



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012145734/15, 28.03.2011

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
28.03.2011

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
29.03.2010 EP 10158273.2;
06.07.2010 US 61/361,697

(43) Дата публикации заявки: 10.05.2014 Бюл. № 13

(45) Опубликовано: 27.11.2016 Бюл. № 33

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: WO2004016282 A1, 26.02.2004.
WO2006048295 A1, 11.05.2006. RU2323002 C2,
27.04.2008.(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 29.10.2012(86) Заявка РСТ:
EP 2011/054735 (28.03.2011)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2011/120924 (06.10.2011)

Адрес для переписки:

129090, Москва, Б.Спасская, 25, стр. 3, ООО
"Юридическая фирма Городисский и Партнеры"

(72) Автор(ы):

Петер УЛЬРИХ (СН),
Катя БАЕР (СН),
Жорж ИМБЕР (СН),
Мари-Жозе ХЁЛЛИНГЕР (СН),
Мари-Эмманюэль РИВЬЕР (СН),
Ана ГРАФ (СН)

(73) Патентообладатель(и):

НОВАРТИС АГ (СН)

(54) КОМПОЗИЦИЯ, ВКЛЮЧАЮЩАЯ АМИЛОИДНЫЙ ПЕПТИД Аβ-1-6, ПРИСОЕДИНЕННЫЙ
К ВИРУСОПОДОБНОЙ ЧАСТИЦЕ И АДЬЮВАНТУ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к области фармацевтики и медицины и касается композиции для лечения и/или профилактики деменции, болезни Альцгеймера, деменции, связанной с болезнью Альцгеймера, или связанных с указанными заболеваниями состояний, содержащая 450 мкг конструкции, содержащей пептид Аβ1-6, состоящий из структуры вирусоподобной частицы (VLP), химически присоединенной к пептиду Аβ1-6 через двухвалентный линкер сукцинимидил-6-(b-малеимидопропионамидо)гексаноат, где VLP

состоит из капсидных белков РНК бактериофага Qβ и где пептид Аβ1-6 слит на С-конце со спейсерной последовательностью GGC, и 450 мкг фармацевтически приемлемого адьюванта, который представляет собой соль алюминия. В другом варианте изобретение представляет собой вакцину, комбинацию, применение композиции и набор. Группа изобретений обеспечивает при более слабых иммунных реакциях снижение частоты случаев микрокровоизлияний и лечение на ранних стадиях заболевания. 6 н. и 6 з.п. ф-лы, 2 табл., 4 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

A61K 39/00 (2006.01)*A61K 47/48* (2006.01)*A61P 25/28* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2012145734/15, 28.03.2011**(24) Effective date for property rights:
28.03.2011

Priority:

(30) Convention priority:
29.03.2010 EP 10158273.2;
06.07.2010 US 61/361,697(43) Application published: **10.05.2014** Bull. № 13(45) Date of publication: **27.11.2016** Bull. № 33(85) Commencement of national phase: **29.10.2012**(86) PCT application:
EP 2011/054735 (28.03.2011)(87) PCT publication:
WO 2011/120924 (06.10.2011)

Mail address:

129090, Moskva, B.Spasskaja, 25, str. 3, OOO
"JURidicheskaja firma Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):

Peter ULRIKH (CH),
Katja BAER (CH),
ZHorzh IMBER (CH),
Mari-ZHoze KHELLINGER (CH),
Mari-Emmanuel RIVER (CH),
Ana GRAF (CH)

(73) Proprietor(s):

NOVARTIS AG (CH)(54) **COMPOSITION CONTAINING AMYLOIDAL PEPTIDE A β -1-6 ATTACHED TO VIRUS-LIKE PARTICLE AND ADJUVANT**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: group of inventions refers to pharmaceuticals and medicine and concerns a composition for treating and/or preventing dementia, Alzheimer's disease, dementia associated with Alzheimer's disease, or related with the above said diseases conditions, containing 450 mcg of a structure containing peptide A β 1-6 consisting of a structure of a virus-like particle (VLP) chemically attached to the peptide A β 1-6 through a divalent linker succinimidyl-6-(b-maleimide propionamido)hexanoate, where the VLP consists of capsid RNA proteins of bacteriophage

Q β and where peptide A β 1-6 is combined on C-end with the spacer sequence of GGC and with 450 mcg of pharmaceutically acceptable adjuvant, which is a salt of aluminium. In another version the invention is a vaccine, a combination, an application of the composition and a kit.

EFFECT: group of inventions provides at weaker immune reactions decreasing of the rate of microbleedings and treatment at early stages of a disease.

12 cl, 2 tbl, 4 ex

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к новым композициям и вакцинам, содержащим i) конструктор, содержащий пептид A β 1-6, и ii) фармацевтически приемлемый адъювант (в данном контексте композиция по настоящему изобретению), а также к применению указанных композиций для лечения пациентов, страдающих от болезни Альцгеймера, прежде всего на ранних стадиях заболевания.

Предпосылки создания настоящего изобретения

По крайней мере 15 миллионов человек во всем мире страдают от болезни Альцгеймера (БА). Заболевание характеризуется прогрессирующим нарушением способности пациента к нормальному образу жизни. Смертельный исход большинства пациентов наступает через 5-10 лет после постановки диагноза.

В настоящее время накоплено значительное число данных, которые свидетельствуют о том, что β -амилоидный белок, являющийся основным компонентом амилоидных бляшек у пожилых людей, играет важную роль в развитии болезни Альцгеймера.

Успешная модифицирующая течение заболевания терапия при БА по-видимому должна включать препараты, влияющие на отложения β -амилоида в мозге. A β -специфические антитела, активно генерируемые иммунной системой или пассивно введенные извне, существенно снижают объем бляшек у трансгенных мышей с различными моделями A β -амилоидоза. Однако первые клинические попытки стимулировать иммунную систему у пациентов с БА на выработку A β -антител были прерваны из-за неприемлемых побочных эффектов (менингоэнцефалит у 6% пациентов (см. статью Orgogozo J.M., Oilman S., Dartigues J.F., Laurent B., Puel M., Kirby L.C., Jouanny P., Dubois B., Eisner L., Flitman S., Michel B.F., Boada M., Frank F., Hock C., Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after A β 42 immunization, *Neurology*, 61, с.46-54 (2003)). Позже было установлено, что в ходе указанных испытаний активировались A β -реактивные аутоиммунные Т-клетки, возможно, вследствие активации лимфоцитов T_H1. Такую ответную реакцию T_H1 можно объяснить действием адъюванта (QS-21) в комбинации с Т-клеточными эпитопами в AN1792 (см. статью Lemere & Masliah, *Nat. Rev. Neurol.* 6 (2), с.108-120 (2010)). Таким образом для исключения возможных опасных реакций при одновременной индукции пригодного иммунного ответа необходимо с большой осторожностью выбирать иммуноген и адъювант.

Описание изобретения

Неожиданно было установлено, что более слабые иммунные реакции и снижение частоты случаев микрокровоизлияний наблюдаются при использовании конструкторов, содержащих пептид A β 1-6. Прежде всего при использовании конструкторов, содержащих вирусоподобные частицы (VLP), ковалентно связанные с пептидом A β 1-6, не наблюдалось ни отрицательных иммунных реакций, ни повышения частоты случаев микрокровоизлияний.

Неожиданно также было установлено, что конструкторы, содержащие пептид A β 1-6, можно также эффективно комбинировать с адъювантом при введении пациентам, страдающим от деменции, болезни Альцгеймера, деменции, связанной с болезнью Альцгеймера, или от связанных с указанными заболеваниями состояний.

Неожиданно было установлено, что при введении адъюванта совместно с конструктором, содержащим пептид A β 1-6, не наблюдается провоспалительного ответа, несмотря на то, что уровень иммунного ответа против указанного конструктора усиливается. Такое действие играет важную роль прежде всего при лечении пожилых пациентов.

В данном контексте термин «композиция по настоящему изобретению» обозначает

композицию, включающую i) конструктор, содержащий пептид Aβ1-6, и ii) фармацевтически приемлемый адъювант. Композиция по настоящему изобретению также может содержать приемлемый фармацевтический носитель.

Согласно настоящему изобретению пептид Aβ1-6 связан с частицей-ядром, характеризующейся повторяющейся структурой, например самособирающейся VLP. Такая VLP может содержать капсидные белки РНК бактериофага, например капсидные белки РНК бактериофага Qβ.

Фрагмент Aβ1-6 и конструктор, содержащий указанные фрагменты по настоящему изобретению, известны в данной области техники. В заявке WO 04/016282, Cytos and Novartis, описаны конструкторы, содержащие VLP, включающие рекомбинантные белки бактериофага, такого как Qβ, линкерную группу и пептид Aβ1-6, вместе образующие упорядоченную повторяющуюся антигенную структуру.

Конструктор по настоящему изобретению можно получать и очищать, как описано в WO 04/016282, прежде всего в примере 13, содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки.

Согласно настоящему изобретению VLP можно ковалентно присоединять к пептиду Aβ1-6 через двухвалентную линкерную группу. Указанная двухвалентная линкерная группа описана, например, в заявке WO 04/016282, на стр.53, первый абзац, содержание которой включено в данный контекст в качестве ссылки.

В одном варианте настоящего изобретения двухвалентная линкерная группа представляет собой гетеробифункциональный сшивающий агент, содержащий функциональную группу, которая взаимодействует с VLP или по крайней мере с одной субъединицей VLP, например боковую аминогруппу остатка лизина.

Двухвалентная линкерная группа может содержать другую функциональную группу, которая взаимодействует с пептидом Aβ1-6 или остатком цистеина в составе указанного пептида Aβ1-6.

Согласно настоящему изобретению гетеробифункциональный сшивающий агент можно выбрать из группы, включающей SMPH, сульфо-MBS, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMPB, сульфо-SMCC, SVSB, SIA, например SPDP или Sulfb-LC-SPDP.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения пептиды Aβ1-6, пригодные для создания композиций по настоящему изобретению, модифицируют аминокислотной линкерной группой, например аминокислотной спейсерной группой, для связывания с VLP. Указанные пептиды Aβ1-6 включают, но, не ограничиваясь только ими, пептид Aβ1-6, присоединенный С-концевым фрагментом к спейсеру GGC. Аминокислотные линкерные группы, например аминокислотные спейсерные группы, пригодные для присоединения к N-концевому фрагменту Aβ1-6, включают, но не ограничиваясь только ими, последовательности CGG и CGHGKNKS. Линкерные группы, пригодные для присоединения к С-концевому фрагменту пептида Aβ1-6, включают, но не ограничиваясь только ими, последовательность GGC. В одном варианте, если линкерная группа присоединена к С-концевому фрагменту Aβ1-6, то С-концевую группу цистеина амидируют, что обозначается формулой “-CONH2”, а N-концевая группа остается свободной, что обозначается формулой “NH2-”. В конкретном варианте аминокислотная линкерная группа, например аминокислотная группа, содержащая остаток цистеина в качестве второго участка для присоединения, соединена с С-концевым фрагментом пептида Aβ1-6.

В одном варианте конструктор, содержащий пептид Aβ1-6, состоит из VLP РНК бактериофага Qβ, ковалентно связанной с указанным пептидом Aβ1-6 через

двухвалентную линкерную группу, причем пептид Aβ1-6 модифицирован аминокислотной спейсерной группой.

В еще одном варианте конструкт, содержащий пептид Aβ1-6, состоит из VLP РНК бактериофага Qβ, причем пептид Aβ1-6 ковалентно присоединен С-концевым
 5 фрагментом к спейсерной группе GGC, а VLP ковалентно связана с указанным пептидом Aβ1-6 через двухвалентную линкерную группу, как определено в данном контексте выше термином «конструкт по настоящему изобретению».

В другом объекте настоящего изобретения предлагается композиция вакцины, содержащая: i) конструкт, содержащий пептид Aβ1-6, и ii) фармацевтически приемлемый
 10 адъювант, например содержащая конструкт по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый адъювант.

В настоящем изобретении также предлагаются способы лечения. Таким образом в настоящем изобретении предлагается композиция по настоящему изобретению или вакцина по настоящему изобретению для применения при лечении. В другом объекте
 15 настоящего изобретения предлагается способ иммунизации, который заключается во введении композиции по настоящему изобретению или вакцины по настоящему изобретению животному, например человеку.

Адъюванты

Как определено в данном контексте, термин «адъювант» обозначает агент, который
 20 при введении в сочетании (например, в комбинации) с конструктом, содержащим пептид Aβ1-6 по настоящему изобретению, усиливает иммунный ответ на указанный конструкт. Адъювант усиливает иммунный ответ по нескольким механизмам, таким как, приток (рекрутинг) лимфоцитов, стимуляция В- и/или Т-клеток и/или стимуляция макрофагов.

Согласно настоящему изобретению адъюванты могут включать, но не ограничиваясь
 25 только ими, органические или неорганические адъюванты, адъюванты на масляной основе или виросомы.

Неорганические адъюванты включают, но не ограничиваясь только ими, минеральные адъюванты, например, соли алюминия ил кальция, такие как фосфат алюминия, гидроксид алюминия (в данной контексте Al(OH)3), сульфат калия-алюминия
 30 (алюмокалиевые квасцы) и фосфат кальция. Указанные адъюванты можно использовать отдельно или в комбинации с другими адъювантами, например, как описано ниже.

Органические адъюванты включают, но не ограничиваясь только им, сквален.

Кроме того, адъюванты по настоящему изобретению включают, но не ограничиваясь только ими, MPL (монофосфориллипид А), AS03 (фирмы GSK, Prepandrix), AS04 (фирмы
 35 GSK, комбинация MPL и гидроксида алюминия, Fendrix, Cervarix), QS21 (сапонин, очищенный растительный экстракт мыльного дерева (Quillaia saponaria), содержащий глюкозид тритерпена), AS01 (фирмы GSK, липосомы, QS21 и MPL), AS02 (фирмы GSK, QS21 и MPL), LT (термолабильный энтеротоксин из E.coli), CpG (олигонуклеотиды, содержащие неметелированные последовательности CpG) и MF59® (фирмы Novartis).
 40 MF59 представляет собой субмикронную эмульсию сквалена масло-в-воде, моноолеат полиоксиэтиленсорбита и триолеат полиоксиэтиленсорбита.

Адъюванты, пригодные для применения в настоящем изобретении, включают, например, минеральные адъюванты или адъюванты, содержащие сквален, например эмульсию сквалена, например MF59. В одном варианте композиция по настоящему
 45 изобретению включает конструкт по настоящему изобретению и (1) MF59 или (2) соль алюминия (например, гидроксид алюминия).

Выбор адъюванта зависит от эффективности адъюванта при повышении иммунного ответа, от стабильности композиции, содержащей адъювант, например вакцины,

содержащей адъювант, от способа введения, дозировки, а также от вида животного, подлежащего вакцинации.

Можно комбинировать два или более адъювантов. Например, можно комбинировать соли алюминия совместно с MPL, QS21 и/или MF59.

5 Согласно настоящему изобретению приблизительно от 5 до 600 мкг конструктора, содержащего пептид A β 1-6, например конструктора по настоящему изобретению, можно вводить человеку, например, приблизительно от 5 до 550 мкг, приблизительно от 50 до 500 мкг, приблизительно от 100 до 500 мкг, например, приблизительно от 75 до 300 мкг, например, приблизительно от 50 до 150 мкг, например, приблизительно от 15 до 10 125 мкг, например, приблизительно от 25 до 100 мкг, например, приблизительно 50 мкг, 75 мкг, 100 мкг, 150 мкг, 200 мкг, 300 мкг, 400 мкг или 450 мкг. Таким образом, композиция по настоящему изобретению может содержать в дозе одно из указанных количеств конструктора по настоящему изобретению. В одном варианте композиция по настоящему изобретению содержит приблизительно 150 мкг или приблизительно 450 15 мкг конструктора по настоящему изобретению в дозе.

В отдельном варианте композиция по настоящему изобретению содержит приблизительно от 10 до 600 мкл адъюванта в дозе, например, приблизительно от 50 до 500 мкл адъюванта в дозе, например, приблизительно от 100 до 500 мкл адъюванта в дозе, например, приблизительно от 100 до 300 мкл адъюванта в дозе, например, 20 приблизительно от 150 до 300 мкл адъюванта в дозе, например, приблизительно от 125 до 250 мкл адъюванта в дозе, например, приблизительно 125 мкл в дозе или, например, приблизительно 250 мкл в дозе или, например, приблизительно 500 мкл адъюванта в дозе. Указанные количества прежде всего используют в отношении MF59.

В одном варианте композиция по настоящему изобретению содержит 1) 25 приблизительно от 100 до 300 мкл MF59 в дозе, например, приблизительно 125 мкл в дозе, приблизительно 250 мкл в дозе или приблизительно 500 мкл в дозе и 2) приблизительно 150 мкг конструктора, содержащего пептид A β 1-6, например, 150 мкг конструктора по настоящему изобретению. В другом варианте композиция содержит 1) 30 приблизительно 125 мкл или приблизительно 250 мкл MF59 и 2) приблизительно 150 мкг конструктора по настоящему изобретению в дозе.

В еще одном варианте композиция по настоящему изобретению содержит 1) приблизительно от 100 до 500 мкл MF59 в дозе, например, приблизительно 125 мкл в дозе, 250 мкл в дозе, 450 мкл в дозе или 500 мкл в дозе MF59 и 2) приблизительно 450 35 мкг конструктора, содержащего пептид A β 1-6, например, 450 мкг конструктора по настоящему изобретению. В одном варианте композиция содержит 1) приблизительно 125 мкл или приблизительно 250 мкл MF59 и 2) приблизительно 450 мкг конструктора по настоящему изобретению в одной дозе.

В другом варианте композиция по настоящему изобретению содержит 1) приблизительно от 125 до 250 мкл в дозе MF59 и 2) приблизительно от 50 до 500 мкг, 40 приблизительно от 100 до 500 мкг, приблизительно 150 мкг, например, приблизительно 200 мкг конструктора, содержащего пептид A β 1-6, например, 150 мкг конструктора по настоящему изобретению в дозе.

В еще одном варианте настоящего изобретения адъювант смешивают с конструктором, содержащим пептид A β 1-6, например, с конструктором по настоящему изобретению, в 45 соотношении от приблизительно 0,5:1 (об./об.) до приблизительно 4:1 (об./об.), например, приблизительно от 0,8:1 (об./об.) до приблизительно 3,5:1 (об./об.), например, от приблизительно 1:1 (об./об.) до приблизительно 2:1 (об./об.), например, приблизительно в соотношении 1:1 (об./об.).

В другом варианте композиция по настоящему изобретению содержит приблизительно от 10 до 900 мкг адьюванта в дозе, например, приблизительно от 50 до 850 мкг адьюванта в дозе, например, приблизительно от 100 до 800 мкг адьюванта в дозе, например, приблизительно от 120 до 600 мкг адьюванта в дозе, например, приблизительно от 100 до 550 мкг адьюванта в дозе, например, приблизительно от 150 до 450 мкг адьюванта в дозе, например, приблизительно 50 мкг в дозе, приблизительно 100 мкг в дозе, приблизительно 150 мкг в дозе или приблизительно 450 адьюванта в дозе. Указанные количества являются прежде всего предпочтительными для солей алюминия, например алюмокалиевых квасцов или гидроксида алюминия. В случае гидроксида алюминия количество указано в расчете на массу элементного алюминия.

В еще одном варианте композиция содержит 1) приблизительно 50 мкг или приблизительно 150 мкг гидроксида алюминия и 2) 150 мкг конструктора по настоящему изобретению в одной дозе. В другом варианте композиция содержит 1) приблизительно 150 мкг или приблизительно 450 мкг гидроксида алюминия и 2) 450 мкг конструктора по настоящему изобретению в дозе.

В другом варианте настоящего изобретения композиция содержит 1) приблизительно 600 мкг или приблизительно 850 мкг гидроксида алюминия и 2) приблизительно 450 мкг конструктора по настоящему изобретению в дозе.

Если ответная реакция пациента на лечение является низкой, можно использовать более высокую дозу. Таким образом в еще одном варианте композиция содержит 1) приблизительно 600 мкг или приблизительно 850 мкг гидроксида алюминия и 2) приблизительно 600 мкг конструктора по настоящему изобретению в дозе.

Если в качестве адьювантов используют соли алюминия, пригодные соотношения адьюванта и конструктора, содержащего пептид A β 1-6, включают, но не ограничиваясь только ими, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 5:1 или 6:1 (масс./масс.) в расчете на массу элементного алюминия.

Адьювант можно вводить совместно с конструктором, содержащим пептид A β 1-6, в виде единой композиции или до введения, совместно с введением или после введения конструктора, содержащего пептид A β 1-6.

Составы и способы введения

Композицию по настоящему изобретению можно вводить различными способами, известными в данной области техники, например инъекцией, вливанием, ингаляцией, перорально или другими пригодными физическими способами. Композиции можно также вводить внутримышечно, внутривенно или подкожно. В одном из вариантов композицию по настоящему изобретению вводят парентерально, например внутримышечно или подкожно, например внутримышечно.

Составы, содержащие композицию по настоящему изобретению, включают стерильные водные растворы, например физиологический раствор, или неводные растворы и суспензии. Примеры неводных растворителей включают пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и пригодные для инъекций органические сложные эфиры, например этилолеат. Для увеличения проницаемости через кожу и усиления абсорбции антигена можно использовать носители или герметичные повязки.

В случае парентерального введения конструктор, содержащий пептид A β 1-6 по настоящему изобретению, можно вводить в виде инъекционных раствора или суспензии указанного конструктора в физиологически приемлемом разбавителе в смеси с фармацевтически приемлемым носителем, который может представлять собой жидкость, например воду, масло, солевой раствор, глицерин или этанол. Композиция может

содержать дополнительные компоненты, например смачивающие или эмульгирующие агенты, ПАВ, регулирующие pH буферные агенты и т.п. Другие компоненты включают вазелин или животные масла, а также масла растительного или синтетического происхождения, например арахисовое масло, соевое масло и минеральное масло.

5 Предпочтительными носителями, например, в случае инъекционных растворов являются гликоли, такие как пропиленгликоль и полиэтиленгликоль.

Пригодный состав для введения композиции по настоящему изобретению, например, для подкожного введения представляет собой водный раствор, содержащий фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ) или другой буферный раствор. Например, композиция
10 по настоящему изобретению содержит от 0,1 до 1 мг/мл конструктора по настоящему изобретению, например, от приблизительно 0,25 до 0,75 мг/мл конструктора по настоящему изобретению, например, от приблизительно 0,4 до 0,6 мг/мл, например, 0,5 мг/мл конструктора по настоящему изобретению и не содержит других эксципиентов. В одном варианте настоящего изобретения предлагается водный раствор, содержащий ФСБ
15 или другой буферный раствор и 1 мг/мл конструктора по настоящему изобретению.

Буферный раствор также может содержать L-гистидин.

Композиция по настоящему изобретению может дополнительно содержать наполнитель, например сахарозу. Для регулировки pH можно добавлять соляную кислоту.

20 Стандартную лекарственную форму можно замораживать или хранить в лиофилизированном виде до использования. Предпочтительно, если композиция по настоящему изобретению находится в лиофилизированном виде, она содержит буферное вещество (например, L-гистидин) и наполнитель, например сахарозу. Перед введением лиофилизат повторно растворяют при добавлении соответствующего количества
25 разбавителя (например, воды или раствора декстрозы) и получают требуемую концентрацию конструктора, содержащего пептид A β 1-6. После добавления разбавителя раствор осторожно перемешивают и смесь выдерживают до образования пены и до образования прозрачного раствора. Затем растворенный лиофилизат смешивают с пригодным адьювантом. Предпочтительно растворенный лиофилизат, смешанный с
30 адьювантом, не следует хранить при КТ в течение более 4 ч перед введением.

Пригодные разбавители включают, но не ограничиваясь только ими, воду, например дистиллированную воду, физиологический ФСБ, раствор Рингера, раствор декстрозы, раствор Хенкса. В одном варианте в качестве разбавителя используют сам адьювант. В другом варианте разбавитель представляет собой раствор гидроксида алюминия.

35 Лекарственную форму можно вводить шприцом предпочтительно подкожной инъекцией теплокровным животным, прежде всего в брюшной отдел. В одном варианте композицию (лекарственную форму) вводят внутримышечно (т.е. вводят состав для внутримышечного введения). В другом варианте композицию (лекарственную форму) вводят в плечо.

40 Для размораживания стандартную дозу можно выдерживать при КТ в течение периода приблизительно от 15 мин до 45 мин, например в течение 30 мин. Предпочтительно перед отбором лекарственного средства флаконы осторожно переворачивают несколько раз для диспергирования практически невидимых глазом частиц.

45 Пригодная лекарственная форма конструктора, содержащего пептид A β 1-6 по настоящему изобретению, например конструктора по настоящему изобретению, представляет собой лиофилизат, который повторно растворяют при добавлении воды для инъекций, при этом получают концентрат конструктора по настоящему изобретению

при концентрации 1,0 мг/мл. Указанная форма прежде всего пригодна для введения конструктора по настоящему изобретению в комбинации с минеральным адьювантом, например с гидроксидом алюминия. Указанная лекарственная форма прежде всего пригодна для внутримышечного введения конструктора по настоящему изобретению.

5 Для введения конструктора, содержащего пептид A β 1-6 по настоящему изобретению, например конструктора по настоящему изобретению, в комбинации с адьювантом MF59, лекарственная форма представляет собой лиофилизат, повторно растворенный с использованием соответствующих объемов раствора декстрозы.

10 Композицию по настоящему изобретению можно получать в виде инъекционных растворов, например в виде растворов или суспензий, или в виде твердых форм, пригодных для растворения или суспендирования в жидких носителях перед введением.

Способы лечения

15 Согласно настоящему изобретению предлагается применение композиции по настоящему изобретению для лечения и/или профилактики болезни Альцгеймера, прежде всего на ранней стадии заболевания, а также болезни Альцгеймера от легкой до средней тяжести или тяжелой формы или связанных с указанным заболеванием состояний. Например, предлагается применение указанных композиций для лечения или профилактики деменции, например деменции, связанной с болезнью Альцгеймера, а также сосудистой деменции с амилоидной ангиопатией.

20 В настоящем изобретении также предлагается применение композиций по настоящему изобретению для лечения пациентов с повышенным уровнем бета-амилоида, включая, но не ограничиваясь только ими, пациентов, страдающих от деменции, связанной с болезнью Паркинсона, или от деменции с тельцами Леви.

25 Настоящее изобретение относится также к композициям по настоящему изобретению для профилактического лечения субъектов из группы риска развития болезни Альцгеймера, включая, но не ограничиваясь только ими, субъектов, у которых наблюдаются когнитивное нарушение легкой степени, субъектов, с генотипами, связанными с болезнью Альцгеймера, например ApoE4, субъектов с трисомией 21 и субъектов с суррогатными маркерами, указывающими на риск развития болезни Альцгеймера.

30 Термин «лечение», использованный в данном контексте, обозначает прежде всего лечение, целью которого является остановка патогенных процессов, приводящих к прогрессированию заболевания и/или имеющих симптоматический эффект, а также лечение с целью снижения интенсивности заболевания или связанных с ним симптомов.

35 Термин «деменция типа Альцгеймера» (и «деменция, связанная с болезнью Альцгеймера»), использованный в данном контексте, обозначает прежде всего заболевание, определенное в соответствии с критериями руководства по диагностике и статистическому учету психических расстройств (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders), том 4 (DSM-IV).

40 Настоящее изобретение также относится к способу лечения деменции, болезни Альцгеймера, деменции, связанной с болезнью Альцгеймера, или состояний, связанных с указанными заболеваниями, у человека, и указанный способ заключается во введении композиции по настоящему изобретению пациенту, нуждающемуся в таком лечении. В настоящем изобретении также предлагаются способы иммунизации и вакцинации, 45 соответственно, для профилактики, лечения и/или ослабления интенсивности симптомов деменции, болезни Альцгеймера, деменции, связанной с болезнью Альцгеймера, или связанных с указанными заболеваниями состояний у человека.

Частоту инъекций можно изменять в зависимости от ответной реакции пациента.

Например, частоту введения может изменять лечащий врач в зависимости от ответной реакции пациента на лечение и соответствующего титра антител. Например, пациенту, у которого наблюдается слабая ответная реакция, может потребоваться более частое введение, а пациенту, у которого наблюдается слишком высокая ответная реакция, может потребоваться менее частое введение для того, чтобы вызвать и/или поддерживать один и тот же титр антител.

Частота инъекций может составлять, но не ограничиваясь только ими, от 1 до 10 раз в год, например от 2 до 8 в год, например 6 раз в год.

В одном варианте композицию по настоящему изобретению вводят человеку, нуждающемуся в таком лечении, приблизительно каждые 4-8 недель, предпочтительно приблизительно каждые 5-7 недель, прежде всего приблизительно каждые 6 недель. Указанный режим можно поддерживать в течение приблизительно от 12 до 16 недель, например приблизительно 12 недель. Например, композицию по настоящему изобретению вводят в неделю 0, 6, 12. Кроме того интервалы между последующими введениями композиции по настоящему изобретению можно увеличивать.

Таким образом в одном варианте настоящего изобретения предлагается режим введения а) два и более раз с интервалами приблизительно 6 недель, а затем б) два и более раз с интервалами приблизительно 12 недель. В одном варианте настоящего изобретения предлагается режим введения а) три раза с интервалами приблизительно 6 недель (например, в неделю 0, 6 и 12), а затем б) два или более раз (например, 3, 4, 5 или более) с интервалами приблизительно 12 недель (например, в неделю 24, 36, 48 и 60).

Указанный режим введения прежде всего пригоден для лечения пациентов, страдающих от деменции, болезни Альцгеймера или деменции, связанной с болезнью Альцгеймера.

Пригодность композиции по настоящему изобретению для лечения указанных выше нарушений можно подтвердить в ходе соответствующих клинических испытаний, например, описанных в разделе Примеры.

Пригодные клинические испытания включают прежде всего рандомизированные параллельные испытания двойным слепым методом с контролем плацебо с участием пациентов, страдающих от болезни Альцгеймера, или испытания с открытой этикеткой.

Комбинации и наборы

Конструкт, содержащий пептид A β 1-6 и адъювант, можно упаковывать и поставлять в одном контейнере (например, флакон или заполненный шприц) или в разных контейнерах (например, флаконах) и смешивать перед введением. Упаковка, например комплект, может включать инструкции по использованию, прежде всего если конструкт, содержащий пептид A β 1-6, и адъювант упакованы раздельно и упаковка, например комплект, обычно содержит инструкции по смешиванию перед введением.

Таким образом, в настоящем изобретении предлагается коммерческая упаковка, включающая а) композицию или вакцину по настоящему изобретению и б) инструкции по применению. В настоящем изобретении также предлагается коммерческая упаковка, включающая а) конструкт по настоящему изобретению, б) адъювант и в) инструкции по применению. В такой упаковке конструкт может находиться в виде лиофилизата, а адъювант можно использовать в качестве растворителя. Набор также необязательно включает фармацевтически приемлемый разбавитель и/или устройство для введения (например, шприц).

В настоящем изобретении также предлагается коммерческая упаковка, включающая а) конструкт, содержащий пептид A β 1-6, например конструкт по настоящему

изобретению, и б) адъювант вместе в) с инструкциями по одновременному, раздельному или последовательному применению для лечения или профилактики болезни Альцгеймера или связанных с ней нарушений, прежде всего болезни Альцгеймера.

В еще одном варианте настоящего изобретения предлагается комбинация, включающая композицию по настоящему изобретению и по крайней мере один ноотропный агент, предпочтительно ингибитор холинэстеразы, такой как мемантин.

Термин «ноотропный агент», использованный в данном контексте, включает, но не ограничиваясь только ими, растительные ноотропные экстракты, антагонисты кальция, ингибиторы холинэстеразы, дигидроэрготоксин, ницерголин, пирацетам, производные пурина, пиритинол, винкамин и винпоцетин.

Термин «ноотропный растительный экстракт», использованный в данном контексте, включает, но не ограничиваясь только ими, экстракты листьев гинкго билоба. Термин «антагонисты кальция», использованный в данном контексте, включает, но не ограничиваясь только ими, циннаризин и нимодипин. Термин «ингибиторы холинэстеразы», использованный в данном контексте, включает, но не ограничиваясь только ими, гидрохлорид донепезила, ривастигмин, мемантин и гидрохлорид галантамина. Термин «производные пурина», использованный в данном контексте, включает, но не ограничиваясь только им, пентифуллин.

Экстракт листьев гинкго билоба можно вводить, например, в виде коммерческого препарата, например, с торговым названием гинкодилатTM в соответствии с информацией, указанной в инструкции по применению указанного препарата.

Циннаризин можно вводить, например, в виде коммерческого препарата, например, с торговым названием циннаризин форте - ratiopharmTM. Нимодипин можно вводить, например, в виде коммерческого препарата, например, с торговым названием нимотопTM. Гидрохлорид донепезила можно вводить, например, в виде коммерческого препарата, например, с торговым названием арицептTM. Ривастигмин получают, как описано в заявке US 5602176. Указанный препарат вводят, например, в виде коммерческого препарата, например, с торговым названием экселонTM. Гидрохлорид галантамина можно вводить, например, в форме коммерческого препарата, например с торговым названием реминилTM. Дигидроэрготоксин можно вводить, например, в виде коммерческого препарата, например с торговым названием хидергинTM.

Ницерголин можно вводить, например, в виде коммерческого препарата, например, с торговым названием сермионTM. Пирацетам можно вводить, например, в виде коммерческого препарата, например, с торговым названием цереброфортеTM.

Пентифуллин можно вводить в виде коммерческого препарата, например, с торговым названием косалдонTM. Пиритинол можно вводить, например, в виде коммерческого препарата, например, с торговым названием энцефаболTM. Винпоцетин можно вводить, например, в виде коммерческого препарата, например, с торговым названием кавинтонTM. Мемантин можно вводить, например, в форме коммерческого препарата, например, с торговым названием аксураTM или намендаTM.

Структуру активных агентов, определенную по номеру кода, международному непатентованному названию дженерика или торговому названию, можно найти в действующем издании стандартного справочника "The Merck Index" или в базах данных, например, в базе международных патентов (например, IMS World Publications), соответствующее содержание которых включено в данные контекст в качестве ссылки.

Таким образом, в настоящем изобретении также предлагается комбинация, включающая композицию по настоящему изобретению и по крайней мере один ноотропный агент, выбранный из группы, включающей ноотропные растительные

экстракты, антагонисты кальция, ингибиторы холинэстеразы, дигидроэрготоксин, ницерголин, пирацетам, производные пурина, пиритинол, винкамин и винпоцетин или мемантин, и в указанной комбинации активные ингредиенты присутствуют в каждом случае в свободной форме или в форме фармацевтически приемлемой соли, и указанная комбинация необязательно включает по крайней мере один фармацевтически приемлемый носитель для одновременного, раздельного или последовательного введения, прежде всего для применения при лечении деменции, болезни Альцгеймера или связанных с ними нарушений.

Указанная комбинация необязательно может представлять собой комбинированный препарат.

В комбинации с композицией по настоящему изобретению можно использовать другие агенты, например антидепрессанты, такие как SSRI, SNRI, NRI, антипсихотические средства, такие как рисперидон, противодиабетические средства, такие как инсулин или метформин, антиоксиданты, такие как селегилин, витамин Е, противовоспалительные агенты, такие как НСПВС, гиполипидемические агенты, такие как статины, заместители гормонов, например эстрогены, снижающие уровень амилоидов агенты, такие как ингибиторы бета-секретазы, ингибиторы агрегации, такие как бета-блокаторы, хелатирующие агенты, иммуномодуляторы, такие как ацетат глатирамера.

Термин «комбинированный препарат», использованный в данном контексте, обозначает прежде всего «набор компонентов», т.е. активных ингредиентов, как определено выше, которые можно вводить независимо или в составе различных фиксированных комбинаций, содержащих определенные количества ингредиентов, т.е. одновременно или в различные периоды времени. Компоненты набора можно затем вводить, например, одновременно или поочередно, т.е. в различные периоды времени через одинаковые или различные интервалы времени для любого компонента набора. Предпочтительно интервалы времени выбирают таким образом, чтобы обеспечить более эффективное действие на заболевание, подлежащее лечению, при комбинированном введении компонентов по сравнению с действием, которое наблюдается при использовании только одного любого из активных ингредиентов.

Таким образом, в настоящем изобретении также предлагается:

- комбинация по настоящему изобретению для применения при лечении,
- применение комбинации, описанной в данном контексте, для получения лекарственного средства, предназначенного для профилактики и/или лечения болезни Альцгеймера или связанных с ней нарушений, таких как деменция, прежде всего болезнь Альцгеймера, например, на ранней стадии заболевания,
- коммерческая упаковка, содержащая комбинацию, описанную в данном контексте, вместе с инструкциями по одновременному, раздельному или последовательному применению указанной комбинации для профилактики и/или лечения болезни Альцгеймера или связанных с ней нарушений, таких как деменция, прежде всего болезнь Альцгеймера, например, на ранней стадии заболевания.

В одном варианте настоящего изобретения предлагается а) композиция по настоящему изобретению в комбинации б) с компонентом комбинации. В одном варианте настоящего изобретения компонент комбинации (б) обозначает ингибитор холинэстеразы, прежде всего ривастигмин или мемантин.

Если компоненты комбинации вводят в виде отдельных лекарственных форм, можно использовать дозировку и способ введения, как указано в инструкциях по применению. Прежде всего пациенту можно вводить следующие дозы компонента комбинации (б).

Циннаризин можно вводить пациенту в суточной дозе от приблизительно 75 до приблизительно 150 мг.

Нимодипин можно вводить пациенту в суточной дозе от приблизительно 60 до приблизительно 120 мг.

5 Гидрохлорид донепезила можно вводить пациенту в суточной дозе от приблизительно 5 до 10 мг.

Ривастигмин можно вводить пациенту в суточной дозе от приблизительно 2 до приблизительно 20 мг, например, приблизительно 4 и приблизительно 18 мг, например, приблизительно 6 и приблизительно 12 мг.

10 Галантамин можно вводить пациенту в суточной дозе от приблизительно 12 до 24 мг, например, 12 мг дважды в сутки.

Дигидроэрготоксин можно вводить пациенту в форме метансульфоната в суточной дозе от приблизительно 4 мг до 10 мг, например, приблизительно 8 мг.

15 Ницерголин можно вводить пациенту в форме тартрата внутримышечной инъекцией в суточной дозе от приблизительно 4 мг до 8 мг.

Пирацетам можно вводить пациенту в суточной дозе от приблизительно 1200 до 5000 мг, например, 4800 мг/сут.

Пентифуллин можно вводить пациенту в суточной дозе от приблизительно от 400 до 800 мг.

20 Пиритинол можно вводить пациенту в форме гидрохлорида в суточной дозе приблизительно 600 мг.

Винпоцетин можно вводить пациенту в суточной дозе от приблизительно 10 до 15 мг.

25 Мемантин можно вводить пациенту в форме гидрохлорида мемантина в суточной дозе от приблизительно 20 мг.

В настоящем изобретении также предлагается контейнер, содержащий композицию, вакцину или комбинацию по настоящему изобретению. Контейнер может быть изготовлен из стекла или пластика. Контейнер необязательно включает стерильное входное отверстие. Пригодные контейнеры по настоящему изобретению включают

30 бутылки, флаконы, шприцы и пробирки.

Общие положения

Термин «содержащий» обозначает включающий, а также «состоящий из», например композиция, «содержащая X», может включать исключительно компонент X или может включать дополнительный компонент, например X+Y.

35 Термин «приблизительно» в отношении численных значений x обозначает, например, x+10%.

Настоящее изобретение полностью описано и дополнительно проиллюстрировано следующими примерами и формулой изобретения, которые приведены только в качестве иллюстрации настоящего изобретения и не ограничивают его объем. Специалисту в

40 данной области представляется очевидным, или он может установить в ходе простых экспериментов, что существуют многочисленные эквиваленты специфических способов, описанных в данном контексте. Указанные эквиваленты включены в объем настоящего изобретения и формулу изобретения.

Примеры

45 Пример 1

Внутримышечные инъекции кроликам композиции, содержащей конструкт по настоящему изобретению и гидроксид алюминия ($\text{Al}(\text{OH})_3$) или MF59

Шести группам кроликов, содержащим по 9 самок в группе, вводили внутримышечно

в заднюю ногу в день 1 (верхняя часть мышцы бедра, правая задняя нога), в день 14 (верхняя часть мышцы бедра, левая задняя нога) и в день 28 (нижняя часть мышцы бедра, правая задняя нога). Группам 1, 2 и 3 вводили по 150 мкг конструктора по настоящему изобретению в смеси с 0,050 мг $\text{Al}(\text{OH})_3$ (группа 1), 0,150 мг $\text{Al}(\text{OH})_3$ (группа 2) или 0,450 мг $\text{Al}(\text{OH})_3$ (группа 3). Группам 4, 5 и 6 вводили по 150 мкг конструктора по настоящему изобретению в смеси с 0,125 мл MF59 (группа 4), 0,25 мл MF59 (группа 5) или 0,5 мл MF59 (группа 6). В каждой дозе MF59 содержалось 5, 10,0 или 20,0 мг сквалена, соответственно, который является действующим агентом MF59. Животных умерщвляли через 14 дней после последнего введения (день 42).

Оценивали следующие параметры: смертность/выживаемость (дважды в день), клинические проявления (каждый день) включая реакцию на коже в участке внутримышечной инъекции (приблизительно через 24 и 48 ч после введения), массу тела (каждую неделю), количество потребляемого корма (дважды в неделю), гематологический и клинический биохимический анализы (один раз до лечения и в день 42), обследование невооруженным глазом после завершения лечения, массу органов и гистопатологию в участках инъекций. Отбирали кровь для серологического анализа (один раз до лечения и в дни 20, 26, 34, 39 и 42). Кроме того, отбирали образцы плазмы (один раз до лечения и в день 42) и спинномозговой жидкости (при вскрытии в день 42).

В ходе испытаний не выявлено летальных исходов, токсикологически значимых изменений клинических симптомов, изменений на коже, изменений массы тела (увеличения), (относительного) изменения количества потребляемого корма, изменений гематологических и клинических биохимических параметров и показателей при вскрытии.

Иммуногенный ответ наблюдался у всех леченых животных. Во всех группах максимальная средняя концентрация анти-А β -антител и анти-Q β -антител (ответ на носитель) IgG достигалась в день 34 испытаний, т.е. через шесть дней после третьей инъекции, и указанная концентрация снижалась в дни 39 и 42. Выработка анти-А β -антител IgG в группах 1-5, но не включая группу 6, значительно изменялась от особи к особи. Иммуногенный ответ анти-Q β характеризовался меньшими различиями от особи к особи по сравнению с иммунным ответом анти-А β . У животных, у которых не наблюдался ответ или наблюдался слабый ответ на А β , напротив, наблюдался достаточно высокий ответ на Q β . Для обоих исследованных адъювантов (т.е. $\text{Al}(\text{OH})_3$ или MF59) максимальная средняя концентрация анти-А β IgG повышалась в период между введением первой и второй доз.

Для кроликов, которых лечили конструктором по настоящему изобретению в смеси с гидроксидом алюминия, ответ заключался в основном в дозозависимом повышении частоты и тяжести макрофагического ответа с некоторой степенью лимфоцитарного воспаления. Ответ снижался со временем, возвращаясь на фоновые уровни, соответствующие самой ранней инъекции (инъекция в день 1).

У кроликов, которых лечили конструктором по настоящему изобретению в смеси с MF59 (группы 4, 5 и 6), наблюдалось повышение частоты воспалительных реакций в зависимости от введенной дозы (но не в зависимости от времени) и не наблюдалось усиления тяжести симптомов.

В ходе указанных испытаний было установлено, что у самок новозеландских белых кроликов-альбиносов после трех внутримышечных инъекций конструктора по настоящему изобретению в комбинации с гидроксидом алюминия или MF59 наблюдалась достаточно

высокая переносимость. Во всех группах максимальная средняя концентрация анти-Аβ и анти-Qβ IgG достигалась в день 34 лечения, т.е. через шесть суток после третьей инъекции, и снижалась в дни 39 и 42. По сравнению с группами, которым вводили конструктор по настоящему изобретению/Al(OH)₃, при совместном введении конструктора по настоящему изобретению и MF59 наблюдалось незначительное повышение иммуногенного ответа для обоих анти-Аβ и анти-Qβ IgG. Высокая доза любого адъюванта не обеспечивает какого-либо преимущества по сравнению с введением соответствующей средней дозы.

Пример 2

Внутримышечное введение обезьянам композиции, содержащей конструктор по настоящему изобретению и гидроксид алюминия (Al(OH)₃) или MF59

Объектом испытаний являлась иммунизация только конструктором по настоящему изобретению или в комбинации с гидроксидом алюминия или с MF59 взрослым самкам макак-крабоедов (*Macaca fascicularis*) в течение по крайней мере 26 недель. Животным вводили дозу в дни 1, 15, 43 и 140.

Оценивали следующие параметры: смертность, клинические показатели (включая обследование участка инъекции после введения дозы), массу тела, неврологическое состояние, нейрореповеденческая функция, данные серологического анализа (определение титра антител Аβ и Qβ), накопление моноядерных клеток периферической крови (РВМС) в ответ на стимуляцию Т-клеток, протеомный и метаболический анализ (результаты предоставляли отдельно), гематологический анализ, клинический биохимический анализ и анализ мочи, изменение массы и гистологии отдельных органов/тканей, микроскопический анализ (включая иммуногистохимический анализ и окрашивание серебром областей мозга для определения отложения амилоидов, а также анализ спинномозговой жидкости).

Выбирали следующие уровни доз:

Таблица 1							
Выбранные уровни доз							
Номер группы	Адъювант	Описание группы	Объем дозы (мл/животное)	Уровень дозы (мкг/на инъекцию)	Число животных в группе		Вскрытие через 28 недель
					Самцы	Самки	
1	Подкожно	Низкая 1	0,150	150	Отс.	5	5
2	Подкожно	Высокая 1	0,400	400	Отс.	5	5
3	Гидроксид алюминия, подкожно	Высокая 1	0,550*	400	Отс.	5	5
4	MF59 внутримышечно	Высокая 1	0,800	400	Отс.	5	5

* значение 0,548 мл/на животное округлено

В ходе испытаний не наблюдали связанных с исследованным препаратом смертельных исходов или связанных с исследованным препаратом показателей для любых исследуемых параметров. В ходе испытаний не наблюдали макроскопические или гистопатологические признаки токсичности в отношении органа-мишени вследствие введения исследуемого соединения.

Показатели, обнаруженные при вскрытии, соответствовали ожидаемому обычному спектру патологических показателей для макак-крабоедов. Не наблюдали необычных макроскопических признаков токсичности в отношении органа-мишени.

Гистопатологические показатели соответствовали ожидаемому обычному спектру патологических изменений у взрослых самок макак-крабоедов. При подкожном или внутримышечном введении конструктора по настоящему изобретению в отдельности или

в смеси с адьювантами, гидроксидом алюминия и MF59, наблюдалась достаточно высокая переносимость при введении доз 150 или 400 мкг/сут в дни 1, 15, 43 и 140 в ходе испытаний самкам макак-крабоедов старшего возраста, при этом не наблюдали признаков токсичности, связанных с исследованным препаратом. В ходе испытаний не наблюдалось отрицательных эффектов, связанных с лечением или уровнем введенных доз.

Пример 3

Подкожное и внутримышечное введение макакам-крабоедам в течение 26 недель

Испытания проводили при введении конструкта по настоящему изобретению в комбинации с адьювантами, проводили семь клинических иммунизации подкожно (п/к) и внутримышечно (в/м) в случае $Al(OH)_3$ и внутримышечно в случае MF59.

В ходе испытаний оценивали следующие показатели: контроль концентрации, клинические обследования, масса тела, неврологические исследования, нейроповеденческая функция, офтальмологическое обследование, ЭКГ, артериальное давление, серологический анализ (анализ специфических антител $A\beta/Q\beta$ IgG), накопление моноядерных клеток периферической крови в ответ на стимуляцию Т-клеток, иммуноферментативный спот-анализ (ELISPOT), анализ $A\beta$, гематологический анализ, клинический биохимический анализ, анализ мочи, определение иммуноглобулинов, анализ спинномозговой жидкости, масса органов, макроскопические исследования при вскрытии и гистопатологический анализ. Выбирали следующие дозы:

Таблица 2

Выбранные уровни доз

Номер группы	Адьювант	Описание группы	Объем инъекции (мл/животное)	Доза (мкг/инъекция)	Число животных в группе	
					Самцы	Самки
1	П/к	$Al(OH)_3$	0,77	0	3	3
2	В/м	$Al(OH)_3$	0,77	0	3	3
3	В/м	MF59	1,2	0	3	3
4	П/к	Конструкт/ $Al(OH)_3$	0,77	600	4	4
5	В/м	Конструкт/ $Al(OH)_3$	0,77	600	4	4
6	В/м	Конструкт/MF59	1,2	600	4	4

Результаты исследования можно обобщить следующим образом.

Животное 24965F из группы 5 умерщвляли в состоянии агонии в день 91 испытаний в связи с диареей и значительной потерей массы тела. Гематологический анализ в день 91 показал незначительное снижение показателя гематокрита и незначительное повышение числа моноцитов. Клинический биохимический анализ свидетельствовал о средней степени повышении содержания мочевины и дисбалансе электролитов в крови, а также о снижении содержания общего белка, альбумина и глобулина. Основные показатели указанного крайне истощенного животного при вскрытии включали аномальное полужидкое содержимое толстого кишечника, а также изменение красной окраски слизистой слепой кишки и ободочной кишки.

По данным гистопатологического анализа легкая степень (ободочная кишка) или средняя степень (в слепой кишке) криптогенного микроабсцесса связана с наличием полужидкого содержимого в толстом кишечнике. Наблюдалась также атрофия кишечных ворсинок средней степени в подвздошной кишке. Ряд других показателей свидетельствовал об ухудшении состояния животного со сниженным потреблением корма в течение длительного периода времени. Так как описанные показатели относились только к одному животному, их рассматривали как случайные и не связанные с лечением комбинацией исследуемый препарат/гидроксид алюминия.

После подкожного введения в участках инъекций наблюдались значительные изменения, включая опухание и покраснение у животных, которым вводили конструктор по настоящему изобретению (600 мкг/инъекция) в комбинации с $Al(OH)_3$ (группа 4).

Аналогичные показатели, но в меньшей степени, наблюдали в контрольной группе (группа 1), в которой вводили только $Al(OH)_3$. Опухание и покраснение также наблюдались после внутримышечного введения конструктора по настоящему изобретению (600 мкг/инъекцию) в комбинации с $Al(OH)_3$ (группа 5), но также в меньшей степени.

Никаких других прижизненных показателей, связанных с введением конструктора по настоящему изобретению, или адъювантов MF59, или $Al(OH)_3$, или их комбинаций, обнаружено не было.

У всех животных после введения конструктора по настоящему изобретению наблюдался ответ антител $A\beta$ и $Q\beta$ IgG. В контрольной группе титр антител $A\beta$ не наблюдался с одним исключением (группа 3, животное 24886, день 152, 9,3 ед.). Титр антител $Q\beta$ в контрольных группах в большинстве случаев был ниже предела количественного определения. Однако для 12 образцов из 252 зарегистрированы значения выше нижнего предела количественного обнаружения (6 в группе 1, 1 в группе 2, 5 в группе 3). В группах 4 и 5 определяли титр $Q\beta$ в 4 из 16 образцов до введения лекарственного средства (2 в группе 4, 2 в группе 5). Диапазон указанных титров $Q\beta$ (в контрольных группах 1-3 или в образцах до введения лекарственного средства (группы 4-6) составлял очень низкую величину (от 1,0 до 3,4 ед.) по сравнению с титрами, полученными после введения конструктора по настоящему изобретению в группах 4, 5 и 6 (у всех животных после введения дозы наблюдалось по крайней мере одно значение титра $Q\beta$ 841,7 ед. или более). В основном значительное повышение титра антител наблюдалось после третьей инъекции и последующих инъекций: наблюдались практически аналогичные профили $A\beta$ и $Q\beta$ IgG для всех групп, которым вводили конструктор по настоящему изобретению. Добавление гидроксида алюминия вызывало незначительное повышение титров $A\beta$ по сравнению с добавлением MF59. Наблюдаемый эффект более ярко выражен при оценке по титру $Q\beta$. Способ введения конструктора по настоящему изобретению в смеси с гидроксидом алюминия (подкожно или внутримышечно) очень незначительно влияет на иммунный ответ $A\beta$ и $Q\beta$. Несмотря на то, что данные иммуноферментного спот-анализа свидетельствуют об индукции распространения $Q\beta$ специфичных Т-клеток, полученные данные свидетельствуют об отсутствии распространения $A\beta$ специфичных Т-клеток.

Наблюдались изменения гистопатологических показателей при обследовании участков инъекции в группах 1, 2, 4 и 5 (которым вводили $Al(OH)_3$ или конструктор по настоящему изобретению в комбинации с $Al(OH)_3$), которые включали гистиоцитоз и подострое воспаление различной степени тяжести. Колликативный некроз наблюдался в местах большого скопления гистиоцитов в группах 4 и 5 (комбинация конструктор по настоящему изобретению/ $Al(OH)_3$, подкожное и внутримышечное введение соответственно). Кластеры гистиоцитов аналогичного внешнего вида наблюдали в дренирующих лимфатических узлах (подмышечные узлы в группе 4, паховые в группе 5) у отдельных животных в группах 4 и 5. В участках инъекций в группе 6 (конструктор по настоящему изобретению/MF59) наблюдалось подострое воспаление от минимальной до средней степени тяжести у 3 самцов и минимальное слабое подострое воспаление у трех самок.

В заключение следует отметить, что подкожное и внутримышечное введение

исследуемого препарата (конструкта по настоящему изобретению в комбинации с $\text{Al}(\text{OH})_3$) приводит к местному опуханию и покраснению кожи. По данным гистопатологического анализа наблюдали гистиоцитоз и подострое воспаление, а также колликативный некроз и кластеры гистиоцитов в дренирующих лимфоузлах.

Введение адьюванта $\text{Al}(\text{OH})_3$ также приводит к опуханию, покраснению, гистиоцитозу и подострому воспалению в участках инъекций, но в меньшей степени тяжести. Таким образом, можно заключить, что исследуемый препарат при введении в комбинации с $\text{Al}(\text{OH})_3$ вносит вклад в развитие указанных отрицательных явлений.

Введение исследуемого препарата в комбинации с MF59 вызывало только подострое воспаление, которое не наблюдалось в соответствующей контрольной группе (группа 3).

Пример 4

Рандомизированные испытания с плацебо контролем двойным слепым методом в течение 90 недель с участием пациентов с болезнью Альцгеймера при неоднократном внутримышечном введении конструкта по настоящему изобретению

Испытания проводили с участием пациентов в возрасте не менее 85 лет (включительно), страдающих от болезни Альцгеймера легкой степени с индексом от 20 до 26 (включительно) по краткой шкале оценки психического статуса (MMSE).

Пациенты не проходили никакого курса лечения или проходили курс лечения стабильными дозами ингибитора холинэстеразы или мемантина в течение последних 4 недель до проведения клинических испытаний. Пациентов рандомизировали в группы, в которых пациентам вводили многократные внутримышечные дозы конструкта по настоящему изобретению в смеси с адьювантом или плацебо. Первой группе пациентов многократно внутримышечно вводили 150 мкг конструкта по настоящему изобретению в комбинации с адьювантом: или 150 мкг гидроксида алюминия, или 50 мкг гидроксида алюминия, или 250 мкл MF59, или 125 мкл MF59. Второй группе пациентов многократно внутримышечно вводили 450 мкг конструкта по настоящему изобретению в комбинации с адьювантом: или 150 мкг гидроксида алюминия, или 450 мкг гидроксида алюминия, или 125 мкл MF59, или 250 мкл MF59. Третьей группе пациентов многократно внутримышечно вводили плацебо, содержащее или 150 мкг гидроксида алюминия, или 450 мкг гидроксида алюминия, или 125 мкл MF59, или 250 мкл MF59.

Указанные дозы вводили в недели 0, 6, 12, а затем в недели 24, 36, 48 и 60.

Гидроксид алюминия готовили при разбавлении исходной суспензии (15 г/л $\text{Al}(\text{OH})_3$) раствором NaCl. Конечная суспензия содержала 2,7 мг/мл $\text{Al}(\text{OH})_3$, 9 мг/мл NaCl pH 5,9 (pH 5.5-7.5). Гомогенной суспензией заполняли флаконы объемом 2 мл, закрывали резиновыми пробками, автоклавировали для обеспечения стерильности и хранили при 2°C-8°C.

В случае MF59 насыпным материалом заполняли в стерильных условиях флаконы объемом 3 мл, закрывали пробками и хранили при температуре 2°C-8°C в защищенном от света месте.

Перед введением конструкт по настоящему изобретению смешивали с адьювантом.

Оценка безопасности исследуемого лекарственного средства включала общий физический осмотр, неврологическое исследование, ЭКГ в 12 отведениях, оценку основных показателей состояния организма, стандартные клинические лабораторные анализы (гематологический, биохимический анализ крови, анализ мочи), специализированные иммунологические лабораторные исследования крови и спинномозговой жидкости, МРТ головного мозга, а также регистрацию побочных

эффектов и тяжелых побочных эффектов.

Ответ Аβ-антител оценивали по титру Аβ-антител (IgG и IgM) в сыворотке и спинномозговой жидкости методами ИФА. Связывание Аβ-антител ex vivo в сыворотке и спинномозговой жидкости изучали иммунологическими методами в ткани головного мозга человека и головного мозга трансгенных мышей, содержащего β-амилоидный белок-предшественник. Ответ в виде титра антител на VLP в сыворотке определяли для исследования иммунного ответа на вещество-носитель по отношению к иммунному ответу на Аβ.

Диагностическая оценка фармакодинамических параметров включала: 1) выявление связанных с заболеванием маркеров в спинномозговой жидкости (пептиды Аβ и их изоформы, тау-белок и его изоформы, фосфо-тау) и в плазме (Аβ белки и изоформы), 2) объемная MPT и 3) индекс по шкале оценки когнитивных функций при болезни Альцгеймера (ADAS-Cog), индекс по шкале оценки психического статуса (MMSE), индекс по шкале клинической оценки деменции (CDR) и совместное исследование болезни Альцгеймера по шкале оценки способности к самообслуживанию (ADCS-ADL).

Термин «пациент с ответной реакцией на лечение» обозначает пациентов, у которых регистрировали значительное повышение уровня титра Аβ-специфических антител по сравнению с базовым значением. Титры Аβ-специфических антител определяли как титры выше нижнего предела количественного определения достоверности методом ИФА, т.е. по количеству специфических антител по отношению к стандартной сыворотке в качестве калибровочного маркера.

Формула изобретения

1. Композиция для лечения и/или профилактики деменции, болезни Альцгеймера, деменции, связанной с болезнью Альцгеймера, или связанных с указанными заболеваниями состояний, содержащая:

i) 450 мкг конструкции, содержащей пептид Аβ1-6, состоящий из структуры вирусоподобной частицы (VLP), химически присоединенной к пептиду Аβ1-6 через двухвалентный линкер сукцинимидил-6-(β-малеимидопропионамидо)гексаноат (SMPH), где VLP состоит из капсидных белков РНК бактериофага Qβ и где пептид Аβ1-6 слит на С-конце со спейсерной последовательностью GGC, и

ii) 450 мкг фармацевтически приемлемого адъюванта, который представляет собой соль алюминия.

2. Композиция по п. 1, где солью алюминия является Al(OH)₃.

3. Композиция по п. 1 или 2, где конструкция, содержащая пептид Аβ1-6, находится в водном растворе.

4. Вакцина для лечения и/или профилактики деменции, болезни Альцгеймера, деменции, связанной с болезнью Альцгеймера, или связанных с указанными заболеваниями состояний, содержащая композицию по любому из пп. 1-3.

5. Вакцина по п. 4, где солью алюминия является Al(OH)₃.

6. Комбинация для лечения и/или профилактики деменции, болезни Альцгеймера, деменции, связанной с болезнью Альцгеймера, или связанных с указанными заболеваниями состояний, содержащая композицию по любому из пп. 1-3, или вакцина по любому из пп. 4-5 и по крайней мере одно средство, выбранное из следующего перечня: ноотропные средства, мемантин, антидепрессанты, антипсихотические средства, противодиабетические средства, антиоксиданты, противовоспалительные средства, гиполипидемические средства, средства для заместительной гормонотерапии, снижающие уровень амилоидов агенты, ингибиторы агрегации, хелатирующие средства и

иммуномодулирующие средства.

7. Применение композиции по любому из пп. 1-3 для получения лекарственного средства для лечения и/или профилактики деменции, болезни Альцгеймера, деменции, связанной с болезнью Альцгеймера, или связанных с указанными заболеваниями состояний.

8. Применение композиции по любому из пп. 1-3 для получения лекарственного средства для лечения индивидуумов из группы риска развития деменции, болезни Альцгеймера, деменции, связанной с болезнью Альцгеймера, или связанных с указанными заболеваниями состояний.

9. Применение по п. 7 или 8, где композицию вводят с интервалами от приблизительно 6 до приблизительно 12 недель.

10. Применение по любому из п. 7 или 8, где композицию вводят два или более раз с интервалами приблизительно 6 недель, а затем два раза или более с интервалами приблизительно 12 недель.

11. Композиция по любому из пп. 1-3, где композицию вводят два или более раз с интервалами приблизительно 6 недель, а затем два или более раз с интервалами приблизительно 12 недель.

12. Набор для лечения и/или профилактики деменции, болезни Альцгеймера, деменции, связанной с болезнью Альцгеймера, или связанных с указанными заболеваниями состояний, содержащий а) композицию по любому из пп. 1-3 и б) инструкцию по применению.