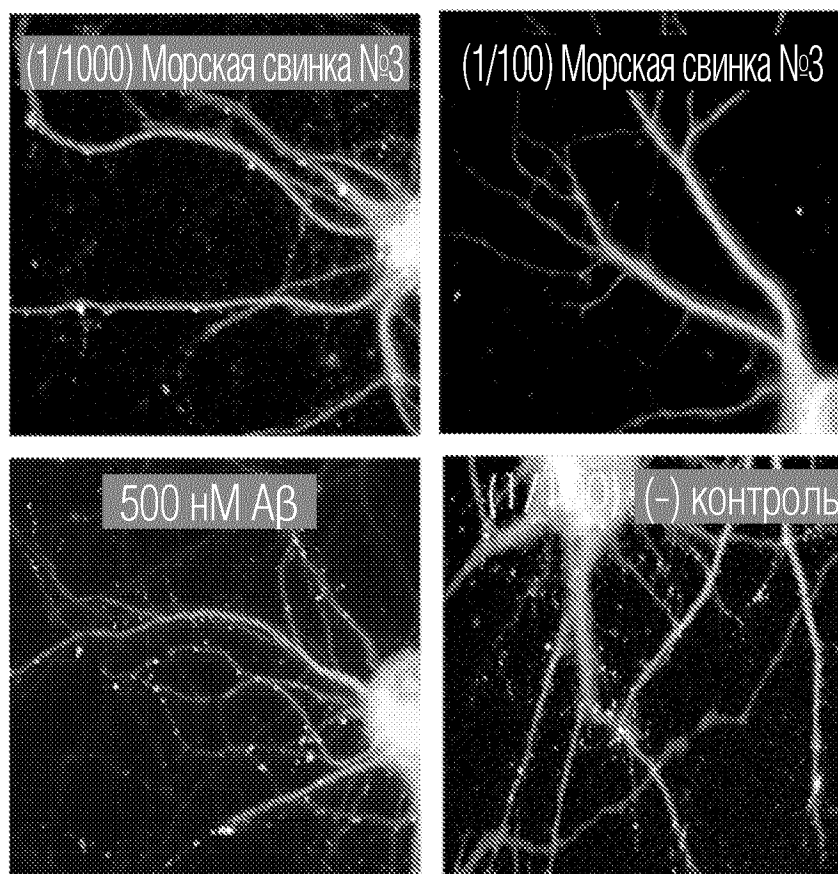
Мозг пациента с БА (04-33) – Контрольная сыворотка – Разведение 1:1500



10/40
ФИГ. 4А

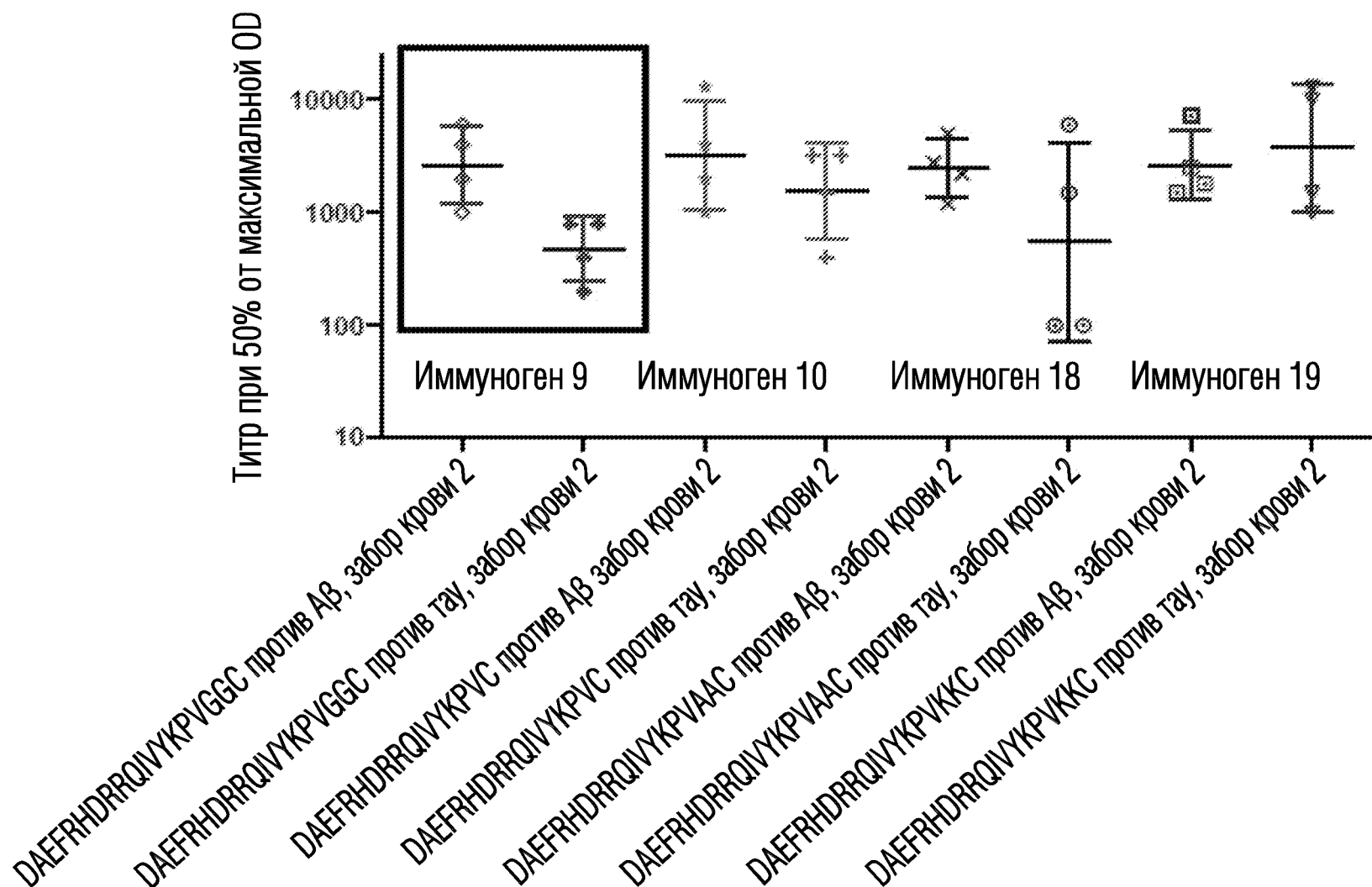


ФИГ. 4В



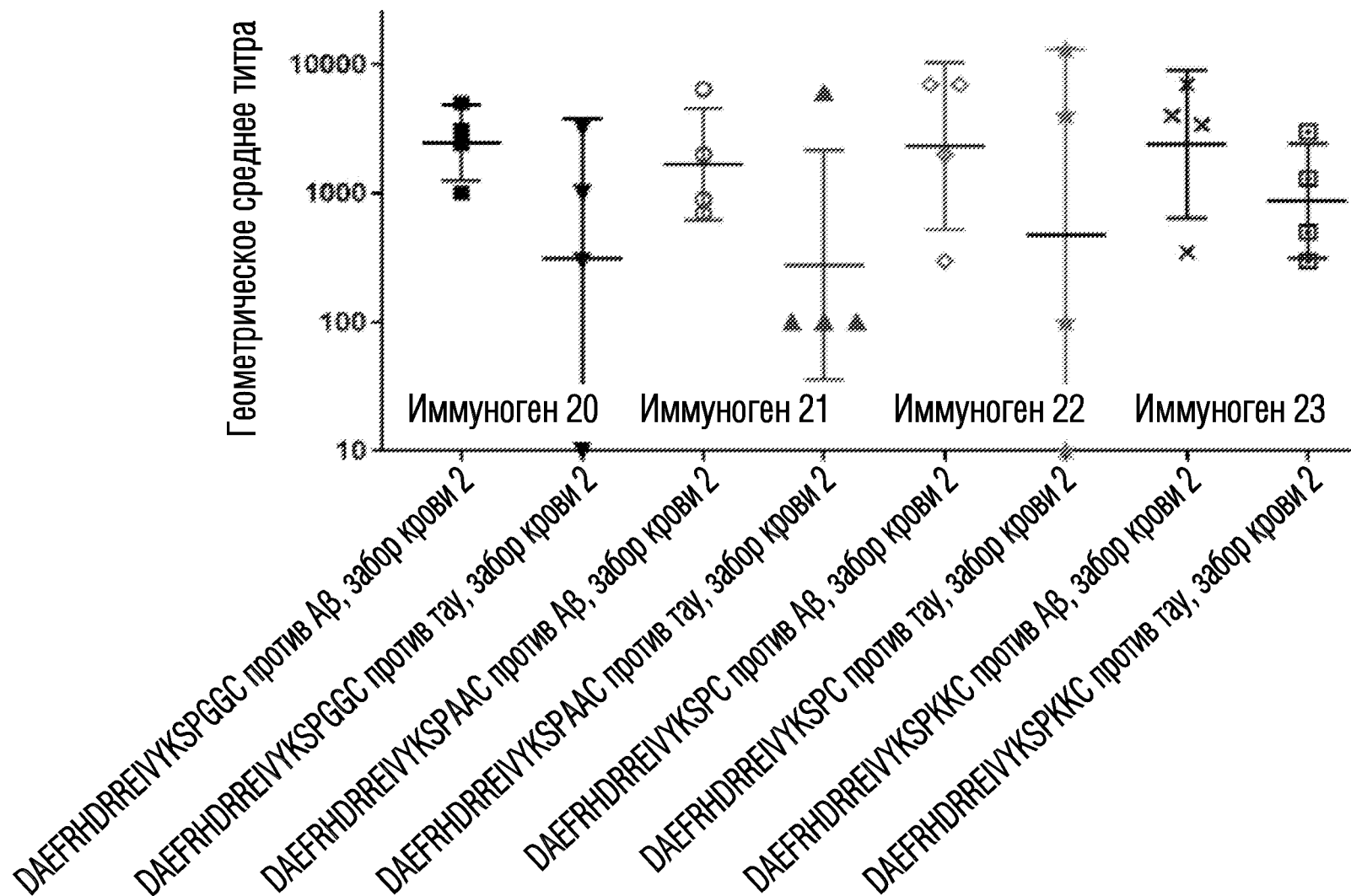
ФИГ. 5А

Титры против Аβ и тау с использованием различных линкеров в двойном иммуногене



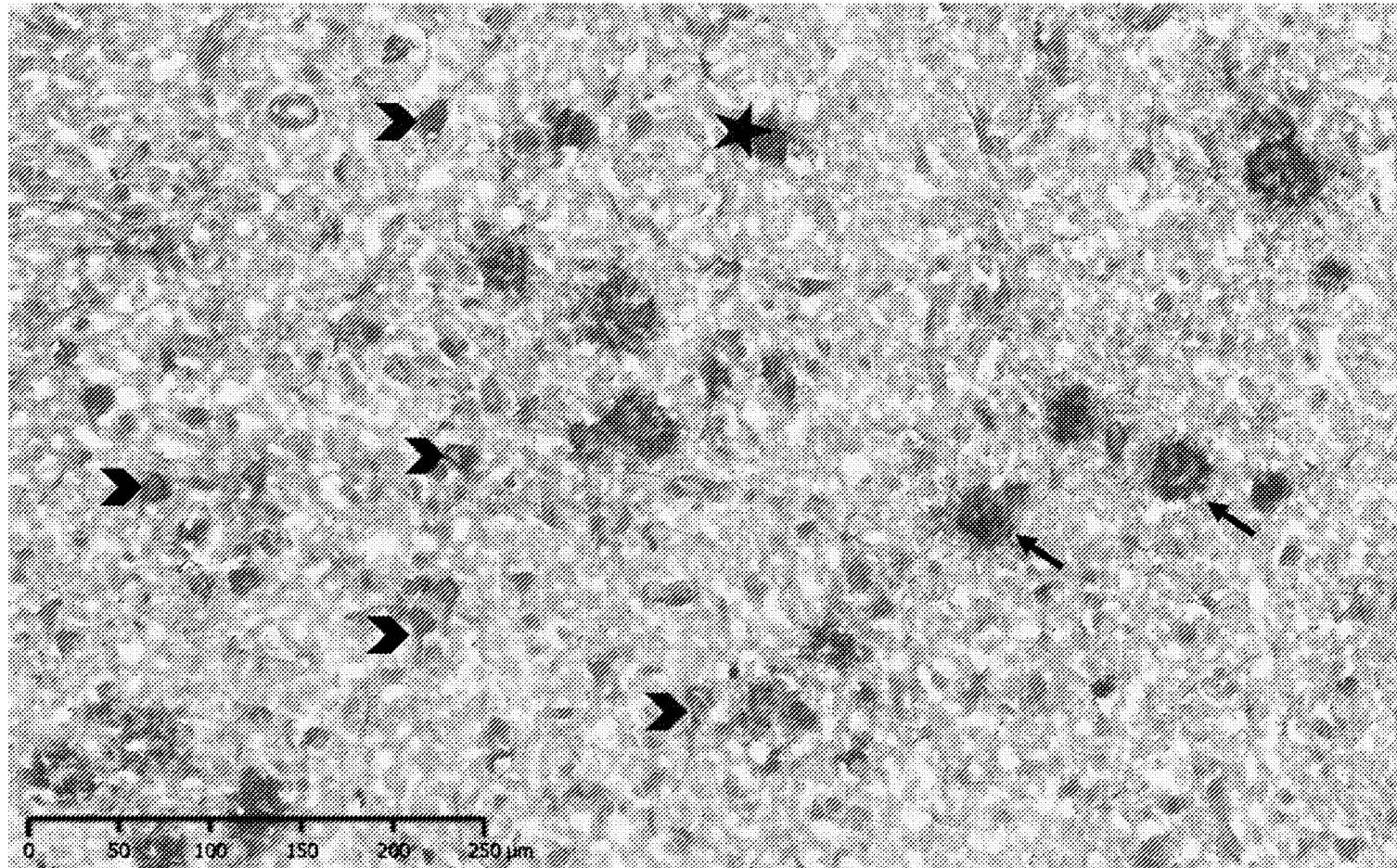
ФИГ. 5В

Титры против Аβ и тау с использованием различных линкеров в двойном иммуногене



ФИГ. 6А

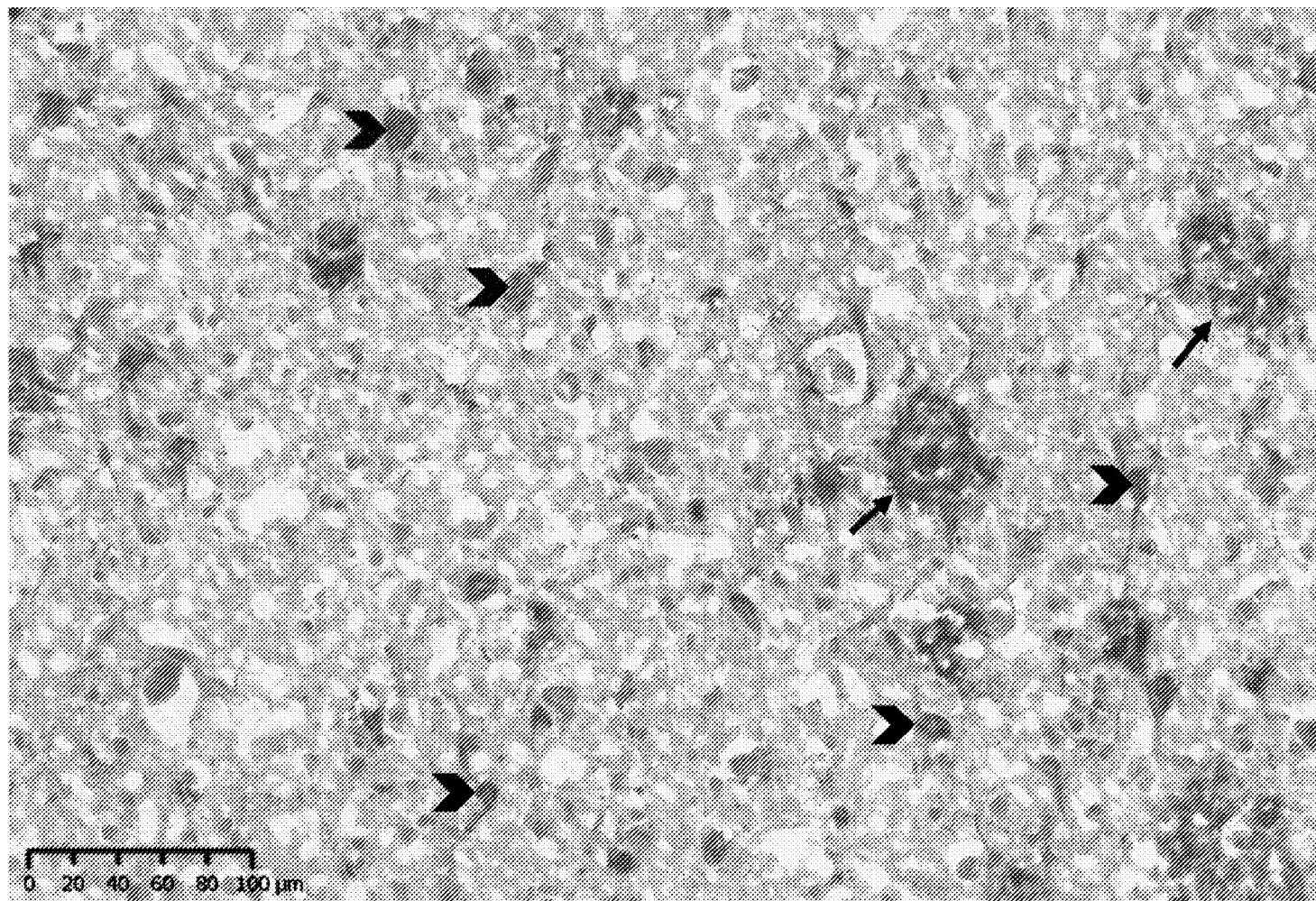
Иммуноген 19, мышь № 1, разведение 1:1000



Aβ →
Патологический тау ➤
Астроцит ★

ФИГ. 6В

Иммуноген 19, мышь № 3, разведение 1:1000

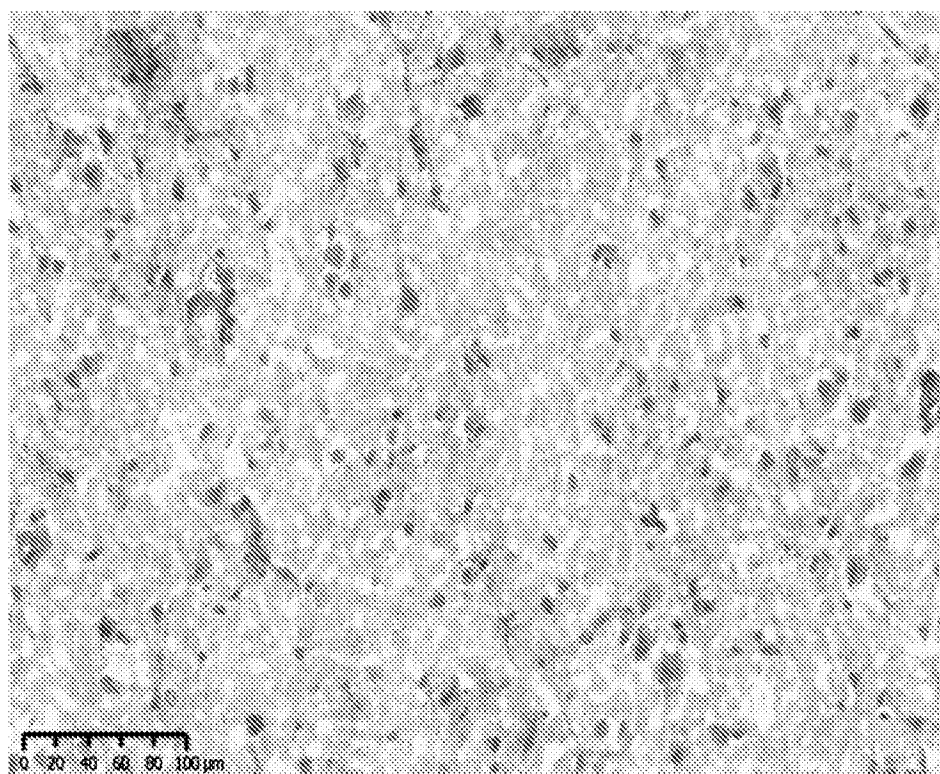
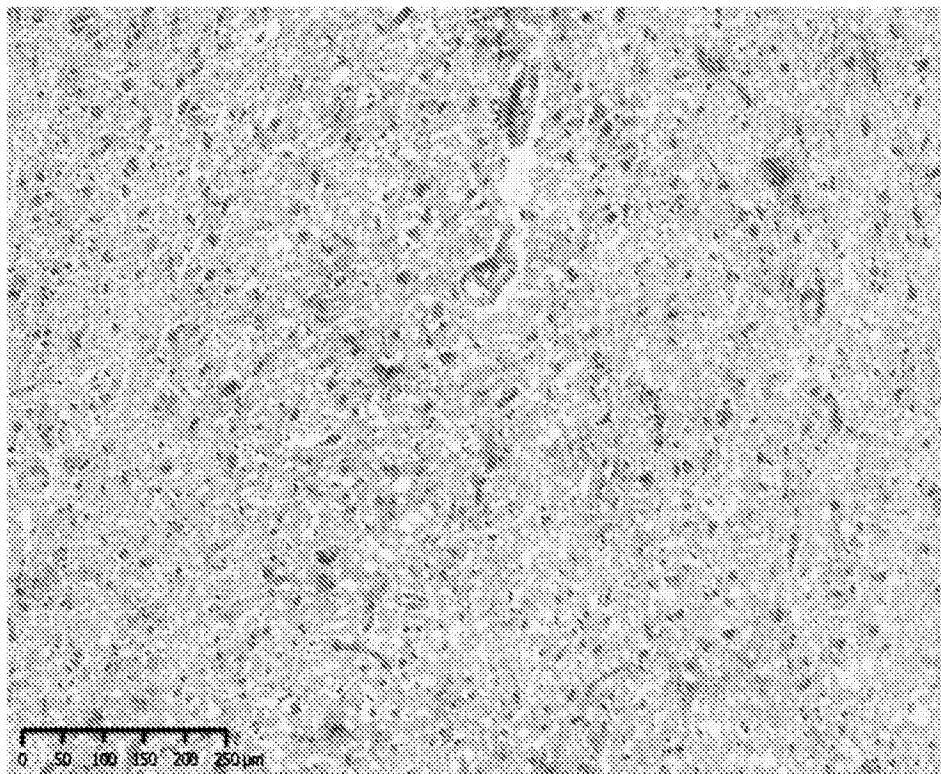


Ав →
Патологический тау ➤

15/40

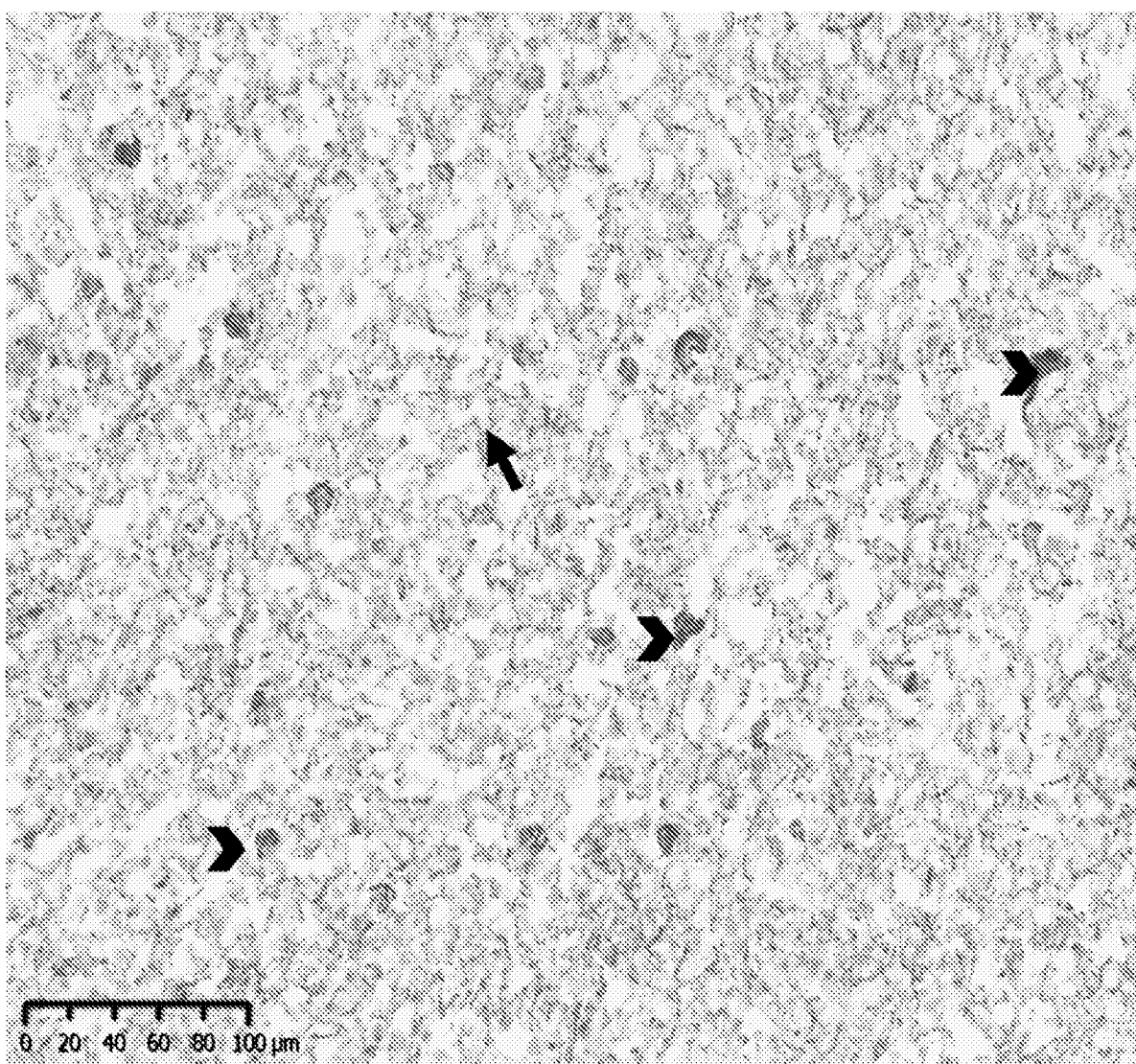
ФИГ. 6С

Отрицательный контроль — мышинная сыворотка — разведение 1:1000



ФИГ. 6D

Положительный контроль к тау – антитело m6H3 – 0,1 мкг/мл

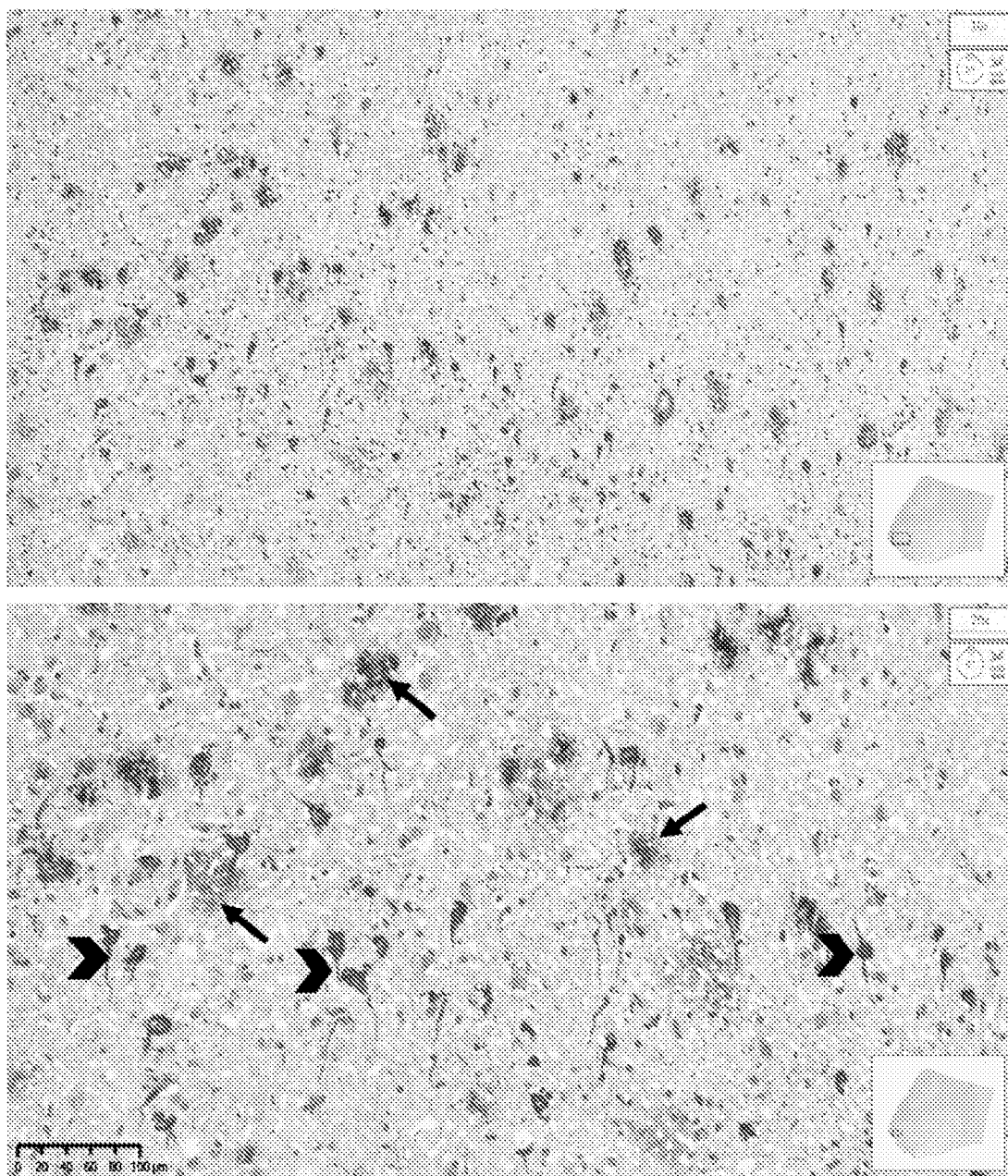


Патологический тау

17/40

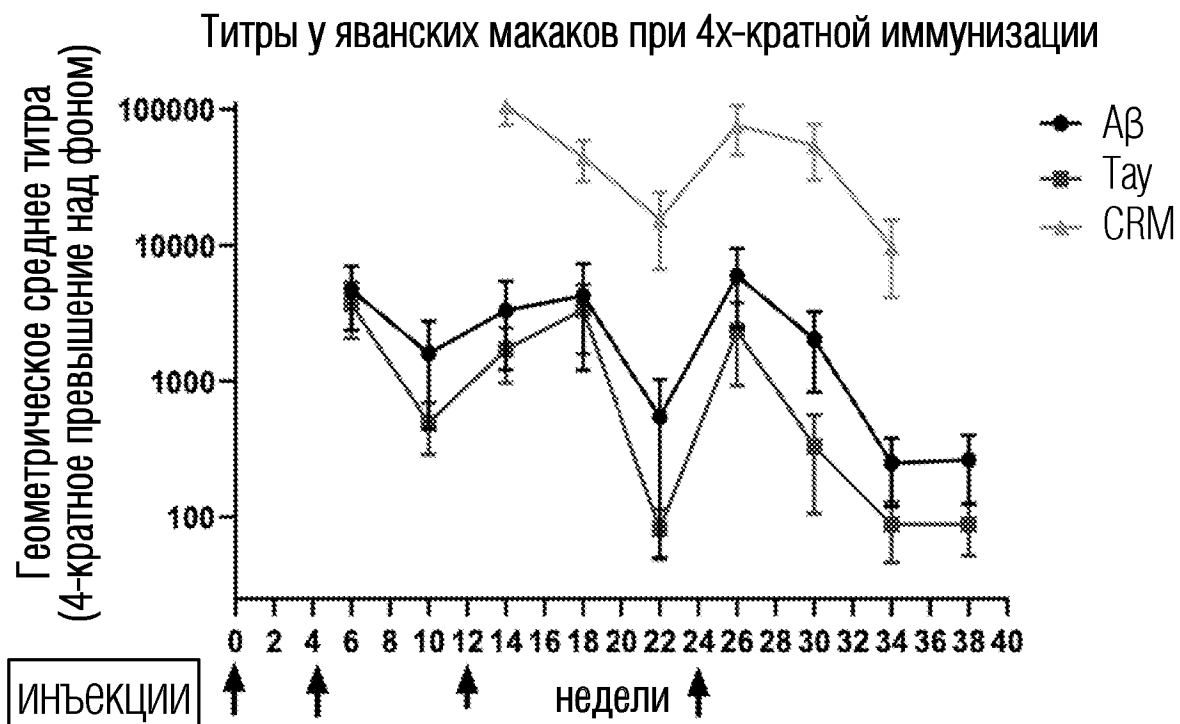
ФИГ. 6Е

Эталон: сыворотка морской свинки, вакцинированной иммуногеном 9
Вакцинированная морская свинка № 2 — разведение 1:300



Aβ →
Tay ➤

ФИГ. 7А

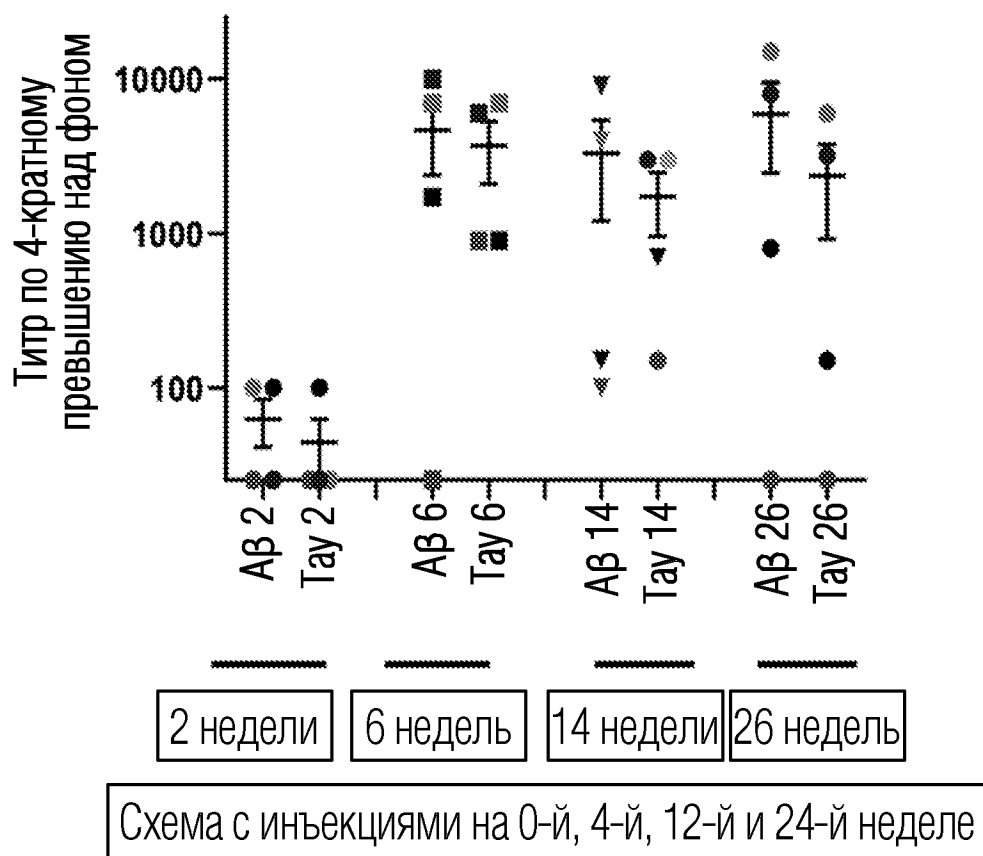


ФИГ. 7В



ФИГ. 8А

Титры в динамике при 4-кратной иммунизационной схеме 1



ФИГ. 8В

Титры в динамике при 3-кратной иммунизационной схеме 2

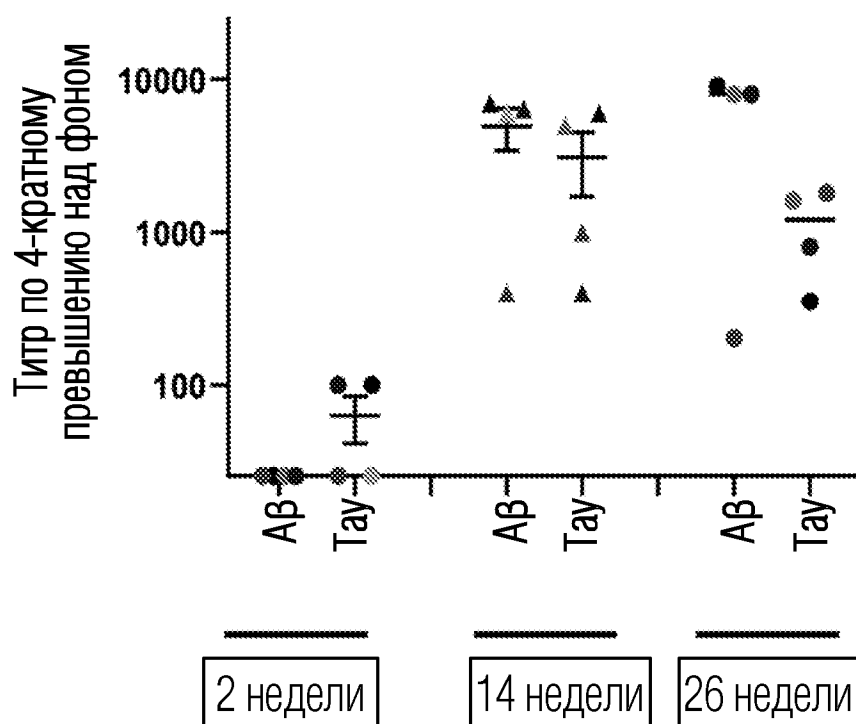
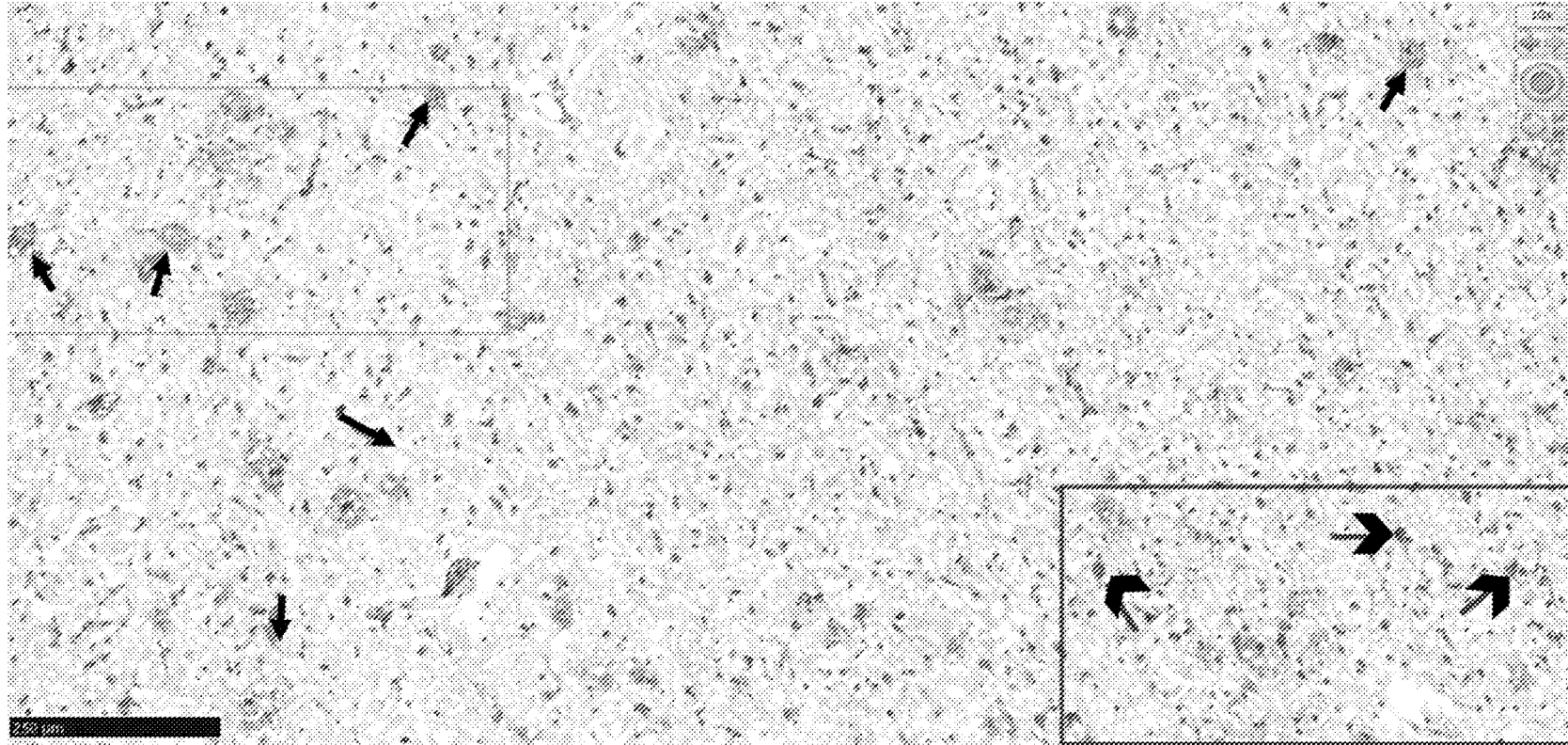


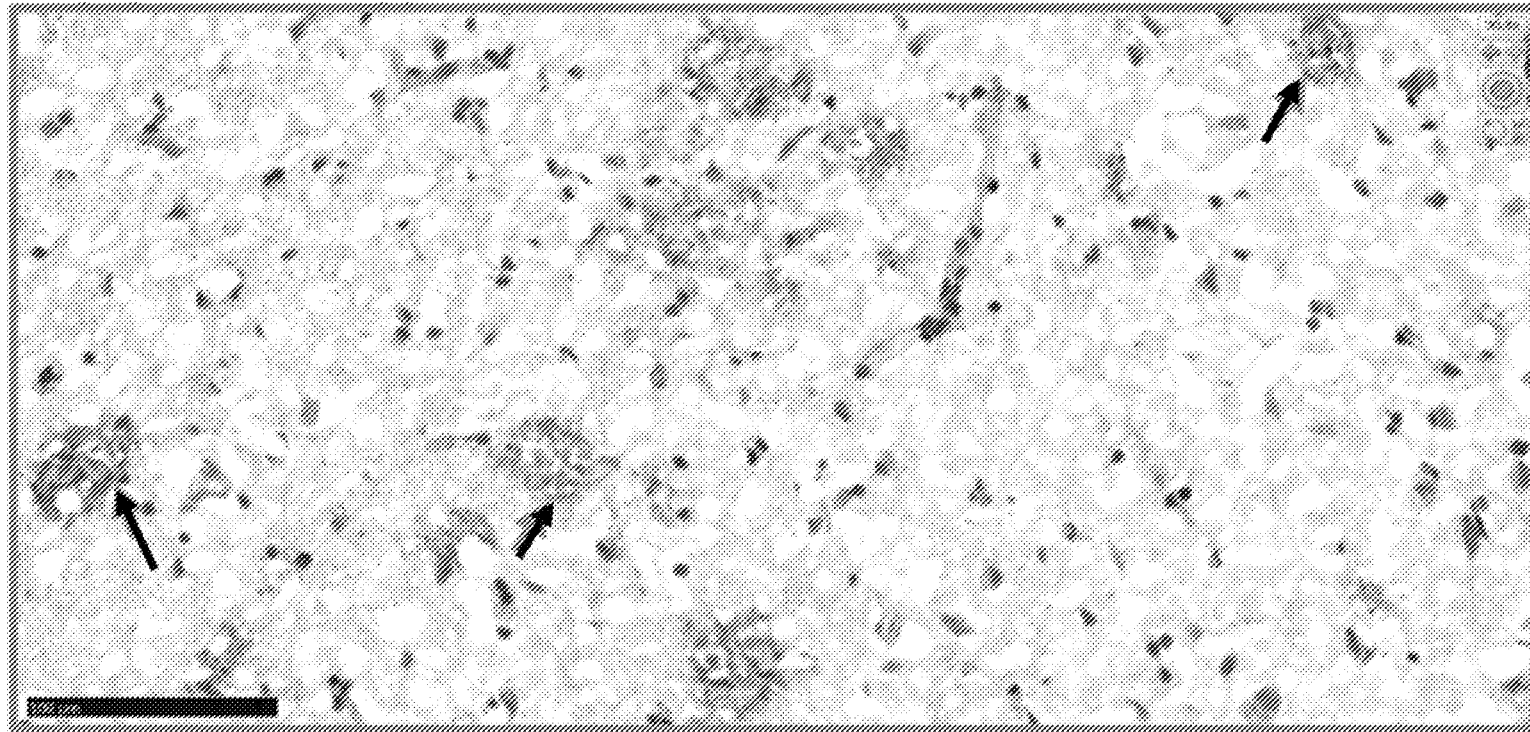
Схема с инъекциями на 0-й, 8-й и 24-й неделе

ФИГ. 9А



$A\beta$ →
 T_{ay} ➤

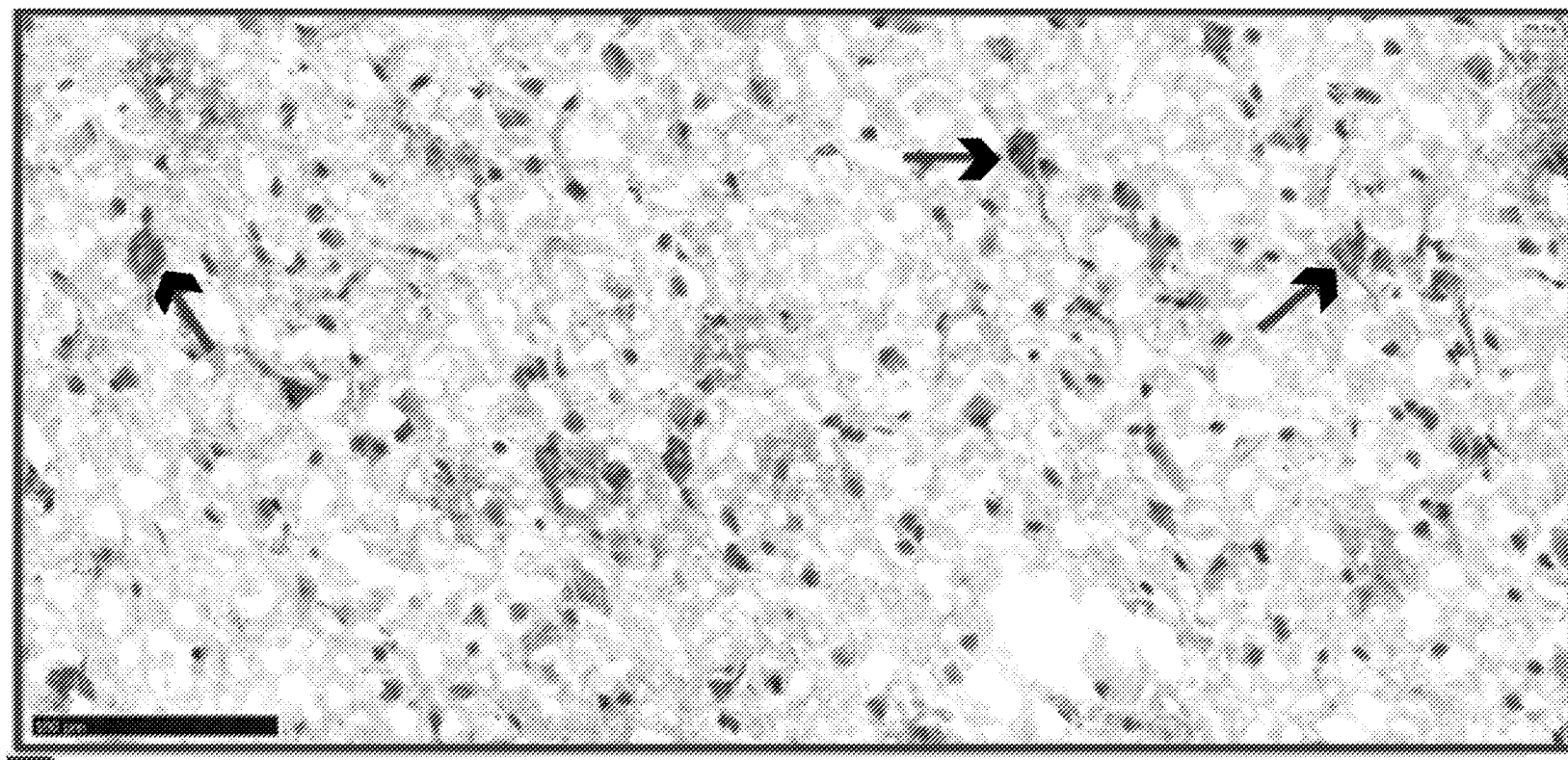
ФИГ. 9В



Aβ →

Патологический Aβ

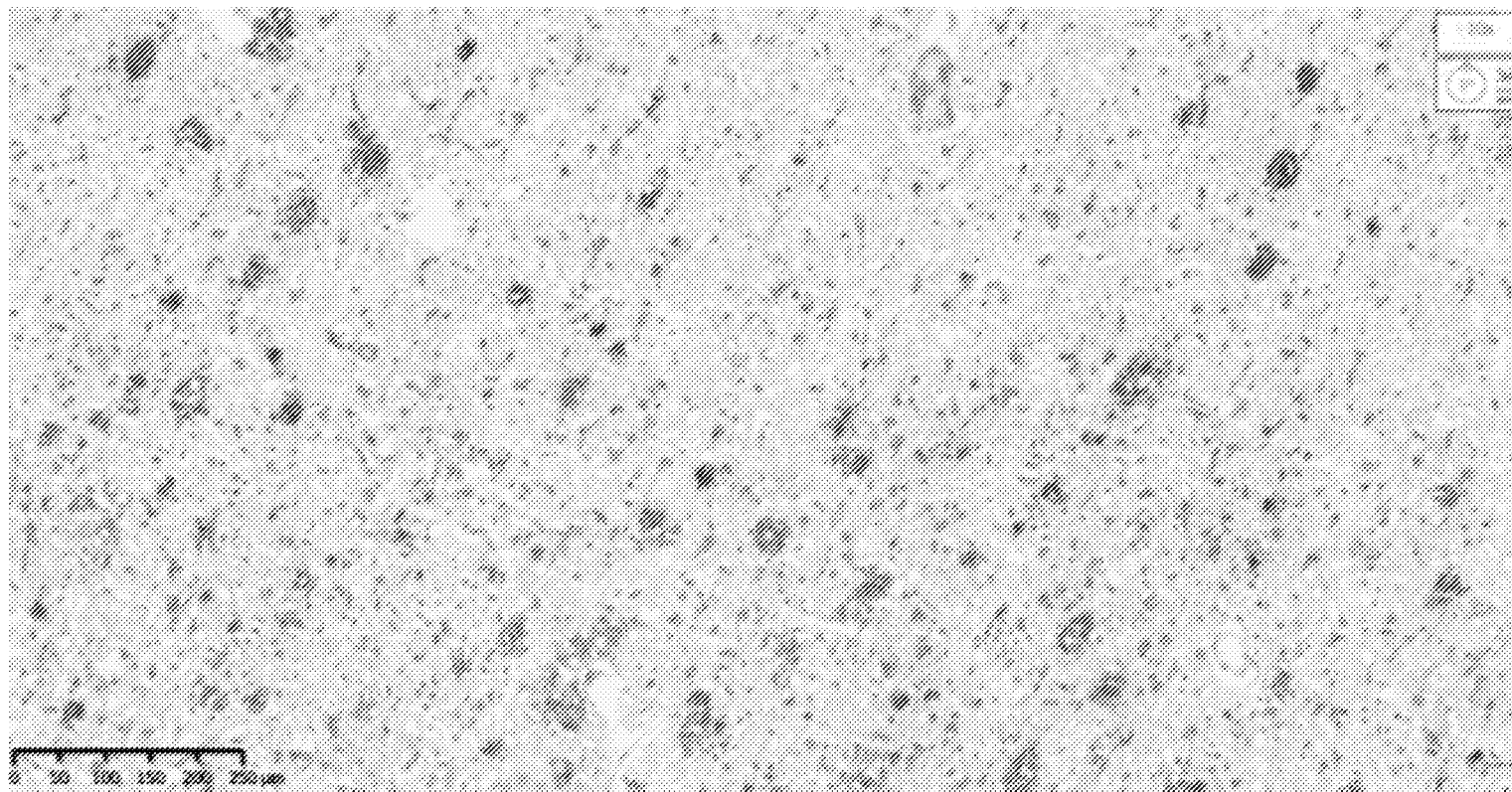
ФИГ. 9С



Тау ➤

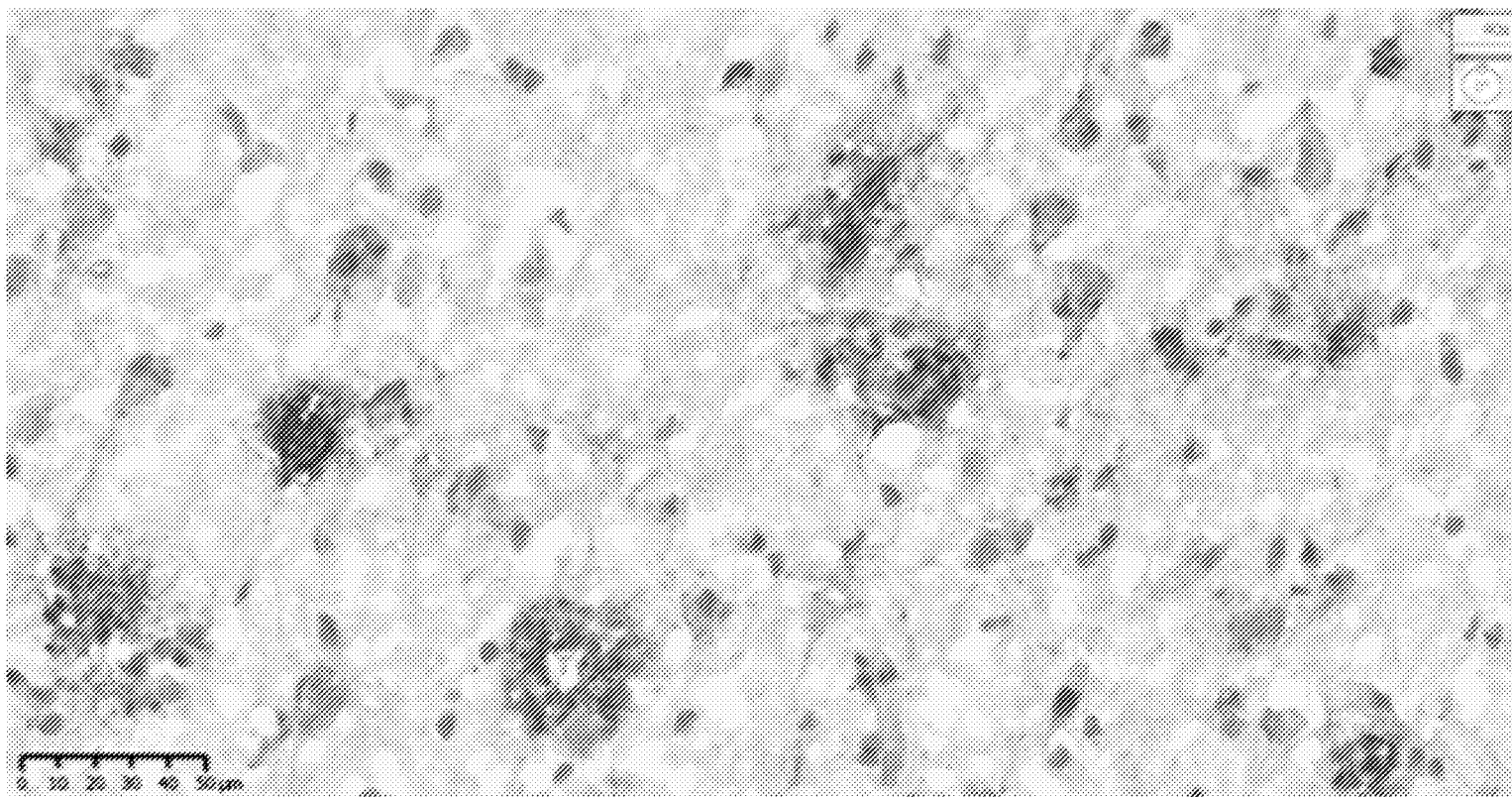
Патологический тау

ФИГ. 10А

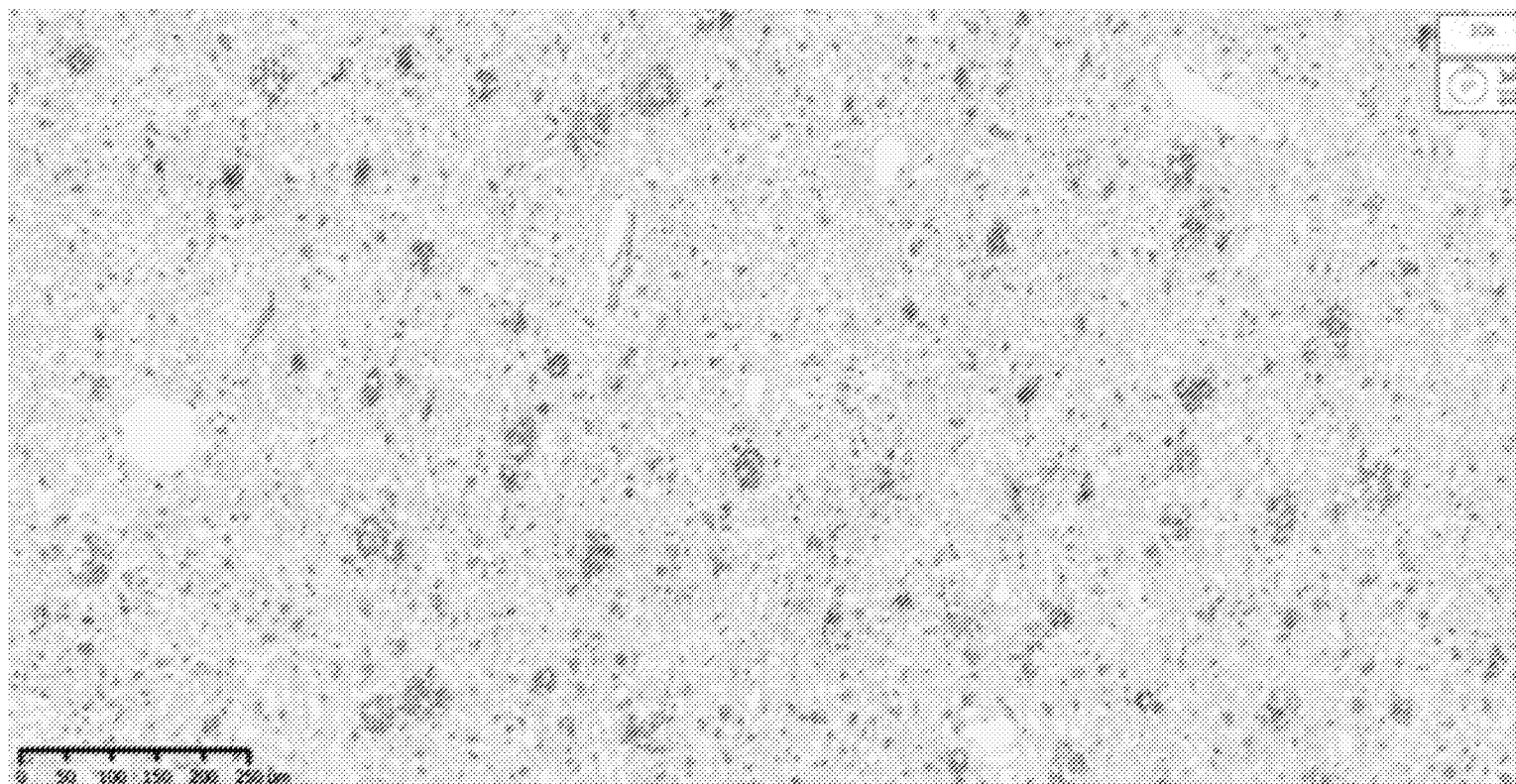


ФИГ. 10В

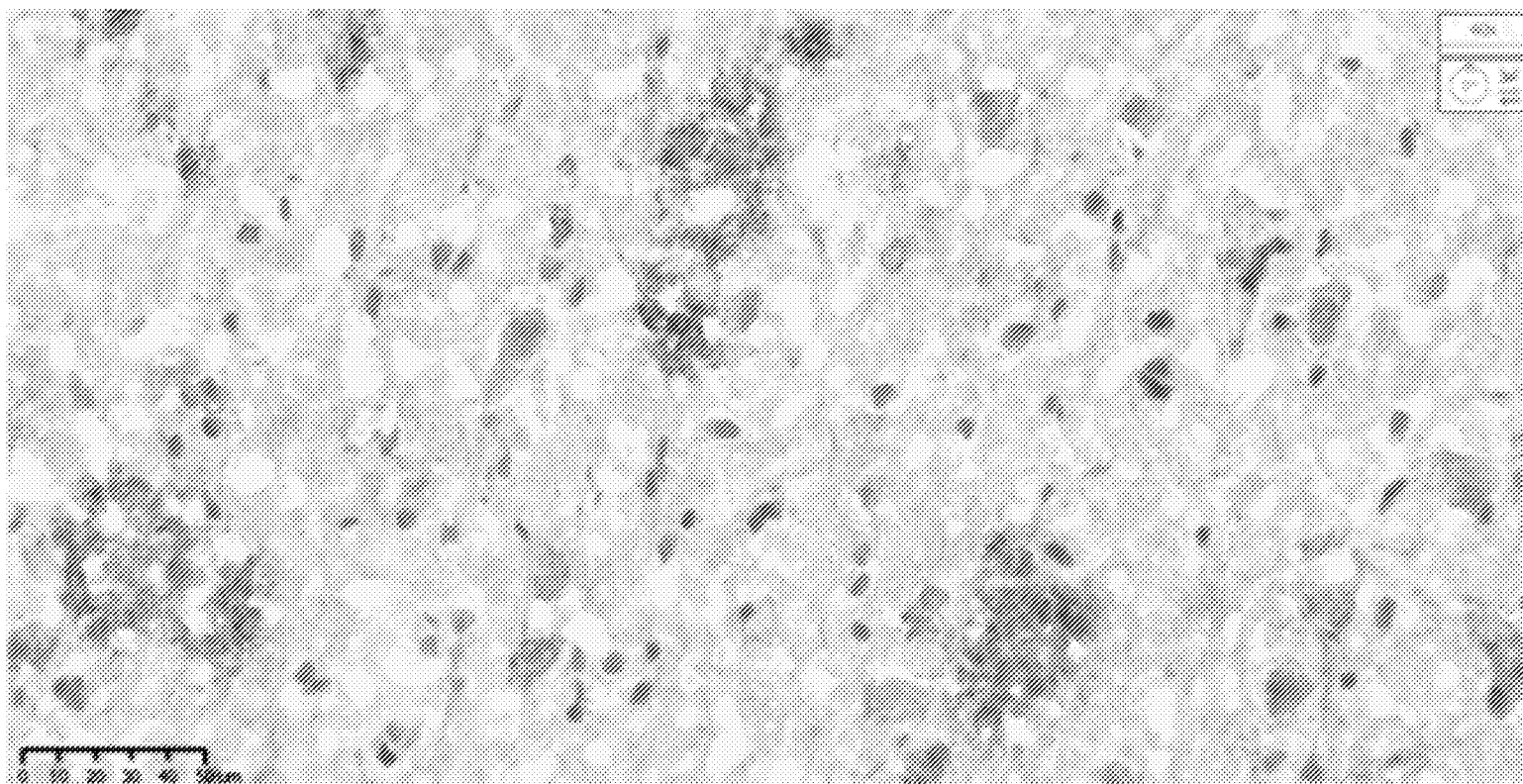
Слабое окрашивание патологического тау



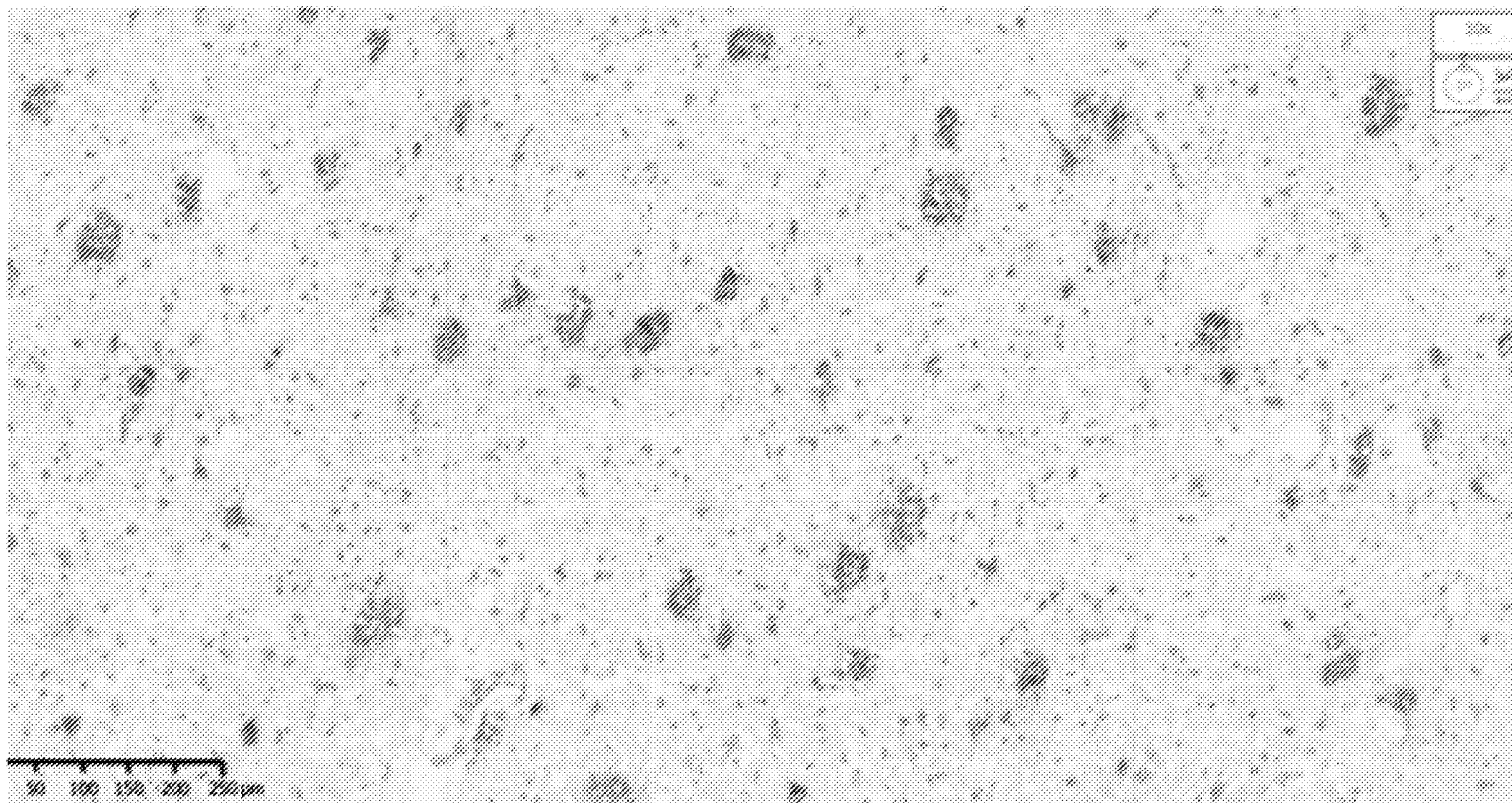
ФИГ. 11А



ФИГ. 11В

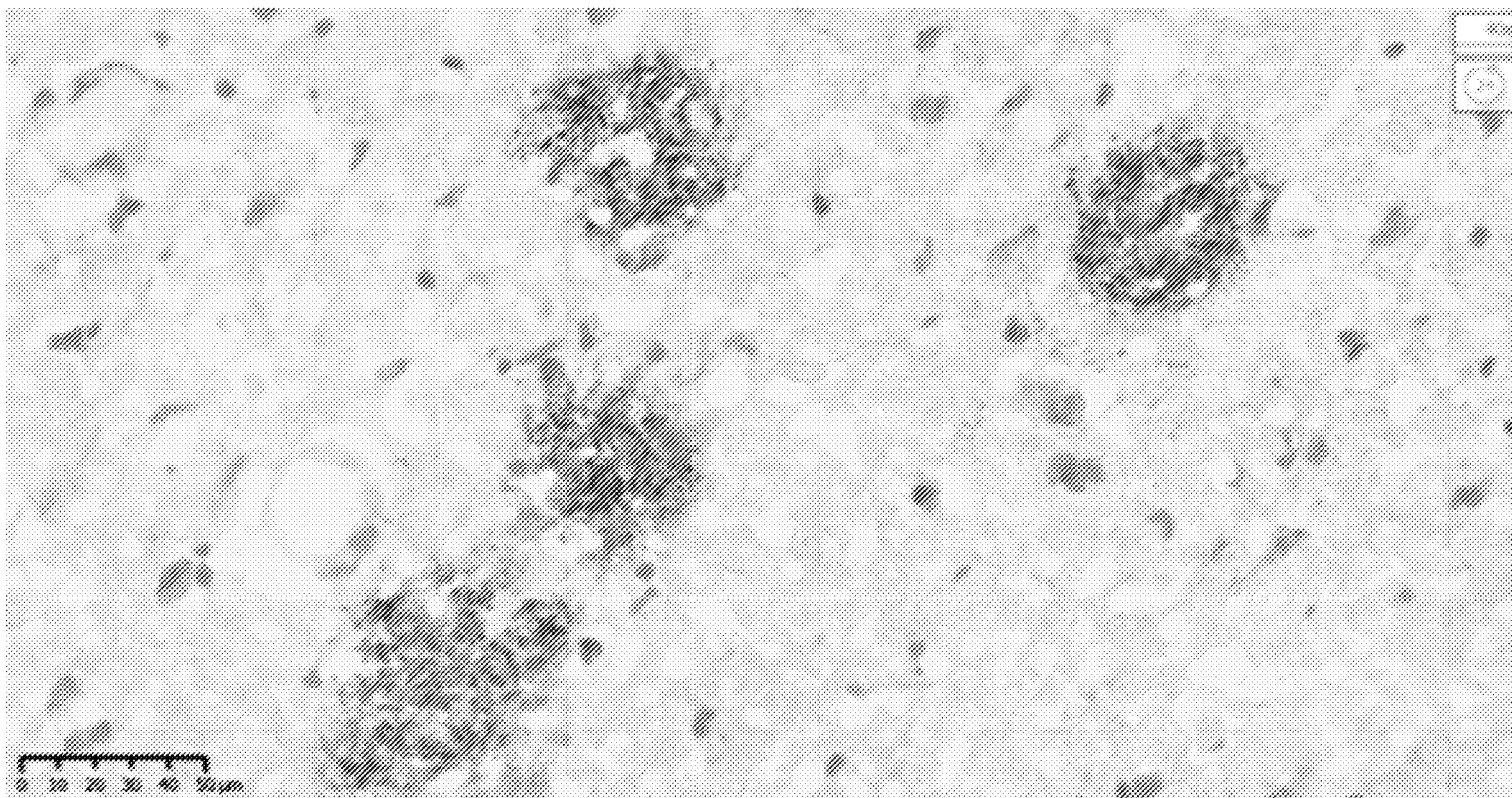


ФИГ. 12А



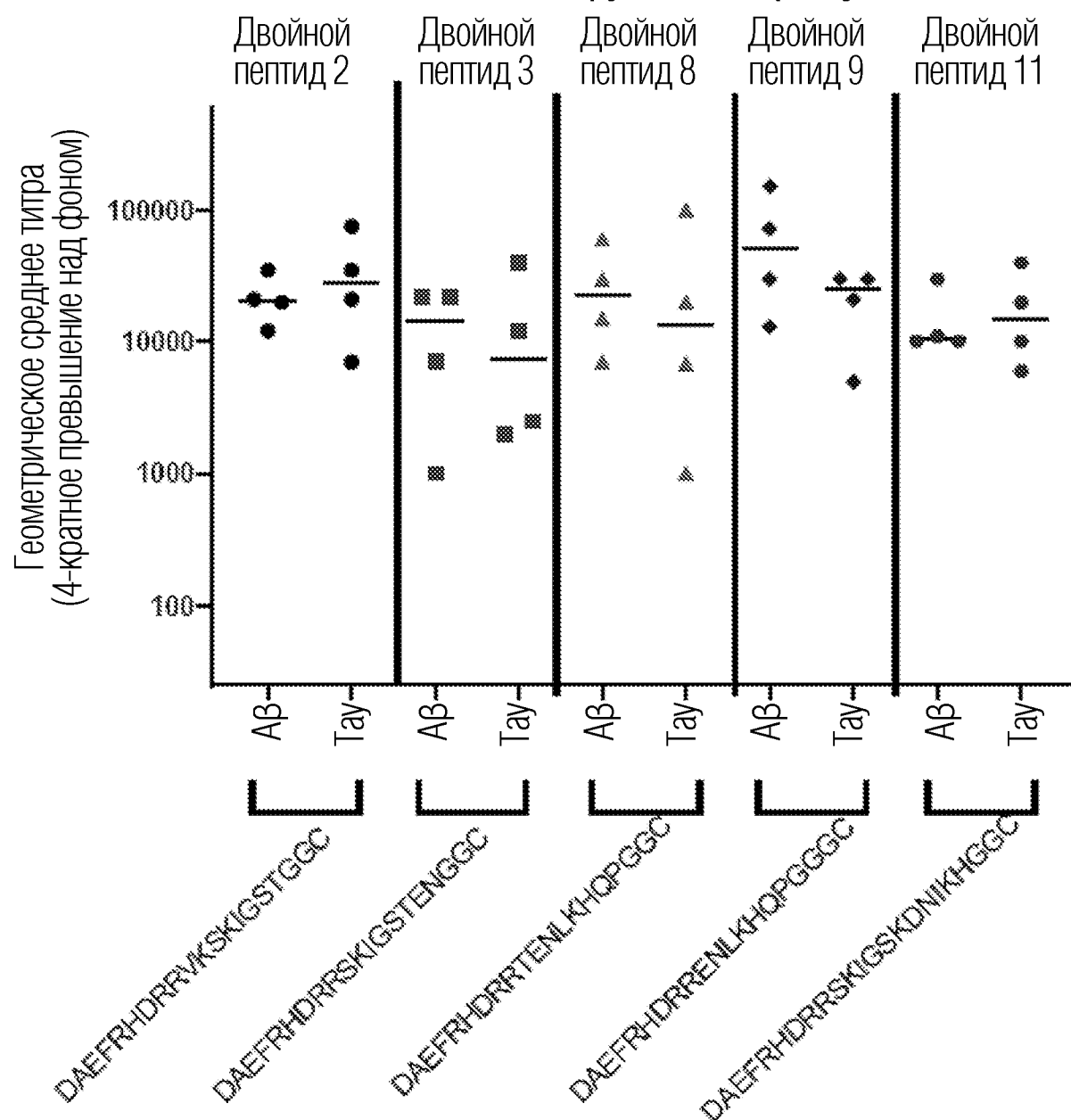
ФИГ. 12В

Нет окрашивания патологического тау



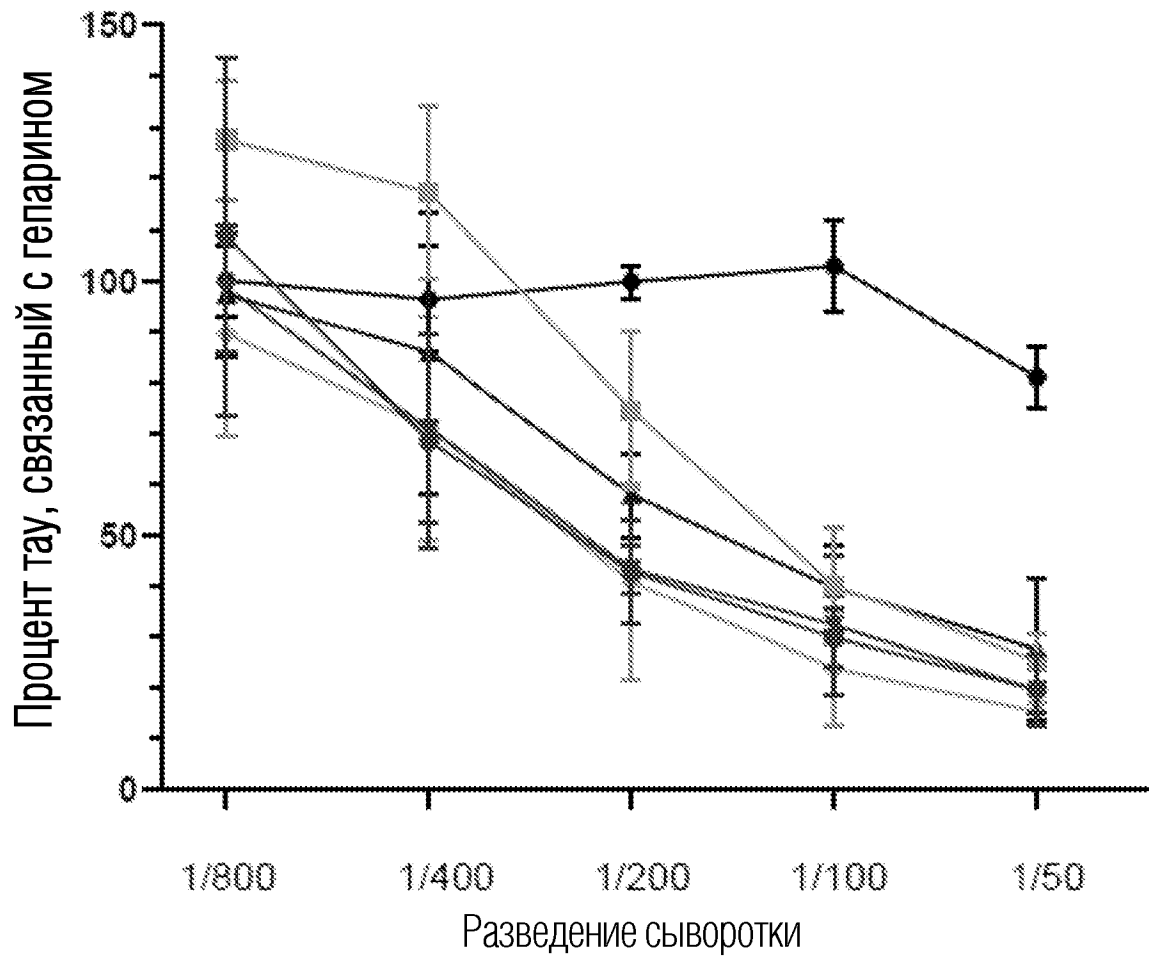
ФИГ. 13

Терминальный забор крови после иммунизации
двойными конструкциями A β -tau



ФИГ. 14

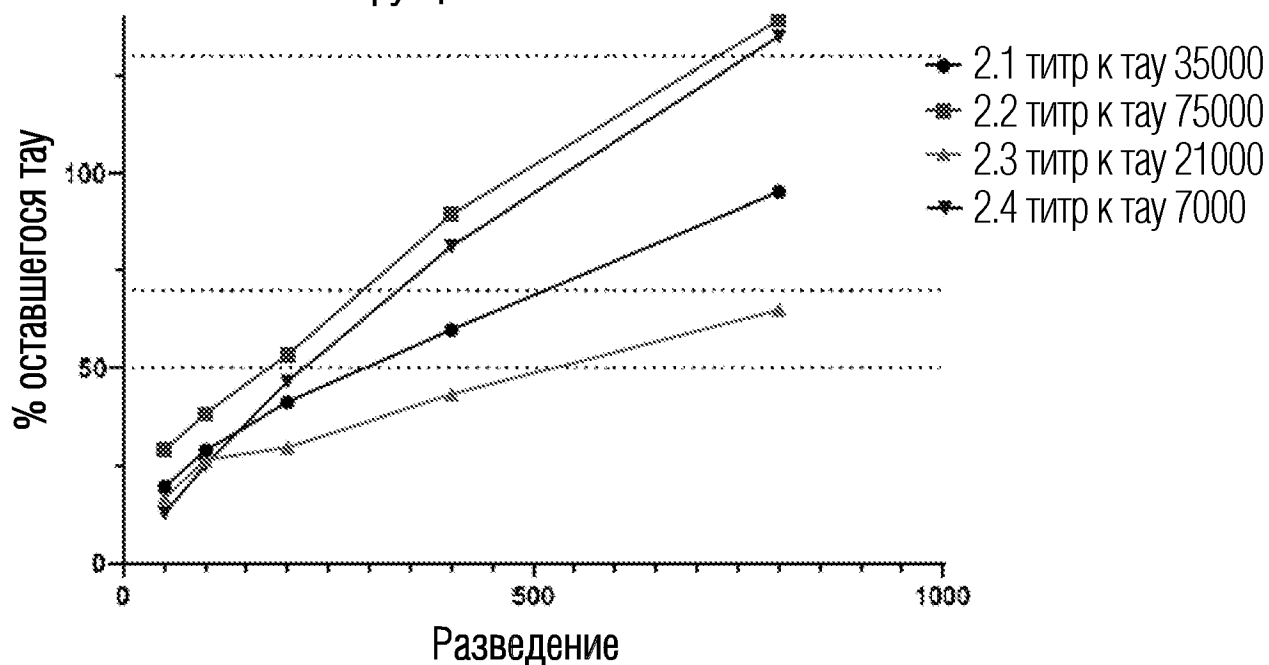
Конкурентное связывание сыворотки с тау



- DAEFRHDDR RVKSKIGSTGGC
- DAEFRHDDR RSKIGSTENGGC
- DAEFRHDDR RTENLKHQPGGC
- DAEFRHDDR RENLKHQPGGGC
- DAEFRHDDR RSKIGSKDNIKHGGC
- Отрицательный контроль

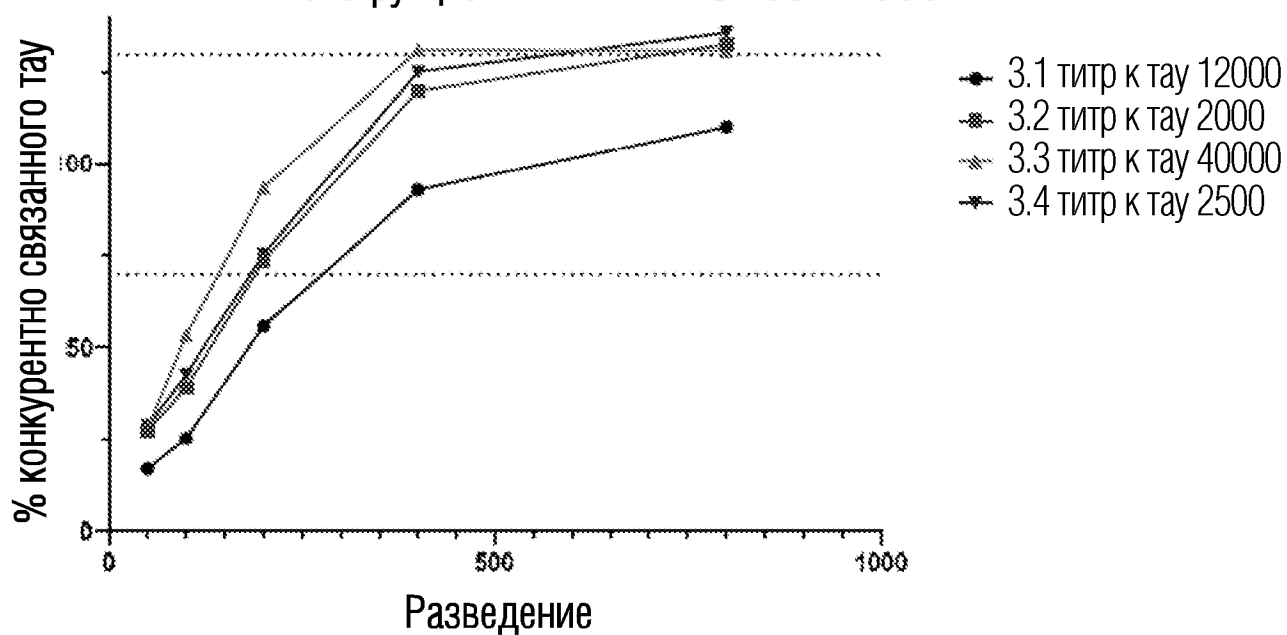
ФИГ. 15А

Конкурентное связывание с тау сыворотки, полученной при иммунизации
конструкцией DAEFRHDDRVRKSKIGSTGGC



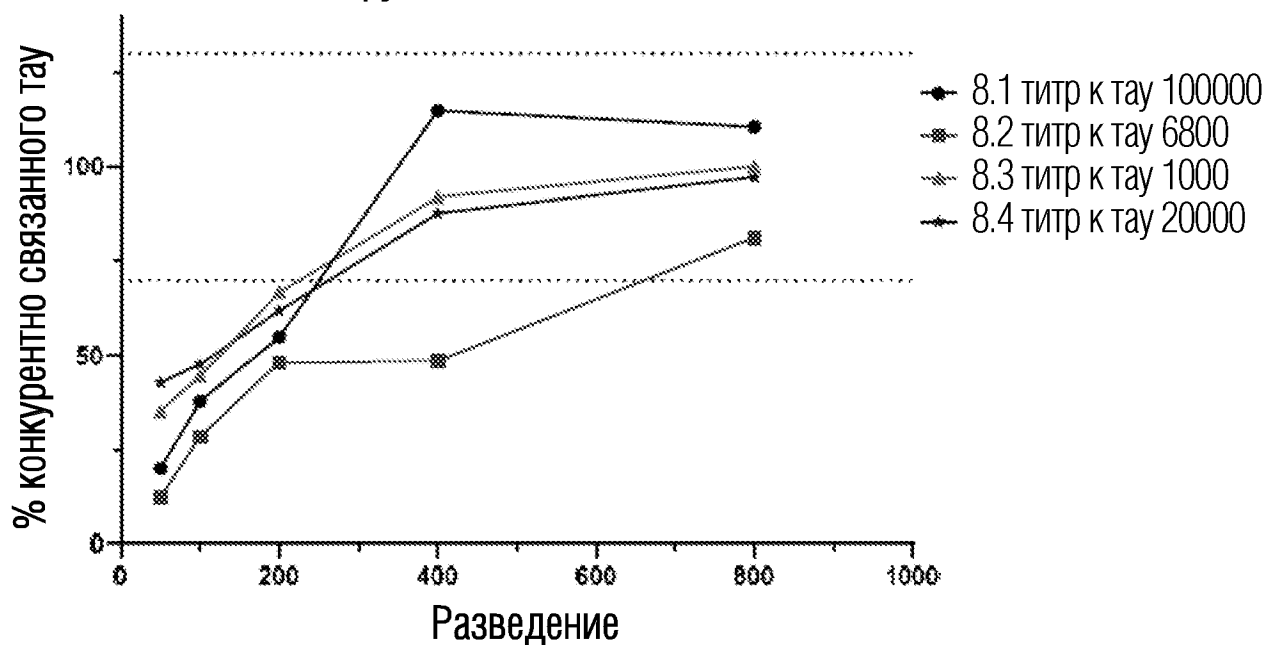
ФИГ. 15В

Конкурентное связывание с тау сыворотки, полученной при иммунизации
конструкцией DAEFRHDDRISKIGSTENGGC



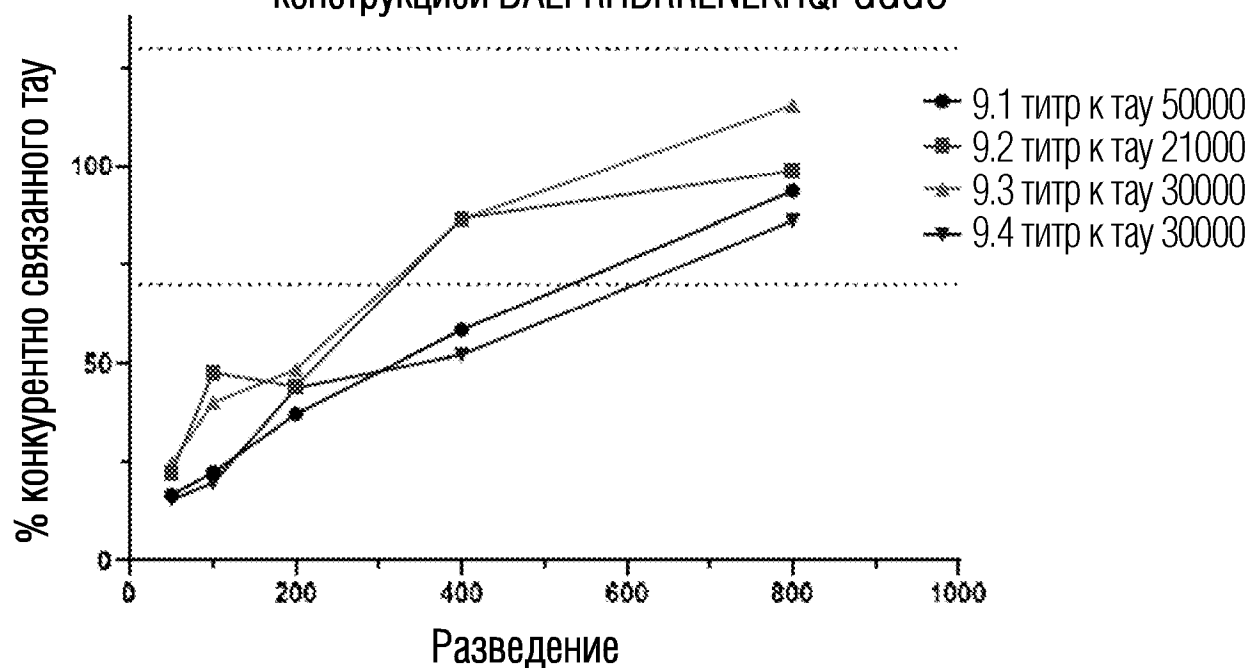
ФИГ. 15С

Конкурентное связывание с тау сыворотки, полученной при иммунизации конструкцией DAEFRHDDRRTENLKHQPGGC



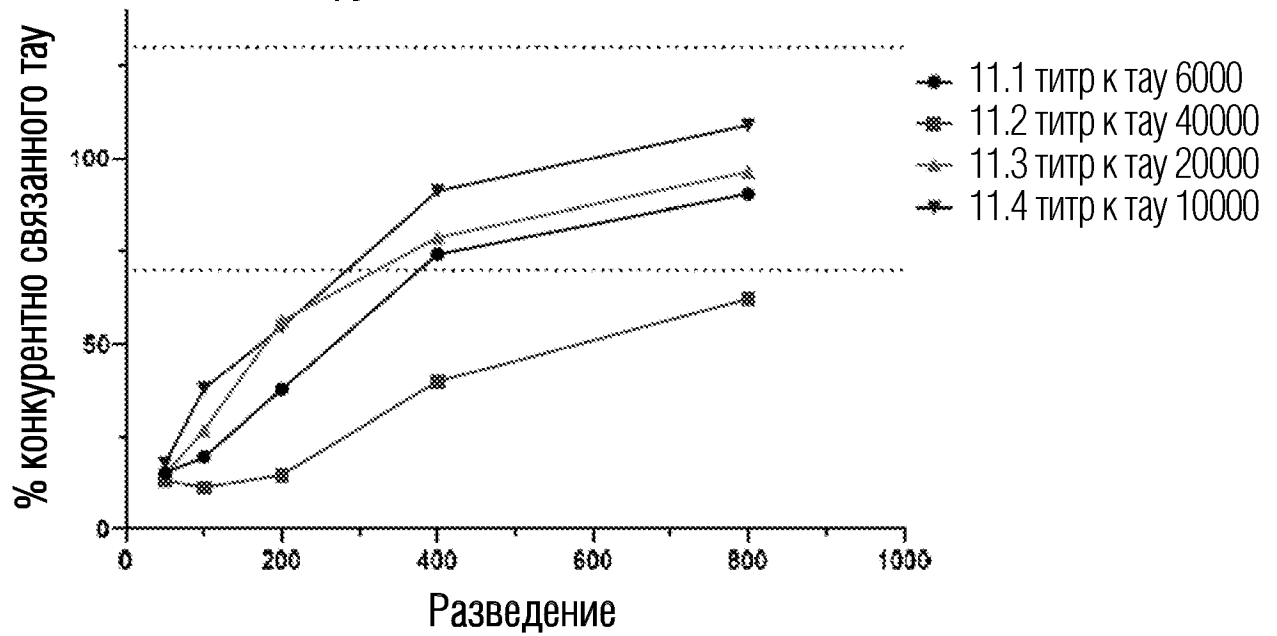
ФИГ. 15D

Конкурентное связывание с тау сыворотки, полученной при иммунизации конструкцией DAEFRHDDRRENLKHQPGGC



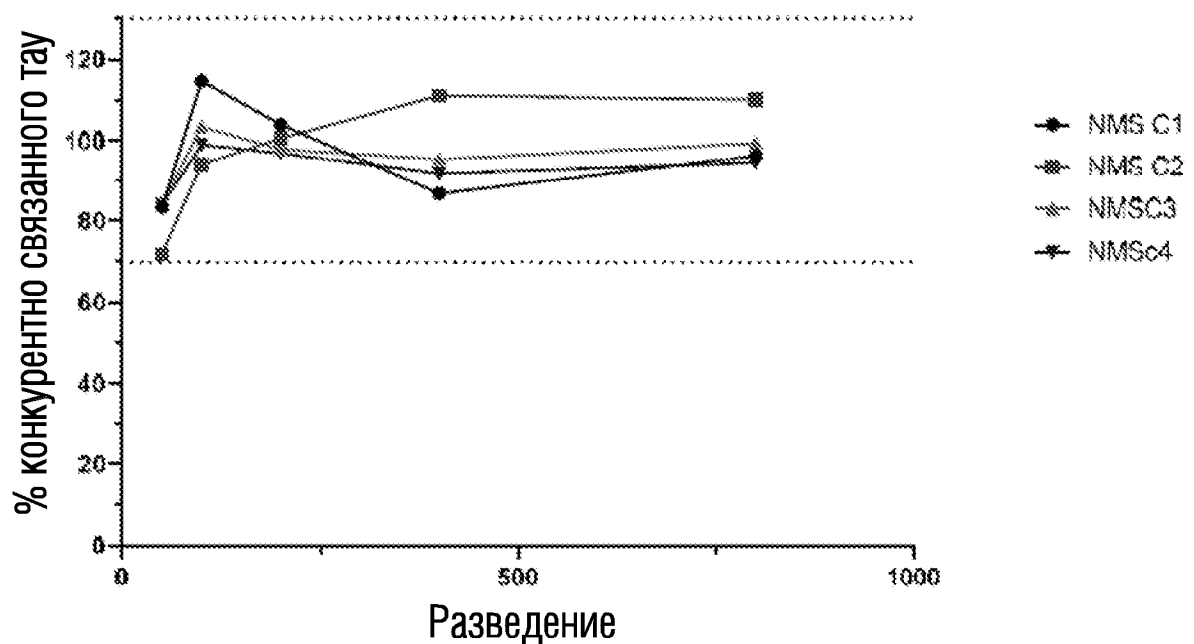
ФИГ. 15Е

Конкурентное связывание с тау сыворотки, полученной при иммунизации конструкцией DAEFRHRRRSKIGSKDNIKHGGS



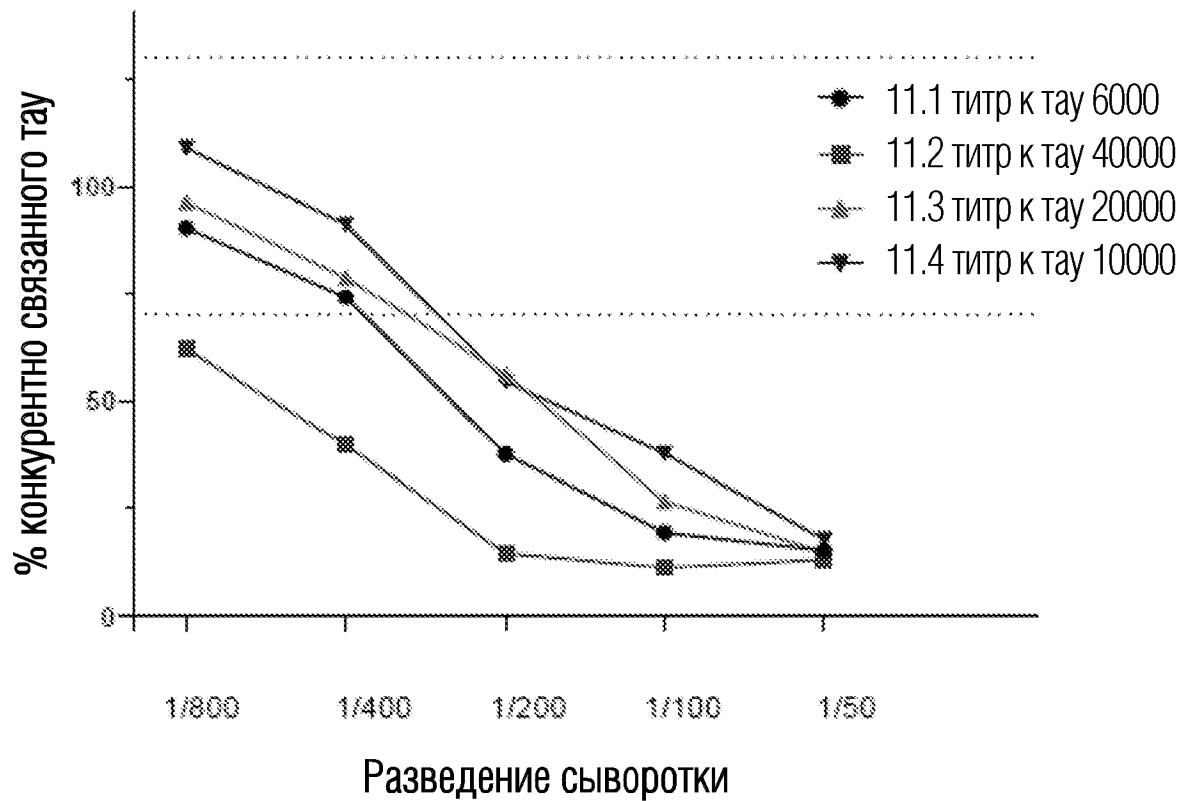
ФИГ. 15F

Контроли на гепариновом планшете

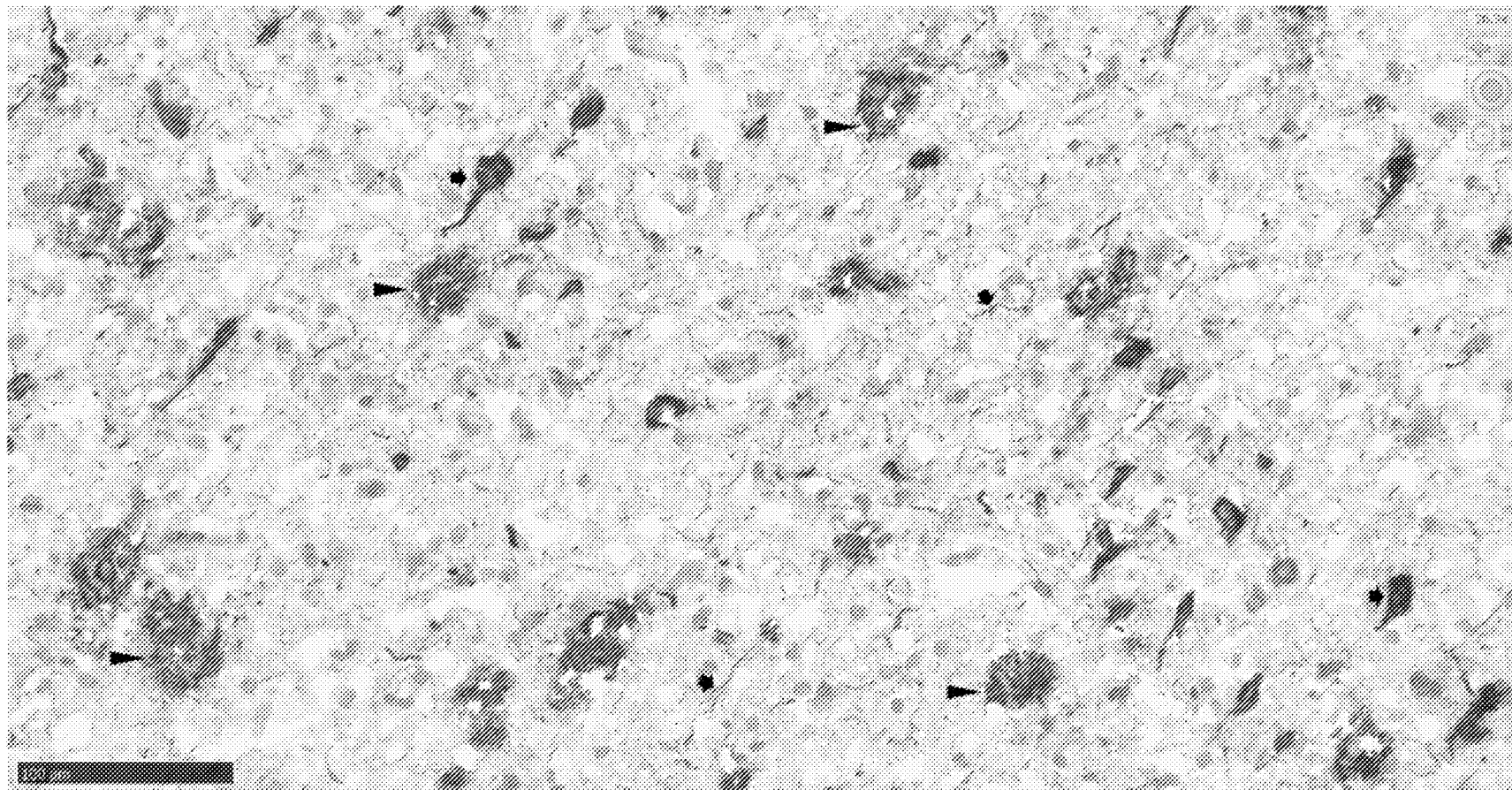


ФИГ. 15G

Конкурентное связывание с тау сыворотки, полученной при иммунизации
конструкцией DAEFRHRRRSKIGSKDNIKHHGGC



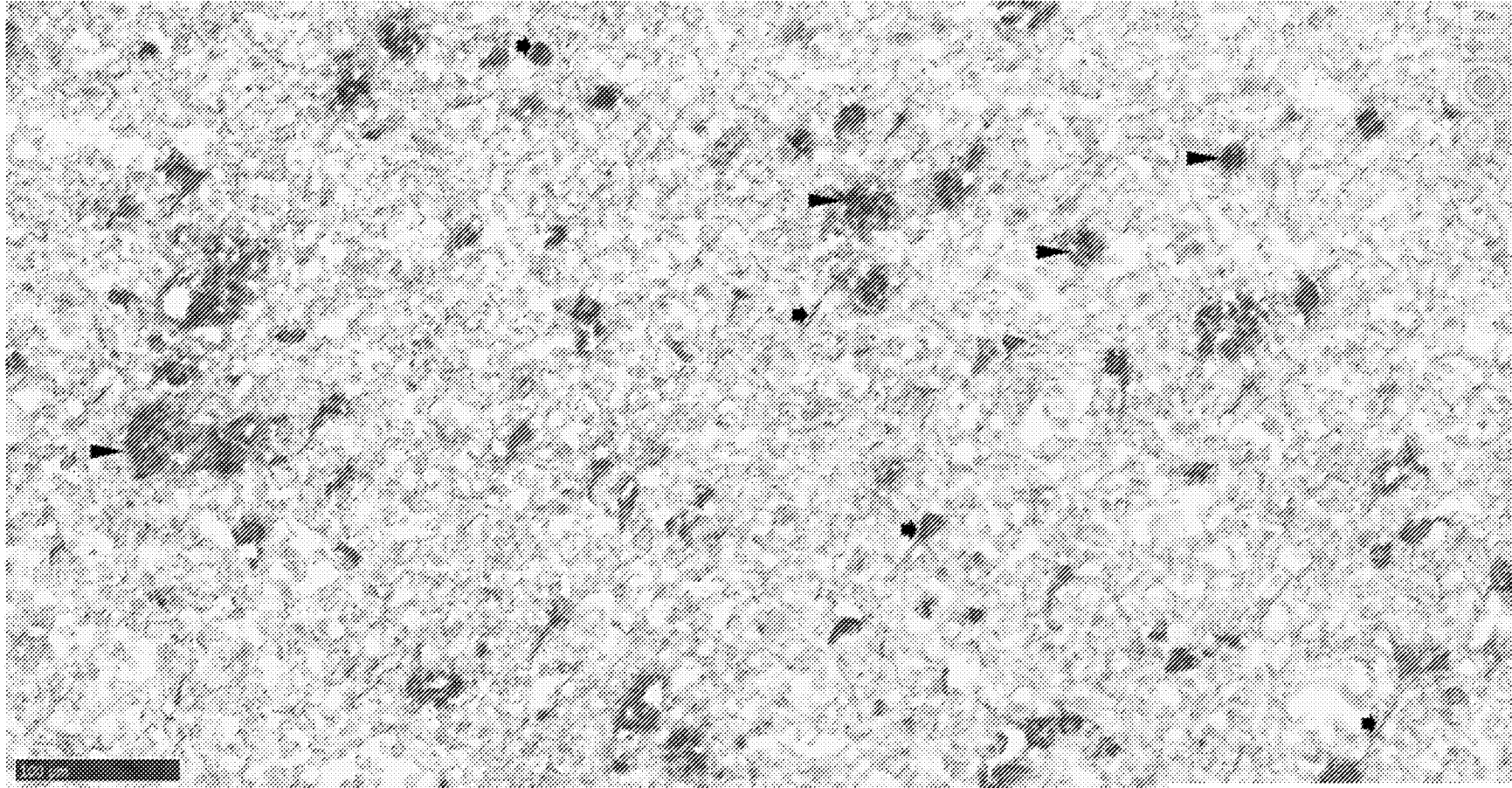
ФИГ. 16А



Окрашивание мышинной сывороткой в разведении 1:300 после
иммунизация двойной вакциной Aβ/tau (сыворотка 2.3_031521)
Пример окрашивания при иммунизации с использованием
DAEFRHDDRVRKSKIGSTGGC

- ▶ Патологический Aβ
- Патологический tau
(распространен в нейритах)

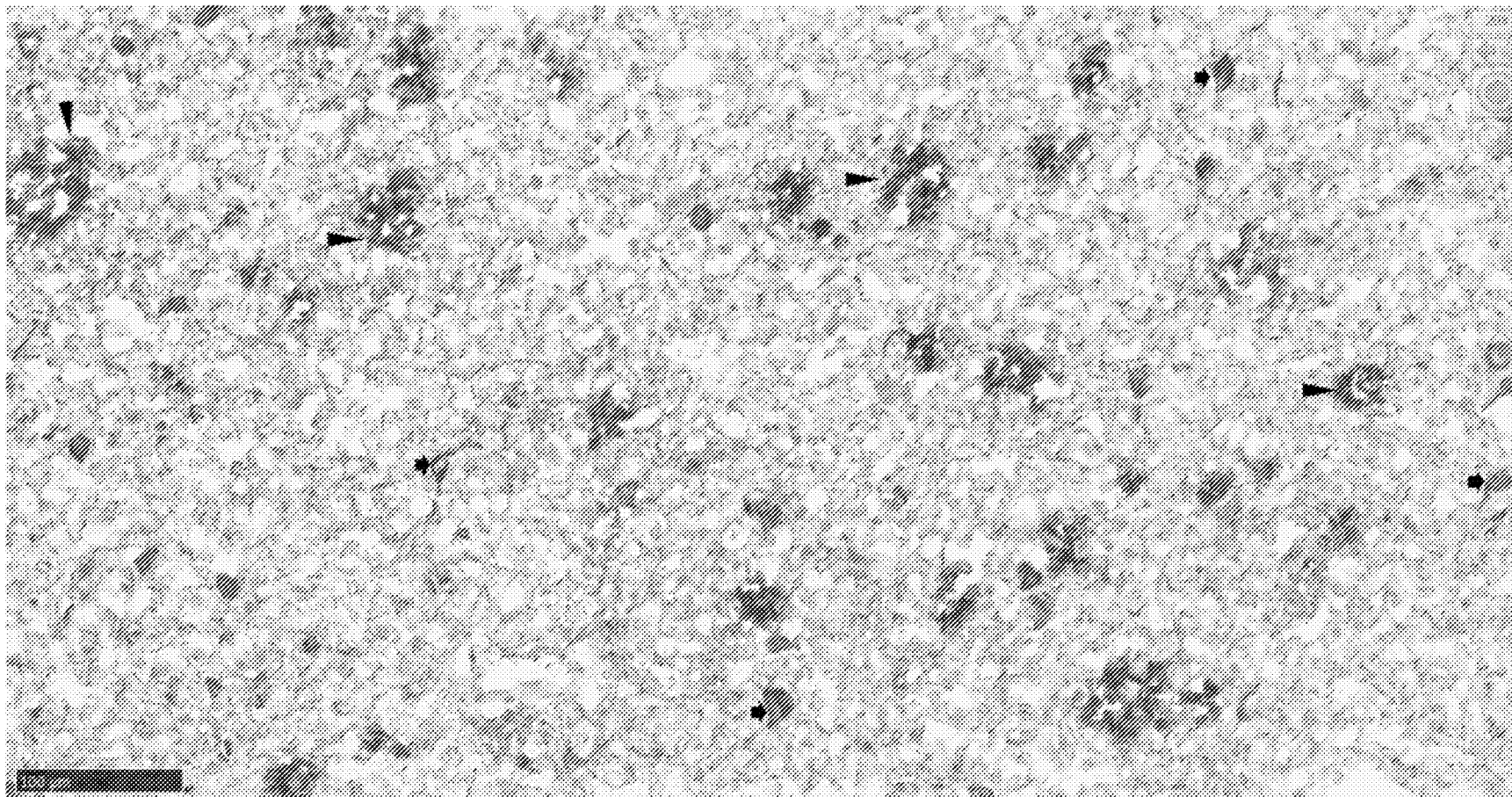
ФИГ. 16В



Окрашивание мышинной сывороткой в разведении 1:300 после
иммунизация двойной вакциной Abeta/tau (сыворотка 3.1_031521)
Пример окрашивания при иммунизации с использованием
DAEFRHDSRRSKIGSTENGGC

- ▶ Патологический Aβ
- ➡ Патологический tau
(распространен в нейритах)

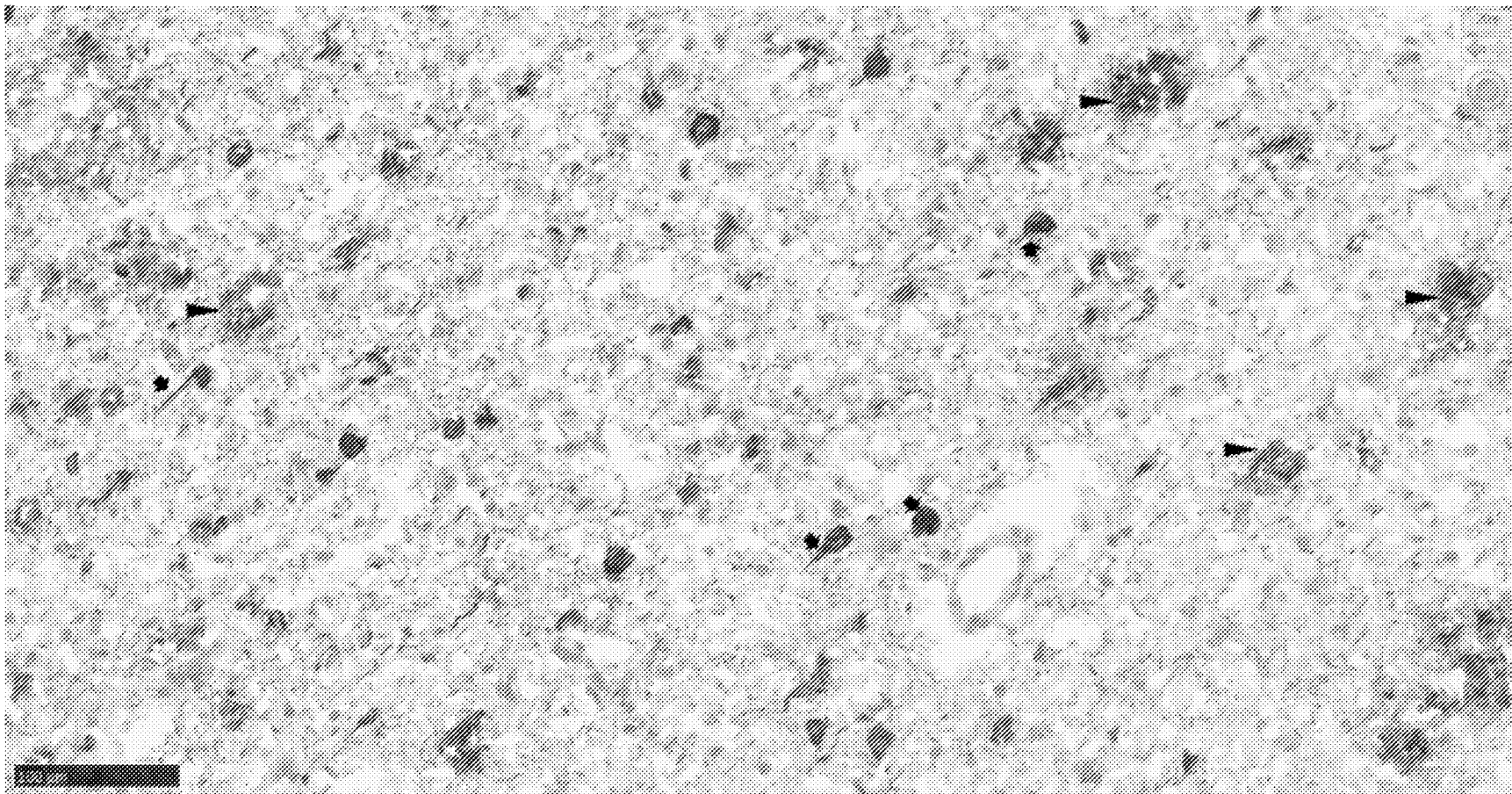
ФИГ. 16С



Окрашивание мышинной сывороткой в разведении 1:300 после
иммунизация двойной вакциной Abeta/tau (сыворотка 8.4_031521)
Пример окрашивания при иммунизации с использованием
DAEFRHDDRTENLKHQPGGC

- ▶ Патологический Aβ
- ➔ Патологический tau
(распространен в нейритах)

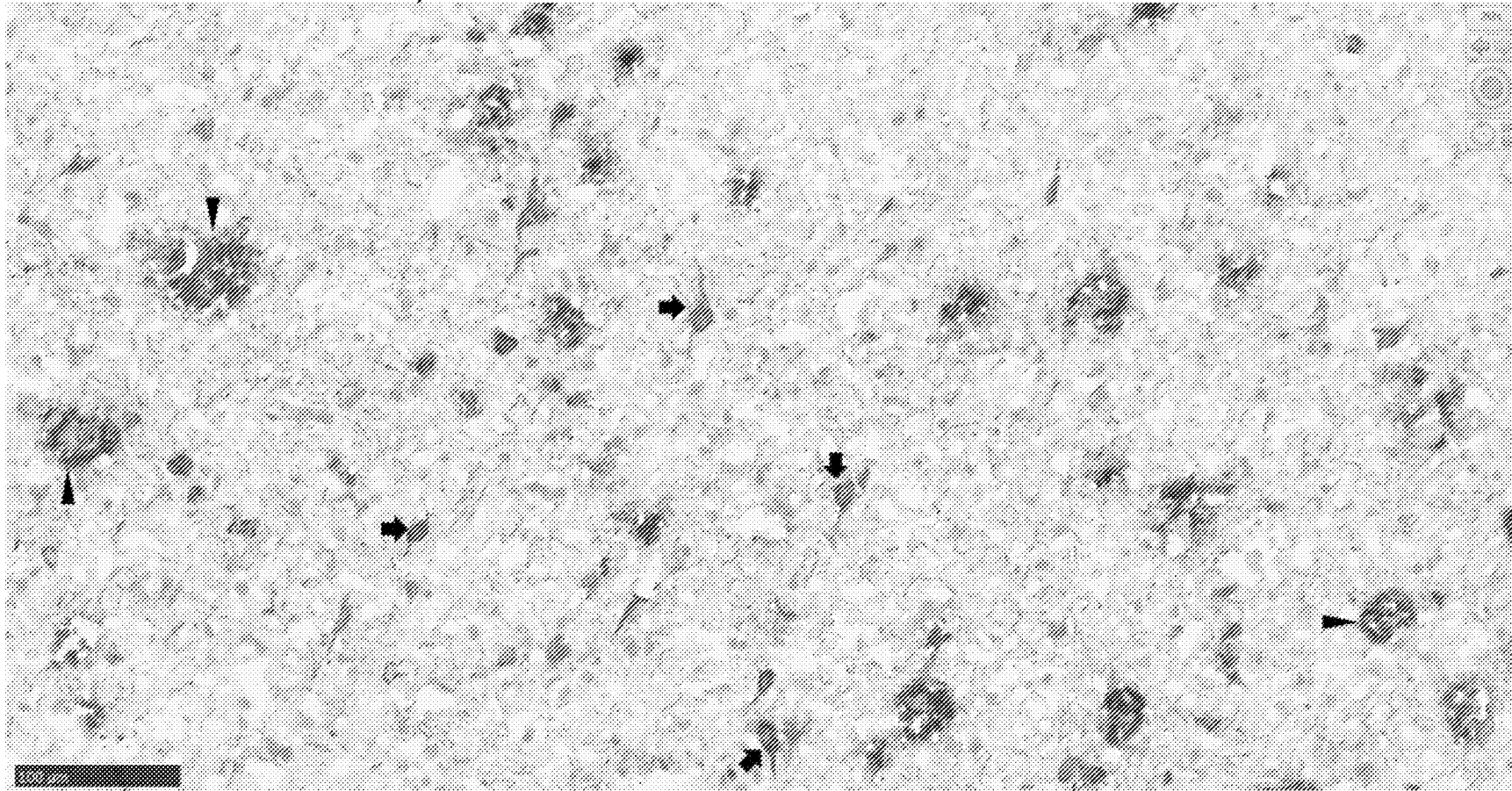
ФИГ. 16D



Окрашивание мышинной сывороткой в разведении 1:300 после
иммунизация двойной вакциной Abeta/tau (сыворотка 9.2_031521)
Пример окрашивания при иммунизации с использованием
DAEFRHDDRRENLKHQPGGGC

- ▶ Патологический Aβ
- ➡ Патологический tau
(распространен в нейритах)

ФИГ. 16Е



Окрашивание мышинной сывороткой в разведении 1:300 после
иммунизация двойной вакциной Aβ/tau (сыворотка 11.1_031521)
Пример окрашивания при иммунизации с использованием
DAEFRHDSRRSKIGSKDNIKHGGC

- ▲ Патологический Aβ
- ➔ Патологический tau
(распространен в нейритах)