



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011144307/15, 01.04.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
01.04.2010

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
03.04.2009 EP 09157303.0

(43) Дата публикации заявки: 10.05.2013 Бюл. № 13

(45) Опубликовано: 27.04.2016 Бюл. № 12

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: (см. прод.)(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 03.11.2011(86) Заявка РСТ:
EP 2010/054418 (01.04.2010)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2010/115843 (14.10.2010)Адрес для переписки:
105082, Москва, Спартаковский пер., 2, стр. 1,
секция 1, этаж 3, ЕВРОМАРКПАТ

(72) Автор(ы):

Андреа ПФАЙФЕР (CH),
Андреас МУС (CH),
Фред ВАН-ЛЁВЕН (BE),
Мария ПИЛГРЕН (CH)

(73) Патентообладатель(и):

АЦ ИММУНЕ С.А. (CH),
Католикe Университайт Лёвен (BE)

(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к области фармацевтики и медицины и касается антигенной конструкции и фармацевтической композиции, содержащей ее, предназначенные для терапевтического и диагностического применения при лечении заболеваний и нарушений, которые вызываются или ассоциированы с нейтрофибриллярными сплетениями. В частности, в заявке описана фармацевтическая композиция, содержащая антигенный пептид, предпочтительно антигенный фосфорилированный пептид,

имитирующий основной патологический фосфо-эпитоп тау-белка, предназначенная для терапевтического и диагностического применения при лечении таупатий, включая болезнь Альцгеймера. Группа изобретений обеспечивает получение высокоспецифического иммунного ответа в организме и дает возможность предупреждать или облегчать таупатии или заболевания, связанные с таупатией. 6 н. и 28 з.п. ф-лы, 11 пр., 15 табл., 37 ил.

(56) (продолжение):

CAROLINE SMET " Etude des interactions entre la peptidyl-prolyl cis/trans isomerase Pin1 et la proteine microtubulaire tau/ Recherche d'inhibiteurs ciblant la liaison de Pin1 a ses substrats phosphoreles. THESE pour l'obtention du grade de Docteur de l'universite de Lille 2, 18 Octobre 2004, CAROLINE SMET " The

R U 2 5 8 2 9 1 6 C 2

R U 2 5 8 2 9 1 6 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 582 916** (13) **C2**

(51) Int. Cl.

A61K 39/385 (2006.01)

A61K 38/10 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2011144307/15, 01.04.2010**

(24) Effective date for property rights:
01.04.2010

Priority:

(30) Convention priority:
03.04.2009 EP 09157303.0

(43) Application published: **10.05.2013** Bull. № 13

(45) Date of publication: **27.04.2016** Bull. № 12

(85) Commencement of national phase: **03.11.2011**

(86) PCT application:
EP 2010/054418 (01.04.2010)

(87) PCT publication:
WO 2010/115843 (14.10.2010)

Mail address:

**105082, Moskva, Spartakovskij per., 2, str. 1, seksija
1, etazh 3, EVROMARKPAT**

(72) Inventor(s):

**Andrea PFAJFER (CH),
Andreas MUS (CH),
Fred VAN-LEVEN (BE),
Marija PILGREN (CH)**

(73) Proprietor(s):

**ATS IMMUNE S.A. (CH),
Katolike Univerzitatj Leven (BE)**

(54) PHARMACEUTICAL COMPOSITION

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: group of inventions refers to pharmaceuticals and medicine and concerns an antigen structure and pharmaceutical composition containing it, used for therapeutic and diagnostic application in treating diseases and disorders caused by or associated with neurofibrillar plexuses. Particularly, the claim describes a pharmaceutical composition containing an antigen peptide, preferentially an antigen

phosphorylated peptide simulating a primary pathological phosphor-epitope of tau-protein applicable for therapeutic and diagnostic application for treating taupathies, including Alzheimer disease.

EFFECT: group of inventions provides producing a high-specific immune response in the body and makes it possible to prevent or relieve taupathies or taupathy-related diseases.

34 cl, 11 ex, 15 tbl, 37 dwg

Настоящее изобретение относится к способам и композициям, предназначенным для терапевтического и диагностического применения при лечении заболеваний и нарушений, которые вызываются или ассоциированы с нейрофибриллярными сплетениями. В частности, изобретение относится к способам и композициям, предназначенным для терапевтического и диагностического применения при лечении таупатий, включая болезнь Альцгеймера (AD).

Нейрофибриллярные сплетения являются основным нейропатологическим отличительным признаком AD. Они образуются в результате агрегации гиперфосфорилированного тау-белка и его конформеров. Для AD характерна эта патология, отличающаяся целым рядом нейрогенеративных таупатий, в частности специфическими типами фронтотемпоральной деменции (деменция лобно-височного типа) (FTD).

Тау-белок представляет собой легко растворимый «не уложенный естественным образом» белок, обладающий авидностью к связыванию с микротрубочками (MT), усиливая их скрепление и стабильность. MT имеют решающее значение для целостности цитоскелета нейронов и, следовательно, для правильного формирования и функционирования нейронных цепей, т.е. для обеспечения способности к познанию и памяти. Связывание тау-белка с MT контролируется процессом динамического фосфорилирования и дефосфорилирования, что было продемонстрировано главным образом *in vitro* и на клетках, не относящихся к нейронам. Вследствие наличия большого количества возможных сайтов фосфорилирования (>80), точная роль каждого из них и идентификация ответственных за их фосфорилирование киназ остаются в основном не выясненными *in vivo*.

При AD в головном мозге таупатология развивается позднее, чем амилоидная патология и, поэтому, по-видимому, в ответ на амилоидную патологию, что представляет собой сущность гипотезы об амилоидном каскаде. Это основано и подтверждено исследованиями на страдающих AD и синдромом Дауна пациентах и подтверждается опытами, проведенными на трансгенных мышах с комбинированной амилоидной и таупатологией (Lewis и др., 2001; Oddo и др., 2004; Ribe и др., 2005; Muyliaert и др., 2006; 2008; Terwel и др., 2008).

Точное время возникновения обеих патологий у страдающих AD людей, а также механизмы, связывающие амилоидную и таупатологию, остаются в значительной степени не изученными, но существует предположение о том, что в них участвует активация нейронных путей передачи сигналов, которые действуют на или посредством GSK3 и cdk5, представляющие собой основные «тау-киназы» (см. обзор Muyliaert и др., 2006, 2008).

Гипотезы о том, что таупатия представляет собой не безобидное побочное действие, а является основным патологическим «орудием» при AD, основано на надежных генетических, патологических и экспериментальных данных, которые полностью согласуются друг с другом:

- в случаях ранней семейной AD, являющейся следствием мутаций амилоидного белка-предшественника (APP) или пресенилина, облигатной причиной патогенеза является накопление амилоида, но неизменно патология включает параллельную таупатию, идентичную той, которая имеет место в случаях начинающейся в старшем возрасте спорадической AD,

- серьезность когнитивной дисфункции и деменции коррелирует с таупатией, но не с амилоидной патологией, что было подтверждено в последнее время результатами, полученными на фазе 1 и 2 нескольких клинических исследований, включающих PIB-

РЕТ-визуализацию амилоида (визуализация методом РЕТ (эмиссионная позитронная томография) с использованием трейсера PIB (Pittsburg Compound-B)) и идентификацию целого ряда «ошибочных позитивов», а именно, обладающих нормальной когнитивной способностью индивидуумов с высокой нагрузкой амилоидом головного мозга,

- при семейной FTD таупатия провоцируется мутантным тау-белком и вызывает нейродегенерацию непосредственно, без амилоидной патологии,

- на экспериментальных созданных на мышах моделях установлено, что когнитивные дефекты, обусловленные амилоидной патологией, практически полностью устраняются при отсутствии тау-белка (Roberson и др., 2007).

Взятые в совокупности сведения подтверждают гипотезу о том, что тау-белок играет решающую роль в снижении когнитивной функции при AD и родственных нейродегенеративных таупатиях.

Наиболее широко применяемым лечением AD является пассивная иммунотерапия с использованием специфических МАт для устранения амилоидных пепетидов и их агрегатов, которые, как предполагается, являются нейротоксическими или синапсотоксическими.

Предполагается, что иммунотерапия, направленная на таупатологию, основана на противодействии патологическим конформерам тау-белка, которые, как известно или как предполагается, вызывают нейродегенерацию. Вызывающая AD амилоидная патология и внутринейронные агрегаты гиперфосфорилированного тау-белка, вероятно, обладают синергетическим действием на вызывающий когнитивные нарушения и дегенерацию каскад патологических событий, что приводит при AD к состоянию от умеренного ухудшения когнитивной способности (MCI) до серьезной деменции. Таким образом, комбинация медикаментозного лечения, направленного на таупатологию и направленного на амилоидную патологию (или любую другую патологию), представляет собой предпочтительный и значительно более эффективный путь лечения AD.

Известно лишь немного других терапевтических подходов, направленных против тау-белка, они включают в основном применение:

- ингибиторов киназ, которые, вероятно, повышают фосфорилирование тау-белка до патологических уровней,

- соединений, которые блокируют агрегацию гиперфосфорилированного тау-белка в цитоплазме.

Эти подходы страдают различными недостатками с позиций специфичности и эффективности, возникает проблема, связанная с попытками модифицировать метаболизм APP и амилоида, все это свидетельствует о важности продолжения поиска дополнительных подходов к лечению, включая иммунотерапию, направленную на тау-белок.

Практически не предпринималось попыток выявить, не говоря уже о том, чтобы оказать направленное воздействие на них, патологические тау-конформеры *in vivo*. На фазе II клинического испытания A(342 ни рассматривали, ни анализировали достаточно глубоко связанную со сплетением патологию (Nicoll и др., 2003; Masliah и др., 2005). С другой стороны, результаты направленной на амилоид экспериментальной иммунотерапии, полученные на доклинической мышинной модели с комбинированной AD-подобной патологией, продемонстрировали, что она оказывала также воздействие на таупатологию, хотя тау-агрегаты при этом сохранялись (Oddo и др., 2004).

Определенные сомнения вызывала возможность осуществления соответствующей внутриклеточной иммунотерапии, направленной на тау-белок. Они были сняты после экспериментального исследования таупатологии на мышинной модели, проведенного

в последние годы Asuni с соавторами (Asuni и др., 2007). Эти исследователи продемонстрировали снижение связанной со сплетением патологии и функциональные улучшения при вакцинации с использованием полученным из тау-белка фосфорилированного пептида (фосфо-пептид). Эти данные согласуются с опубликованными результатами иммунотерапии, направленной на α -синуклеин, которые были получены ранее на модели болезни Паркинсона (PD) (Masliah и др., 2005), и на супероксиддисмутазу, которые были получены на модели амиотрофического бокового склероза (ALS) (Urushitani и др., 2007). Эти два заболевания являются примерами болезней, связанных с внутриклеточными белками, которые приводят к нейродегенерации в результате действия пока не полностью изученных механизмов. С другой стороны, полноразмерный рекомбинантный тау-белок, который продуцируется бактериями, и который выделяют из них, по-видимому, не пригоден в качестве вакцины, хотя возможно, что применяемые адъюванты, т.е. полный адъювант Фрейнда и коклюшевый токсин, могли оказывать влияние на отрицательный результат, полученный в этом исследовании (Rosenmann и др., 2006).

Существует выраженная потребность в разработке пассивной и/или активной иммунотерапии, которая могла бы противостоять действию патологических белковых конформеров, которые, как известно или как предполагается, вызывают нейродегенеративные нарушения, такие как амилоидная патология при AD, вызываемая, например, внутринейронными агрегатами гиперфосфорилированного тау-белка, которая столь же типична для AD, что и амилоидная патология.

Существующую выраженную потребность можно удовлетворить согласно настоящему изобретению путем разработки методов пассивной или активной иммунизации с использованием вакцин на основе липосом (Nicolau и др., 2002; Muhs и др., 2007) и МАт на основе фосфо-пептидов, имитирующих основные патологические фосфо-эпитопа тау-белка. Эти комбинированные действия позволяют создавать новые специфические МАт к линейным и конформационным простым и сложным фосфо-эпитопам тау-белка, которые, вероятно, ответственны за синапто- и нейротоксичность при таупатологиях, включая AD.

В настоящем изобретении предложены новые способы и антигенные пептиды, предлагаемые в изобретении и представленные в настоящем описании, и их функциональные фрагменты, включая композиции, которые содержат указанные антигенные пептиды или их фрагменты, предназначенные для получения высокоспецифического, прежде всего обладающего конформационной специфичностью, иммунного ответа в организме, но, прежде всего в организме животного, в частности млекопитающего или человека, которые обладают высокой эффективностью и обладают способностью предупреждать или облегчать таупатии или симптомы, ассоциированные с таупатиями, группой заболеваний и нарушений, который ассоциированы с образованием нейрофибриллярных повреждений, основной патологии головного мозга в этой группе нейродегенеративных нарушений.

Настоящее изобретение относится также к антителам, прежде всего моноклональным антителам, включая их функциональные фрагменты, и фармацевтическим композициям, которые содержат указанные антитела, образовавшиеся в результате высокоспецифического, прежде всего обладающего конформационной специфичностью, иммунного ответа в организме при введении антигенного пептида, предлагаемого в изобретении и представленного в настоящем описании, или его функционального фрагмента и композиции, которая содержит указанный антигенный пептид или его фрагмент, для предупреждения или облегчения таупатии или симптомов,

ассоциированных с таупатиями, группой заболеваний и нарушений, который ассоциированы с образованием нейрофибриллярных повреждений, основной патологии головного мозга в этой группе нейродегенеративных нарушений.

Указанную группу нейродегенеративных нарушений можно подразделять на две субкатегории. К первой категории относятся заболевания или нарушения, которые характеризуются одновременным существованием тау- и амилоидной патологии, включая (но, не ограничиваясь только ими) болезнь Альцгеймера, болезнь Крейтцфельдта-Якоба, боксерскую деменцию, синдром Дауна, болезнь Герстманна-Штреусслера-Шейнкера, миозит с тельцами включения, церебральную амилоидную ангиопатию, связанную с белком-прионом, и травматическое повреждение головного мозга.

Ко второй категории относятся заболевания или нарушения без четкой амилоидной патологии, включая (но, не ограничиваясь только ими) комплекс амиотрофический боковой склероз/паркинсонизм-деменция (синдром Гуама), деменцию, связанную с накоплением аргирофильных зерен, кортикобазальную дегенерацию, диффузные нейрофибриллярные сплетения с кальцификацией, фронтотемпоральную деменцию с паркинсонизмом, сцепленную с хромосомой 17, болезнь Галлервордена-Шпатца, множественную системную атрофию, болезнь Ниманна-Пика типа С, болезнь Пика, прогрессирующий субкортикальный глиоз, прогрессирующий супрануклеарный панэнцефалит (прогрессирующий краснушный паралич).

В частности, настоящее изобретение относится к новым способам и фармацевтическим композициям, которые содержат антигенные пептиды, предлагаемые в изобретении и представленные в настоящем описании, или их функциональные фрагменты, и антитела, прежде всего моноклональные антитела, включая их функциональные фрагменты, которые можно получать путем введения антигенных пептидов, предлагаемых в изобретении и представленных в настоящем описании, или их функциональных фрагментов животному-хозяину для восстановления или улучшения, но, прежде всего для полного восстановления когнитивной способности к запоминанию, у млекопитающего, прежде всего у человека, который страдает заболеванием или нарушением, ассоциированным с образованием нейрофибриллярных повреждений.

Таким образом, объектом изобретения является антигенный пептид, прежде всего модифицированный антигенный пептид или его функциональный фрагмент, и фармацевтические композиции, которые содержат указанный антигенный пептид или его функциональный фрагмент, где пептид можно получать из тау-белка. В частности, изобретение относится к антигенному пептиду, прежде всего антигенному фосфо-пептиду или его функциональному фрагменту, имитирующему основной патологический фосфо-эпитоп тау-белка, где пептид или его фрагмент дополнительно модифицирован путем его присоединения к носителю или реконструкции в носителе, к фармацевтической композиции, которая содержит указанный антигенный пептид или его функциональный фрагмент, и к способу получения указанного пептида или его функционального фрагмента и фармацевтической композиции соответственно, для лечения заболеваний и нарушений, которые вызываются или ассоциированы с образованием нейрофибриллярных повреждений, основной патологии головного мозга при таупатии, которые представляют собой гетерогенную группу нейродегенеративных заболеваний или нарушений, включая заболевания или нарушения, которые характеризуются одновременным наличием тау- и амилоидной патологии, включая (но, не ограничиваясь только ими) болезнь Альцгеймера, болезнь Крейтцфельдта-Якоба, боксерскую деменцию, синдром Дауна, болезнь Герстманна-Штреусслера-Шейнкера, миозит с тельцами

включения, церебральную амилоидную ангиопатию, связанную с белком-прионом, травматическое повреждение головного мозга, а также другие заболевания или нарушения без четкой амилоидной патологии, включая (но, не ограничиваясь только ими) комплекс амиотрофический боковой склероз/паркинсонизм-деменция (синдром 5 Гуама), не-гуамовского типа болезнь моторных нейронов, связанную с нейрофибриллярными сплетениями, деменцию, связанную с накоплением аргирофильных зерен, кортикобазальную дегенерацию, диффузные нейрофибриллярные сплетения с кальцификацией, фронтотемпоральную деменцию с паркинсонизмом, сцепленную с хромосомой 17, болезнь Галлервордена-Шпатца, множественную системную атрофию, 10 болезнь Ниманна-Пика типа С, болезнь Пика, прогрессирующий субкортикальный глиоз, прогрессирующий супрануклеарный панэнцефалит, подострый склерозирующий панэнцефалит, деменцию, связанную только со сплетениями, постэнцефалический паркинсонизм, миотоническую дистрофию.

Один из вариантов осуществления изобретения относится к антигенному пептиду 15 или его функциональному фрагменту и фармацевтическим композициям, которые содержат указанный антигенный пептид или его функциональный фрагмент, где пептид или фрагмент содержит от 5 аминокислотных остатков до 30 аминокислотных остатков, прежде всего от 10 аминокислотных остатков до 25 аминокислотных остатков, прежде всего от 12 аминокислотных остатков до 22 аминокислотных остатков, прежде всего 20 от 14 аминокислотных остатков до 20 аминокислотных остатков, прежде всего от 16 аминокислотных остатков до 18 аминокислотных остатков соответственно, аминокислотной последовательности, выбранной из группы последовательностей, которые представлены в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9, где характерной особенностью 25 этих последовательностей является схема фосфорилирования, ассоциированная с патологическим состоянием или нарушением, прежде всего с состоянием или нарушением, ассоциированным с образованием нейрофибриллярных повреждений.

Одним из вариантов осуществления настоящего изобретения является молекула нуклеиновой кислоты или ее фрагменты, кодирующая(ие) антигенный пептид или его 30 функциональный фрагмент, выбранный из группы последовательностей, которые представлены в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9.

Одним из вариантов осуществления изобретения является антигенный пептид, прежде всего антигенный пептид, модифицированный согласно настоящему изобретению, или 35 его функциональный фрагмент и фармацевтическая композиция, которая содержит указанный антигенный пептид или его функциональный фрагмент, где аминокислотная последовательность пептида или фрагмента идентична по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85%, предпочтительно по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, предпочтительно по меньшей мере на 98%, 40 предпочтительно по меньшей мере на 99%, последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, и обладает практически такой же иммуногенной активностью, что и указанный антигенный пептид, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 2, где аминокислотный остаток, соответствующий аминокислотному остатку 18 (P-Tyr₁₈) SEQ ID NO: 2, является фосфорилированным (T1).

Одним из вариантов осуществления изобретения является антигенный пептид, прежде всего антигенный пептид, модифицированный согласно настоящему изобретению, или 45 его функциональный фрагмент и фармацевтическая композиция, которая содержит указанный антигенный пептид или его функциональный фрагмент, где аминокислотная

последовательность пептида или фрагмента представлена в SEQ ID NO: 2, в которой аминокислотный остаток 18 (P-Tyr₁₈) является фосфорилированным (T1).

Одним из вариантов осуществления изобретения является антигенный пептид, прежде всего антигенный пептид, модифицированный согласно настоящему изобретению, или его функциональный фрагмент и фармацевтическая композиция, которая содержит указанный антигенный пептид или его функциональный фрагмент, где аминокислотная последовательность пептида или фрагмента идентична по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85%, предпочтительно по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, предпочтительно по меньшей мере на 98%, предпочтительно по меньшей мере на 99%, последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4 соответственно, и обладает практически такой же иммуногенной активностью, что и указанный антигенный пептид, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 3, где по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере 2, предпочтительно по меньшей мере 3, но наиболее предпочтительно все аминокислотные остатки, соответствующие аминокислотным остаткам 202 (P-Ser₂₀₂), 205 (P-Thr₂₀₅), 212 (P-Thr₂₁₂) и 214 (P-Ser₂₁₄) SEQ ID NO: 3 и 4 соответственно, являются фосфорилированными.

Одним из вариантов осуществления изобретения является антигенный пептид, прежде всего антигенный пептид, модифицированный согласно настоящему изобретению, или его функциональный фрагмент и фармацевтическая композиция, которая содержит указанный антигенный пептид или его функциональный фрагмент, где аминокислотная последовательность пептида или фрагмента представлена в SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4 соответственно, в которых по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере 2, предпочтительно по меньшей мере 3, но наиболее предпочтительно все аминокислотные остатки 202 (P-Ser₂₀₂), 205 (P-Thr₂₀₅), 212 (P-Thr₂₁₂) и 214 (P-Ser₂₁₄) являются фосфорилированными.

Одним из вариантов осуществления изобретения является антигенный пептид, прежде всего антигенный пептид, модифицированный согласно настоящему изобретению, или его функциональный фрагмент и фармацевтическая композиция, которая содержит указанный антигенный пептид или его функциональный фрагмент, где аминокислотная последовательность пептида или фрагмента идентична по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85%, предпочтительно по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, предпочтительно по меньшей мере на 98%, предпочтительно по меньшей мере на 99%, последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4, и обладает практически такой же иммуногенной активностью, что и указанный антигенный пептид, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 4, где по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере 2 аминокислотных остатка, соответствующих аминокислотным остаткам 202 (P-Ser₂₀₂) и 205 (P-Thr₂₀₅) SEQ ID NO: 4, являются фосфорилированными.

Одним из вариантов осуществления изобретения является антигенный пептид, прежде всего антигенный пептид, модифицированный согласно настоящему изобретению, или его функциональный фрагмент и фармацевтическая композиция, которая содержит указанный антигенный пептид или его функциональный фрагмент, где аминокислотная последовательность пептида или фрагмента представлена в SEQ ID NO: 4, в которой по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере 2 аминокислотных остатка 202 (P-Ser₂₀₂) и 205 (P-Thr₂₀₅) являются фосфорилированными.

Одним из вариантов осуществления изобретения является антигенный пептид, прежде

всего антигенный пептид, модифицированный согласно настоящему изобретению, или его функциональный фрагмент и фармацевтическая композиция, которая содержит указанный антигенный пептид или его функциональный фрагмент, где аминокислотная последовательность пептида или фрагмента идентична по меньшей мере на 80%,
 5 предпочтительно по меньшей мере на 85%, предпочтительно по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, предпочтительно по меньшей мере на 98%, предпочтительно по меньшей мере на 99%, последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3, и обладает практически такой же иммуногенной активностью, что и указанный антигенный пептид, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 3, где
 10 по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере 2 аминокислотных остатка, соответствующих аминокислотным остаткам 212 (P-Thr₂₁₂) и 214 (P-Ser₂₁₄) SEQ ID NO: 3, являются фосфорилированными.

Одним из вариантов осуществления изобретения является антигенный пептид, прежде всего антигенный пептид, модифицированный согласно настоящему изобретению, или
 15 его функциональный фрагмент и фармацевтическая композиция, которая содержит указанный антигенный пептид или его функциональный фрагмент, где аминокислотная последовательность пептида или фрагмента представлена в SEQ ID NO: 3, в которой по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере 2 аминокислотных остатка 212 (P-Thr₂₁₂) и 214 (P-Ser₂₁₄) являются фосфорилированными.

Одним из вариантов осуществления изобретения является антигенный пептид, прежде всего антигенный пептид, модифицированный согласно настоящему изобретению, или его функциональный фрагмент и фармацевтическая композиция, которая содержит указанный антигенный пептид или его функциональный фрагмент, где аминокислотная
 25 последовательность пептида или фрагмента идентична по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85%, предпочтительно по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, предпочтительно по меньшей мере на 98%, предпочтительно по меньшей мере на 99%, последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5, и обладает практически такой же иммуногенной активностью, что и указанный антигенный пептид, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 5, где
 30 по меньшей мере один, но предпочтительно все аминокислотные остатки, соответствующие аминокислотным остаткам 396 (P-Ser₃₉₆) и 404 (P-Ser₄₀₄) SEQ ID NO: 5, являются фосфорилированными.

Одним из вариантов осуществления изобретения является антигенный пептид, прежде всего антигенный пептид, модифицированный согласно настоящему изобретению, или
 35 его функциональный фрагмент и фармацевтическая композиция, которая содержит указанный антигенный пептид или его функциональный фрагмент, где аминокислотная последовательность пептида или фрагмента представлена в SEQ ID NO: 5, в которой по меньшей мере один, но предпочтительно все аминокислотные остатки 396 (P-Ser₃₉₆)
 40 и 404 (P-Ser₄₀₄) являются фосфорилированными.

Одним из вариантов осуществления изобретения является антигенный пептид, прежде всего антигенный пептид, модифицированный согласно настоящему изобретению, или его функциональный фрагмент и фармацевтическая композиция, которая содержит указанный антигенный пептид или его функциональный фрагмент, где аминокислотная
 45 последовательность пептида или фрагмента идентична по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85%, предпочтительно по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, предпочтительно по меньшей мере на 98%, предпочтительно по меньшей мере на 99%, последовательности, представленной в SEQ

ID NO: 6, и обладает практически такой же иммуногенной активностью, что и указанный антигенный пептид, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 6, где по меньшей мере один, но предпочтительно все аминокислотные остатки, соответствующие аминокислотным остаткам 404 (P-Ser₄₀₄) и 409 (P-Ser₄₀₉) SEQ ID NO: 6, являются фосфорилированными.

Одним из вариантов осуществления изобретения является антигенный пептид, прежде всего антигенный пептид, модифицированный согласно настоящему изобретению, или его функциональный фрагмент и фармацевтическая композиция, которая содержит указанный антигенный пептид или его функциональный фрагмент, где аминокислотная последовательность пептида или фрагмента представлена в SEQ ID NO: 6, в которой по меньшей мере один, но предпочтительно все аминокислотные остатки 404 (P-Ser₄₀₄) и 409 (P-Ser₄₀₉) являются фосфорилированными.

Одним из вариантов осуществления изобретения является антигенный пептид, прежде всего антигенный пептид, модифицированный согласно настоящему изобретению, или его функциональный фрагмент и фармацевтическая композиция, которая содержит указанный антигенный пептид или его функциональный фрагмент, где аминокислотная последовательность пептида или фрагмента идентична по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85%, предпочтительно по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, предпочтительно по меньшей мере на 98%, предпочтительно по меньшей мере на 99%, последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7, и обладает практически такой же иммуногенной активностью, что и указанный антигенный пептид, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 7, где по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере 2, предпочтительно по меньшей мере 3, но предпочтительно все аминокислотные остатки, соответствующие аминокислотным остаткам 202 (P-Ser₂₀₂), 205 (P-Thr₂₀₅), 212 (P-Thr₂₁₂) и 214 (P-Ser₂₁₄) SEQ ID NO: 7, являются фосфорилированными.

Одним из вариантов осуществления изобретения является антигенный пептид, прежде всего антигенный пептид, модифицированный согласно настоящему изобретению, или его функциональный фрагмент и фармацевтическая композиция, которая содержит указанный антигенный пептид или его функциональный фрагмент, где аминокислотная последовательность пептида или фрагмента представлена в SEQ ID NO: 7, в которой по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере 2, предпочтительно по меньшей мере 3, но предпочтительно все аминокислотные остатки 202 (P-Ser₂₀₂), 205 (P-Thr₂₀₅), 212 (P-Thr₂₁₂) и 214 (P-Ser₂₁₄) SEQ ID NO: 7 являются фосфорилированными.

Одним из вариантов осуществления изобретения является антигенный пептид, прежде всего антигенный пептид, модифицированный согласно настоящему изобретению, или его функциональный фрагмент и фармацевтическая композиция, которая содержит указанный антигенный пептид или его функциональный фрагмент, где аминокислотная последовательность пептида или фрагмента идентична по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85%, предпочтительно по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, предпочтительно по меньшей мере на 98%, предпочтительно по меньшей мере на 99%, последовательности, представленной в SEQ ID NO: 8, и обладает практически такой же иммуногенной активностью, что и указанный антигенный пептид, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 8, где аминокислотный остаток, соответствующий аминокислотному остатку 409 (P-Ser₄₀₉) SEQ ID NO: 8, является фосфорилированным.

Одним из вариантов осуществления изобретения является антигенный пептид, прежде

всего антигенный пептид, модифицированный согласно настоящему изобретению, или его функциональный фрагмент и фармацевтическая композиция, которая содержит указанный антигенный пептид или его функциональный фрагмент, где аминокислотная последовательность пептида или фрагмента представлена в SEQ ID NO: 8, в которой аминокислотный остаток, соответствующий аминокислотному остатку 409 (P-Ser₄₀₉) SEQ ID NO: 8, является фосфорилированным.

Одним из вариантов осуществления изобретения является антигенный пептид, прежде всего антигенный пептид, модифицированный согласно настоящему изобретению, или его функциональный фрагмент и фармацевтическая композиция, которая содержит указанный антигенный пептид или его функциональный фрагмент, где аминокислотная последовательность пептида или фрагмента идентична по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85%, предпочтительно по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, предпочтительно по меньшей мере на 98%, предпочтительно по меньшей мере на 99%, последовательности, представленной в SEQ ID NO: 9, и обладает практически такой же иммуногенной активностью, что и указанный антигенный пептид, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 9, где аминокислотный остаток, соответствующий аминокислотному остатку 404 (P-Ser₄₀₄) SEQ ID NO: 9, является фосфорилированным.

Одним из вариантов осуществления изобретения является антигенный пептид, прежде всего антигенный пептид, модифицированный согласно настоящему изобретению, или его функциональный фрагмент и фармацевтическая композиция, которая содержит указанный антигенный пептид или его функциональный фрагмент, где аминокислотная последовательность пептида или фрагмента представлена в SEQ ID NO: 9, в которой аминокислотный остаток, соответствующий аминокислотному остатку 404 (P-Ser₄₀₄) SEQ ID NO: 9, является фосфорилированным.

Настоящее изобретение относится также к антигенному пептиду, модифицированному согласно настоящему изобретению, или его функциональному фрагменту и к фармацевтическим композициям, которые содержат указанный модифицированный антигенный пептид или его функциональный фрагмент, где пептид практически идентичен указанным выше антигенным пептидам, последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 2-9, и обладает практически такой же иммуногенной активностью, что и указанные антигенные пептиды, последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 2-9, но конкретный вариант пептидного фрагмента представляет собой консервативно модифицированный вариант одного из указанных фрагментов, при этом изменения приводят к замене одной или нескольких аминокислот, предпочтительно от 1 до 10 аминокислот, более предпочтительно от 1 до 6 аминокислот, еще более предпочтительно от 1 до 4 аминокислот, но наиболее предпочтительно от 1 до 3 аминокислот, на химически сходную аминокислоту. Таблицы консервативных замен, приводящих к получению функционально сходных аминокислот, хорошо известны в данной области и представлены ниже в настоящем описании. Консервативные замены предпочтительно следует осуществлять таким образом, чтобы общий чистый заряд пептида, а также распределение заряда по молекуле пептида, оставались практически прежними.

Под объем настоящего изобретения подпадает также вариант пептидного фрагмента, предпочтительно вариант антигенного пептида, модифицированного согласно настоящему изобретению, и фармацевтическая композиция, которая содержит указанный вариант пептидного фрагмента, где пептид практически идентичен указанным выше

фрагментам, предлагаемым в изобретении, и обладает практически такой же биологической активностью, что и указанные фрагменты, при этом в нем один или несколько аминокислотных остатков удалены в результате делеции.

Следующим вариантом изобретения является пептид, предлагаемый в изобретении, или его функциональный фрагмент в форме полимера, выбранного из группы, включающей 2-мер, 3-мер, 4-мер, 5-мер, 6-мер, 7-мер, 8-мер, 9-мер, 10-мер, 11-мер, 12-мер, 13-мер, 14-мер, 15-мер, 16-мер, 20-мер, 30-мер и 50-мер, при этом мономерные единицы указанного полимера всегда идентичны или представляют собой различные мономерные единицы и выбраны из группы, включающей пептид, предлагаемый в изобретении и представленный в настоящем описании, предпочтительно пептид, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9, или его функциональный фрагмент и варианты пептидов.

В одном из вариантов осуществления изобретения антигенный пептид, предлагаемый в изобретении и представленный в настоящем описании, или его функциональный фрагмент модифицируют путем присоединения к носителю или реконструкции в носителе, прежде всего носителе, который также функционирует в качестве адъюванта, с получением надмолекулярной антигенной конструкции. В конкретном варианте осуществления изобретения антигенный пептид, предлагаемый в изобретении и представленный в настоящем описании, или его функциональный фрагмент модифицируют путем присоединения или реконструкции в липосоме, например, с получением «надмолекулярной антигенной конструкции», которая описана в опубликованной международной заявке на патент WO 2005/081872, описание которой полностью включено в настоящее описание в качестве ссылки. Антигенный пептид или его функциональный фрагмент дополнительно модифицируют таким образом, чтобы он обладал способностью к уникальной презентации антигенного пептида на поверхности носителя, что приводит к повышенной экспозиции антигена и, в конце концов, к созданию антител, которые отличаются высокой степенью конформационной чувствительности. В частности, антигенный пептид, предлагаемый в изобретении и представленный в настоящем описании, модифицируют посредством ассоциации с липофильным или гидрофобным фрагментом, что облегчает встраивание в липидный бислой липосомы-носителя/иммунного адъюванта, прежде всего с липофильным или гидрофобным фрагментом, который функционирует в качестве «якоря» для закрепления пептида в бислое липосомы и имеет размер, который обеспечивает расположение пептида в непосредственной близости от поверхности липосомы и стабилизирует его в таком положении.

В другом варианте осуществления изобретения липофильный или гидрофобный остаток представляет собой жирную кислоту, триглицерид или фосфолипид, прежде всего жирную кислоту, триглицерид или фосфолипид, которые содержат углеродную C₁₂-C₂₄-цепь, но наиболее предпочтительно представляет собой пальмитиновую кислоту.

В конкретном варианте осуществления изобретения антигенный пептид, предлагаемый в изобретении и представленный в настоящем описании, или его функциональный фрагмент модифицируют с помощью по меньшей мере двух молекул пальмитиновой кислоты, ковалентно связанных с N- и C-концами указанного антигенного пептида или его функционального фрагмента, или путем реконструкции в носителе, представляющем собой липосому.

В одном из вариантов осуществления изобретения каждый из пептидов или фрагментов в конъюгатах шит с четырьмя молекулами пальмитиновой кислоты; в

результате они являются тетрапальмитированными.

В одном из вариантов осуществления изобретения две молекулы пальмитиновой кислоты сшиваются с N-концом и две молекулы пальмитиновой кислоты сшиваются с C-концом пептида или фрагмента.

5 В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения антигенный пептид, предлагаемый в изобретении и представленный в настоящем описании, или его функциональный фрагмент модифицируют посредством ассоциации с липофильным или гидрофобным фрагментом, таким, например, как пальмитиновая кислота, и реконструируют в липосоме, при этом препарат в виде липосомы может содержать
10 также адъюванты, такие, например, как липид А, квасцы, фосфат кальция, интерлейкин-1 и/или микрокапсулы из полисахаридов и белков, но прежде всего детоксифицированный липид А, такой как монофосфорильный или дифосфорильный липид А, или квасцы, что позволяет получать надмолекулярную антигенную конструкцию.

Одним из вариантов осуществления изобретения является надмолекулярная
15 конструкция, предлагаемая в изобретении и представленная в настоящем описании, которая содержит из расчета на одну молекулу носителя один или несколько антигенных пептидов, предпочтительно два или большее количество антигенных пептидов, предлагаемых в изобретении и представленных в настоящем описании, или их функциональных фрагментов.

20 В одном из вариантов осуществления изобретения молекула-носитель представляет собой липосому.

В одном из вариантов осуществления изобретения два или большее количество антигенных пептидов представляют собой одинаковые или различные пептиды, прежде всего пептиды, выбранные из группы, включающей SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ
25 ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9, или их функциональные фрагменты и варианты пептидов.

Одним из вариантов осуществления изобретения является надмолекулярная конструкция, предлагаемая в изобретении и представленная в настоящем описании, которая содержит из расчета на одну молекулу носителя комбинацию двух или большего
30 количества антигенных пептидов, последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, или их функциональных фрагментов.

Одним из вариантов осуществления изобретения является антитело, прежде всего моноклональное антитело, включая любой функциональный эквивалент антитела или его функциональные фрагменты, где антитело распознает и связывается с
35 фосфорилированным патологическим конформером тау-белка или теми фрагментами конформера, которые обуславливают патологические свойства указанного конформера, прежде всего с патологическим фосфо-эпитопом тау-белка.

В частности, настоящее изобретение относится к антителу, прежде всего моноклональному антителу, включая любой функциональный эквивалент антитела
40 или его функциональные фрагменты, где антитело распознает и связывается с высокой специфичностью с фосфорилированным патологическим конформером тау-белка или теми фрагментами конформера, которые обуславливают патологические свойства указанного конформера, прежде всего с патологическим фосфо-эпитопом тау-белка.

В конкретном варианте осуществления изобретения антитело, прежде всего
45 моноклональное антитело, включая любой функциональный эквивалент антитела или его функциональные фрагменты, предлагаемые в изобретении, связывается с патологическим конформером тау-белка или теми фрагментами конформера, которые обуславливают патологические свойства указанного конформера, прежде всего с

патологическим фосфо-эпитопом тау-белка, с аффинностью, которая по меньшей мере на 40%, предпочтительно по меньшей мере на 50%, предпочтительно по меньшей мере на 60%, предпочтительно по меньшей мере на 70%, предпочтительно по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 90%, 95% и вплоть до 100% выше, чем аффинность связывания с нефосфорилированным, непатологическим конформером тау-белка.

Конкретным вариантом осуществления изобретения является антитело, прежде всего моноклональное антитело, включая любой функциональный эквивалент антитела или его функциональные фрагменты, предлагаемые в изобретении, которое связывается специфически с нейрофибриллярными сплетениями (NFT) и волокнами нейропиля в головном мозге человека, страдающего болезнью Альцгеймера.

Другим объектом настоящего изобретения являются антитела, прежде всего моноклональные антитела или их функциональные фрагменты, которые непосредственно и специфически связываются с эпитопом на тау-белке или с комбинацией эпитопов, прежде всего с эпитопом, специфическим для фосфорилированного патологического конформера тау-белка, прежде всего с патологическим фосфо-эпитопом тау-белка, таким, например, как эпитоп, который представляет собой или входит в пептидную последовательность, выбранную из группы последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9, и варианты их фрагментов.

В частности, настоящее изобретение относится к антителу, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, прежде всего моноклональному антителу, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, которые можно получать иммунизацией пригодного животного антигенным пептидом, в частности пептидной композицией, предлагаемой в изобретении и представленной выше в настоящем описании, прежде всего композицией, которая содержит антигенный пептид, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO:

9, включая функциональный фрагмент или варианты их фрагментов.

Одним из вариантов осуществления изобретения является антитело, прежде всего моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, где антитело отличается свойствами антитела, которое продуцируется клеточной линией гибридомы ACI-41-Ab1, депонированной 3 марта 2010 г. под регистрационным номером DSM ACC3043.

Более конкретно, изобретение относится к антителу, прежде всего моноклональному антителу, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, которое продуцируется клеточной линией гибридомы ACI-41-Ab1, депонированной 3 марта 2010 г. под регистрационным номером DSM ACC3043.

Одним из вариантов осуществления изобретения является антитело, прежде всего моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, где антитело отличается свойствами антитела, которое продуцируется клеточной линией гибридомы 2B6, депонированной 10 марта 2010 г. под регистрационным номером DSM ACC3044.

Более конкретно, изобретение относится к антителу, прежде всего моноклональному антителу, включая любое функционально эквивалентное антитело или его

моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, где антитело отличается свойствами антитела, которое продуцируется клеточной линией гибридомы 7C2, депонированной 10 марта 2010 г. под регистрационным номером DSM ACC3050.

5 Более конкретно, изобретение относится к антителу, прежде всего моноклональному антителу, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, которое продуцируется клеточной линией гибридомы 7C2, депонированной 10 марта 2010 г. под регистрационным номером DSM ACC3050.

Антитело может представлять собой химерное антитело или гуманизированное
10 антитело, которое все еще сохраняет характеристики специфического связывания, указанные выше.

Одним из вариантов осуществления изобретения является клеточная линия, которая продуцирует антитело, предлагаемое в изобретении и представленное в настоящем описании.

15 Конкретным вариантом осуществления изобретения является клеточная линия гибридомы ACI-41-Ab1, депонированная 3 марта 2010 г. под регистрационным номером DSM ACC3043.

Другим конкретным вариантом осуществления изобретения является клеточная линия гибридомы 2B6, депонированная 10 марта 2010 г. под регистрационным номером
20 DSM ACC3044.

Другим конкретным вариантом осуществления изобретения является клеточная линия гибридомы 3AB, депонированная 10 марта 2010 г. под регистрационным номером DSM ACC3045.

Другим конкретным вариантом осуществления изобретения является клеточная
25 линия гибридомы 4C1, депонированная 10 марта 2010 г. под регистрационным номером DSM ACC3046.

Другим конкретным вариантом осуществления изобретения является клеточная линия гибридомы 5D10A3, депонированная 10 марта 2010 г. под регистрационным номером DSM ACC3047.

30 Другим конкретным вариантом осуществления изобретения является клеточная линия гибридомы 6C10, депонированная 10 марта 2010 г. под регистрационным номером DSM ACC3048.

Другим конкретным вариантом осуществления изобретения является клеточная линия гибридомы 6H1, депонированная 10 марта 2010 г. под регистрационным номером
35 DSM ACC3049.

Другим конкретным вариантом осуществления изобретения является клеточная линия гибридомы 7C2, депонированная 10 марта 2010 г. под регистрационным номером DSM ACC3050.

Под объем изобретения подпадают также субклоны и представляющие собой
40 варианты клоны указанных выше конкретных клеточных линий гибридом, которые сохраняют способность продуцировать антитело, обладающее способностью к специфическому связыванию с тау-белком, предлагаемое в настоящем изобретении.

Конкретным вариантом осуществления изобретения является фармацевтическая композиция и способ получения фармацевтической композиции, которая содержит
45 антигенный пептидный фрагмент, прежде всего антигенный пептидный фрагмент, модифицированный посредством присоединения к носителю и/или реконструкции в носителе, прежде всего носителе, представляющем собой липосому, предлагаемую в изобретении и представленную в настоящем описании, или его функциональный

фрагмент в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем и/или разбавителем и/или эксципиентом, предназначенная для сохранения или улучшения, прежде всего для полного восстановления когнитивной способности к запоминанию, у животного, прежде всего у млекопитающего или у человека, который страдает нарушением памяти.

5 Одним из вариантов осуществления изобретения является фармацевтическая композиция, которая содержит антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, прежде всего моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные
10 фрагменты, предлагаемые в настоящем изобретении, в терапевтически эффективном количестве в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем и/или разбавителем и/или эксципиентом.

Еще одним объектом изобретения является фармацевтическая композиция, предлагаемая в изобретении и представленная в настоящем описании, и/или способ
15 лечения заболеваний и нарушений, которые вызываются или ассоциированы с образованием нейрофибриллярных повреждений, основной патологии головного мозга при таупатии, которые представляют собой гетерогенную группу нейродегенеративных заболеваний или нарушений, включая заболевания или нарушения, которые характеризуются одновременным существованием тау- и амилоидной патологии, включая (но не ограничиваясь только ими) болезнь Альцгеймера, болезнь Крейтцфельда-
20 Якоба, боксерскую деменцию, синдром Дауна, болезнь Герстманна-Штреусслера-Шейнкера, миозит с тельцами включения, церебральную амилоидную ангиопатию, связанную с белком-прионом, травматическое повреждение головного мозга, а также другие заболевания или нарушения без четкой амилоидной патологии, включая (но, не ограничиваясь только ими) комплекс амиотрофический боковой склероз /паркинсонизм-
25 деменция (синдром Гуама), не-гуамовского типа болезнь моторных нейронов, связанную с нейрофибриллярными сплетениями, деменцию, связанную с накоплением аргирофильных зерен, кортикобазальную дегенерацию, диффузные нейрофибриллярные сплетения с кальцификацией, фронтотемпоральную деменцию с паркинсонизмом, сцепленную с хромосомой 17, болезнь Галлервордена-Шпатца, множественную
30 системную атрофию, болезнь Ниманна-Пика типа C, болезнь Пика, прогрессирующий субкортикальный глиоз, прогрессирующий супрануклеарный панэнцефалит, подострый склерозирующий панэнцефалит, деменцию, связанную только со сплетениями, постэнцефалический паркинсонизм, миотоническую дистрофию, где способ заключается в том, что вводят животному, в частности млекопитающему или человеку,
35 фармацевтическую композицию, предлагаемую в изобретении и представленную в настоящем описании, в терапевтически эффективном количестве в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем и/или разбавителем и/или эксципиентом.

Конкретным вариантом осуществления изобретения является фармацевтическая композиция, предлагаемая в изобретении и представленная в настоящем описании, и/
40 или способ сохранения или улучшения, прежде всего для полного восстановления когнитивной способности к запоминанию, у животного, прежде всего у млекопитающего или человека, который страдает нарушением памяти, где способ заключается в том, что вводят животному, в частности млекопитающему или человеку, фармацевтическую композицию, предлагаемую в изобретении и представленную в настоящем описании,
45 в терапевтически эффективном количестве в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем и/или разбавителем и/или эксципиентом.

Следующим объектом изобретения является фармацевтическая композиция и способ получения указанной композиции, а также способ индукции иммунного ответа у

животного, прежде всего у млекопитающего или человека, страдающего заболеванием и состоянием, которые вызываются или ассоциированы с образованием нейрофибриллярных повреждений, заключающийся в том, что вводят животному или человеку фармацевтическую композицию, предлагаемую в изобретении, в терапевтически эффективном количестве в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем и/или разбавителем и/или эксципиентом.

Одним из вариантов осуществления изобретения является способ индукции иммунного ответа у животного, прежде всего у млекопитающего или человека, страдающего нейрофибриллярными повреждениями, которые приводят к таупатии, достигающего такого уровня, чтобы можно было сохранять или улучшать симптомы, ассоциированные с этим заболеванием или состоянием, такие, например, как ухудшение памяти, прежде всего вплоть до полного восстановления исходного состояния.

Фармацевтическая композиция, содержащая антигенный пептид, предлагаемый в изобретении и представленный в настоящем описании, при введении животному, прежде всего млекопитающему, но предпочтительно человеку, приводит главным образом к образованию антител невоспалительных Th2-подтипов, например, изотипа IgG1 и IgG2b, и/или независимых от Т-клеток антител подклассов IgG, таких, например, как IgG3, и/или не приводит к существенному повышению уровня маркеров воспаления в головном мозге, выбранных из группы, включающей IL-1 β , IL-6, IFN- γ и TNF α .

Согласно другому объекту изобретения фармацевтическую композицию, содержащую антигенный пептид, предлагаемый в изобретении и представленный в настоящем описании, можно применять для индукции независимого от Т-клеток иммунного ответа при лечении заболевания, состояния или нарушения у пациента, прежде всего больного животного или человека, прежде всего пациента, который нуждается в указанном независимом от Т-клеток ответе, такого, например, как пациент с иммунной толерантностью или пациент с активированными Т-клетками, в которой антигенный пептид модифицирован посредством присоединения к носителю и/или реконструкции в носителе, прежде всего липосомном носителе, в результате чего антиген презентуется на поверхности носителя, прежде всего липосомы.

В одном из вариантов осуществления изобретения антигенная композиция, предлагаемая в изобретении и представленная в настоящем описании, обладает эффективностью в качестве иммуностимулятора.

В конкретном варианте осуществления изобретения указанный пептидный антиген презентуется в виде массива с большим количеством повторов на поверхности липосомы. В другом конкретном варианте осуществления изобретения указанный антиген не содержит Т-клеточный эпитоп.

В одном из вариантов осуществления изобретения антигенную композицию, предлагаемую в изобретении и представленную в настоящем описании, применяют для лечения пациента с иммунной толерантностью или пациента с активированными Т-клетками, прежде всего пациента с ослабленным иммунитетом, в частности пациента, страдающего аутоиммунным заболеванием, прежде всего пациента с Т-клеточным дефицитом, в частности с Т-клеточным дефицитом, обусловленным истощением у указанного пациента CD4-Т-клеток и/или с пониженным уровнем экспрессии CD14 и/или CD40L на CD4-Т-клетках.

Антитела, предлагаемые в изобретении, можно применять в способе диагностирования ассоциированного с тау-белком заболевания или состояния у пациента, заключающемся в том, что определяют иммуноспецифическое связывание антитела или его активного фрагмента с эпитопом тау-белка в образце или *in situ*,

который включает стадии, на которых

(а) приводят в контакт образец или специфическую часть организма или область организма, который/которая, как ожидается, может содержать тау-белок, с антителом, которое связывается с эпитопом тау-белка;

5 (б) дают возможность антителу связаться с тау-белком с образованием иммунологического комплекса;

(в) выявляют образование иммунологического комплекса; и

(г) устанавливают корреляцию между присутствием или отсутствием иммунологического комплекса и присутствием или отсутствием тау-белка в образце
10 или специфической части или области организма.

Одним из вариантов осуществления является способ диагностирования предрасположенности пациента к ассоциированному с тау-белком заболеванию или состоянию, заключающийся в том, что определяют иммуноспецифическое связывание моноклонального антитела или его активного фрагмента с эпитопом тау-белка в
15 образце или *in situ*, который включает стадии, на которых

(а) приводят в контакт образец или специфическую часть организма или область организма, который/которая, как ожидается, может содержать тау-антиген, с антителом, предлагаемым в изобретении и представленным в настоящем описании, где антитело связывается с эпитопом тау-белка;

20 (б) дают возможность антителу связаться с тау-антигеном с образованием иммунологического комплекса;

(в) выявляют образование иммунологического комплекса; и

(г) устанавливают корреляцию между присутствием или отсутствием иммунологического комплекса и присутствием или отсутствием тау-антигена в образце
25 или специфической части или области организма,

(д) осуществляют сравнение количества указанного иммунологического комплекса с нормальным контрольным значением,

при этом увеличение количества агрегатов по сравнению с нормальным контрольным значением свидетельствует о том, что пациент страдает или имеет риск развития
30 ассоциированного с тау-белком заболевания или состояния.

Следующим вариантом осуществления изобретения является способ мониторинга минимальных остаточных признаков заболевания у пациента после лечения антителом или композицией по одному из предыдущих пунктов, заключающийся в том, что:

(а) приводят в контакт образец или специфическую часть организма или область
35 организма, который/которая, как ожидается, может содержать тау-антиген, с антителом, предлагаемым в изобретении и представленным в настоящем описании, где антитело связывается с эпитопом тау-белка;

(б) дают возможность антителу связаться с тау-антигеном с образованием иммунологического комплекса;

40 (в) выявляют образование иммунологического комплекса; и

(г) устанавливают корреляцию между присутствием или отсутствием иммунологического комплекса и присутствием или отсутствием тау-антигена в образце
или специфической части или области организма,

(д) осуществляют сравнение количества указанного иммунологического комплекса
45 с нормальным контрольным значением,

при этом увеличение количества агрегатов по сравнению с нормальным контрольным значением свидетельствует о том, что пациент все еще страдает минимальными остаточными признаками заболевания.

Следующим вариантом осуществления изобретения является способ прогнозирования восприимчивости пациента к лечению антителом или композицией по одному из предыдущих пунктов, заключающийся в том, что:

(а) приводят в контакт образец или специфическую часть организма или область организма, который/которая, как ожидается, может содержать тау-антиген, с антителом, предлагаемым в изобретении и представленным в настоящем описании, где антитело связывается с эпитопом тау-белка;

(б) дают возможность антителу связаться с тау-антигеном с образованием иммунологического комплекса;

(в) выявляют образование иммунологического комплекса; и

(г) устанавливают корреляцию между присутствием или отсутствием иммунологического комплекса и присутствием или отсутствием тау-антигена в образце или специфической части или области организма,

(д) осуществляют сравнение количества указанного иммунологического комплекса до, и после начала лечения,

при этом снижение количества агрегатов свидетельствует о том, что существует высокая вероятность того, что пациент будет обладать восприимчивостью к лечению.

Согласно другому варианту осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, можно применять в тест-наборе для выявления и диагностирования ассоциированных с тау-белком заболеваний и состояний.

В частности, предложен тест-набор, предназначенный для выявления и диагностирования ассоциированных с тау-белком заболеваний и состояний, который содержит антитела, предлагаемые в изобретении, в частности тест-набор, который содержит контейнер, включающий одно или несколько антител, предлагаемых в настоящем изобретении, и инструкции по применению антител для связывания с тау-антигеном с образованием иммунологического комплекса, так, чтобы присутствие или отсутствие иммунологического комплекса коррелировало с присутствием или отсутствием тау-антигена.

Эти и другие объекты, особенности и преимущества настоящего изобретения должны стать более ясными после ознакомления с прилагаемым подробным описанием вариантов осуществления изобретения и прилагаемой формулой изобретения.

Краткое описание чертежей и последовательностей

На чертежах показано:

на фиг.1а - результаты анализа антител к Tau5-20 [pY18] изотипа IgG в мышцах дикого типа (WT), иммунизированных вакциной ACI-33. Анализ антител к Tau5-20 [pY18] изотипа IgG осуществляли в сыворотке мышей дикого типа линии C57BL/6, которым вводили путем 3 инъекций ACI-33 в дни d0, d13 и d28 и отбирали образцы крови в d-1, d27 и d47. Результаты выражены в виде средних значений ОП + стандартное отклонение для группы, состоящей из 6 мышей;

на фиг.1б - результаты анализа антител к Tau5-20 [pY18] изотипа IgG в ТКО - мышцах, иммунизированных ACI-33. Анализ антител к Tau5-20 [pY18] изотипа IgG осуществляли в сыворотке мышей дикого типа линии C57BL/6, которым вводили путем 3 инъекций ACI-33 в d0, d13 и d28 и отбирали образцы крови в d-1, d27 и d47. Результаты выражены в виде средних значений ОП + стандартное отклонение для группы, состоящей из 6 мышей;

на фиг.2а - результаты анализа антител к Tau393-408 [pS396/pS404] изотипа IgG в WT-мышцах, иммунизированных ACI-35. Анализ антител к Tau393-408 [pS396/pS404] изотипа IgG осуществляли в сыворотке мышей дикого типа линии C57BL/6, которым

вводили путем 5 инъекций АСІ-35 в d0, d16, d30, d99 и d113 и отбирали образцы крови в d-1, d28, d42, d98 и d126. Результаты выражены в виде средних значений ОП + стандартное отклонение для группы, состоящей из 6 мышей;

на фиг.2б - результаты анализа антител к Tau393-408 [pS396/pS404] изотипа IgG в ТКО - мышах, иммунизированных АСІ-35. Анализ антител к Tau393-408 [pS396/pS404] изотипа IgG осуществляли в сыворотке ТКО - мышей, которым вводили путем 5 инъекций АСІ-35 в d0, d16, d30, d99 и d113 и отбирали образцы крови в d-1, d28, d42, d98 и d126. Результаты выражены в виде средних значений ОП + стандартное отклонение для группы, состоящей из 6 мышей;

на фиг.3а - результаты анализа антител к Tau401-418 [pS404/S409] изотипа IgG в WT-мышах, иммунизированных АСІ-36. Анализ антител к Tau401-418 [pS404/S409] изотипа IgG осуществляли в сыворотке мышей дикого типа линии C57BL/6, которым вводили путем 3 инъекций АСІ-36 в d0, d13 и d28 и отбирали образцы крови в d-1, d27 и d47. Результаты выражены в виде средних значений ОП + стандартное отклонение для группы, состоящей из 6 мышей;

на фиг.3б - результаты анализа антител к Tau401-418 [pS404/S409] изотипа IgG в ТКО-мышах, иммунизированных АСІ-36. Анализ антител к Tau401-418 [pS404/S409] изотипа IgG осуществляли в сыворотке ТКО-мышей, которым вводили путем 3 инъекций АСІ-36 в d0, d13 и d28 и отбирали образцы крови в d-1, d27 и d47. Результаты выражены в виде средних значений ОП +- стандартное отклонение для группы, состоящей из 6 мышей;

фиг.4а/4б - результаты анализа антител к Tau206-221 [pT212/pS214] и к Tau196-211 [pS202/pT205] изотипа IgG в WT-мышах, иммунизированных АСІ-41. Анализ антител к Tau206-221 [pT212/pS214] и к Tau196-211 [pS202/pT205] изотипа IgG осуществляли в сыворотке мышей дикого типа линии C57BL/6, которым вводили путем 3 инъекций АСІ-41 в d0, d20 и d35 и отбирали образцы крови в d-1, d34 и d48. Результаты выражены в виде средних значений ОП + стандартное отклонение для группы, состоящей из 6 мышей; одну ту же сыворотку оценивали с использованием обоих фосфорилированных тау-пептидов (pТаи, pТау-пептиды);

на фиг.4в/4г - результаты анализа антител к Tau206-221 [pT212/pS214] и к Tau196-211 [pS202/pT205] изотипа IgG в ТКО-мышах, иммунизированных АСІ-41. Анализ антител к Tau206-221 [pT212/pS214] и к Tau196-211 [pS202/pT205] изотипа IgG осуществляли в сыворотке ТКО, которым вводили путем 3 инъекций АСІ-41 в d0, d20 и d35 и отбирали образцы крови в d-1, d34 и d48. Результаты выражены в виде средних значений ОП + стандартное отклонение для группы, состоящей из 6 мышей; одну ту же сыворотку оценивали с использованием обоих pТау-пептидов;

на фиг.5а - результаты анализа антител к Tau5-20 [pY18] изотипов IgG и IgM в WT-мышах, иммунизированных АСІ-33. Анализ антител к Tau5-20 [pY18] изотипов IgG1, -2а, -2б, -3 и IgM осуществляли в сыворотке C57BL/6-мышей через 47 дней после первой иммунизации с использованием АСІ-33. Результаты выражены в виде средних значений ОП при применении разведения 1/100 (IgG1), 1/100 (IgG2а), 1/100 (IgG2б), 1/100 (IgG3) и 1/3200 (IgM)+стандартное отклонение для группы, состоящей из 6 мышей;

на фиг.5б - результаты анализа антител к Tau5-20 [pY18] изотипов IgG и IgM в ТКО-мышах, иммунизированных АСІ-33. Анализ антител к Tau5-20 [pY18] изотипов IgG1, -2а, -2б, -3 и IgM осуществляли в сыворотке ТКО-мышей через 47 дней после первой иммунизации с использованием АСІ-33. Результаты выражены в виде средних значений ОП при применении разведения 1/100 (IgG1), 1/100 (IgG2а), 1/100 (IgG2б), 1/100 (IgG3) и 1/3200 (IgM)+стандартное отклонение для группы, состоящей из 6 мышей;

на фиг.6а - результаты анализа антител к Tau393-408 [pS396/pS404] изотипов IgG и IgM в WT-мышях, иммунизированных ACI-35. Анализ антител к Tau393-408 [pS396/pS404] изотипов IgG1, -2а, -2b, -3 и IgM осуществляли в сыворотке C57BL/6-мышей через 42 дня после первой иммунизации с использованием ACI-35. Результаты выражены в виде средних значений ОП при применении разведения 1/100 (IgG1), 1/1600 (IgG2а), 1/1600 (IgG2b), 1/800 (IgG3) и 1/1600 (IgM)+стандартное отклонение для группы, состоящей из 6 мышей;

на фиг.6б - результаты анализа антител к Tau393-408 [pS396/pS404] изотипов IgG и IgM в ТКО-мышях, иммунизированных ACI-35. Анализ антител к Tau393-408 [pS396/pS404] изотипов IgG1, -2а, -2b, -3 и IgM осуществляли в сыворотке ТКО-мышей через 42 дня после первой иммунизации с использованием ACI-35. Результаты выражены в виде средних значений ОП при применении разведения 1/100 (IgG1), 1/1600 (IgG2а), 1/1600 (IgG2b), 1/800 (IgG3) и 1/1600 (IgM)+стандартное отклонение для группы, состоящей из 6 мышей;

на фиг.7а - результаты анализа антител к Tau401-418 [pS404/S409] изотипов IgG и IgM WT-мышях, иммунизированных ACI-36. Анализ антител к Tau401-418 [pS404/S409] изотипов IgG1, -2а, -2b, -3 и IgM осуществляли в сыворотке C57BL/6-мышей через 47 дней после первой иммунизации с использованием ACI-36. Результаты выражены в виде средних значений ОП при применении разведения 1/100 (IgG1), 1/400 (IgG2а), 1/400 (IgG2b), 1/100 (IgG3) и 1/400 (IgM)+стандартное отклонение для группы, состоящей из 6 мышей;

на фиг.7б - результаты анализа антител к Tau401-418 [pS404/S409] изотипов IgG и IgM ТКО-мышях, иммунизированных ACI-36. Анализ антител к Tau401-418 [pS404/S409] изотипов IgG1, -2а, -2b, -3 и IgM осуществляли в сыворотке ТКО-мышей через 47 дней после первой иммунизации с использованием ACI-36. Результаты выражены в виде средних значений ОП при применении разведения 1/100 (IgG1), 1/400 (IgG2а), 1/400 (IgG2b), 1/100 (IgG3) и 1/400 (IgM)+стандартное отклонение для группы, состоящей из 5 мышей;

на фиг.8а - результаты анализа антител к Tau196-211 [pS202/pT205] изотипов IgG и IgM в WT-мышях, иммунизированных ACI-41. Анализ антител к Tau196-211 [pS202/pT205] изотипов IgG1, -2а, -2b, -3 и IgM осуществляли в сыворотке C57 ВЬ/6-мышей через 48 дней после первой иммунизации с использованием ACI-41. Результаты выражены в виде средних значений ОП при применении разведения 1/100 (IgG1), 1/100 (IgG2а), 1/3200 (IgG2b), 1/1600 (IgG3) и 1/3200 (IgM)+стандартное отклонение для группы, состоящей из 6 мышей;

на фиг.8б - результаты анализа антител к Tau196-211 [pS202/pT205] изотипов IgG и IgM в ТКО-мышях, иммунизированных ACI-41. Анализ антител к Tau196-211 [pS202/pT205] изотипов IgG1, -2а, -2b, -3 и IgM осуществляли в сыворотке ТКО-мышей через 48 дней после первой иммунизации с использованием ACI-41. Результаты выражены в виде средних значений ОП при применении разведения 1/100 (IgG1), 1/100 (IgG2а), 1/3200 (IgG2b), 1/1600 (IgG3) и 1/3200 (IgM)+стандартное отклонение для группы, состоящей из 6 мышей;

на фиг.9а/9б - супернатанты гибридом из Т25-колб, полученные после вакцинации с использованием ACI-36: ТАUPIR-скрининг (скрининг на основе иммунореактивного окрашивания тау-белка) и Тау-ELISA-скрининг. 9а: ТАUPIR-окрашивание старых biGT-мышей с использованием неразведенного супернатанта. 9б: Анализ титров антител к рТау-пептиду Т4.5, к Тау-пептиду Т4.6, к рТау-белку и к Тау-белку в образцах клонов неразведенного супернатанта. Результаты выражены в виде ОП;

на фиг.10а/10б/10в - супернатанты гибридом из Т25-колб, полученные после вакцинации с использованием АСІ-41: ТАUPIR-скрининг и Таи ELISA-скрининг. 10а: ТАUPIR-окрашивание старых biGT-мышей с использованием неразведенного супернатанта. 9б: Анализ титров антител к рТау-пептиду Т8.5, к Тау-пептиду Т8.6, к рТау-белку и к Тау-белку в образцах неразведенного клона супернатанта. Результаты выражены в виде ОП; 10в: Анализ титров антител к рТау-пептиду Т9.5, к Тау-пептиду Т9.6, к рТау-белку и к Тау-белку в образцах клонов неразведенного супернатанта. Результаты выражены в виде ОП;

фиг.11 - результаты анализа супернатанта гибридомы на планшете, сенсibilизированном Т8: Tau206-221 [pT212/p8214], Т9: Tau196-211 [p8202/pT205] и hP-Taи. Анализ антител к Tau206-221 [pT212/pS214], к Tau196-211 [pS202/pT205] и к hP-Taи из клонов супернатанта гибридомы. Результаты выражены в виде ОП. Один и тот же супернатант тестировали в неразведенном состоянии при использовании как рТау-пептидов, так и hP-Taи-пептидов;

на фиг.12 - результаты окрашивания клоном антитела АСІ-41-Ab1 (Т89-F4) NFT в головном мозге страдавших AD людей. Срезы головного мозга страдавших AD пациентов (а, б и в), страдавших PSP (прогрессирующий супрануклеарный паралич) пациентов (г, д и е) и здоровых контрольных индивидуумов (ж, з и и) окрашивали, используя АТ100 (а, г и ж) или АСІ-41-Ab1 (Т89-F4) в разведениях 1/1 (б, д и з) или 1/30 (в, е и и);

на фиг.13 - результаты окрашивания антителом 5D10 NFT в головном мозге страдавших AD людей. Срезы коры головного мозга страдавших AD пациентов окрашивали, используя антитела 5D10 (а) или АТ100 (б);

на фиг.14 - результаты анализа антител к Tau393-408 [pS396/pS404] изотипа IgG в мышцах, иммунизированных АСІ-35. Анализ антител к Tau393-408 [pS396/pS404] изотипа IgG осуществляли в плазме С57BL/6-мышей, которым вводили путем 3 инъекций АСІ-35 в d0, d14 и d28 и отбирали образцы крови в d-7, d7, d21, d35 и d56. Результаты выражены в виде средних значений ОП + стандартное отклонение для группы, состоящей из 10 мышей;

на фиг.15 - результаты анализа антител к Tau393-408 [pS396/pS404] изотипов IgG в мышцах, иммунизированных АСІ-35. Анализ антител к Tau393-408 [pS396/pS404] изотипов IgG1, -2а, -2б и -3 осуществляли в плазме С57BL/6-мышей через 35 дней после первой иммунизации АСІ-35. Результаты выражены в виде средних значений ОП при применении ненасыщающего разведения 1/1600 (IgG1), 1/3200 (IgG2а), 1/3200 (IgG2б) и 1/800 (IgG3) +стандартное отклонение для группы, состоящей из 10 мышей;

на фиг.16а: - результаты анализа антител к Tau393-408 [pS396/S404] изотипа IgM в мышцах, иммунизированных АСІ-35. Анализ антител к Tau393-408 [pS396/S404] изотипа IgM осуществляли в плазме С57BL/6-мышей через 35 дней после первой иммунизации АСІ-35. Результаты выражены в виде средних значений ОП при применении разведения 1/6400+стандартное отклонение для группы, состоящей из 10 мышей;

на фиг.16б - результаты анализа антител к Tau393-408 изотипа IgG в мышцах, иммунизированных АСІ-35. Анализ антител к Tau393-408 изотипа IgG осуществляли в плазме С57BL/6-мышей через 35 дней после первой иммунизации АСІ-35. Результаты выражены в виде средних значений ОП при применении разведения 1/100+стандартное отклонение для группы, состоящей из 10 мышей;

на фиг.17 - результаты анализа пролиферации клеток из селезенки, повторно стимулированной Con А или рТау/Тау-пептидом. Анализ пролиферации тау-специфических Т-клеток осуществляли с использованием МТТ в d56. В каждой группе

объединяли спленоциты из 10 мышей и повторно стимулировали Con A, Tau393-408 [pS396/S404]- или Tau393-408-пептидами;

на фиг.18 - результаты ELISPOT-анализа производства цитокинов спленоцитами, повторно стимулированными Tau393-408 [pS396/S404]- и Tau393-408-пептидами.

5 Осуществляли ELISPOT-анализ производства цитокинов Р-Тau/Тau-специфическими Т-клетками. В каждой группе объединяли спленоциты из 10 мышей и повторно стимулировали Tau393-408 [pS396/S404]- и Tau393-408-пептидами;

на фиг.19 - результаты анализа антител к Tau5-20 [pY18] изотипа IgG ав мышях, иммунизированных ACI-33. Анализ антител к Tau5-20 [pY18] изотипа IgG осуществляли
10 в сыворотке TPLH-мышей, которым вводили путем 5 инъекций ACI-33 в d0, d13, d28, d91 и d133 и отбирали образцы крови в d-1, d27, d41, d76, d104 и d135. Результаты выражены в виде среднего значения ОП+стандартное отклонение для группы мышей, d-1 n=10 мышей, d27, d41 и d76 n=9 мышей, 1 мышь погибла из-за драки, d104 n=6, 3 мыши погибли в результате патологии, d135 n=2, 4 мыши погибли в результате
15 патологии;

на фиг.20 - результаты анализа антител к Tau393-408 [pS396/pS404] изотипа IgG в мышях, иммунизированных ACI-35. Анализ антител к Tau393-408 [pS396/pS404] изотипа IgG осуществляли в сыворотке TPLH-мышей, которым вводили путем 5 инъекций ACI-35 в d0, d13, d27, d91 и d133 и отбирали образцы крови в d-1, d26, d40, d75, d103, d145 и
20 d155. Результаты выражены в виде среднего значения ОП+стандартное отклонение для группы мышей, d-1 и d26 n=10 мышей, d40 n=9 мышей, d75 n=6 мышей, d103 и d145 n=4 мыши, d155 n=3 мыши. Все мыши погибли в результате патологии;

на фиг.21 - результаты анализа антител к Tau206-221 [pT212, pS214] изотипа IgG в мышях, иммунизированных ACI-39. Анализ антител к Tau206-221 [pT212, pS214] изотипа
25 IgG осуществляли в сыворотке TPLH-мышей, которым вводили путем 5 инъекций ACI-39 в d0, d13, d28, d91 и d133 и отбирали образцы крови в d-1, d27, d41, d76, d104 и d135. Результаты выражены в виде среднего значения ОП+стандартное отклонение для группы мышей, d-1, d27 и d41 n=10 мышей, d76 n=7 мышей, d104 n=6 мышей, d135 n=2 мыши. Все мыши погибли в результате патологии;

на фиг.22 - результаты анализа антител к Tau196-211 [pS202, pT205] изотипа IgG в мышях, иммунизированных ACI-40. Анализ антител к Tau196-211 [pS202, pT205] изотипа IgG осуществляли в сыворотке TPLH-мышей, которым вводили путем 5 инъекций ACI-40 в d0, d13, d28, d91 и d133 и отбирали образцы крови в d-1, d27, d41, d76, d104 и d135. Результаты выражены в виде среднего значения ОП+стандартное отклонение для
35 группы мышей, d-1, d27 и d41 n=10 мышей, d76 n=8 мышей, d104 n=6 мышей, d135 n=5 мышей. Все мыши погибли в результате патологии;

на фиг.23 - результаты анализа антител к Tau5-20 [pY18] изотипов IgG и IgM в мышях, иммунизированных ACI-33. Анализ антител к Tau5-20 [pY18] изотипов IgG1, -2a, -2b, -3 и IgM осуществляли в сыворотке TPLH-мышей в d41 после трех иммунизации ACI-33.
40 Результаты выражены в виде средних значений ОП при применении ненасыщающего разведения 1/100 (IgG1), 1/200 (IgG2a), 1/100 (IgG2b), 1/100 (IgG3) и 1/100 (IgM)+стандартное отклонение для группы, состоящей из 9 мышей;

на фиг.24 - результаты анализа антител к Таи393-408 [pS396/pS404] изотипов IgG и IgM в мышях, иммунизированных ACI-35. Анализ антител к Tau393-408 [pS396/pS404]
45 изотипов IgG1, -2a, -2b, -3 и IgM осуществляли в сыворотке TPLH-мышей в d40 после трех иммунизации ACI-35. Результаты выражены в виде средних значений ОП при применении ненасыщающего разведения 1/100 (IgG1), 1/100 (IgG2a), 1/100 (IgG2b), 1/100 (IgG3) и 1/100 (IgM)+стандартное отклонение для группы, состоящей из 9 мышей;

на фиг.25 - результаты анализа антител к Tau206-221 [pT212, pS214] изотипов IgG и IgM в мышцах, иммунизированных ACI-39. Анализ антител к Tau206-221 [pT212, pS214] изотипов IgG1, -2a, -2b, -3 и IgM осуществляли в сыворотке TPLH-мышей в d41 после трех иммунизации ACI-39. Результаты выражены в виде средних значений ОП при

5 применении ненасыщающего разведения 1/100 (IgG1), 1/200 (IgG2a), 1/200 (IgG2b), 1/100 (IgG3) и 1/100 (IgM)+стандартное отклонение для группы, состоящей из 10 мышей;

на фиг.26 - результаты анализа антител к Tau196-211 [pS202, pT205] изотипов IgG и IgM в мышцах, иммунизированных ACI-40. Анализ антител к Tau196-211 [pS202, pT205] изотипов IgG1, -2a, -2b, -3 и IgM осуществляли в сыворотке TPLH-мышей в d41 после

10 трех иммунизации ACI-40. Результаты выражены в виде средних значений ОП при применении ненасыщающего разведения 1/100 (IgG1), 1/400 (IgG2a), 1/200 (IgG2b), 1/800 (IgG3) и 1/100 (IgM)+стандартное отклонение для группы, состоящей из 10 мышей;

на фиг.27 - результаты анализа титров антител изотипа IgG при обработке различными Тау-пептидами и -белками в мышцах, иммунизированных ACI-33. Анализ

15 титров антител изотипа IgG осуществляли в d-1 и d41 в сыворотке TPLH-мышей после 3 инъекций ACI-33. Результаты выражены в виде средних значений ОП+стандартное отклонение для группы, состоящей из 9 мышей;

на фиг.28 - результаты анализа титров антител изотипа IgG к различным Тау-пептидам и -белкам в мышцах, иммунизированных ACI-35. Анализ титров антител изотипа IgG

20 осуществляли в d-1 и d40 в сыворотке TPLH-мышей после 3 инъекций ACI-35. Результаты выражены в виде средних значений ОП+стандартное отклонение для группы, состоящей из 9 мышей;

на фиг.29 - результаты анализа титров антител изотипа IgG к различным Тау-пептидам и -белкам в мышцах, иммунизированных ACI-39. Анализ титров антител изотипа IgG

25 осуществляли в d-1 и d41 в сыворотке TPLH-мышей после 3 инъекций ACI-39. Результаты выражены в виде средних значений ОП+стандартное отклонение для группы, состоящей из 10 мышей;

на фиг.30 - результаты анализа титров антител изотипа IgG к различным Тау-пептидам и -белкам в мышцах, иммунизированных ACI-40. Анализ титров антител изотипа IgG

30 осуществляли в d-1 и d41 в сыворотке TPLH-мышей после 3 инъекций ACI-40. Результаты выражены в виде средних значений ОП+стандартное отклонение для группы, состоящей из 10 мышей;

на фиг.31 - данные, полученные с помощью Rotarod-теста, для мышей, иммунизированных ACI-33, по сравнению с мышами, которым инъецировали ЗФР.

35 Rotarod-тесты осуществляли на пяти различных возрастных группах мышей, обозначенных согласно возрасту (в месяцах) TPLH-мышей;

на фиг.32 - корреляция между титрами антитела к Tau5-20 [pY18] и данными Rotarod-теста. Корреляцию определяли на TPLH-мышях возрастом 7,8 месяцев, которым инъецировали ACI-33. Титры антитела к сыворотке мышей определяли с помощью

40 ELISA (ОП), а данные Rotarod-теста выражали в виде периода времени, в течение которого животные оставались на устройстве (время);

на фиг.33 - результаты Rotarod-теста для мышей, иммунизированных ACI-35, по сравнению с мышами, которым инъецировали ЗФР. Результаты Rotarod-теста представлены для TPLH-мышей возрастом 9,5 месяцев, иммунизированных ACI-35,

45 относительно обработанной ЗФР контрольной группы. ACI-35 n=5 и ЗФР n=4, остальные мыши погибли в результате патологии, обнаруженной при применении этой модели;

на фиг.34 - результаты количественной оценки CD3+CD4+, полученные с помощью FACS, для бестимусных мышей и мышей дикого типа, обработанных ACI-33. Приведен

процент находящихся в «окне» клеток, позитивно окрашенных по CD3 и CD4, среди «голых» или wt-мышей, обработанных ACI-33. Левая панель: схематическое изображение FACS-анализа для состоящих из двух особей групп «голых» и wt-мышей. Правая панель: каждая колонка соответствует средним значениям и СКО для состоящих из 6 мышей групп. Мыши №№5 и 6: «голые» мыши; мыши №№7 и 8: мыши дикого типа;

на фиг.35 - результаты анализа антител к Tau5-20 [pY18] изотипа IgG в «голых» мышцах и wt-мышцах, иммунизированных ACI-33. Анализ антител к Tau5-20 [pY18] изотипа IgG осуществляли в сыворотке «голых» и wt-мышей, которым вводили путем 3 инъекций ACI-33 в d0, d14 and d28 и отбирали образцы крови в d2, d7, d21, d35 и d56. Результаты выражены в виде средних значений ОП+стандартное отклонение для группы, состоящей из 6 мышей;

на фиг.36 - результаты анализа антител к Tau5-20 [pY18] изотипов IgG и IgM в «голых» мышцах и wt-мышцах, иммунизированных ACI-33. Анализ антител к Tau5-20 [pY18] изотипов IgG1, -2a, -2b, -3 и IgM в сыворотке «голых» и wt-мышей осуществляли в d35 после трех иммунизации ACI-33. Результаты выражены в виде средних значений ОП при применении ненасыщающего разведения 1/100 (IgG1), 1/100 (IgG2a), 1/100 (IgG2b), 1/100 (IgG3) и 1/100 (IgM)+стандартное отклонение для группы, состоящей из 6 мышей;

на фиг.37 - результаты анализа титров антител изотипа IgG к различным Тау-пептидам и -белкам в «голых» мышцах и wt-мышцах, иммунизированных ACI-33. Анализ титров антител изотипа IgG осуществляли в d35 в сыворотке «голых» и wt-мышей после 3 инъекций ACI-33. Результаты выражены в виде средних значений ОП+стандартное отклонение для группы, состоящей из 6 мышей.

SEQ ID NO: 1 - аминокислотная последовательность контрольной последовательности T5: Таи 379-408 [pS396, pS404],

SEQ ID NO: 2 - аминокислотная последовательность последовательности 1 (T1): Тау 5-20 [pY18],

SEQ ID NO: 3 - аминокислотная последовательность последовательности 8 (T8): Тау 206-221 [pT212, pS214],

SEQ ID NO: 4 - аминокислотная последовательность последовательности 9 (T9): Тау 196-211 [pS202, pT205],

SEQ ID NO: 5 - аминокислотная последовательность последовательности 3 (T3): Тау 393-408 [pS396, pS404],

SEQ ID NO: 6 - аминокислотная последовательность последовательности 4 (T4): Тау 401-418 [pS404, pS409],

SEQ ID NO: 7 - аминокислотная последовательность последовательности 2 (T2): Тау 200-216 [pS202+pT205 & pT212+pS214],

SEQ ID NO: 8 - аминокислотная последовательность последовательности 10 (T10): Тау 407-418 [pS409],

SEQ ID NO: 9 - аминокислотная последовательность последовательности 11 (T11): Тау 399-408 [pS404].

Определение понятий

Понятия «полипептид», «пептид» и «белок» в контексте настоящего описания используют взаимозаменяемо, и они обозначают биологическую молекулу, состоящую из аминокислот, сцепленных пептидной связью. Понятие «пептиды» означает цепи аминокислот (как правило, L-аминокислот), альфа-атомы углерода которых сцеплены через пептидные связи, образованные в результате реакции конденсации между карбоксильной группой альфа-углерода одной аминокислоты и аминогруппой на альфа-углероде другой аминокислоты. Концевая аминокислота на одном конце цепи

(т.е. аминоконцевая) имеет свободную аминогруппу, а концевая аминокислота на другом конце цепи (т.е. карбоксиконцевая) имеет свободную карбоксильную группу. Так, понятие «аминоконец» (сокращенно N-конец) относится к свободной альфа-аминогруппе аминокислоты на аминоконце пептида или альфа-аминогруппе (иминогруппа, когда она участвует в образовании пептидной связи) аминокислоты в любом другом положении внутри пептида. Аналогично этому, понятие «карбоксиконец» (сокращенно C-конец) относится к свободной карбоксильной группе аминокислоты на карбоксиконце пептида или карбоксильной группе аминокислоты в любом другом положении внутри пептида.

Понятия «его фрагмент» или «фрагмент» в контексте настоящего описания относятся к функциональному пептидному фрагменту, который обладает практически такой же (биологической) активностью, что и пептиды, представленные в настоящем описании (например, представленные в SEQ ID NO: 2-9 соответственно), т.е. указанные фрагменты все еще обладают способностью вызывать высокоспецифический, прежде всего обладающий конформационной специфичностью, иммунный ответ в организме, но прежде всего в организме животного, в частности млекопитающего или человека, который обладает высокой эффективностью и обладает способностью предупреждать или облегчать таупатии или симптомы, ассоциированные с таупатиями. В частности, указанные фрагменты все еще содержат специфический патологический фосфо-эпитоп или -эпитопы тау-пептида, которые применяют и которые указаны в настоящем описании.

Как правило, аминокислоты, из которых состоит пептид, нумеруют в определенном порядке, начиная с аминоконца и увеличивая номера по направлению к карбоксиконцу пептида. Таким образом, при указании того, что одна аминокислота следует за другой, считается, что аминокислота расположена ближе к карбоксиконцу пептида, чем предыдущая аминокислота.

Понятие «остаток» в контексте настоящего описания относится к аминокислоте, которая включена в пептид посредством амидной связи. Так, аминокислота может представлять собой встречающуюся в естественных условиях аминокислоту или, если не имеется других ограничений, может представлять собой известные аналоги встречающихся в естественных условиях аминокислот, которые функционируют аналогично встречающимся в естественных условиях аминокислотам (т.е. аминокислотные миметики). Кроме того, содержащие амидную связь миметики включают модификации пептидного каркаса, хорошо известные специалистам в данной области.

Выражение «состоит практически из» в контексте настоящего описания употребляется для указания того, что исключено наличие какого-либо из элементов, которые могут заметно изменять характерные свойства пептидов, к которым это выражение относится. Так, при описании пептида выражение «состоит практически из...» исключает наличие любых аминокислотных замен, добавлений или делеций, которые могут заметно изменять биологическую активность указанного пептида.

Кроме того, специалисту в данной области должно быть очевидно, что упомянутые выше отдельные замены, делеций или добавления, которые изменяют, дополняют или элиминируют индивидуальную аминокислоту или небольшой процент аминокислот (как правило, менее 5%, более предпочтительно менее 1%) в кодируемой последовательности, представляют собой консервативно модифицированные варианты, при которых изменения приводят к замене аминокислоты на химически сходную аминокислоту. Таблицы консервативных замен функционально сходных аминокислот

хорошо известны в данной области. Ниже представлены 6 групп, каждая из которых содержит аминокислоты, являющиеся консервативными заменами друг друга:

- 1) аланин (A), серин (S), треонин (T);
- 2) аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E);
- 3) аспарагин (N), глутамин (Q);
- 4) аргинин (R), лизин (K);
- 5) изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), валин (V); и
- 6) фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W).

Понятия «выделенный» или «биологически чистый» относятся к материалу, который в значительной степени или практически свободен от компонентов, которые в норме сопровождают его в нативном состоянии. Так, пептиды, представленные в настоящем описании, не содержат материалы, которые в норме ассоциированы с их окружением *in situ*. Как правило, выделенные иммуногенные пептиды, представленные в настоящем описании, имеют чистоту, составляющую по меньшей мере примерно 80%, обычно по меньшей мере примерно 90% и предпочтительно по меньшей мере примерно 95% при оценке на основе интенсивности полос окрашенных серебром гелей.

Чистоту белка можно определять многочисленными методами, хорошо известными в данной области, такими как электрофорез в полиакриламидном геле образца белка с последующей визуализацией путем окрашивания. Для определенных целей требуется высокое разрешение и для очистки можно использовать ЖХВР или аналогичные методы.

Когда иммуногенные пептиды являются относительно короткими (т.е. состоят менее чем примерно из 50 аминокислот), их часто синтезируют с помощью стандартных методов химического синтеза пептидов.

Твердофазный синтез, при котором С-концевую аминокислоту последовательности присоединяют к нерастворимой подложке с последующим последовательным добавлением остальных аминокислот последовательности, представляет собой предпочтительный метод химического синтеза иммуногенных пептидов, представленных в настоящем описании. Методы твердофазного синтеза известны специалистам в данной области.

В другом варианте представленные в настоящем описании иммуногенные пептиды синтезируют с помощью метода рекомбинантных нуклеиновых кислот. Как правило, он предусматривает создание нуклеотидной последовательности, которая кодирует пептид, перенос нуклеиновой кислоты в кассету экспрессии под контроль конкретного промотора, экспрессию пептида в хозяине, выделение экспрессируемого пептида или полипептида и при необходимости ренатурацию пептида. Из литературы известны методики, дающие специалисту в данной области достаточную информацию для осуществления указанных процедур.

После их экспрессии рекомбинантные пептиды можно очищать с помощью стандартных методик, включая осаждение сульфатом аммония, аффинную хроматографию на колонках, колоночную хроматографию, гель-электрофорез и т.п. Для применения в качестве терапевтических агентов предпочтительными являются практически чистые композиции, гомогенные примерно на 50-95%, и наиболее предпочтительные гомогенные на 80-95% или более.

Специалисту в данной области должно быть очевидно, что после химического синтеза, биологической экспрессии или очистки конформация иммуногенных пептидов может существенно отличаться от нативной присущей пептидам конформации. В этом случае часто необходимо денатурировать и восстанавливать антипролиферативный пептид,

и затем осуществлять повторную укладку пептида с получением предпочтительной конформации. Методы восстановления и денатурации белков и индукции повторной укладки хорошо известны специалистам в данной области.

Антигенность очищенного белка можно подтверждать, например, демонстрируя реакцию с иммунной сывороткой или антисывороткой, продуцируемой против самого белка.

В контексте настоящего описания упоминание единственного числа может обозначать «один или несколько» и, если не указано иное, то оно включает множественное число.

Понятия «выявление (обнаружение)» или выявленный (обнаруженный)» в контексте настоящего описания означает применение известных методик для выявления биологических молекул, таких как иммунохимические или гистологические методы, и относятся к качественному или количественному выявлению присутствия или определения концентрации исследуемой биологической молекулы.

Понятие «выделенная» относится к биологической молекуле, свободной по меньшей мере от некоторых компонентов, с которыми она связана в естественных условиях.

Понятия «антитело», «антитела» или «их функциональные фрагменты» в контексте настоящего описания имеют известное с данной области значение и относятся к молекулам или активным фрагментам молекул, которые связываются с известными антигенами, прежде всего к молекулам иммуноглобулинов и к иммунологически активным фрагментам молекул иммуноглобулинов, т.е. молекулам, которые содержат сайт связывания, иммуноспецифически связывающийся с антигеном. Иммуноглобулин, предлагаемый в изобретении, может относиться к любому типу (IgG, IgM, IgD, IgE, IgA и IgY) или классу (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подклассам молекул иммуноглобулина.

Согласно настоящему изобретению подразумевается, что к «антителам» относятся моноклональные антитела, поликлональные, химерные, одноцепочечные, биспецифические, симианизированные (включающие участки обезьяньих антител), человеческие и гуманизированные антитела, а также их активные фрагменты. Например, к активным фрагментам молекул, которые связываются с известными антигенами, относятся Fab- и P(ab')₂-фрагменты, включая продукты экспрессионной библиотеки Fab-фрагментов иммуноглобулинов, и связывающиеся с эпитопом фрагменты любых антител и их указанных фрагментов.

Указанные активные фрагменты можно получать из антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, с помощью многочисленных методик. Например, очищенные моноклональные антитела можно расщеплять ферментом, таким как пепсин, и подвергать ЖХВР-гель-фильтрации. Затем соответствующую фракцию, содержащую Fab-фрагменты, можно собирать и концентрировать с помощью фильтрации через мембрану и т.п. Дополнительное описание общих методик выделения активных фрагментов антител см., например, у Khaw B. A. и др., J. Nucl. Med. 23, 1982, cc. 1011-1019; Rousseaux и др., Methods Enzymology, 121, 1986, cc. 663-669, изд-во Academic Press. Понятие «гуманизированное антитело» относится к типу сконструированного антитела, в котором CDR получены из иммуноглобулина-донора из организма кроме человека, а остальные выведенные из иммуноглобулина части молекулы получены из одного (или нескольких) человеческого(их) иммуноглобулина(ов).

Гуманизированное антитело может представлять собой также антитело с вариабельной областью, в которой один или несколько каркасных участков имеют человеческие аминокислоты или аминокислоты приматов. Кроме того, поддерживающие каркас остатки (остатки каркасного участка) можно изменять для сохранения

аффинности к связыванию. Методы получения «гуманизированных антител» хорошо известны специалистам в данной области (см., например. Queen и др., Proc. Natl Acad Sci USA, 86, 1989, ee. 10029-10032 (1989), Hodgson и др., Bio/Technology, 9, 1991, с.421).

«Гуманизированное антитело» можно получать также с помощью нового подхода генетической инженерии, который позволяет получать поликлональные антитела, напоминающие человеческие, с созревшей аффинностью в крупных животных, таких, например, как кролики ([http:// www.rctech.com/bioventures/therapeutic.php](http://www.rctech.com/bioventures/therapeutic.php)).

Понятие «моноклональное антитело» хорошо известно в данной области и относится к антителу, которое в больших количествах получают в лабораторных условиях из индивидуального клона и которое распознает только один антиген. Моноклональные антитела, как правило, создают путем слияния продуцирующей антитела В-клетки, как правило, с коротким временем жизни, с быстро растущей клеткой, такой как раковая клетка (иногда ее называют «иммортилизованной» клеткой). Образовавшаяся гибридная клетка или гибридома быстро размножается, создавая клон, который продуцирует антитело в больших количествах.

Понятие «антиген» относится к полному агенту или его фрагменту, который может индуцировать иммунный ответ в организме, прежде всего в организме животного, более предпочтительно млекопитающего, включая человека. Понятие включает иммуногены и области, ответственные за антигенность, или антигенные детерминанты.

В контексте настоящего описания понятие «растворимый» обозначает частично или полностью растворимый в водном растворе.

В контексте настоящего описания понятие «иммуногенные» относится к субстанциям, которые вызывают или усиливают производство антител, Т-клеток и других реактивных иммунных клеток, направленных против иммуногенного агента и участвующих в иммунном ответе в организме человека или животных.

Иммунный ответ имеет место, когда в организме индивидуума продуцируется достаточное количество антител, Т-клеток и других реактивных иммунных клеток против введенных иммуногенных композиций, предлагаемых в настоящем изобретении, для ослабления или облегчения подлежащего лечению нарушения.

Понятие «гибридома» известно в данной области и обычным специалистам в данной области и относится к клетке, полученной путем слияния продуцирующей антитело клетки и иммортилизованной клетки, например, клетки множественной миеломы. Эта гибридная клетка обладает способностью обеспечивать постоянную поставку антител (см. выше определение понятия «моноклональное антитело» и ниже раздел «Примеры», в которых метод слияния описан более подробно).

Понятие «носитель» в контексте настоящего описания означает структуру, в которую антигенный пептид или надмолекулярную конструкцию можно встраивать или с которой их можно ассоциировать, осуществляя тем самым презентацию или обеспечивая доступность антигенных пептидов или фрагмента пептида для иммунной системы человека или животных. Любую частицу, которую можно применять для лечения животных или человека, такую, например, как пузырек, частицу или состоящее из частиц тельце, можно использовать в качестве носителя в контексте настоящего изобретения.

Понятие «носитель» относится также и к методам введения, которые обеспечивают транспортировку композиции надмолекулярных антигенных конструкций, содержащих антигенный пептид, к требуемым областям посредством механизмов введения. Одним из примеров такой системы введения является система, в которой используют коллоидные металлы, такие как коллоидное золото.

Белки-носители, которые можно применять в композициях надмолекулярных

антигенных конструкций, предлагаемых в настоящем изобретении, включают (но, не ограничиваясь ими) белок, связывающий мальтозу «МВР»; бычий сывороточный альбумин «БСА»; гемоцианин лимфы улитки «KLH»; яичный белок, флагеллин; тироглобулин; сывороточный альбумин любых видов; гамма-глобулин любых видов; сингенные клетки; сингенные клетки, несущие антигены Ia; и полимеры D- и/или L-аминокислот.

В надмолекулярной антигенной конструкции, предлагаемой в настоящем изобретении, липосома может выполнять двойную функцию, в том плане, что ее можно применять в качестве носителя, содержащего описанную выше надмолекулярную конструкцию, и в то же время она может выполнять функцию адъюванта, повышающего или стимулирующего иммунный ответ в животном- или человеке-мишени, который подлежит лечению терапевтической вакциной, предлагаемой в изобретении. Следует понимать также, что композиции надмолекулярных антигенных конструкций, предлагаемых в настоящем изобретении, могут содержать также дополнительные адъюванты, включая (но, не ограничиваясь только ими) гемоцианин лимфы улитки (KLH), бычий сывороточный альбумин (БСА) и другие адъюванты, такие, например, как липид А, квасцы, фосфат кальция, интерлейкин 1 и/или микрокапсулы полисахаридов и белков, но прежде всего детоксифицированный липид А, такой как монофосфорильный или дифосфорильный липид А, или квасцы, дополнительные консерванты, разбавители, эмульгаторы, стабилизаторы и другие компоненты, которые являются известными и которые нашли применение в известных из существующего уровня техники вакцинах. Кроме того, любую известную в данной области систему адъювантов можно применять в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении. К таким адъювантам относятся (но, не ограничиваясь ими) неполный адъювант Фрейнда, полный адъювант Фрейнда, полидисперсный β -(1,4)-связанный ацетилованный маннан («Acemannan»), titermax® (адъюванты на основе сополимера полиоксиэтилена-полиоксипропилена фирмы CytRx Corporation), модифицированные липидные адъюванты фирмы Chiron Corporation, адъюванты, являющиеся производными сапонаина фирмы Cambridge Biotech, убитые Bordetella pertussis, липополисахарид (LPS) грамотрицательных бактерий, крупные полимерные анионы, такие как сульфат декстрана, и неорганические гели, такие как квасцы, гидроксид алюминия или фосфат алюминия.

Кроме того, понятие «эффективное количество» относится к количеству антигенной/иммуногенной композиции, которое при введении человеку или животному вызывает иммунный ответ. Эффективное количество легко может определять специалист в данной области с помощью общепринятых процедур.

Понятие «пациент с иммунной толерантностью» в контексте настоящего описания относится к больному животному или человеку, для которого характерна ограниченная способность реагировать на антигены, прежде всего на чужие антигены, но прежде всего на новые антигены, такие, например, как новые антигены, присутствующие при вновь возникающих заболеваниях. Такая ограниченная способность может быть связана, по меньшей мере частично, с хронологическим возрастом CD4⁺-Т-клеток. Кроме того, «пациент с иммунной толерантностью» может отличаться нарушенным долгосрочным CD4⁺-Т-клеточным иммунным ответом на воздействие антигена в результате нарушений пролиферации и секреции цитокинов Т-клетками памяти в процессе вторичных иммунных ответов.

Понятие «пациент с активированными Т-клетками» в контексте настоящего описания относится к больному животному или человеку, для которого характерна Т-клеточная активация и у которого дополнительная стимуляция Т-клеточного ответа может

сопровождаться медицинским риском.

Понятие «пациент с ослабленным иммунитетом» в контексте настоящего описания относится к больному животному или человеку, который имеет иммунную систему, нарушенную в результате возраста, болезни, такой как болезнь, связанная с ВИЧ, рак, 5 или в результате лечения, например, лечения воспалительных заболеваний таких как (но, не ограничиваясь только ими) ревматоидный артрит, псориаз, системная красная волчанка, гранулематоз Вегенера и т.д.

При создании настоящего изобретения продемонстрировано, что индуцируемый антителом ответ на антигенную композицию, предлагаемую в изобретении, в основном 10 является независимым от Т-клеток. Для доказательства этого использовали модель, созданную на «голых» мышах, где «голых» мышей вакцинировали и гуморальные иммунные ответы оценивали для измерения ответа на Аβ-специфическое антитело, индуцированное антигенной композицией, предлагаемой в изобретении, у иммунизированных «голых» мышей. «Голые» мыши несут мутацию Foxp1 и в 15 результате имеют пониженную Т-клеточную функцию из-за отсутствия нормального тимуса.

Понятие «фармацевтически эффективное количество» в контексте настоящего описания относится к дозе действующего вещества в фармацевтической композиции, требуемой для излечения или по меньшей мере частичной приостановки симптомов 20 заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или любых связанных с ними осложнений.

Конкретным вариантом осуществления настоящего изобретения является применение презентации антигена, прежде всего на поверхности молекулы носителя, такой как липосома, что приводит к более эффективной доступности и стабилизации 25 предпочтительной конформации антигена, что в конце концов приводит к получению высокоспецифического иммунного ответа, прежде всего независимого от Т-клеток иммунного ответа, и приводит к образованию антител с уникальными свойствами.

В частности, осуществляют презентацию антигенного пептида на поверхности молекулы носителя в виде массива с большим количеством повторов, прежде всего 30 содержащий повторы массив содержит по меньшей мере 10 повторяющихся антигенных единиц/молекулу носителя, предпочтительно по меньшей мере 50 повторяющихся антигенных единиц/молекулу носителя, предпочтительно по меньшей мере 100 повторяющихся антигенных единиц/молекулу носителя, предпочтительно по меньшей мере 200 повторяющихся антигенных единиц/молекулу носителя, предпочтительно по 35 меньшей мере 300 повторяющихся антигенных единиц/молекулу носителя, предпочтительно по меньшей мере 400 повторяющихся антигенных единиц/молекулу носителя, предпочтительно по меньшей мере 500 повторяющихся антигенных единиц/молекулу носителя.

Модифицированный фосфорилированный пептидный антиген, предлагаемый в 40 изобретении и представленный в настоящем описании, прежде всего фосфорилированный пептидный антиген, имитирующий основной патологический фосфо-эпитоп тау-белка, можно синтезировать с помощью модифицированного метода, описанного у Nicolau и др., Proc Natl. Acad. Sci USA 99, 2002, ee. 2332-2337. Этот подход предусматривает ступенчатую сборку конструкции с помощью твердофазного пептидного синтеза на 45 амидной смоле на основе стандартной Fmoc/tBu-химии. Затем ортогональные защитные группы концевых лизинов можно удалять и свободные аминокислоты ацилировать пальмитиновой кислотой.

Удаление защитных групп боковых цепей и сопутствующее высвобождение пептида

из смолы можно осуществлять в кислых условиях, которые обеспечивают получение требуемого тетрапальмитоилированного фосфо-пептида в виде неочищенного продукта.

Затем можно получать конечный продукт высокой степени чистоты и подтверждать его идентичность и чистоту известными в данной области методами, такими, например, как масс-спектрометрия с ионизацией электроспреем и/или ЖХВР-анализ.

Одним из вариантов осуществления настоящего изобретения является иммуногенная композиция, которая содержит фосфорилированный пептидный антиген, предлагаемый в изобретении и представленный в настоящем описании, имитирующий основной патологический фосфо-эпитоп тау-белка, где пептидный антиген модифицируют таким образом, чтобы он обладал способностью поддерживать и стабилизировать определенную конформацию антигена. Эта определенная конформация приводит к индукции сильного и высокоспецифического иммунного ответа при введении животному или человеку.

Одним из путей достижения формирования и стабилизации требуемой конформации антигенного пептида является презентация антигенного пептида в виде присоединенного или включенного или реконструированного, частично или полностью, в носителе, прежде всего носителе, который может функционировать также в качестве адъюванта.

Согласно настоящему изобретению носитель может представлять собой, например, пузырек, состоящее/состоящую из частиц тельце или молекулу; бактериальные мембранные белки, белки Оmp энтеробактерий, наночастицы, мицеллы, золотые частицы, микрочастицы и/или виросомы или любые иные средства, которые могут служить в качестве носителя/адъюванта для антигенного пептида, но прежде всего липосому.

В конкретном варианте осуществления изобретения антигенный пептид присоединяют или встраивают или реконструируют в носителе благодаря слабым взаимодействиям, такими, например, как взаимодействие Ван-дер-Ваальса, гидрофобное или электростатическое взаимодействие, или комбинация двух или большего количества указанных типов взаимодействий, в результате пептид презентуется в специфической конформации, которая поддерживается и стабилизируется путем ограничения сдвига трехмерной структуры антигенного пептида, в результате чего конформационные изменения предупреждаются или в значительной степени ограничиваются.

Когда пузырек, частицу или состоящее из частиц тельце применяют в качестве носителя/адъюванта, например, липосому, то композицию антигенного пептида можно выбирать так, чтобы ее общий чистый заряд был идентичен заряду на поверхности носителя/адъюванта, к которому пептид присоединен. Электростатические силы отталкивания, которые обладают эффективностью между одинаково заряженной поверхностью носителя/адъюванта и антигенного пептида, но прежде всего между одинаково заряженной поверхностью носителя и аминокислотными остатками, из которых состоит антигенный пептид, и более предпочтительно между одинаково заряженной поверхностью носителя и одинаково заряженными аминокислотными остатками, из которых состоит антигенный пептид, могут приводить к тому, что антигенный пептид приобретает определенную высокоспецифическую и стабилизированную конформацию, которая гарантирует высокую биологическую активность. В результате антигенный пептид экспонируется и презентуется в конформации, которая обладает высокой биологической активностью и позволяет иммунной системе целевого организма свободно взаимодействовать с антигенными детерминантами, входящими в антигенную конструкцию в биологически активной конформации, что при введении животному или человеку приводит к сильному и специфическому для конформации иммунному ответу, приводящему, например, к

образованию высокого титра антител в целевом организме.

Иммуногенный ответ можно дополнительно усиливать при использовании липосомы в качестве носителя, поскольку липосома может функционировать в качестве адъюванта, усиливающего или стимулирующего иммунный ответ в организме животного- или человека-мишени, подлежащего лечению с помощью фармацевтической композиции, предлагаемой в изобретении. Липосома необязательно может содержать также дополнительный адъювант, такой, например, как липид А, квасцы, фосфат кальция, интерлейкин 1 и/или микрокапсулы из полисахаридов и белков, но предпочтительно детоксицированный липид А, такой как монофосфорильный или дифосфорильный липид А, или квасцы.

В конкретном варианте осуществления изобретения антигенный пептид, предлагаемый в изобретении и описанный выше, прежде всего антигенный пептид общий чистый заряд которого является отрицательным, применяют в реконструированном в липосоме виде, прежде всего в липосоме, компоненты которой выбирают так, чтобы общий чистый заряд головной группы липосомы был отрицательным. В частности, липосома состоит из компонентов, выбранных из группы, включающей димиристоилфосфатидилхолин (DMPC), димиристоилфосфатидилэтаноламин (DMPEA), димиристоилфосфатидилглицерин (DMPG) и холестерин, и необязательно содержит также монофосфорильный липид А или любой другой адъювант, который можно применять в объеме настоящего изобретения, такой, например, как квасцы, фосфат кальция, интерлейкин 1 и/или микрокапсулы из полисахаридов и белков.

Другим конкретным вариантом осуществления изобретения является модифицированный антигенный пептид, предлагаемый в изобретении и описанный выше, ковалентно связанный с молекулой якорного типа, которую можно встраивать в носитель/адъювант, фиксируя тем самым пептид с носителем/адъювантом и осуществляя его презентацию на поверхности молекулы носителя/адъюванта или в непосредственной близости от ее поверхности так, чтобы электростатические силы становились эффективными, как описано выше.

Когда липосомы применяют в качестве носителя/адъюванта, антигенная пептидная конструкция, как правило, имеет гидрофобный хвост, который встраивается в мембрану липосомы при ее формировании. Кроме того, антигенные пептиды можно модифицировать так, чтобы они содержали гидрофобный хвост, который можно встраивать в липосому.

Антигенная композиция, предлагаемая в настоящем изобретении, как правило, содержат пептиды, модифицированные с целью усиления антигенного действия, при этом указанные пептиды можно модифицировать путем пэгилирования (используя полиэтиленгликоль или модифицированный полиэтиленгликоль) или модифицировать с помощью других методов, например, с использованием пальмитиновой кислоты, как описано выше, полиаминокислот (например, полиглицина, полигистидина), полисахаридов (например, полигалактуроновой кислоты, полимолочной кислоты, полигликолида, хитина, хитозана), синтетических полимеров (полиамиды, полиуретаны, сложные полиэфиры) или сополимеров (например, поли(метакриловой кислоты) и N-(2-гидрокси)пропилметакриламида) и т.п.

Конкретным вариантом осуществления изобретения являются антигенные пептиды, предлагаемые в изобретении и описанные выше, которые в результате модификации содержат гидрофобный хвост, в результате указанные пептиды можно встраивать в липосому. В частности, фосфорилированный пептидный антиген, предлагаемый в

изобретении и представленный в настоящем описании, который имитирует основной патологический фосфо-эпитоп тау-белка, можно модифицировать с помощью липофильного или гидрофобного фрагмента, который облегчает встраивание в липидный бислой носителя/адъюванта. Липофильные или гидрофобные фрагменты, предлагаемые в настоящем изобретении, могут представлять собой жирные кислоты, триглицериды и фосфолипиды, прежде всего жирные кислоты, триглицериды и фосфолипиды, в которых углеродный каркас жирной кислоты содержит по меньшей мере 10 атомов углерода, прежде всего липофильные фрагменты, включающие жирные кислоты, углеродный каркас которых состоит по меньшей мере примерно из 14 атомов углерода и вплоть примерно до 24 атомов углерода, при этом каждое индивидуальное количество атомов углерода в этом диапазоне подпадает под объем настоящего изобретения. В частности, изобретение относится к антигенному пептиду, предлагаемому в изобретении и описанному выше, который в результате модификации содержат гидрофобный хвост, прежде всего гидрофобный хвост, который состоит из гидрофобных фрагментов, в которых углеродный каркас содержит по меньшей мере 14 атомов углерода, но предпочтительно 16 атомов углерода. Примерами гидрофобных фрагментов являются (но, не ограничиваясь ими) пальмитиновая кислота, стеариновая кислота, миристиновая кислота, лауриновая кислота, олеиновая кислота, линолевая кислота, линоленовая кислота и холестерин или 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфатидилэтаноламин (DSPE). В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения гидрофобный фрагмент представляет собой пальмитиновую кислоту.

В одном из вариантов осуществления изобретения антигенный пептид, предлагаемый в изобретении и представленный в настоящем описании, ковалентно связывают с липофильным или гидрофобным фрагментом. В контексте настоящего изобретения ковалентное связывание антигенного пептида можно осуществлять с помощью аминокислотных остатков, которые удлиняют аминокислотные последовательности, соответствующие последовательностям антигенного пептида, предлагаемого в изобретении, в частности, на его конце(ах), прежде всего на N- и C-конце(ах), и с которыми связываются остатки жирных кислот.

В частности, каждый конъюгат содержит по меньшей мере четыре молекулы жирной кислоты, углеродная цепь которой включает от C 12 до C24, прежде всего углеродная цепь которой состоит из C 16, где молекулы жирной кислоты ковалентно связаны с N- и C-концами антигенных пептидов. Можно предусматривать также другие распределения, в том числе внутри аминокислотной последовательности. Эти пептиды также связывают ковалентно с молекулами жирных кислот.

Таким образом, фармацевтические композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, могут содержать липосомы, представляющие собой липосомы в которых можно реконструировать очищенные или частично очищенные или модифицированные антигенные пептиды, предлагаемые в изобретении и представленные в настоящем описании. Кроме того, в липосомах можно реконструировать пептидные фрагменты. Настоящее изобретение относится также к антигенным пептидным фрагментам, модифицированным с целью повышения их антигенности. Например, антигенные фрагменты и адъюванты можно присоединять к пептиду или смешивать с ним. Примерами антигенных фрагментов и адъювантов являются (но, не ограничиваясь только ими) липофильные мурамилные дипептидные производные, неионные блок-сополимеры, гидроксид алюминия или фосфат алюминия, и их смеси.

Липосомы, которые можно применять в композициях, предлагаемых в настоящем изобретении, представляют собой липосомы, известные специалистам в данной области.

Можно использовать любые стандартные липиды, применяемые для приготовления липосом. Для создания композиций, предлагаемых в настоящем изобретении, можно применять стандартные состоящие из двух или нескольких слоев липосомы. Хотя можно применять любой метод приготовления липосом, известный специалистам в данной области, наиболее предпочтительные липосомы получают согласно методу, описанному у Alving и др., *Infect. Immun.* 60, 1992, сс. 2438-2444, публикация включена в настоящее описание в качестве ссылки. Липосома может необязательно содержать адъювант или иммуномодулятор или оба указанных агента. Предпочтительным иммуномодулятором является липид А, прежде всего детоксифицированный липид А, такой, например, как монофосфорильный или дифосфорильный липид А.

Липосомы можно получать также методом инъекции в перекрестном потоке, который описан, например, у Wagner и др., *Journal of Liposome Research* т.12(3), 2002, сс. 259-270. При инъекции липидных растворов в водной буферной системе липиды имеют тенденцию образовывать «осадки (преципитаты)» с последующей самоагрегацией в пузырьки.

Размер полученных пузырьков зависит от таких факторов как концентрация липида, скорость перемешивания, скорость инъекции и выбор липидов. Предназначенная для получения система может состоять из модуля для инъекции в перекрестном потоке, емкостей для полярной фазы (например, раствор ЗФР-буфера), емкости для этанольного/липидного раствора и устройства для создания давления, но прежде всего устройство для создания давления азота. В то время как водный или полярный раствор нагнетают насосом через модуль для перекрестной инъекции, этанольный/липидный раствор инъецируют в полярную фазу с помощью различных величин прилагаемого давления.

Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения модифицированный антигенный пептид, предлагаемый в изобретении и представленный в настоящем описании, можно дополнительно модифицировать путем реконструкции (восстановления) в липосомах, которые состоят из фосфолипидов и холестерина (фосфатидилэтаноламин, фосфатидилглицерин, холестерин в различных молярных отношениях). Можно применять другие фосфолипиды. Липид А применяют в концентрации примерно 40 мкг/пмоль фосфолипидов.

Липосома может обладать двойной функцией, поскольку ее можно применять в качестве носителя, содержащего описанную выше надмолекулярную конструкцию, и в то же время она может выполнять функцию адъюванта для усиления или стимуляции иммунного ответа в организме животного- или человека-мишени, подлежащего лечению терапевтической вакциной, предлагаемой в изобретении. Необязательно липосома, кроме того, может содержать дополнительный адъювант или иммуномодулятор или оба указанных агента, такой, например, как липид А, квасцы, фосфат кальция, интерлейкин-1 и/или микрокапсулы из полисахаридов и белков, но прежде всего липид А, более предпочтительно детоксифицированный липид А, такой как монофосфорильный или дифосфорильный липид А, или квасцы.

В конкретном варианте осуществления изобретения липосомы, включающие липид А, применяют в качестве адъюванта для приготовления фармацевтической композиции, предлагаемой в изобретении. Димиристоилфосфатидилхолин, -глицерин и холестерин смешивают, в частности в молярном соотношении 9:1:7. Затем добавляют сильный иммуномодулятор, такой, например, как монофосфорильный липид А, в приемлемой концентрации, прежде всего в концентрации от 30 до 50 мг на ммоль, более предпочтительно 40 мг на ммоль фосфолипидов. Затем добавляют модифицированный антигенный пептид в молярном соотношении пептида и фосфолипидов от 1:30 до 1:200, прежде всего в молярном соотношении от 1:50 до 1:120, более предпочтительно

1:100. Растворители удаляют, например, выпариванием, и образовавшуюся пленку гидрируют стерильным буферным раствором, таким как ЗФР.

Конкретным вариантом осуществления изобретения является антигенный пептид, предлагаемый в изобретении и представленный в настоящем описании,
 5 модифицированный по меньшей мере двумя молекулами пальмитиновой кислоты, ковалентно связанных с N- и C-концами антигенного пептида, реконструированный в липосомном носителе.

Пальмитоилирование, создающее якорь для пептида в бислое липосомы благодаря относительно небольшой длине остатка C_{16:0}-жирной кислоты, приводит к тому, что
 10 пептид презентуется на поверхности липосомы или непосредственно вблизи ее поверхности.

Фармацевтическую композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, которая содержит пептидный антиген, предлагаемый в изобретении и представленный в настоящем описании, прежде всего фосфо-пептид, имитирующий основные
 15 патологические фосфо-эпитопы тау-белка, прежде всего в фармацевтически эффективном количестве, можно приготавливать в форме жидкого раствора или инъектируемой суспензии или также в твердой форме, пригодной для солиubilизации перед инъекцией, например, в виде набора, предназначенного для применения композиции, предлагаемой в изобретении, согласно описанному ниже методу.

20 Приемлемые фармацевтические носители, разбавители и/или эксципиенты хорошо известны в данной области, и к ним относятся, например, забуференные фосфатом физиологические растворы, вода, эмульсии, такие как эмульсии типа масло/вода, различные типы смачивающих агентов, стерильные растворы и т.д.

25 Препаративную форму фармацевтической композиции, предлагаемой в изобретении, можно получать с помощью общепринятой методологии, известной специалистам в данной области.

Фармацевтическую композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, которая содержит пептидный антиген, предлагаемый в изобретении и представленный в настоящем описании, прежде всего фосфо-пептид, имитирующий основные
 30 патологические фосфо-эпитопы тау-белка, прежде всего в фармацевтически эффективном количестве, можно вводить человеку или животному, страдающему таупатией, для индукции иммунного ответа у указанного человека или животного с целью облегчения симптомов, ассоциированных с заболеванием, или восстановления состояния, присущего здоровым индивидуумам, не пораженным заболеванием.

35 Композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, вводят человеку или животному с помощью любых общепринятых стандартных путей введения в твердой, жидкой форме или в виде аэрозоля, которые содержат приемлемую фармацевтически эффективную дозу. Как правило, композицию можно вводить с использованием местного, орального, ректального, назального или парентерального (например,
 40 внутривенного, подкожного или внутримышечного) пути введения. Кроме того, композицию можно включать в обеспечивающие пролонгированное высвобождение матрицы, например, из биоразлагаемых полимеров, полимеры можно имплантировать в область, в которую требуется осуществлять введение, например, в область опухоли. Метод предусматривает введение однократной дозы, введение повторных доз с
 45 предварительно установленными временными интервалами и пролонгированное введение в течение предварительно определенного периода времени.

В конкретном варианте осуществления изобретения антигенную конструкцию, предлагаемую в изобретении, прежде всего композицию вакцины, которая содержит

антигенную конструкцию в фармацевтически приемлемой форме, вводят в виде повторяющихся доз, прежде всего 1-15 доз, более предпочтительно 2-10 доз, более предпочтительно 3-5 доз и еще более предпочтительно 3 доз, с временными интервалами, составляющими 1-20 недель, прежде всего с временными интервалами, составляющими 1-10 недель, прежде всего с временными интервалами, составляющими 1-6 недель, более предпочтительно с временными интервалами, составляющими 1-4 недели и еще более предпочтительно с временными интервалами от 2 до 3 недель. Иммунный ответ оценивают в полученных образцах сыворотки/плазмы через приемлемый промежуток времени после ревакцинации, прежде всего через 3-10 дней после ревакцинации, более предпочтительно через 4-8 дней после ревакцинации и более предпочтительно через 7 дней после ревакцинации, и определяют иммуногенность антигенной конструкции с помощью известной методологии, прежде всего с помощью одного из обычно применяемых иммуноанализов, таких, например, как ELISA.

В частности, композицию антигенного пептида, предлагаемую в изобретении, вводят парентерально, но прежде всего с помощью внутрибрюшинной, внутривенной, подкожной и внутримышечной инъекции.

Препараты для парентерального введения включают стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. К неводным растворителям относятся (но, не ограничиваясь только ими) пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительное масло, такое как оливковое масло, и инъектируемые органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Водные растворители можно выбирать из группы, включающей воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, включая физиологический раствор и забуференные среды. Наполнители для парентерального введения включают раствор хлорида натрия, декстрозу Рингера, декстрозу и хлорид натрия, лактированный раствор Рингера или жидкие жиры. Наполнители для внутривенного введения представляют собой добавки для восполнения дефицита жидкости или питательных веществ, электролитные добавки (например, на основе декстрозы Рингера) и другие вещества. Могут присутствовать также консерванты, такие, например, как антимикробные средства, антиоксиданты, хелатирующие агенты, инертные газы и др.

Доза композиции должна зависеть от состояния, подлежащего лечению, конкретной применяемой композиции и других клинических факторов, таких как вес, размер и состояние пациента, площадь поверхности тела, конкретное соединение или композиция, подлежащее/подлежащая введению, другие одновременно применяемые лекарственные средства и путь введения.

Фармацевтическую композицию, предлагаемую в изобретении, можно вводить в сочетании с другими биологически активными субстанциями и процедурами, предназначенными для лечения заболеваний, прежде всего нейродегенеративных заболеваний. Другие биологически активные субстанции могут быть компонентами той же композиции, которая уже содержит фармацевтическую композицию, предлагаемую в изобретении, в форме смеси, при этом фармацевтическую композицию, предлагаемую в изобретении, и другую биологически активную субстанцию смешивают в фармацевтически приемлемом растворителе и/или носителе или с ним, или они могут присутствовать отдельно в виде компонента других композиций, которые могут поступать в продажу отдельно или вместе в форме состоящего из компонентов набора.

Фармацевтическую композицию, предлагаемую в изобретении, можно вводить в сочетании с другой(ими) биологически активной(ыми) субстанцией или субстанциями поочередно или последовательно. Например, фармацевтическую композицию, предлагаемую в изобретении, можно вводить одновременно с первой дополнительной

биологически активной субстанцией или последовательно после или до введения фармацевтической композиции. Если выбрана приемлемая схема, при которой более одной дополнительной обладающей биологической активностью субстанции вводят в сочетании по меньшей мере с одной фармацевтической композицией, предлагаемой в изобретении, то соединения или субстанции можно частично вводить одновременно, частично последовательно в различных комбинациях.

Другим объектом настоящего изобретения являются смеси фармацевтической композиции, предлагаемой изобретении, и необязательно одной или нескольких дополнительных биологически активных субстанций, а также способы применения фармацевтической композиции, предлагаемой в изобретении, или их смесей, включая композиции, которые содержат указанную фармацевтическую композицию или смеси фармацевтических композиций, предназначенные для профилактического и/или терапевтического лечения и/или облегчения таупатий, группы заболеваний и нарушений, которые ассоциированы с образованием нейрофибриллярных повреждений, представляющих собой основную патологию головного мозга в этой группе нейродегенеративных нарушений, включает (но, не ограничиваясь только ими) болезнь Альцгеймера, болезнь Крейтцфельда-Якоба, боксерскую деменцию, синдром Дауна, болезнь Герстманна-Штреусслера-Шейнкера, миозит с тельцами включения и церебральную амилоидную ангиопатию, связанную с белком-прионом, травматическое повреждение головного мозга, а также комплекс амиотрофический боковой склероз /паркинсонизм-деменция (синдром Гуама), не-гуамовского типа болезнь моторных нейронов, связанную с нейрофибриллярными сплетениями, деменцию, связанную с накоплением аргирофильных зерен, кортикобазальную дегенерацию, диффузные нейрофибриллярные сплетения с кальцификацией, фронтотемпоральную деменцию с паркинсонизмом, сцепленную с хромосомой 17, болезнь Галлервордена-Шпатца, множественную системную атрофию, болезнь Ниманна-Пика типа С, болезнь Пика, прогрессирующий субкортикальный глиоз, прогрессирующий супрануклеарный панэнцефалит, подострый склерозирующий панэнцефалит, деменцию, связанную только со сплетениями, постэнцефалический паркинсонизм, миотоническую дистрофию.

Смеси, предлагаемые в изобретении, могут содержать помимо фармацевтической композиции, предлагаемой в изобретении, биологически активную субстанцию, такую, например, как известные соединения, применяемые для медикаментозного лечения таупатий и/или амилоидозов, группы заболеваний и нарушений, ассоциированных с амилоидом или амилоидоподобным белком, таким как амилоидный β -белок, который участвует в патогенезе болезни Альцгеймера.

В следующем варианте осуществления изобретения другая биологически активная субстанция или соединение может представлять собой также терапевтическое средство, которое можно применять для лечения заболеваний и нарушений, которые вызываются или ассоциированы с амилоидом или амилоидоподобными белками, включая амилоидоз, вызываемый амилоидом β , или их можно применять для медикаментозного лечения других неврологических нарушений.

Другая биологически активная субстанция или соединение может обладать биологическим действием, опосредуемым таким же или сходным механизмом, что и терапевтическая вакцина, предлагаемая в изобретении, или обладать неродственным механизмом действия или сочетанием родственных и/или неродственных механизмов действия.

Как правило, другое биологически активное соединение может представлять собой энхансеры нейтронной трансмиссии, психотерапевтические лекарственные средства,

ингибиторы ацетилхолинэстеразы, блокаторы кальциевых каналов, биогенные амины, транквилизаторы на основе бензодиазепинов, усилители синтеза, накопления или высвобождения ацетилхолина, агонисты постсинаптического рецептора ацетилхолина, ингибиторы моноаминоксидазы-A или -B, антагонисты рецептора N-метил-D-аспартатглутамата (NMDA), нестероидные противовоспалительные лекарственные средства, антиоксиданты и антагонисты серотонергического рецептора.

В частности, смесь, предлагаемая в изобретении, может содержать по меньшей мере одно другое биологически активное соединение, выбранное из группы, включающей соединения против окислительного стресса, антиапоптозные соединения, хелаты металлов, ингибиторы репарации ДНК, такие как пирензепин и его метаболиты, 3-амино-1-пропансульфоновую кислоту (3APS), 1,3-пропандисульфонат (1.3PDS), активаторы секретаз, ингибиторы β - и γ -секретаз, тау-белки, нейромедиатор, разрушители β -складчатой конформации, противовоспалительные молекулы или ингибиторы холинэстеразы (ChEI), такие как такрин, ривастигмин, донепезил и/или галантамин, и другие лекарственные средства и пищевые добавки, в сочетании с терапевтической вакциной, предлагаемой в изобретении, и необязательно фармацевтически приемлемым носителем и/или разбавителем и/или эксципиентом.

Согласно еще одному варианту осуществления изобретения смеси, предлагаемые в изобретении, могут содержать ниацин или мемантин в сочетании с терапевтической вакциной, предлагаемой в изобретении, и необязательно фармацевтически приемлемым носителем и/или разбавителем и/или эксципиентом.

Еще одним вариантом осуществления изобретения являются смеси, которые содержат «атипичные антипсихотические средства», такие, например, как клозапин, зипрасидон, рисперидон, арипипразол или оланзапин, предназначенные для лечения позитивных или негативных психотических симптомов, включая галлюцинации, бред, нарушения мышления (проявляющиеся в выраженной непоследовательности действий, психическом расстройстве, расстройстве ассоциативного мышления) и эксцентричное или неорганизованное поведение, а также ангедонию, пониженную эмоциональную реакцию, апатию и отказ от общества, в сочетании с терапевтической вакциной, предлагаемой в изобретении, необязательно фармацевтически приемлемым носителем и/или разбавителем и/или эксципиентом.

В конкретных вариантах осуществления изобретения композиции и смеси, предлагаемые в изобретении и описанные выше, содержат фармацевтическую композицию, предлагаемую в изобретении, и биологически активную субстанцию соответственно в терапевтически или профилактически эффективном количестве.

Другие соединения, которые можно применять в смесях в сочетании с фармацевтической композицией, предлагаемой в изобретении, описаны, например, в WO 2004/058258 (см. прежде всего на с.16 и с.17), включая мишени терапевтических лекарственных средств (сс.36-39), алкансульфоновые кислоты и алкансерную кислоту (сс.39-51), ингибиторы холинэстеразы (сс.51-56), антагонисты NMDA-рецептора (сс. 56-58), эстрогены (сс.58-59), нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (сс.60-61), антиоксиданты (сс.61-62), агонисты рецепторов, активируемых пероксисомальными пролифераторами (PPAR) (сс.63-67), средства, понижающие уровень холестерина (сс. 68-75); ингибиторы амилоида (сс.75-77), ингибиторы образования амилоида (сс.77-78), хелаторы металлов (сс.78-79), антипсихотические средства и антидепрессанты (сс.80-82), пищевые добавки (сс.83-89) и соединения, повышающие доступность биологически активных субстанций в головном мозге (см. сс.89-93) и пролекарства (сс.93 и 94), указанный документ включен в настоящее описание в качестве

ссылки, но прежде всего соединения, упомянутые на указанных выше страницах.

Примеры

Пример 1: Вакцины

Восемь последовательностей, выведенных из фосфорилированного тау-белка, использовали в качестве антигенов для создания вакцин. В качестве контроля использовали применявшийся ранее иммуногенный пептид (Asuni и Др., 2007).

Таблица 1:		
Описание тау-последовательностей		
Описание	Вакцина	Последовательность
T5: контрольная последовательность: Tau379-408 [pS396, pS404]	ACI-37	RENAKAKTDHGAEIVYKS(p)PVVSGDTS(p) PRHL (n=30) (SEQ ID NO: 1)
T1: Последовательность 1: Tau5-20[pY18]	ACI-33	RQFEFVMEHDHAGTY(p)GL (n=16) (SEQ ID NO:2)
T8: Последовательность 8: Tau206-221 [pT212, pS214]	ACI-39	PGSRRT(p)PS(p)LPTPPTR (n=16) (SEQ ID NO:3)
T9: Последовательность 9: Tau196-211 [pS202, pT205]	ACI-40	GYSSPGS(p)PGT(p)PGSRSR (n=16) (SEQ ID NO: 4)
T3: Последовательность 3: Tau393-408 [pS396, pS404]	ACI-35	VYKS(p)PVVSGDTS(p)PRHL (n=16) (SEQ ID NO: 5)
T4: Последовательность 4: Tau401-418 [pS404, pS409]	ACI-36	GDTS(p)PRHLS(p)NVSSTGSID (n=18) (SEQ ID NO: 6)
T2: Последовательность 2: Tau200-216 [pS202+pT205 и pT212+pS214]	ACI-34	PGS(p)PGT(p)PGSRRT(p)PS(p)LP (n=17) (SEQ ID NO: 7)
T10: Последовательность 10: Tau407-418[pS409]	ACI-42	HLS(p)NVSSTGSID (n=12) (SEQ ID NO: 8)
T11: Последовательность 11: Tau399-408 [pS404]	ACI-43	VSGDTS(p)PRHL (n=10) (SEQ ID NO: 9)

Пример 2: Получение выведенных из тау-белка тетрапальмитоилированных фосфорилированных пептидов

Создавали с помощью ступенчатого процесса антигенную пептидную последовательность, фланкированную двумя парами лизинов, с помощью твердофазного пептидного синтеза на амидной смоле, используя стандартную Fmoc/tBu-химию. Затем ортогональные защитные группы концевых лизинов избирательно удаляли и свободные

аминогруппы ацилировали пальмитиновой кислотой. Удаление защитных групп боковых цепей и одновременное отделение пептида от смолы осуществляли в кислых условиях, что позволяло получать требуемый тетрапальмитоилированный фосфорилированный пептид в виде неочищенного продукта. Идентичность и чистоту дополнительно подтверждали с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF и ЖХВР-анализа.

Последовательности выведенных из тау-белка тетрапальмитоилированных фосфорилированных пептидов:

T1: H-K(Pal)-K(Pal)-RQFEFVMEHDHAGTY(P)GL-K(Pal)-K(Pal)-NH₂

T2: H-K(Pal)-K(Pal)-PGS(p)PGT(p)PGSRRT(p)PS(p)LP-K(Pal)-K(Pal)-NH₂

T3: H-K(Pal)-K(Pal)-VYKS(p)PVVSGDTS(p)PRHL-K(Pal)-K(Pal)-NH₂

T4: H-K(Pal)-K(Pal)-GDTS(p)PRHLS(p)NVSSTGSID-K(Pal)-K(Pal)-NH₂

T8: H-K(Pal)-K(Pal)-PGSRRT(p)PS(p)LPTPPTR-K(Pal)-K(Pal)-NH₂

T9: H-K(Pal)-K(Pal)-GYSSPGS(p)PGT(p)PGSRSR-K(Pal)-K(Pal)-NH₂

T10: H-K(Pal)-K(Pal)-HLS(p)NVSSTGSID-K(Pal)-K(Pal)-NH₂

T11: H-K(Pal)-K(Pal)-VSGDTS(p)PRHL-K(Pal)-K(Pal)-NH₂

2.1: Синтез пептидного антигена T1

Ортогонально защищенную аминокислоту Fmoc-Lys(Mtt)-OH (3 экв.) вносили вручную на амидную смолу (амидная MBHA (метилбензилгидриламид) смола Ринка, 1 экв., 0,26 ммоль) в присутствии 2 экв. ДИК (диизопропилкарбодиимид)/ГОВТ (1-гидроксибензотриазол) в ДМФ (диметилформамид). Затем смолу отмывали ДМФ (3×1 мин). После удаления N-концевой Fmoc-группы с помощью 25% пиперидина в ДМФ

(1×1 мин и 2×15 мин) второй остаток Fmoc-Lys(Mtt)-ОН (3 экв.) автоматически сшивали, используя 5 экв. PyBOP (гексафторфосфат бензотриазол-1-илокситрипирролидинофосфония/ГОБТ/ДИЭА (диизопропилэтиламин) в ДМФ (2×15 мин). Следующие 16 аминокислот, несущих стандартные защитные группы Fmoc боковых цепей, автоматически включали, применяя ранее описанный протокол сочетания. Фосфорилированные аминокислоты (фосфо-аминокислоты) интродуцировали в виде монобензиловых эфиров на фосфатной группе. После каждой стадии сочетания осуществляли стадию отмывки ДМФ (3×30 с), стадию удаления Fmoc с помощью 25% пиперидина в ДМФ (3×3 мин) и вторую стадию отмывки ДМФ (6×30 с). После сочетания Tyr(PO(OBzl)₂) применяли 0,5% ДБУ (диазабициклоундецен) в ДМФ для осуществления стадии удаления защитной группы Fmoc. Сборку пептидной последовательности завершали, добавляя два последних остатка Fmoc-Lys(Mtt)-ОН с использованием 2 экв. PyBOP/ГОБТ/ДИЭА в ДМФ.

Затем Mtt-группы (метилтримитильные группы) концевых остатков лизина избирательно отщепляли в атмосфере азота путем обработки смолы (1 экв. 600 мг, 0,092 ммоль) 10 мл дегазированной смеси ТИПС (триизопропилсилиловый эфир)/ТФК/ДХМ (дихлорметан) (1:1:98) в течение нескольких циклов по 10 мин. Смолу отмывали ДХМ (х3) и ДМФ (х3). Затем пальмитиновую кислоту (20 экв., 473 мг, 1,85 ммоль) сшивали с указанными аминокислотными группами с удаленными защитными группами, используя ТБТУ (тетрафторборат тетраметил-О-(бензотриазол)-1-ил)урония (20 экв. 593 мг, 1,85 ммоль) и ДИЭА (40 экв, 643 мкл, 3,70 ммоль) в ДХМ/ДМФ (1:1) (6 мл). Смолу отмывали ДХМ (х5) и ДМФ (х5). Затем N-концевую Fmoc-группу удаляли с помощью 20% дегазированного пиперидина в ДМФ (3×10 мин) и смолу отмывали ДМФ (х3) и ДХМ (х5). И, наконец, осуществляли одновременное расщепление смолы и удаление защитных групп боковых цепей в атмосфере азота с использованием дегазированной смеси ТФК/ТИПС/Н₂О/ЭДТ (1,2-этандитриол) (95:1:2,5:2,5) (4 мл) в течение 4,5 ч. После растирания в холодном диэтиловом эфире получали неочищенный продукт Т1 в виде твердого вещества белого цвета (189 мг, выход 60%) с чистотой 56% (по данным ЖХВР-анализа). С помощью масс-спектрологии MALDI-TOF подтверждали идентичность основного продукта (m/z ожидаемое: 3427,12 [МН⁺], обнаруженное: 3426,87).

2.2: Синтез пептидного антигена ТЗ

Ортогонально защищенную аминокислоту Fmoc-Lys(Mtt)-ОН (3 экв.) вносили вручную на амидную смолу (амидная МВНА-смола Ринка, 1 экв., 0,4 ммоль) в присутствии PyBOP/ГОБТ/ДИЭА в ДМФ. Затем смолу отмывали ДМФ (3×1 мин). После удаления N-концевой Fmoc-группы с помощью 25% пиперидина в ДМФ (1×1 мин и 2×15 мин) второй остаток Fmoc-Lys(Mtt)-ОН (3 экв.) сшивали, используя такие же условия загрузки. Следующие 16 аминокислот, несущих стандартные защитные группы Fmoc боковых цепей, включали вручную, применяя ранее описанный протокол сочетания. Фосфорилированные аминокислоты интродуцировали в виде монобензиловых эфиров на фосфатной группе. Продолжительность реакции сочетания определяли с помощью TNBT- (нитроголубой тетразолий) теста или хлоранильного теста после пролина. При необходимости осуществляли вторую реакцию сочетания с использованием 2 экв. защищенных Fmoc аминокислот в присутствии ДИК/ГОБТ или ГАТУ (гексафторфосфат О-(7-азабензотриазол-1-ил) тетраметилурония)/ДИЭА. После каждой стадии сочетания осуществляли стадию отмывки ДМФ (3×1 мин), стадию удаления Fmoc с помощью 25% пиперидина в ДМФ (1×1 мин и 2×15 мин) и вторую стадию отмывки ДМФ (7×1 мин). После сочетания первой Ser(PO(OBzl)ОН) 0,5% ДБУ в ДМФ применяли для осуществления стадии удаления защитных групп Fmoc. Сборку пептидной

последовательности завершали, добавляя два последних остатка Fmoc-Lys(Mtt)-ОН.

Затем Mtt-группы концевых остатков лизина избирательно отщепляли в атмосфере азота путем обработки смолы (1 экв. 195 мг, 0,01 ммоль) 10 мл ТИПС/ТФК/ДХМ (1:1:98) в течение нескольких циклов по 10 мин. Смолу отмывали ДХМ (х3) и ДМФ (х3).

5 Затем пальмитиновую кислоту (20 экв., 51 мг, 0,2 ммоль) сшивали с указанными аминокруппами с удаленными защитными группами, используя ТБТУ (20 экв. 64 мг, 0,2 ммоль) и ДИЭА (40 экв, 70 мкл, 0,4 ммоль) в ДХМ/ДМФ (1:1) (2 мл). Смолу отмывали ДХМ (х5) и ДМФ (х5). Затем N-концевую Fmoc-группу удаляли с помощью 20% пиперидина в ДМФ (3×10 мин) и смолу отмывали ДМФ (х3) и ДХМ (х3). И, наконец, 10 осуществляли одновременное расщепление смолы и удаление защитных групп боковых цепей в атмосфере азота с использованием смеси ТФК/ТИПС/Н₂О (95:1,5:2,5) (2 мл) в течение 2 ч. После растирания в холодном диэтиловом эфире получали неочищенный продукт Т3 в виде твердого вещества белого цвета (34 мг, выход 100%) с чистотой 67% (по данным ЖХВР-анализа). С помощью масс-спектрологии MALDI-TOF подтверждали 15 идентичность основного продукта (m/z ожидаемое: 3365,15 [МН⁺], обнаруженное 3369,66).

2.3: Синтез пептидного антигена Т4

Ортогонально защищенную аминокислоту Fmoc-Lys(Mtt)-ОН (5-кратный избыток) автоматически сшивали с амидной смолой Tentagel R RAM (0,19 ммоль/г, 750 мг, 0,1425 20 ммоль), используя ДЦКИ (дициклогексилкарбодиимид) и ГОБТ в качестве активирующих агентов, в ДМФ. После удаления N-концевой Fmoc-группы второй остаток Fmoc-Lys(Mtt)-ОН (5-кратный избыток) сшивали в присутствии ДЦКИ и ГОБТ. Следующие 16 аминокислот, несущих стандартные защитные группы боковых цепей, 25 автоматически включали, применяя аналогичные протоколы сочетания/удаления защитных групп. Фосфо-аминокислоты интродуцировали в виде монобензиловых эфиров на фосфатной группе. Осуществляли двойные сочетания в течение 60 мин для всех остатков с последующей стадией кэпирования с помощью уксусного ангидрида. Сборку пептидной последовательности завершали, добавляя два последних остатка Fmoc-Lys(Mtt)-ОН.

30 Затем Mtt-группы концевых остатков лизина избирательно отщепляли путем обработки смолы (1 экв. 750 мг, 0,075 ммоль) 10 мл ТИПС/ТФК/ДХМ (1:1:98) в течение нескольких циклов по 10 мин. Смолу отмывали ДХМ (х3) и ДМФ (х3). Затем пальмитиновую кислоту (20 экв., 51 мг, 0,2 ммоль) сшивали с указанными 35 аминокруппами с удаленными защитными группами, используя ТБТУ (20 экв. 482 мг, 1,5 ммоль) и ДИЭА (40 экв, 536 мкл, 3,0 ммоль) в ДХМ/ДМФ (1:1) (7 мл). Смолу отмывали ДХМ (х5) и ДМФ (х5). Затем N-концевую Fmoc-группу удаляли с помощью 20% пиперидина в ДМФ (3×10 мин) и смолу отмывали ДМФ (х3) и ДХМ (х3). И, наконец, осуществляли одновременное отщепление от смолы и удаление защитных групп боковых 40 цепей с использованием смеси ТФК/ТИПС/Н²О (95:2,5:2,5) (6 мл) в течение 3,5 ч. После растирания в холодном диэтиловом эфире получали неочищенный продукт Т4 в виде твердого вещества белого цвета (96 мг, выход 37%) с чистотой 50% (по данным ЖХВР-анализа). С помощью масс-спектрологии MALDI-TOF подтверждали идентичность основного продукта (m/z ожидаемое: 3455,10 [МН⁺], обнаруженное: 3456,13).

2.4: Синтез пептидного антигена Т8

45 Ортогонально защищенную аминокислоту Fmoc-Lys(Mtt)-ОН (5 экв. 781 мг, 1,25 ммоль) вносили вручную на амидную PEGA-смолу Ринка (1 экв., 0,33 ммоль/г, 758 г), используя ДИПКДИ (диизопропилкарбодиимид) (5 экв., 196 мг, 1,25 ммоль) и ГОБТ (5 экв., 169 мг, 1,25 ммоль) в ДМФ (5 мл) для двух реакций сочетания, которые

осуществляли в течение 8 ч. Затем смолу отмывали ДМФ (х5). После удаления N-концевой Fmoc-группы с помощью 20% пиперидина в ДМФ (7 мл × 3×5 мин) второй остаток Fmoc-Lys(Mtt)-ОН (10 экв., 1,56 г, 2,5 ммоль) сшивали в присутствии ТБТУ (10 экв., 803 мг, 2,5 ммоль), ГОБТ (10 экв., 338 мг, 2,5 ммоль) и ДИЭА (20 экв., 871 мл, 5,0 ммоль). Следующие 16 аминокислот, несущих стандартные защитные группы боковых цепей, включали вручную, применяя аналогичные протоколы циклов сочетания/удаления защитных групп/отмывки. Фосфорилированные аминокислоты интродуцировали исключительно в виде монобензиловых эфиров на фосфатной группе (10 экв.) с помощью ТБТУ (10 экв.), ГОБТ (5 экв.) и ДИЭА (15 экв.) в ДМФ. В процессе синтеза время реакции сочетания составляло 1 ч. Сборку пептидной последовательности завершали, добавляя два последних остатка Fmoc-Lys(Mtt)-ОН.

Затем Mtt-группы концевых остатков лизина избирательно отщепляли путем обработки пептидильной смолы (1 экв. 385 мг, 0,019 ммоль) 10 мл ТИПС/ТФК/ДХМ (1:1:98) в течение нескольких циклов по 10 мин. Смолу отмывали ДХМ (х3) и ДМФ (х3). Затем пальмитиновую кислоту (20 экв., 968 мг, 3,8 ммоль) сшивали с указанными аминокислотами с удаленными защитными группами, используя ТБТУ (20 экв., 1,21 г, 3,8 ммоль) и ДИЭА (40 экв., 1,31 мл 7,6 ммоль) в ДХМ/ДМФ (1:1) (4 мл). Смолу отмывали ДХМ (х5) и ДМФ (х5). Затем N-концевую Fmoc-группу удаляли с помощью 20% пиперидина в ДМФ (3×10 мин) и смолу отмывали ДМФ (х3) и ДХМ (х3). И, наконец, осуществляли одновременное отщепление от смолы и удаление защитных групп боковых цепей с использованием смеси ТФК/ТИПС/Н²О (95:2,5:2,5) (4 мл) в течение 3,5 ч. После растирания в холодном диэтиловом эфире получали неочищенный продукт Т8 в виде твердого вещества белого цвета (50, 2 мг, выход 10%) с чистотой 55% (по данным ЖХВР-анализа). С помощью масс-спектропии MALDI-TOF подтверждали идентичность основного продукта (m/z ожидаемое: 3331,17 [МН⁺], обнаруженное: 3335,19).

2.5: Синтез пептидного антигена Т9

Ортогонально защищенную аминокислоту Fmoc-Lys(Mtt)-ОН (3 экв.) вносили вручную на амидную смолу (амидная МВНА-смола Ринка, 1 экв., 0,4 ммоль) в присутствии РуВОР/ГОБТ/ДИЭА в ДМФ. Затем смолу отмывали ДМФ (3×1 мин). После удаления N-концевой Fmoc-группы с помощью 25% пиперидина в ДМФ (1×1 мин и 2×15 мин) второй остаток Fmoc-Lys(Mtt)-ОН (3 экв.) сшивали, используя такие же условия загрузки. Следующие 16 аминокислот, несущих стандартные защитные группы боковых цепей, включали, применяя ранее описанный протокол сочетания. Фосфорилированные аминокислоты интродуцировали в виде монобензиловых эфиров на фосфатной группе. Продолжительность реакции сочетания определяли с помощью TNBT-теста или хлоранильного теста после пролина. При необходимости осуществляли вторую реакцию сочетания с использованием 2 экв. защищенной Fmoc аминокислоты в присутствии ДИК/ГОБТ или ГАТУ/ДИЭА. После каждой стадии сочетания осуществляли стадию отмывки ДМФ (3×1 мин), стадию удаления Fmoc с помощью 25% пиперидина в ДМФ (1×1 мин и 2×15 мин) и вторую стадию отмывки ДМФ (7×1 мин). После сочетания Thr (PO(OBzl)ОН) использовали 0,5% ДБУ в ДМФ для осуществления стадии удаления защитной группы Fmoc. Сборку пептидной последовательности завершали, добавляя два последних остатка Fmoc-Lys(Mtt)-ОН.

Затем Mtt-группы концевых остатков лизина избирательно отщепляли путем обработки смолы (1 экв., 650 мг, 0,156 ммоль) 10 мл ТИПС/ТФК/ДХМ (1:1:98) в течение нескольких циклов по 10 мин. Затем смолу отмывали ДХМ (х3) и ДМФ (х3). Пальмитиновую кислоту (20 экв., 1,01 г, 3,15 ммоль) сшивали с указанными

аминогруппами с удаленными защитными группами, используя ТБТУ (20 экв. 814 мг, 3,5 ммоль) и ДИЭА (40 экв, 1,1 мл, 6,3 ммоль) в ДХМ/ДМФ (1:1) (6 мл). Смолу отмывали интенсивно ДХМ (x5) и ДМФ (x5). Затем N-концевую Fmoc-группу удаляли с помощью 20% пиперидина в ДМФ (3x10 мин) и смолу вновь отмывали ДМФ (x3) и ДХМ (x3).

5 И, наконец, осуществляли одновременное отщепление от смолы и удаление защитных групп боковых цепей с использованием смеси ТФК/ТИПС/Н₂O (95:2,5:2,5) (9 мл) в течение 3 ч. После растирания в холодном диэтиловом эфире получали неочищенный продукт Т9 в виде твердого вещества белого цвета (291 мг, выход 59%) с чистотой 69% (по данным ЖХВР-анализа). С помощью масс-спектрологии MALDI-TOF подтверждали
10 идентичность основного продукта (m/z ожидаемое: 3172,98 [МН⁺], обнаруженное: 3172,90).

2.6: Синтез пептидного антигена Т 10

Тетрапальмитоилированный пептид Т 10 получали с помощью протокола, аналогичного описанному для Т9 (масштаб пептидного синтеза: 0,25 ммоль). Кроме
15 того, псевдопролин [psi(Gly-Ser)] применяли в качестве конструктивного элемента перед последовательностью Asn-Val-Ser-Ser, встраивание которой было проблематичным. Получали неочищенный продукт Т10 в виде твердого вещества белого цвета (809 мг, количественный выход) с чистотой 56% (по данным ЖХВР-анализа). С помощью масс-спектрологии MALDI-TOF подтверждали идентичность
20 основного продукта (m/z ожидаемое: 2761,9 [МН⁺], обнаруженное: 2759,2).

2.7: Синтез пептидного антигена Т11

Тетрапальмитоилированный пептид Т11 получали с помощью протокола, аналогичного описанному для Т9 (масштаб пептидного синтеза: 0,25 ммоль). Получали неочищенный продукт Т11 в виде твердого вещества белого цвета (495 мг, выход 76%)
25 с чистотой 80% (по данным ЖХВР-анализа). С помощью масс-спектрологии MALDI-TOF подтверждали идентичность основного продукта (m/z ожидаемое: 2613,8 [МН⁺], обнаруженное: 2612,2).

Пример 3: Получение вакцин (процесс А)

Выведенный из тау-белка тетрапальмитоилированный фосфорилированный пептид
30 взвешивали (количество см. в таблице 2, ниже) и помещали в стеклянную круглодонную колбу вместимостью 250 мл. Затем взвешивали димиристоилфосфатидилхолин (DMPC), димиристоилфосфатидилглицерин (DMPG), холестерин и адъювант, представляющий собой монофосфорильный липид А (MPLA) (все фирмы Avanti Polar Lipids Inc., шт.Алабама, США) и добавляли в молярном соотношении 9:1:7:0,2 соответственно.
35 Затем добавляли хлороформ, получая прозрачный раствор с мелкими частицами. После осторожного перемешивания в течение 15 мин органический растворитель удаляли упариванием при пониженном давлении при 40°C, а затем в глубоком вакууме в течение 3 ч. Образовавшуюся тонкую пленку регидратировали путем добавления стерильного ЗФР в многослойном вытяжном шкафу и осторожно перемешивали при КТ (комнатная
40 температура) в течение 18 ч. Конечное молярное соотношение пептид/фосфолипид составляло 1:100. Затем суспензию липосом разделяли на аликвоты в стерильных фальконовских пробирках вместимостью 15 мл (5 мл продукта/пробирку) перед хранением при 2-8°C. Конечная концентрация пептида составляла 40 мкМ.

Пример 4: Характеристики липосомальных вакцин на основе тау-пептидов 4.1.

45 Методы

4.1.1 Количественная оценка пептида. DMPC и холестерина с помощью ЖХВР

Для анализа липосомальных вакцин на основе тау-пептидов (ACI-33, ACI-35, ACI-36, ACI-39, ACI-40 и ACI-41, их все приготавливали согласно процессу А, описанному

в примере 3) приготавливали образцы путем добавления воды (20 мкл) к образцу вакцины (20 мкл) в стеклянном флаконе для ЖХВР, затем добавляли изопропанол (140 мкл) и ТФК (20 мкл). Разбавленный в 5 раз образец кратковременно встряхивали перед инъекцией (20 мкл). Анализ осуществляли, используя С3-колонку с обращенной фазой типа Zorbax 300SB-B3 (250×4,6 мм, 5 мкм, 300Å, фирма Agilent) термостатированную до 75°C, осуществляя обнаружение при 207 и 214 нм. Для элюирования применяли следующие растворители: растворитель Б, 95% изопропанола, 5% воды, 0,1% ТФК; растворитель А, 10% ацетонитрила, 90% воды, 0,1% ТФК. Применяли градиент от 40% Б до 60% Б в течение 20 мин при скорости потока 1 мл/мин. Для калибровки использовали индивидуально стандарты тау-пептидов (Т1, Т3, Т4, Т8 и Т9) и DMPC/холестерина в различных концентрациях. Для тау-пептидов приготавливали маточный раствор концентрации 1 мг/мл в ТФК/iPrOH/H₂O (1:7:2) и осуществляли серийные разведения (1:1), начиная с концентрации 400 мкг/мл до 12,5 мкг/мл. Для липидов приготавливали маточные растворы концентрации 8,0 мг/мл для DMPC и 3,5 мг/мл для холестерина в 70% изопропанола и 30% воды и разводили (1:5), (1:10) и (1:50) с помощью такой же смеси.

4.1.2. Количественная оценка MPLA с помощью ЖХВР

MPLA в липосомальной вакцине на основе тау-пептидов оценивали с помощью ЖХВР с обнаружением УФ-детектором после дериватизации адьюванта с помощью обладающего активностью при УФ-облучении хромофора 3,5-динитробензилоксинамина (DNBA). В целом, метод состоял в следующем: 20 мкл липосомальных тау-конструкций добавляли в раствор DNBA в пиридине (10 мг/мл, общий объем 100 мкл), выдерживали при 60°C в течение 3 ч и затем пиридин удаляли выпариванием. Образовавшиеся гранулы повторно солюбилизировали с помощью в смеси хлороформ/метанол (2:1, об/об) для ЖХВР-анализа. Для калибровки использовали MPLA (фирма Avanti Polar Lipids) в четырех различных концентрациях и дериватизировали и анализировали в липосомальных тау-конструкциях. ЖХВР-анализ осуществляли с помощью колонки с обращенной фазой фирмы Agilent типа XDB-C18 (250×4,6 мм, 120Å, 5 мкм), термостатированной до 50°C, осуществляя обнаружение при 254 нм. Для элюирования применяли следующие растворители: растворитель А, 95% ацетонитрила, 5% воды, 4,8 мМ фосфорная кислота; растворитель Б, 95% изопропанола, 5% воды, 4,8 мМ фосфорная кислота. Применяли градиент от 10% Б до 70% Б в течение 30 мин при скорости потока 1 мл/мин.

4.1.3 Потенциал поверхности липосом

Образцы липосомальных тау-конструкций разводили в 100 раз ЗФР. Анализ осуществляли с помощью устройства Zetasizer Nano (фирма Малверн, США) при 25°C. Выбор продолжительности измерений и потенциала осуществляли в автоматическом режиме, как правило, применяли потенциал 50 мВ. Данные трансформировали автоматически с помощью уравнения Смолуховского, используя программу DTS 5.0 (фирма Малверн) для расчета зета-потенциала. Поскольку липосомальные тау-конструкции состояли из смеси DMPC/DMPG/холестерин/MPLA в молярном соотношении 9:1:7:0,2; ожидаемый чистый заряд должен быть отрицательным.

4.1.4 Конформационный анализ с помощью кругового дихроизма (CD)

Липосомальные тау-конструкции разводили (1:1) ЗФР с получением конечной концентрации пептида 18 мкМ. Липосомы идентичного состава, но без тау-пептида, применяли в качестве контрольного раствора для вычитания фонового уровня. CD-спектры регистрировали на спектрополяриметре Jasco-815, снабженном кварцевой кюветой с длиной оптического пути 0,1 см (фирма Hellma, Германия), при 23°C.

Измерения осуществляли при длинах волн 195-250 нм с шириной полосы 1,0 нм и разрешением 0,5 нм. Применяли скорость сканирования 50 нм/мин и время ответа 1 с. Контрольные спектры усредняли (по результатам 8 сканирований) и вычитали из средних результатов 8 сканирований спектров каждого образца. Полученный спектр ([θ]_{obs}, в градусах) сглаживали после преобразования в среднюю молярную

эллиптичность остатков ([θ], градусы·см²·дмоли⁻¹) согласно уравнению [θ]= [θ]_{obs}×MRW/101с), в котором MRW обозначает среднюю молекулярную массу остатков (ММ/ количество остатков), l обозначает длину оптического пути (см) и c обозначает концентрацию (г/см³).

4.1.5 ThT-флуоресцентный анализ

Оценку ThT (тиофлавин Т)-флуоресценции осуществляли с помощью ридера для титрационных микропланшетов типа Infinite M200 (фирма Tecan Group Ltd, Швейцария). Общая процедура состояла в следующем: липосомальные тау-конструкции разводили в ЗФР с получением различных концентраций (таблица 2). Липосомы такого же состава, но без тау-пептида разводили аналогично и применяли в качестве отрицательного контроля (партия ACI-35-081015-B). К 98 мкл раствора каждой вакцины или контрольного раствора добавляли ThT (2 мкл, 1,2 мМ в воде) с получением конечной концентрации 24 мкМ. После кратковременного перемешивания аликвоту из каждого образца (70 мкл) добавляли в черный прозрачный 384-луночный титрационный микропланшет фирмы Perkin Elmer и испускание флуоресценции определяли при длине волны 485 нм через 30 мин после возбуждения при длине волны 440 нм. Ширина полосы возбуждения составляла 9 нм, а ширина полосы испускания 20 нм. γ -Циклодекстрин применяли в качестве внутреннего контроля. Осуществляли серийные 2-кратные разведения в ЗФР, начиная с маточного раствора концентрации 640 мМ в ЗФР, получая 320, 160 и 80 мМ контрольные растворы γ -циклодекстрина.

Таблица 2:

Образцы, приготовленные для ThT-анализа

Пептид	Вакцина	Партия	Разведение	Конц. пептида (мкг/мл)
T1	ACI-33	ACI-33-081031-A	2-кратное	23
		ACI-33-081031-A	3-кратное	15
		ACI-33-081031-A	4-кратное	7,7
		ACI-33-081031-A	12-кратное	3,8
T3	ACI-35	ACI-35-081015-A	2-кратное	39
		ACI-35-081015-A	3-кратное	26
		ACI-35-081015-A	4-кратное	20
		ACI-35-081015-A	12-кратное	5
T4	ACI-36	ACI-36-081110-A	2-кратное	16,5
		ACI-36-081110-A	3-кратное	11
		ACI-36-081110-A	4-кратное	8,3
		ACI-36-081110-A	12-кратное	2,1
T8	ACI-39	ACI-39-090202-A	2-кратное	24
		ACI-39-090202-A	3-кратное	16
		ACI-39-090202-A	4-кратное	12
		ACI-39-090202-A	12-кратное	4
T9	ACI-40	ACI-40-090202-A	2-кратное	30
		ACI-40-090202-A	3-кратное	20
		ACI-40-090202-A	4-кратное	15
		ACI-40-090202-A	12-кратное	5
T8+T9	ACI-41	ACI-41-081204-A	2-кратное	11,5
		ACI-41-081204-A	3-кратное	7,7

Пептид	Вакцина	Партия	Разведение	Конц. пептида (мкг/мл)
Отрицательный контроль	Отрицательный контроль	ACI-41-081204-A	4-кратное	5,8
		ACI-41-081204-A	12-кратное	1,
		ACI-35-081015-B	2-кратное	н.о.
		ACI-35-081015-B	3-кратное	н.о.
		ACI-35-081015-B	4-кратное	н.о.
		ACI-35-081015-B	12-кратное	н.о.

4.2. Результаты

4.2.1 Количественная оценка пептида, DMPC и холестерина с помощью ЖХВР

На ЖХВР-хроматограмме при длине волны обнаружения 207 нм, которую получали после инъекции образцов вакцин, видно присутствие тау-пептида, DMPC и холестерина (см. таблицу 3). На основе калибровочных кривых, для построения которых использовали стандарты, рассчитывали количество каждого компонента вакцины. Обнаруженное содержание тау-пептида, DMPC и холестерина в липосомальных суспензиях, содержащих тау-пептиды, оказалось близким требуемым величинам.

4.2.2 Количественная оценка MPLA с помощью ЖХВР

На ЖХВР-хроматограмме при длине волны обнаружения 254 нм, которую получали после инъекции образца DNBA-derivatизированной содержащей тау-пептид вакцины, видно присутствие меченого MPLA (см. таблицу 3). На основе калибровочной кривой, для построения которой использовали стандарт, рассчитывали количество MPLA в содержащих тау-пептид липосомальных вакцинах. Обнаруженное содержание MPLA в липосомальных суспензиях, содержащих тау-пептиды, оказалось близким к требуемым величинам.

4.1.3 Потенциал поверхности липосом

Данные об измеренном зета-потенциале липосомальных вакцин, содержащих тау-пептид, представлены в таблице 3.

4.2.4 Конформационный анализ тау-пептида в липосомальных вакцинах с помощью CD

Конформацию содержащих тау-пептид липосомальных вакцин, приготовленных согласно описанному выше методу, определяли с помощью кругового дихроизма.

Результаты представлены в таблице 3.

4.2.5. ThT-анализ тау-пептида в липосомальных вакцинах

Агрегированные состояния тау-пептидов липосомальных вакцин (полученных с использованием описанного выше процесса А), определенные с помощью флуориметического ThT-анализа, представлены в таблице 3.

Таблица 3. Обобщение характеристик вакцин							
Вакцина	Компонент	Время удерживания	Требуемое значение (мкг/мл)	Результат (мкг/мл)	Потенциал поверхности липосомы (мВ)	Конформация по данным кругового дихроизма	ThT-анализ (агрегация пептида), флуоресцентный сигнал
ACI-33	пептид Т1	19,3 мин	130	46	-18,7	Смешанная конформация, включающая бета-сгиб и бета-поворот	Агрегация
	холестерин	11,2 мин	1027	923			
	DMPC	10,0 мин	2314	2463			
	DMPG	и.о.	261	nd			
	MPLA	39,8 мин	135	62			
ACI-35	пептид Т3	19,5 мин	130	78	-19,2	Произвольная спиральная конформация	Отсутствие агрегации
	холестерин	11,6 мин	1046	1438			
	DMPC	10,3 мин	2357	nd			
	DMPG	и.о.	266	nd			
	MPLA	29,7 мин	135	124			

5	ACI-36	пептид T4	20,3 мин	130	33	-17,8	Произвольная спиральная конформация с определенной долей бета-складок	Агрегация
		холестерин	11,2 мин	1018	1387			
		DMPC	10,0 мин	2296	nd			
		DMPG	н.о.	259	nd			
		MPLA	29,7 мин	135	83			
10	ACI-39	пептид T8	19,3 мин	130	48	-16,8	Бета-складчатая конформация	Отсутствие агрегации
		холестерин	11,8 мин	1056	1906			
		DMPC	10,5 мин	2381	4316			
		DMPG	н.о.	269	nd			
		MPLA	30,9 мин	135	144			
15	ACI-40	пептид T9	21,0 мин	130	60	-14,7	Произвольная спиральная конформация	Отсутствие агрегации
		холестерин	11,8 мин	1109	1655			
		DMPC	10,5 мин	2500	2894			
		DMPG	н.о.	269	nd			
		MPLA	30,9 мин	135	122			
20	ACI-41	пептид T8+T9	18,3 мин+19,9 мин	65+65	23+34	-17,3	Смесь произвольной спиральной и бета-складчатой конформации	Отсутствие агрегации
		холестерин	11,2 мин	1109	34			
		DMPC	9,9 мин	2500	1574			
		DMPG	н.о.	282	3829			
		MPLA	30,9 мин	135	80			

Пример 5: Иммуногенность пальмитоилированных тау-антигенов для мышей дикого типа и Тау-/- КО мышей

5.1. Методы

5.1.1 Мыши с «выключенным» геном tau (ТКО)

Для «выключения» гена tau использовали обеспечивающий направленный перенос вектор, с помощью которого встраивали кДНК EGFP (усиленный зеленый флуоресцентный белок) в экзон 1 в рамке считывания гена с эндогенным иницирующим кодоном. В результате получали слитый белок с первыми 31 аминокислотами (ак) тау-белка, за которыми располагался EGFP (описано у Tucker KL. и др., Nature Neuroscience, 2001). Делению гена подтверждали вестерн-блоттингом лизатов всего головного мозга. Оценка уровней тау-белка с помощью нескольких антител к тау-белку свидетельствовала о том, что все изоформы тау-белка отсутствовали в гомозиготном мутанте и их уровень был снижен на 50% в гетерозиготном мутанте. Мутации поддерживали в генетическом фоне C57BL/6.

5.1.2 Получение вакцины

Вакцины получали с помощью процесса А, описанного в примере 3.

5.1.3 Иммунизации

Мышам линии C57BL/6 или Тау-/- КО (ТКО) вводили с помощью i.p. инъекций вакцину (ACI-33, ACI-35, ACI-36 и ACI-41), осуществляя три обработки (схема 1) (таблица 4).

В случае иммунизации ACI-33, ACI-35, ACI-36 и ACI-41 осуществляли три иммунизации с 2-недельными интервалами между каждым введением в (день (d)0, d13, d28), как проиллюстрировано на схеме 1. За 1 день (d-1) до первых иммунизации, затем после второй (d27) и третьей (d47) иммунизации отбирали образцы крови и получали сыворотку. Для получения сыворотки давали образоваться сгустку в образцах крови в течение ночи, с последующим получением супернатанта после центрифугирования. Определяли титры специфических для фосфорилированных тау-пептидов (pTau) антител в виде IgG и IgM и подклассов IgG-изотипа с помощью ELISA. В качестве контроля определяли также с помощью ELISA титры антитела в виде IgG, не обладающего специфичностью в отношении pTau.

Таблица 4:

Иммунизация мышей

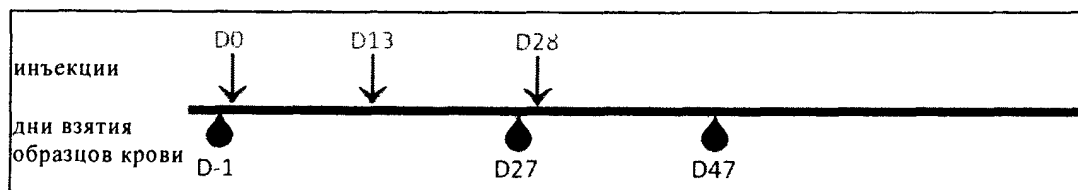
Группа	Линия мышей	Возраст (мес.)	Количество и пол животных	Обработка/объем ^а	Партия вакцины	Путь введения ^б	Уровень дозы, количество-пептида мкг/дозу ^в	Количество MPLA мкг/дозу ^в
АСI-33 (Т1 пептид)	WT	6	3♀ 3♂	АСI-33 0,2 мл	АСI-33-081031-A	i.p.	9	12
	KO	4-5	3♀ 3♂	АСI-33 0,2 мл	АСI-33-081031-A	i.p.	9	12
АСI-35 (Т3 пептид)	WT	6	3♀ 3♂	АСI-35 0,2 мл	АСI-35-081015-A	i.p.	16	23
	KO	6-8	3♀ 3♂	АСI-35 0,2 мл	АСI-35-081015-A	i.p.	16	23
АСI-36 (Т4 пептид)	WT	6	3♀ 3♂	АСI-36 0,2 мл	АСI-36-081110-A	i.p.	7	13
	KO	4	3♀ 3♂	АСI-36 0,2 мл	АСI-36-081110-A	i.p.	7	13
АСI-41 (Т8+Т9 пептид s)	WT	7	3♀ 3♂	АСI-41 0,2 мл	АСI-41-081204-A	i.p.	5	7
	KO	4	3♀ 3♂	АСI-41 0,2 мл	АСI-41-081204-A	i.p.	5	7

а: теоретический объем

б: i.p.: внутрибрюшинно

в: количество, измеренное после анализа

Схема 1: Режим иммунизации и отбора крови при применении АСИ-33, АСИ-35, АСИ-36 и АСИ-41



5.1.4 Количественная оценка специфических для тау-пептидов антител

Специфические для рТау-пептидов антитела в виде IgG определяли с помощью ELISA в трех образцах сыворотки, полученных при отборе крови. Специфические для тау-пептида IgG определяли в сыворотке, полученной в дни d-1 и d47. Специфические для рТау-пептидов антитела изотипов IgM и IgG определяли с помощью ELISA в образце сыворотки, полученном при отборе крови в d47. Планшеты сенсibilizировали 10 мкг/мл соответствующего тау-пептида в течение ночи при 4°C. После отмывки каждой лунки с использованием 3ФР-0,05% Твин 20 и блокады с помощью 1% БСА в 3ФР-0,05% Твин 20 в планшеты вносили серийные разведения сыворотки и инкубировали при 37°C в течение 2 ч. После отмывки планшеты инкубировали с конъюгированным со щелочной фосфатазой (AP) антимышиным полным антителом в виде IgG (фирма Jackson Laboratories, Балтимор, шт. Пенсильвания, США) или с изотипспецифическими антителами (конъюгированный с пероксидазой из хрена (HRP) антимышиный IgM, конъюгированный с AP антимышиный IgG1, конъюгированные с биотином антимышиные IgG2a и IgG3, которые получали от фирмы Pharmingen BD, Сан-Диего, шт. Калифорния, США, и конюгированный с HRP антимышиный IgG2b фирмы Zymed Laboratories, Сан-Франциско, шт. Калифорния) в течение 2 ч при 37°C. После отмывки планшеты инкубировали с rNPP (пара-нитрофенилфосфат), представляющим собой фосфатный субстрат для AP, или ABTS (2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновая кислота)), представляющей собой субстрат для HRP, и считывали при 405 нм с помощью планшет-ридера для ELISA. Дополнительную стадию осуществляли для

конъюгированных с биотином антител, при этом планшеты инкубировали в течение 45 мин с комплексом стрептавидин-HRP (фирма R&D Systems, Миннеаполис, шт.Миннесота, США) перед выявлением с помощью ABTS. Результаты выражали в виде ОП (оптическая плотность) для первого разведения и ненасыщающего разведения в случае IgG и ОП для ненасыщающего разведения в случае изотипов IgG и IgM.

5.1.5 Связывание антител к тау-пептидам с тау-сплетениями на срезах головного мозга трансгенных животных (TAUPIR)

Связывание антител, присутствующих в сыворотке вакцинированных животных, со сплетениями в срезах головного мозга осуществляли с помощью TAUPIR-иммуногистохимии.

Применяемые срезы головного мозга получали из трансгенных животных Таи P301L (TPLN: наиболее длинная изоформа (441 ак) человеческого тау-беока с мутацией P301L) на конечной стадии жизни и из старых (возрастом >15 месяцев) мышей, несущих 2 трансгена (дважды трансгенные мыши линии biGT (трансгенные мыши линии GSK-3, скрещенные с мышами линии TPLN).

Срезы головного мозга отмывали в течение 5 мин в ЗФР, затем инкубировали в течение 15 мин при КТ в 1,5% H₂O₂ в ЗФР: МеОН (1:1) для блокады эндогенной пероксидазы. После трехкратной отмывки срезов в ЗФРТ (ЗФР/0,1% Тритон X100) их инкубировали в течение 30 мин при КТ в блокирующем растворе, включающем ЗФР+ 10% FCS (фетальная телячья сыворотка). Инкубацию с сывороткой, содержащей антитела к тау-белку, осуществляли в течение ночи при 4°C. Сыворотку разводили в ЗФРТ/10% FCS, используя несколько азличных серийных разведениях от 1/2500 до 1/10000. Срезы отмывали трижды в ЗФРТ перед инкубацией с конъюгированным HRP козьим антимышиным вторичным антителом (фирмы Dako, Глоструп, Дания)) в ЗФРТ/10% FCS в течение 1 ч при КТ. Перед обнаружением срезы отмывали трижды в ЗФРТ и инкубировали в 50 мМ Трис/НСl pH 7,6 в течение 5 мин. Обнаружение осуществляли путем инкубации срезов в течение 3 мин в диаминобензидине (DAB: 1 таблетка в 10 мл 50 мМ Трис/НСl+3 мкл 30% H₂O₂) (фирма MP Biomedicals, Солон шт.Огайо, США). Реакцию прекращали путем трехкратной отмывки срезов в ЗФРТ. Затем срезы переносили на пластины из силанизированного стекла и сушили на воздухе на теплой пластине при 50°C в течение 2 ч. Контрастное окрашивание осуществляли путем инкубации с гематоксилином Майера (фирма Fluka Chemie, Бухс, Швейцария) в течение 1 мин с последующей стадией отмывки в течение 4 мин в проточной водопроводной воде. Срезы дегидратировали, помещая их в баню с 50%, 70%, 90% и дважды 100% этанола, а затем дважды на 1 мин в ксилол. И, наконец, срезы заключали в среду DePeX (фирма BDH Chemicals Ltd., Пул, Великобритания), закрывая стеклянными покровными стеклами

5.1.6 Вестерн-блоттинг (ВБ)

Анализ связывания антител, находящихся в сыворотке вакцинированных животных, с pTau в экстрактах головного мозга трансгенных животных осуществляли с помощью ВБ.

Для гомогенизации головного мозга мышей дикого типа FVB, мышей линий TPLN, biGT и мышей с «выключенным» геном Tau (ТКО) использовали следующий буфер: 25 мМ Трис/НСl pH 7,6, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТКА, 1 мМ ЭГТК, 30мМ NaF, 0,2 мМ Na₃VO₄, 1нМ оадаевая кислота, 1 мМ фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ), 5 мМ Na₄P₂O₇, 1 таблетка полного коктейля ингибиторов протеаз (СРiС) на общий объем 12 мл. Для получения гомогената всего головного мозга головной мозг гомогенизировали

на льду в 1 об./массу полушария (мл/г) с помощью приводимого в действие мотором устройства типа гомогенизатора Поттера (стеклянная пробирка/тефлоновой пестик) при 700 об/мин.

Гомогенат всего головного мозга разводили в соотношении 1:1 буфером для образца (125 mM Трис/HCl pH 6,8, 4% (мас./об.) додецилсульфат натрия (ДСН), 20% глицерина, 0,01% бромфенолового синего)+5% бета-меркаптоэтанол, затем быстро нагревали до 95°C. Образцы выдерживали 5 мин, разводили $1/4$ в буфере для образца, вновь нагревали до 95°C, затем охлаждали и центрифугировали при 14000 об/мин в течение 5 мин до получения прозрачного дебриса, который не соллюбилизировали. Супернатанты собирали и вносили на гель для осуществления ДСН-ПААГ. Перенос на нитроцеллюлозную мембрану (Hybond-ECL) осуществляли в буфере для переноса (25 mM Трис pH 8,6, 190 mM глицин, 20% метанола). Мембрану переносили в блокирующий раствор (0,1% Твин в TBS (50 mM Трис/HCl, pH 7,6, 150 mM NaCl)+5% сухого молока) перед инкубацией в течение ночи при 4°C с мышиной сывороткой, разведенной блокирующим раствором. Инкубацию с вторичным конъюгированным с HRP козьим антитышим антителом (фирма Dako, Глоструп, Дания), разведенным в соотношении 1/10000 в блокирующем растворе, осуществляли при КТ в течение 1 ч. Для обнаружения использовали применяемые для вестерн-блоттинга ECL-реагенты фирмы GE Healthcare.

5.2. Результаты

5.2.1 Специфичность антител из сыворотки вакцинированных мышей

Сыворотку из вакцинированных мышей оценивали с помощью ELISA в отношении специфичности присутствующих в ней антител к рТау-пептидам и тау-пептидам, тау-сплетениям с помощью ТАUPIR-анализа, а к рТау-пептидам с помощью вестерн-блоттинга.

Вакцина ACI-33 индуцировала ответ в виде антител к Tau5-20 [pY18] изотипа IgG после i.p.-инъекции. После двух иммунизации (d27), IgG-ответ оставался стабильным, при этом не обнаружено усиления после третьей иммунизации (d47) (фиг.1a: WT-мыши, однонаправленный дисперсионный анализ, $P<0,05$ при сравнении результатов, полученных в d-1, с результатами, полученными в d27, $P<0,001$ при сравнении результатов, полученных в d-1, с результатами, полученными в d47, и фиг.16: ТКО-мыши, однонаправленный дисперсионный анализ, $P<0,001$ при сравнении результатов, полученных в d-1, с результатами, полученными в дни d27/47).

Вакцина ACI-35 индуцировала сильный ответ в виде антител к Tau393-408 [pS396/pS404] изотипа IgG после i.p.-инъекции. После двух иммунизации (d28), IgG-ответ оставался стабильным (d42, 98 и 126), при этом не обнаружено усиления после третьей иммунизации (d42) и отсутствие усиления при отборе образцов крови до, между или после ревакцинации (фиг.2a: WT-мыши: однонаправленный дисперсионный анализ, $P<0,0001$ при сравнении результатов, полученных в d-1 с результатами, полученными в дни d28/42/98/126, и фиг.26: ТКО-мыши: однонаправленный дисперсионный анализ, $P<0,0001$ при сравнении результатов, полученных в d-1, с результатами, полученными в дни d28/42/98/126).

Вакцина ACI-36 индуцировала ответ в виде антител к Tau401-418 [pS404/S409] изотипа IgG после i.p.-инъекции. После двух иммунизации (d27), IgG-ответ оставался стабильным, при этом не обнаружено усиления после третьей иммунизации (d47) (фиг.3a: WT-мыши: однонаправленный дисперсионный анализ, $P<0,001$ при сравнении результатов, полученных в d-1 с результатами, полученными в d27, $P<0,0001$ при сравнении результатов, полученных в d-1 с результатами, полученными в d47, и фиг.36: ТКО-мыши: однонаправленный дисперсионный анализ, $P<0,0001$ при сравнении результатов,

полученных в d-1 с результатами, полученными в дни d27/47).

Вакцина ACI-41 после i.p.-инъекции индуцировала сильный ответ в виде IgG к пептидам Tau206-221 [pT212/p8214] и Tau196-211 [pS202/pT205]. После двух иммунизации (d34/7), IgG-ответ оставался стабильным, при этом не обнаружено усиления после третьей иммунизации (d48) (фиг.4а: WT-мыши, антитела к Tau206-221 [pT212/pS214]-IgG, однонаправленный дисперсионный анализ, $P < 0,0001$ при сравнении результатов, полученных в d-1 с результатами, полученными в дни d34/48); (фиг.4б: WT-мыши, антитела к Tau196-211 [pS202/pT205]-IgG, однонаправленный дисперсионный анализ, $P < 0,0001$ при сравнении результатов, полученных в d-1 с результатами, полученными в дни d34/48); (фиг.4в: ТКО-мыши, антитела к Tau206-221 [pT212/pS214]-IgG, однонаправленный дисперсионный анализ, $P < 0,0001$ при сравнении результатов, полученных в d-1 с результатами, полученными в дни d34/48); (фиг.4 г: ТКО-мыши, антитела к Tau196-211 [pS202/pT205]-IgG, однонаправленный дисперсионный анализ, $P < 0,0001$ при сравнении результатов, полученных в d-1 с результатами, полученными в дни d34/48).

Сыворотку из вакцинированных мышей дополнительно оценивали в отношении специфичности антител к Тау-пептидам с помощью ТАУPIR-иммуногистохимии и вестерн-блоттинга. Данные, полученные для всех липосомальных конструкций и для каждой мышинной модели, обобщены ниже в таблице 5.

Таблица 5: Обобщение данных о специфичности антител из сыворотки вакцинированных мышей				
Вакцина	Мыши	ELISA (количество позитивных/ общее количество мышей)	ТАУPIR (количество позитивных/ общее количество мышей)	Вестерн-блоттинг (количество позитив- ных/общее количество мышей)
ACI-33	WT	4/6	2/6	1/6
	КО	5/6	2/6	2/6
ACI-35	WT	5/6; 1i	5/6; 1i	5/6; 1i
	КО	6/6	3/6	6/6
ACI-36	WT	5/6	4/6	1/6
	ко	5/6; 1i	3/6; 1i	1/6; 1i
ACI-41	WT	6/6	4/6	4/6
	ко	6/6	1/6	3/6

5.2.2 Анализ изотипического ответа у иммунизированных мышей дикого типа линии C57BL/6 и Тау-/- КО (ГКО) ACI-33

Вакцина ACI-33 индуцировала у WT-мышей титры антител всех изотипов IgG2a, -2b и -3, а также IgM после трех i.p.-иммунизации (фиг 5а; WT-мыши). При этом практически отсутствовал IgG1 и обнаружено значимое различие между титрами IgG1 и IgG2b и -3 (фиг.5а; WT-мыши; однонаправленный дисперсионный анализ, $P < 0,05$ при сравнении IgG1 с IgG3, $P < 0,001$ при сравнении IgG1 с IgG2b).

Вакцина ACI-33 индуцировала у ТКО-мышей титры антител всех изотипов IgG2a, -2b и -3, а также IgM после трех i.p.-иммунизации (фиг.5б; ТКО-мыши). При этом практически отсутствовал IgG1 и обнаружено значимое различие между титрами антител этого подкласса и другими IgG-изотипами (фиг.5б, однонаправленный дисперсионный анализ, $P < 0,05$ при сравнении IgG1 с IgG2a/IgG3, $P < 0,001$ при сравнении IgG1 с IgG2b).

ACI-35

Вакцина ACI-35 индуцировала у WT-мышей титры антител всех IgG-изотипов, а также IgM после трех i.p.-иммунизации (фиг 6а; WT-мыши). Значимое различие обнаружено только для IgM-ответа, который являлся более высоким по сравнению с IgG3-ОТВЕТОМ (фиг.6а; WT-мыши, однонаправленный дисперсионный анализ, $P < 0,05$ при сравнении IgM с IgG3).

Вакцина АСІ-35 индуцировала у ТКО-мышей более высокие титры антител всех IgG-изотипов, а также IgM после трех i.p.-иммунизаций (фиг.6б; ТКО-мышь).

АСІ-36

Вакцина АСІ-36 индуцировала у WT-мышей титры антител всех IgG-изотипов, а также IgM после трех i.p.-иммунизаций (фиг.7а; WT-мышь).

Вакцина АСІ-36 индуцировала у ТКО-мышей титры антител всех IgG-изотипов а также IgM после трех i.p.-иммунизаций (фиг.7б; ТКО-мышь). Обнаружен статистически значимый более высокий уровень IgG2b по сравнению с IgG1 (фиг.7б; ТКО-мышь, однонаправленный дисперсионный анализ, $P < 0,05$ при сравнении IgG2b с IgG1).

АСІ-41

Вакцина АСІ-41 индуцировала у WT-мышей высокие титры антител к Tau196-211 [pS202/pT205] всех IgG-изотипов а также IgM после трех i.p.-иммунизаций (фиг.8а; WT-мышь).

Вакцина АСІ-41 индуцировала у ТКО-мышей высокие титры антител к Tau196-211 [pS202/pT205] всех IgG-изотипов а также IgM после трех i.p.-иммунизаций (фиг.8б; ТКО-мышь).

5.3. Заключение

Вакцина на основе тау-пептида индуцировала титры IgG в организме всех мышей. Обнаружен низкий гуморальный иммунный ответ в виде IgG1 по сравнению с IgG2b и IgG3 у мышей, иммунизированных АСІ-33. У мышей, вакцинированных всеми другими вакцинами на основе тау-пептидов, индуцировались сопоставимые титры антител всех IgG2a, -2b и 3-изотипов, а также IgM.

Антитела, образовавшиеся при вакцинации мышей вакциной на основе тау-пептида, специфически связывались с pТау-пептидами и слабо связывались с тау-пептидами. Образовавшиеся антитела также обладали способностью распознавать сплетения в головном мозге Тау-трансгенных мышей и распознавать pТау из головного мозга Тау-трансгенных мышей при анализе с помощью ВБ.

Пример 6: Создание и скрининг гибридом и антител

Целью настоящего исследования было создание и скрининг МАт (моноклональных антител) к тау-белку. Гибридомы создавали путем слияния селезенки мышей, иммунизированных тау-пептидом, с клеточной линией миеломы. Гибридомы оценивали в отношении реактивности как к фосфорилированному, так и нефосфорилированному полноразмерному тау-белку, а также как к фосфорилированным, так и нефосфорилированным антигенным тау-пептидам, применяемым в препарате вакцин. Скрининг гибридом в отношении реактивности супернатантов гибридом к тау-сплетениям осуществляли с помощью иммуногистохимии с использованием срезов головного мозга Тау-трансгенных мышей.

6.1. Методы

6.1.1 Слияние

Для создания гибридом использовали мышей дикого типа линии C57BL/6, вакцинированных АСІ-33 (Tau5-20 [pY18]) и АСІ-35. Мышей ревакцинировали вакциной АСІ-33 в день 0, затем вновь в день 4, и слияние осуществляли в день 7. 173×10^6 (АСІ-33) спленоцитов из иммунизированных мышей сливали с клетками миеломы линии SP2-O-Ag14, используя соотношение 5 спленоцитов/1 клетку миеломы.

Для создания гибридом использовали мышей дикого типа линии C57BL/6, вакцинированных АСІ-36 (Tau401-418 [pS404/S409]). Мышей ревакцинировали вакциной АСІ-36 в день 0, затем вновь в день 4, и слияние осуществляли в день 7. 84×10^6 спленоцитов из иммунизированных мышей сливали с клетками миеломы линии SP2-O-

Ag14, используя соотношение 5 спленоцитов/1 клетку миеломы.

Для создания гибридом использовали мышей дикого типа линии C57BL/6, вакцинированных ACI-41 (смесь Tau206-221 [pT212/pS214] и Tau196-211 [pS202/pT205]). Мышей ревакцинировали вакциной ACI-41 в день 0, затем вновь в день 4, и слияние осуществляли в день 8. 162х10 спленоцитов из иммунизированных мышей сливали с клетками миеломы линии SP2-O-Ag14, используя соотношение 5 спленоцитов/1 клетку миеломы.

Три слияния осуществляли в 8х96-луночных планшетах, и клоны обозначали согласно номеру планшета (1-8), затем ряда (A-G) и, наконец, колонки (1-12).

6.1.2 Метод скрининга для отбора клонов

Сначала 8 96-луночных планшетов подвергали дважды скринингу в отношении экспрессии IgG. Затем клоны, для которых обнаружена позитивная экспрессия, переносили в 24-луночные планшеты и клеточные супернатанты (=клоны) растущих клеток оценивали с помощью скрининга на основе Таи-ELISA и иммуногистохимического скрининга на основе ТАUPIR. Позитивные супернатанты по данным ELISA и/или ТАUPIR переносили в T25-колбы и клоны вновь подвергали скринингу в отношении экспрессии IgG, скринингу с помощью Тау-ELISA и ТАUPIR.

6.1.3 IgG-скрининг

ELISA-планшеты сенсibilizировали 50 мкл/лунку антимышиного антитела в виде IgG (фирма CER Groupe, Марлоие, Бельгия) в буфере для сенсibilизации в течение 16 ч при 4°C. После отмывки планшетов с использованием 3ФР/Твин вносили блокирующий раствор из расчета 100 мкл/лунку в течение 1 ч при КТ. 50 мкл неразведенного супернатанта гибридомы инкубировали в течение 1 ч при КТ. После стадии отмывки в планшеты вносили смесь конъюгированных с пероксидазой из хрена (HRP) антимышиных IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3 (фирма Ab Serotec, Роли, штат Северная Каролина, США) в течение 1 ч при КТ. После конечной отмывки осуществляли обнаружение с помощью ТМВ (3-3',5,5'-тетраметилбензидин), фосфатазного субстрата для HRP, и планшеты считывали при 405 нм, используя планшет-ридер для ELISA. Результаты выражали в виде величин ОП (оптическая плотность)

6.1.4 Скрининг гибридом с помощью Тау-ELISA

Скрининг гибридом с помощью ELISA осуществляли, используя рТау-пептид (ACI-33, T1.5: Tau5-20 [pY18]; ACI-36, T4.5: Tau401-418 [pS404/S409]; ACI-41, T8.5: Tau206-221 [pT212/pS214] и T9.5: Tau196-211 [pS202/pT205] PolyPeptide Laboratories, Хиллерод, Дания), соответствующий тау-пептид (ACI-33, T1.6: Tau5-20; ACI-36, T4.6: Tau401-4; ACI-41, T8.6: Tau206-221 и T9.6:

Таи 196-211, PolyPeptide Laboratories, Хиллерод, Дания), фосфорилированный полноразмерный (441 ак) тау-белок (рТау-белок, Vandebroek и др., 2005) и полноразмерный (441 ак) тау-белок (Таи-белок, фирма SignalChem, Ричмонд, Канада). И, наконец, в качестве отрицательного контроля применяли бычий сывороточный альбумин (БСА).

Планшеты сенсibilizировали 10 мкг/мл соответствующего тау-пептида и 1 мкг/мл соответствующего тау-белка в течение ночи при 4°C. После отмывки каждой лунки с помощью 3ФР-0,05% Твин 20 и блокады 1% БСА в 3ФР-0,05% Твин 20, в планшеты добавляли неразведенный супернатант гибридомы или среду в качестве отрицательного контроля и инкубировали при 37°C в течение 2 ч. После отмывки планшеты инкубировали с конъюгированным со щелочной фосфатазой (AP) полным антимышиным антителом в виде IgG (фирма Jackson Laboratories, Балтимор, шт. Пенсильвания, США) в течение 2 ч при 37°C. После отмывки планшеты

инкубировали с pNPP (пара-нитрофенилфосфат), фосфатазным субстратом для AP, и считывали при 405 нм, используя планшет-ридер для ELISA. Результаты выражали в виде величин ОП (оптическая плотность).

6.1.5 Иммуногистохимический (ИГХ) скрининг гибридом: связывание антител к тау-пептидам со сплетениями в срезах головного мозга трансгенных мышей (TAUPIR)

TAUPIR-эксперименты осуществляли согласно протоколу, описанному в примере 5.1.5.

6.1.6 IgG-скрининг супернатантов гибридом из T25-колб

Планшеты для ELISA сенсibilизировали 5 мкг/мл антимышиного антитела в виде IgG, специфического в отношении P(ab')₃-фрагмента (фирма Jackson Laboratories, Балтимор, шт. Пенсильвания, США) в карбонатном-бикарбонатном буфере для сенсibilизации, pH 9,6 (фирма Sigma, Бухс, Швейцария) в течение ночи при 4°C. После отмывки планшетов неразведенный супернатант гибридомы, применяемое в качестве положительного контроля антитела в виде IgG1 (6E10 в концентрации 1 мкг/мл: фирма Covance, Эмеривилль, шт. Калифорния, США) или отрицательный контроль (только культуральная среда) инкубировали в течение 1 ч при КТ. После стадии отмывки инкубировали на планшетах в течение 2 ч при 37°C используемый в качестве вторичного антитела конъюгированный с AP козий антимышиный IgG (подклассы 1+2a+2b+3)-Fc7-фрагмент специфический (фирма Jackson Laboratories, Балтимор, шт. Пенсильвания, США). После конечной отмывки осуществляли обнаружение, используя pNPP (пара-нитрофенилфосфат), фосфатазный субстрат для AP, и планшеты считывали при 405 нм, используя планшет-ридер для ELISA. Результаты выражали в виде ОП (оптическая плотность).

6.2. Результаты

АСИ-33-гибридомы

Клеточные супернатанты из 8×96-луночных планшетов, образовавшиеся после слияния, подвергали скринингу в отношении производства IgG. Установлено, что из 768 протестированных лунок (8×96 лунок) 277 лунок оказались позитивными касательно экспрессии IgG и их содержимое переносили в 24-луночные планшеты. В 24-луночных планшетах выращивали 79 клонов и супернатант этих клеток анализировали. Затем позитивные клоны переносили в T25-колбы и супернатанты подвергали скринингу в отношении производства IgG с помощью ELISA и TAUIR (таблица 6).

Таблица 6:				
Скрининг клонов из 24-луночных планшетов		Скрининг клонов из T25-» колб		
Позитивные согласно ELISA	Позитивные согласно TAUIR	Позитивные согласно IgG-скринингу	Позитивные согласно ELISA	Позитивные согласно TAUIR
1A7		1A7		
	1A11			
	1C11	1C11		
2C9		2C9		
3C5		3C3	3C3	
3C5		3C5		
3E8		3E8		
3G10	3G10	3G10	3G10	
6C10	6C10	6C10	6C10	6C10
6F3		6F3		
6F8		6F8		

Только один клон, а именно 6C10, оказался позитивным по результатам всех 3 скринингов и он был отобран для субклонирования.

АСИ-36-гибридомы

Клеточные супернатанты из 8×96-луночных планшетов, образовавшиеся после слияния, подвергали скринингу в отношении производства IgG. Установлено, что из 768 протестированных лунок (8×96 лунок) 333 лунки оказались позитивными касательно экспрессии IgG и их содержимое переносили в 24-луночные планшеты. В 24-луночных планшетах выращивали 75 клонов и супернатант этих клеток анализировали. Затем позитивные клоны переносили в T25-колбы и супернатанты подвергали скринингу в отношении производства IgG с помощью ELISA и TAUIR (таблица 7).

Таблица 7:				
Скрининг клонов из 24-луночных планшетов		Скрининг клонов из T25-колб		
Позитивные согласно ELISA	Позитивные согласно TAUIR	Позитивные согласно IgG-скринингу	Позитивные согласно ELISA	Позитивные согласно TAUIR
2B6	2B6	2B6	2B6	2B6
2F9	2F9	2F9	2F9	2F9
2G1		2G1	2G1	2G1
3A8	3A8	3A8	3A8	3A8
3B9		3B9	3B9	3B9

Скрининг клонов из 24-луночных планшетов		Скрининг клонов из T25-колб		
Позитивные согласно ELISA	Позитивные согласно TAUIR	Позитивные согласно IgG-скринингу	Позитивные согласно ELISA	Позитивные согласно TAUIR
3F11	3F11	3F11		3F11
	4A3			4A3
4C1		4C1	4C1	4C1
4C12		4C12	4C12	4C12
4E12		4E12	4E12	4E12
5E10		5E10	5E10	
5F5		5F5	5F5	
7D6	7D6	7D6	7D6	7D6
6H1		6H1	6H1	6H1

С целью отбора клонов для следующих стадий распределяли по рангу все супернатанты, положительные согласно IgG/ELISA/TAUIR-скринингам, на основе результатов, полученных с помощью ELISA- и TAUIR-анализа. Распределение по рангу результатов, полученных с помощью ELISA и TAUIR, осуществляли согласно процедуре, описанной в разделе «Методы» TAUIR-окрашивание оказалось практически идентичным для пяти первых клонов и соответствовало результатам, полученным с помощью ELISA. Клон 4C12 отбрасывали, поскольку он был обнаружен в том же планшете, что и клон 4C1, что повышало вероятность того, что эти два клона были одинаковыми (распознавали один и тот же эпипот). Отбирали 4 наиболее активных клон, а именно, 3A8, B6, 4C1 и 6H1. Другие 6 клонов (4C12, 2G1, 2F9, 7D6, 3B9, 4E12) поддерживали для возможного повторного применения.

Распределение по рангу 10 клонов, оказавшихся позитивными по результатам ELISA-скрининга и TAUIR-скрининга, осуществляли для отбора наиболее активных клонов (таблица 8). Серым цветом обозначены 5 наиболее активных клонов.

Таблица 8:	
Распределение по рангу клонов, позитивных по результатам ELISA- и TAUIR-анализа	
Ранжирование по результатам ELISA-анализа	Ранжирование по результатам TAUIR-анализа
3A8	6H1
2B6	4C1
4C1	3A8
6H1	4C12
4C12	2B6

2G1	2F9
2F9	3B9
7D6	2G1
3B9	7D6
4E12	4E12

АСI-41-гибридомы

Клеточные супернатанты из 8×96-луночных планшетов, образовавшиеся после слияния, подвергали скринингу в отношении производства IgG. Установлено, что из 768 протестированных лунок (8×96 лунок) 215 лунок оказались позитивными касательно экспрессии IgG и их содержимое переносили в 24-луночные планшеты. В 24-луночных планшетах выращивали 81 клон и супернатант этих клеток анализировали. Затем позитивные клоны переносили в T25-колбы и супернатанты подвергали скринингу в отношении производства IgG, с помощью ELISA- и TAUIR-анализа (таблица 9).

Таблица 9:				
Скрининг клонов из 24-луночных планшетов		Скрининг клонов из T25-колб		
Позитивные согласно ELISA	Позитивные согласно TAUIR	Позитивные согласно IgG-скринингу	Позитивные согласно ELISA	Позитивные согласно TAUIR
	3D11	3D11		3D11
4H6		4H6		4H6
5D10	5D10	5D10	5D10	5D10
5E6	5E6			
5F10		5F10		
6B7		6B7	6B7	
7C2	7C2	7C2	7C2	7C2
	8G8			8G8
	8H8	8H8		8H8

Только клоны 5D10 и 7C2 оказались позитивным по результатам всех 3 скринингов и их отбирали для субклонирования. Клон 5D10 связывался только с пептидом T8.5, а клон 7C2 связывался с двумя пептидами из вакцины ACI-41 (T8.5 и T9.5) (фиг.10).

Субклон 5D10A4, полученный из 5D10, оказался специфическим для pTau-пептида.

6.3. Заключение

Установлено, что созданные антитела обладали высокой специфичностью в отношении pTau-пептидов, но отличалась лишь невысокой способностью к связыванию с нефосфорилированными пептидами.

На основе результатов, полученных при осуществлении трех слияний (ACI-33, ACI-36 и ACI-41), в общей сложности 7 клонов депонировали в DSMZ (таблица 10) и отбирали для последующего субклонирования.

Таблица 10:				
Перечень депонированных гибридом				
Антиген	Вакцина	Название гибридомы	Регистрационный номер	Дата депонирования
T8: Tau206-221 [pT212/pS214] + T9: Tau196-211 [pS202/pT205]	ACI-41	ACI-41-Ab1	DSM ACC3043	3 марта 2010 г.
T4: Tau401-418 [pS404, pS409]	ACI-36	2B6	DSM ACC3044	10 марта 2010 г.
T4: Tau401-418 [pS404, pS409]	ACI-36	3A8	DSM ACC3045	10 марта 2010 г.
T4: Tau401-418 [pS404, pS409]	ACI-36	4C1	DSM ACC3046	10 марта 2010 г.
T8: Tau206-221 [pT212/pS214] + T9: Tau196-211 [pS202/pT205]	ACI-41	5D10A3	DSM ACC3047	10 марта 2010 г.
T1: Tau5-20 [pY18]	ACI-33	6C10	DSM ACC3048	10 марта 2010 г.
T4: Tau401-418 [pS404, pS409]	ACI-36	6H1	DSM ACC3049	10 марта 2010 г.

Антиген	Вакцина	Название гибридо- мы	Регистрационный номер	Дата депонирования
T8: Tau206-221 [pT212/pS214] + T9: Tau196-211 [pS202/pT205]	ACI-41	7C2	DSM ACC3050	10 марта 2010 г.

Пример 7: Специфическое окрашивание срезов головного мозга страдавшего АР человека двумя антителами (ACI-41-Ab1 и 5D10), полученными из мышей, вакцинированных ACI-41

Целью настоящего исследования было изучение результатов окрашивания нейрофибриллярных сплетений (NFT) в головном мозге страдавшего болезнью Альцгеймера (AD) человека, с помощью антитела ACI-41-Ab1 (9H3-субклон T89-F4) и 5D10, полученных из двух различных слияний спленоцитов мышей, иммунизированных вакциной ACI-41. Для этой цели применяли анализ иммунореактивного окрашивания фосфорилированного тау-белка (TAUPIR) срезов головного мозга человека, страдавшего AD.

7.1. Методы

7.1.1 Создание антитела ЗРЮ

Антитело 5D10 создавали согласно методу, описанному в примере 9.

7.1.2 Создание антитела ACI-41-Ab1

7.1.2.1 Слияние

Мышей дикого типа линии C57BL/6, вакцинированных ACI-41 (вакцина ACI-41 содержит смесь двух фосфорилированных тау-пептидов, Tau206-221 [pT212/pS214] и Таи 196-211 [pS202/pT205]), использовали для получения гибридомы. Мышей ревакцинировали пептидами, входящими в ACI-41, за 5 дней до слияния. 58×10 спленоцитов из иммунизированной мыши сливали с клетками миеломы линии SP2/0-O-Ag 14, используя соотношение 5 спленоцитов/1 клетку миеломы. В результате слияния получали 10×96-луночных планшетов, которые затем подвергали скринингу для выявления представляющих интерес клонов.

7.1.2.2 ELISA-скрининг гибридом

Скрининг гибридом с помощью ELISA осуществляли, используя планшеты, сенсibilизированные T8: Tau206-221 [pT212/pS214], T9: Tau196-211 [pS202/pT205] или гиперфосфорилированным (hP)-тау-пептидом (hP-Tau) (см. описание в разделе, в котором представлен метод вестерн-блоттинга).

Планшеты сенсibilизировали 2 мкг/мл hP-Tau в течение ночи при комнатной температуре (КТ). После отмывки каждой лунки 3ФР и блокады 2% FCS в 3ФР супернатант гибридомы вносили в планшеты и инкубировали в течение 1 ч при КТ. После стадии отмывки планшеты инкубировали с конъюгированным с пероксидазой полным козым антимышиным AffiniPure Ig (выявление IgG+IgM, фирма Dako Глоструп, Дания) в 3ФР, 1% FCS в течение 1 ч при КТ. Планшеты проявляли с помощью TMB (3,3',5,5'-тетраметилбензидин).

Реакцию прекращали, добавляя 2н. H₂SO₄ и считывали при 450 нм, используя планшет-ридер для ELISA. Результаты выражали в виде оптической плотности (ОП) для каждого клона гибридомы.

При применении пептидов (негиперфосфорилированных) планшеты сенсibilизировали 10 мкг/мл пептида Tau206-221 [pT212/pS214] или Tau196-211 [pS202/pT205] в течение ночи при 4°C. После отмывки 3ФР и блокады 2% NHS в 3ФР супернатант гибридомы вносили в планшеты и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре (КТ). После стадии отмывки планшеты инкубировали с биотинилированным антимышиным IgG (фирмы Vector labs) в 3ФР, 1% NHS в течение

1 ч при КТ. Осуществляли дополнительную стадию для конъюгированных с биотином антител и планшеты инкубировали в течение 30 мин, используя комплекс стрептавидин-HRP (ABC-набор, фирма Vector labs) перед обнаружением. После стадии отмывки планшеты проявляли с помощью ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин). Реакцию

5 прекращали, добавляя 2н. H_2SO_4 и считывали при 450 нм, используя планшет-ридер для ELISA. Результаты выражали в виде оптической плотности (ОП) для каждого клона гибридомы.

7.1.2.3 ИГХ-скрининг гибридом: связывание антител к тау-пептидам со сплетениями в срезах головного мозга трансгенных мышей (TAUIR-анализ)

10 Связывание со сплетениями антител, продуцируемых клетками гибридомы, осуществляли с помощью иммуногистохимического анализа (ИГХ) на срезах головного мозга Тау-трансгенных мышей.

Изучали срезы головного мозга старых (возрастом >20 месяцев) дважды трансгенных мышей линии biGT (трансгенные мыши линии GSK-3, скрещенные с мышами линии

15 TPLH (мышы, экспрессирующие наиболее длинную изоформу человеческого тау-белка (441 ак) с мутацией P301L) и мышей с «выключенным» геном Тау (ТКО) в качестве отрицательного контроля.

TAUIR-окрашивание осуществляли согласно протоколу, описанному в примере 5.1.5.

20 7.1.2.4 Скрининг гибридом методом вестерн-блоттинга (ВБ)

Связывание антител, продуцируемых клетками гибридом, с рТау в экстрактах головного мозга трансгенных животных и/или с экстрактом, содержащим hP-Тау, осуществляли с помощью ВБ.

Для гомогенизации головного мозга мышей дикого типа FVB, мышей линий TPLH, biGT и с «выключенным» геном Тау (ТКО) использовали следующий буфер: 25 мМ

25 Трис/HCl pH 7,6, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТКА, 1 мМ ЭГТК, 30мМ NaF, 0,2 мМ Na_3VO_4 , 1нМ оадаевая кислота, 1 мМ

фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ), 5 мМ $Na_4P_2O_7$, 1 таблетка полного коктейля ингибиторов протеаз (CPIC) на общий объем 12 мл. Для получения гомогената всего

30 головного мозга головной мозг гомогенизировали на льду в 1 объеме/массу полушария (мл/г) с помощью приводимого в действие мотором устройства типа гомогенизатора Поттера (стеклянная пробирка/тефлоновой пестик) при 700 об/мин.

Для получения экстракта, содержащего hP-Тау, головной мозг мышей линий TPLH и ТКО гомогенизировали, используя следующий буфер: 100 мМ MES pH 6,8, 1 мМ β -меркаптоэтанол, 5 мМ ЭДТК, 2,5 мМ ФМСФ, 5 мкг/мл хлорметилкетона тозил-L-лизина (TLCK), 100мМ NaF, 1нМ оадаевая кислота, 0,2 мМ Na_3VO_4 и 1 таблетка

35 полного коктейля ингибиторов протеаз (CPIC) на общий объем 12 мл. Головной мозг гомогенизировали на льду в 6 объемах/массу полушария (мл/г) с помощью приводимого в действие мотором устройства типа гомогенизатора Поттера (стеклянная пробирка /

40 тефлоновой пестик) при 700 об/мин. Гомогенат центрифугировали при 20000xg в течение 30 мин при 4°C и супернатант переносили и быстро нагревали до 95°C, выдерживали при этой температуре в течение 10 мин, затем охлаждали на тающем льду. Осуществляли стадию центрифугирования, затем супернатант разделяли на аликвоты и хранили при

45 -20°C в виде фракции, обозначенной «hP-Тау».

Гомогенат всего головного мозга разводили в соотношении 1:1 буфером для образца (125 мМ Трис/HCl, pH 6,8, 4% (мас./об.) додецилсульфат натрия (ДСН), 20% глицерина, 0,01% бромфенолового синего)+5% бета-меркаптоэтанол, затем быстро нагревали до

95°C. Образцы выдерживали 5 мин, разводили $1/4$ в буфере для образца, вновь нагревали до 95°C, затем охлаждали и центрифугировали при 14000 об/мин в течение 5 мин до получения прозрачного дебриса, который не солюбилизировали. Супернатанты собирали и вносили на гель для осуществления ДСН-ПААГ. Перенос на нитроцеллюлозную мембрану (Hybond-ECL) осуществляли в буфере для переноса (25 mM Трис pH 8,6, 190 mM глицин, 20% метанола). Мембрану переносили в блокирующий раствор (0,1% Твин в TBS (50 mM Трис/HCl, pH 7,6, 150 mM NaCl)+5% сухого молока) перед инкубацией в течение ночи при 4°C с неразведенным супернатантом гибридомы. Инкубацию с вторичным конъюгированным с HRP козым антимышиным антителом (фирма Dako, Глоструп, Дания), разведенным в соотношении 1/10000 в блокирующем растворе, осуществляли при КТ в течение 1 ч. Для обнаружения использовали применяемые для вестерн-блоттинга ECL-реагенты фирмы GE Healthcare.

7.1.3 Связывание антител к фосфорилированным тау-пептидам с тау-сплетениями в головном мозге страдавшего АР человека

Клоны антител к фосфорилированному тау-пептиду ACI-41-Ab1 (субклон 9H3 T89-F4) (мышиний IgM-изотип) и 5D10 (мышиний IgG-изотип) создавали путем двух различных слияний с использованием спленоцитов вакцинированных ACI-41 мышей. Вакцина ACI-41 содержит смесь двух фосфорилированных тау-пептидов, Tau206-221 [pT212/pS214] и Tau196-211 [pS202/pT205]. Анализ связывания клона антитела T89-F4 со сплетениями в срезах головного мозга, полученных из головного мозга страдающего АР человека, проводили с помощью ТАУPIR- иммуногистохимии. Применяли срезы коры головного мозга индивидуумов, страдающих АР, прогрессирующим супрануклеарным параличом (PSP), и здоровых людей в качестве контролей. Срезы головного мозга отмывали в течение 5 мин в 3ФР, затем инкубировали в течение 15 мин при КТ в 1,5% H_2O_2 в смеси 3ФР:MeOH (1:1) для блокады эндогенной пероксидазы. После трехкратной отмывки срезов в 3ФРТ (3ФР/0,1% Тритон X100) их инкубировали в течение 30 мин при КТ в блокирующем растворе, включающем 3ФР+10% FCS (фетальная телячья сыворотка). Инкубацию с первичными антителами (клон 9H3 T89-F4, 5D10 и AT100 в качестве положительного контроля) осуществляли в течение ночи при 4°C. Срезы отмывали трижды в 3ФРТ перед инкубацией с конъюгированным HRP козым антимышиным вторичным антителом (фирмы Dako, Глоструп, Дания) в 3ФРТ/10% FCS в течение 1 ч при КТ. Перед обнаружением срезы отмывали трижды в 3ФРТ и инкубировали в 50 mM Трис/HCl pH 7,6 в течение 5 мин. Обнаружение осуществляли путем инкубации срезов в течение 3 мин в диаминобензидине (DAB: 1 таблетка в 10 мл 50 mM Трис/HCl+3 мкл 30% H_2O_2) (фирма MP Biomedicals, Солон, шт.Огайо, США).

Реакцию прекращали путем трехкратной отмывки срезов в 3ФРТ. Затем срезы переносили на пластины из силанизированного стекла и сушили на воздухе на теплой пластине при 50°C в течение 2 ч. Контрастное окрашивание осуществляли путем инкубации с гематоксилином Майера (фирма Fluka Chemie, Бухс, Швейцария) в течение 1 мин с последующей стадией отмывки в течение 4 мин в проточной водопроводной воде. У срезов удаляли парафин, помещая их дважды на 5 мин в ксилол и дважды на 1 мин в 100% EtOH, затем отмывали каждый раз в течение 1 мин в 90%, 70%, 50% EtOH и дистиллированной воде. Для обнаружения антигена срезы кипятили в течение 10 мин в 0,01M растворе лимонной кислоты (pH 6,0) и охлаждали в течение 20 мин. И, наконец, срезы заключали в DePeX (фирма BDH Chemicals Ltd., Пул, Великобритания), закрывая стеклянными покровными стеклами. Окрашенные срезы исследовали микроскопически с использованием оптики с эпифлуоресцентным освещением и 3CCD-камеры (фирма

Leica, Ветцлар, Германия). Получали изображения и анализировали их с помощью выделенной программы (IM500, фирма Leica).

7.2. Результаты

7.2.1 Скрининг гибридом

5 Скрининг с помощью ELISA осуществляли согласно процедуре, описанной в разделе «Методы», отбирали 172 клон гибридом и переносили в 12-луночные планшеты. Затем осуществляли ELISA для оценки специфичности антител к рТau-пептидам Tau206-221 [pT212/pS214], Tau196-211 [pS202/pT205] и/или содержащему hP-Tau экстракту. Это позволяло получить 25 позитивных в отношении рТau-пептидов клонов и 21 клон, обладающий специфичностью в отношении hP-Tau (фиг.11).

15 Иммуногистохимические исследования проводили параллельно с ELISA-анализом. Обнаружены различные схемы окрашивания в клонах, перенесенных в 12-луночные планшеты. Неспецифическое глиальное, ядерное и цитоплазматическое окрашивание обнаружено в некоторых срезах головного мозга мышей линии biGT, инкубированных с неразведенным супернатантом отобранных клонов.

Супернатант клона 9H3 (ACI-41-Ab11) окрашивал с высокой специфичностью структуры цитоплазматических сплетений.

20 ВБ-скрининг в отношении головного мозга и содержащих hP-Tau экстрактов из различных линий мышей осуществляли, используя неразведенный супернатант отобранных гибридом. Не было обнаружено никакой реакции с тау-пептидами ни в одном из протестированных супернатантов гибридом.

7.2.2 Окрашивание нейрофибриллярных сплетений в срезах головного мозга страдавшего болезнью Альцгеймера человека

25 Способность клонов антител ACI-41-Ab1 (субклон 9H3 T89-F4) и 5D10 связываться с NFT в головном мозге страдавшего AD человека оценивали с помощью ТАUPIR-иммуногистохимии. Было установлено, что клон антитела к фосфорилированному тау-пептиду T89-F4 связывался с содержащими фосфорилированные тау-пептиды NFT в головном мозге страдавшего AD человека (фиг.12).

30 Способность антитела 5D10 связываться с NFT в срезах коры головного мозга страдающего AD человека оценивали с помощью ТАUPIR-иммуногистохимии. Было установлено, что клон антитела к фосфорилированному тау-пептиду 5D10 связывался с содержащими фосфорилированные тау-пептиды NFT и нитями нейропиля в срезах коры головного мозга страдавшего AD человека (фиг.13.).

7.3. Заключение

35 Скрининг созданных путем вакцинации ACI-41 клонов гибридом с помощью ELISA позволил обнаружить 36 клонов, которые связывались с фосфорилированными пептидами и/или экстрактами полноразмерного hP-Tau. Скрининг с помощью ТАUPIR этих 36 клонов подтвердил окрашивание структур цитоплазматических сплетений одним из клонов (9H3), а именно, ACI-41-Ab1.

40 Для двух антител ACI-41-Ab1 (9H3-F4) и 5D10 продемонстрировано специфическое связывание с NFT и нитями нейропиля в срезах головного мозга страдающего AD человека.

45 Пример 8: Эффективность вакцины ACI-35, полученной с помощью двух различных процессов, в отношении индукции рТau-специфического IgG-ответа после i.p.- или s.c.-иммунизации мышей дикого типа (C57BL/6)

Целью настоящего исследования была оценка эффективности вакцины ACI-35 (Tau393-408 [pS396/pS404]), полученной с помощью двух различных процессов, процесса А для получения ACI (процесс А ACI) или процесса L3 для получения ACI (процесс L3 ACI),

в отношении индукции титров антител после подкожной (s.c.) или внутривенной (i.p.) инъекции мышам дикого типа линии C57BL/6. Мышей иммунизировали трижды с 2-недельными интервалами и отбирали образцы крови за 1 неделю до первой инъекции и затем через 1 неделю после каждой иммунизации. Общие анти-рТау (Tau393-408 [pS396/pS404]) IgG-ответы оценивали с помощью ELISA. Кроме того профиль изотипов в гуморальной иммунном ответе анализировали после 3 иммунизации для оценки распределения различных подклассов IgG, а также IgM. Анализировали титры антител к соответствующим не-рТау (Tau393-408)-пептидам. Т-клеточные ответы, индуцированные ACI-35, оценивали с помощью ELISPOT-метода.

8.1. Методы

8.1.1 Получение вакцины ACI-35 с помощью процесса А ACI

Вакцины ACI-35 получали согласно протоколу, описанному в примере 3. Затем липосомальную суспензию (партия ACI-35-081103-B) разделяли на аликвоты и хранили при 2-8°C. Конечное соотношение пептид / фосфолипид составляло 1:100.

8.1.2 Получение вакцины ACI-35 с помощью процесса L3 ACI

Выведенный из тау-белка тетрапальмитоилированный фосфо-пептид Tau393-408 [pS396/pS404] (человеческий тау-пептид 393-408 с фосфогруппой на S396 и S404) (4,0 мг) вносили в 25-миллилитровый стеклянный флакон в который добавляли гексафторизопропанол (ГФИП) (5 мл). Это прозрачный раствор затем добавляли при перемешивании к раствору димиристоилфосфатидилхолина (DMPC), димиристоилфосфатидилглицерина (DMPG), холестерина и адъюванта, представляющего собой монофосфорильный липид А (MPLA) (все препараты получали от фирмы Avanti Polar Lipids Inc. шт.Алабама, США) в хлороформе (35 мл) (молярное соотношение 9:1:7:0,2 соответственно). Затем образовавшийся раствор фильтровали через гидрофобную фильтрующую мембрану из политетрафторэтилена (PTFE) с размером пор 0,2 мкм в 250-миллилитровую круглодонную стеклянную колбу. Затем органический растворитель удаляли выпариванием при пониженном давлении при 40°C, а затем в глубоком вакууме в течение 3 ч. Образовавшуюся тонкую пленку регидратировали путем добавления ЗФР (40 мл) и осторожно перемешивали при КТ в течение 18 ч. Затем суспензию липосом (партия ACI-35-081103-A) разделяли на аликвоты и хранили при 2-8°C. Конечное соотношение пептид/фосфолипид составляло 1:100.

8.1.3 Иммунизации

13-недельным мышам линии C57BL/6 (по 10 мышей на группу) вводили путем s.c.- или i.p.-инъекций вакцину трижды с 2-недельными интервалами между введения (дни (d) 0, d14, d28) согласно таблице 11. За 1 неделю до (d-7) первой иммунизации, затем через 7 после инъекций (т.е. в дни d7, d21, d35) и в момент умерщвления (d56) собирали образцы крови и получали плазму. Титры Tau393-408 [pS396/pS404]-специфических антител в виде IgG и IgM и профиль подклассов IgG-изотипов определяли с помощью ELISA. Используемые в качестве контроля титры не-р Тау393-408-специфического антитела в виде IgG определяли с помощью ELISA.

Таблица 11:

Иммунизация мышей							
Группа	Количество и пол животных	Обработка /объем ^а	Партия вакцины	Процесс	Путь введения ^б	Уровень дозы, количество пептида мкг/дозу ^в	Количество MPLA мкг/дозу ^в
1	10 самок	ACI-35 0,2 мл	ACI-35-081103-A	L3 ACI	i.p	10	16
2	10 самок	ACI-35 0,2 мл	ACI-35-081103-A	L3 ACI	s.c	10	16

3	10 самок	AC1-35 0,2 мл	AC1-35-081103-B	A ACI	i.p	13	19
4	10 самок	AC1-35 0,2 мл	AC1-35-081103-B	A ACI	s.c	13	19
^a : теоретический объем ^б : s.c.: подкожно ^в : количество, измеренное после анализа							

8.1.4 Количественная оценка специфических для тау-пептидов антител

Специфические для Tau393-408 [pS396/pS404] антитела в виде IgG определяли с помощью ELISA в 5 образцах плазмы, полученных после отбора крови. Специфические для Tau393-408 антитела в виде IgG, специфические для Tau393-408 [pS396/pS404] антитела изотипов IgM и IgG определяли с помощью ELISA в образцах плазмы, полученных после отбора крови в d35. Планшеты сенсibilizировали 10 мкг/мл соответствующего тау-пептида в течение ночи при 4°C. После отмывки каждой лунки 3ФР-0,05% Твин 20 и блокады с помощью 1% БСА в 3ФР-0,05% Твин 20 серийные разведения плазмы вносили в планшеты и инкубировали при 37°C в течение 2 ч. После отмывки планшеты инкубировали с конъюгированным с щелочной фосфатазой (AP) антимышиным антителом в виде IgG (фирма Jackson Laboratories, Балтимор, шт. Пенсильвания, США) или изотипспецифическими антителами (конъюгированный с пероксидазой из хрена (HRP) антимышиный IgM, конъюгированный с AP антимышиный IgG1, конъюгированные с биотином антимышинные IgG2a и IgG3, которые получали от фирмы Pharmingen BD, Сан-Диего, шт. Калифорния, США, и конъюгированный с HRP антимышиный IgG2b фирмы Zymed Laboratories, Сан-Франциско, шт. Калифорния) в течение 2 ч при 37°C. После отмывки планшеты инкубировали с pNPP (пара-нитрофенилфосфат), представляющим собой фосфатазный субстрат для AP, или ABTS (2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновая кислота)), представляющей собой субстрат для HRP, и считывали при 405 нм с помощью планшет-ридера для ELISA. Дополнительную стадию осуществляли для конъюгированных с биотином антител, при этом планшеты инкубировали в течение 45 мин с комплексом стрептавидин-HRP (фирма R&D Systems, Миннеаполис, шт. Миннесота, США) перед выявлением с помощью ABTS. Результаты выражали в виде ОП (оптическая плотность) для первого разведения и ненасыщающего разведения в случае изотипа IgG и ОП для ненасыщающего разведения в случае изотипов IgG и IgM.

8.1.5 Количественная оценка специфического для тау-пептидов производства цитокинов Т-клетками с помощью ELISPOT

Производство цитокинов Tau393-408 [pS396/pS404]- и Tau393-408-специфическими Т-клетками оценивали с помощью ELISPOT. Предназначенные для мультискрининга 96-луночные нитроцеллюлозные планшеты (фирма Millipore, Молшем, Франция) сенсibilizировали в течение ночи моноклональными антителами к мышиным IFN-γ и IL-4 согласно инструкциям производителя (фирма Pharmingen BD, Сан-Диего, шт. Калифорния, США). Суспензии отдельных клеток получали из селезенки иммунизированных мышей и инкубировали с серийными разведениями Tau393-408 [pS396/pS404] и Tau393-408 (10 и 1 мкг/мл) и конкавалином А (5 мкг/мл, фирма Amersham) при 37°C в 5% CO₂ в течение 72 ч. Затем планшеты отмывали и инкубировали в течение 1 ч при 37°C с биотинилированными моноклональными антителами к мышиным IFN-γ и IL-4. После отмывки планшеты инкубировали в течение 1 ч при 37°C с конъюгатом стрептавидин-HRP и после отмывки пятна проявляли, добавляя субстрат (АЕС, 3-амино-9-этилкарбазол). Количество пятен на лунку подсчитывали визуализацией с помощью стереомикроскопа и результат выражали в виде количества пятен на 10 клеток. В

качестве отрицательных контролей использовали селезенку необработанных мышей.

8.1.6 Нерадиоактивный анализ клеточной пролиферации

Суспензии отдельных клеток получали из селезенки иммунизированных мышей и инкубировали с серийными разведениями Tau393-408 [pS396/pS404] и Tau393-408 (10 и 1 мкг/мл) и конкавалином А (5 мкг/мл, фирма Amersham) при 37°C в 5% CO₂ в течение 72 ч. Для количественной оценки пролиферации использовали набор для нерадиоактивного анализа пролиферации клеток (MTT) (фирма Promega, Дюбендорф, Швейцария) согласно инструкциям производителя. В целом, метод состоял в следующем: 15 мкл раствора красителя добавляли в каждую лунку и планшеты инкубировали в течение 4 ч при 37°C. Затем добавляли из расчета 100 мкл растворов для солиubilизации /прекращения реакции и планшеты инкубировали при 4°C еще в течение минимум 1 ч. ОП измеряли при длинах волн 570 нм и 690 нм.

8.2. Результаты

8.2.1 Оценка гуморального иммунного ответа, индуцированного различными вакцинами

Вакцина ACI-35 индуцировали сильный анти-рTau393-408 [pS396/pS404] IgG-ответ после i.p.- или s.c.-инъекции вне зависимости от используемого процесса получения вакцины. В целом, высокие титры антител присутствовали уже через 7 дней первой иммунизацией вакциной. При использовании одного и того же процесса более высокий ответ обнаружен при применении s.c.-инъекции по сравнению с i.p.-инъекцией в d21 и d35 у животных, вакцинированных полученной согласно процессу L3 ACI вакциной (фиг.14, двунаправленный дисперсионный анализ, P<0,001 d21/d35) и в d21, d35 и d56 у животных, которым инъецировали вакцину, полученную согласно процессу А ACI (фиг.14, двунаправленный дисперсионный анализ, P<0,001 d21/d35, P<0,01 d56). Для животных, которых вакцинировали с помощью i.p.-инъекций, ответ оказался более высоким при использовании полученной согласно процессу L3 ACI вакцины по сравнению с полученной согласно процессу А ACI вакциной во взятых сразу после иммунизации образцах крови (d7 и d21) (фиг.14, двунаправленный дисперсионный анализ, P<0,001 d7/d21), в то время как не обнаружено различий для животных, которых обрабатывали путем s.c.-инъекций. В целом, вакцины, полученные с помощью рассматриваемых двух процессов, по-видимому, являются эквивалентными, если применяют s.c.-инъекцию.

Анализ результатов ОП при ненасыщающем разведении подтвердил различие между i.p.- и s.c.-инъекциями при применении полученной с помощью различных процессов вакцины ACI-35. В целом, результаты оставались прежними, демонстрируя, что s.c.-инъекция приводила к получению более высоких титров Ат, чем i.p.-инъекция, и что в случае s.c.-инъекций не обнаружены существенные различия между двумя процессами получения вакцины.

Для определения изотипов индуцированных вакциной антител плазму, полученную в d35, анализировали с помощью специфического для изотипа IgG ELISA. ACI-35 индуцировала все группы антител к рTau393-408 [pS396/pS404]-IgG, т.е. изотипы IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3. IgG2b являлся доминантным изотипом, что характеризовалось более высокими величинами ОП даже при разведении 1/3200. Для подкласса IgG1 обнаружен более высокий ответ при s.c.-инъекции по сравнению с i.p.-инъекцией при использовании вакцин, полученных с помощью обоих процессов (фиг.15, однонаправленный дисперсионный анализ, P<0,05). Такие же различия обнаружены для подкласса IgG3. Для подклассов IgG2a и -2b не обнаружено различий ни между тестируемыми вакцинами, полученными с помощью двух процессов, ни при

использовании i.p.- или s.c.-инъекции вакцины.

Не обнаружено различия между двумя изученными процессами получения вакцин касательно гуморальных иммунных ответов в виде анти-pTau393-408 [pS396/pS404]-IgM, хотя выявлены существенно более высокие титры IgM при применении i.p.-инъекции по сравнению с s.c.-инъекцией (фиг.16а, однонаправленный дисперсионный анализ, $P < 0,001$).

Во всех группах анализировали также титры антител к нефосфорилированному Tau393-408. Специфические для Tau393-408 антитела в виде IgG выявлены во всех группах, но указанные титры оказались ниже, чем титры антител к pTau393-408 [pS396/pS404]. Не обнаружено различия в титрах антител к Tau393-408 в виде IgG при применении полученных двумя процессами вакцин или в зависимости от пути введения (фиг.16б, однонаправленный дисперсионный анализ, $P > 0,05$).

Данные о средних значениях первых трех титров IgG к различным тау-пептидам представлены в таблице 12.

Таблица 12: Средние значения первых трех титров антител к Tau393-408 [pS396/pS404] в виде IgG (ОП при разведении 1/100)						
Вакцина на основе pTau-пептида	Процесс получения вакцины	Путь введения	d7	d21	d35	Среднее значение
Tau393-408 [pS396/pS404]	L3 ACI	i.p.	1,899	2,284	1,825	2,003
		S.C.	1,485	2,956	2,444	2,295
	A ACI	i.p.	0,902	1,467	1,708	1,359
		S.C.	1,276	2,964	2,426	2,222

8.2.2 Оценка Т-клеточного ответа, индуцированного ACI-35 Повторная стимуляция in vitro спленоцитов ConA, pTau393-408 [pS396/pS404]- или Tau393-408-пептидами не приводила к различиям в пролиферации между тестируемыми группами (фиг.17), но она оказалась положительной в случае ConA.

Повторная стимуляция с использованием Tau393-408 [pS396/pS404] в дозе 10 мкг/мл индуцировала секрецию цитокинов, которая оказалась выше в спленоцитах из вакцинированных мышей по сравнению с необработанными мышами (фиг.18). Инъекция s.c. полученной согласно процессу L3 ACI вакцины индуцировала более высокий уровень обоих анализируемых цитокинов, при этом отсутствовало заметное различие между уровнями IFN- γ и IL-4. Инъекция i.p. или s.c. полученной согласно процессу A ACI вакцины индуцировала секрецию цитокинов, главным образом IL-4, и уровни оказались более высоким при использовании i.p.-инъекции. Повторная стимуляция Tau393-408 [pS396/pS404] в дозе 1 мкг/мл индуцировала секрецию цитокинов, сопоставимую с повторной стимуляцией с использованием Tau393-408 [pS396/pS404] в дозе 10 мкг/мл.

При повторной стимуляции с использованием не-Tau393-408-пептида получены результаты, сопоставимые с полученными при использовании соответствующего pTau-пептида (фиг.18). И в этом случае вакцина, полученная согласно процессу A ACI, индуцировал секрецию цитокинов, среди которых преобладал IL-4.

8.3. Заключение

Вакцина ACI-35 индуцировала высокие титры IgG уже после первой иммунизации вне зависимости от процесса ее получения и изученного пути введения. При сравнении оказалось, что s.c.-инъекция вакцин вне зависимости от применяемого процесса их получения приводила к возникновению более высоких титров антител в виде IgG. I.p.-инъекция ACI-35, полученной согласно процессу A ACI, индуцировал более низкие титры IgG1 и IgG3 по сравнению с другой группой. I.p.-инъекция ACI-35 индуцировала существенно более высокие титры IgM, чем s.c.-инъекция. И, наконец, во всех группах обнаружены титры IgG к не-pTau393-408-пептиду.

Повторная стимуляция с использованием рТау- или тау-пептидов индуцировала производство цитокинов по данным ELISPOT-анализа, которые главным образом представляли собой IL-4 в организме мышей, вакцинированных вакциной, которую получали согласно процессу А АСІ.

Пример 9: Иммуногенность содержащей тау-пептид вакцины для Таи Р30ІL-ТраНСreННbіx мышей (TPLH)

Целью настоящего исследования являлся анализ иммуногенности анти-тау-вакцинации с использованием подкожной (s.c.) инъекции содержащих тау-пептиды липосомальных вакцин (АСІ-33, АСІ-35, АСІ-39 и АСІ-40) для Таи Р301b-трансгенных мышей.

9.1. Методы

9.1.1 Тау Р301b-трансгенные мыши (TPLH)

Гомозиготных по Тау Р301L трансгенных мышей (TPLH) с генетическим фоном FVB/N применяли для оценки эффективности s.c.-вакцинации с помощью АСІ-33 или АСІ-35. В организме этих мышей происходила экспрессия наиболее длинной изоформы человеческого тау-белка с мутацией Р301L под контролем мышинового промотора *thy1*. Клинические симптомы проявлялись у мышей в возрасте 6-7 месяцев и у престарелых TPLH-мышей развивалась смертельная таупатия с прогрессирующим нейронным нарушением и образованием нейрофибриллярных сплетений (NFT). На конечной стадии они теряли вес и внезапно погибали (вероятно из-за связанных с дыханием проблем (асфиксия), большинство в возрасте 9-11 месяцев и все без исключения в возрасте до 12 месяцев.

9.1.2 Получение вакцин АСІ-33 и АСІ-35

Вакцины получали согласно процессу А, описанному в примере 3. Затем липосомальную суспензию (партия АСІ-33-081031-А и партия АСІ-35-081015-А+АСІ-35-090402-А) разделили на аликвоты и хранили при 2-8°C. Конечное молярное соотношение пептид/фосфолипид составляло 1:100.

9.1.3 Иммунизации

АСІ-33. АСІ-39 и АСІ-40

TPLH-мышам возрастом от 21 до 31 недели (8-10 мышей на группу: смесь самок (♀) и самцов (♂)) вводили путем s.c.-инъекций вакцину пять раз (таблица 13). Первые три иммунизации осуществляли с 2-недельными интервалами между каждым введением (дни (d) 0, d13, d28) согласно схеме 1. Затем животных подвергали ревакцинации один раз в месяц в течение двух месяцев (в дни d91 и d133). За 1 день (d-1) до первых иммунизации, затем после второй (d27) и третьей (d41) иммунизации отбирали образцы крови. Отбор крови осуществляли также до, между и после ревакцинаций (в дни d76, d104, d135). Для получения сыворотки давали образоваться сгустку в образцах крови в течение ночи, затем получали супернатант с помощью центрифугирования. Определяли титры специфических для фосфорилированных тау-пептидов антител в виде IgG и IgM и подклассов IgG-изотипа с помощью ELISA. Определяли также с помощью ELISA титры антител в виде IgG, специфических для не-рТау, полноразмерного (441 ак) тау-белка и фосфорилированного полноразмерного (441 ак) тау-белка.

АСІ-35

TPLH-мышам возрастом от 22 до 31 недели (10 мышей на группу: смесь самок (♀) и самцов (♂)) вводили путем s.c.-инъекций вакцину пять раз (таблица 13). Первые три иммунизации осуществляли с 2-недельными интервалами между каждым введением (дни (d) 0, d13, d27) согласно схеме 1. Затем животных подвергали ревакцинации один раз в месяц в течение двух месяцев (в дни d91 и d133). За 1 день (d-1) до первых

иммунизаций, затем после второй (d26) и третьей (d40) иммунизаций отбирали образцы крови. Отбор крови осуществляли также до, между и после ревакцинациями (в дни d75, d103, d155). Для получения сыворотки давали образоваться сгустку в образцах крови в течение ночи, затем получали супернатант с помощью центрифугирования. Определяли титры специфических для Tau393-408 [p8396/p8404]-пептида антител в виде IgG и IgM и подклассов IgG-изотипа с помощью ELISA. Определяли также с помощью ELISA титры антител в виде IgG, специфических для не-Tau393-408p, полноразмерного (441 ак) тау-белка и фосфорилированного полноразмерного (441 ак) тау-белка.

Таблица 13:

Иммунизация мышей

Группа	Количество и пол животных	Обработка/объем ^а	Партия вакцины	Путь введения ^б	Уровень дозы, количество пептида, мкг/дозу ^в	Количество MPLA, мкг/дозу ^в
1	5♀ 5♂	АСИ-33 0,2 мл	АСИ-33-081031-А	s.c.	9	12
	5♀ 3♂	ЗФР 0,2 мл	N.A.	s.c.	N.A.	N.A.
2	5♀ 5♂	АСИ-35 0,2 мл	АСИ-35-081015-А АСИ-35-090402-А	s.c.	16 8	23 27
	5♀ 5♂	ЗФР 0,2 мл	N.A.	s.c.	N.A.	N.A.
3	5♀ 5♂	АСИ-39 0,2 мл	АСИ-39-090202-А	s.c.	9,6	28,8
	5♀ 3♂	ЗФР 0,2 мл	N.A.	s.c.	N.A.	N.A.

Группа	Количество и пол животных	Обработка/объем ^а	Партия вакцины	Путь введения ^б	Уровень дозы, количество пептида, мкг/дозу ^в	Количество MPLA, мкг/дозу ^в
4	5♀ 5♂	АСИ-400,2 мл	АСИ-40-090202-А	s.c.	12	24,4
	5♀ 3♂	ЗФР 0,2 мл	N.A.	s.c.	N.A.	N.A.

N.A.=неприемлемо
^а: теоретический объем
^б: S.C.: ПОДКОЖНО
^в: количество, измеренное после анализа

9.1.4 Количественное определение специфических для тау-пептидов антител

У мышей, обработанных АСИ-33, АСИ-39 и АСИ-40, определяли с помощью ELISA антитела в виде IgG, специфические соответственно в отношении Tau5-20 [pY18], Tau206-221 [pT212, pS214] и Tau196-211 [pS202, pT205], в 6 образцах сыворотки, полученных при отборе крови. Специфические для Tau5-20, полноразмерного (441ак) тау-белка и фосфорилированного полноразмерного (441 ак) IgG определяли в сыворотке, полученной в дни d-1 и d41. Специфические для фосфорилированных тау-пептидов антитела изотипов IgM и IgG определяли с помощью ELISA в образце сыворотки, полученном при отборе крови в d41.

У мышей, обработанных АСИ-35, определяли с помощью ELISA антитела в виде IgG, специфические соответственно в отношении Tau393-408 [pS396/pS404], в 7 образцах сыворотки, полученных при отборе крови. Специфические для Tau393-408, полноразмерного (441 ак) тау-белка и фосфорилированного полноразмерного (441 ак) тау-белка IgG определяли в сыворотке, полученной в дни d-1 и d40. Специфические для Tau393-408 [pS396/pS404] антитела изотипов IgM и IgG определяли с помощью ELISA

в образце сыворотки, полученном при отборе крови в d40.

Планшеты сенсibilизировали 10 мкг/мл соответствующего тау-пептида в течение ночи при 4°C. После отмывки каждой лунки 3ФР-0,05% Твин 20 и блокады с помощью 1% БСА в 3ФР-0,05% Твин 20 в планшеты вносили серийные разведения сыворотки и инкубировали при 37°C в течение 2 ч. После отмывки планшеты инкубировали с конъюгированным с щелочной фосфатазой (AP) антимышиным полным антителом в виде IgG (фирма Jackson Laboratories, Балтимор, шт. Пенсильвания, США) или с изотипспецифическими антителами (конъюгированный с пероксидазой из хрена (HRP) антимышиный IgM, конъюгированный с AP антимышиный IgG1, конъюгированные с биотином антимышиные IgG2a и IgG3, которые получали от фирмы Pharmingen BD, Сан-Диего, шт. Калифорния, США, и конъюгированный с HRP антимышиный IgG2b фирмы Zymed Laboratories, Сан-Франциско, шт. Калифорния) в течение 2 ч при 37°C. После отмывки планшеты инкубировали с pNPP (пара-нитрофенилфосфат), представляющим собой фосфатазный субстрат для AP, или ABTS (2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновая кислота)), представляющей собой субстрат для HRP, и считывали при 405 нм с помощью планшет-ридера для ELISA. Дополнительную стадию осуществляли для конъюгированных с биотином антител, при этом планшеты инкубировали в течение 45 мин с комплексом стрептавидин-HRP (фирма R&D Systems, Миннеаполис, шт. Миннесота, США) перед выявлением с помощью ABTS. Результаты выражали в виде ОП (оптическая плотность) для ненасыщающего разведения в случае IgG, изотипов IgG и IgM.

9.1.5 Связывание антител к тау-пептидам с тау-сплетениями на срезах головного мозга трансгенного животного (TAUPIR-анализ)

Связывание антител, присутствующих в сыворотке животных, вакцинированных ACI-33, ACI-35, ACI-39 и ACI-40, со сплетениями на срезах головного мозга осуществляли с помощью ТАUPIR-иммуногистохимии.

ТАUPIR-окрашивание осуществляли согласно протоколу, описанному в примере 5.1.5.

9.1.6 Вестерн-блоттинг (ВБ)

Вестерн-блоттинг осуществляли согласно протоколу, описанному в примере 5.1.6, за исключением того, что отмывку осуществляли перед обнаружением с помощью раствора конъюгата Qdot 625 со стрептавидином (фирма Invitrogen, шт. Калифорния) в течение 30-60 мин при КТ.

9.2. Результаты

9.2.1 Гуморальный иммунный ответ в виде IgG

При применении всех конструкций вакцин обнаружены титры специфических антител в виде IgG.

ACI-33 вакцина индуцировала специфический IgG-ответ после s.c.-инъекции. После двух иммунизации (d27) IgG-ответ сохранялся стабильным, при этом не обнаружено его повышение после третьей иммунизации (d41) (фиг.19 однонаправленный дисперсионный анализ, $P < 0,001$ при сравнении результатов, полученных в день d-1, с результатами, полученными в день d27, $P > 0,05$ при сравнении результатов, полученных в день d27, с результатами, полученными в день d41). Снижение титра антител обнаружено в d76 (фиг.19 однонаправленный дисперсионный анализ, $P < 0,001$ при сравнении результатов, полученных в день d41, с результатами, полученными в день d76), и ревакцинация животных вновь приводила к небольшому повышению титров в d104.

Вакцина ACI-35 индуцировала анти-Tau393-408 [pS396/pS404]-IgG-ответ после s.c.-

инъекции. После двух 2 иммунизации (d26) IgG-ответ не повышался после осуществления третьей иммунизации (d40) (фиг.20, однонаправленный дисперсионный анализ, $P < 0,001$ при сравнении результатов, полученных в день d-1, с результатами, полученными в дни d26 and d40). Ревакцинация животных вновь приводила к повышению титров в d103 (фиг.20, однонаправленный дисперсионный анализ, $P < 0,05$ при сравнении результатов, полученных в день d-1, с результатами, полученными в день d104, и $P < 0,001$ при сравнении результатов, полученных в день d-1, с результатами, полученными в день d145).

Вакцина ACI-39 индуцировала анти-Tau206-221 [pT212, pS214]-IgG-ответ после s.c.-инъекций. После двух иммунизации (d27) IgG-ответ сохранялся стабильным, при этом не обнаружено его повышения после третьей иммунизации (d41) (фиг.21, однонаправленный дисперсионный анализ, $P < 0,001$ при сравнении результатов, полученных в день d-1, с результатами, полученными в дни d27/d41). Обнаружено снижение титров в d76 и ревакцинация животных восстанавливала титры до такого же уровня после 3 иммунизации (фиг.21, однонаправленный дисперсионный анализ, $P < 0,05$ при сравнении результатов, полученных в день d-1, с результатами, полученными в день d76, и $P > 0,05$ при сравнении результатов, полученных в день d41, с результатами, полученными в день d104).

Анализ результатов, проведенный при оценке ОП при ненасыщающем разведении, продемонстрировал такие же результаты, что и полученные при насыщающем разведении 1/100 (однонаправленный дисперсионный анализ, $P < 0,05$ при сравнении результатов, полученных в день d-1, с результатами, полученными в дни d27/d41/d104, и $P > 0,05$ при сравнении результатов, полученных в день d-1, с результатами, полученными в день d76).

Вакцина ACI-40 индуцировала анти-Taи 196-211 [pS202, pT205]-IgG-ответ после s.c.-инъекции. После двух иммунизации (d27) IgG-ответ оставался стабильным без повышения после третьей иммунизации (d41) (фиг.22, однонаправленный дисперсионный анализ, $P < 0,001$ при сравнении результатов, полученных в день d-1, с результатами, полученными в день d27, $P > 0,05$ при сравнении результатов, полученных в день d27, с результатами, полученными в день d41). Обнаружено снижение титров антител в d76 (фиг.22, однонаправленный дисперсионный анализ, $P < 0,001$ при сравнении результатов, полученных в день d41, с результатами, полученными в день d76), и ревакцинация животных вновь приводила к повышению титров в d104.

Анализ результатов, проведенный при оценке ОП при ненасыщающем разведении, продемонстрировал такие же результаты, что и полученные при насыщающем разведении 1/100 (однонаправленный дисперсионный анализ, $P < 0,001$ при сравнении результатов, полученных в день d-1, с результатами, полученными в день d27, $P > 0,05$ при сравнении результатов, полученных в день d27, с результатами, полученными в день d41, и $P < 0,01$ при сравнении результатов, полученных в день d41, с результатами, полученными в день d76).

9.2.2. Анализ изотипов

Вакцинация ACI-33 после трех s.c.-иммунизации индуцировала титр антител, главным образом представленных подклассами IgG2a и -2b (фиг.23). Уровень IgG1, IgG3 и IgM был ниже и обнаружено значимое различие между уровнями IgG2a/2b и IgG1/IgM (фиг.23, однонаправленный дисперсионный анализ, $P < 0,05$ при сравнении IgG1 с IgG2a/2b, $P < 0,001$ при сравнении IgM с IgG2a/2b).

Вакцинация ACI-35 после трех s.c.-иммунизации индуцировала титр антител, главным образом представленных подклассами IgG2a и -2b (фиг.24). Уровень IgG1 был ниже и

обнаружено значимое различие между уровнями IgG1 и IgG2a (фиг.24, однонаправленный дисперсионный анализ, $P < 0,05$ при сравнении IgG1 с IgG2a). Уровень IgG3 и IgM был ниже и обнаружено значимое различие между уровнями IgG2a/2b и IgG3/IgM (фиг.24, однонаправленный дисперсионный анализ, $P < 0,05$ при сравнении IgG3/IgM с IgG2b, $P < 0,0001$ при сравнении IgG3/IgM с IgG2a).

Вакцинация ACI-39 после трех s.c.-иммунизации индуцировала титр антител, главным образом представленных подклассами IgG2a и -2b (фиг.25). Уровень IgG1, IgG3 и IgM был значимо ниже по сравнению с титрами IgG2a/2b (фиг.25, однонаправленный дисперсионный анализ, $P < 0,05$ при сравнении IgG2b с IgG1/IgG3, $P < 0,01$ при сравнении IgG2a с IgG1/IgG3, $P < 0,001$ при сравнении IgG2a/2b с IgM).

Вакцинация ACI-40 после трех s.c.-иммунизации индуцировала титр антител, главным образом представленных подклассом IgG2b (фиг.26, однонаправленный дисперсионный анализ, $P < 0,05$ при сравнении IgG2b с IgG2a и $P < 0,001$ при сравнении IgG2b с IgG1/IgG3/IgM). Титры IgG2a также оказались выше, чем титры IgM (фиг.26, однонаправленный дисперсионный анализ, $P < 0,01$ при сравнении IgG2a с IgM).

9.2.3 Специфичность антител

Титры IgG, индуцированные тремя s.c.-инъекциями вакцин на основе тау-пептидов, анализировали также в отношении различных тау-пептидов (pТау-пептид и тау-пептид) и белков (антитело к фосфорилированному полноразмерному (441 ак) тау-белку (синоним антитело к pТау-белку) и полноразмерному (441 ак) тау-белку (синоним антитело к тау-белку)).

У вакцинированных ACI-33 мышей образец крови, полученный в d-1, использовали в качестве контроля для различных вариантов сенсибилизации обнаружено различие между предварительно полученным образцом крови и сывороткой, собранной после трех иммунизации в случае сенсибилизации Tau5-20 [pY18] и тау-белком (фиг.27, однонаправленный дисперсионный анализ, $P < 0,001$ при сравнении результатов, полученных в день d-1, с результатами, полученными в день d41 для Tau5-20 [pY18], $P < 0,05$ при сравнении результатов, полученных в день d-1, с результатами, полученными в день d41 для Тау-белка).

У вакцинированных ACI-35 мышей образец крови, полученный в d-1, использовали в качестве контроля и обнаружено значимое различие между данными, полученными ad-In d40, только касательно титров антител к Tau393-408 [pS396/pS404] (фиг.28, однонаправленный дисперсионный анализ, $P < 0,0001$ при сравнении результатов, полученных в день d-1, с результатами, полученными в день d40 для титров антитела к Tau393-408 [pS396/pS404]). В d40 уровни антитела, полученные при использовании Tau393-408 [pS396/pS404]-пептида также значимо отличались от уровней, полученных для всех других вариантов сенсибилизации (фиг.28, однонаправленный дисперсионный анализ, $P < 0,0001$ при сравнении результатов, полученных в день d40 для антитела к Tau393-408 [pS396/pS404], с результатами, полученными в день d40 для антитела к Таи393-408/pТау-белку/тау-белку).

У вакцинированных ACI-39 мышей образец крови, полученный в d-1, использовали в качестве контроля, и только в случае сенсибилизации Tau206-221 [pT212, pS214] обнаружено различие между предварительно полученным образцом крови и сывороткой, собранной после трех иммунизации (фиг.29; однонаправленный дисперсионный анализ, $P < 0,001$ d-1 относительно d41 для Tau206-221 [pT212, pS214]).

У вакцинированных ACI-40 мышей образец крови, полученный в d-1, использовали в качестве контроля и была обнаружено различие между результатами, полученными для предварительно взятого образца крови и образцом сыворотки, взятым после

осуществления 3 иммунизаций, в случае сенсibilизации Taul96-211 [pS202, pT205] и Tau 196-211 (фиг.30, однонаправленный дисперсионный анализ $P<0,001$ при сравнении результатов, полученных в день d-1, с результатами, полученными в день d41 для Таи 196-211 [pS202, pT205], $P<0,05$ при сравнении результатов, полученных в день d-1, с результатами, полученными в день d41 для Taul96-211).

Мышиную сыворотку использовали также для ТАUPIR-экспериментов с целью решения вопроса о том, могут ли антитела к тау-пептидами, присутствующие в сыворотке, распознавать сплетения в срезах головного мозга Таи-трансгенных животных.

Осуществляли также ВБ-анализ экстрактов головного мозга различных мышей, используя мышиную сыворотку или контрольное антитело к Тау-5 для выявления всех форм тау-пептидов и белков (pTau и Tau).

Данные обобщены в приведенной ниже таблице 14.

Таблица 14: Обобщение данных ТАUPIR- и ВБ-экспериментов на вакцинированных мышах линии TPLN		
Вакцина	ТАUPIR (количество позитивных/общее количество мышей)	Вестерн-блоттинг (количество позитивных/общее количество мышей)
АСI-33	6/10	3/9
АСI-35	4/10	0/4
АСI-39	7/10	1/5
АСI-40	10/10	3/7

9.3. Заключение

Титры антител к тау-пептидам анализировали на основе их связывания с различными тау-пептидами и pTau-пептидами, а также полноразмерными pTau-белками или тау-белками. Липосомальная иммунизация с использованием содержащих тау-пептиды вакцин приводила к образованию антител в виде IgG, которые специфически связывались с pTau-пептидами и фосфорилированным тау-белком и отличались более слабой способностью к связыванию с нефосфорилированными пептидами и белками.

Касательно IgG-изотипов обнаружен более низкий гуморальный иммунный IgG1-ответ по сравнению с IgG2b- и IgG3-ответом. Обнаружен низкий IgM-ответ, зависящий от пути (s.c.) иммунизации.

Специфичность антител, образовавшихся при иммунизации мышей вакцинами на основе тау-пептидов, оценивали с помощью ТАUPIR-анализа и установлено, что практически для всех образцов сыворотки мышей характерен высокий уровень связывания с тау-сплетениями, присутствующими в срезах головного мозга несущих мутантный тау-белок животных.

Пример 10: Эффективность вакцинации АСИ-33 или АСИ-35, изученная с использованием в качестве модели Таи Р301b-трансгенных мышей

Целью настоящего исследования являлся анализ эффективности анти-тау-вакцинации с использованием подкожной (s.c.) инъекции вакцин АСИ-33 (Tau5-20 [pY18]) или АСИ-35 (Tau393-408 [pS396/pS404]) на Тау Р301b-трансгенных мышах. Мышей иммунизировали 5 раз и анализировали изменения поведения с помощью Rotarod-теста (тест, позволяющий оценивать координацию движений и физическую выносливость животных) в течение жизни животного.

10.1 Методы

10.1.1 Получение вакцин

Вакцины АСИ-33 и АСИ-35 получали согласно протоколу, описанному в примере 3.

10.1.2.Иммунизация

Животных иммунизировали либо АСИ-33, либо АСИ-35 согласно протоколу,

описанному в примере 9 (схема 2 для АСІ-33 и схема 3 для АСІ-35)

Схема 2. Порядок иммунизации, отбора крови и осуществления Rotarod-тестов при иммунизации АСІ-33

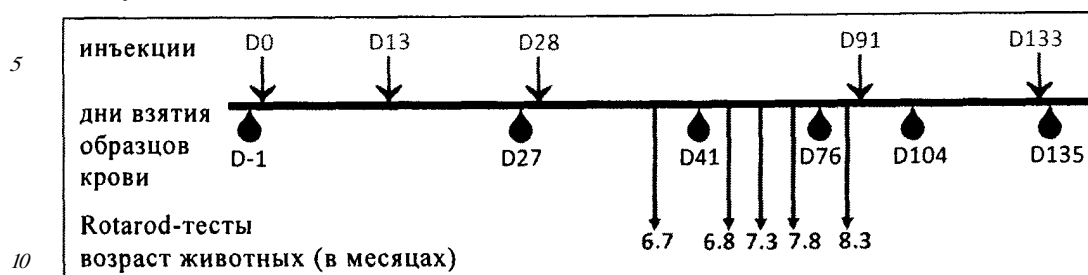
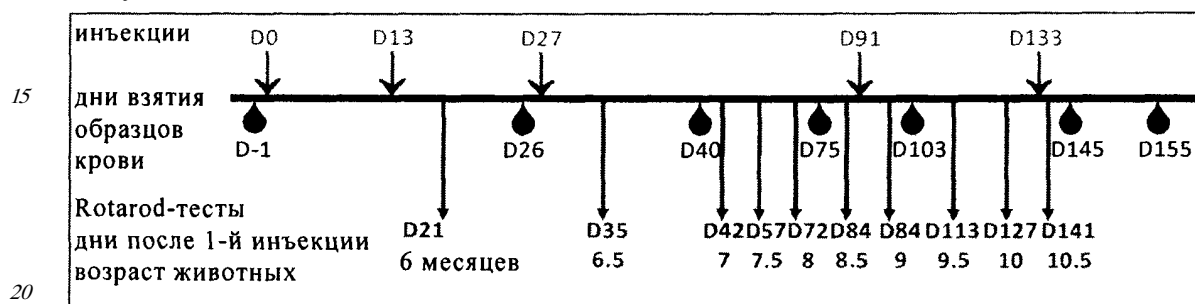


Схема 3. Порядок иммунизации, отбора крови и осуществления Rotarod-тестов при иммунизации АСІ-35



10.1.3 Поведение (Rotarod-тест)

Для наблюдения за двигательной активностью животных осуществляли автоматический Rotarod-тест. По пять мышей одновременно тестировали на вращающемся стержне (диаметр 3 см), разделенном непрозрачными разделяющими перегородками. В процессе теста скорость вращения стержня повышалась с 4 до 40 об/мин в течение 5 мин. Для каждой мыши определяли время нахождения на вращающемся стержне в течение максимум 5 мин.

10.2 Результаты

Для оценки двигательной активности TPLH-мышей после обработки АСІ-33 или ЗФР подвергали Rotarod-тесту мышей пяти различных возрастов (фиг.31).

Значимое различие между животными, которым инъецировали АСІ-33 и ЗФР, обнаружено для животных возрастом 7,3 месяца (фиг.31, двусторонний дисперсионный анализ $P < 0,001$ возраст 7,3 месяца). Это воздействие АСІ-33 на двигательное поведение мышей коррелировало с титрами антител к Таи5-20 [pY18] в сыворотке мышей возрастом 7,8 месяца (фиг.32, χ^2 -критерий Спирмена $P < 0,001$).

Для оценки моторной активности TPLH-мышей после обработки АСІ-35 или ЗФР мышей подвергали Rotarod-тесту (фиг.33). Хотя не обнаружено значимых различий между обработанной и контрольной группой, для мышей возрастом 9,5 месяца можно обнаружить тенденцию к более высокой эффективности обработки АСІ-35 мышей в Rotarod-тесте (фиг.33, критерий Манна-Уитни, $P = 0,1905$ возраст 9,5 месяца).

10.3 Заключение

Вакцинация АСІ-33 TPLH-мышей оказывала благоприятное воздействие на дефицит двигательной активности мышей относительно обработанных ЗФР животных при оценке с помощью Rotarod-теста. Это положительное действие коррелировало с титрами антител к тау-пептидам в сыворотке мышей.

Вакцинация АСІ-35 TPLH-мышей приводила к определенной тенденции в отношении воздействия на дефицит двигательной активности мышей возрастом 9,5 месяца относительно животных, которых обрабатывали ЗФР, по данным Rotarod-теста.

Пример 11: Гуморальный иммунный ответ в виде антител к рТау у самок «голых» мышей

Целью настоящего исследования была оценка гуморального иммунного ответа в виде антител к рТау, индуцированного инъекцией вакцины ACI-33 (Tau5-20 [pY18])

самкам «голых» мышей. «Голые» мыши несут мутацию $Foxn1^{nu}$, имеют пониженную Т-клеточную функцию из-за снижения соответствующей функции вилочковой железы. Таким образом, целью настоящего исследования заключалась в определении того, является ли гуморальный иммунный ответ, индуцируемый ACI-33, независимым от Т-клеток.

«Голым» мышам с генетическим фоном C57BL/6- и соответствующим мышам дикого типа такого же помета возрастом 11 или 13 недель, осуществляли подкожную инъекцию (s.c.) вакцины. Мышей иммунизировали трижды с 2-недельными интервалами и отбирали образцы крови через 1 неделю после каждой иммунизации. Общие IgG-ответы в виде антител к рТау- (Tau5-20 [pY18])-пептиду оценивали с помощью ELISA. Кроме того, анализировали профиль изотипов гуморального иммунного ответа после трех иммунизации для оценки распределения подклассов IgG, а также IgM. Анализировали также титры антител к соответствующему не-рТау-(Tau5-20)-пептиду, полноразмерному (441 ак) тау-белку и фосфорилированному полноразмерному (441 ак) тау-белку.

Для подтверждения отсутствия Т-клеток-хелперов в «голых» мышах оценивали процент $D3^{+}/CD4^{+}$ -клеток с помощью лазерного анализатора клеток по интенсивности флуоресценции (FACS).

11.1 Методы

11.1.1. Получение вакцины ACI-33

Вакцины ACI-33 получали согласно методу, описанному в примере 3.

Затем липосомальную суспензию (партия ACI-33-090818-A) разделяли на аликвоты и хранили при 2-8°C. Конечное молярное соотношение пептид/фосфолипид составляло 1:100. Вакцины отправляли на фирму JSW Life Sciences GmbH (Австрия).

11.1.2 Иммунизации

На фирме JSW Life Sciences GmbH «голым» мышам (B6.Cg-Foxn1nu/J) с генетическим фоном C57BL/6 и соответствующим мышам дикого типа такого же помета (6 ♀ мышей/группу) вводили путем s.c.-инъекций ACI-33 трижды с 2-недельными интервалами между каждым введением (день 0, 14, 28) согласно схеме, представленной в таблице 15.

Собирали образцы плазмы из лицевой вены/артерии за 7 дней до и через 2, 4, 7, 21, 35 и 56 дней после первой инъекции. Титры Tau5-20 [pY18]-специфических антител в виде IgG и IgM и профили IgG-изотипа определяли с помощью ELISA. Также с помощью ELISA определяли титры антител в виде IgG к не-рТау5-20, полноразмерному (441 ак) тау-белку и фосфорилированному полноразмерному (441 ак) тау-белку. Образцы крови собирали также в d-7 для FACS-анализа для определения процента $CD3^{+}/CD4^{+}$ -клеток.

11.1.3 Количественная оценка специфических для тау-пептидов антител

Специфические антитела в виде IgG к Tau5-20 [pY18] оценивали количественно с помощью ELISA в 5 образцах сыворотки, полученной при отборе крови (d2, d7, d21, d35 и d56). Антитела в виде IgG к Tau5-20, полноразмерному (441 ак) тау-белку и фосфорилированному полноразмерному (441 ак) тау-белку определяли в сыворотке, полученной в d35. Специфические для Tau5-20 [pY18] антитела изотипов IgM и IgG определяли с помощью ELISA в сыворотке из образцов крови, полученных в d35. Планшеты сенсibilizировали соответствующим тау-пептидом, взятым в концентрации 10 мкг/мл, и соответствующим тау-белком, взятым в концентрации 1 мкг/мл, в течение

ночи при 4°C. После отмывки каждой лунки 3ФР-0,05% Твин 20 и блокады с помощью 1% БСА в 3ФР-0,05% Твин 20 в планшеты вносили серийные разведения сыворотки и инкубировали при 37°C в течение 2 ч. После отмывки планшеты инкубировали с конъюгированным с щелочной фосфатазой (AP) антимышиным полным антителом в виде IgG (фирма Jackson Laboratories, Балтимор, шт. Пенсильвания, США) или с изотипспецифическими антителами (конъюгированный с пероксидазой из хрена (HRP) антимышиный IgM, конъюгированный с AP антимышиный IgG1, конъюгированные с биотином антимышиные IgG2a и IgG3, которые получали от фирмы Pharmingen BD, Сан-Диего, шт. Калифорния, США, и конъюгированный с HRP антимышиный IgG2b фирмы Zymed Laboratories, Сан-Франциско, шт. Калифорния) в течение 2 ч при 37°C. После отмывки планшеты инкубировали с pNPP (пара-нитрофенилфосфат), представляющим собой фосфатазный субстрат для AP, или ABTS (2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновая кислота)), представляющей собой субстрат для HRP, и считывали при 405 нм с помощью планшет-ридера для ELISA. Дополнительную стадию осуществляли для конъюгированных с биотином антител, при этом планшеты инкубировали с течение 45 мин с комплексом стрептавидин-HRP (фирма R&D Systems, Миннеаполис, шт. Миннесота, США) перед выявлением с помощью ABTS. Результаты выражали в виде величин ОП (оптическая плотность) для ненасыщающего разведения в случае IgG, изотипов IgG и IgM.

11.1.4 Количественная оценка CD3⁺/CD4⁺-клеток

Образцы крови мышей лизировали с помощью хлорида аммония до осветления, затем центрифугировали при 400xg в течение 7 мин и дебрис ресуспендировали в 3ФР, содержащем ЭДТК. Затем клетки блокировали с помощью CD16/CD32-блокирующего реагента и окрашивали с помощью антител к CD4 (PE-конъюгат) и CD3 (PE-Cy5) в течение 30 мин при 4°C. Образцы отмывали 3ФР, ресуспендировали в растворе фиксатора (DB Cellfix, разведенный в соотношении 1:40 в BD FACS Flow) и оценивали с помощью цитометра BD FACS. Рассчитывали процент клеток в дискриминационном окне, позитивно окрашенных в отношении CD3⁺ и CD4⁺ (Т-клетки-хелперы).

Таблица 15:

Иммунизация мышей							
Группа	Количество и пол животных	Обработка/объем ^а	Партия вакцины	Процесс получения вакцины	Путь введения ^б	Уровень дозы, количество пептида мкг/дозу ^в	Количество MPLA мкг/дозу ^в
1	6♀ «голых» мышей	ACI-33 0,2 мл	ACI-33-090818-A	ACI-A	s.c.	12,6	15,8
			A				
2	6♀ wt-мышей	ACI-33 0,2 мл	ACI-33-090818-A	ACI-A	s.c.	12,6	15,8

^а: теоретический объем
^б: s.c.: подкожно
^в: количество, измеренное после анализа

11.2 Результаты

11.2.1 Общие сведения

Ни одно из животных не погибло, не достигнув состояния зрелости, и не обнаружено никаких побочных действий в процессе осуществления обработок. У всех животных линии B6.Cg-Foxlnu/J присутствовал типичный «nude»-фенотип, в то время мыши дикого типа (wt) такого же помета имели нормальную шерсть.

11.2.2 Количественная оценка CD3 /CD4 - клеток

CD3/CD4 - окрашивание с последующим FACS-анализом продемонстрировали существенное снижение количества Т-клеток-хелперов (CD3/CD4 - клетки) у «голых» мышей по сравнению с wt-животными (фиг.34).

11.2.3 Анализ иммунного ответа

5 Титры антитела к Tau5-20 [pY18] в виде IgG, образовавшиеся при вакцинации ACI-33, анализировали с целью изучения иммуногенности вакцины в отношении wt-мышей и «голых» мышей. Титры антитела к Tau5-20 [pY18] в виде IgG в «голых» мышцах анализировали с целью решения вопроса о том, является ли ответ, индуцируемый ACI-33, независимым от функции Т-клеток. Вакцина индуцировала IgG-ответ на Tau5-20
10 [pY18] у «голых» мышей и не обнаружено значимого различия между индуцированным ACI-33 гуморальным иммунным ответом у wt- или «голых» мышей во все изученные моменты времени (фиг.35; двунаправленный дисперсионный анализ, $P < 0,05$ при сравнении всех образцов крови, взятых у «голых» мышей, с образцами, взятыми у wt-мышей).

15 Вакцина ACI-33 индуцировала в обеих линиях мышей IgG-ответ на Tau5-20 [pY18] после s.c.-инъекции, пик которого достигался после двух иммунизации (d27)(фиг.35).

Вакцина ACI-33 индуцировала титры антител одинакового профиля для различных подклассов IgG и IgM у «голых» и wt-мышей, поскольку не выявлено значимых различий между двумя линиями мышей после трех s.c.-иммунизации вакциной (фиг.36,
20 однонаправленный дисперсионный анализ, $P > 0,05$ при сравнении IgG1 у «голых» мышей с IgG1 у wt-мышей, IgG2a/2b у «голых» мышей с IgG2a/2b у wt-мышей, IgG3 у «голых» мышей с IgG3 у wt-мышей, IgM у «голых» мышей с IgM у wt-мышей). В обеих линиях мышей обнаружен существенно более низкий уровень IgG1 по сравнению с IgG2b и IgM (фиг.36, однонаправленный дисперсионный анализ, «голые» мыши: $P < 0,01$ при сравнении
25 IgG1 с IgG2b или IgM; Wt-мыши: $P < 0,05$ при сравнении IgG1 с IgG2b или IgM). Кроме того, у «голых» мышей обнаружен существенно более низкий уровень IgG1 по сравнению с IgG3 (фиг.36, однонаправленный дисперсионный анализ, «голые» мыши: $P < 0,05$ при сравнении IgG1 с IgG3), и уровень IgG2a также оказался более низким по сравнению с IgG2b, IgG3 и IgM (фиг.36, однонаправленный дисперсионный анализ, «голые» мыши:
30 $P < 0,05$ при сравнении IgG2a с IgG2b, IgG3 или IgM).

Титры IgG, индуцированные после третьей s.c.-инъекции ACI-33, анализировали также с использованием различных тау-пептидов (антитела к Tau5-20 [pY18] и к Tau5-20) и белков (антитела к фосфорилированному полноразмерному (441 ак) тау-белку (синоним антитела к pТау-белку) и антитела к полноразмерному (441 ак) тау-белку
35 (синоним антитела к тау-белку) (фиг.37). Не обнаружено различия в титрах антител к различным пептидам и белкам между wt- и «голыми» мышами. В группе «голых» мышей обнаружено значимо различие между титрами антител к Tau5-20 [pY18], которые оказались выше, чем титры к Tau5-20 (фиг.37, однонаправленный дисперсионный анализ, $P < 0,05$ при сравнении титров антител к Tau5-20 [pY18] с титрами антител к Tau5-
40 20).

11.3 Заключение

Несмотря на невысокий процент CD3⁺ и CD4⁺-клеток в «голых» мышцах, вакцина ACI-33 индуцировала сильный IgG-ответ на Tau5-20 [pY18]. Устойчивость гуморального иммунного ответа и распределение IgG-изотипов оказались одинаковыми у wt-мышей
45 и «голых» мышей, что позволяет предположить независимость указанных параметров от Т-клеток при вакцинации ACI-33. По сравнению с иммунокомпетентными мышами иммунизация ACI-33 индуцировала идентичный титр антител и кинетику со сходным профилем IgG у мышей с дефицитом Т-клеток. Кроме того, титры антител к различным

тау-пептидам и белкам оказались сходными для иммунокомпетентных мышей и мышей с дефицитом Т-клеток. Эти данные свидетельствуют о том, что ACI-33 индуцировала независимый от Т-клеток гуморальный иммунный ответ как у «голых», так и у wt-мышей.

Ссылки

- Alving и др., Infect. Immun. 60, 1992, сс. 2438-2444;
 Asuni и др., J Neurosc. 27(34), 2007, сс. 9115-9129;
 Hodgson и др., Bio/Technology, 9, 1991, с.421;
 Khaw B.A. и др., J. Nucl. Med. 23, 1982, сс. 1011-1019;
 Lewis и др., Nature Genetics, 25, 2000, сс. 402-405;
 Masliah и др., Neuron, 46(6), 2005, сс. 857-868;
 Muhs и др., Proc Natl Acad Sci USA, 104(23), 2007, сс. 9810-9815;
 Muyllaert и др., Rev Neurol, 162(10), 2006, сс. 903-907;
 Muyllaert и др., Genes Brain Behav., Suppl. 1, 2008, сс. 57-66;
 Nicolau и др., Proc Natl. Acad. Sci USA 99, 2002, сс. 2332-2337;
 Nicoll и др., Nature Med, 9, 2003, сс. 448-452;
 Oddo и др., Neuron, 43, 2004, сс. 321-332;
 Queen и др., Proc. Natl Acad Sci USA, 86, 1989, сс. 10029-10032;
 Ribe и др., Neurobiol Dis, 20(3), 2005, сс. 814-822;
 Roberson и др., (2007) Science, 316(5825), сс. 750-754;
 Rosenmann и др., (2006) Arch Neurol, 63(10), сс. 1459-1467;
 Rousseaux и др., Methods Enzymology, изд-во Academic Press 121, 1986, сс. 663-669;
 Terwel и др., J Biol Chem, 280, 2006, сс. 3963-3973;
 Terwel и др., Am J pathol., 172(3), 2008, сс. 786-798;
 Urushitani и др., Proc. Natl Acad Sci USA, 104(79), 2007, сс. 2495-2500;
 Wagner и др., Journal of Liposome Research, т.12(3), 2002, сс. 259-270.

Депозиты

В соответствии с Будапештским договором следующие клеточные линии гибридом депонированы на имя фирмы AC IMMUNE S.A. в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур ГмБХ (DSMZ), Брауншвейг, Mascheroder Weg 1B, 38124
 Branuschweig:

Название гибридомы	Регистрационный номер	Дата депонирования
AC1-41-Ab1	DSM ACC3043	3 марта, 2010 г.
2B6	DSM ACC3044	10 марта, 2010 г.
3A8	DSM ACC3045	10 марта, 2010 г.
4C1	DSM ACC3046	10 марта, 2010 г.
5D10A3	DSM ACC3047	10 марта, 2010 г.
6C10	DSM ACC3048	10 марта, 2010 г.
6H1	DSM ACC3049	10 марта, 2010 г.
7C2	DSM ACC3050	10 марта, 2010 г.

Формула изобретения

1. Антигенная конструкция, содержащая антигенный пептид, соответствующий последовательности в пределах тау-белка, включающий фосфо-эпитоп, где пептидом является (а), модифицированный путем связывания с липофильным или гидрофобным фрагментом, который облегчает встраивание в липидный бислой липосомы, и (б), реконструированный в липосому так, что пептид презентируется на поверхности липосомы, для индукции иммунного ответа у животного, страдающего от нейродегенеративного расстройства, где указанный антигенный пептид имеет

аминокислотную последовательность, идентичную

а. SEQ ID NO: 2 по меньшей мере на 95%, и имеет практически такую же иммуногенную активность, что и антигенный пептид, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 2, где аминокислотный остаток, соответствующий

5 аминокислотному остатку 18 (P-Tyr₁₈) SEQ ID NO: 2, является фосфорилированным;

б. SEQ ID NO: 3 по меньшей мере на 95%, и имеет практически такую же иммуногенную активность, что и антигенный пептид, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 3, где по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два аминокислотных остатка, соответствующих аминокислотным остаткам 212

10 (P-Thr₂₁₂) и 214 (P-Ser₂₁₄) SEQ ID NO: 3, являются фосфорилированными;

в. SEQ ID NO: 4 по меньшей мере на 95%, и имеет практически такую же иммуногенную активность, что и антигенный пептид, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 4, где по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два аминокислотных остатка, соответствующих аминокислотным остаткам 202

15 (P-Ser₂₀₂) и 205 (P-Thr₂₀₅) SEQ ID NO: 4, являются фосфорилированными;

г. SEQ ID NO: 5 по меньшей мере на 95%, и имеет практически такую же иммуногенную активность, что и антигенный пептид, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 5, где по меньшей мере один, но предпочтительно все аминокислотные остатки, соответствующие аминокислотным остаткам 396 (P-Ser₃₉₆)

20 и 404 (P-Ser₄₀₄) SEQ ID NO: 5, являются фосфорилированными;

д. SEQ ID NO: 6 по меньшей мере на 95%, и имеет практически такую же иммуногенную активность, что и антигенный пептид, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 6, где по меньшей мере один, но предпочтительно все аминокислотные остатки, соответствующие аминокислотным остаткам 404 (P-Ser₄₀₄)

25 и 409 (P-Ser₄₀₉) SEQ ID NO: 6, являются фосфорилированными;

е. SEQ ID NO: 7 по меньшей мере на 95%, и имеет практически такую же иммуногенную активность, что и антигенный пептид, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 7, где по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно по меньшей мере три, но наиболее предпочтительно все аминокислотные остатки, соответствующие 202 (P-Ser₂₀₂), 205 (P-Thr₂₀₅), 212 (P-Thr₂₁₂)

30 и 214 (P-Ser₂₁₄) SEQ ID NO: 7, являются фосфорилированными;

ж. SEQ ID NO: 8 по меньшей мере на 95%, и имеет практически такую же иммуногенную активность, что и антигенный пептид, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 8, где аминокислотный остаток, соответствующий аминокислотному остатку 409 (P-Ser₄₀₉) SEQ ID NO: 8, является фосфорилированным;

или

з. SEQ ID NO: 9 по меньшей мере на 95%, и имеет практически такую же иммуногенную активность, что и антигенный пептид, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 9, где аминокислотный остаток, соответствующий аминокислотному остатку 404 (P-Ser₄₀₄) SEQ ID NO: 9, является фосфорилированным.

40

2. Антигенная конструкция по п. 1, где пептид состоит из 5-25 аминокислотных остатков.

45

3. Антигенная конструкция по п. 1, где указанный пептид содержит основной патологический фосфо-эпитоп тау-белка, соответствующий последовательности в пределах тау-белка, характеризующейся схемой фосфорилирования, которая связана с патологическими состояниями или расстройствами.

4. Антигенная конструкция по п. 1, где пептид не содержит Т-клеточный эпитоп.

5. Антигенная конструкция по п. 1, где пептид презентуется на поверхности липосомы в виде массива с большим количеством повторов.

6. Антигенная конструкция по п. 1, где пептид при введении животному или человеку в форме фармацевтической композиции обладает способностью вызывать специфический для конформации и не зависящий от Т-клеток иммунный ответ.

7. Антигенная конструкция по п. 1, где липофильный или гидрофобный фрагмент представляет собой жирную кислоту, триглицерид, диглицерид, стероид, сфинголипид, гликолипид или фосфолипид.

8. Антигенная конструкция по п. 7, где липофильный или гидрофобный фрагмент представляет собой жирную кислоту, предпочтительно жирную кислоту, углеродный каркас которой состоит по меньшей мере из 10, предпочтительно по меньшей мере из 12 атомов углерода, предпочтительно по меньшей мере из 16 атомов углерода.

9. Антигенная конструкция по п. 8, где гидрофобный фрагмент представляет собой пальмитиновую кислоту.

10. Антигенная конструкция по п. 1, где гидрофильный или гидрофобный фрагмент ковалентно связан с каждым из концов пептида или пептидного фрагмента посредством по меньшей мере одной, предпочтительно одной или двух аминокислот, таких, например, как лизин, глутаминовая кислота и цистеин.

11. Антигенная конструкция по любому из пп. 1-10, где пептид дополнительно модифицирован посредством связывания с гидрофильным фрагментом.

12. Антигенная конструкция по п. 11, где гидрофильный фрагмент представляет собой полиэтиленгликоль.

13. Антигенная конструкция по любому из пп. 1-10, где тау-белок представляет собой человеческий белок.

14. Антигенная конструкция по п. 13, где указанный антигенный пептид соответствует последовательности в пределах тау-белка человека между

а. положениями 5 и 20, и в котором тирозин в положении 18 является фосфорилированным;

б. положениями 196-221, и в котором по меньшей мере одна, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно по меньшей мере три, но наиболее предпочтительно все четыре аминокислоты в положениях 202, 205, 212, 214 являются фосфорилированными;

в. положениями 393 и 408, и в котором по меньшей мере одна из аминокислот, но наиболее предпочтительно все аминокислоты в положениях 396 и 404 являются фосфорилированными;

г. положениями 401 и 418, и в котором по меньшей мере одна из аминокислот, но наиболее предпочтительно все аминокислоты в положениях 404 и 409 являются фосфорилированными;

д. положениями 200 и 216, и в котором по меньшей мере одна из аминокислот, но наиболее предпочтительно все аминокислоты в положениях 202 и 205 и/или положениях 212 и 214 являются фосфорилированными;

е. положениями 407 и 418, и в котором серин в положении 409 является фосфорилированным; или

ж. положениями 399 и 408, и в котором серин в положении 404 является фосфорилированным.

15. Антигенная конструкция по п. 13, где тау-пептид имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; SEQ

ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9.

16. Антигенная конструкция по п. 15, в которой две молекулы пальмитиновой кислоты ковалентно присоединены к N-терминальному концу и две молекулы пальмитиновой кислоты ковалентно присоединены к C-терминальному концу антигенного пептида.

17. Антигенная конструкция по п. 16, где последовательностью антигенного пептида с ковалентно присоединенными двумя молекулами пальмитиновой кислоты (Pal) на N-терминальном конце и двумя молекулами пальмитиновой кислоты на (Pal) на C-терминальном конце является H-K(Pal)-K(Pal)-VYKS(p)PVVSGDTS(p)PRHL-K(Pal)-K(Pal)-NH₂.

18. Антигенная конструкция по любому из предыдущих пунктов, предназначенная для применения при лечении нейродегенеративных нарушений, таких как таупатии.

19. Антигенная конструкция по п. 18, предназначенная для применения при лечении болезни Альцгеймера.

20. Фармацевтическая композиция, содержащая антигенную конструкцию по одному из предыдущих пунктов или их комбинацию для индукции иммунного ответа у животного, страдающего нейродегенеративным расстройством.

21. Фармацевтическая композиция по п. 20, которая содержит фармацевтически приемлемый адъювант и/или иммуномодулятор.

22. Фармацевтическая композиция, которая является вакциной, содержащей антигенный пептид, соответствующий последовательности в пределах тау-белка, включающий фосфо-эпитоп, где пептидом является (а), модифицированный путем связывания с липофильным или гидрофобным фрагментом, который облегчает встраивание в липидный бислой липосомы, и (б), реконструированный в липосому так, что пептид презентируется на поверхности липосомы, и дополнительно включающей фармацевтические приемлемый адъювант и/или иммуномодулятор, где антигенный пептид имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, а липофильный и гидрофильный фрагмент является пальмитиновой кислотой, ковалентно связанной с каждым из концов пептида, для индукции иммунного ответа у животного, страдающего нейродегенеративным расстройством.

23. Фармацевтическая композиция, которая является вакциной, содержащей антигенный пептид, соответствующий последовательности в пределах тау-белка, включающий фосфо-эпитоп, где пептидом является (а), модифицированный путем связывания с липофильным или гидрофобным фрагментом, который облегчает встраивание в липидный бислой липосомы, и (б), реконструированный в липосому так, что пептид презентируется на поверхности липосомы, и дополнительно включающей фармацевтические приемлемый адъювант и/или иммуномодулятор, где антигенный пептид имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, а липофильный и гидрофильный фрагмент является пальмитиновой кислотой, ковалентно связанной с каждым из концов пептида, для индукции иммунного ответа у животного, страдающего нейродегенеративным расстройством.

24. Фармацевтическая композиция, которая является вакциной, содержащей антигенный пептид, соответствующий последовательности в пределах тау-белка, включающий фосфо-эпитоп, где пептидом является (а), модифицированный путем связывания с липофильным или гидрофобным фрагментом, который облегчает встраивание в липидный бислой липосомы, и (б), реконструированный в липосому так, что пептид презентируется на поверхности липосомы, и дополнительно включающей фармацевтические приемлемый адъювант и/или иммуномодулятор, где антигенный пептид имеет аминокислотную последовательность как SEQ ID NO: 3, так и SEQ ID NO:

4, а липофильный и гидрофильный фрагмент является пальмитиновой кислотой, ковалентно связанной с каждым из концов пептида, для индукции иммунного ответа у животного, страдающего нейродегенеративным расстройством.

25. Фармацевтическая композиция по п. 23 или 24, содержащая пептид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 3, и антигенный пептид, имеющий обе последовательности SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, где пептид является тетрапальмитинированным, и монофосфорильный липид А.

26. Фармацевтическая композиция по п. 22, включающая пептид SEQ ID NO: 5, который является тетрапальмитинированным, и монофосфорильный липид А.

27. Фармацевтическая композиция по п. 25, где две молекулы пальмитиновой кислоты ковалентно присоединены к N-терминальному концу и две молекулы пальмитиновой кислоты к C-терминальному концу антигенного пептида.

28. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 21-24, в которой иммуномодулятор представляет собой детоксифицированный липид А, такой, например, как монофосфорильный или дифосфорильный липид А.

29. Фармацевтическая композиция по одному пп. 21-24, предназначенная для применения при лечении нейродегенеративного нарушения, такого как таупатия.

30. Фармацевтическая композиция по п. 28, предназначенная для применения при лечении нейродегенеративного нарушения, такого как таупатия.

31. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 20-24 и 26 для лечения заболеваний и нарушений, которые вызываются или ассоциированы с образованием нейрофибриллярных повреждений, основной патологии головного мозга при таупатии, которые включают гетерогенную группу нейродегенеративных заболеваний или нарушений, включая заболевания или нарушения, которые характеризуются одновременным существованием тау- и амилоидной патологии, включая (но не ограничиваясь только ими) болезнь Альцгеймера, болезнь Крейтцфельда-Якоба, боксерскую деменцию, синдром Дауна, болезнь Герстманна-Штреусслера-Шейнкера, миозит с тельцами включения, церебральную амилоидную ангиопатию, связанную с белком-прионом, травматическое повреждение головного мозга, а также другие заболевания или нарушения без четкой амилоидной патологии, включая (но, не ограничиваясь только ими) комплекс амиотрофический боковой склероз /паркинсонизм-деменция (синдром Гуама), не-гуамовского типа болезнь моторных нейронов, связанную с нейрофибриллярными сплетениями, деменцию, связанную с накоплением аргирофильных зерен, кортикобазальную дегенерацию, диффузные нейрофибриллярные сплетения с кальцификацией, фронтотемпоральную деменцию с паркинсонизмом, сцепленную с хромосомой 17, болезнь Галлервордена-Шпатца, множественную системную атрофию, болезнь Ниманна-Пика типа С, болезнь Пика, прогрессирующий субкортикальный глиоз, прогрессирующий супрануклеарный панэнцефалит, подострый склерозирующий панэнцефалит, деменцию, связанную только со сплетениями, постэнцефалический паркинсонизм, миотоническую дистрофию.

32. Фармацевтическая композиция по любому пп. 20-24 и 26 для применения при лечении болезни Альцгеймера.

33. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 20-24 и 26 для применения индукции иммунного ответа у животного, предпочтительно млекопитающего или человека, страдающего нейродегенеративным нарушением, таким как таупатия.

34. Применение антигенной конструкции по любому пп. 1-19 для приготовления лекарственного средства для применения при лечении нейродегенеративных заболеваний или нарушений, включая заболевания или нарушения, которые вызываются или

ассоциированы с образованием нейрофибриллярных повреждений и характеризуются одновременным существованием тау- и амилоидной патологии, или болезни Альцгеймера, болезни Крейтцфельда-Якоба, боксерской деменции, синдрома Дауна, болезни Герстманна-Штреусслера-Шейнкера, миозита с тельцами включения, 5 церебральной амилоидной ангиопатии, связанной с белком-прионом, травматического повреждения головного мозга, а также других заболеваний или нарушений без четкой амилоидной патологии, включая (но, не ограничиваясь только ими) комплекс амиотрофический боковой склероз /паркинсонизм-деменция (синдром Гуама), не-гуамовского типа болезнь моторных нейронов, связанную с нейрофибриллярными 10 сплетениями, деменцию, связанную с накоплением аргирофильных зерен, кортикобазальную дегенерацию, диффузные нейрофибриллярные сплетения с кальцификацией, фронтотемпоральную деменцию с паркинсонизмом, сцепленную с хромосомой 17, болезнь Галлервордена-Шпатца, множественную системную атрофию, болезнь Ниманна-Пика типа С, болезнь Пика, прогрессирующий субкортикальный 15 глиоз, прогрессирующий супрануклеарный панэнцефалит, подострый склерозирующий панэнцефалит, деменцию, связанную только со сплетениями, постэнцефалический паркинсонизм, миотоническую дистрофию.

20

25

30

35

40

45

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> АЦ Иммуне С.А.
 К.У.Лёвен Рисёрч & Дивелоппмент
 <120> Фармацевтическая композиция
 <130> P2654 PCT BS
 <150> 09157303.0
 <151> 2009-04-03
 <160> 9
 <170> PatentIn, версия 3.4
 <210> 1
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> ACI-37
 <220>
 <221> вариация
 <222> (18)..(18)
 <223> /замена= «фосфорилированный серин»
 <220>
 <221> вариация
 <222> (26)..(26)
 <223> /замена= «фосфорилированный серин»
 <400> 1

Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr
 1 5 10 15
 Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu
 20 25 30

<210> 2
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> ACI-33
 <220>
 <221> вариация
 <222> (14)..(14)
 <223> /замена= «фосфорилированный тирозин»
 <400> 2

Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly Thr Tyr Gly Leu
 1 5 10 15

<210> 3
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> ACI-39
 <220>
 <221> вариация
 <222> (7)..(7)
 <223> /замена= «фосфорилированный треонин»
 <220>
 <221> вариация
 <222> (9)..(9)

<223> /замена= «фосфорилированный серин»
 <400> 3
 Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg
 1 5 10 15
 <210> 4
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> ACI-40
 <220>
 <221> вариация
 <222> (7) .. (7)
 <223> /замена= «фосфорилированный серин»
 <220>
 <221> вариация
 <222> (10) .. (10)
 <223> /замена= «фосфорилированный треонин»
 <400> 4
 Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg
 1 5 10 15
 <210> 5
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> ACI-35
 <220>
 <221> вариация
 <222> (4) .. (4)
 <223> /замена= «фосфорилированный серин»
 <220>
 <221> вариация
 <222> (12) .. (12)
 <223> /замена= «фосфорилированный серин»
 <400> 5
 Val Tyr Lys Ser Pro val val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu
 1 5 10 15
 <210> 6
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> ACI-36
 <220>
 <221> вариация
 <222> (4) .. (4)
 <223> /замена= «фосфорилированный серин»
 <220>
 <221> вариация
 <222> (9) .. (9)
 <223> /замена= «фосфорилированный серин»
 <400> 6
 Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn val Ser Ser Thr Gly Ser
 1 5 10 15
 Ile Asp
 <210> 7

<211> 17
 <212> PRT
 <213> ACI-34

<220>
 <221> вариация
 <222> (3) .. (3)
 <223> /замена= «фосфорилированный серин»

<220>
 <221> вариация
 <222> (6) .. (6)
 <223> /замена= «фосфорилированный треонин»»

<220>
 <221> вариация
 <222> (13) .. (13)
 <223> /замена= «фосфорилированный треонин»

<220>
 <221> вариация
 <222> (15) .. (15)
 <223> /замена= «фосфорилированный серин»

<400> 7

Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu
 1 5 10 15

Pro

<210> 8
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> ACI-42

<220>
 <221> вариация
 <222> (3) .. (3)
 <223> /замена= «фосфорилированный серин»

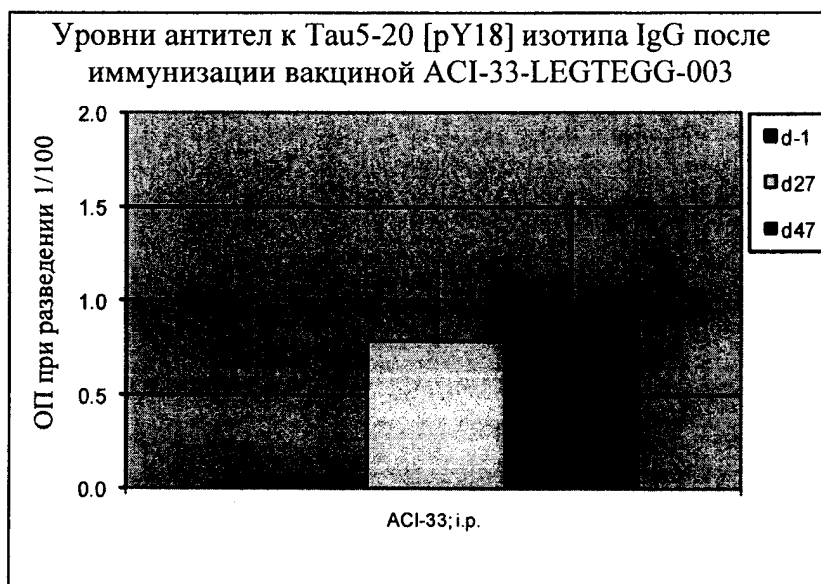
<400>8

His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser lie Asp
 1 5 10

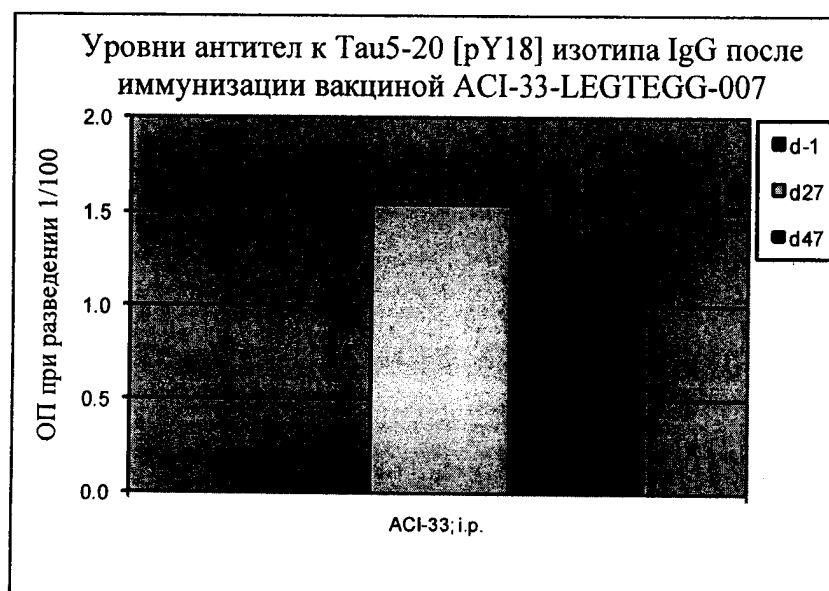
<210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> ACI-43

<220>
 <221> вариация
 <222> (6) .. (6)
 <223> /замена= «фосфорилированный серин»
 <400> 9

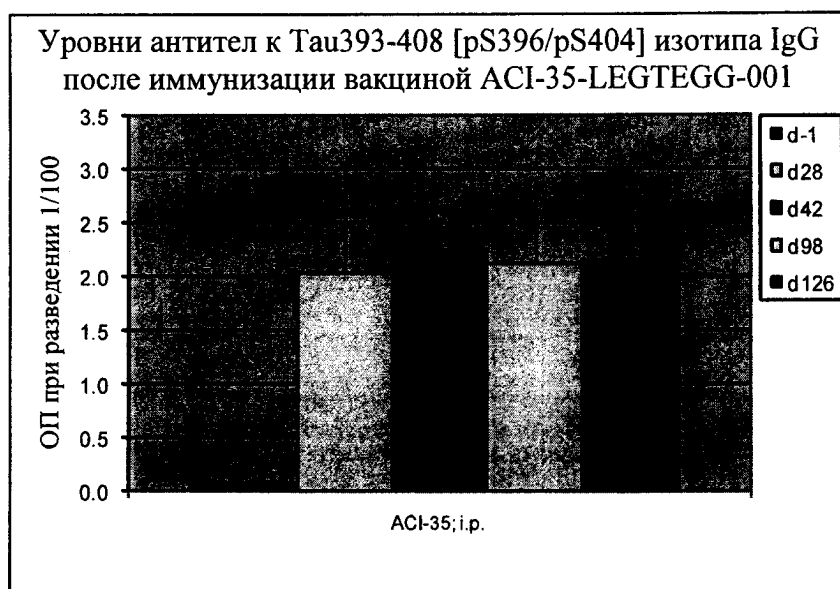
Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu
 1 5 10



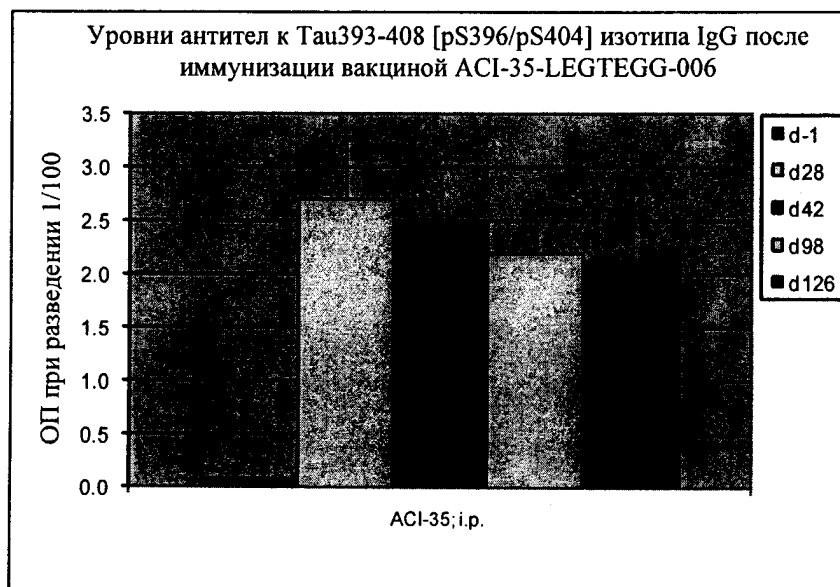
Фиг. 1a



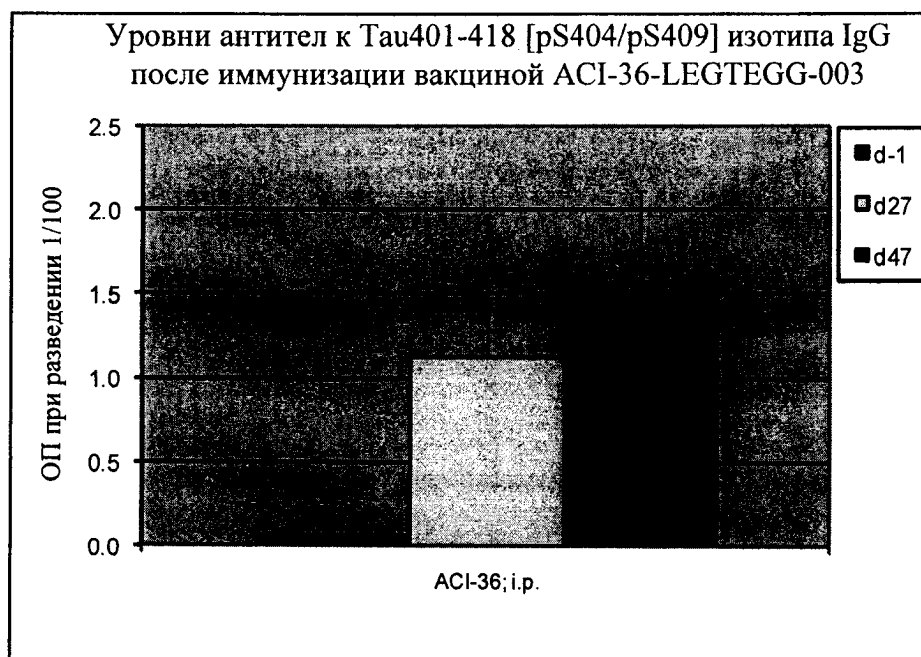
Фиг. 1б



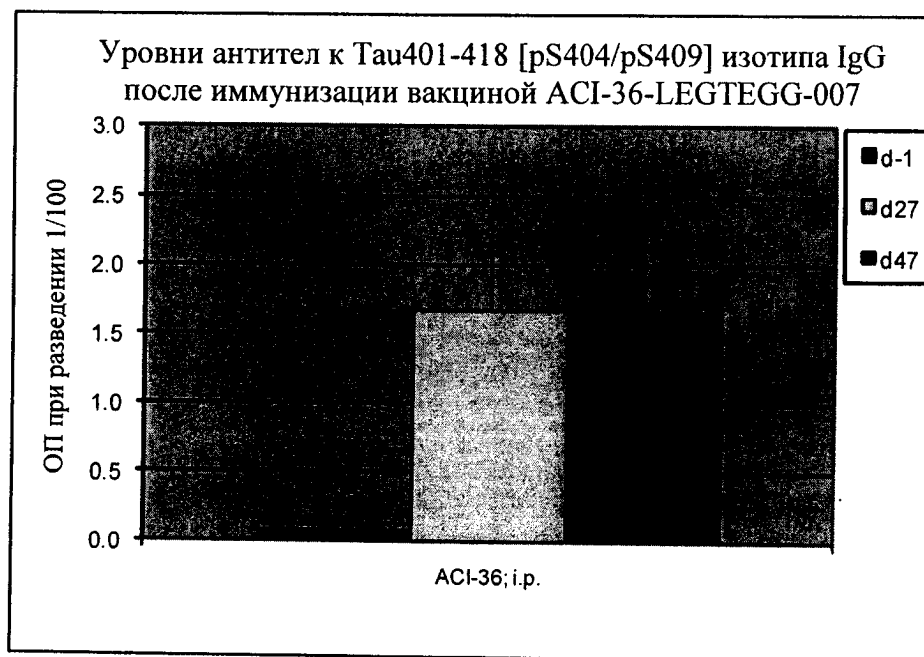
Фиг. 2а



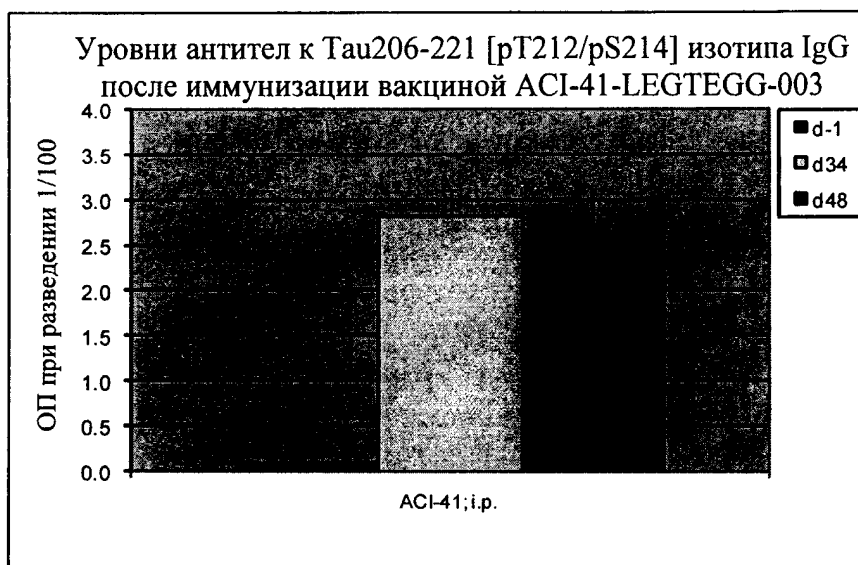
Фиг. 2б



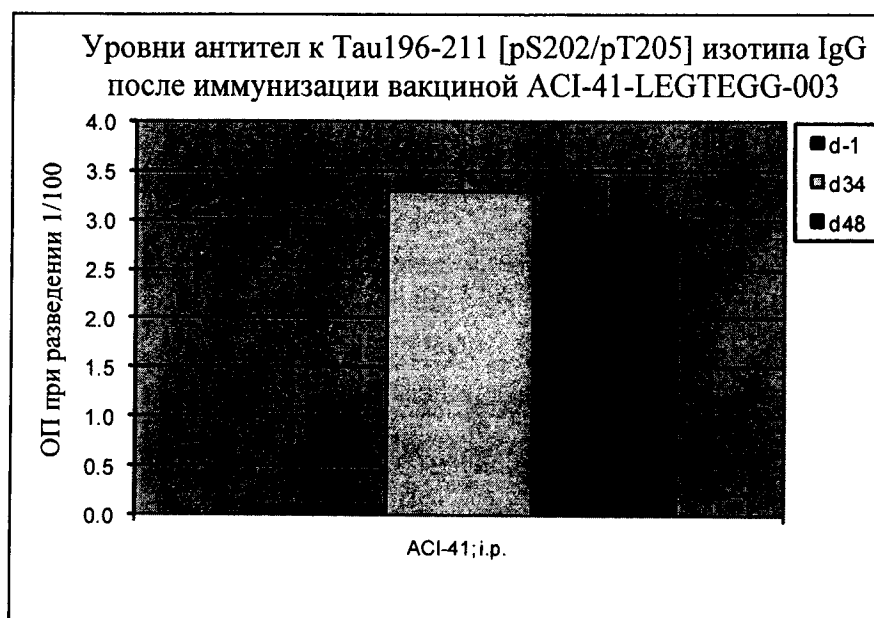
Фиг. 3а



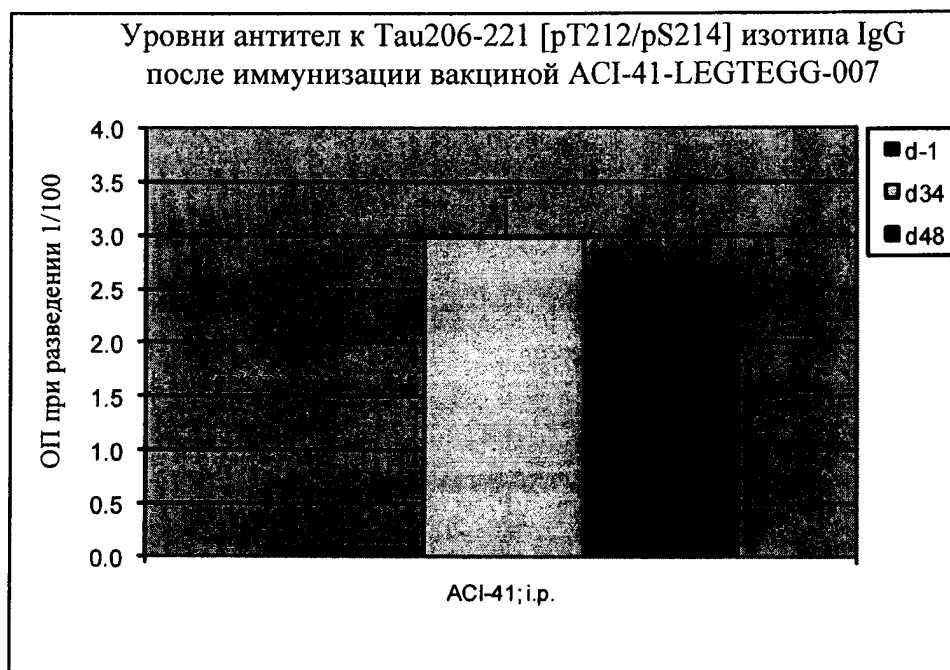
Фиг. 3б



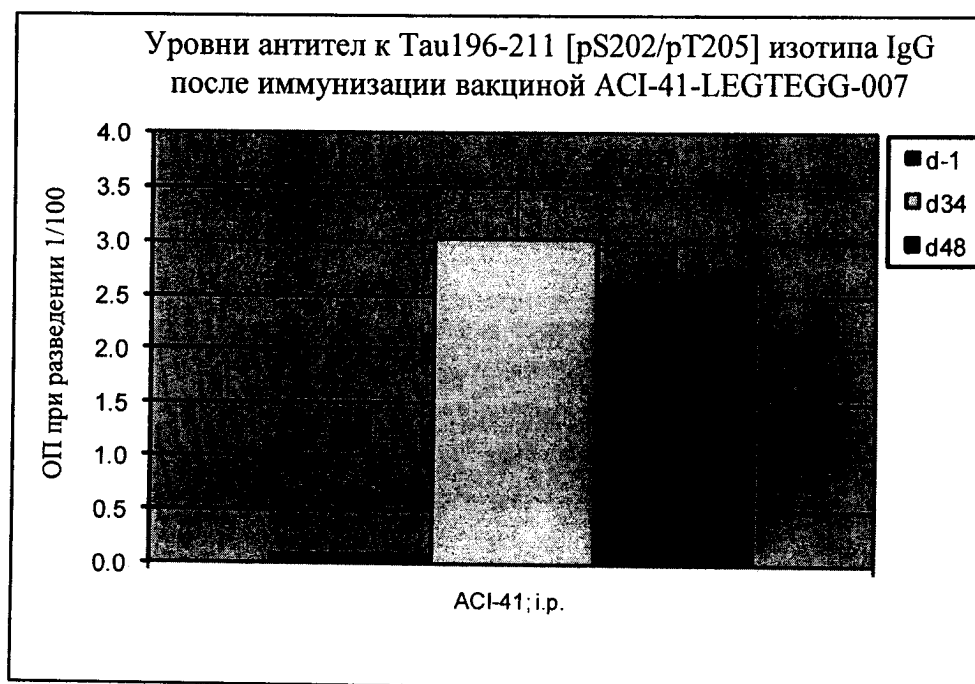
Фиг. 4а



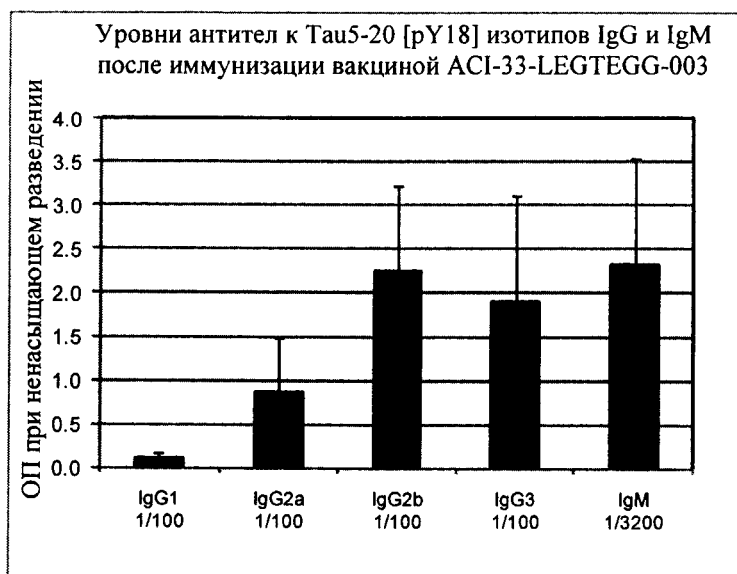
Фиг. 4б



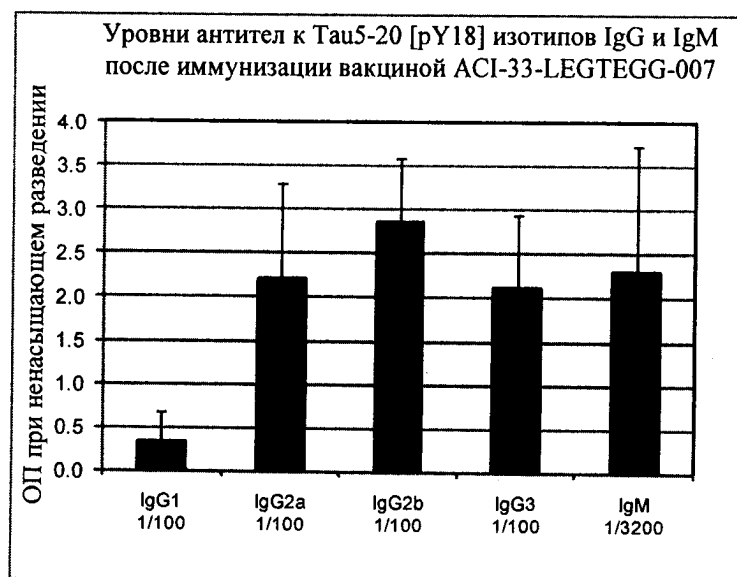
Фиг. 4в



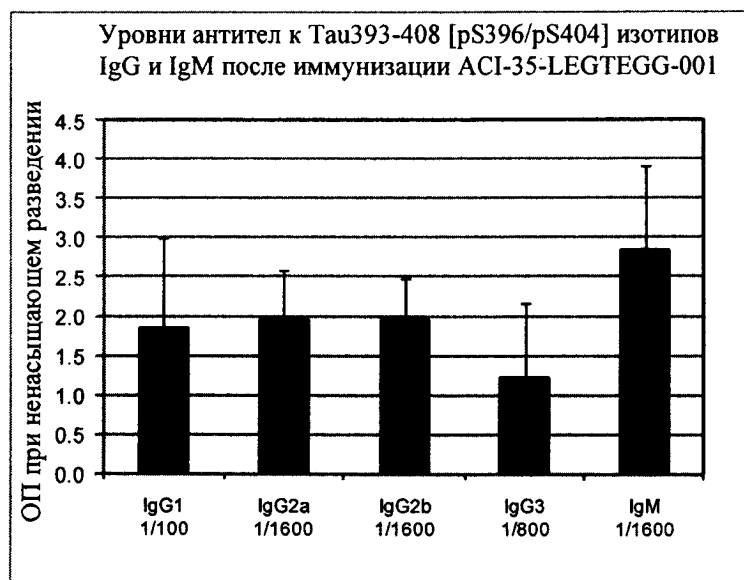
Фиг. 4г



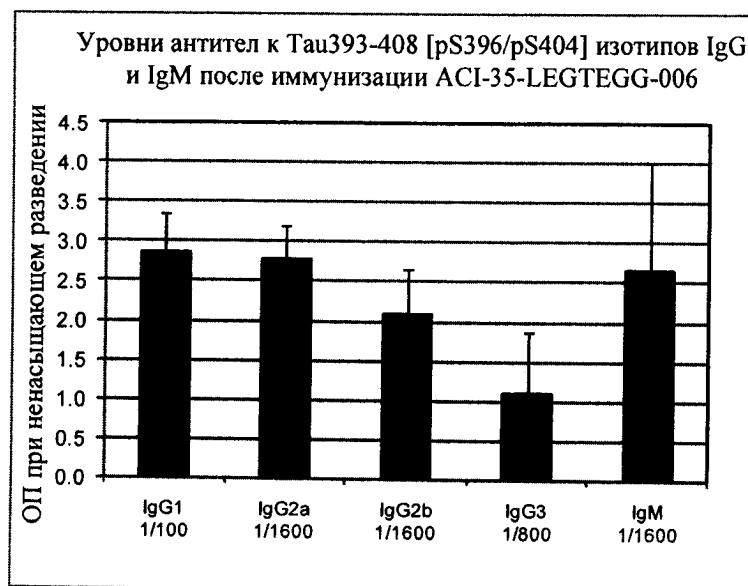
Фиг. 5а



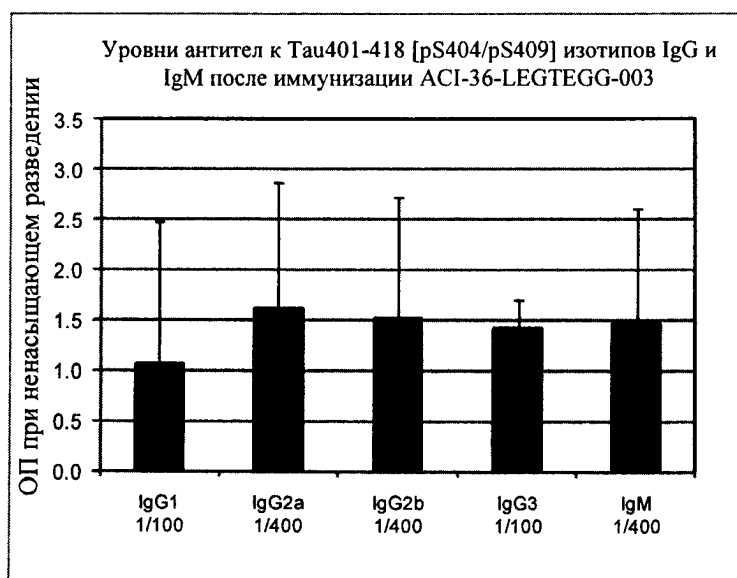
Фиг. 5б



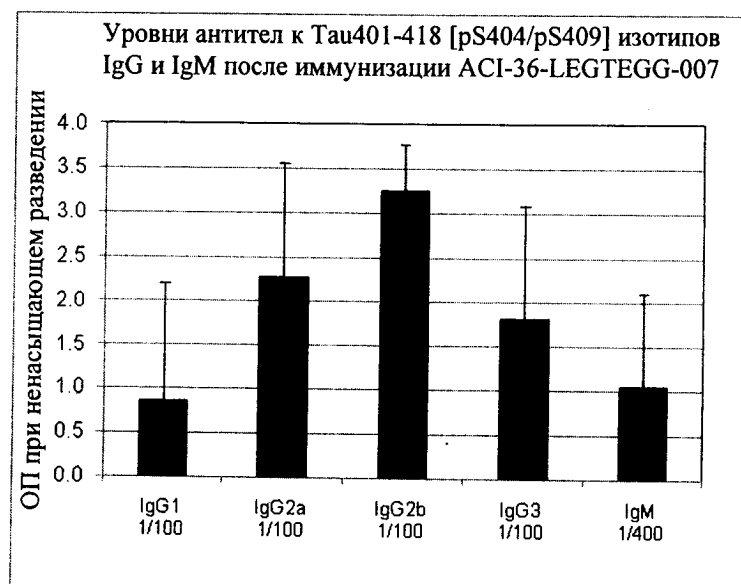
Фиг. 6а



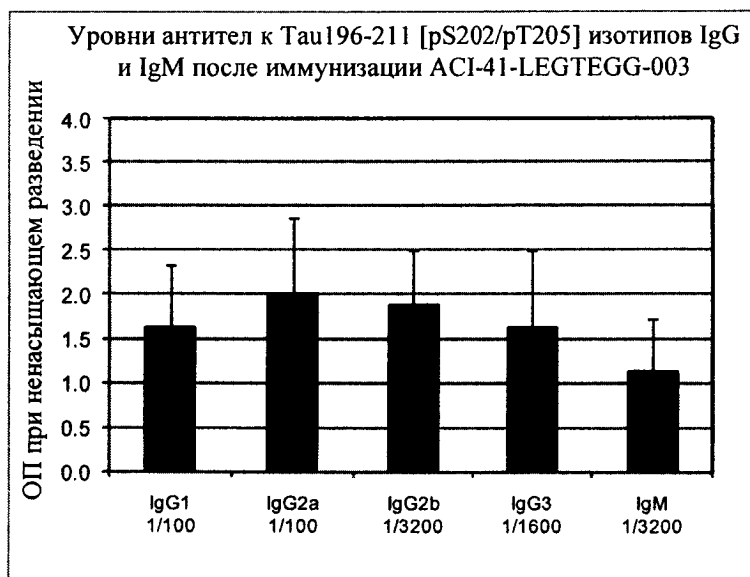
Фиг. 6б



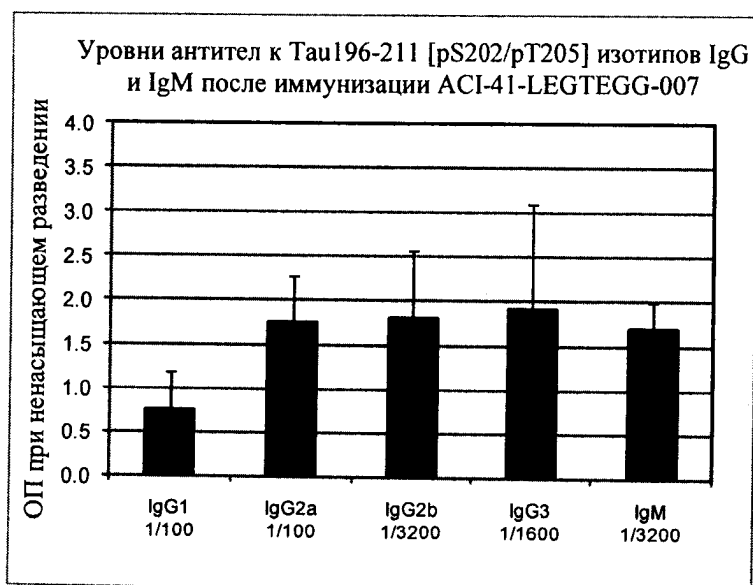
Фиг. 7а



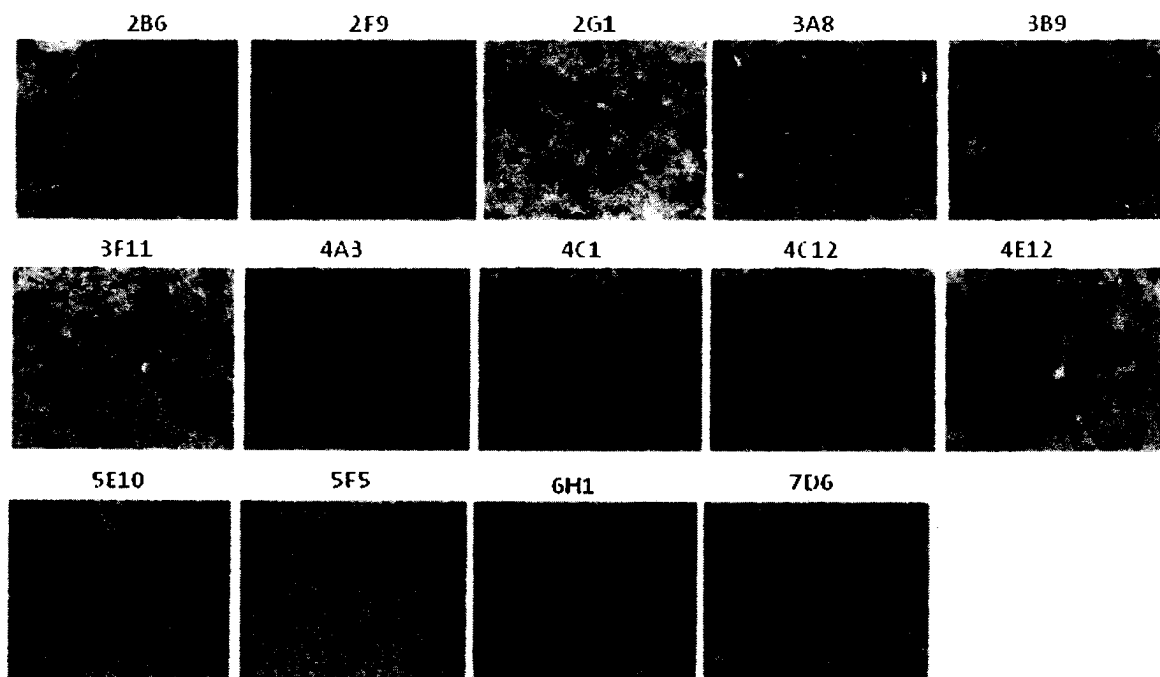
Фиг. 7б



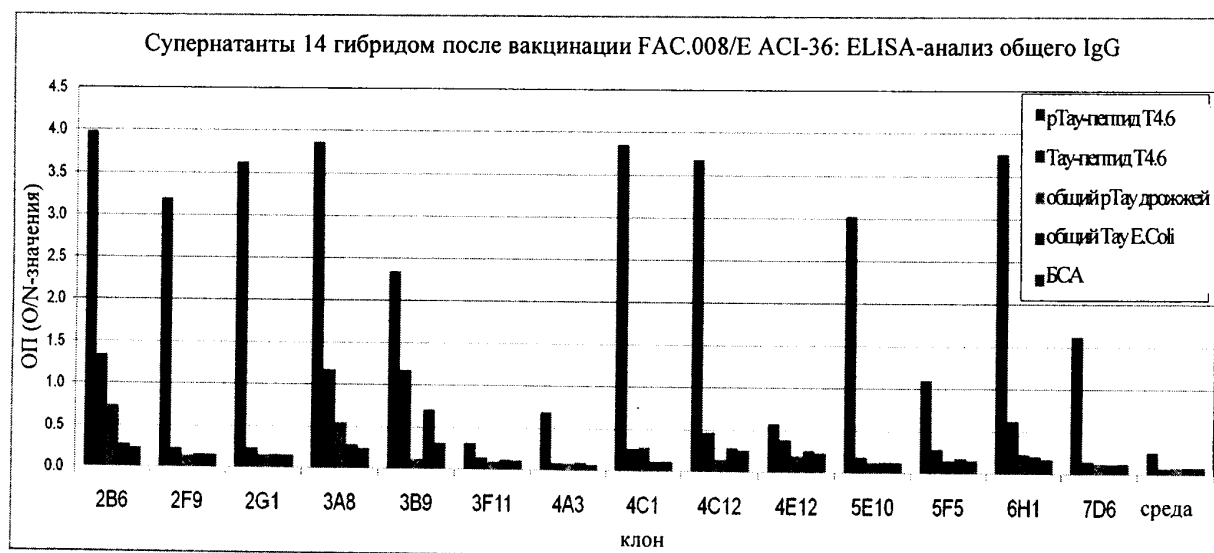
Фиг. 8а



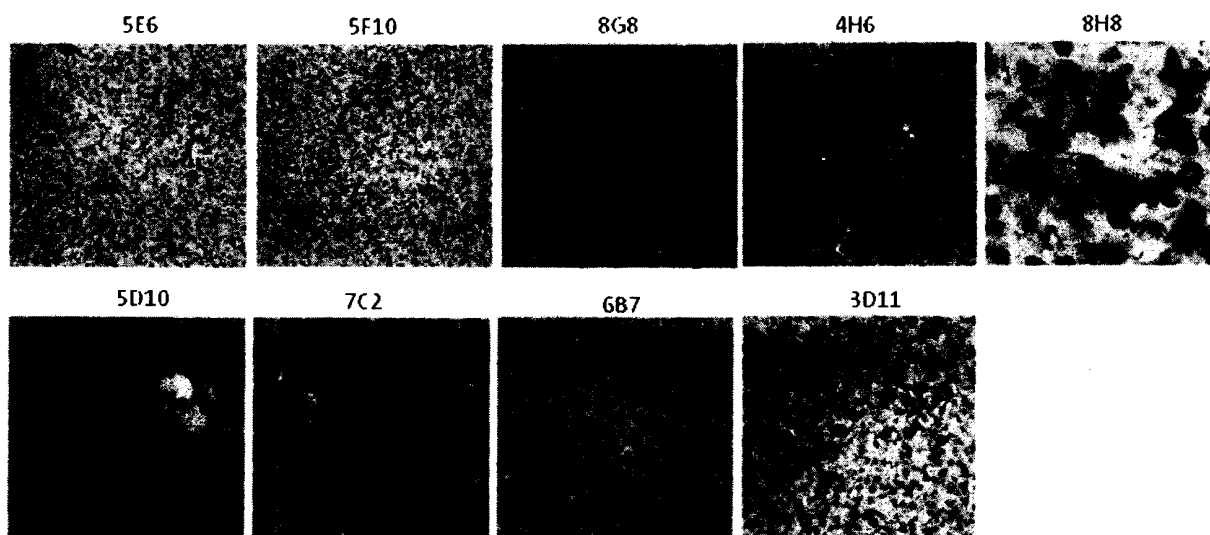
Фиг. 8б



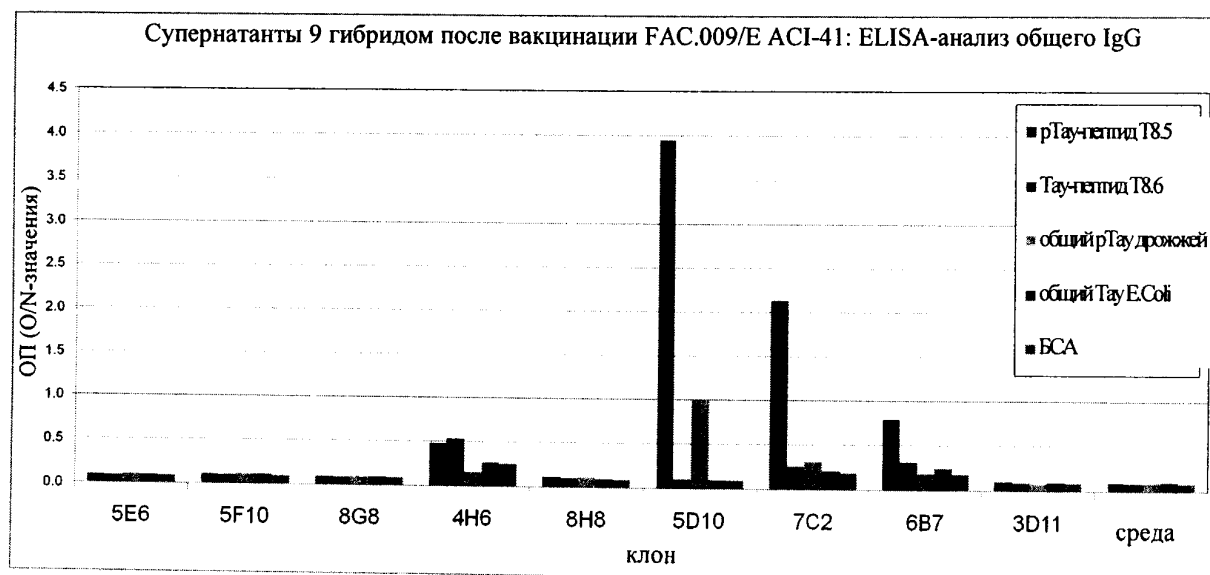
Фиг. 9а



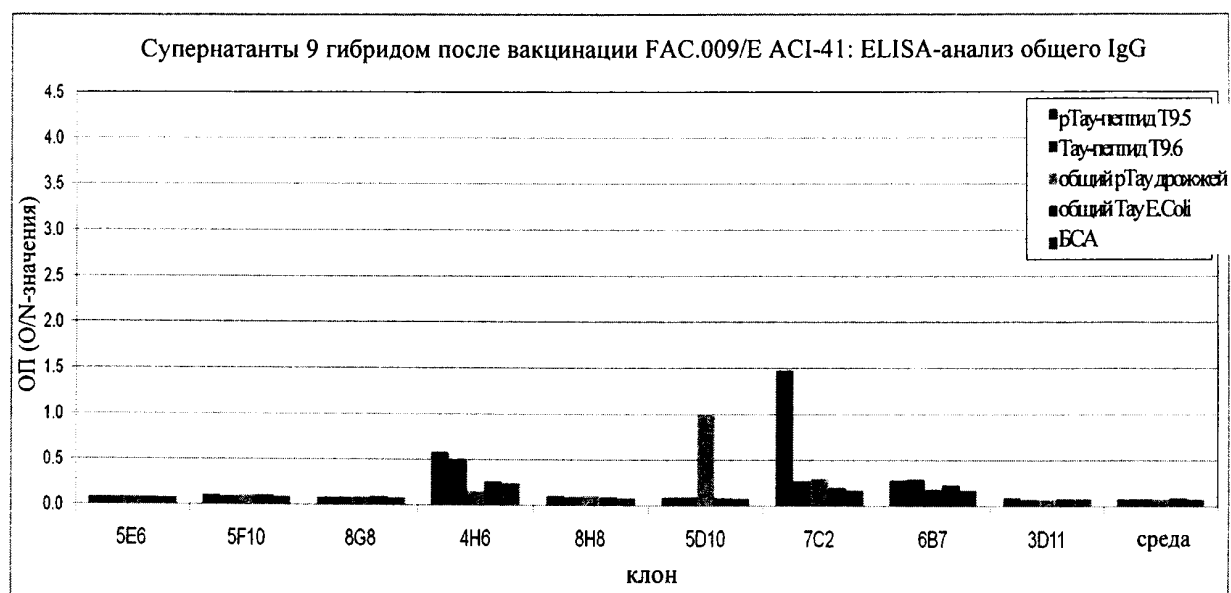
Фиг. 9б



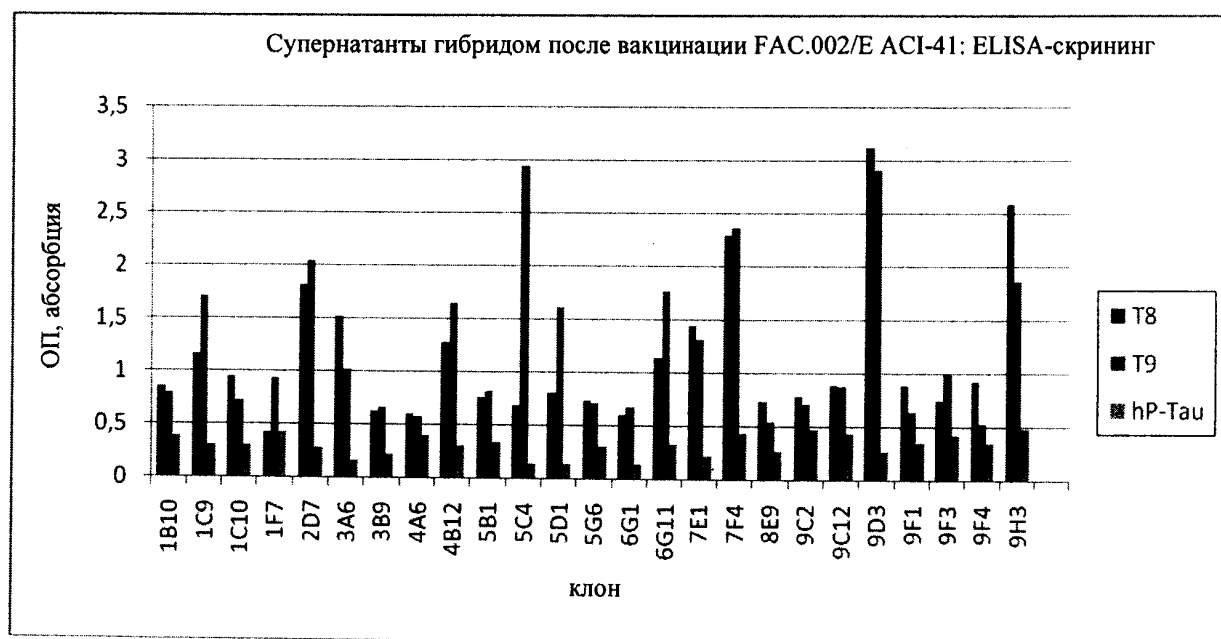
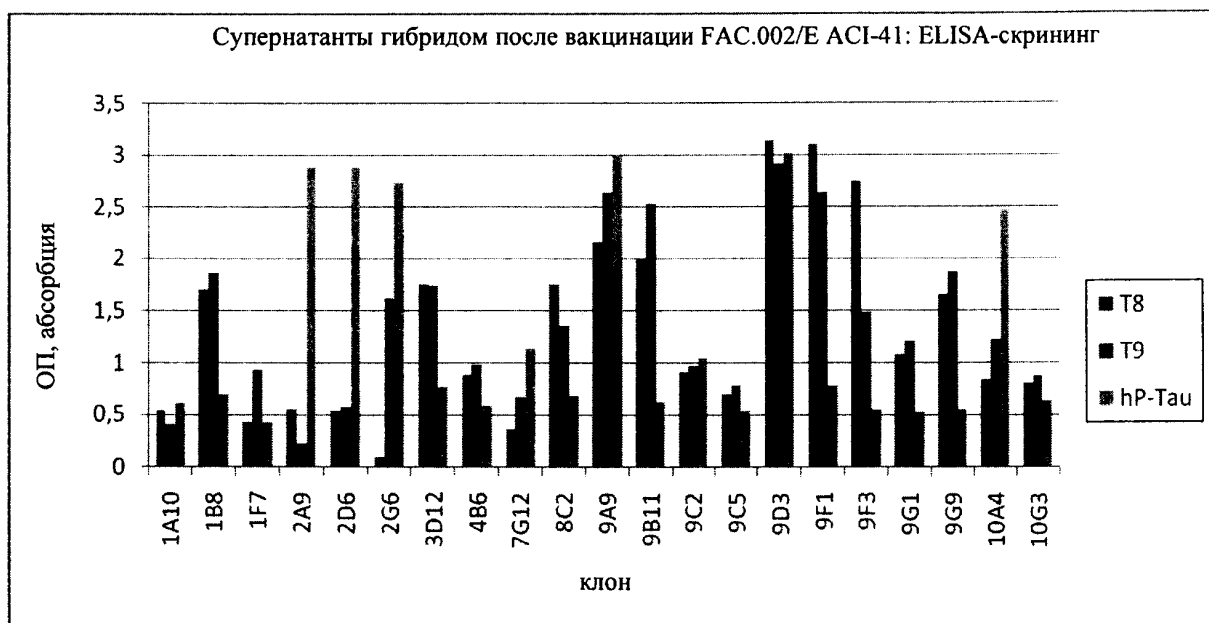
Фиг. 10а



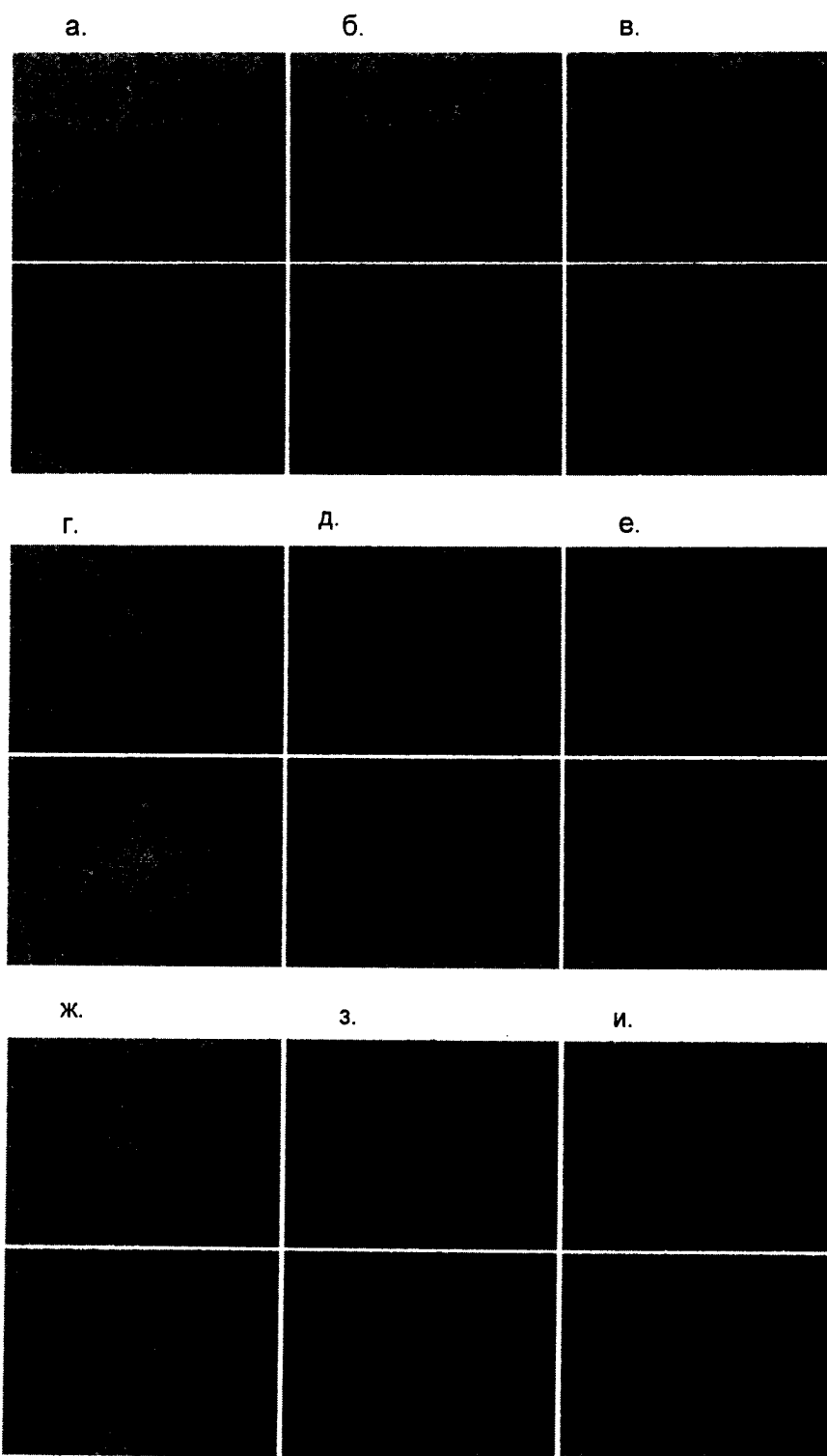
Фиг. 10б



Фиг. 10в

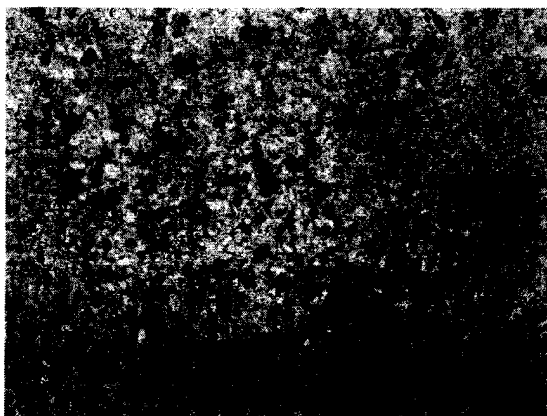


Фиг. 11

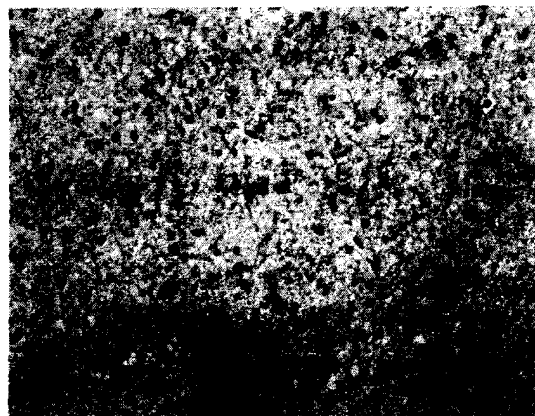


Фиг. 12

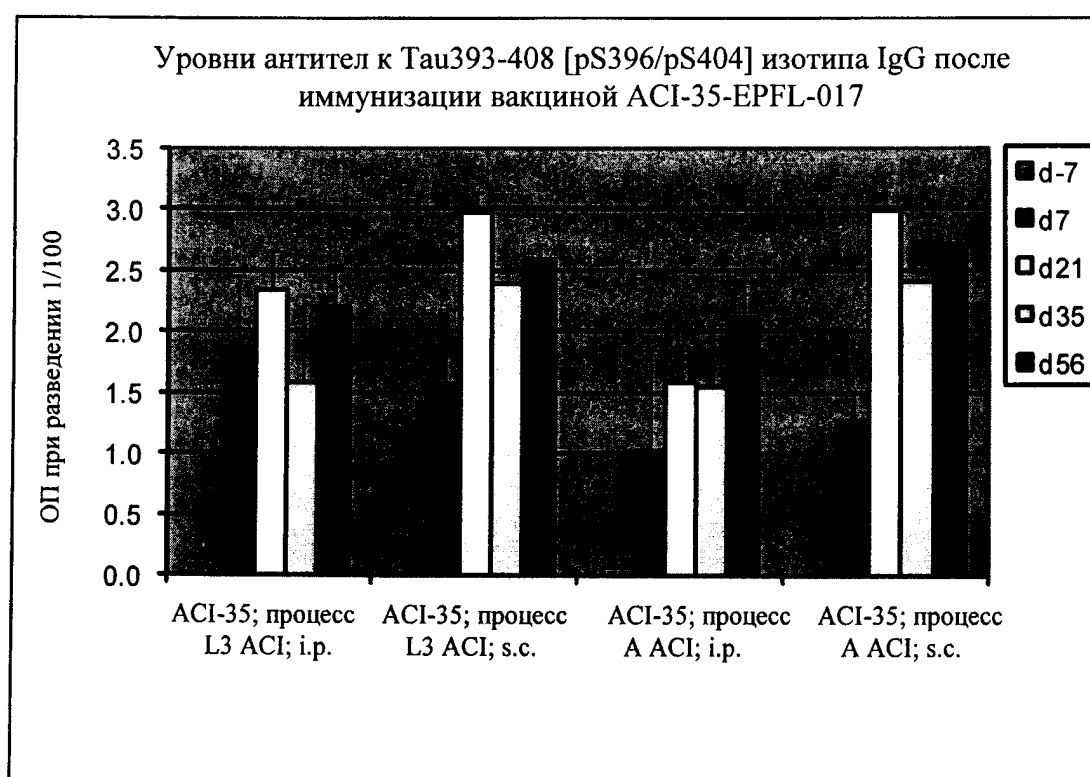
а.



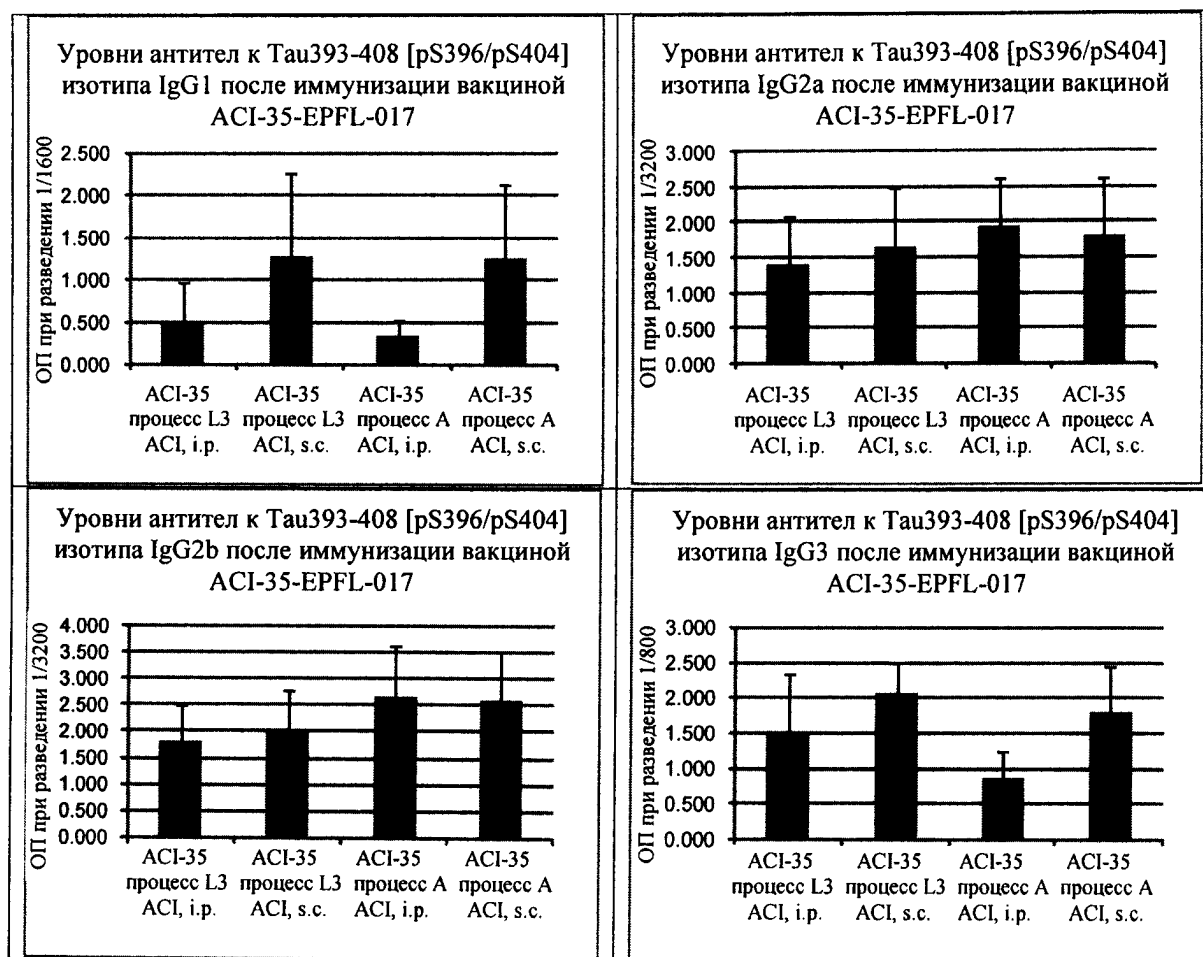
б.



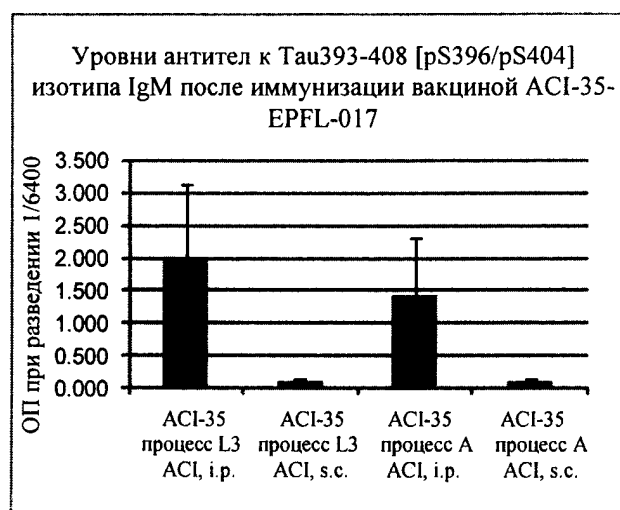
Фиг. 13



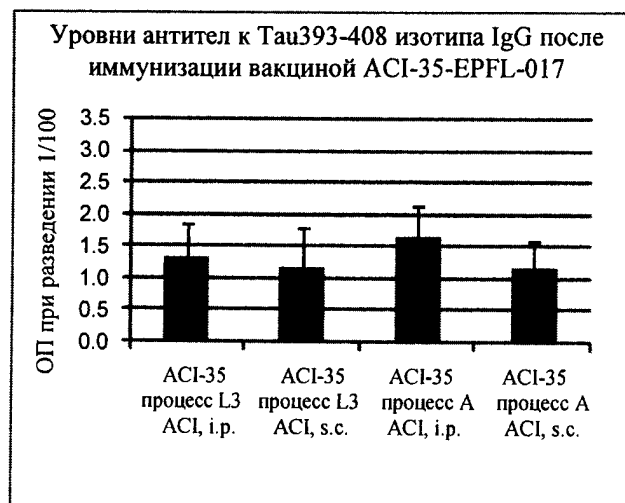
Фиг. 14



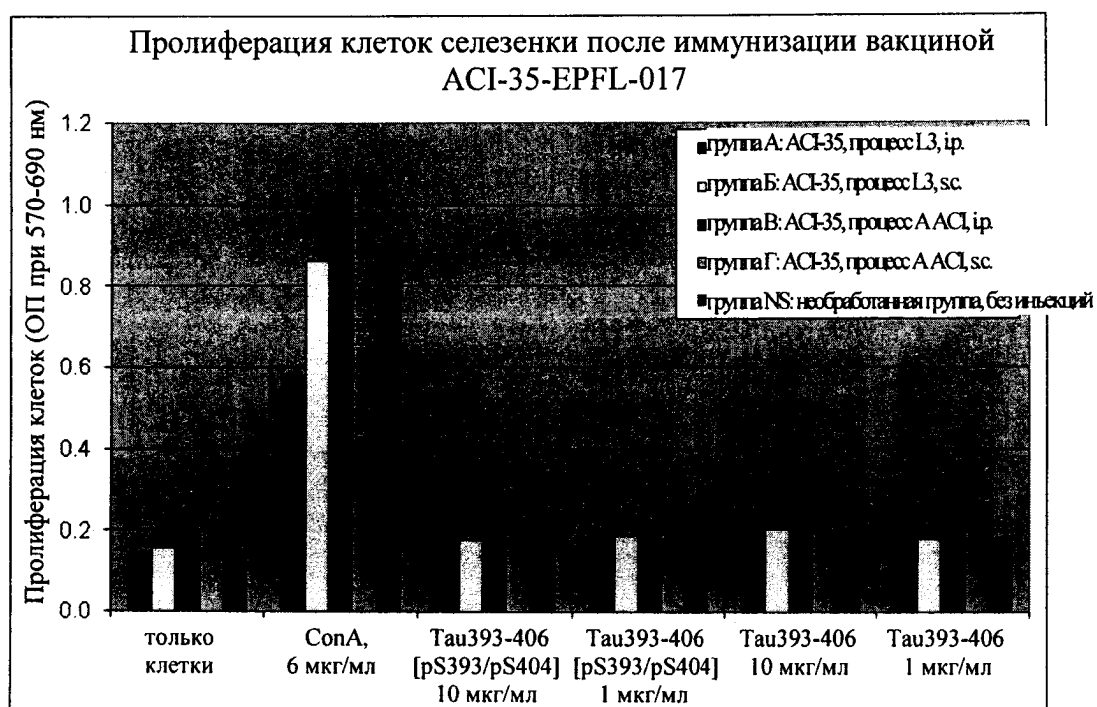
Фиг. 15



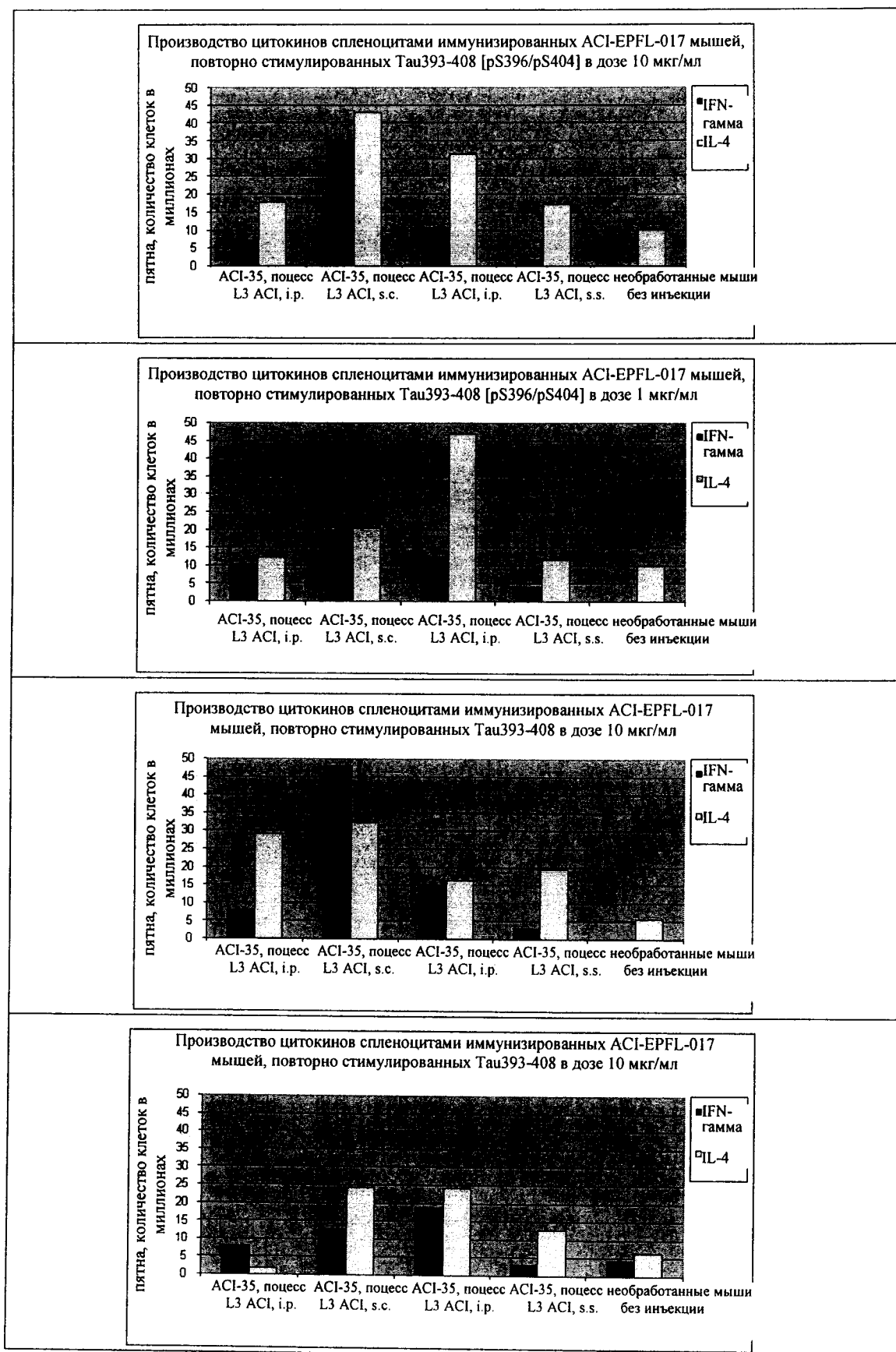
Фиг. 16а



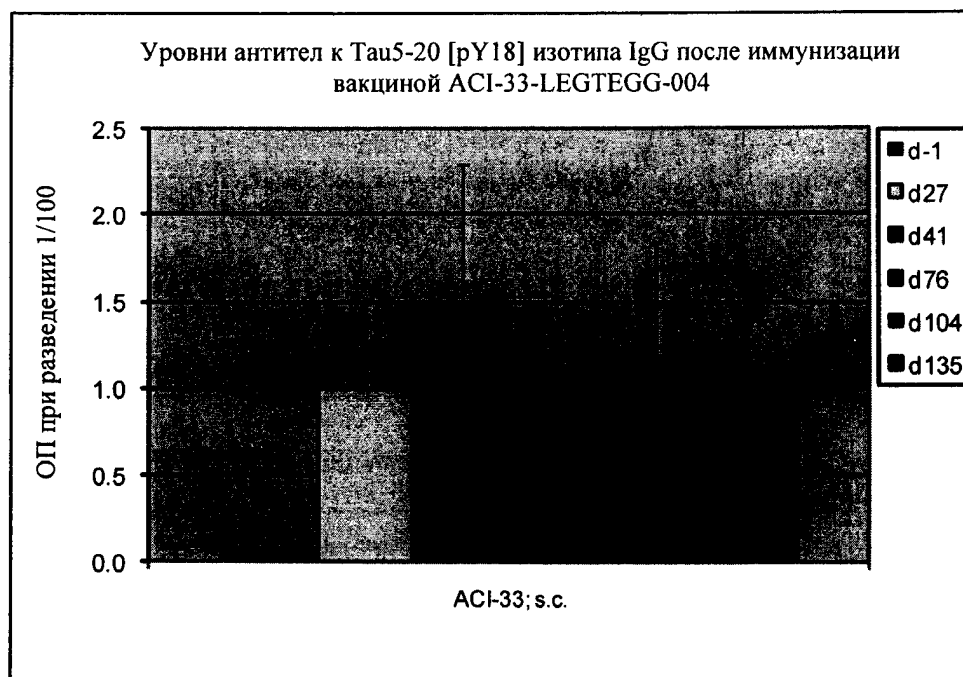
Фиг. 166



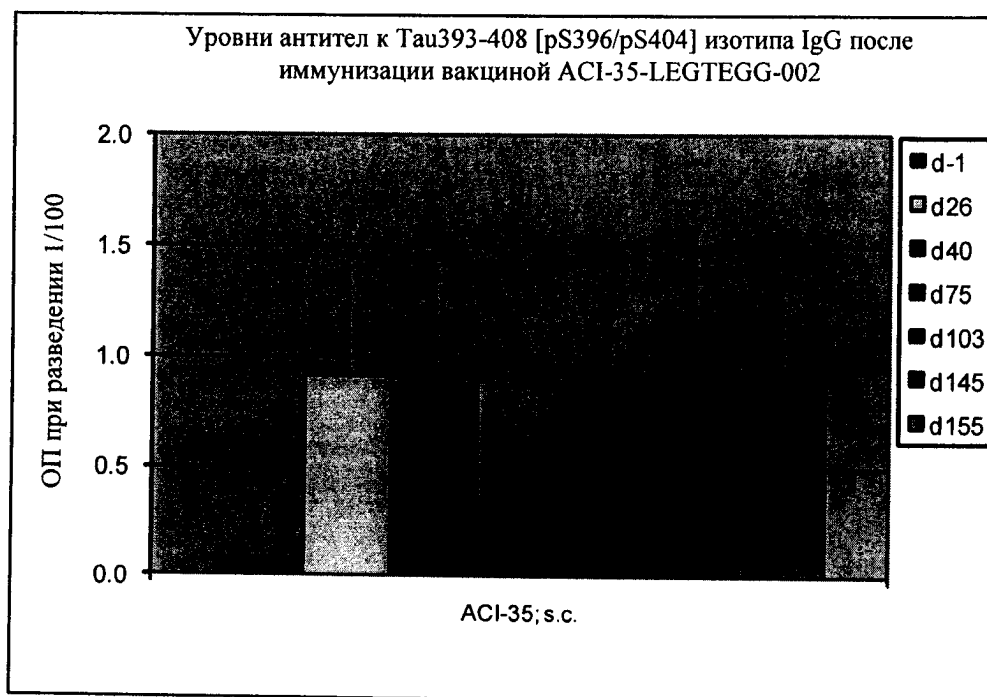
Фиг. 17



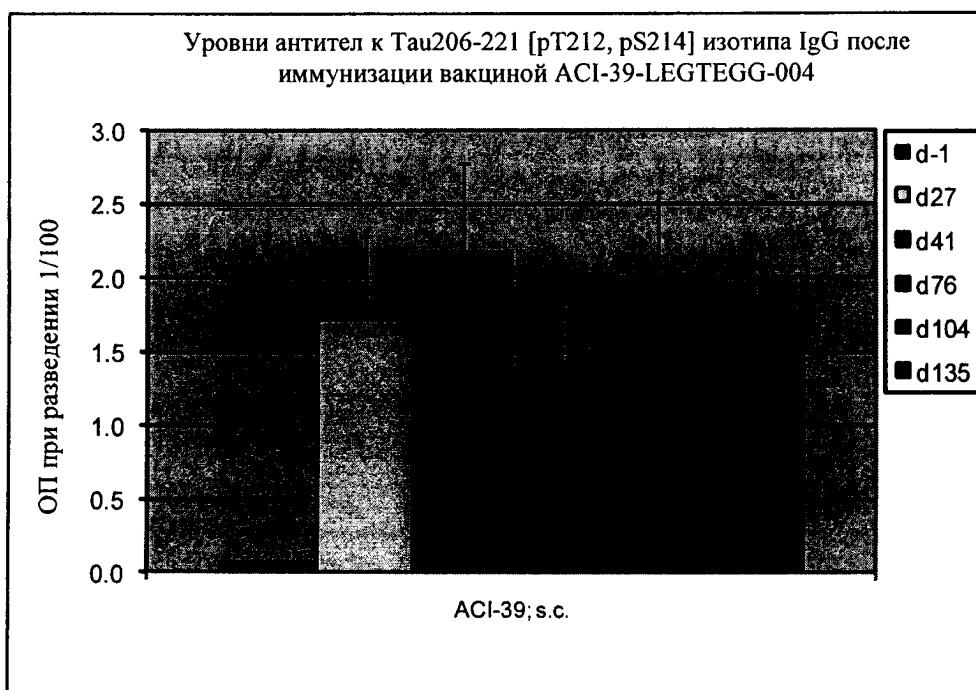
Фиг. 18



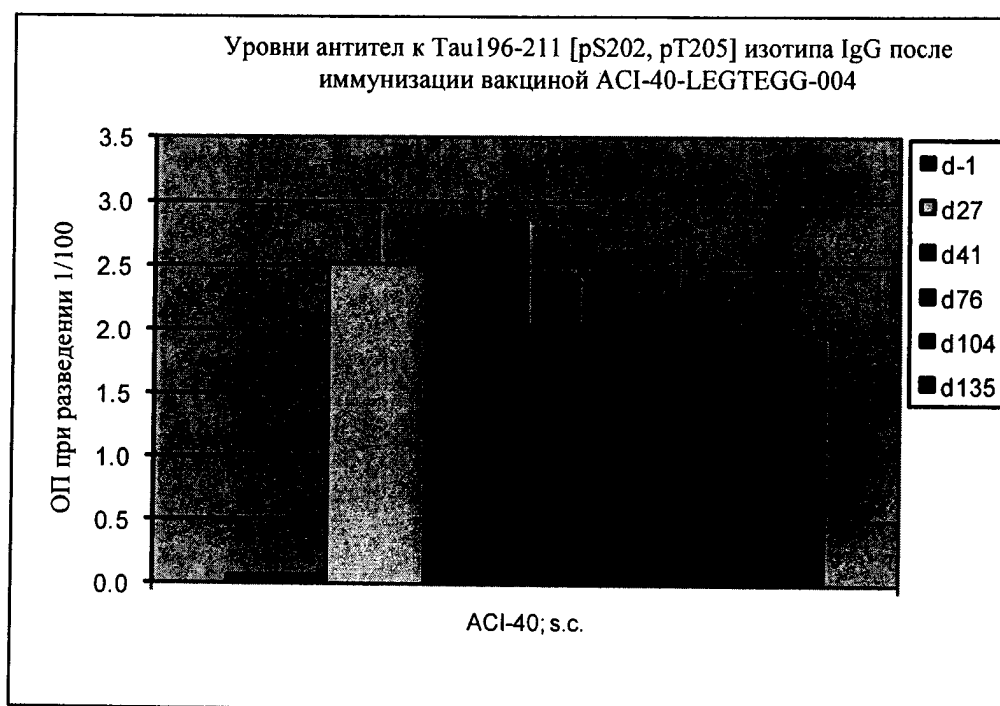
Фиг. 19



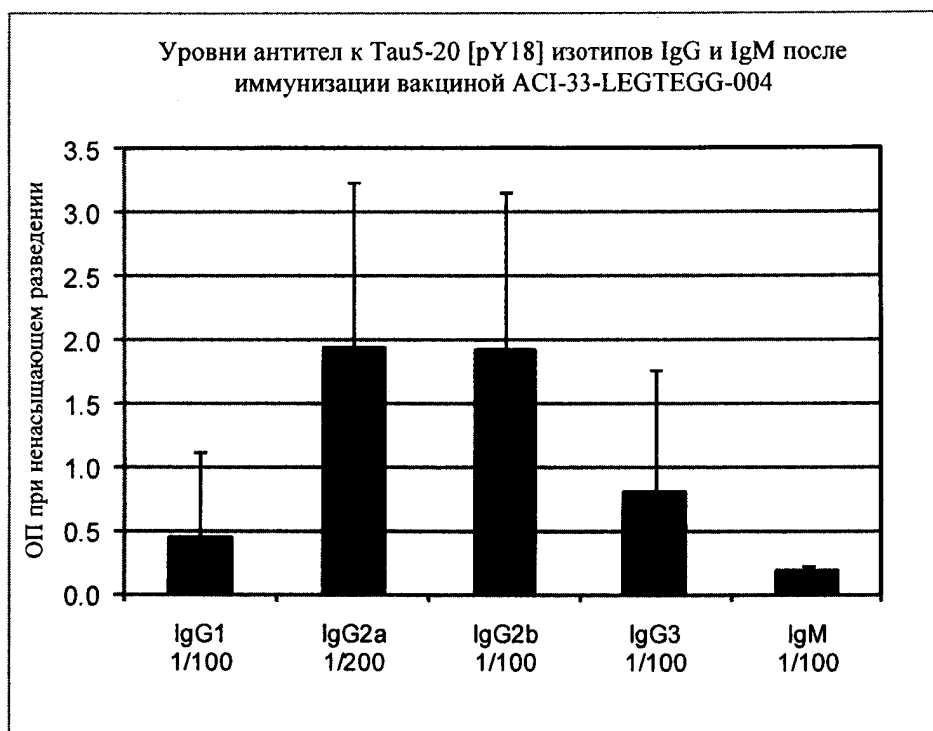
Фиг. 20



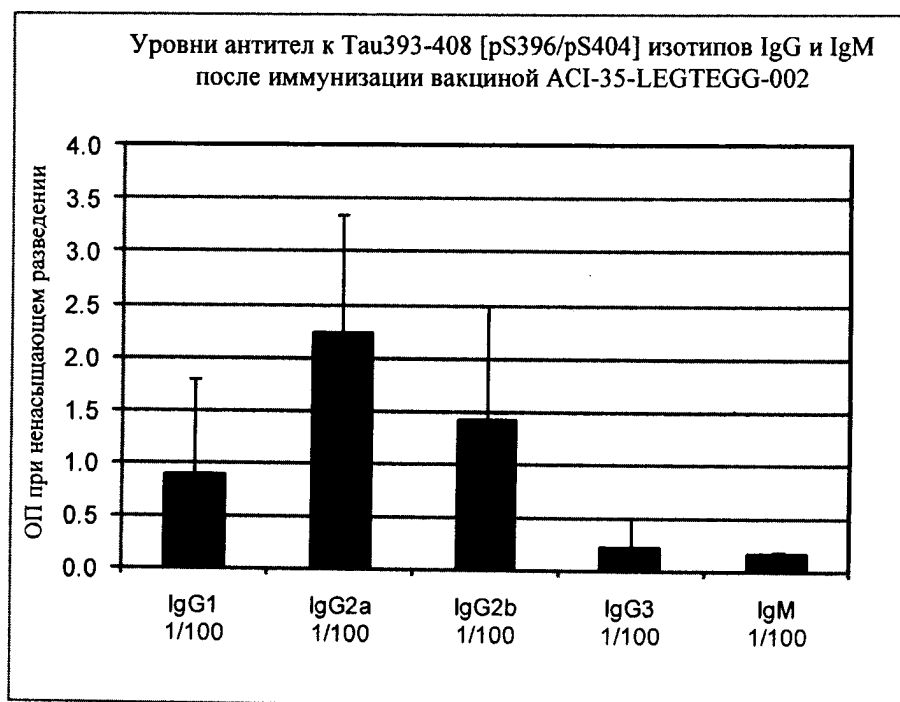
Фиг. 21



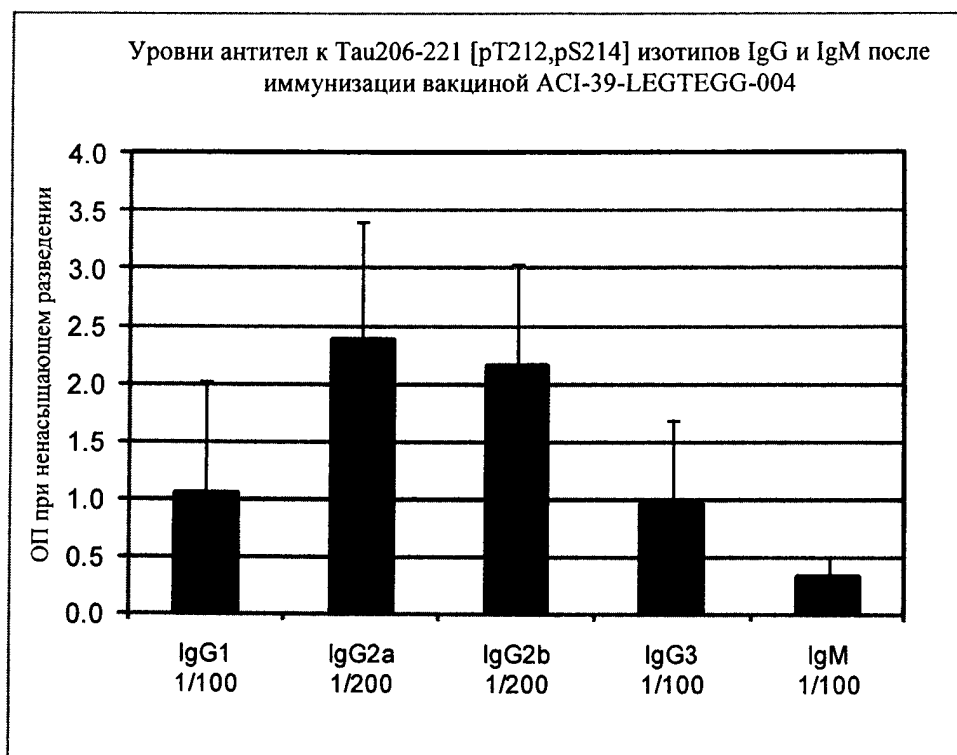
Фиг. 22



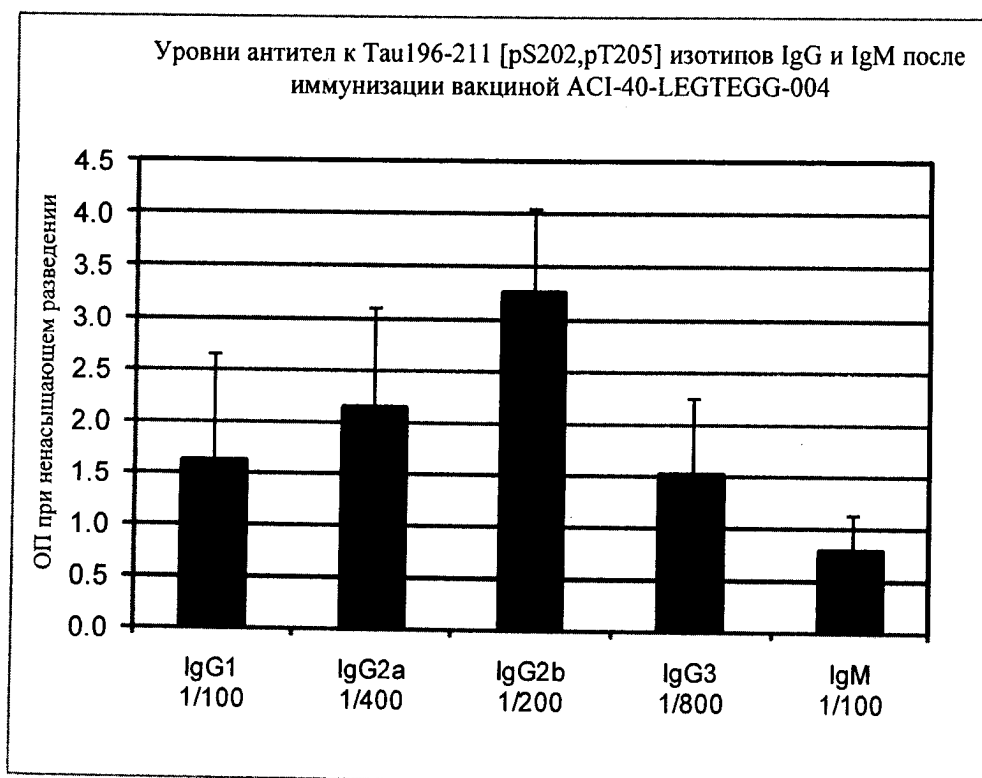
Фиг. 23



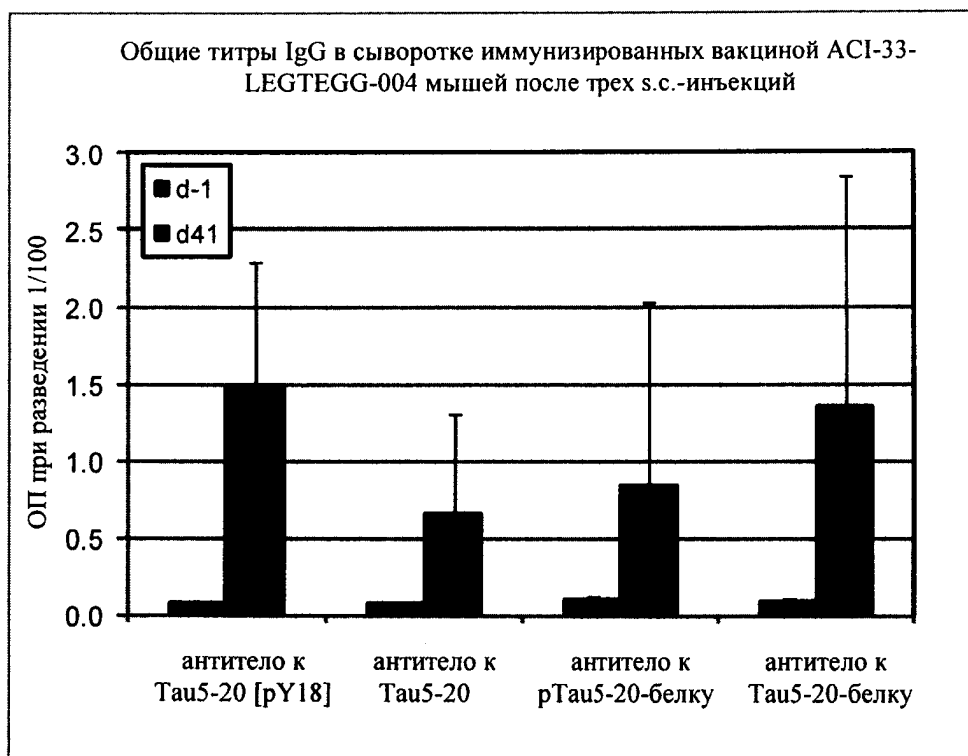
Фиг. 24



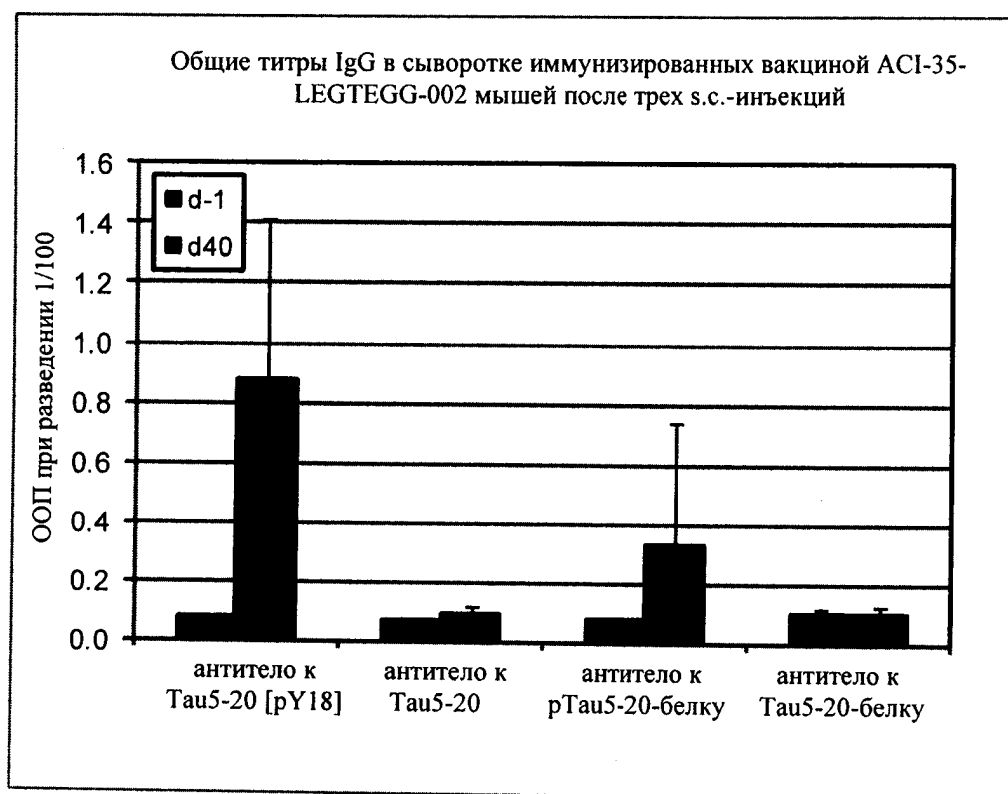
Фиг. 25



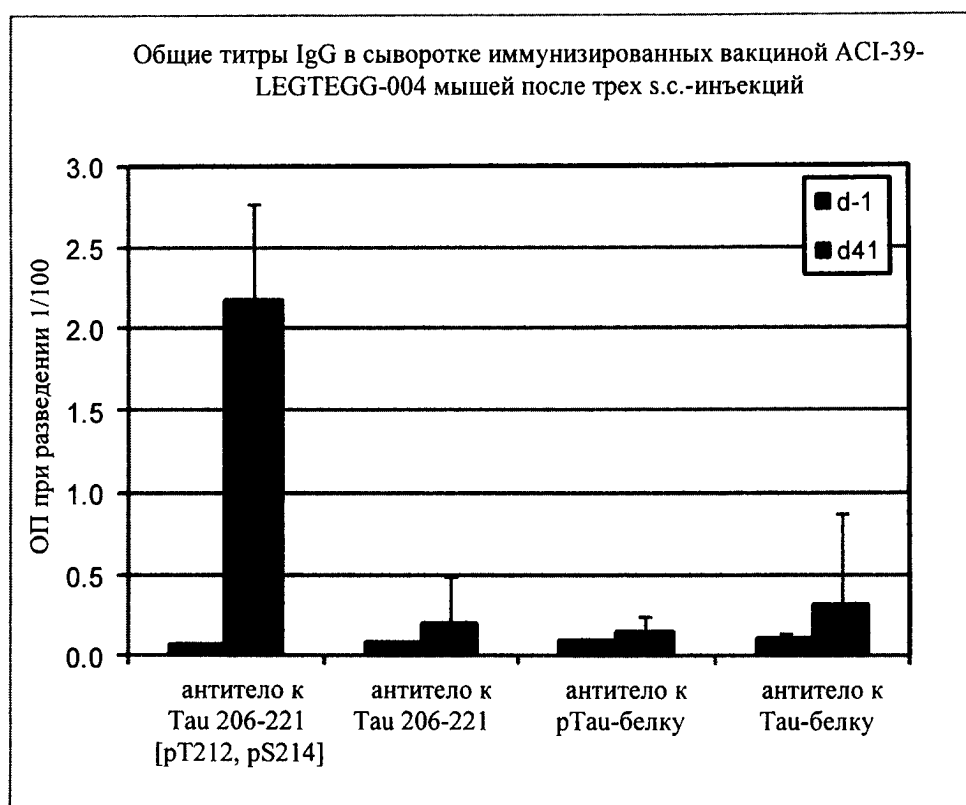
Фиг. 26



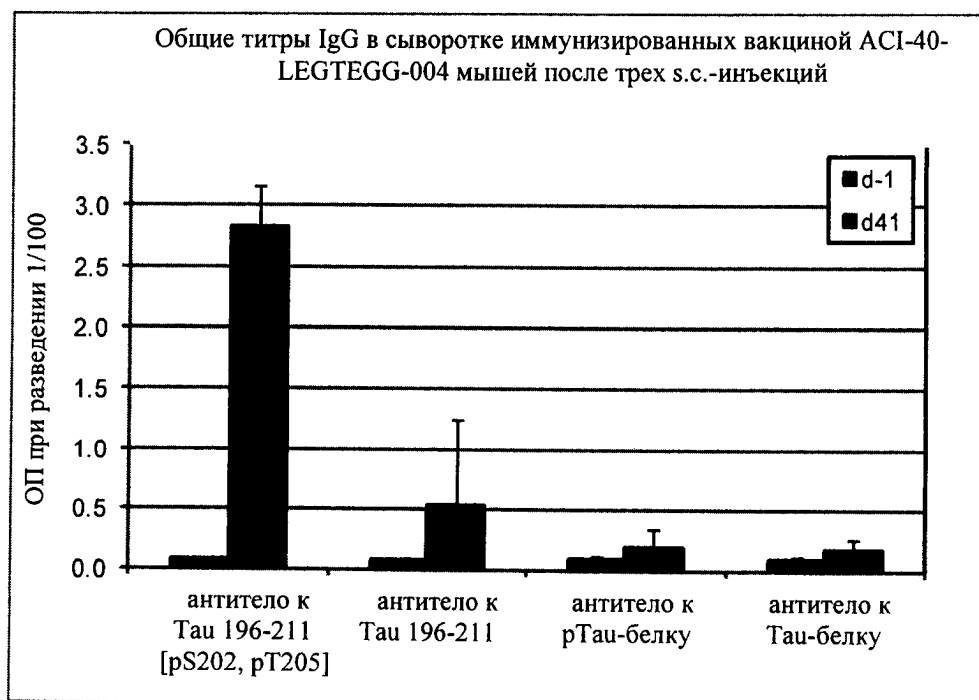
Фиг. 27



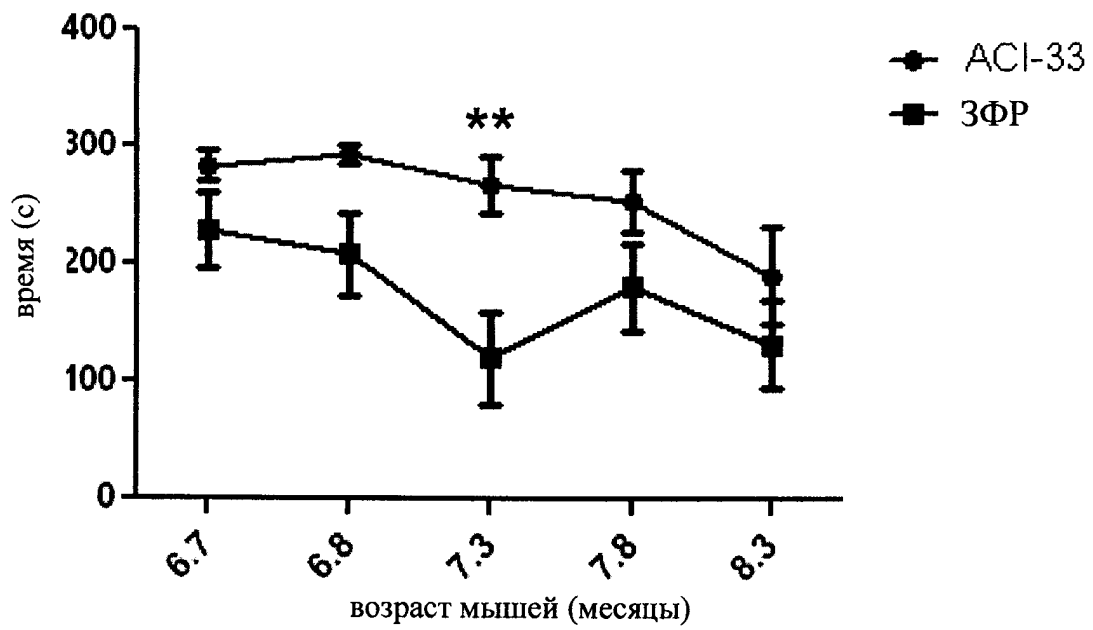
Фиг. 28



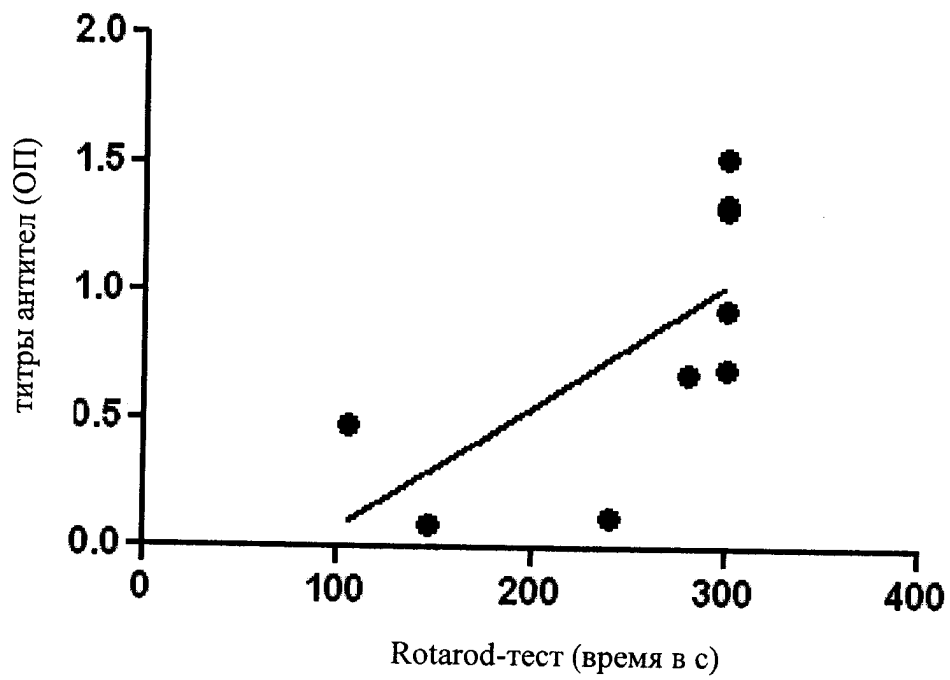
Фиг. 29



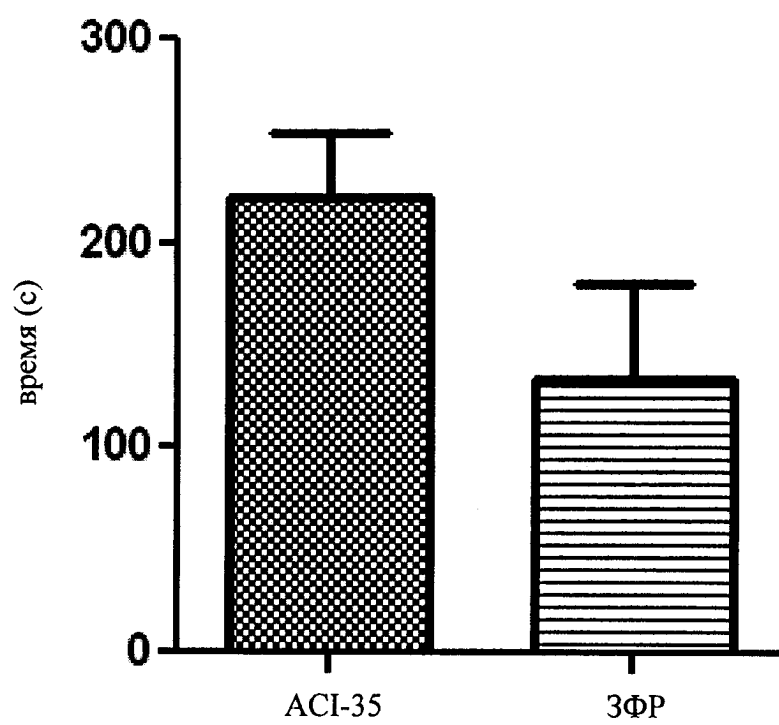
Фиг. 30



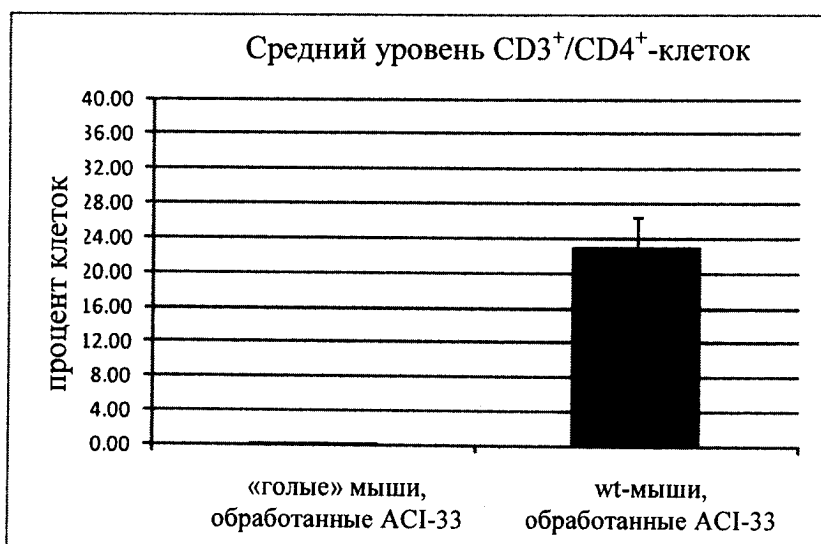
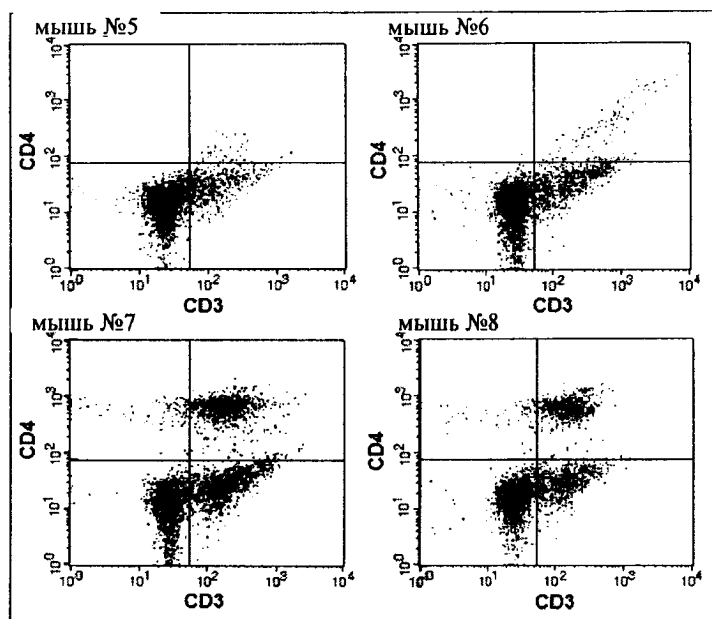
Фиг. 31



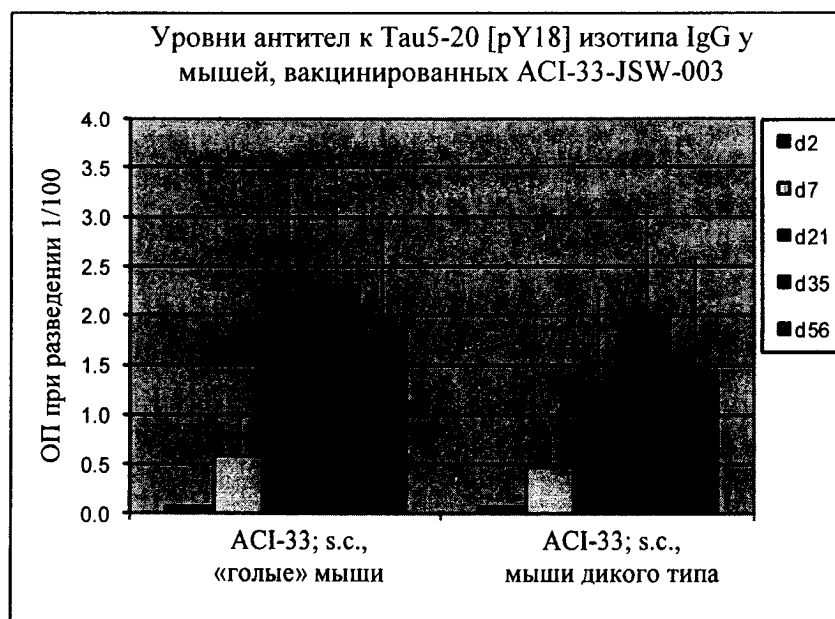
Фиг. 32



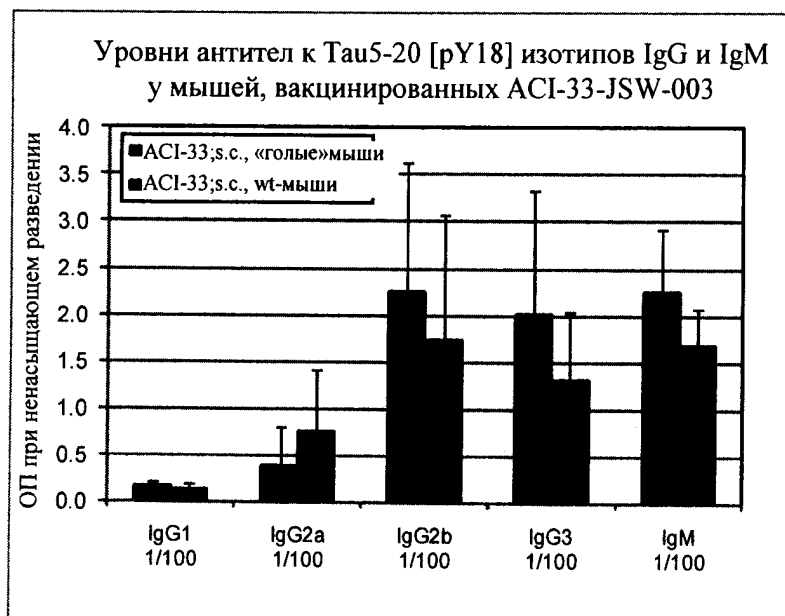
Фиг. 33



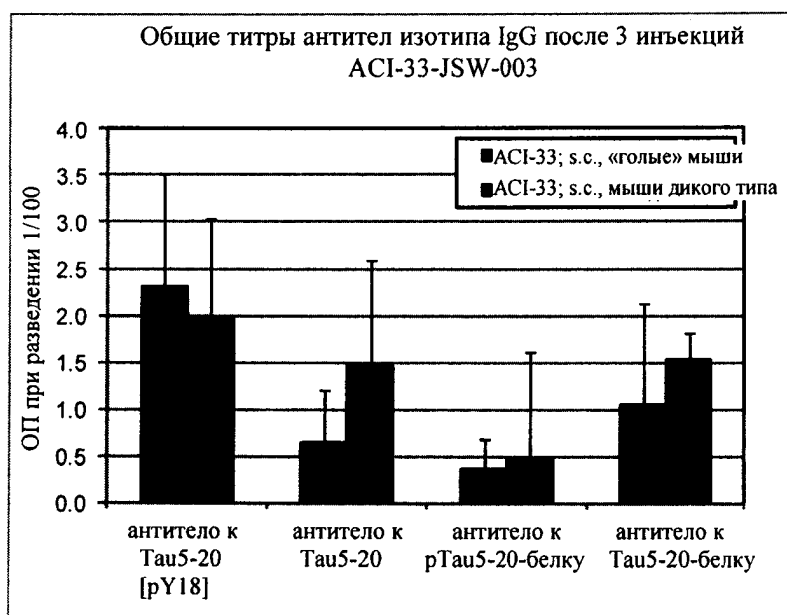
Фиг. 34



Фиг. 35



Фиг. 36



Фиг. 37