

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390506** (13) **A1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**(43) Дата публикации заявки
2023.05.29(51) Int. Cl. *A61K 38/04* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2021.08.04(54) **ИММУНОГЕННЫЕ СОЕДИНЕНИЯ**

(31) 20189425.0

(32) 2020.08.04

(33) EP

(86) PCT/EP2021/071778

(87) WO 2022/029181 2022.02.10

(71) Заявитель:
АС ИММБЮН СА (CH)

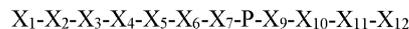
(72) Изобретатель:

Винтер Дориан, Стаффлер Гюнтер,
Галабова Гергана, Михайловская Ева,
Грубер Петра, Балаж Катя (AT)

(74) Представитель:

Костюшенкова М.Ю., Гизатуллин
Ш.Ф., Гизатуллина Е.М., Угрюмов
В.М., Строкова О.В., Джермакян Р.В.
(RU)

(57) Антигенный пептид, содержащий структуру



и полученный из аминокислот 113-124 альфа-синуклеина. В соответствии со структурой P представляет собой пролин; X_1 представляет собой L, K, A или S, где L представляет собой лейцин, K представляет собой лизин, A представляет собой аланин и S представляет собой серин; X_2 представляет собой E или S, где E и S определены выше; X_3 представляет собой D, E, K, N, A или S, где N представляет собой аспарагин, D представляет собой аспарагиновую кислоту и D, E, K, A и S определены выше; X_4 представляет собой M, A, S, L или K, где M представляет собой метионин и A, S, L и K определены выше; X_5 представляет собой P или A, как определено выше; X_6 представляет собой V, A или S, где V представляет собой валин и A и S определены выше; X_7 представляет собой D или S, как определено выше; X_9 представляет собой D или A, как определено выше; X_{10} представляет собой N, S или A, где N, S и A определены выше; X_{11} представляет собой E, A или S, где E, A и S определены выше; X_{12} присутствует или отсутствует и, если присутствует, представляет собой A, K, V, S или G, где G представляет собой глицин и A, K, V и S определены выше. Структура содержит по меньшей мере одну мутацию по сравнению с последовательностью дикого типа L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A. Пептид не содержит дипептид Y-E сразу после X_{12} , где Y представляет собой тирозин и E определена выше. Пептиды конъюгированы с подходящим носителем и подходят для лечения синуклеинопатий.

A1

202390506

202390506

A1

ИММУНОГЕННЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

ОПИСАНИЕ

Изобретение относится к иммуногенным соединениям и их применению в профилактике и лечении синуклеинопатий, особенно болезни Паркинсона (БП), деменции с тельцами Леви (ДТЛ) и множественной системной атрофии (МСА).

БП является синуклеинопатией и вторичным, наиболее частым, нейродегенеративным двигательным заболеванием. Распространенность БП колеблется от 100 до 200/100000 в общей популяции и затрагивает примерно 1% населения старше 60 лет с годовой заболеваемостью примерно 15/100000. Это хронически прогрессирующее нарушение, определяемое сочетанием двигательных синдромов (брадикинезия, ригидность, тремор в покое и постуральная неустойчивость) и недвигательных синдромов (различные вегетативные дисфункции, сенсорные аномалии и психические аномалии), которые, как правило, предшествуют двигательным синдромам. Характерным признаком заболевания является обширная потеря дофаминергических нейронов в черной субстанции (ЧС), сопровождающаяся накоплением нитевидных белковых включений, называемых тельцами Леви (ТЛ), которые преимущественно состоят из альфа-синуклеина (aSyn). БП, ДТЛ и другие заболевания с ТЛ демонстрируют накопление и перераспределение aSyn в различных областях мозга и клеточных популяциях.

МСА представляет собой еще одну очень важную синуклеинопатию. МСА представляет собой спорадическое нейродегенеративное нарушение, характеризующееся симптомами L-ДОФА-резистентного паркинсонизма, мозжечковой атаксии и дизавтономии. Пациенты страдают от мультисистемной потери нейронов, поражающей различные области головного мозга, включая полосатое тело, черную субстанцию, мозжечок, мост, а также нижние оливы и спинной мозг. МСА характеризуется aSyn-положительными глиальными цитоплазматическими включениями (GCI) и редкими нейрональными включениями на всем протяжении центральной нервной системы. Эти включения ассоциированы со стриатонигральной дегенерацией, оливопонтocerebellарной атрофией и поражением вегетативных ядер продолговатого и спинного мозга. Важность GCI для патогенеза МСА общепризнана и особо отмечена в недавнем анализе моделей трансгенных мышей, исследующем эффект сверхэкспрессии aSyn в олигодендроглии. У трансгенных мышей, свехэкспрессирующих человеческий aSyn, наблюдали как GCI-подобные агрегаты, так и биохимические маркеры МСА.

ДТЛ является вторым наиболее распространенным типом нейродегенеративной деменции в западном обществе после болезни Альцгеймера (БА). Она составляет 4-7% от клинически диагностированной деменции, при этом прогнозируют, что такое же количество случаев ускользает от постановки правильного клинического диагноза. Диагностика ДТЛ является сложной задачей, так как заболевание представляет собой «промежуточное» состояние между БА и БП и демонстрирует перекрывающиеся признаки обоих заболеваний. Четыре клинических консенсусных критерия, два из которых должны присутствовать для диагностики «вероятной ДТЛ», представляют собой колебания когнитивных функций и внимания, повторяющиеся зрительные галлюцинации, нарушение поведения в фазе быстрого сна и спонтанные двигательные признаки паркинсонизма, которые возникают у больных позже, чем другие критерии. Они могут быть подтверждены различными дополнительными клиническими критериями, которые могут необязательно возникать, такими как обморок и преходящие эпизоды апатии, тревожности, депрессии, психотические эпизоды и нейролептическая чувствительность и многие другие. Симптомы неодинаковы среди пациентов.

Патология ДТЛ характеризуется наличием включений, называемых тельцами Леви (ТЛ), преимущественно состоящих из альфа-синуклеина (αSyn), который играет роль в потере функции и структуры нейронов. Однако при ДЛБ ТЛ обнаруживаются диффузно распределенными по всей коре, тогда как при БП они обнаруживаются преимущественно в дофаминергических нейронах черной субстанции. ТЛ при ДТЛ менее четко разграничены, менее эозинофильны и менее нитевидны, чем таковые при БП. Кроме того, в мозге пациентов с ДТЛ можно найти амилоидные бляшки, содержащие в основном карбокси-концевые удлиненные формы амилоида бета (Aβ), такие как Aβ1-42. Кортикальное отложение амилоидов связано с перфузией нижних височных долей и тенденцией к атрофии гиппокампа.

αSyn представляет собой природный мономерный белок с молекулярной массой 14 кДа, который в норме располагается на пресинаптических окончаниях, связанный либо с мембранами синаптических пузырьков, либо в цитозоле. Его естественная функция остается малоизученной и, вероятно, он участвует в синаптической передаче. При патогенезе в центральной нервной системе (ЦНС) и периферической нервной системе происходит неправильное свертывание и агрегация αSyn, возможно, как следствие посттрансляционной модификации, включая среди прочего С-концевое расщепление протеазами (Dufty 2007, Bassil 2016). Агрегация приводит к образованию различных видов αSyn, таких как олигомеры, протофибриллы и фибриллы, которые были ассоциированы с патогенезом заболеваний с ТЛ. Фибриллярные формы αSyn выявляют преимущественно в

ТЛ, локализованных в телах нервных клеток (Kosaka et al., 1990; Dickson et al., 1989). Агрегаты aSyn также можно обнаружить в астроглиальных клетках (Braak 2007).

Не только фибриллы, но и различные виды олигомерного aSyn обнаруживают в пораженном головном мозге человека. В отличие от фибриллярного aSyn, олигомерные агрегаты, скорее всего, расположены в отростках и пресинаптических окончаниях нейронов, где они могут повредить синапсы, таким образом, олигомерный aSyn соотносят с клеточной цитотоксичностью.

Показано, что мономерный aSyn может образовывать различные типы агрегатов с различным внешним видом, конформацией, цитотоксичностью и химическими свойствами в различных условиях *in vitro*. В зависимости от конформации мономера и существующих допустимых условий могут образовываться различные типы агрегатов, обладающие разными структурными характеристиками. При диссеминации отдельные виды aSyn внедряют свою конформацию (например, «фибриллы» или «ленты») в принимающую клетку и генерируют агрегаты одного и того же вида в процессе, называемом «конформационное тиражирование». Если их вводить в мозг крысы, эти типы агрегатов проявляют различные свойства в отношении образования включений и генерации поведенческих и нейротоксических фенотипов *in vivo*.

Предполагают, что разные типы агрегатов aSyn экспонируют разные полипептидные цепи из-за их различных конформаций. Эти дифференциально экспонирующие поверхности допускают различные наборы интрамолекулярных взаимодействий. Таким образом, конформация данного вида aSyn диктует его свойства, такие как их склонность к диссеминации или предрасположенность к определенным типам клеток. Начиная появляться экспериментальные данные, демонстрирующие различные свойства видов aSyn, выделенных из материала с БП или МСА; анализ патологического материала головного мозга пациентов с БП или МСА показал различные свойства передаваемых агрегатов aSyn.

Доступные в настоящее время способы лечения нацелены исключительно на симптомы, однако способы лечения, способные изменить лежащую в основе нейродегенерацию, все еще находятся в стадии разработки. В настоящем документе представлен подход специфической для aSyn активной иммунотерапии (SAIT), который нацелен преимущественно на олигомерные и нейротоксические формы aSyn, и, таким образом, может препятствовать прогрессированию синуклеинопатий.

Вакцинация PD01 и PD03, ранее разработанными AFFITOPE®, нацеленными на aSyn, доказала свою эффективность у различных моделей нарушения агрегации aSyn у животных, уменьшая патологию aSyn, предохраняя от нейровоспаления, а также улучшая

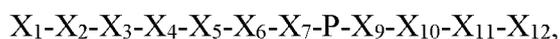
состояние дефицита поведения (Mandler et al. 2014; WO 2009/103105 A1, WO 2011/020133 A1, WO 2017/076873 A1). Эти пептиды оказались безопасными и хорошо переносимыми вакцинами, способными индуцировать мишень-специфические антитела у людей.

В WO 2005/108423 A1 раскрыты пептиды, придающие устойчивость к стрессу окружающей среды, полученные в том числе из aSyn, бета-синуклеина (bSyn) или гамма-синуклеина (GSyn), которые, если присутствуют в слитом белке с белком-партнером, могут обеспечивать снижение денатурации и/или повышенную растворимость этого белка-партнера слияния. В WO 2018/151821 A1 раскрыты антитела к aSyn, которые можно использовать для диагностики, лечения и профилактики нейродегенеративных заболеваний. Эти антитела создают путем иммунизации нативным aSyn или аллельным вариантом A53T и они должны преимущественно связываться с предварительно сформированными фибриллами («PFF»). В WO 2005/013889 A2 раскрыты фрагменты нативного aSyn, который подходит для лечения или профилактики заболевания с ТЛ (ДТЛ) или для создания моноклонального антитела для лечения или профилактики ТДЛ.

Целью настоящего изобретения является создание лекарственного средства на основе вакцины для применения в профилактике и лечении синуклеинопатий. Еще одной целью является создание пептидов для вакцинации, подходящих для применения у человека.

Кроме того, изобретение может обеспечивать улучшенные иммуногенные пептиды, которые обладают улучшенной иммуногенностью, индуцируют более высокое количество aSyn-специфических антител на периферии и индуцируют более высокое количество aSyn-специфических антител в головном мозге. Кроме того, желательно также повысить целевое связывание индуцированных антител за счет ответа олигоклональных антител («продолженный эпитоп»).

Таким образом, настоящее изобретение относится к антигенному пептиду, содержащему, состоящему по существу или состоящему из структуры:



где:

P представляет собой пролин;

X₁ представляет собой L, K, A или S, где L представляет собой лейцин, K представляет собой лизин, A представляет собой аланин и S представляет собой серин;

X₂ представляет собой E или S, где E представляет собой глутаминовую кислоту и S определена выше;

X₃ представляет собой D, E, K, N, A или S, где N представляет собой аспарагин, D представляет собой аспарагиновую кислоту и E, K, A и S определены выше;

X₄ представляет собой M, A, S, L или K, где M представляет собой метионин и A, S, L и K определены выше;

X₅ представляет собой P или A, как определено выше;

X₆ представляет собой V, A или S, где V представляет собой валин и A и S определены выше;

X₇ представляет собой D или S, как определено выше;

X₉ представляет собой D или A, как определено выше;

X₁₀ представляет собой N, S или A, где N, S и A определены выше;

X₁₁ представляет собой E, A или S, где E, A и S определены выше;

X₁₂ присутствует или отсутствует и, если присутствует, представляет собой A, K, V, S или G, где G представляет собой глицин и A, K, V и S определены выше,

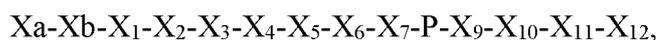
при условии, что X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-P-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂ не является L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A и содержит от 1 до 5 аминокислотных отличий по сравнению с аминокислотной последовательностью L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A, и где пептид не содержит дипептид Y-E сразу после X₁₂, где Y представляет собой тирозин, а E определена выше. Таким образом, в настоящем документе обычно используют однобуквенный код аминокислоты.

Антигенный пептид может содержать от 1 до 5 аминокислотных отличий (т.е. 1, 2, 3, 4 или 5 отличий) или от 1 до 4 аминокислотных отличий по сравнению с аминокислотной последовательностью L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A. Отличия, как правило, заключаются в замене аминокислот (в соответствии с вариантами, изложенными для каждой позиции, за исключением того, что X₁₂ может быть удалена). Предпочтительно, чтобы было от 1 до 3 аминокислотных отличий и наиболее предпочтительно 2 аминокислотных отличия от аминокислотной последовательности L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A (которая представляет собой последовательность альфа-синуклеина дикого типа из аминокислот 113-124). Эти отличия можно выбрать из любой из аминокислот X₁-X₁₂, кроме X₈, которая является пролином. В некоторых вариантах осуществления антигенный пептид содержит отличия аминокислот по сравнению с аминокислотной последовательностью L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A в одном или нескольких положениях, выбранных из X₁, X₃, X₄ и X₁₂. Предпочтительно, антигенный пептид содержит два аминокислотных отличия по сравнению с аминокислотной последовательностью L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A в положениях, выбранных из X₁, X₃, X₄ и X₁₂.

Антигенные пептиды по изобретению при использовании в качестве иммуногена сохраняют свою способность генерировать aSyn-специфические антитела. Кроме того, антигенные пептиды по изобретению являются более иммуногенными, чем

соответствующие пептиды дикого типа aSyn (содержащие 12-мерный L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A, p9524 (SEQ ID NO: 4)), в отношении генерации aSyn-специфических антител, как показано в сравнительном эксперименте в настоящем документе. Они также более иммуногенны, чем другие пептиды aSyn из C-концевой области aSyn, которые, как было показано, менее иммуногенны, чем p9524; см. таблицы 1 и 2 ниже (например, p4456 (SEQ ID NO: 1) и p4572 (SEQ ID NO: 2)). Эти свойства специалист в данной области может проверить, следуя указаниям в настоящем документе, как правило, путем тестирования пептида в форме конъюгата из типа, подробно описанного в настоящем документе (например, пептид, конъюгированный с CRM197 в качестве белка-носителя). Пептиды можно вводить подходящему экспериментальному животному, в частности, мышам и забирать образец (например, кровь) в подходящий период после введения (опять же, см. примеры для конкретных деталей). Определение титра антител к aSyn можно проводить, например, с помощью ИФА, как описано в настоящем документе.

Антигенные пептиды по изобретению, как правило, не содержат дополнительных аминокислотных остатков альфа-синуклеина после X₁₂. В частности, они не содержат дипептид Y-E сразу после X₁₂. Как описано в настоящем документе пептиды, содержащие аминокислоты Y₁₂₅ и E₁₂₆, были теоретически рассчитаны в анализах *in silico* для связывания с высокой аффинностью с различными аллельными вариантами MHC I и, таким образом, являются потенциальными эпитопами цитотоксических Т-клеток (www.syfpeithi.de). Антигенные пептиды, однако, могут содержать ограниченное количество дополнительных N-концевых аминокислотных остатков. Таким образом, антигенные пептиды могут содержать, состоять по существу или состоять из структуры



где:

Xa присутствует или отсутствует и, если присутствует, представляет собой G, где G представляет собой глицин;

Xb представляет собой G, где G определена выше; и

X₁-X₁₂ определены выше.

Антигенные пептиды по изобретению имеют таким образом, как правило, 11-20 аминокислот в длину, предпочтительно 12-14 аминокислот в длину (т.е. 12, 13 или 14 аминокислот в длину). Особенно предпочтительно, когда антигенные пептиды состоят из 12 или 14 аминокислот в длину. Антигенные пептиды по изобретению вызывают ответ антител при отсутствии Т-клеточного ответа. Таким образом, антигенные пептиды по изобретению сами по себе, как правило, не содержат Т-клеточных эпитопов, в частности эпитопов цитотоксических Т-клеток.

Как описано далее в настоящем документе, антигенные пептиды по изобретению, как правило, применяют в форме иммуногенных соединений, в которых они конъюгированы с носителем. Чтобы облегчить процесс конъюгации, антигенные пептиды по изобретению могут дополнительно содержать аминокислоту, которая действует как сайт конъюгации. Как правило, эта аминокислота является концевой аминокислотой и предпочтительно находится на N-конце. В предпочтительных вариантах осуществления антигенный пептид дополнительно содержит концевой остаток цистеина, предпочтительно N-концевой остаток цистеина.

В некоторых вариантах осуществления X_1 представляет собой L, S или K, X_2 представляет собой E или S, X_3 представляет собой S, D, E, A, K или N, X_4 представляет собой M, X_{10} представляет собой N и/или X_{12} представляет собой A, S, K или V, предпочтительно, где X_1 представляет собой L или K, X_2 представляет собой E, X_3 представляет собой S, D, E, K или A, X_4 представляет собой M, X_{10} представляет собой N и/или X_{12} представляет собой A, S или K, особенно, где X_1 представляет собой L или K, X_3 представляет собой D, K или S и X_{12} представляет собой A. В этих вариантах осуществления, другие положения в пептиде предпочтительно представляют собой аминокислоты альфа-синуклеина дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления X_1 представляет собой A, S или K. В некоторых вариантах осуществления X_2 представляет собой S. В некоторых вариантах осуществления X_3 представляет собой A, S, E, K или N. В некоторых вариантах осуществления X_4 представляет собой A, S, L или K. В некоторых вариантах осуществления X_5 представляет собой A. В некоторых вариантах осуществления X_6 представляет собой A или S. В некоторых вариантах осуществления X_7 представляет собой S. В некоторых вариантах осуществления X_9 представляет собой A. В некоторых вариантах осуществления X_{10} представляет собой A или S, предпочтительно S. В некоторых вариантах осуществления X_{11} представляет собой A или S. В некоторых вариантах осуществления X_{12} представляет собой S, V, G или K. В соответствии с этими вариантами осуществления, предпочтительно, чтобы присутствовали максимум одна, две или три дополнительных мутации в антигенном пептиде по сравнению с нативной последовательностью L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A. В некоторых вариантах осуществления нет дополнительных мутаций в антигенном пептиде по сравнению с нативной последовательностью L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A.

В некоторых вариантах осуществления антигенный пептид выбран из группы, состоящей из AEDMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEA, LESMPVDPDNEA, LESMPVDPDNES, SEDMPVDPDNEA, SEKMPVDPDNEA LEEMPVDPDNEA,

SESMPVDPDNEA, LEDMPVDPDNES, LEAMPVDPDNEA, LEDMPVDPDNEK, LEDMPVDPDNEV, LEKMPVDPDNEK, LSDMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNES, LENMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEK и KEDMPVDPDNEA, предпочтительно SEDMPVDPDNEA, SEKMPVDPDNEA, LEEMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNEK, LESMPVDPDNEA, LESMPVDPDNES, KESMPVDPDNEA, KEDMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNES, LEKMPVDPDNEA и LESMPVDPDNES, особенно LEKMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEK, KESMPVDPDNEA и KEDMPVDPDNEA. В предпочтительных вариантах осуществления антигенный пептид содержит, состоит по существу или состоит из аминокислотной последовательности KESMPVDPDNEA, GKESMPVDPDNEA, GGKESMPVDPDNEA или CGGKESMPVDPDNEA.

Антигенные пептиды по изобретению, как правило, используют в форме иммуногенных соединений, в которых они конъюгированы с носителем. Носитель действует как источник Т-клеточных эпитопов для улучшения иммунного ответа на иммуногенные пептиды. Таким образом, изобретение относится к иммуногенному соединению, содержащему антигенный пептид по изобретению и носитель, содержащий Т-клеточные эпитопы и присоединенный к антигенному пептиду. Предлагается иммуногенное соединение, имеющее структуру

Носитель- X_1 - X_2 - X_3 - X_4 -P-V-D-P-D- X_{10} -E- X_{12} ,

где

носитель представляет собой полипептидный носитель, ковалентно связанный с X_1 ; предпочтительно содержащий линкерную группу, которая ковалентно связывает молекулу носителя с пептидом X_1 - X_2 - X_3 - X_4 -P-V-D-P-D- X_{10} -E- X_{12} ;

D представляет собой аспарагиновую кислоту, E представляет собой глутаминовую кислоту, P представляет собой пролин и V представляет собой валин;

X_1 представляет собой L, K, A или S, где L представляет собой лейцин, K представляет собой лизин, A представляет собой аланин и S представляет собой серин;

X_2 представляет собой E или S, где E и S определены выше;

X_3 представляет собой D, E, K, N, A или S, где N представляет собой аспарагин и D, E, K, A и S определены выше;

X_4 представляет собой M, A, S, L или K, где M представляет собой метионин и A, S, L и K определены выше;

X_{10} представляет собой N, S или A, где N, S и A определены выше;

X_{12} присутствует или отсутствует и, если присутствует, представляет собой A, K, V, S или G, где G представляет собой глицин и A, K, V и S определены выше,

при условии, что X_1 -E- X_3 - X_4 -P-V-D-P-D- X_{10} -E- X_{12} не является L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A.

Настоящие соединения содержат пептиды, которые способны вызывать сильный ответ антитела к aSyn («антигенные пептиды»), т.е. что индуцированные антитела проявляют высокую перекрестную реактивность с человеческим aSyn, хотя эти пептиды имеют последовательность, которая отличается от нативной последовательности (L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A). С помощью пептидов по настоящему изобретению были достигнуты иммунные ответы, превосходящие ответ с нативной последовательностью (т.е. нацеленный на те же самые нативные структуры), и можно индуцировать высокоэффективный и подходящий антителный ответ у вакцинированных индивидуумов. Антитела, индуцированные путем вакцинации соединениями по настоящему изобретению, связываются с с высокой селективностью и специфичностью с агрегированными токсичными видами aSyn и тельцами Леви в патологических тканях головного мозга человека.

Ранее было продемонстрировано, что можно создать иммуногенные пептиды с ненативными аминокислотными последовательностями aSyn для выявления специфических иммунных ответов против aSyn, которые улучшены в отношении перекрестной реактивности с bSyn (WO 2009/103105 A1, WO 2011/020133 A1). В настоящем документе было неожиданно продемонстрировано, что можно получить улучшенные пептиды с ненативными аминокислотными последовательностями aSyn, которые, в дополнение к вызыванию иммунного ответа, специфичного для aSyn, демонстрируют повышенную иммуногенность и способны вызывать антитела с более высокой перекрестной реактивностью, чем пептиды, описанные в WO 2009/103105 A1 и WO 2011/020133 A1 (см. примеры ниже).

Предпочтительные иммуногенные соединения по настоящему изобретению содержат предпочтительный пептид по настоящему изобретению, где X_1 представляет собой L, S, или K, X_2 представляет собой E или S, X_3 представляет собой S, D, E, A, K или N, X_4 представляет собой M, X_{10} представляет собой N и/или X_{12} представляет собой A, S, K или V. Другие предпочтительные иммуногенные соединения по настоящему изобретению содержат предпочтительный пептид, где X_1 представляет собой L, S или K, X_2 представляет собой E, X_3 представляет собой S, D, E, K или A, X_4 представляет собой M, X_{10} представляет собой N и/или X_{12} представляет собой A, S или K. Другой предпочтительный вариант осуществления представляет собой пептид по настоящему изобретению, где X_1 представляет собой L или K, X_3 представляет собой D, K или S и X_{12} представляет собой A.

В предпочтительных вариантах осуществления носитель, содержащий Т-клеточные эпитопы, присоединен к антигенному пептиду через линкер. Таким образом, также предлагается антигенный пептид, присоединенный к линкеру. Можно использовать любой подходящий линкер, как это будет легко понятно специалисту в данной области. Линкер может быть химическим линкером или линкером на основе пептида/аминокислот. Линкер может содержать реакционноспособные функциональные группы, чтобы сделать возможным связывание антигенного пептида с носителем посредством подходящей химической реакции. Таким образом, линкер может содержать две реакционноспособных группы. Первая присоединяется к носителю (белку), как правило, через реакционноспособную боковую цепь аминокислоты, например, путем реакции с первичным амином (например, на остатке лизина). Таким образом, как правило, образуется амидная связь. Вторая присоединяется к антигенному пептиду, опять же, как правило, через реакционноспособную боковую цепь аминокислоты, например, посредством сульфгидрильной группы (например, на остатке цистеина). Таким образом, как правило, образуется тиоэфирная связь. Предпочтительные линкеры, таким образом, представляют собой гетеробифункциональные линкеры, в частности те, которые содержат реакционноспособную аминную группу, такую как сложный эфир N-гидроксисукцинимид (NHS), и реакционноспособную сульфгидрильную группу, такую как малеинимид. Таким образом, линкер может содержать sGMBS (=сульфоGMBS) - сложный эфир (малеимидобутирилокси)сульфосукцинимид, GMBS - сложный эфир малеимидобутирилоксисукцинимид, сулцинимидил 3-(бромацетила)пропионат (SBAP) или сулцинимидил 6-(N-малеимидо)-н-гексаноат (MXC). Другие линкеры, которые можно использовать, содержат sEMCS (=сульфоEMCS) - сложный эфир N-(ε-малеимидокапроилокси)сульфосукцинимид, MBS - сложный эфир m-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимид, sMBS (=сульфоMBS) - сложный эфир (m-малеимидобензоил-N-гидрокси)сульфосукцинимид, йодо-ацетамид-(ПЭГ)2-малеинимид (=N-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этил)-3-(2-(2-йодоацетила)этокси)пропанамид) и йодо-ацетамид-(ПЭГ)-три(малеинимид) (=3,3'-((3-((3-((2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этил)амино)-3-оксопропокси)метил)-2-(2-йодацетила)пропан-1,3-диил)бис(окси))бис(N-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этил)пропанамид)).

Линкер может присоединять антигенный пептид к специфическим аминокислотным остаткам или боковым цепям, содержащимся в носителе (белок). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антигенный пептид конъюгирован с остатками лизина (через группу первичного амина), содержащимися в носителе (белке). Также предусмотрена конъюгация через остатки гистидина. Следует отметить, что антигенный

пептид может быть предоставлен в составе более крупной пептидной молекулы, остальная часть которой не является производной аминокислотной последовательности альфа-синуклеина, чтобы обеспечить линкер или облегчить связывание. Например, пептид может содержать дополнительные остатки, такие как один или несколько остатков цистеина со спейсером или без него, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ), для облегчения прикрепления к носителю (белку). Эти дополнительные остатки, как правило, расположены на N- и/или C-конце антигенного пептида, предпочтительно на N-конце антигенного пептида. В этом контексте термин «по существу состоит из» может означать, что антигенный пептид по изобретению содержит 11-20, предпочтительно от 12 до 14 смежных аминокислот, полученных из последовательности альфа-синуклеина (аминокислоты 111-124 или 113-124, содержащие, по меньшей мере, одну (и до четырех) мутаций, как определено в настоящем документе), но может содержать ограниченное число дополнительных остатков, таких как дополнительный остаток цистеина, для облегчения прикрепления к белку-носителю со спейсером или без него, такому как ПЭГ или спейсер на основе аминокислот.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения молекула линкера иммуногенного соединения содержит, по меньшей мере, один аминокислотный остаток цистеина и/или глицина, предпочтительно связанный посредством химического линкера с молекулой полипептидного носителя. Обеспечение аминокислотных линкеров на N-конце (например, 12-мерных) пептидов по настоящему изобретению дает много преимуществ для связывания более крупных соединений (в качестве носителей) и для выявления (более) сильных иммунных ответов; однако такие линкеры, особенно аминокислотные линкеры, не являются обязательными для настоящего изобретения.

Предпочтительными аминокислотными линкерами являются глицин и цистеин (или их сочетания, такие как CG-, CGG-, CCG-, GC-, GGC-, GCC-, GG-, GGG- и т.д.) а также изолейцин, аланин, валин, лейцин, серин, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, лизин, аспарагин, глутамин и т.д. Аминокислотный линкер может также содержать более одного аминокислотного остатка, например, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных остатков. Предпочтительно исключать определенные аминокислотные остатки в пептидном (на основе аминокислот) линкере из-за проблем с устойчивостью/сворачиванием, особенно если аминокислотный линкер длиннее пяти аминокислотных остатков, а также, если антигенный пептид непосредственно связан с белком-носителем через пептидную связь. Таким образом, если аминокислотный линкер (или аминокислотная последовательность, удлиняющая N-конец от X₁) длиннее пяти

аминокислотных остатков, предпочтительно, чтобы линкер не содержал аминокислот, выбранных из группы, состоящей из пролина, аргинина или гистидина в (линкерной) области N-конца в направлении к X_1 , т.е. в пределах первых пяти аминокислот из молекулы аминокислотного линкера, начиная с аминокислоты, которая является N-концевой по отношению к X_1 .

Предпочтительными пептидными линкерами для применения по изобретению являются те, которые не образуют Т-клеточный эпитоп. Это можно оценивать с применением известных способов, в том числе *in silico*, например, путем обращения к базе данных SYFPEITHI, содержащей лиганды и пептидные мотивы МНС (<http://www.syfpeithi.de/>).

Альтернативно, или в дополнении к аминокислотному линкеру, носитель предпочтительно содержит, помимо полипептидного носителя, также химические связывающие группы (или химические компоненты, возникающие в результате процессов химического связывания). Предпочтительные связывающие группы можно получать с помощью химических линкеров, таких как гетеробифункциональные соединения, такие как GMBS или сульфо-GMBS. Все химические линкеры, известные и используемые в данной области, особенно те, которые используются для производства продуктов, вводимых человеку, могут быть использованы для обеспечения связи носителя с пептидом по настоящему изобретению. Особенно предпочтительный химический линкер представляет собой химический линкер, который связывается через непептидную связь с антигенным пептидом по изобретению и с носителем. Такое связывание посредством непептидной связи является особенно выгодным в отношении его иммуногенных, стабилизирующих и/или производственных свойств. Предпочтительно, молекула линкера образована NHS-полиэтиленоксидом (ПЭО) (например, NHS-ПЭО₄-малеинимид) или другими соединениями, используемыми в биохимических технологиях.

Особенно предпочтительные иммуногенные соединения по настоящему изобретению предпочтительно содержат пептид $X_1-X_2-X_3-X_4-P-V-D-P-D-X_{10}-E-X_{12}$, который выбран из группы, состоящей из KESMPVDPDNEA, LESMPVDPDNEA, LESMPVDPDNEA, SEDMPVDPDNEA, LEEMPVDPDNEA, SESMPVDPDNEA, LEDMPVDPDNEA, LEAMPVDPDNEA, LEDMPVDPDNEK, LEDMPVDPDNEV, LEKMPVDPDNEK, LSDMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNEA, KEDMPVDPDNEA, LENMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEK и KEDMPVDPDNEA, предпочтительно SEDMPVDPDNEA, LEEMPVDPDNEA, LESMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEA, KEDMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNEA и LESMPVDPDNEA, особенно LEKMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEA и KEDMPVDPDNEA.

Носитель действует как источник Т-клеточных эпитопов и, таким образом, как правило, содержит множественные Т-клеточные эпитопы. Т-клеточные эпитопы являются универсальными эпитопами Т-клеток. Под «универсальным» эпитопом Т-клеток подразумевают эпитоп, специфичный для Т-клеток, который присутствует у большинства людей. «Универсальная» способность Т-клеточного эпитопа активировать Т-клетки является результатом, по меньшей мере, двух взаимодополняющих свойств: i) аффинности связывания с бороздкой HLA, то есть прочности связывания, а также ii) его способности беспорядочно связывать разные гаплотипы HLA, что означает способность охватывать очень разные популяции людей в отношении различий в экспрессии молекул HLA. Универсальные эпитопы Т-клеток могут связываться с большинством аллелей MHC класса II, присутствующих в популяции человека. Таким образом, Т-клеточные эпитопы носителя могут быть способны стимулировать ответ CD4⁺ Т-клеток. Таким образом, Т-клеточные эпитопы носителя могут быть способны стимулировать ответ хелперных Т-клеток, который усиливает (специфическую для антигенного пептида) В-клеточную продукцию антител.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления иммуногенное соединение по настоящему изобретению содержит молекулу фармацевтически приемлемого полипептидного носителя; белок-носитель. Белок-носитель может быть выбран из группы, состоящей из дифтерийного токсина (ДТ) и его вариантов, особенно CRM197 (перекрестно реагирующий материал 197), гемоцианина морского блюдца (KLH), столбнячного токсина, термолабильного энтеротоксина (LT), холерного токсина (ХТ), столбнячных токсинов (СТ), мутантных токсинов, альбумин-связывающих белков, бычьего сывороточного альбумина, синтетически полученных слитых пептидов, содержащих несколько Т-клеточных эпитопов (например, Tet или PADRE). Другие белки-носители, которые могут быть использованы, включают экзотоксин А псевдомонад (ЕРА), белок D *Haemophilus influenzae* (HiD) или белковый комплекс наружной мембраны менингококка (ОМРС). CRM197 является особенно предпочтительным белком-носителем.

Неполипептидные носители также могут быть включены в состав иммуногенных соединений по настоящему изобретению. Примеры включают микрочастицы сополимера молочной и гликолевой кислот (микрочастицы PLG), частицы полксамера, вирусоподобные частицы и дендримеры. Другие носители могут содержать наночастицы или липосомы.

Иммуногенные соединения и антигенные пептиды по настоящему изобретению предпочтительно применяют для терапевтических и профилактических способов лечения пациентов, особенно для применения для лечения или профилактики синуклеинопатий.

Предпочтительными синуклеинопатиями для лечения или профилактики являются нарушения с тельцами Леви (НТЛ), особенно болезнь Паркинсона (БП), болезнь Паркинсона с деменцией (БПД) и деменция с тельцами Леви (ДТЛ), а также множественная системная атрофия (МСА) или нейродегенерация с накоплением железа в головном мозге типа I (NBIA типа I).

По другому аспекту настоящего изобретения настоящее изобретение относится к фармацевтическому препарату, содержащему иммуногенное соединение или антигенный пептид по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый эксципиент (который может упоминаться взаимозаменяемо как носитель). Термин «эксципиент» охватывает любой компонент за исключением иммуногенного соединения, которое присутствует в конечном составе для введения. Фармацевтический препарат предпочтительно предназначен для применения в качестве вакцины для лечения или профилактики синуклеинопатии, которая может быть выбрана из группы, состоящей из нарушения с тельцами Леви (НТЛ), особенно болезни Паркинсона (БП), болезни Паркинсона с деменцией (БПД) и деменции с тельцами Леви (ДТЛ), а также множественной системной атрофии (МСА) или нейродегенерации с накоплением железа в головном мозге типа I (NBIA типа I).

Фармацевтический препарат по настоящему изобретению предпочтительно сформулирован в виде вакцины. Фармацевтический препарат, предпочтительно вакцину, можно формулировать с адъювантом, предпочтительно с адъювантом, выбранным из группы, состоящей из фосфата алюминия MF59, фосфата кальция, цитокинов (например, IL-2, IL-12, GM-CSF), сапонинов (например, QS21), производных MDP, олигонуклеотидов CpG, IC31, LPS, монофосфорил липид А ((MPLA), причем термин охватывает производные MPLA, такие как монофосфорилгексаацил липид А, 3-деацил (синтетический) (3D-(6-ацил)PHAD[®]), PHAD[®] (фосфорилированный гексаацилдисахарид) или MPL), полифосфазены и гидроксид алюминия, или их смеси; особенно с гидроксидом алюминия в качестве адъюванта. Целью адъюванта/адъювантов является усиление или стимуляция иммунного ответа у индивидуумов. В некоторых вариантах осуществления, в состав носителя входит, по меньшей мере, один адъювант. Другие адъюванты, которые можно использовать по изобретению, включают среди прочих адъюванты, содержащие алюминий, в частности, гидроксид алюминия (квасцы), имидазохинолинамин, такой как резиквимод (R-848) и/или CpG (синтетические олигодезоксинуклеотиды (ОДН), содержащие неметилованные мотивы CpG). Адъювантом может быть агонист толл-подобных рецепторов (TLR).

Как правило, фармацевтический препарат по настоящему изобретению, особенно если он составлен в виде вакцины, содержит иммуногенное соединение по настоящему изобретению (или пептид по настоящему изобретению, не обязательно связанный с альтернативным носителем) в количестве от 0,1 нг до 10 мг, предпочтительно от 10 нг до 1 мг, в частности, от 1 мкг до 500 мкг, или, альтернативно, например, от 100 фмоль до 10 мкмоль, предпочтительно от 10 пмоль до 1 мкмоль, в частности, от 1 нмоль до 500 нмоль. Количество пептида в некоторых вариантах осуществления может составлять от 100 пмоль до 100 нмоль. Количества в настоящем документе относятся к пептидным компонентам композиции.

Как правило, фармацевтические препараты, особенно вакцины, могут также содержать вспомогательные вещества, такие как эксципиенты, например, буферы, стабилизаторы и т.д. Предпочтительно, такие вспомогательные вещества, например, фармацевтически приемлемый эксципиент, такой как вода, буфер и/или стабилизаторы, содержатся в количестве от 1 до 99% (по массе), более предпочтительно от 5 до 80% (по массе), особенно предпочтительно от 10 до 70% (по массе). Предпочтительно, фармацевтический препарат по настоящему изобретению формулируют в виде липосом, виросом, иском, кохлеатов, эмульсий.

Антигенные пептиды, иммуногенные соединения и фармацевтические препараты по изобретению можно вводить в соответствии с любой подходящей схемой. Их можно вводить в соответствии со стратегией вакцинации для иммунизации типа «прайм-буст» (праймирование/стимулирование). Стратегии вакцинации для иммунизации «прайм-буст» предусматривают множественную иммунизацию. Они направлены на повышение эффективности вакцины. Как правило, каждый раз вводят одну и ту же вакцинную композицию; так называемая гомологичная схема вакцинации с иммунизацией «прайм-буст». Возможные схемы введения фармацевтического препарата для фазы начального праймирования предусматривают раз в две недели вплоть до четырехмесячного курса лечения; предпочтительными являются введения от 2 до 5, особенно от 3 до 4, введений вакцины для начального праймирования (в период от 1 до 5 месяцев) с последующими ревакцинациями или поддерживающими прививками через 3–12 месяцев после этого или даже спустя годы, помимо других режимов, уже предложенных для других вакцин.

В абсолютных количествах предпочтительно использовать количество пептида (в виде антигена) по настоящему изобретению в дозе, по меньшей мере, 10 мкг, предпочтительно, по меньшей мере, 50 мкг. В связи с этим важно отметить, что «мкг пептида (в виде антигена)», указываемый в настоящем изобретении, относится к количеству антигенного пептида в дозе и не включает носитель или линкер в составе

вакцинного конъюгата (иммуногенное соединение, если оно присутствует). Таким образом, предпочтительные количества антигена составляют, по меньшей мере, 5 нмоль, предпочтительно, по меньшей мере, 25 нмоль.

Предпочтительно, фармацевтический препарат, содержащий иммуногенное соединение или антигенный пептид, формулируют для парентерального введения. В конкретных вариантах осуществления препарат формулируют для подкожного, интрадермального или внутримышечного введения. Также можно использовать внутривенное введение.

Стратегия вакцинации по настоящему изобретению предпочтительно следует обычным стратегиям вакцинации. В предпочтительном варианте осуществления стратегия вакцинации предназначена для аутоантигенов согласно WO 2017/076873 A1 т.е. для получения первичного иммунного ответа у пациента, а затем для проведения ревакцинации или поддерживающей терапии.

Предпочтительно, для того, чтобы получить высокий титр антител в течение всего периода лечения бустерную/поддерживающую вакцинацию проводят в тот момент времени, когда первичный иммунный ответ уже прошел, т.е. когда титры антитела, полученные при первичной вакцинации (вызванные одним, двумя, тремя, четырьмя или больше введениями вакцины в ходе получения первичного иммунного ответа), упали ниже пределов определенных уровней (например, ниже пределов заданного порогового уровня анализа, подходящего для тестирования большого числа образцов) или, по меньшей мере, опустились ниже 30%, предпочтительно ниже 50%, особенно, ниже 80% от максимального уровня антитела, присутствующего в ходе первичной вакцинации. Для поддержания такого высокого уровня может быть полезным введение бустерных/поддерживающих инъекций каждые 3-12 месяцев после начальной (первичной) иммунизации.

Предпочтительно, количество антигена в дозе для бустерного/поддерживающего введения, по меньшей мере, на 20%, предпочтительно, по меньшей мере, на 50%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 100%, особенно, по меньшей мере, на 200% выше, чем количество, используемое в дозе для введения для первичного иммунного ответа. В определенных вариантах осуществления также предпочтительно, если доза антигена для бустерного/поддерживающего введения, по меньшей мере, на 300%, предпочтительно, по меньшей мере, на 400%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 500%, особенно, по меньшей мере, на 600% выше, чем количество, используемое в дозе для введения для первичного иммунного ответа. Однако в некоторых вариантах осуществления в каждом случае вводят одну и ту же композицию. Таким образом, в некоторых вариантах

осуществления количество вводимого антигена одинаково во всех случаях (в пределах производственных допусков).

По дополнительному предпочтительному варианту осуществления бустерное/поддерживающее введение повторяют через некоторое время, например, через один год, два года, три года или десять лет. Предпочтительно, второе или дальнейшее бустерное/поддерживающее введение проводят таким же или подобным образом, как и первое бустерное/поддерживающее введение, т.е. с повышенным количеством антигена по сравнению с дозой первичной вакцинации или с тем же количеством антигена.

Способы введения по настоящему изобретению, как правило, те же, что и для существующих вакцинаций. Таким образом, предпочтительное введение иммуногенного соединения или антигенного пептида, или фармацевтического препарата по настоящему изобретению представляет собой парентеральное, такое как подкожное, интрадермальное или внутримышечное введение. Однако иммуногенное соединение или антигенный пептид, или фармацевтический препарат по изобретению можно вводить индивидууму любым подходящим путем введения. Как известно специалисту, такую композицию (предпочтительно вакцинную композицию) можно вводить местным, пероральным, ректальным, назальным или парентеральным (например, внутривенным, интрадермальным, подкожным или внутримышечным) путями. Кроме того, композиции могут быть включены в матрицы с длительным высвобождением, такие как биоразлагаемые полимеры, полимеры, имплантируемые вблизи или в непосредственной близости к месту, к которому требуется доставка. Однако в предпочтительных вариантах осуществления композиции вводят внутримышечно или подкожно.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения иммуногенное соединение или антигенный пептид, или фармацевтический препарат, предпочтительно в форме вакцины, вводят вместе с адъювантом, предпочтительно оксигидроксидом алюминия. Согласно этому наиболее предпочтительному варианту осуществления, настоящее изобретение относится к использованию степени чистоты по Европейской фармакопее (оксигидроксид алюминия, монография 1664), более конкретно к продукту, произведенному Brenntag Biosector (2% алгидрогель), протестированному на соответствие EP. Алгидрогель доступен в трех вариантах: алгидрогель 1,3%, алгидрогель 2% и алгидрогель "85". Алгидрогель 2% был выбран в качестве международного стандарта для гелей гидроксида алюминия. Фармацевтический препарат по настоящему изобретению асептически сформулирован в подходящем буфере, предпочтительно изотоническом фосфатном буфере (от 1 мМ до 100 мМ), предпочтительно в концентрации $\geq 1,0$ мг/мл алгидрогеля (в пересчете на эквивалент

Al_2O_3 ; этот показатель (Al как «эквивалент Al_2O_3 ») используют в широком смысле для настоящего изобретения; таким образом, все дозы и количества, указанные в настоящей заявке, поскольку они относятся к оксигидроксиду алюминия, относятся к эквивалентам Al_2O_3 (оксигидроксид алюминий (алгидрогель)), даже более предпочтительно в концентрации $\geq 1,5$ мг/мл алгидрогеля (в пересчете на эквивалент Al_2O_3), наиболее предпочтительно в концентрации $\geq 2,0$ мг/мл алгидрогеля (в пересчете на эквивалент Al_2O_3). Количество соли алюминия для алгидрогеля дано в пересчете на эквивалент Al_2O_3 в соответствии с концентрацией, заявленной производителем (т.е. 2% алгидрогель соответствует 2% Al_2O_3 , т.е. 20 мг/мл). Эта концентрация может быть непосредственно преобразована в соответствующую концентрацию алюминия при использовании соответствующих молекулярных масс (20 мг/мл Al_2O_3 (M_w 101,96) соответствует 10,6 мг/мл алюминия (молекулярная масса 26,98)).

Носителем по настоящему изобретению может быть любая молекула подходящего и фармацевтически приемлемого носителя, не обязательно с линкером для соединения линкера с антигенным пептидом по изобретению (содержащим от X_1 до X_{12}).

По предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения антигенный пептид (который может быть 12-мерным пептидом) по настоящему изобретению связан, по меньшей мере, с одним фармацевтически приемлемым полипептидным носителем, предпочтительно CRM197 (перекрестно-реагирующий материал 197), KLN (гемоцианин морского блюдца), столбнячным токсином, альбумин-связывающим белком, бычьим сывороточным альбумином, или синтетическими слитыми пептидами, содержащими несколько эпитопов Т-клеток. Дополнительные носители или носитель или линкерные молекулы в составе носителя включают дендример (MAP; *Biol. Chem.* 358: 581), пептидные линкеры (или фланкирующие области), а также вспомогательные вещества, описанные в Singh et al., *Nat. Biotech.* 17 (1999), 1075-1081 (в частности, в таблице 1 этого документа), и O'Hagan et al., *Nature Reviews, Drug Discovery* 2 (9) (2003), 727-735 (в частности, эндогенные иммуно-потенцирующие соединения и системы доставки, описанные в ней), и другие или их смеси. Химию конъюгации (например, через гетеробифункциональные соединения, такие как GMBS и, конечно, также другие, как вызывается в «Bioconjugate Techniques», Greg T. Hermanson) в этом контексте можно выбирать из реакций, известных специалисту.

Кроме того, вакцинную композицию, содержащую иммуногенное соединение или антигенный пептид по настоящему изобретению, можно формулировать с адьювантом, предпочтительно низкорастворимой композицией алюминия, в частности, гидроксидом алюминия. Конечно, также можно использовать такие адьюванты, как фосфат алюминия

MF59, фосфат кальция, цитокины (например, IL-2, IL-12, GM-CSF), сапонины (например, QS21), производные MDP, олигонуклеотиды CpG, IC31, LPS, MPLA (которые включают MPL), полифосфазены, эмульсии (например, Фрейнда, SAF), липосомы, вирусомы, искомы, кохлеаты, микрочастицы PLG, поллоксамерные частицы, вирусоподобные частицы, термолабильный энтеротоксин (LT), холерный токсин (ХТ), дифтерийный токсин (ДТ), столбнячные токсины (СТ), мутантные токсины (например, LTK63 и LTR72), микрочастицы, липосомы и/или полимеризованные липосомы.

Пептид или полипептид по настоящему изобретению предпочтительно связан с носителем или адьювантом через линкер, который представляет собой NHS-полиэтиленоксид (ПЭО) (например, NHS-ПЭО₄-малеинимид). Альтернативы описаны выше.

Носитель предпочтительно содержит белок анатоксина. Белок анатоксина может быть природным белком анатоксина или его рекомбинантным вариантом, используемым в фармацевтических композициях. Токсины могут быть инактивированы, например, обработкой формальдегидом, глутаральдегидом, УДФ-диальдегидом, пероксидом, кислородом или мутацией (например, с использованием рекомбинантных способов). Мутантные дифтерийные токсины с пониженной токсичностью также можно получать с помощью рекомбинантных способов.

ДТ представляет собой перекрестно-реагирующие материалы дифтерийного токсина (DT-CRM) или дифтерийные анатоксины. DT-CRM относится к мутантному дифтерийному токсину, например, за счет мутации или химической модификации, так что он больше не содержит достаточного количества АДФ-рибозила. Неограничивающие примеры DT-CRM включают DT-CRM30, DT-CRM45, DT-CRM176, DT-CRM197 и DT-CRM228. Дифтерийный анатоксин представляет собой дифтерийный токсин, инактивированный формальдегидом. ДТ является коммерчески доступным или его можно получать известными в данной области способами, такими как технология рекомбинантных ДНК.

CRM197 представляет собой нетоксический вариант (т.е., анатоксин) дифтерийного токсина, который сохраняет иммунологические свойства дифтерийного токсина дикого типа. CRM197 отличается от дифтерийного токсина дикого типа одним основанием в структурном гене, что приводит к единственной аминокислотной замене глутаминовой кислоты на глицин. CRM197, как правило, выделяют из культур *Corynebacterium diphtheria* штамма C7 (P1 97), выращенных на среде на основе экстракта казामीновых кислот и дрожжей. CRM197 можно очищать с помощью ультрафильтрации, осаждения сульфатом аммония и ионообменной хроматографией. Альтернативно,

CRM197 можно получать рекомбинантным путем. CRM197 использовали при разработке гликоконъюгированных вакцин, таких как Hibtiter™, Menveo® или Prevnar®.

Столбнячный токсин получают и используют во всем мире для крупномасштабной иммунизации против столбняка (или тризма), вызываемого *Clostridium tetani*. Столбнячный токсин также применяют как отдельно, так и в составе вакцин против дифтерии и/или коклюша. Родительский белок, столбнячный токсин, обычно получают из культур *Clostridium tetani*. Столбнячный токсин имеет молекулярную массу приблизительно 150 кДа и состоит из двух субъединиц (приблизительно 100 кДа и примерно 50 кДа), связанных сульфидной связью. Токсин, как правило, детоксифицируют с помощью формальдегида и его можно очищать от культуральных фильтратов с применением известных способов, таких как осаждения сульфатом аммония или способы хроматографии. Столбнячный токсин также может быть инактивирован рекомбинантными генетическими способами. Столбнячный токсин также использовали в качестве переносчика белка в других вакцинах, включая пневмококковые конъюгатные вакцины. Также можно использовать смешанный носитель, например, пневмококковую конъюгатную вакцину в комбинации с CRM197, серотип 3 в комбинации со столбнячным токсином-носителем, серотип 3, конъюгированный с дифтерийным анатоксином.

Пептиды по настоящему изобретению представляют собой варианты нативной последовательности человеческого aSyn, т.е. AFFITOPE® или VARIOTOPE® (представляющий собой пептид, который содержит вариации последовательности по сравнению с исходной нативной последовательностью aSyn, но который демонстрирует аналогичные (такие же или улучшенные) характеристики иммунизации, т.е. способен вызывать иммунный ответ, аналогичный или более высокий, чем иммунный ответ, полученный нативной последовательностью aSyn). Таким образом, AFFITOPES® предназначены не для того, чтобы вызывать ответы цитотоксических или хелперных Т-клеток, а в первую очередь, чтобы избежать цитотоксических атак против любой ткани, достижимой для CD8+ Т-клеток, несущих линейную последовательность фрагментов иммунизирующего пептида, а затем, чтобы избежать ответов на пептиды, полученные из мишени, независимо от вакцины и, таким образом, генерации постоянно возобновляемого и неконтролируемого иммунного ответа. Эта технология AFFITOPE® или VARIOTOPE® была разработана с целью (i) преодоления толерантности к собственным белкам, (ii) получения высоких титров ответа антител на пептидную молекулу вакцины, которая перекрестно реагирует с нативным целевым белковым эпитопом, (iii) отсутствия индукции аутоиммунного ответа.

При осуществлении настоящего изобретения длина пептида, таким образом, была ограничена, достигнув 12 аминокислотных остатков (от X_1 до X_{12}). Антигенные пептиды по изобретению, как правило, имеют длину 11-20 аминокислот, предпочтительно 12-14 аминокислот. Особенно предпочтительно, когда антигенные пептиды содержат 12 или 14 аминокислот в длину. Они, как правило, содержат от 1 до 4, предпочтительно 2 или 3 аминокислотных мутаций по сравнению с нативной последовательностью альфа-синуклеина. Обратите внимание, однако, что могут быть разрешены удлинения аминокислот, которые не основаны на (или не идентичны) последовательности альфа-синуклеина, особенно на N-конце пептида. Такие дополнительные аминокислоты могут входить, например, в состав линкера. Могут присутствовать линкеры (включая аминокислотные или пептидные линкеры), которые ковалентно связывают пептид с другими молекулярными группами, такими как носитель. Линкер может содержать дополнительные аминокислоты, предпочтительно аминокислоты с незаряженными боковыми цепями, такие как глицины. Линкеры можно присоединять ко всем положениям иммуногенного пептида, при условии, что иммуногенные свойства пептидов существенно не ухудшаются. Например, линкеры могут быть связаны через N-концевую или C-концевую аминокислоту (X_1 или X_{12}); возможно также связывание внутри пептида. Однако предпочтительно связывать настоящие пептиды через N-конец пептида (X_1) с носителем, если пептиды по настоящему изобретению применяют в качестве иммуногенной композиции. Если пептиды по настоящему изобретению применяют для других целей, таких как препаративные молекулы (например, в процессе антителиоочистки) или диагностические зонды (например, для выявления антител в образцах человека), линкеры и носители могут быть более разнообразными, включая связывание пептидов по настоящему изобретению с поверхностями, т.е. твердыми поверхностями. Таким образом, пептиды по настоящему изобретению также можно использовать в различных анализах и наборах, в частности, в иммунологических анализах и наборах. Таким образом, особенно предпочтительно, чтобы пептиды по настоящему изобретению могли быть частью другого пептида или полипептида, например, они могут быть слиты или конъюгированы с ферментом, который используют в качестве репортера в иммунологическом анализе. Такие репортерные ферменты включают, например, флуоресцентные молекулы, такие как зеленый флуоресцентный белок (GFP), фосфатазы, такие как щелочная фосфатаза, или оксидазы/редуктазы, такие как пероксидаза хрена.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антигенному пептиду, имеющему структуру



где

D представляет собой аспарагиновую кислоту, E представляет собой глутаминовую кислоту, P представляет собой пролин и V представляет собой валин;

X₁ представляет собой L, K, A или S, где L представляет собой лейцин, K представляет собой лизин, A представляет собой аланин и S представляет собой серин;

X₂ представляет собой E или S, где E и S определены выше;

X₃ представляет собой D, E, K, N, A или S, где N представляет собой аспарагин и D, E, K, A и S определены выше;

X₄ представляет собой M, A, S, L или K, где M представляет собой метионин и A, S, L и K определены выше;

X₁₀ представляет собой N, S или A, где N, S и A определены выше;

X₁₂ присутствует или отсутствует и, если присутствует, представляет собой A, K, V, S или G, где G представляет собой глицин и A, K, V и S определены выше,

при условии, что X₁-X₂-X₃-X₄-P-V-D-P-D-X₁₀-E-X₁₂ не является L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A.

В случае сомнения, термин «имеющий структуру» следует понимать как «состоящий из (структуры)» данных аминокислотных остатков (т.е. исключая дополнительные аминокислотные остатки, например, у С-конца антигенного пептида). Не исключены малые модификации, такие как амидирование, этерификация, формилирование, ацетилирование, другое химическое замещение и т.д. на свободном С- (или N-) конце пептида или его боковых цепей, но предпочтительно не иметь таких модификаций. Такие незначительные модификации входят в объем термина «состоящий по существу из», как его применяют в настоящем документе. Эти 11-мерные или 12-мерные пептиды по настоящему изобретению («(антигенный) пептид(-ы) (по настоящему изобретению)»; «от X₁ до X₁₂»; и т.д.) могут быть предоставлены в композиции, подходящей для назначаемого применения для профилактики и/или лечения синуклеинопатий, особенно в фармацевтических композициях, предпочтительно в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем. Такие фармацевтические композиции можно вводить нуждающемуся в этом пациенту в эффективном количестве для достижения профилактического и/или терапевтического эффекта.

В одном из вариантов осуществления пептид по настоящему изобретению выбран из группы, состоящей из AEDMPVDPDNEA, LEAMPVDPDNEA, LEDAPVDPDNEA, LEDMAVDPDNEA, LEDMPADPDNEA, LEDMPVDPANEА, LEDMPVDPDNAA, SEDMPVDPDNEA, LSDMPVDPDNEA, LESMPVDPDNEA, LEDSPVDPDNEA, LEDMPSDPDNEA, LEDMPVSPDNEA, LEDMPVDPDSEA, LEDMPVDPDNSA,

LEDMPVDPDNES, LEEMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNEA, LENMPVDPDNEA,
 LEDKPVDPDNEA, LEDMPVDPDNEV, LEDMPVDPDNEG, LEDMPVDPDNEK,
 LESMPVDPDNES, SESMPVDPDNEA, LESSPVDPDNEA, SEDMPVDPDNES,
 LEDSPVDPDNES, SEDSPVDPDNEA, KEDMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNES,
 SEKMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNEK, KESMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEK,
 предпочтительно, KEDMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNEA, LESMPVDPDNES,
 LEKMPVDPDNES, SEKMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNEK, KESMPVDPDNEA,
 KESMPVDPDNEK.

Предпочтительно, пептид по настоящему изобретению выбран из группы, состоящей из KESMPVDPDNEA, LESMPVDPDNEA, LESMPVDPDNES, SEDMPVDPDNEA, LEEMPVDPDNEA, SESMPVDPDNEA, LEDMPVDPDNES, LEAMPVDPDNEA, LEDMPVDPDNEK, LEDMPVDPDNEV, LEKMPVDPDNEK, LSDMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNEA, KEDMPVDPDNEA, LENMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEK и KEDMPVDPDNEA, предпочтительно SEDMPVDPDNEA, LEEMPVDPDNEA, LESMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEA, KEDMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNEA и LESMPVDPDNES, особенно LEKMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEA и KEDMPVDPDNEA.

По другому аспекту, настоящее изобретение также относится к антигенному пептиду с аминокислотным линкером, имеющему структуру

Линкер- X_1 - X_2 - X_3 - X_4 -P-V-D-P-D- X_{10} -E- X_{12} ,

где X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_{10} и X_{12} определены выше, и где аминокислотный линкер содержит от 1 до 5 аминокислотных остатков.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления, пептид с аминокислотным линкером по настоящему изобретению содержит линкер, где аминокислотный остаток/аминокислотные остатки в линкере выбраны из группы, состоящей из глицина, цистеина, изолейцина, аланина, валина, лейцина, серина, глутаминовой кислоты, аспарагиновой кислоты, лизина, аспарагина, глутамина и их сочетаний, предпочтительно, где линкер выбран из группы C-, G-, CG-, CGG-, CCG-, GC-, GGC-, GCC-, GG-, и GGG-; особенно, где пептид с аминокислотным линкером выбран из группы GGKESMPVDPDNEA, GKESMPVDPDNEA, GGGKESMPVDPDNEA, CGGKESMPVDPDNEA, GCGKESMPVDPDNEA, GGCKESMPVDPDNEA, CCGKESMPVDPDNEA, CGCKESMPVDPDNEA, CCCKESMPVDPDNEA, CCKESMPVDPDNEA, CGKESMPVDPDNEA, GCKESMPVDPDNEA, CKESMPVDPDNEA, GGKESMPVDPDNEK, GGKEDMPVDPDNEA, GGKESMPVDPDNEK, GGKEDMPVDPDNEA, CLESMPVDPDNEA, CLESMPVDPDNES,

CSEMPVDPDNEA, CLEEMPVDPDNEA, CSESMPVDPDNEA, CLEDMPVDPDNEA, CLEAMPVDPDNEA, CLEDMPVDPDNEK, CLEDMPVDPDNEV, CGGKESMPVDPDNEA, CLEKMPVDPDNEK, CLSDMPVDPDNEA, CLEKMPVDPDNEA, CKEDMPVDPDNEA, CLENMPVDPDNEA, CGGKESMPVDPDNEK и CGGKEDMPVDPDNEA, особенно GGKESMPVDPDNEA, GKESMPVDPDNEA, GGGKESMPVDPDNEA, CGGKESMPVDPDNEA, GCGKESMPVDPDNEA, GGCKESMPVDPDNEA, CCGKESMPVDPDNEA, CGCKESMPVDPDNEA, CCKESMPVDPDNEA, CCKESMPVDPDNEA, CGKESMPVDPDNEA, GCKESMPVDPDNEA и CKESMPVDPDNEA.

Предпочтительно, в соответствии со всеми соответствующими аспектами настоящего изобретения

(a) X_{12} присутствует и нет дополнительного аминокислотного остатка на С-конце после X_{12} ; или

(b) X_{12} отсутствует и нет дополнительного аминокислотного остатка на С-конце после X_{11} .

В соответствии с этими конкретными предпочтительными вариантами осуществления антигенный пептид по изобретению не имеет дополнительных удлинений на С-конце (за исключением того, что могут присутствовать незначительные модификации, например, которые могут стабилизировать соединение или пептид (например, амидирование и т.д.)). В любом случае не должно присутствовать никаких дополнительных аминокислот на С-конце (в отличие от слитого белка, описанного, например, в WO 2005/108423 A1), который представляет собой нативную аминокислотную последовательность aSyn, т.е. конкретно Tyr₁₂₅ и Glu₁₂₆, которые могут связываться с высокой аффинностью с различными аллельными вариантами МНСI, и, следовательно, могут быть потенциальными эпитопами цитотоксических Т-клеток. Таким образом, на С-конце пептида не должен присутствовать аминокислотный остаток Y или дипептид YE, где Y представляет собой тирозин и E определена выше.

Пептиды и соединения по настоящему изобретению могут быть получены синтетически путем химического синтеза, который хорошо известен в данной области, либо в виде изолированного пептида, либо в составе другого полипептида. Альтернативно, пептиды и соединения можно получать в микроорганизме, который продуцирует пептид по настоящему изобретению, который затем выделяют и при желании дополнительно очищают. Пептиды и соединения можно получать в таких микроорганизмах, как бактерии, дрожжи или грибы, в клетках эукариот, таких как клетки млекопитающего или насекомого, или в рекомбинантных вирусных векторах, таких как

аденовирус, поксвирус, вирус герпеса, лесной вирус Семлики, бакуловирус, бактериофаг, вирус Синдбис или вирус Сендаи. Подходящие бактерии для продукции пептидов и соединений включают *E.coli*, *B.subtilis* или любую другую бактерию, которая способна экспрессировать пептиды, такие как пептидный мимотоп. Подходящие типы дрожжей для экспрессии пептидов и соединений включают *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida*, *Pichia pastoris* или любые другие дрожжи, способные экспрессировать пептиды. Соответствующие способы хорошо известны в данной области. Также способы для выделения и очистки рекомбинантно произведенных пептидов и соединений хорошо известны в данной области и включают, например, гель-фильтрацию, аффинную хроматографию, ионообменную хроматографию и т.д.

Чтобы облегчить выделение пептидов и соединений, можно получать слитый полипептид, где 12-мерный пептид трансляционно слит (ковалентно связан) с гетерологичным полипептидом, что делает возможным выделение с помощью аффинной хроматографии. Типичными гетерологичными полипептидами являются метка His (например, His₆; 6 гистидиновых остатков), метка GST (глутатион-S-трансфераза) и т.д. Слитый полипептид способствует не только очистке пептидов и соединений, но также может предотвращать деградацию при очистке. Если желательно удалить гетерологический полипептид после очистки, слитый полипептид может содержать участок расщепления, например, на стыке между пептидным мимотопом и гетерологичным полипептидом. Участок расщепления состоит из аминокислотной последовательности, которая расщепляется ферментом, специфичным для аминокислотной последовательности на участке (например, протеазы).

Антигенный пептид по изобретению, иммуногенное соединение по изобретению или фармацевтический препарат по изобретению предназначены для применения в терапии (т.е. в качестве лекарственного средства). Более конкретно, изобретение относится к антигенному пептиду по изобретению, иммуногенному соединению по изобретению или фармацевтическому препарату по изобретению для применения для лечения или профилактики синуклеинопатии. Изобретение также относится к применению антигенного пептида по изобретению, иммуногенного соединения по изобретению или фармацевтического препарата по изобретению для получения лекарственного средства для лечения или профилактики синуклеинопатии. Изобретение также относится к способу лечения или профилактики синуклеинопатии, предусматривающему введение антигенного пептида по изобретению, иммуногенного соединения по изобретению или фармацевтического препарата по изобретению нуждающемуся в этом индивидууму. В конкретных вариантах осуществления в

соответствии со всеми этими аспектами, синуклеинопатия выбрана из группы, состоящей из нарушений с тельцами Леви (НТЛ), особенно болезнь Паркинсона (БП), болезнь Паркинсона с деменцией (БПД) и деменция с тельцами Леви (ДТЛ), а также множественной системной атрофии (МСА) или нейродегенерации с накоплением железа в головном мозге типа I (NBIA типа I). В некоторых вариантах осуществления в соответствии с этими аспектами термин синуклеинопатии (или альфа-синуклеинопатии) используют для описания заболеваний, при которых обнаруживают агрегаты а-синуклеина, и включает первичные синуклеинопатии и сопутствующую патологию. К первичным синуклеинопатиям относятся болезнь Паркинсона (спорадическая, семейная с мутациями альфа-синуклеина, семейная с мутациями, отличными от альфа-синуклеина, истинная вегетативная недостаточность и дисфагия тельца Леви), деменция с тельцами Леви (ДТЛ; в том числе деменция с тельцами Леви (ДТЛ) («истинная» деменция с тельцами Леви), болезнь Паркинсона с деменцией (БПД)), или болезнь диффузных телец Леви, множественная системная атрофия (синдром Шай-Дрейгера, стриатонигральная дегенерация и оливопонтocerebellарная атрофия). Кроме того, поражения аSyn можно выявлять как сопутствующую патологию при следующих заболеваниях: спорадическая болезнь Альцгеймера, семейная болезнь Альцгеймера с мутациями APP, семейная болезнь Альцгеймера с мутациями PS-1, PS-2 или другими мутациями, семейная британская деменция, миозит с тельцами включения, травматическое повреждение головного мозга, хроническая травматическая энцефалопатия, деменция боксеров, таупатии (болезнь Пика, лобно-височная деменция, прогрессирующий супрануклеарный паралич, корково-базальная дегенерация, лобно-височная деменция с паркинсонизмом, связанным с хромосомой 17 и синдромом Ниманна-Пика типа C1), синдром Дауна, болезнь Крейтцфельда-Якоба, болезнь Хантингтона, болезнь мотонейронов, боковой амиотрофический склероз (спорадический, семейный и комплекс БАС-деменция Гуама), нейроаксональная дистрофия, нейродегенерация головного мозга с накоплением железа типа 1 (синдром Галлервордена-Шпатца), прионные болезни, болезнь Герстманна-Штрауслера-Шейнкера, атаксия телеангиоэктазия, синдром Мейге, подострый склерозирующий панэнцефалит, болезнь Гоше, болезнь Краббе, а также другие нарушения лизосомального накопления (в том числе синдром Куфора-Ракеба и синдром Санфилиппо), или нарушение поведения во сне с быстрыми движениями глаз (БДГ).

Согласно всем этим аспектам, индивидуум, которого лечат, представляет собой млекопитающего индивидуума, предпочтительно человека. Антигенный пептид по изобретению, иммуногенное соединение по изобретению или фармацевтический препарат по изобретению вводят в количестве, эффективном для лечения или профилактики

синуклеинопатии. Профилактика предпочтительна с использованием вакцинных композиций по изобретению. Профилактика включает отсрочку начала и/или тяжести заболевания (по сравнению с ситуацией без введения), а также полную профилактику заболевания. Лечение включает улучшение состояния одного или нескольких симптомов заболевания, предотвращение или замедление прогрессирования заболевания (по сравнению с ситуацией без введения), а также полное излечение заболевания. Подходящ дозировки и способы введения описываются в настоящем документе, а их варианты могут быть определены эмпирически практикующим врачом.

Изобретение может быть дополнительно определено следующими пронумерованными пунктами:

1. Иммуногенное соединение, имеющее структуру

Носитель- X_1 - X_2 - X_3 - X_4 -P-V-D-P-D- X_{10} -E- X_{12} ,

где

Носитель представляет собой полипептидный носитель, ковалентно связанный с X_1 ; предпочтительно содержащий линкерную молекулу, которая ковалентно связывает молекулу носителя с пептидом X_1 - X_2 - X_3 - X_4 -P-V-D-P-D- X_{10} -E- X_{12} ;

D представляет собой аспарагиновую кислоту, E представляет собой глутаминовую кислоту, P представляет собой пролин, и V представляет собой валин;

X_1 представляет собой L, K, A или S, где L представляет собой лейцин, K представляет собой лизин, A представляет собой аланин и S представляет собой серин;

X_2 представляет собой E или S, где E и S определены выше;

X_3 представляет собой D, E, K, N, A или S, где N представляет собой аспарагин и D, E, K, A и S определены выше;

X_4 представляет собой M, A, S, L или K, где M представляет собой метионин и A, S, L и K определены выше;

X_{10} представляет собой N, S или A, где N, S и A определены выше;

X_{12} присутствует или отсутствует и, если присутствует, представляет собой A, K, V, S или G, где G представляет собой глицин и A, K, V и S определены выше,

при условии, что X_1 - X_2 - X_3 - X_4 -P-V-D-P-D- X_{10} -E- X_{12} не является L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A.

2. Иммуногенное соединение по п.1, где X_1 представляет собой L, S или K, X_2 представляет собой E или S, X_3 представляет собой S, D, E, A, K или N, X_4 представляет собой M, X_{10} представляет собой N и/или X_{12} представляет собой A, S, K или V, предпочтительно, где X_1 представляет собой L или K, X_2 представляет собой E, X_3 представляет собой S, D, E, K или A, X_4 представляет собой M, X_{10} представляет собой N,

и/или X_{12} представляет собой А, S или К, особенно, где X_1 представляет собой L или К, X_3 представляет собой D, К или S и X_{12} представляет собой А.

3. Иммуногенное соединение по п.1 или 2, где линкерная молекула содержит, по меньшей мере, один аминокислотный остаток цистеина и/или глицина, предпочтительно связанный при помощи химического линкера с молекулой полипептидного носителя, особенно, где линкерная молекула образована NHS-полиэтиленоксидом (ПЭО) (например, NHS-ПЭО₄-малеинимид).

4. Иммуногенное соединение по любому из пп. 1-3, где пептид X_1 - X_2 - X_3 - X_4 -P-V-D-P-D- X_{10} -E- X_{12} выбран из группы, состоящей из KESMPVDPDNEA, LESMPVDPDNEA, LESMPVDPDNES, SEDMPVDPDNEA, LEEMPVDPDNEA, SESMPVDPDNEA, LEDMPVDPDNES, LEAMPVDPDNEA, LEDMPVDPDNEK, LEDMPVDPDNEV, LEKMPVDPDNEK, LSDMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNEA, LENMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEK и KEDMPVDPDNEA, предпочтительно SEDMPVDPDNEA, LEEMPVDPDNEA, LESMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEA, KEDMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNEA и LESMPVDPDNES, особенно LEKMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEA и KEDMPVDPDNEA.

5. Иммуногенное соединение по любому из пп. 1-4, где пептид X_1 - X_2 - X_3 - X_4 -P-V-D-P-D- X_{10} -E- X_{12} представляет собой KESMPVDPDNEA.

6. Иммуногенное соединение по любому из пунктов 1-5, где молекула полипептидного носителя представляет собой или содержит молекулу фармацевтически приемлемого носителя, выбранную из группы, состоящей из гемоцианина морского блюдца (KLH), столбнячного токсина, термолабильного энтеротоксина (LT), холерного токсина (ХТ), дифтерийного токсина (ДТ) и их вариантов, особенно, CRM 197, столбнячных токсинов (СТ), мутантных токсинов, альбумин-связывающих белков и бычьего сывороточного альбумина.

7. Иммуногенное соединение по любому из пп. 1-6 для применения для лечения или профилактики синуклеинопатий, предпочтительно для применения для лечения или профилактики синуклеинопатий, выбранных из группы, состоящей из нарушений с тельцами Леви (НТЛ), особенно, болезни Паркинсона (БП), болезни Паркинсона с деменцией (БПД) и деменции с тельцами Леви (ДТЛ), а также множественной системной атрофии (МСА) или нейродегенерации с накоплением железа в головном мозге типа I (NBIA типа I).

8. Фармацевтический препарат, содержащий соединение по любому из пп. 1-7 и фармацевтически приемлемый носитель, предпочтительно для применения в качестве вакцины при лечении или профилактике синуклеинопатии, предпочтительно

синуклеинопатии, выбранной из группы, состоящей из нарушений с тельцами Леви (НТЛ), особенно, болезни Паркинсона (БП), болезни Паркинсона с деменцией (БПД) и деменции с тельцами Леви (ДТЛ), а также множественной системной атрофии (МСА) или нейродегенерации с накоплением железа в головном мозге типа I (NBIA типа I).

9. Фармацевтический препарат по п. 8, где препарат формулируют в виде вакцины с адъювантом, предпочтительно с адъювантом, выбранным из группы, состоящей из фосфата алюминия MF59, фосфата кальция, цитокинов (например, IL-2, IL-12, GM-CSF), сапонинов (например, QS21), производных MDP, олигонуклеотидов CpG, IC31, LPS, MPL, полифосфазенов и гидроксида алюминия, или их смеси; особенно, с гидроксидом алюминия в качестве адъюванта.

10. Фармацевтический препарат по п.8 или 9, где соединение по любому из пунктов 1-10 содержится в количестве от 0,1 нг до 10 мг, предпочтительно от 10 нг до 1 мг, в частности от 100 нг до 100 мкг.

11. Фармацевтический препарат по любому из пунктов 8-10, где препарат формулируют для подкожного, интрадермального или внутримышечного введения; и/или где препарат формулируют в виде липосом, виросом, иском, кохлеатов или эмульсий.

12. Антигенный пептид, имеющий структуру

$X_1-X_2-X_3-X_4-P-V-D-P-D-X_{10}-E-X_{12}$,

где

D представляет собой аспарагиновую кислоту, E представляет собой глутаминовую кислоту, P представляет собой пролин и V представляет собой валин; (C-) представляет собой цистеин, присутствующий или нет;

X_1 представляет собой L, K, A или S, где L представляет собой лейцин, K представляет собой лизин, A представляет собой аланин и S представляет собой серин;

X_2 представляет собой E или S, где E и S определены выше;

X_3 представляет собой D, E, K, N, A или S, где N представляет собой аспарагин и D, E, K, A и S определены выше;

X_4 представляет собой M, A, S, L или K, где M представляет собой метионин и A, S, L и K определены выше;

X_{10} представляет собой N, S или A, где N, S и A определены выше;

X_{12} присутствует или отсутствует и, если присутствует, представляет собой A, K, V, S, или G, где G представляет собой глицин и A, K, V и S определены выше,

при условии, что $X_1-X_2-X_3-X_4-P-V-D-P-D-X_{10}-E-X_{12}$ не является L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A.

13. Пептид по п. 12, выбранный из группы, состоящей из KESMPVDPDNEA, LESMPVDPDNEA, LESMPVDPDNES, SEDMPVDPDNEA, LEEMPVDPDNEA, SESMPVDPDNEA, LEDMPVDPDNES, LEAMPVDPDNEA, LEDMPVDPDNEK, LEDMPVDPDNEV, LEKMPVDPDNEK, LSDMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNEA, LENMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEK и KEDMPVDPDNEA, предпочтительно SEDMPVDPDNEA, LEEMPVDPDNEA, LESMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEA, KEDMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNEA и LESMPVDPDNES, особенно, LEKMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEA и KEDMPVDPDNEA.

14. Пептид с аминокислотным линкером, имеющий структуру

Линкер- X_1 - X_2 - X_3 - X_4 -P-V-D-P-D- X_{10} -E- X_{12} ,

где X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_{10} , и X_{12} определены как в пункте 13, и где аминокислотный линкер содержит от 1 до 5 аминокислотных остатков.

15. Пептид с аминокислотным линкером по п. 14, где аминокислотный остаток/остатки в линкере выбраны из группы, состоящей из глицина, цистеина, изолейцина, аланина, валина, лейцина, серина, глутаминовой кислоты, аспарагиновой кислоты, лизина, аспарагина, глутамина и их сочетаний, предпочтительно где линкер выбран из группы C-, G-, CG-, CGG-, CCG-, GC-, GGC-, GCC-, GG- и GGG-; особенно, где пептид с аминокислотным линкером выбран из группы GGKESMPVDPDNEA, GKESMPVDPDNEA, GGGKESMPVDPDNEA, CGGKESMPVDPDNEA, GCGKESMPVDPDNEA, GGCKESMPVDPDNEA, CCGKESMPVDPDNEA, CGCKESMPVDPDNEA, CCKESMPVDPDNEA, CCKESMPVDPDNEA, CGKESMPVDPDNEA, GCKESMPVDPDNEA, CKESMPVDPDNEA, GGKESMPVDPDNEK, GGKEDMPVDPDNEA, GGKESMPVDPDNEK, CLESMPVDPDNEA, CLESMPVDPDNES, CSEDMPVDPDNEA, CLEEMPVDPDNEA, CSESMPVDPDNEA, CLEDMPVDPDNES, CLEAMPVDPDNEA, CLEDMPVDPDNEK, CLEDMPVDPDNEV, CGGKESMPVDPDNEA, CLEKMPVDPDNEK, CLSDMPVDPDNEA, CLEKMPVDPDNEA, CKEDMPVDPDNEA, CLENMPVDPDNEA, CGGKESMPVDPDNEK, и CGGKEDMPVDPDNEA, особенно, GGKESMPVDPDNEA, GKESMPVDPDNEA, GGGKESMPVDPDNEA, CGGKESMPVDPDNEA, GCGKESMPVDPDNEA, GGCKESMPVDPDNEA, CCGKESMPVDPDNEA, CGCK-ESMPVDPDNEA, CCKESMPVDPDNEA, CCKESMPVDPDNEA, CGKESMPVDPDNEA, GCKESMPVDPDNEA и CKESMPVDPDNEA.

16. Иммуногенное соединение по любому из пунктов 1-7 или пептид с аминокислотным линкером по пункту 14 или 15, где линкерная молекула или

аминокислотный линкер не содержит аминокислот, выбранных из группы, состоящей из пролина, аргинина или гистидина.

17. Иммуногенное соединение или пептид с аминокислотным линкером по п. 16, где на С-конце пептида отсутствует аминокислотный остаток Y или дипептидная цепь YE, где Y представляет собой тирозин и E определена выше; предпочтительно, где

(a) X₁₂ присутствует и где нет дополнительного аминокислотного остатка на С-конце после X₁₂; или

(b) X₁₂ отсутствует и где нет дополнительного аминокислотного остатка на С-конце после X₁₁.

18. Применение иммуногенного соединения по любому из пунктов 1-7, 16 и 17 или антигенного пептида по пунктам 12 или 13 или пептида с аминокислотным линкером по пунктам 14-17 для получения лекарственного средства для лечения или профилактики синуклеинопатий, предпочтительно для лечения или профилактики синуклеинопатий, выбранных из группы, состоящей из нарушений с тельцами Леви (НТЛ), особенно, болезни Паркинсона (БП), болезни Паркинсона с деменцией (БПД) и деменции с тельцами Леви (ДТЛ), а также множественной системной атрофии (МСА) или нейродегенерации с накоплением железа в головном мозге типа I (NBIA типа I).

19. Способ лечения или профилактики синуклеинопатий, предпочтительно лечения или профилактики синуклеинопатии, выбранной из группы, состоящей из состоящей из нарушений с тельцами Леви (НТЛ), особенно, болезни Паркинсона (БП), болезни Паркинсона с деменцией (БПД) и деменции с тельцами Леви (ДТЛ), а также множественной системной атрофии (МСА) или нейродегенерации с накоплением железа в головном мозге типа I (NBIA типа I), где эффективное количество иммуногенного соединения по любому из пунктов 1-7, 16 и 17 или антигенного пептида по п. 12 или 13 или пептид с аминокислотным линкером по пп. 14-17, вводят человеку, нуждающемуся в таком лечении или профилактике.

Сокращения, используемые в настоящем документе:

а/к - аминокислота

АТ - антитело

аSyn – альфа-синуклеин

БСА - бычий сывороточный альбумин

bSyn - бета синуклеин

ЦНС - центральная нервная система

ДТЛ - деменция с тельцами Леви

ДГА - докозагексаеновая кислота (очищенная)

EC₅₀ - Полумаксимальная эффективная концентрация

ИФА - твердофазный иммуноферментный анализ

Fc - проточная ячейка

FELASA - Федерация научных ассоциаций по лабораторным животным

ч - час(-ы)

HBS - физиологический раствор буфера HEPES

HNE - 4-гидрокси-2-ноненал

ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография

HRP - пероксидаза хрена

IC₅₀ – полумаксимальная ингибирующая концентрация

ИГХ - иммуногистохимия

IQR – межквартильный диапазон

IR - иммунный ответ

кДа - килодальтон

KLH – гемоцианин морского блюдца

ТЛ - тельце Леви/тельца Леви

МАТ - моноклональное антитело

МСА - множественная системная атрофия

ОП - Оптическая плотность

ОП_{max/2} - Полумаксимальная оптическая плотность

БП - болезнь Паркинсона

RT - комнатная температура

ЕО – единицы ответа

SAIT – специфическая активная иммунотерапия

п/к - подкожный

SEM - стандартная ошибка среднего

ЧС - черная субстанция

ППР - поверхностный плазмонный резонанс

Vs – по сравнению с

wt - дикий тип

Изобретение дополнительно описано посредством следующих примеров и фигур, но не ограничивается ими.

Фигура 1: Схематическая временная динамика экспериментов. Инъекции показаны стрелками, а забор крови – каплями. PP: Начальная плазма, EP: Конечная плазма. Pn: Плазма n. Wn: Неделя эксперимента.

Фигура 2: Сравнение перекрестно реагирующих антител к aSyn, индуцированных p4456 и p4572 или соответствующим нативным эпитопом aSyn разной длины. (A) Представлены концентрации индуцированных антител против белка aSyn из конечной плазмы каждой отдельной мыши. Столбцы представляют средние значения с SEM. Экстремальные выбросы (за пределами 3-кратного IQR) были удалены с графика (B). Относительное положение введенных пептидов вдоль аминокислотной последовательности нативной последовательности aSyn. p9524 использовали в качестве каркаса для дальнейшей разработки AFFITOPE® и он выделен серым цветом.

Фигура 3: Иммуногенность пептидов (поставляемых в виде конъюгатов пептид/белок-носитель) с последовательностью aSyn а/к113-124 с одиночными заменами аланина (A) или серина (B). Определяли групповую медиану концентраций антител к aSyn в конечной плазме, полученной от отдельных иммунизированных мышей, и устанавливали по отношению к концентрации антител к aSyn, вызванных вакцинацией p9524, которая была принята за 100%. Последовательности вводимых пептидов показаны в таблице 3 и 4.

Фигура 4: Иммуногенность пептидов (поставляемых в виде конъюгатов пептид/белок-носитель) с последовательностью aSyn а/к 113-124 с заменами одной аминокислоты в положениях 1 или 3 (A) и 4 или 12 (B). Определяли групповую медиану концентраций антител к aSyn в конечной плазме, полученной от отдельных иммунизированных мышей, и устанавливали по отношению к концентрации антител к aSyn, вызванных вакцинацией p9524, которая была принята за 100%. Последовательности вводимых пептидов показаны в таблице 7 и 8.

Фигура 5: Иммуногенность к aSyn, индуцированная последовательностью aSyn а/к 113-124 с двойной заменой серина и других аминокислот. Определяли групповую медиану концентраций антител к aSyn в конечной плазме, полученной от отдельных иммунизированных мышей, и устанавливали по отношению к концентрации антител к aSyn, вызванных вакцинацией p9524, которая была принята за 100%. Последовательности вводимых пептидов показаны в таблице 11.

Фигура 6: Иммуногенность к aSyn, индуцированная последовательностью aSyn а/к₁₁₃₋₁₂₄ и последовательностями, удлиненными с N-конца. Определяли групповую медиану концентраций антител к aSyn в конечной плазме, полученной от отдельных иммунизированных мышей, и устанавливали по отношению к концентрации антител к aSyn, вызванных вакцинацией p10074, которая была принята за 100%. Последовательности вводимых пептидов показаны в таблице 13.

Фигура 7: Иммуногенность к aSyn, индуцированная последовательностью aSyn a/k₁₁₃₋₁₂₄, последовательностями, удлиненными с N-конца, и последовательностью aSyn a/k₁₁₅₋₁₂₁ p4456. Определяли групповую медиану концентраций антител к aSyn в конечной плазме, полученной от отдельных иммунизированных мышей, и устанавливали по отношению к концентрации антител к aSyn, вызванных вакцинацией p4456, которая была принята за 100%. Последовательности вводимых пептидов показаны в таблице 13.

Фигура 8: Иммуногенность последовательностей p10033 и p10118, нацеленных на aSyn, и их последовательностей, укороченных с C-конца. (A) Определяли групповую медиану концентраций антител к aSyn в конечной плазме, полученной от отдельных иммунизированных мышей, и устанавливали по отношению к концентрации антител к aSyn, вызванных вакцинацией p10033, которая была принята за 100%. (B) Определяли групповую медиану концентраций антител к aSyn в конечной плазме, полученной от отдельных иммунизированных мышей, и устанавливали по отношению к концентрации антител к aSyn, вызванных вакцинацией p10118, которая была принята за 100%. Последовательности вводимых пептидов показаны в таблице 16.

Фигура 9: ИГХ-окрашивание посмертного среза головного мозга человека с ДТЛ с помощью антител, индуцированных кандидатными AFFITOPE®. Антитела, используемые на каждой панели, индуцируют пептидом, показанным сверху соответствующей панели. Подчеркнутые буквы обозначают аминокислоты, которые отличаются от нативной последовательности. Полосы размеров показывают 50 мкМ на основных изображениях и 10 мкМ в меньшем поле в правом нижнем углу, фокусируясь на отдельных тельцах Леви (ТЛ).

Фигура 10: Предпочтительное связывание с олигомерными и токсичными видами aSyn по сравнению с мономерными формами (данные ViaCore). Сенсограммы устойчивости связывания антител, индуцированных кандидатными AFFITOPE®, и моноклональных антител LB509 и 28A7 с олигомерными (красная кривая) или мономерными видами aSyn (зеленая кривая). Синие линии обозначают отрицательный контроль (связывание только с буфером HBS). Ось x: длительность (сек), ось y: относительные единицы ответа связывания.

Фигура 11: Конкурентный ИФА, показывающий зависящее от концентрации ингибирование связывания специфичных к кандидатным AFFITOPE® антител с мономерами, олигомерами и филаментами aSyn. Очищенные антитела из мышей, иммунизированных кандидатными AFFITOPE®, предварительно инкубировали с увеличивающимися количествами различных видов aSyn, а затем тестировали на связывание с олигомерами aSyn, связанными с планшетами. Ингибирование связывания

мономерным aSyn показано красными кривыми, ингибирование фибриллярным aSyn – синими кривыми, ингибирование олигомерами – зелеными кривыми. Ось x: десятичный логарифм концентрации видов aSyn (нг/мл), ось y: значение ОП 405, измеренное с каждым видом aSyn и концентрацией.

Примеры

Идентификация aSyn-AFFITOPE®

Учитывая потенциальную токсичность различных агрегатов aSyn, терапевтические подходы к синуклеинопатиям могут включать снижение уровней или накопления внутриклеточных и внеклеточных aSyn. Тот факт, что олигомерный aSyn способен секретироваться в межклеточное пространство и способен перемещаться от одного пораженного нейрона или (например, в случае MCA) олигодендрокита к соседнему нейрону или нейроглиальной клетке прионоподобным образом (Lee et al., 2008, Lashuel et al., 2013, Bengoa-Vergniory et al., 2017, Bernis et al., 2015) открывает возможности для такого терапевтического подхода, как специфическая активная иммунотерапия (SAIT) AFFIRIS, направленная на перенос aSyn длительным образом. Короткие синтетические пептиды AFFITOPE® PD01 и PD03, имитирующие определенные области aSyn, были протестированы в качестве соединений для SAIT в клинических испытаниях фазы I при БП - PD01A (NCT01568099; Volc et al., 2020) и PD03A (NCT02267434)- и при множественной системной атрофии (MCA) у пациентов (PD01 и PD03) (NCT02270489). Было показано, что средства хорошо переносятся и вызывают антитела, специфичные к aSyn, с предпочтением олигомерных aSyn.

В ходе настоящего изобретения было разработано второе поколение aSyn-нацеленных AFFITOPE®, которые индуцировали более высокие титры и перекрестную реактивность к белку aSyn, чем наблюдаемые для PD01 и PD03, соответственно. Кроме того, в центре внимания при селекции была также способность индуцированного антитела различать агрегированные и токсичные виды aSyn (олигомерный aSyn) и мономерный белок aSyn. Таким образом, предполагают, что связывание AFFITOPE®-индуцированного антитела с чрезмерно представленными мономерными видами aSyn на периферии будет незначительным, однако предпочтительно будет происходить связывание с токсичными олигомерными и недостаточно представленными видами aSyn в ЦНС и на периферии.

Для выявления AFFITOPE® с высоким потенциалом был выбран эпитоп aSyn a/k₁₁₃₋₁₂₄. Были применены четко определенные критерии отбора, такие как высокая иммуногенность, высокая перекрестная реактивность к нативному эпитопу aSyn и связывание индуцированных антител с высокой селективностью по отношению к

олигомерным и фибриллярным токсичным видам aSyn (связывание олигомеров больше, чем связывание фибрилл).

Стратегия отбора состояла из нескольких стадий: (i) обнаружение эпитопа внутри С-конца белка-мишени aSyn для выявления высокоиммуногенного и подходящего эпитопа, (ii) аланиновое сканирование для выявления положений в нативной последовательности мишени, которые можно заменить для повышения иммуногенности и перекрестной реактивности, (iii) сериновое сканирование для выявления положений в нативной последовательности мишени, которые можно заменить для повышения иммуногенности и перекрестной реактивности, (iv) двойные замены серина в нативной последовательности мишени, (v) замены аминокислот, отличных от Ala или Ser, способные улучшить иммуногенность и перекрестную реактивность по отношению к aSyn, и (vi) удаление одной аминокислоты на С-конце из двух выбранных последовательностей AFFITOPE®.

Схема иммунизации во всех экспериментах *in vivo*

Во всех экспериментах, описываемых в настоящем документе, мыши BALB/c получали 3 инъекции с последовательностями AFFITOPE® или нативного эпитопа aSyn (10 мкг чистого пептида на инъекцию) с интервалами раз в две недели (фигура 1).

Поиск эпитопов внутри С-конца белка-мишени aSyn (эксперимент *in vivo* aSyn-28)

Был проведен скрининг эпитопов на высокоиммуногенные последовательности в С-концевой области белка aSyn. Для этой цели, использовали отрезки аминокислот разной длины, варьирующей от 7 до 13 аминокислот, для исследований иммуногенности на мышах дикого типа BALB/c (таблица 1, фигура 1). Параллельно для сравнения были включены ранее отобранные AFFITOPE® от AFFiRiS, p4456 и p4572. Плазму от всех животных собирали через две недели после третьей иммунизации и затем анализировали с помощью ИФА для определения титров против введенного пептида и белка aSyn, а также концентраций антител, реагирующих на aSyn. Пептид p9524 соответствующий последовательности aSyn а/к₁₁₃₋₁₂₄, индуцировал наибольшее количество aSyn-специфических антител (фигура 2, Таблица 2). Основываясь на этих выводах, эту последовательность выбирали как нативную целевую последовательность для дальнейшего отбора кандидата AFFITOPE®. Два других пептида, p9964 и p9556, которые давали также высокие титры антител к aSyn, были исключены из дальнейшей разработки. Пептид p9964 содержит аминокислоты Y₁₂₅ и E₁₂₆, и для пептидных фрагментов, полученных из p9964, были теоретически рассчитано анализами *in silico* связывание с высокой аффинностью с различными аллельными вариантами МНСI и, таким образом,

они могут быть потенциальными эпитопами цитотоксических Т-клеток (www.syfpeithi.de). Пептид p9556 не был выбран для дальнейшей разработки, поскольку он не охватывает потенциально связанный с патологией калпаиновый участок расщепления aSyn L₁₁₃/E₁₁₄. В таблице 2 обобщены титры к aSyn, обнаруженные в плазме мышей, индуцированных AFFITOPE®.

Таблица 1: Постановка эксперимента aSyn-28.

В таблице показаны лекарственный препарат, последовательность пептида в лекарственном препарате и идентификационные номера соответствующей последовательности.

ID	Группа	Лекарственный препарат	Последовательность	Дополнительная информация
1	1	p4456-CRM197 Гидроксид алюминия	C-DQPVLDP	aSyn115-121 (M→Q, D→L)
2	2	p4572-CRM197 Гидроксид алюминия	C-YDRPVQPDR	aSyn114-122 (E→Y, M→R, D→Q, N→R)
3	3	p9964-CRM197- Гидроксид алюминия	C- EDMPVDPDNEA YE	aSyn114-126
4	4	p9524-CRM197 Гидроксид алюминия	C- LEDMPVDPDNE A	aSyn113-124
5	5	p9556-CRM197 Гидроксид алюминия	C-DMPVDPDNEA	aSyn115-124
6	6	p9557-CRM197 Гидроксид алюминия	C-EDMPVDPDNE	aSyn114-123
7	7	p9663-CRM197 Гидроксид алюминия	C-VDPDNEAYE	aSyn118-126

Таблица 2: aSyn-28, основные результаты, включая титры, концентрацию индуцированного антитела и перекрестную реактивность. Все параметры оценивали у отдельных мышей, и значения относятся к медианам. Концентрацию антител к aSyn в

плазме иммунизированных мышей экстраполировали из эталонной кривой, полученной с помощью MAT LB509.

ID последовательности	Группа	Титры против инъектированного пептида	Титры против aSyn	Концентрация АТ к aSyn [мкг/мл]
1	1	98101	22951	97,0
2	2	114544	12449	49,5
3	3	62282	88308	375,1
4	4	90418	91136	420,9
5	5	78491	90089	376,9
6	6	33753	29295	117,5
7	7	93592	30084	129,7

Аланиновое сканирование по эпитопу aSyn113-124 (aSyn-30) и сериновое сканирование (aSyn-31)

На следующем этапе каждая аминокислотная позиция нативной последовательности aSyn₁₁₃₋₁₂₄ была заменена либо аланином, либо серином для определения важности замещаемых позиций для поддержания или усиления иммуногенности (таблицы 3 и 4). Мышей BALB/c инъектировали три раза соответствующими AFFITOPE® и через две недели после третьей и последней инъекции плазму каждой отдельной мыши собирали и анализировали с помощью ИФА для определения титров, индуцированных AFFITOPE®, и концентраций антител к aSyn. Аланиновое сканирование показало, что Leu в положении 1 (p9988) и Asp в положении 3 (p9990) в последовательности aSyn a/k₁₁₃₋₁₂₄ (p9524) не существенны, и, с другой стороны, их замена на Ala приводит к более высокой перекрестной реактивности к aSyn (фигура 3А). Сериновое сканирование, т.е. замена каждой нативной аминокислоты в последовательности aSyn 113-124 на серин (фигура 3В), выявило более высокую перекрестную реактивность с aSyn за счет замены аминокислот в положениях 1 (p9999), 2 (p10000), 3 (p10001) и 12 (p10010) на серин. Таблицы 5 и 6 суммируют индуцированные титры против aSyn, присутствующего в плазме иммунизированных мышей, относительно титров, индуцированных последовательностью WT.

Таблица 3: Постановка эксперимента с aSyn-30.

В таблице показаны различные группы лечения, соответствующие используемые лекарственные препараты, последовательность пептида в лекарственном препарате и идентификационные номера соответствующей последовательности.

ID последовательности	Группа	Лекарственный препарат	Последовательность
4	1	p9524-CRM197 Гидроксид алюминия	C-LEDMPVDPDNEA
8	2	p9988-CRM197 Гидроксид алюминия	C-AEDMPVDPDNEA
9	3	p9989-CRM197 Гидроксид алюминия	C-LADMPVDPDNEA
10	4	p9990-CRM197 Гидроксид алюминия	C-LEAMPVDPDNEA
11	5	p9991-CRM197 Гидроксид алюминия	C-LEDAPVDPDNEA
12	6	p9992-CRM197 Гидроксид алюминия	C-LEDMAVDPDNEA
13	7	p9993-CRM197 Гидроксид алюминия	C-LEDMPADPDNEA
14	8	p9994-CRM197 Гидроксид алюминия	C-LEDMPVAPDNEA
15	9	p9995-CRM197 Гидроксид алюминия	C-LEDMPVDADNEA
16	10	p9996-CRM197 Гидроксид алюминия	C-LEDMPVDPANEA
17	11	p9997-CRM197 Гидроксид алюминия	C-LEDMPVDPDAEA
18	12	p9998 Гидроксид алюминия -CRM197	C-LEDMPVDPDNEA

Таблица 4: Постановка эксперимента aSyn-31. В таблице показаны различные группы лечения, соответствующие используемые лекарственные препараты, последовательность пептида в лекарственном препарате и идентификационные номера соответствующей последовательности.

ID последовательно сти	Групп а	Лекарственный препарат	Последовательност ь
4	1	p9524-CRM197 Гидроксид алюминия	C-LEDMPVDPDNEA
19	2	p9999-CRM197 Гидроксид алюминия	C-SEDMPVDPDNEA
20	3	p10000-CRM197 Гидроксид алюминия	C-LSDMPVDPDNEA
21	4	p10001-CRM197 Гидроксид алюминия	C-LESMPVDPDNEA
22	5	p10002-CRM197 Гидроксид алюминия	C-LEDSPVDPDNEA
23	6	p10003-CRM197 Гидроксид алюминия	C-LEDMSVDPDNEA
24	7	p10004-CRM197 Гидроксид алюминия	C-LEDMPSPDPDNEA

25	8	p10005-CRM197 алюминия	Гидроксид	C-LEDMPVSPDNEA
26	9	p10006-CRM197 алюминия	Гидроксид	C-LEDMPVDSNEA
27	10	p10007-CRM197 алюминия	Гидроксид	C-LEDMPVDPSNEA
28	11	p10008-CRM197 алюминия	Гидроксид	C-LEDMPVDPDSEA
29	12	p10009-CRM197 алюминия	Гидроксид	C-LEDMPVDPDNSA
30	13	p10010-CRM197 алюминия	Гидроксид	C-LEDMPVDPDNES

Таблица 5: aSynс-30, основные результаты. Титры к aSyn оценивали у отдельных мышей, и значения представляют собой медианы относительно медианы, полученной с p9524.

ID последовательности	Группа	Титр относительно p9524 (%)
4	1	100,0
8	2	391,8
9	3	56,2
10	4	581,0
11	5	170,0
12	6	215,5
13	7	117,0
14	8	63,9
15	9	50,1
16	10	127,7
17	11	90,4
18	12	114,4

Таблица 6: aSynс-31, основные результаты. Титры к aSyn оценивали у отдельных мышей и значения представляют собой медианы относительно медианы, полученной с p9524.

ID последовательности	Группа	Титр относительно p9524 (%)
4	1	100,0

19	2	699,1
20	3	300,5
21	4	1161,7
22	5	105,0
23	6	19,5
24	7	183,9
25	8	115,2
26	9	21,2
27	10	49,7
28	11	124,6
29	12	107,3
30	13	251,3

Замены аминокислот в положениях 1, 3, 4 и 12 в последовательности эпитопа aSyn а/к113-124 (эксперименты *in vivo* aSyn-32 и aSyn-33)

Поскольку замены Leu в положении 1, Asp в положении 3, Met в положении 4 и Ala в положении 12 на Ala и/или Ser в нативной последовательности aSyn₁₁₃₋₁₂₄ индуцируют высокие концентрации специфического для aSyn антитела (фигура 3), эти положения являются многообещающими кандидатами для модификаций, что привело к разработке AFFITOPE®. На следующей стадии производили замены аминокислотами с разными свойствами (например, аминокислоты с разными зарядами или аминокислоты с разной полярностью) по этим положениям, чтобы определить благоприятные или менее благоприятные замены в отношении иммуногенности и перекрестной реактивности aSyn (таблицы 7 и 8). Для сравнения была включена группа, которой вводили нативный aSyn₁₁₃₋₁₂₄ (p9524). Плазму иммунизированных мышей анализировали с помощью ИФА и определяли титры антител против aSyn относительно титров, полученных с нативной последовательностью (фигура 4А, В). Замены на Lys в обоих положениях 1 и 3 приводили к индукции более высокого количества aSyn-специфических антител (p10029 и p10033), тогда как замены на Trp резко снижали продукцию aSyn-специфических антител (p10026 и p10031) (фигура 4А). Кроме того, замена Asp на Glu в положении 3 приводила к более высокой перекрестной реактивности с aSyn по сравнению с нативной последовательностью aSyn (фигура 4А). Met в положении 4 и Ala в положении 12 были заменены путем аналогичной стратегии в эксперименте aSyn-33 (таблица 8), как показано для положений 1 и 3 в эксперименте aSyn-32. И здесь замена на Lys или Val в положении 12 (p10045 или p10042) приводила к более высоким титрам антител к aSyn, тогда как замена на Trp в любом положении 4 или 12 снижала перекрестную реактивность с aSyn

(фигура 4B). Таблицы 9 и 10 обобщают индуцированные титры против aSyn, присутствующего в плазме иммунизированных мышей, относительно титров, индуцированных последовательностью WT.

Таблица 7: Постановка эксперимента aSyn-32. В таблице показаны различные группы лечения, соответствующие используемые лекарственные препараты, последовательность пептида в лекарственном препарате и идентификационные номера соответствующей последовательности.

ID последовательно сти	Групп а	Лекарственный препарат	Последовательность
4	1	p9524-CRM197 Гидроксид алюминия	C-LEDMPVDPDNEA
31	2	p10026-CRM197 Гидроксид алюминия	C- WEDMPVDPDNEA
32	3	p10027-CRM197 Гидроксид алюминия	C-IEDMPVDPDNEA
33	4	p10028-CRM197 Гидроксид алюминия	C-NEDMPVDPDNEA
34	5	p10029-CRM197 Гидроксид алюминия	C-KEDMPVDPDNEA
35	6	p10030-CRM197 Гидроксид алюминия	C-DEDMPVDPDNEA
36	7	p10031-CRM197 Гидроксид алюминия	C-LEWMPVDPDNEA
37	8	p10032-CRM197 Гидроксид алюминия	C-LEEMPVDPDNEA
38	9	p10033-CRM197 Гидроксид алюминия	C-LEKMPVDPDNEA
39	10	p10034-CRM197 Гидроксид алюминия	C-LELMPVDPDNEA
40	11	p10035-CRM197 Гидроксид алюминия	C-LENMPVDPDNEA

Таблица 8: Постановка эксперимента aSyn-33. В таблице показаны различные группы лечения, соответствующие используемые лекарственные препараты,

последовательность пептида в лекарственном препарате и идентификационные номера соответствующей последовательности.

ID последовательности	Группа	Лекарственный препарат	Последовательность
4	1	p9524-CRM197 Гидроксид алюминия	C-LEDMPVDPDNEA
41	2	p10036-CRM197 Гидроксид алюминия	C-LEDWPVDPDNEA
42	3	p10037-CRM197 Гидроксид алюминия	C-LEDLPVDPDNEA
43	4	p10038-CRM197 Гидроксид алюминия	C-LEDNPVDPDNEA
44	5	p10039-CRM197 Гидроксид алюминия	C-LEDDPVDPDNEA
45	6	p10040-CRM197 Гидроксид алюминия	C-LEDKPVDPDNEA
46	7	p10041-CRM197 Гидроксид алюминия	C-LEDMPVDPDNEW
47	8	p10042-CRM197 Гидроксид алюминия	C-LEDMPVDPDNEV
48	9	p10043-CRM197 Гидроксид алюминия	C-LEDMPVDPDNEG
49	10	p10044-CRM197 Гидроксид алюминия	C-LEDMPVDPDNEA
50	11	p10045-CRM197 Гидроксид алюминия	C-LEDMPVDPDNEK

Таблица 9: aSyn-32, основные результаты. Титры к aSyn, оценивали у отдельных мышей, и значения представляют собой медианы относительно медианы, полученной с p9524.

ID последовательности	Группа	Титр относительно p9524 (%)
4	1	100,0
31	2	41,9

32	3	57,7
33	4	42,5
34	5	128,9
35	6	33,1
36	7	30,9
37	8	338,4
38	9	137,2
39	10	41,4
40	11	128,2

Таблица 10: aSyn-33, основные результаты. Титры к aSyn, оценивали у отдельных мышей, и значения представляют собой медианы относительно медианы, полученной с p9524.

ID последовательности	Группа	Титр относительно p9524 (%)
4	1	100,0
41	2	13,6
42	3	84,6
43	4	41,5
44	5	15,2
45	6	160,8
46	7	22,2
47	8	225,5
48	9	129,5
49	10	42,2
50	11	270,8

Двойные сериновые замены в последовательности эпитопа aSyn a/κ113-124 (эксперимент *in vivo* aSyn-37)

VARIOTOPES® с дополнительными заменами на серины в нативной последовательности aSyn₁₁₃₋₁₂₄ (p9524) были разработаны и протестированы на их иммуногенность у мышей дикого типа BALB/c (таблица 11, фигура 5). Через две недели после третьей и последней инъекции плазму каждой отдельной мыши собирали и анализировали с помощью ИФА для определения титров, индуцированных AFFITOPES®, и концентраций антител к aSyn. Нативную последовательность aSyn инъецировали для прямого сравнения (группа 1). Двойные замены Ser в положениях 3 и 12 (p10074), а также в положениях 1 и 3 (p10075) были способны дополнительно повышать титры aSyn-

специфического антитела по сравнению с нативной последовательностью мишени (фигура 5). Двойные замены серина в положении 1 и 4, а также в положении 4 и 12 не повышали иммуногенность по отношению к aSyn (фигура 5). В таблице 12 обобщены индуцированные титры против aSyn, присутствующего в плазме иммунизированных мышей, относительно титров, индуцированных последовательностью WT.

Таблица 11: Постановка эксперимента aSyn-37. В таблице показаны различные группы лечения, соответствующие используемые лекарственные препараты, последовательность пептида в лекарственном препарате и идентификационные номера соответствующей последовательности.

ID последовательно сти	Групп а	Лекарственный препарат	Последовательность
4	1	p9524-CRM197 Гидроксид алюминия	C-LEDMPVDPDNEA
51	2	p10074-CRM197 Гидроксид алюминия	C-LESMPVDPDNES
52	3	p10075-CRM197 Гидроксид алюминия	C-SESMPVDPDNEA
53	4	p10076-CRM197 Гидроксид алюминия	C-LESSPVDPDNEA
54	5	p10077-CRM197 Гидроксид алюминия	C-SEDMPVDPDNES
55	6	p10078-CRM197 Гидроксид алюминия	C-LEDSPVDPDNES
56	7	p10079-CRM197 Гидроксид алюминия	C-SEDSVDPDNEA

Таблица 12: aSynс-37, основные результаты. Титры к aSyn, оценивали у отдельных мышей, и значения представляют собой медианы относительно медианы, полученной с p9524.

ID последовательности	Группа	Титр относительно p9524 (%)
4	1	100,0
51	2	622,3
52	3	397,0

53	4	145,9
54	5	188,8
55	6	110,5
56	7	101,3

Аминокислотные замены Ser и Lys в положениях 1, 3 и 12 в последовательности эпитопа aSyn а/к113-124 (эксперимент *in vivo* aSyn-44)

Было показано, что замены на Ser и Lys в позициях 1, 3 и 12 в нативной последовательности aSyn₁₁₃₋₁₂₄ благоприятны для индукции высоких концентраций антител к aSyn (фигура 3В, 4 и 5). В исследовании иммуногенности, представленном в настоящем документе, комбинации замен серина и лизина в эпитопе aSyn₁₁₃₋₁₂₄ тестировали у мышей BALB/c дикого типа (эксперимент aSyn-44, таблица 13). Кроме того, к разным пептидам были добавлены линкерные аминокислоты. Параллельно в этот эксперимент для прямого сравнения был включен ранее выбранный кандидатный AFFITOPE® p4456. Через две недели после третьей и последней инъекции плазму каждой отдельной мыши собирали и анализировали с помощью ИФА для определения титров, индуцированных AFFITOPE®, и концентраций антител к aSyn. Кандидатные AFFITOPE®, протестированные в группах 2-7, были способны индуцировать более высокие титры антител к aSyn по сравнению с очень успешным AFFITOPE® p10074, представленным на фигуре 5 (фигура 6). В частности, обнаружено, что AFFITOPE® p10118 индуцирует самые высокие титры против aSyn. Таблица 14 обобщает индуцированные титры против aSyn, присутствующего в плазме иммунизированных мышей, относительно титров, индуцированных p10074.

Для прямого сравнения иммуногенности только что выбранных последовательностей AFFITOPE® (группа 2-7) с пептидом p4456, ранее отобранном в AFFiRiS, групповую медиану концентраций антител к aSyn, индуцированных этими кандидатными AFFITOPE®, устанавливали по отношению к групповой медиане концентрации антитела к aSyn, вызываемого p4456 (фигура 7). Все новые протестированные кандидатные AFFITOPE® индуцировали значительно более высокие aSyn-специфические титры по сравнению с p4456 (фигура 7). В таблице 15 обобщены индуцированные титры против aSyn, присутствующего в плазме иммунизированных мышей, относительно титров, индуцированных последовательностью AFFITOPE® p4456.

Таблица 13: Постановка эксперимента aSyn-44. В таблице показаны различные группы лечения, соответствующие используемые лекарственные препараты, последовательность пептида в лекарственном препарате и идентификационные номера соответствующей последовательности.

ID последовательности	Группа	Лекарственный препарат	Последовательность
51	1	p10074-CRM197 Гидроксид алюминия	C-LESMPVDPDNES
57	2	p10114-CRM197 Гидроксид алюминия	CGG- KEDMPVDPDNEA
58	3	p10115-CRM197 Гидроксид алюминия	C-LEKMPVDPDNES
59	4	p10116-CRM197 Гидроксид алюминия	C-SEKMPVDPDNEA
60	5	p10117-CRM197 Гидроксид алюминия	C-LEKMPVDPDNEK
61	6	p10118-CRM197 Гидроксид алюминия	CGG- KESMPVDPDNEA
62	7	p10119-CRM197 Гидроксид алюминия	CGG- KESMPVDPDNEK
1	8	p4456-CRM197 Гидроксид алюминия	C-DQPVLDP

Таблица 14: aSynс-44, основные результаты. Титры к aSyn, оценивали у отдельных мышей, и значения представляют собой медианы относительно медианы, полученной с p10074 и принятой за 100%.

ID последовательности	Группа	Титр относительно p10074 (%)
51	1	100,0
57	2	160,1
58	3	141,6
59	4	143,4
60	5	258,2
61	6	295,1
62	7	205,5

Таблица 15: Титры к aSyn, оценивали у отдельных мышей, и значения представляют собой групповые медианы относительно групповой медианы, полученной с p4456 и принятой за 100%.

ID последовательности	Группа	Титр относительно p4456 (%)
1	8	100,0
57	2	432,5
58	3	382,5
59	4	387,3
60	5	697,5
61	6	797,1
62	7	555,2

С-концевое укорочение двух выбранных последовательностей AFFITOPE® p10033 и p10118 путем удаления Ala в положении 12

Было показано, что последовательности AFFITOPE® p10033 и особенно p10118 индуцируют высокие концентрации антитела к aSyn (фигура 4А и фигура 6, соответственно). В исследованиях иммуногенности, представленных в настоящем документе, удаляли С-концевой Ala в положении X₁₂ из последовательностей AFFITOPE® p10033 и p10118, чтобы проверить, влияет ли укорочение С-конца на иммуногенность и перекрестную реактивность к aSyn разработанных пептидов. Мышей BALB/c дикого типа иммунизировали в независимых экспериментах либо p10033, p10118, p10166, либо p10167. В таблице 16 перечислены последовательности пептидов.

Через две недели после третьей инъекции плазму каждой отдельной мыши собирали и анализировали методом ИФА для определения титров, индуцированных AFFITOPE®, и реактивности антител к aSyn. Тестируемые укороченные кандидатные AFFITOPE® были способны индуцировать титры антитела к aSyn, которые, хотя и были ниже, чем титры, полученные с использованием последовательностей AFFITOPE®, содержащих Ala в положении X₁₂ (фигура 8), все же были выше, чем титры, полученные с использованием p4456.

В таблице 17 обобщены индуцированные титры против aSyn, присутствующего в плазме иммунизированных мышей, относительно титров, индуцированных либо последовательностью AFFITOPE® p10033 (А), либо последовательностью AFFITOPE® p10118 (В).

Таблица 16: В таблице показаны различные группы лечения, соответствующие используемые лекарственные препараты, последовательность пептида в лекарственном препарате и идентификационные номера соответствующей последовательности.

ID	Лекарственный препарат	Последовательность
-----------	-------------------------------	---------------------------

последовательности		
38	p10033-CRM197 Гидроксид алюминия	C-LEKMPVDPDNEA
63	p10166-CRM197 Гидроксид алюминия	C-LEKMPVDPDNE
61	p10118-CRM197 Гидроксид алюминия	CGG- KESMPVDPDNEA
64	p10167-CRM197 Гидроксид алюминия	CGG-KESMPVDPDNE

Таблица 17: Титры к aSyn оценивали у отдельных мышей и значения представляют медианы относительно к медианы, полученной либо с p10033, либо с p10118.

ID последовательности	Титры относительно p10033 или p10118 (%)
38	100,0
63	58,8
61	100,0
64	76,2

Связывание с мишенью антител, индуцированных выбранными AFFITOPE®

Чтобы выяснить, способны ли антитела, индуцированные кандидатным AFFITOPE®, обнаруживать агрегированный aSyn *in situ*, сыворотку мышей BALB/c дикого типа, вакцинированных кандидатным AFFITOPE®, тестировали с помощью ИГХ-окрашивания на срезах ткани головного мозга человека, полученной после смерти от пациентов с БП/ДТЛ. Тельца Леви являются патологическим признаком в головном мозге пациентов с БП/ДТЛ и в основном обогащены патогенными, агрегированными формами aSyn (Spillantini et al., 1997).

Плазма от мышей, получавших кандидатный AFFITOPE®, выявила тельца Леви на участках коры головного мозга, аналогично контрольному МАТ к aSyn 28A7 (фигура 9). Специфичность подтверждали отсутствием окрашивания после предварительной абсорбции сыворотки с соответствующей пептидной молекулой кандидатного AFFITOPE® (данные не показаны).

Предпочтительное связывание с олигомерными (токсичными) видами aSyn по сравнению с мономерными видами aSyn

Далее, антитела, индуцированные различными AFFITOPE®, тестировали на их селективное связывание с олигомерным aSyn (низкая молекулярная масса, растворимые агрегаты aSyn, преимущественно ди- и тримеры) по сравнению с мономерными видами, используя способ, основанный на ППР (фигура 10). Равное количество антитела, индуцированного кандидатным AFFITOPE®, или моноклонального антитела сначала иммобилизовали на чипе, покрытом иммобилизованным противомышиным антителом.

Затем последовательно наносили мономерные и олигомерные виды aSyn и оценивали дифференциальное связывание (определяемое как EO) с мономерами aSyn и олигомерными видами aSyn. В качестве контроля использовали два моноклональных антитела: LB509 (Biolegend, San Diego, CA) и 28A7 (AFFiRiS AG). Иммуобилизация на поверхности чипа LB509, которое не делает различий между мономерами и олигомерами aSyn, привела к сопоставимым EO для обоих видов aSyn. Второе контрольное антитело, 28A7, которое было индуцировано против пептида p4456, различало мономерные и олигомерные виды aSyn. Антитела, индуцированные кандидатным AFFITOPE®, показали высокую селективность в отношении олигомерных агрегатов aSyn по сравнению с мономерной формой aSyn (фигура 10).

В дополнение к анализу ППР (BiaCore) индуцированные AFFITOPE® антитела были протестированы на предпочтительное связывание с филаментами aSyn по сравнению с мономерными видами aSyn с помощью ИФА с ингибированием. В этих анализах постоянное количество аффинно-очищенных AFFITOPE®-индуцированных антител предварительно инкубировали с титрованным количеством мономерных и филаментных aSyn, а затем переносили на планшеты для ИФА, покрытые филаментами aSyn (подробности см. в Материалах и способах). На фигуре 11 показаны результаты двух репрезентативных кандидатных AFFITOPE® (p10033 и p10118). Очень хорошая конкуренция наблюдалась с олигомерами aSyn, за которыми следовали филаменты aSyn, тогда как конкуренция с мономерной формой aSyn была незначительной (фиг. 11).

В качестве контроля использовали МАТ 28A7, которое, как известно, связывает олигомерные и агрегированные формы aSyn (фигура 11С).

В целом, данные по связыванию антител, специфических к кандидатным AFFITOPE®, ясно свидетельствуют о высокой селективности антител, индуцированных кандидатными AFFITOPE®, к токсичным олигомерным агрегатам aSyn, которые считаются соответствующими токсичными видами, приводящими к гибели клеток, в противоположность мономерной форме.

Материалы и способы

Мыши

Мышей BALB/c приобретали у Janvier Elevages (Le Genest-Sainte-Isle, F).

Животных содержали в установленных условиях, описанных в завке Института молекулярной патологии к лицензированию деятельности в качестве селекционеров, поставщиков и пользователей. Соответствующее разрешение было выдано соответствующими органами 13 мая 2013 года с уведомлением GZ:223633/2013/4.

В кратком изложении, мышей содержали в клетках TECNIPLAST Sealsafe NextIVC Blue Line (Milano, IT) на пять мышей. Клетки были оборудованы приспособлениями в форме гнездового материала и небольшими пластиковыми домиками для укрытия/игр. Возраст мышей на начало эксперимента был от 6 до 8 недель. Они получали стандартную диету и подкисленную воду без ограничений и содержались при 12-часовом цикле свет/темнота.

Все эксперименты над животными проводили в соответствии с австрийским и европейским законодательством и было получено разрешение Венского городского управления, муниципального отдела 58.

Пептиды и белки

Пептиды, применяемые для иммунизации приобретали из микроколлекций EMC (Tübingen, Germany).

CRM197 приобретали у Pfenex (San Diego, CA).

Производство иммуногенных продуктов

Все иммуногенные продукты на основе AFFITOPE®, использованные в описанных экспериментах, представляют собой конъюгаты синтетических пептидов AFFITOPE® с белком-носителем CRM197. Конъюгация представляет собой направленный подход с использованием боковой цепи аминокислотных остатков лизина в CRM197 и свободной тиоловой группы аминокислотного остатка цистеина в пептиде. Для активации CRM197 водный раствор CRM197 доводят до 10 мМ фосфатно-солевым буфером (PBS) и затем осторожно встряхивают с бифункциональным линкером, N-гидроксисукцинимидным сложным эфиром 4-малеимидомасляной кислоты (GMBS). Затем избыток непрореагировавшего GMBS удаляют диализом или ультрафильтрацией. Полученный активированный раствор CRM197 затем инкубируют с пептидами AFFITOPE®, растворенными в фосфатном буфере (pH 6,7). Свободная тиоловая группа цистеина в составе пептида реагирует с малеимидной группой, образуя конечный продукт AFFITOPE®-CRM197.

Применение иммуногена

Вакцины доводят до температуры окружающей среды, встряхивают и вводят подкожно (п/к) в бок мыши (200 мкл) при помощи инсулинового шприца 20 с помощью иглы калибром G30 (Omnican©50, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany). Иммунизацию повторяют трижды с интервалом раз в две недели.

Сбор образцов

Кровь забирали через две недели после каждой инъекции. Плазму собирали и хранили при -20°C до проведения анализа. Сбор крови и умерщвление животных осуществляли с использованием способов, одобренных FELASA.

Моноклональные антитела

В этом исследовании в качестве контроля использовали два моноклональных антитела: LB509 (Biolegend, CA, US) и 28A7. LB509 представляет собой коммерчески доступное очищенное антитело к aSyn₁₁₅₋₁₂₁. Мышиное МАТ 28A7 (IgG1) получали на месте с гибридомами В-клеток мыши (Mandler et al., 2014) против AFFITOPE® PD01, который имитирует эпитоп aSyn₁₁₅₋₁₂₁.

Сбор образцов

Кровь забирали приблизительно через две недели после каждой инъекции, по меньшей мере, за сутки до следующей инъекции. Плазму собирали и хранили при -20°C до проведения анализа. Сбор крови и умерщвление животных осуществляли с использованием способов, одобренных FELASA.

Определение титров путем ИФА

Анализировали титры против иммунизирующих пептидов и против рекомбинантного человеческого белка aSyn. Наличие AFFITOPE®-индуцированных антител в плазме иммунизированных мышей определяли с помощью ИФА. 96-луночные планшеты (Nunc-Maxisorp) покрывали либо рекомбинантным человеческим aSyn (1 мкг/мл), либо инъецированным пептидом (БСА-конъюгат; 1 мкМ). Титры рассчитывали как значения EC₅₀ с помощью PRISM® 5.04 (GraphPad Inc, San Diego, CA) с помощью нелинейного регрессионного анализа (функция логистической подгонки по четырем параметрам).

Иммуногистохимия (ИГХ)

Распознавание aSyn-положительных включений (тельца Леви), проводили на посмертных срезах головного мозга из биопсии лобной коры пациента с ДТЛ (пациент с ДТЛ, случай № X5631, отделение неврологии UCSF, Ла-Хойя, Калифорния).

Плазму мышей, иммунизированных AFFITOPE®, использовали для окрашивания срезов лобной коры и биоптатов головного мозга пациентов с ДТЛ. После подготовки ткани (регидратация, депарафинизация, восстановление антигена и блокирование) срезы инкубировали с разведенной мышиной плазмой в течение 2 часов при комнатной температуре или в течение ночи при 4°C . Срезы инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре с неразбавленным полимером, меченым Dako EnVision HRP (Agilent, Santa Clara, CA). Для каждого окрашивания ИГХ проводили контрастное окрашивание с помощью гематоксилина, а после этого этапа предметные стекла

дегидратировали и погружали в среду Entellan (Sigma-Aldrich). Слайды сканировали в режиме светлого поля с использованием панорамного (Mirax) сканнера 150 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH).

Анализ поверхностного плазмонного резонанса (Biacore)

Все эксперименты проводили на Biacore T200 (GE Healthcare, Chicago, IL) с использованием программного обеспечения Biacore T200 Control 2.0.1. Чип CM5 был иммобилизован с антителом из коммерчески доступного набора для захвата мышинных антител (GE-Healthcare) по инструкциям производителя посредством аминового соединения на проточных ячейках (Fc) 1 и Fc2 чипа. Fc1 служила эталонной проточной ячейкой. Уровни иммобилизации антимышиного антитела для обоих Fc были сопоставимы и приводили приблизительно к 11000 ЕО для Fc1 и Fc2.

Чтобы достичь сопоставимых уровней захваченного антитела, время введения для каждого конкретного антитела тестировали перед фактическим запуском и таким образом корректировали время введения. Это привело к сопоставимым уровням захвата для всех протестированных антител, включая неспецифические антитела, захваченные на Fc1 в каждом цикле.

Экспериментальная последовательность для одного цикла была следующей:

1. Захват неспецифического антитела на эталонной Fc1.
2. Захват aSyn-специфического антитела на Fc2.
3. Введение образца (олигомерный aSyn, мономерный aSyn, только буфер) поверх Fc1 и Fc2
4. Регенерация Fc1 и Fc 2 с низким pH; на чипе остается только антимышиное антитело
5. Поверхность чипа готова к следующему циклу

Получение олигомеров и мономеров aSyn: олигомеры aSyn (SynAging, Vandœuvre-lès-Nancy, FR) размораживали и разбавляли до 5 мкг/мл в HBS незадолго до инъекции. Для удаления высокомолекулярных фракций из полноценного мономерного aSyn (rPeptide) aSyn растворяли заново, разбавляли до 5 мкг/мл в HBS, и центрифугировали с отсеканием по массе в течение 10 минут при 14 000×g с использованием колонок с границей пропускания 50 кДа (Amicon Ultra 0,5 мл). В качестве контроля использовали два специфических для aSyn антитела, LB509 (BioLegend, San Diego, CA) и 28A7 (AFFiRiS AG).

Аффинная очистка AFFITOPE®-специфических антител из иммунной плазмы

Магнитные шарики с йодоацетилем (FG-106, Bioclone Inc., Сан-Диего, Калифорния) связывали с соответствующим пептидом (очищенным ВЭЖХ) в течение 1

часа при комнатной температуре, а оставшийся избыток свободных участков блокировали цистеином дополнительно в течение часа. После реакции блокирования шарики, связанные с AFFITOPE®, инкубировали с 150 мкл плазмы мышей, иммунизированных соответствующим кандидатным AFFITOPE® (в течение 2 часов при комнатной температуре). Затем специфичные для AFFITOPE® антитела элюировали с помощью элюирующего буфера (Thermo Scientific). После этого элюенты концентрировали в пробирках для ультрацентрифугирования (Millipore) (30 кДа) до объема 150 мкл (равного объему на входе).

Конкурентный ИФА

Титрованные количества различных видов aSyn, мономеров (rPeptide) и агрегированных форм, включая фибриллы (Proteos Inc) или олигомеры (Crossbeta Biosciences), в концентрациях в диапазоне от 100 до 0,05 мкг/мл (это соответствует диапазону от 69 до 0,034 мкМ, относящимся к мономерному aSyn), предварительно инкубировали с антителами, которые до этого были очищены от конечной плазмы мышей, иммунизированных кандидатными AFFITOPE®, а также контрольным антителом 28A7 к aSyn. Добавленные виды aSyn конкурируют за связывание с планшетами, покрытыми фибриллами aSyn (Proteos Inc). Значения IC₅₀ рассчитывали как концентрацию либо мономеров, олигомеров, либо фибриллярных aSyn, которая нужна для снижения сигнала ИФА вдвое. Значения IC₅₀ рассчитывали с помощью PRISM® 5.04 (GraphPad Inc, San Diego, CA) с помощью нелинейного регрессионного анализа (функция логистической подгонки по четырем параметрам).

Таблица 18: AFFITOPE® и исходная последовательность исследованных пептидов

ID последовательности	Внутреннее название пептида	Последовательность пептида	Дополнительная информация
1	p4456	C-DQPVLDP	aSyn115-121 (M116→Q, D119→L)
2	p4572	C-YDRPVQPDR	aSyn114-122 (E114→Y, M116→R, D119→Q, N122→R)
3	p9964	C-EDMPVDPDNEAYE	aSyn114-126
4	p9524	C-LEDMPVDPDNEA	aSyn113-124

5	p9556-	C-DMPVDPDNEA	aSyn115-124
6	p9557	C-EDMPVDPDNE	aSyn114-123
7	p9663	C-VDPDNEAYE	aSyn118-126
8	p9988	C-AEDMPVDPDNEA	aSyn113-124 (L113→A)
9	p9989	C-LADMPVDPDNEA	aSyn113-124 (E114→A)
10	p9990	C-LEAMPVDPDNEA	aSyn113-124 (D115→A)
11	p9991	C-LEDAPVDPDNEA	aSyn113-124 (M116→A)
12	p9992	C-LEDMAVDPDNEA	aSyn113-124 (P117→A)
13	p9993	C-LEDMPADPDNEA	aSyn113-124 (V118→A)
14	p9994	C-LEDMPVAPDNEA	aSyn113-124 (D119→A)
15	p9995	C-LEDMPVDADNEA	aSyn113-124 (P120→A)
16	p9996	C-LEDMPVDPANEA	aSyn113-124 (D121→A)
17	p9997	C-LEDMPVDPDAEA	aSyn113-124 (N122→A)
18	p9998	C-LEDMPVDPDNAA	aSyn113-124 (E123→A)
19	p9999	C-SEDMPVDPDNEA	aSyn113-124 (L113→S)
20	p10000	C-LSDMPVDPDNEA	aSyn113-124 (E114→S)
21	p10001	C-LESMPVDPDNEA	aSyn113-124 (D115→S)
22	p10002	C-LEDSPVDPDNEA	aSyn113-124 (M116→S)
23	p10003	C-LEDMSVDPDNEA	aSyn113-124 (P117→S)
24	p10004	C-LEDMPSDPDNEA	aSyn113-124 (V118→S)
25	p10005	C-LEDMPVSPDNEA	aSyn113-124 (D119→S)
26	p10006	C-LEDMPVDSDNA	aSyn113-124 (P120→S)
27	p10007	C-LEDMPVDPSNEA	aSyn113-124 (D121→S)
28	p10008	C-LEDMPVDPDSEA	aSyn113-124 (N122→S)
29	p10009	C-LEDMPVDPDNSA	aSyn113-124 (E123→S)
30	p10010	C-LEDMPVDPDNES	aSyn113-124 (A124→S)

31	p10026	C-WEDMPVDPDNEA	aSyn113-124 (L113→W)
32	p10027	C-IEDMPVDPDNEA	aSyn113-124 (L113→I)
33	p10028	C-NEDMPVDPDNEA	aSyn113-124 (L113→N)
34	p10029	C-KEDMPVDPDNEA	aSyn113-124 (L113→K)
35	p10030	C-DEDMPVDPDNEA	aSyn113-124 (L113→D)
36	p10031	C-LEWMPVDPDNEA	aSyn113-124 (D115→W)
37	p10032	C-LEEMPVDPDNEA	aSyn113-124 (D115→E)
38	p10033	C-LEKMPVDPDNEA	aSyn113-124 (D115→K)
39	p10034	C-LELMPVDPDNEA	aSyn113-124 (D115→L)
40	p10035	C-LENMPVDPDNEA	aSyn113-124 (D115→N)
41	p10036	C-LEDWPVDPDNEA	aSyn113-124 (M116→W)
42	p10037	C-LEDLPVDPDNEA	aSyn113-124 (M116→L)
43	p10038	C-LEDNPVDPDNEA	aSyn113-124 (M116→N)
44	p10039	C-LEDDPVDPDNEA	aSyn113-124 (M116→D)
45	p10040	C-LEDKPVDPDNEA	aSyn113-124 (M116→K)
46	p10041	C-LEDMPVDPDNEW	aSyn113-124 (A124→W)
47	p10042	C-LEDMPVDPDNEV	aSyn113-124 (A124→V)
48	p10043	C-LEDMPVDPDNEG	aSyn113-124 (A124→G)
49	p10044	C-LEDMPVDPDNE D	aSyn113-124 (A124→D)
50	p10045	C-LEDMPVDPDNEK	aSyn113-124 (A124→K)
51	p10074	C-LESMPVDPDNES	aSyn113-124 (D115→S, A124→S)
52	p10075	C-SESMPVDPDNEA	aSyn113-124 (L113→S, D115→S)
53	p10076	C-LESSPVDPDNEA	aSyn113-124 (D115→S, M116→S)
54	p10077	C-SEDMPVDPDNES	aSyn113-124 (L113→S,

			A124→S)
55	p10078	C-LEDSPVDPDNES	aSyn113-124 (M116→S, A124→S)
56	p10079	C-SEDSPVDPDNEA	aSyn113-124 (L113→S, M116→S)
57	p10114	CGG- KEDMPVDPDNEA	aSyn111-124 (I112→G, D115→K)
58	p10115	C-LEKMPVDPDNES	aSyn113-124 (D115→K, A124→S)
59	p10116	C-SEKMPVDPDNEA	aSyn113-124 (L113→S, D115→K)
60	p10117	C-LEKMPVDPDNEK	aSyn113-124 (D115→K, A124→K)
61	p10118	CGG- KESMPVDPDNEA	aSyn111-124 (I112→G, D115→K, P117→S)
62	p10119	CGG- KESMPVDPDNEK	aSyn111-124 (I112→G, D115→K, P117→S, A124→K)
63	p10166	C-LEKMPVDPDNE	aSyn113-123 (D115→K)
64	p10167	CGG- KESMPVDPDNE	aSyn111-123 (I112→G, D115→K, P117→S)

Ссылки

Dufty et al., *Am J Pathol.* 2007 May;170(5):1725-38. [PubMed: 17456777]

Bassil et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Aug 23; 113(34): 9593-8. doi: 10.1073/pnas.1609291113 [PubMed: 27482103]

Kosaka, *J Neurol.* 1990; 237:197–204. [PubMed: 2196340]

Dickson et al., *Acta Neuropathol.* 1989; 78:572–584. [PubMed: 2683563]

Braak et al., *Acta Neuropathol.* 2007; 114:231–241. [PubMed: 17576580]

Lee et al., *Int J Biochem Cell Biol.* 2008; 40:1835–1849. [PubMed: 18291704]

Bengoa-Vergniory et al., *Acta Neuropathol.* 2017;134(6):819-838. doi: 10.1007/s00401-017-1755-1. [PubMed: 28803412]

Bernis et al., *Acta Neuropathol Commun.* 2015 Nov 26;3:75. doi: 10,1186/s40478-015-0254-7. [PubMed: 26612754]

Mandler et al., *Acta Neuropathol.* 2014;127(6):861-79. doi: 10,1007/s00401-014-1256-4. [PubMed: 24525765]

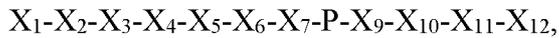
Spillantini et al., *Nature.* 1997 Aug 28;388(6645):839-40. (PubMed: 9278044]

Lashuel, et al., *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 38–48. doi: 10,1038/nrn3406

Volc, et al., *Lancet Neurol.* 19, 591-600. doi: 10,1016/S1474-4422(20)30136-8

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антигенный пептид, содержащий, состоящий по существу или состоящий из структуры:



в которой:

P представляет собой пролин;

X₁ представляет собой L, K, A или S, где L представляет собой лейцин, K представляет собой лизин, A представляет собой аланин и S представляет собой серин;

X₂ представляет собой E или S, где E представляет собой глутаминовую кислоту и S определена выше;

X₃ представляет собой D, E, K, N, A или S, где N представляет собой аспарагин, D представляет собой аспарагиновую кислоту и E, K, A и S определены выше;

X₄ представляет собой M, A, S, L или K, где M представляет собой метионин и A, S, L и K определены выше;

X₅ представляет собой P или A, как определено выше;

X₆ представляет собой V, A или S, где V представляет собой валин и A и S определены выше;

X₇ представляет собой D или S, как определено выше;

X₉ представляет собой D или A, как определено выше;

X₁₀ представляет собой N, S или A, где N, S и A определены выше;

X₁₁ представляет собой E, A или S, где E, A и S определены выше;

X₁₂ присутствует или отсутствует и, если присутствует, представляет собой A, K, V, S, или G, где G представляет собой глицин и A, K, V и S определены выше,

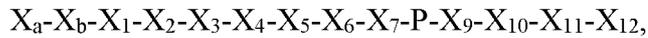
при условии, что X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-P-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂ не являются L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A,

и который содержит от 1 до 5 аминокислотных отличий по сравнению с аминокислотной последовательностью L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A, и дополнительно, причем пептид не содержит дипептид Y-E сразу после X₁₂, где Y представляет собой тирозин и E определена выше.

2. Антигенный пептид по п. 1, который содержит от 1 до 4 аминокислотных отличий по сравнению с аминокислотной последовательностью L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A, предпочтительно, от 1 до 3 аминокислотных отличий и, наиболее предпочтительно, 2 аминокислотных отличия.

3. Антигенный пептид по п. 1 или 2, который содержит аминокислотные отличия по сравнению с аминокислотной последовательностью L-E-D-M-P-V-D-P-D-N-E-A по одному или нескольким положениям, выбранным из X₁, X₃, X₄ и X₁₂.

4. Антигенный пептид по любому из предшествующих пунктов, содержащий, состоящий по существу или состоящий из структуры



В которой:

X_a присутствует или отсутствует и, если присутствует, представляет собой G, где G определена в п. 1;

X_b представляет собой G, где G определена выше; и

X₁-X₁₂ определены в п. 1.

5. Антигенный пептид по любому из предшествующих пунктов, который имеет длину 11-20 аминокислот, предпочтительно, длину 12-14 аминокислоты.

6. Антигенный пептид по любому из предшествующих пунктов, который дополнительно содержит концевой остаток цистеина, предпочтительно, N-концевой остаток цистеина.

7. Антигенный пептид по любому из предшествующих пунктов, в котором X₁ представляет собой L, S, A или K, X₂ представляет собой E или S, X₃ представляет собой S, D, E, A, K или N, X₄ представляет собой M, X₅ представляет собой P, X₆ представляет собой V, X₇ представляет собой D, X₉ представляет собой D, X₁₀ представляет собой N и/или X₁₂ представляет собой A, S, K или V, предпочтительно, где X₁ представляет собой L или K, X₂ представляет собой E, X₃ представляет собой S, D, E, K или A, X₄ представляет собой M, X₁₀ представляет собой N и/или X₁₂ представляет собой A, S или K, особенно, где X₁ представляет собой L или K, X₃ представляет собой D, K или S и X₁₂ представляет собой A.

8. Антигенный пептид по любому из предшествующих пунктов, который выбран из группы, состоящей из AEDMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEA, LESMPVDPDNEA, LESMPVDPDNES, SEDMPVDPDNEA, SEKMPVDPDNEA, LEEMPVDPDNEA, SESMPVDPDNEA, LEDMPVDPDNES, LEAMPVDPDNEA, LEDMPVDPDNEK, LEDMPVDPDNEV, LEKMPVDPDNEK, LSDMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNES, LENMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEK и KEDMPVDPDNEA, предпочтительно SEDMPVDPDNEA, SEKMPVDPDNEA, LEEMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNEK, LESMPVDPDNEA, LESMPVDPDNES, KESMPVDPDNEA, KEDMPVDPDNEA, LEKMPVDPDNES, LEKMPVDPDNEA и LESMPVDPDNES,

особенно, LEKMPVDPDNEA, KESMPVDPDNEK, KESMPVDPDNEA и KEDMPVDPDNEA.

9. Антигенный пептид по любому из предшествующих пунктов, который содержит, состоит по существу или состоит из аминокислотной последовательности KESMPVDPDNEA, GKESMPVDPDNEA, GGKESMPVDPDNEA или CGGKESMPVDPDNEA.

10. Иммуногенное соединение, содержащее антигенный пептид по любому из предшествующих пунктов и носитель, содержащий Т-клеточные эпитопы и присоединенный к антигенному пептиду.

11. Иммуногенное соединение по п. 10, в котором носитель, содержащий Т-клеточные эпитопы, присоединен к антигенному пептиду через линкер.

12. Иммуногенное соединение по п. 10 или 11, в котором носитель, содержащий Т-клеточные эпитопы, присоединен к N-концу антигенного пептида.

13. Иммуногенное соединение по п. 12, в котором белок-носитель выбран из группы, состоящей из гемоцианина морского блюдца (KLH), столбнячного токсина, термолабильного энтеротоксина (LT), холерного токсина (ХТ), дифтерийного токсина (ДТ) и их вариантов, особенно, CRM197, столбнячных токсинов (ТТ), мутантных токсинов, альбумин-связывающих белков и бычьего сывороточного альбумина, предпочтительно, CRM197.

14. Фармацевтический препарат, содержащий антигенный пептид по любому из пп. 1-9 или иммуногенное соединение по любому из пп. 10-13 и фармацевтически приемлемый эксципиент, предпочтительно в форме вакцинной композиции.

15. Фармацевтический препарат по п. 14, дополнительно содержащий адъювант.

16. Фармацевтический препарат по п. 15, в котором адъювант выбран из группы, состоящей из фосфата алюминия MF59, фосфата кальция, цитокинов (например, IL-2, IL-12, GM-CSF), сапонинов (например, QS21), производных MDP, олигонуклеотидов CpG, IC31, LPS, MPLA, полифосфазенов и гидроксида алюминия, или их смесей; особенно, с гидроксидом алюминия в качестве адъюванта.

17. Фармацевтический препарат по п. 15 или 16, который содержит антигенный пептид в количестве от 0,1 нг до 10 мг, предпочтительно от 10 нг до 1 мг, в частности, от 100 нг до 100 мкг.

18. Фармацевтический препарат по любому из пп. 14-17, причем препарат формулируют для парентерального введения, такого как подкожное, интрадермальное, внутривенное или внутримышечное введение.

19. Антигенный пептид по любому из пп. 1-9, иммуногенное соединение по любому из пп. 10-13 или фармацевтический препарат по любому из пп. 14-18 для применения в качестве лекарственного средства.

20. Антигенный пептид по любому из пп. 1-9, иммуногенное соединение по любому из пп. 10-13 или фармацевтический препарат по любому из пп. 14-18 для применения в качестве лечения или профилактики синуклеинопатии.

21. Применение антигенного пептида по любому из пп. 1-9, иммуногенного соединения по любому из пп. 10-13 или фармацевтического препарата по любому из пп. 14-18 для получения лекарственного средства для лечения или профилактики синуклеинопатии.

22. Способ лечения или профилактики синуклеинопатии, предусматривающий введение эффективного количества антигенного пептида по любому из пп. 1-9, иммуногенного соединения по любому из пп. 10-13 или фармацевтического препарата по любому из пп. 14-18 нуждающемуся в этом индивидууму.

23. Применение по любому из пп. 20 или 21 или способ по п. 22, в котором синуклеинопатия представляет собой первичную синуклеинопатию или сопутствующую патологию.

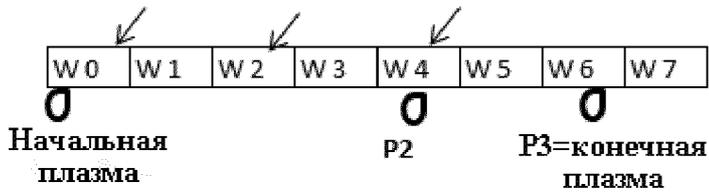
24. Применение или способ по п. 23, в котором первичная синуклеинопатия выбрана из группы, состоящей из болезни Паркинсона (спорадической, семейной с мутациями альфа-синуклеина, семейной с мутациями, отличными от альфа-синуклеина, истинной вегетативной недостаточности и дисфагии тельца Леви), деменции с тельцами Леви (ДТЛ; в том числе деменции с тельцами Леви (ДТЛ) («истинной» деменции с тельцами Леви), болезни Паркинсона с деменцией (БПД)) или болезни диффузных телец Леви, множественной системной атрофии (синдрома Шай-Дрейгера, стриатонигральной дегенерацией и оливопонтocerebellарной атрофии).

25. Применение или способ по п. 23, в котором сопутствующая патология выбрана из группы, состоящей из спорадической болезни Альцгеймера, семейной болезни Альцгеймера с мутациями APP, семейной болезни Альцгеймера с мутациями PS-1, PS-2 или другими мутациями, семейной британской деменции, миозита с тельцами включения, травматического повреждения головного мозга, хронической травматической энцефалопатии, деменции боксеров, таупатий (болезнь Пика, лобно-височная деменция, прогрессирующий супрануклеарный паралич, корково-базальная дегенерация, лобно-височная деменция с паркинсонизмом, связанным с хромосомой 17 и синдром Ниманна-Пика типа C1), синдрома Дауна, болезни Крейтцфельдта-Якоба, болезни Хантингтона, болезни мотонейронов, бокового амиотрофического склероза (спорадический, семейный и

комплекс БАС-деменция Гуама), нейроаксональной дистрофии, нейродегенерации головного мозга с накоплением железа типа I (синдром Галлервордена-Шпатца), прионных болезней, болезни Герстманна-Штрауслера-Шейнкера, атаксии телеангиоэктазии, синдрома Мейге, подострого склерозирующего панэнцефалита, болезни Гоше, болезни Краббе, а также других нарушений лизосомального накопления (в том числе синдром Куфора-Ракеба и синдром Санфилиппо), или нарушения поведения во сне с быстрыми движениями глаз (БДГ).

26. Применение по любому из пп. 20 или 21 или способ по п. 22, в котором синуклеинопатия выбрана из группы, состоящей из нарушений с тельцами Леви (НТЛ), особенно болезнь Паркинсона (БП), болезнь Паркинсона с деменцией (PDD) и деменция с тельцами Леви (ДТЛ), а также множественной системной атрофии (МСА) или нейродегенерации с накоплением железа в головном мозге типа I (NBIA типа I).

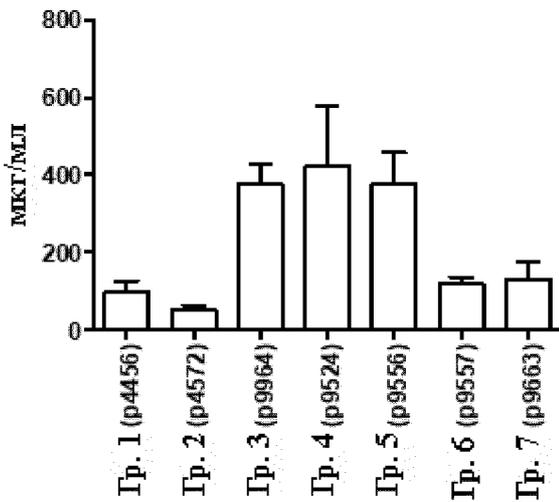
27. Применение или способ по любому из пп. 21-26, в котором лечат человека.



Фиг.1

А

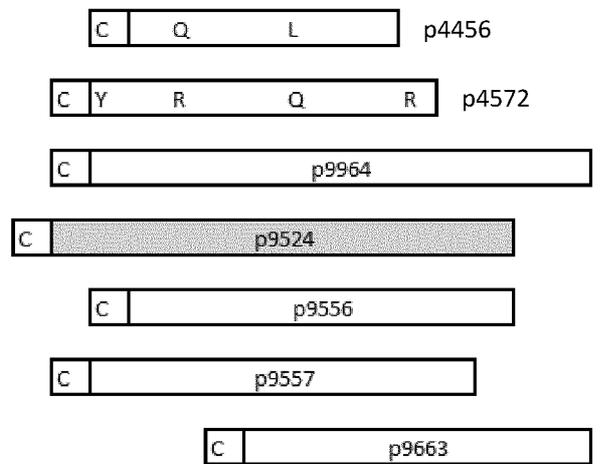
aSyn-28: Концентрация антител к aSyn (плазма)



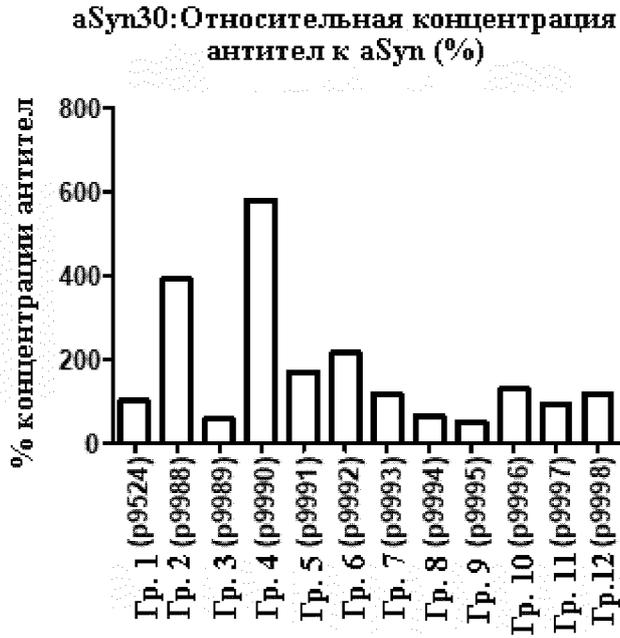
Фиг.2

В

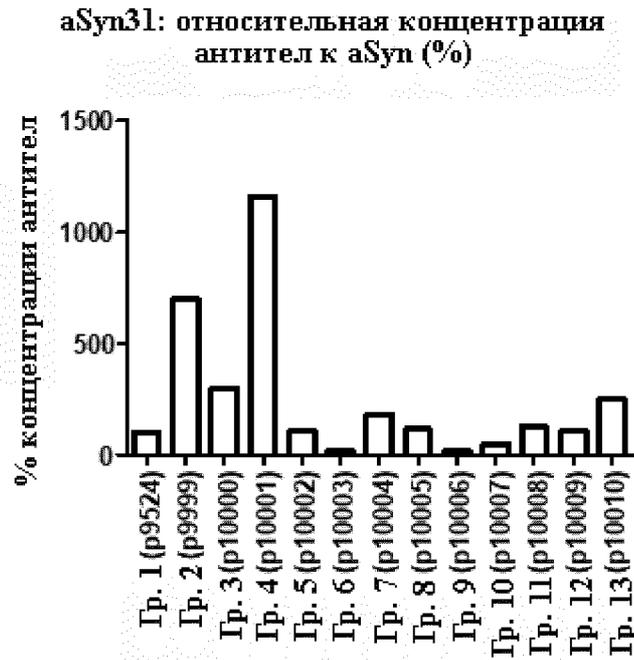
E G I L E D M P V D P D N E A Y E M P
110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128



А



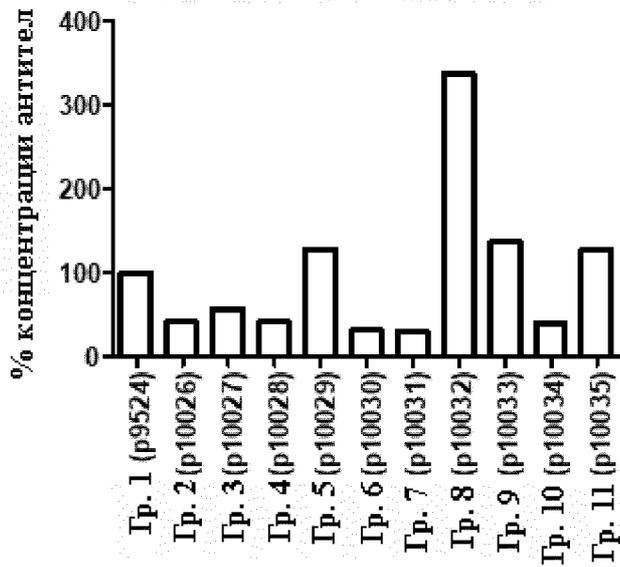
В



Фиг. 3

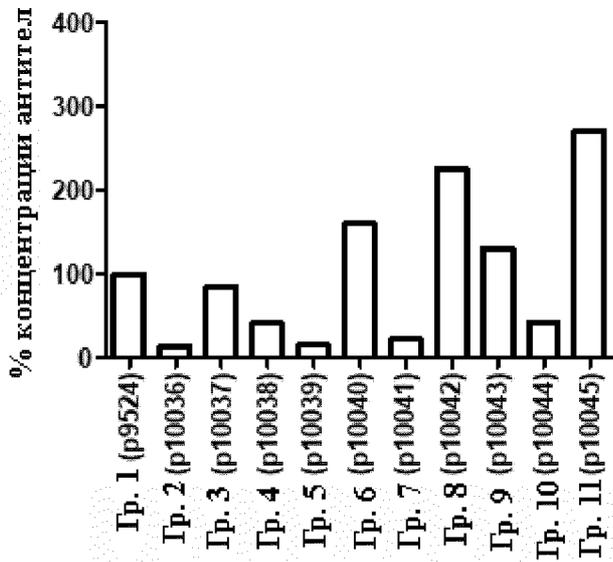
А

**aSyn32: относительная концентрация
антител к aSyn (%)**



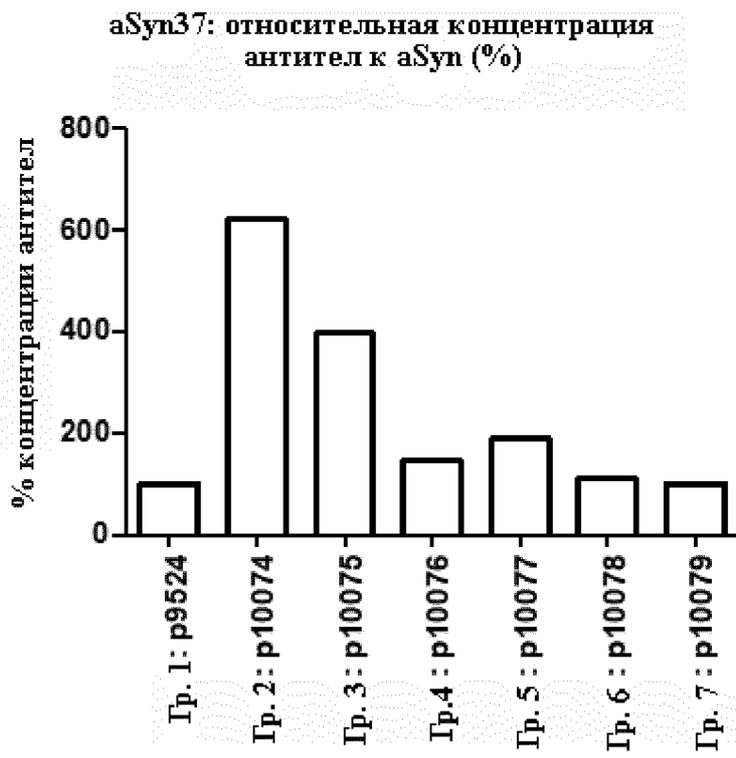
В

**aSyn33: относительная концентрация
антител к aSyn (%)**

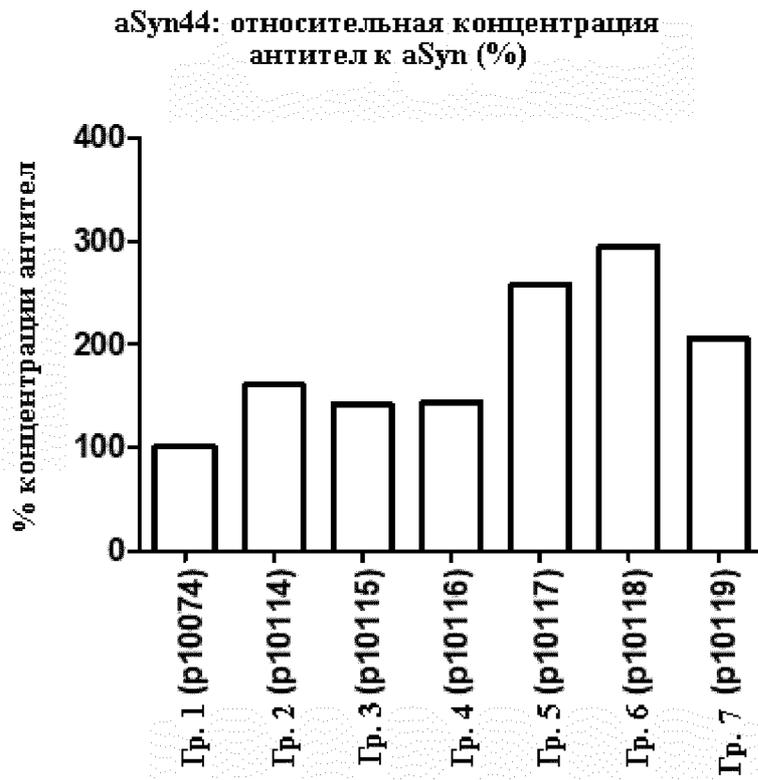


Фиг. 4

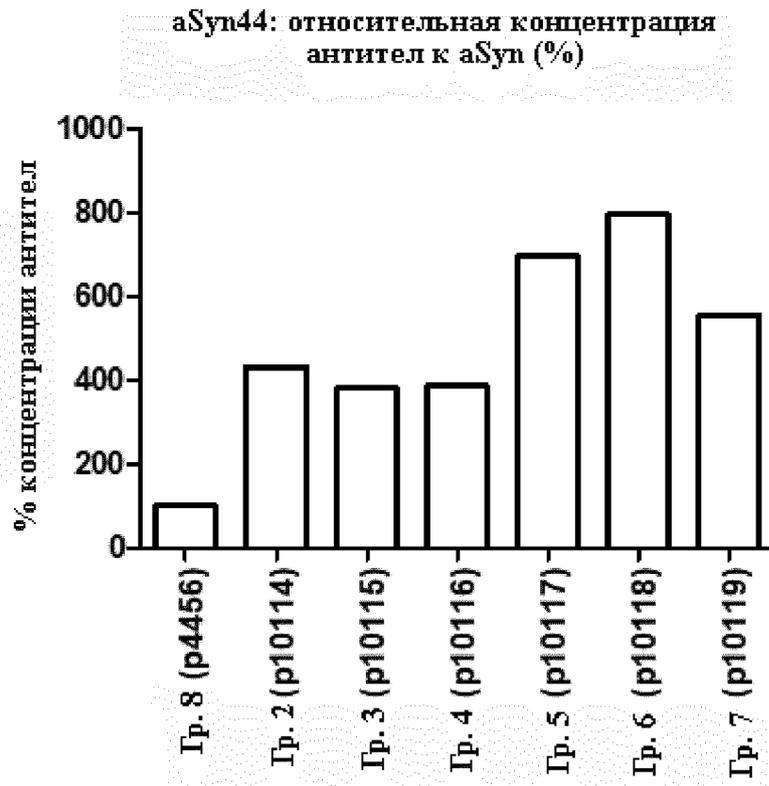
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



А

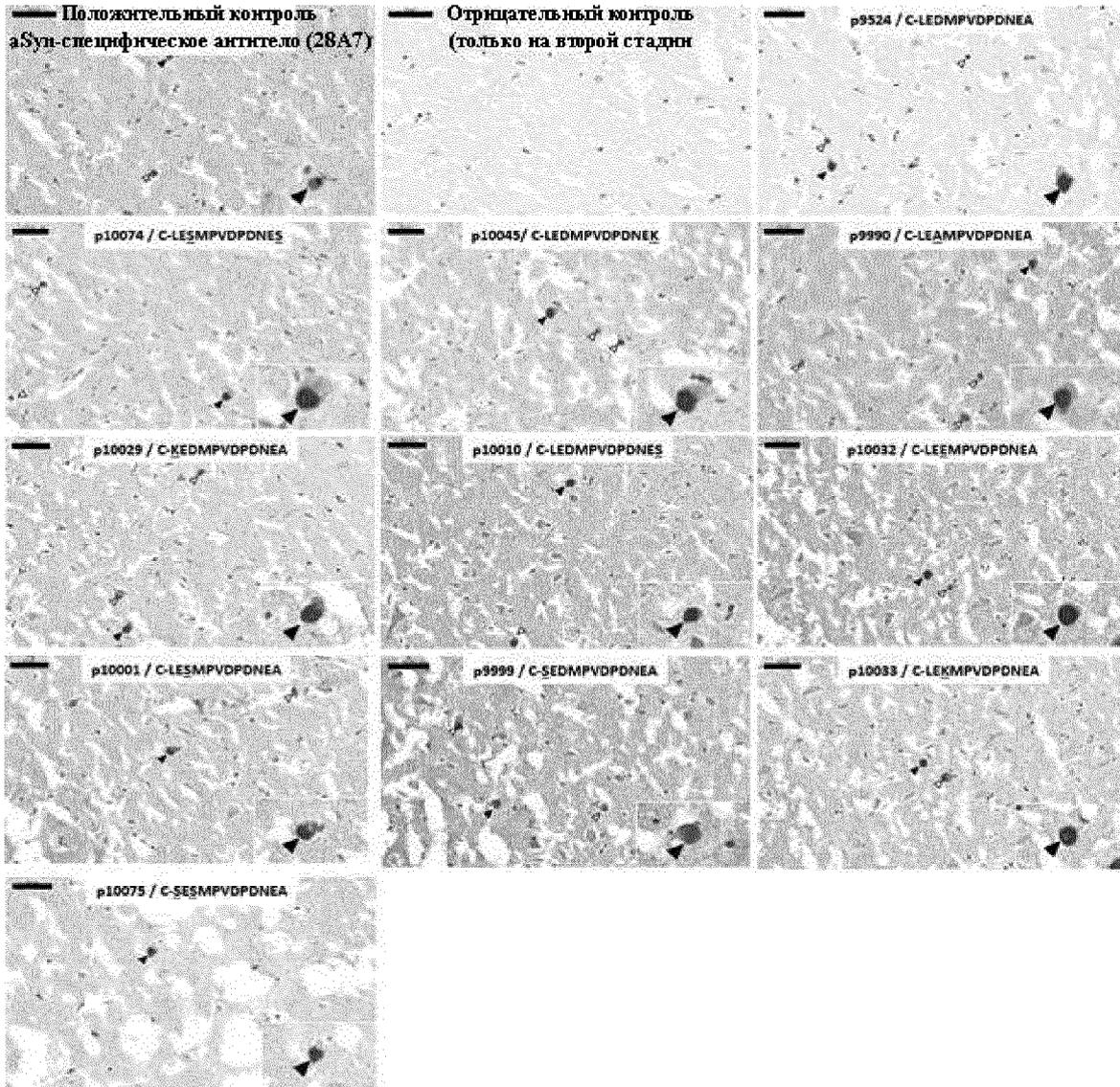


В

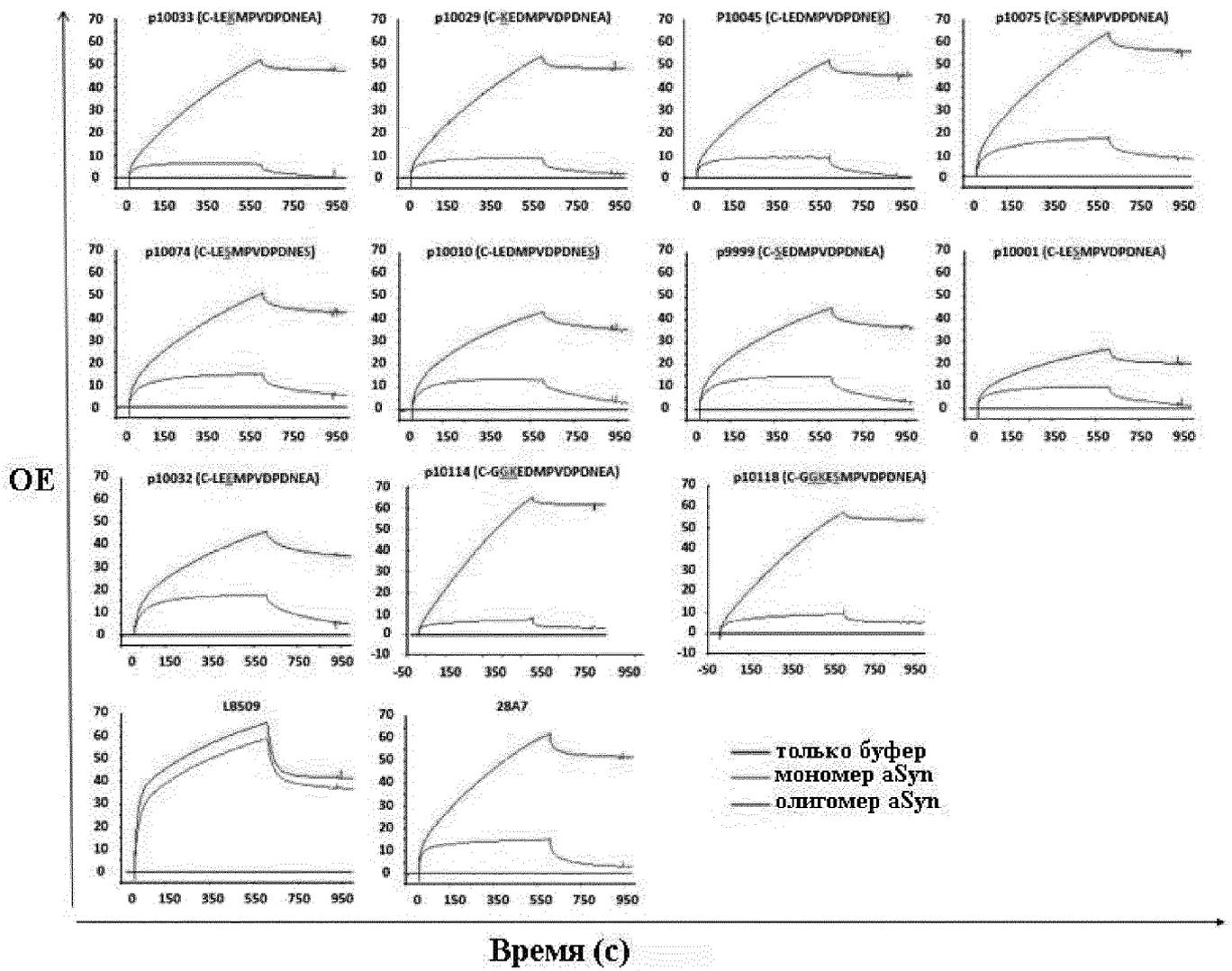


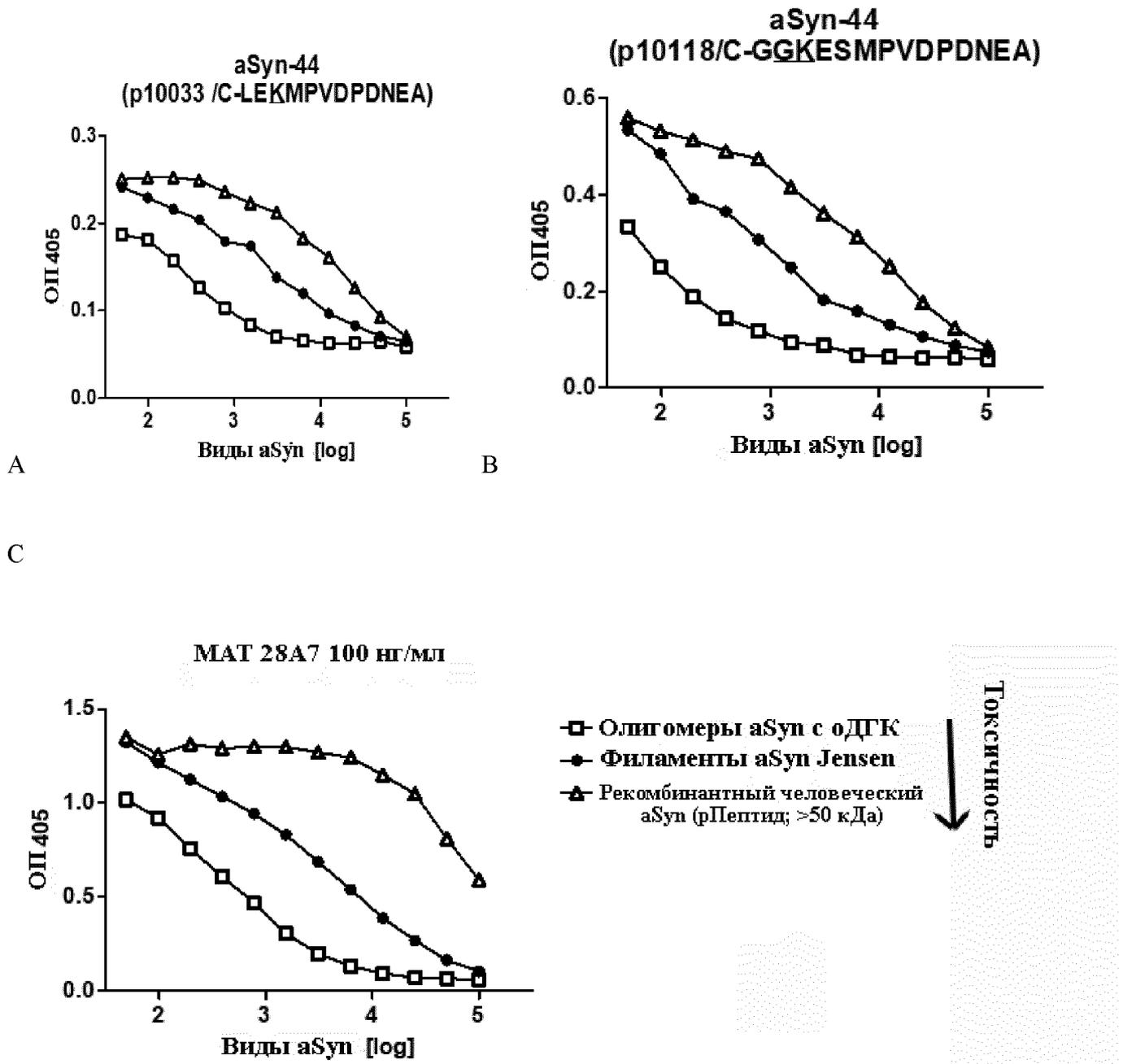
Фиг. 8

Фиг. 9



Фиг. 10





Фиг. 11