



(51) МПК
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A61K 39/00 (2018.08); *A61K 39/39* (2018.08); *A61P 25/28* (2018.08)

(21)(22) Заявка: 2015142996, 23.04.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
23.04.2013

Дата регистрации:
05.08.2019

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
15.03.2013 US 13/843,883

(43) Дата публикации заявки: 24.04.2017 Бюл. № 12

(45) Опубликовано: 05.08.2019 Бюл. № 22

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 15.10.2015

(86) Заявка РСТ:
US 2013/037865 (23.04.2013)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2014/143087 (18.09.2014)

Адрес для переписки:
**129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО
 "Юридическая фирма Городисский и
 Партнеры"**

(72) Автор(ы):

ВАН Чан И (US)

(73) Патентообладатель(и):

ЮНАЙТЕД БАЙОМЕДИКАЛ, ИНК. (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: US 2004247612 A1, 09.12.2004.
 WO2008021296 A2, 21.02.2008. US 20110171243
 A1, 14.07.2011. US 20040009897 A1, 15.01.2004.

RU 2696566 C2

RU 2696566 C2

(54) ПЕПТИДНАЯ ВАКЦИНА ДЛЯ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ИММУНОТЕРАПИИ ДЕМЕНЦИИ АЛЬЦГЕЙМЕРОВСКОГО ТИПА

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к медицине, а именно к иммунологии, и может быть использована для получения фармацевтической композиции для профилактики и/или лечения деменции альцгеймеровского типа. Фармацевтическая композиция включает: а) комбинацию иммуногенных конструкций Аβ пептида с последовательностями SEQ ID NO: 64 и 65, а также включает способ лечения и/или профилактики болезни Альцгеймера. Использование данной группы изобретений позволяет получить иммуногенные конструкции Аβ-пептидов, стимулирующих образование высокоспецифических антител, направленных против N-конца Аβ-пептида, что обеспечивает защитные иммунные ответы у пациентов,

фармацевтической композиции, включающей комбинацию иммуногенных конструкций Аβ пептида с последовательностями SEQ ID NO: 64 и 65, а также включает способ лечения и/или профилактики болезни Альцгеймера. Использование данной группы изобретений позволяет получить иммуногенные конструкции Аβ-пептидов, стимулирующих образование высокоспецифических антител, направленных против N-конца Аβ-пептида, что обеспечивает защитные иммунные ответы у пациентов,

имеющих риск болезни Альцгеймера или болезнь
Альцгеймера. 10 н. и 10 з.п. ф-лы, 26 ил., 20 табл.,

26 пр.

R U 2 6 9 6 5 6 6 C 2

R U 2 6 9 6 5 6 6 C 2

RUSSIAN FEDERATION



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19)

RU

(11)

2 696 566⁽¹³⁾ C2

(51) Int. Cl.

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

A61K 39/00 (2018.08); A61K 39/39 (2018.08); A61P 25/28 (2018.08)

(21)(22) Application: 2015142996, 23.04.2013

(24) Effective date for property rights:
23.04.2013

Registration date:
05.08.2019

Priority:

(30) Convention priority:
15.03.2013 US 13/843,883

(43) Application published: 24.04.2017 Bull. № 12

(45) Date of publication: 05.08.2019 Bull. № 22

(85) Commencement of national phase: 15.10.2015

(86) PCT application:
US 2013/037865 (23.04.2013)

(87) PCT publication:
WO 2014/143087 (18.09.2014)

Mail address:
129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):

VAN Chan I (US)

(73) Proprietor(s):

YUNAJTED BAJOMEDIKAL, INK. (US)

C2

66

55

66

2

RU

R
U

2
6
9
6
5
6
6

C
2

(54) PEPTIDE VACCINE FOR PREVENTION AND IMMUNOTHERAPY OF DEMENTIA OF THE ALZHEIMER'S TYPE

(57) Abstract:

FIELD: medicine; pharmaceuticals.

SUBSTANCE: group of inventions relates to medicine, namely to immunology, and can be used to produce a pharmaceutical composition for the prevention and/or treatment of dementia of the Alzheimer's type. Pharmaceutical composition includes: a) a combination of Aβ peptide immunogenic constructs with sequences SEQ ID NO: 62 and 63; and b) a pharmaceutically acceptable carrier for delivery and/or adjuvant. Group of inventions also relates to variants of a pharmaceutical composition comprising a

combination of Aβ peptide immunogenic constructions with sequences SEQ ID NO: 64 and 65, and also includes a method for the treatment and/or prevention of Alzheimer's disease.

EFFECT: use of the group of inventions allows producing Aβ peptides immunogenic constructs stimulating the generation of highly specific antibodies directed against the N-terminus of the Aβ peptide, offering protective immune responses to patients at risk for, or with, Alzheimer's disease.

20 cl, 26 dwg, 20 tbl, 26 ex

По настоящей заявке испрашивается приоритет по патентной заявке США с серийным № 13/843883, поданной 15 марта 2013 года, полное содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки, как если бы оно было полностью представлено в настоящем описании.

5 ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к вакцине на пептидной основе и к ее составам для предупреждения и иммунотерапии деменции альцгеймеровского типа.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОМУ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Болезнь Альцгеймера (AD) представляет собой наиболее распространенную форму

10 деменции, являясь хроническим нейродегенеративным нарушением, характеризующимся потерей когнитивной способности, тяжелыми нарушениями поведения и смертью. Она поражает приблизительно 10% популяции в возрасте 65 лет и 40% популяции в возрасте более 85 лет. В отличие от других ведущих причин смерти, таких как заболевание сердца, злокачественная опухоль и инсульт, смертность от болезни Альцгеймера значительно 15 возрастет в течение последующих двух-трех десятилетий, поскольку достижения медицинской технологии позволяют большему количеству пациентов достигнуть возраста риска деменции. В США на сегодняшний день 7–8% всех медицинских расходов связано с деменцией. В США в настоящее время живут от 2,5 до 4,0 миллионов пациентов с AD и от 17 до 25 миллионов по всему миру. Отсутствует эффективный метод лечения или 20 средство для излечения от этого тяжелого заболевания.

Как первоначально было определено Алоисом Альцгеймером (1907), два типа микроскопических отложений, т.е. нейрофибрillaryные клубки и сенильные амилоидные бляшки, остаются патологической отличительной чертой заболевания. Окончательный 25 диагноз болезни Альцгеймера традиционно требует либо биопсии, либо гистопатологии после вскрытия. После недавнего внедрения лигандов, которые метят амилоидные бляшки позитронно-активными изотопами в комбинации с исследованием когнитивной способности и измерением конкретных молекул в спинномозговой жидкости, в настоящее время стал возможным более точный диагноз этого заболевания без исследования гистопатологии.

30 Накапливается большое число данных, указывающих на то, что β -амилоидный ($A\beta$) пептид – основной компонент сенильных амилоидных бляшек – играет важную роль при AD. Современный обзор β -амилоидного ($A\beta$) пептида (от 13 февраля 2013 года) доступен в Wikipedia на http://en.wikipedia.org/wiki/Beta_amyloid#cite_note-wales2010-41, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки. Успешная модифицирующая 35 заболевание терапия от AD, вероятно, будет включать продукты, которые влияют на отложение β -амилоида в головном мозге. Недавняя публикация Morgan, D. "Immunotherapy for Alzheimer disease" (Morgan D. J Int Med 2011; 269:54–63), которая имеет отношение к настоящему изобретению, включена в качестве ссылки в качестве обзора уровня техники.

40 Инициирующим фактором, необходимым, но не достаточным для болезни Альцгеймера, является накопление амилоидных агрегатов, состоящих из $A\beta$ -пептида. Генетика семейных форм болезни Альцгеймера и случаев синдрома Дауна (который приводит к преждевременной альцгеймеровской патологии) включает сверхпродукцию более длинной С-концевой формы $A\beta$ -пептида (длиной 42 аминокислоты) в качестве 45 общего элемента. Этот $A\beta_{1-42}$ -пептид склонен к образованию бета-складчатых структур и к агрегации в олигомеры и фибриллы. Эти амилоидные отложения могут присутствовать десятилетиями или более в головном мозге до появления симптомов когнитивного нарушения. Второй стадией патогенеза заболевания является образование

внутринейрональных нейрофибриллярных клубков из гиперфосфорилированного белка тау, связывающего микротрубочки. Другие нейродегенеративные нарушения также могут возникать вследствие патологии тау в отсутствие отложений амилоида, однако они отличаются от болезни Альцгеймера, как клиническими проявлениями, так и

⁵ региональным расположением патологии в головном мозге. В моделях на мышах с трансгенным белком тау отложения тау можно вызвать посредством внутричерепной инъекции амилоида или скрещивания с мышами, продуцирующими отложения Аβ.

Более того, прерывание отложения амилоида посредством иммунотерапии против Аβ может уменьшить прогрессирование патологии тау у мышей, экспрессирующих

¹⁰ множество трансгенов. Патология тау, по-видимому, лучше коррелирует с когнитивным статусом, чем патология амилоида, что согласуется с тем, что она является более существенной причиной ментальной дисфункции. Посредством неустановленных механизмов эти патологии приводят к утрате синаптической функции, синапсов и в конечном итоге к потере нейронов, что приводит к существенной атрофии головного

¹⁵ мозга.

Существует множество гипотез, касающихся вовлеченных механистических стадий. Агрегаты амилоида и/или тау промежуточного размера, называемые олигомерами, считаются более прямой причиной токсичности. Даже на наиболее ранних стадиях нарушения в фазу "мягкого когнитивного нарушения" (MCI), по-видимому, существует значительная патология накопления бляшек и клубков, и потеря нейронов. Эти наблюдения указывают на то, что лечение нарушения на наиболее ранних возможных стадиях, также как и в случае сердечно-сосудистого заболевания, является необходимым для контроля болезни Альцгеймера.

В 1999 году было обнаружено, что вакциинный подход уменьшает отложения амилоида у трансгенных мышей, сверхпродуцирующих белок-предшественник амилоида. После этого было обнаружено, что вакцины или пассивная иммунотерапия, нацеленные на Аβ, устраняют дефицит памяти у этих мышей. Антитела, специфичные к Аβ, активно образуемые иммунной системой или пассивно вводимые, постоянно снижают нагрузку бляшками в различных моделях Аβ-амилоидоза на трансгенных мышах. Учитывая

³⁰ успех вакцинации в моделях на животных и отсутствие какой-либо альтернативной модифицирующей заболевание терапии болезни Альцгеймера, первая клиническая попытка стимулировать иммунную систему пациентов с AD для образования Аβ-антител была предпринята с помощью вакцины, называемой AN1792, которая состояла из полноразмерного Аβ₁₋₄₂-пептида, содержащего как В-, так и Т-клеточные эпитопы,

³⁵ агрегированного в фибриллы. Приблизительно 60 пациентам вводили одну или несколько доз вакцин в испытании безопасности 1 фазы. Одним из первоначальных наблюдений был вариабельный антителенный ответ, причем у многих пациентов вакцины не индуцировали поддающиеся обнаружению титры антител против антигена-мишени, представляющего собой Аβ-пептид. Это отсутствие иммунного ответа у многих из

⁴⁰ пациентов привело к изменению вакциинного состава путем включения QS-21 в качестве адьюванта в попытках усилить иммуногенность вакциинного состава AN1792 в испытании безопасности 2 фазы и иммуногенности. Целью была иммунизация пациентов до заданного титра антител посредством множества инокуляций. Однако иммунизации прекратили вскоре после начала испытания вследствие небольшого процента пациентов

⁴⁵ (~6%), у которых развилась асептическая менингоэнцефалопатия - воспалительная реакция в центральной нервной системе (ЦНС). Два пациента, у которых развились эти симптомы в ЦНС, погибли, и последующая аутопсия выявила инфильтрацию Т-клетками ЦНС, наблюдавшуюся с признаками воспаления менингиальной оболочки.

Было сделано заключение, что неблагоприятный ответ на вакцинский состав AN1792 представлял собой аутоиммунную реакцию, вызванную вакциной (Orgogozo JM, et al., Neurology 2003; 61:46-54). С точки зрения эффективности, не наблюдали отличий уровня уменьшения головного мозга согласно МРТ или когнитивной деятельности между

5 пациентами, которым вводили вакцину, и пациентами, которым вводили плацебо.

Несмотря на неудачу с вакциной AN1792, разработка новых вакцинных стратегий и адьювантов против А β -пептида для иммунотерапии болезни Альцгеймера стала областью интенсивной творческой деятельности. В большинстве случаев целью было достижение активации В-клеток и продукции антител с минимальным вовлечением Т-

10 клеток (по меньшей мере против А β), вследствие неблагоприятных явлений, выявленных в испытаниях у человека с использованием вакцин против полноразмерного А β_{1-42} -пептида, как показано для случая AN1792.

В настоящее время, помимо продукта по настоящему изобретению, созданного автором изобретения и ее бригадой, проводится четыре клинических испытания фазы I/II активной иммунизации с использованием различных конструкций вакцин и составов, нацеленных на фрагменты А β . Эти испытания включают: ACC-001 (Elan Corporation Inc. и Wyeth) с использованием в качестве иммуногена N-концевого пептидного фрагмента А β_{1-7} , конъюгированного с дифтерийным токсоидным белком; CAD106 (Immunodrug

20 TM; Cytos Biotechnology AG и Novartis Pharma AG) с использованием в качестве иммуногена N-концевого пептидного фрагмента А β_{1-5} , связанного с вирусоподобной частицей Q β ; V950 (Merck) с использованием в качестве иммуногена N-концевых пептидов А β , конъюгированных с ISCO-MATRIX; и GSK/Affiris с использованием в качестве иммуногена пептидных миметиков А β , конъюгированных с молекулами

25 носителей. Кроме того, существуют другие вакцинные подходы, нацеленные на А β , как описано в обзоре Tabira T (Tohoku J Exp Med 2010; 220:95-106).

Все конструкции вакцин и составы, нацеленные на А β , в настоящее время проходящие испытания у человека, как описано выше, имеют слабую иммуногенность с

30 вариабельным антителенным ответом, поскольку только у от 30% до приблизительно 70%-80% пациентов, которым вводили эти вакцины, индуцировались антитела против А β -пептида, являющегося мишенью, что делает какой-либо дальнейший анализ эффективности в результате индуцированных вакциной антител против А β более затрудненным. Большинство конструкций вакцин являются сложными, требующими конъюгации очень коротких фрагментов А β -пептида с носителем в виде крупного белка

35 или вирусоподобной частицы, таким образом, направляя большинство антителенных ответов против нежелательного носителя, а не против коротких пептидов-мишеней; сложные конструкции вакцин определяют широкомасштабные процессы производства, таким образом, являясь трудно поддающимися контролю качества и неэкономичными. Эти вакцины имеют неопределенные характеристики безопасности вследствие

40 потенциального свойства активации Th1 используемым адьювантом и составом. Кроме того, на сегодняшний день ни одна из этих вакцин не продемонстрировала какой-либо клинической эффективности, такой как улучшение когнитивных функций у пациентов, которым вводили вакцины.

В развитых странах AD является одним из наиболее дорогостоящих заболеваний

45 для общества. Необходимо найти новые способы терапии для предупреждения, отсрочки возникновения или замедления прогрессирования AD. Несмотря на перспективные данные иммунологических вмешательств в AD у мышей, безопасная и эффективная вакцина у человека, нацеленная на А β , для предупреждения и лечения

деменции альцгеймеровского типа остается проблемой. Ввиду ограничений конструкций вакцин и составов, в настоящее время проходящих доклинические и клинические испытания, как описано выше, существует неудовлетворенная и срочная необходимость разработки безопасного и эффективного вакцинного состава для обеспечения

иммунотерапии с широким ответом для предупреждения и лечения деменции альцгеймеровского типа. Когда такой вакцинный состав станет успешным против патологии Альцгеймера, он войдет в число стандартных подходов для предупреждения заболевания.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к индивидуальным иммуногенным конструкциям Аβ-пептида, к пептидным композициям, содержащим эти иммуногенные конструкции Аβ-пептида и их смеси, к фармацевтическим композициям, включающим вакциные составы, содержащие эти иммуногенные конструкции Аβ-пептида, причем индивидуальные иммуногенные конструкции Аβ-пептида имеют N-конец Аβ-пептида в качестве В-клеточных (В) эпитопов, связанных через спейсерный остаток(и) с гетерологичными Т-хелперными (Th) эпитопами, происходящими из патогенных белков, которые действуют, стимулируя образования высокоспецифических антител, направленных против N-конца Аβ-пептида, обеспечивающих защитные иммунные ответы у пациентов, имеющих риск болезни Альцгеймера или имеющих болезнь Альцгеймера.

В одном варианте осуществления иммуногенные конструкции Аβ-пептида могут содержать гибридный Аβ-пептид, имеющий В-клеточный антигенный участок длиной от 10 до 14 аминокислот из N-концевой части Аβ₁₋₄₂ пептида, например Аβ₁₋₁₀, Аβ_{1-12, Аβ₁₋₁₄}, который связан с гетерологичным Th-эпитопом, происходящим из патогенных белков, таких как белок слияния вируса кори (MVF) (SEQ ID NO: 34), которые действуют совместно, стимулируя образование высокоспецифических антител, перекрестно реагирующих с полноразмерным Аβ₁₋₄₂-пептидом (SEQ ID NO: 1) в сенильных бляшках.

В других вариантах осуществления иммуногенные конструкции Аβ-пептида содержат гибридный пептид, имеющий В-клеточный антигенный участок, представляющий собой Аβ₁₋₁₄-пептид, связанный с гетерологичными Th-эпитопами, происходящими из различных патогенных белков (SEQ ID NO: 33-47), способный индуцировать антитела, перекрестно реагирующие с полноразмерным Аβ₁₋₄₂ пептидом в сенильных бляшках.

С использованием скринингового тестирования иммуногенности было обнаружено, что среди гетерологичных Th-эпитопов, используемых для усиления В-клеточного антигенного участка, представляющего собой Аβ₁₋₁₄ пептид, Th-эпитопы, происходящие из природных патогенов: дифтерийного токсина (SEQ ID NO: 37), Plasmodium Falciparum (SEQ ID NO: 38), холерного токсина (SEQ ID NO: 40), и идеализированные искусственные Th-эпитопы, происходящие из белка слияния вируса кори (MVF 1-5) и поверхностного антигена гепатита В (HBsAg 1-3) в форме либо единой последовательности, либо комбинаторных последовательностей (например SEQ ID NO: 34 и 41-47) являются особенно применимыми в таком усилении В-клеточной антигенности. В других вариантах осуществления пептидные композиции, содержащие смесь иммуногенных конструкций Аβ-пептида с гетерологичными Th-эпитопами, происходящими из

различных патогенов, используют для обеспечения охвата настолько широкого генетического фона у пациентов, который приводит к более высокому проценту уровня отвечающих при иммунизации вакциной для лечения и предупреждения деменции альцгеймеровского типа. В одном варианте осуществления иммуногенные конструкции

А β -пептида (SEQ ID NO: 62 и 63) с гетерологичными Th-эпитопами, происходящими из MVF и HBsAg в комбинаторной форме (SEQ ID NO: 44 и 45), смешивали в эквимолярном соотношении для применения в вакцинном составе для обеспечения максимального охвата популяции реципиентов вакцин, имеющих разнообразный генетический фон. В 5 пептидных композициях по настоящему изобретению наблюдали синергическое усиление иммуногенных конструкций А β -пептида, и антителный ответ по большей части (>90%) был сфокусирован на желаемой перекрестной реактивности против полноразмерного А β ₁₋₄₂ без существенного ответа, или даже без ответа, направленного на гетерологичные Th-эпитопы, используемые для усиления иммуногенности. Это значительно отличается 10 от общепринятых белковых или других биологических носителей, используемых для такого усиления антигенности пептида. В другом варианте осуществления высокоочищенные иммуногенные конструкции А β -пептида (SEQ ID NO: 64 и 65) с гетерологичными Th-эпитопами, происходящими из MVF и HBsAg в форме единой 15 последовательности (SEQ ID NO: 46 и 47), смешивали необязательно в эквимолярном соотношении для применения в вакцинном составе для обеспечения максимального охвата популяции реципиентов вакцины, имеющих разнообразный генетический фон.

Также настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим вакциновые составы для лечения и предупреждения деменции альцгеймеровского типа. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические 20 композиции содержат стабилизированный иммуностимулирующий комплекс, который образован посредством электростатической ассоциации при смешении CpG-олигомера с пептидной композицией, содержащей смесь иммуногенных конструкций А β -пептида, для дальнейшего усиления иммуногенности А β -пептида в направлении желаемой перекрестной реактивности в отношении полноразмерного А β ₁₋₄₂, присутствующего 25 в сенильных бляшках. В других вариантах осуществления фармацевтические композиции, содержащие пептидную композицию из смеси иммуногенных конструкций А β -пептида в контакте с минеральными солями, включающими гель на основе квасцов (Alhydrogel) или фосфат алюминия (Adjuphos) в качестве адьюванта для получения супензионного 30 вакцинового состава, использовали для введения вакцины реципиентам вакцины. В другом варианте осуществления фармацевтические композиции, содержащие пептидную 35 композицию из смеси иммуногенных конструкций А β -пептида, образующих стабилизированных иммуностимулирующий комплекс с CpG-олигомерами, необязательно смешивают с минеральными солями, включая гель на основе квасцов (Alhydrogel) или фосфат алюминия (Adjuphos) в качестве адьюванта с высоким коэффициентом безопасности, для получения супензионного вакцинового состава для 40 введения реципиентам вакцин.

Также настоящее изобретение относится к способам лечения и профилактики деменции альцгеймеровского типа. В описанных способах используются фармацевтические композиции, включающие супензионный вакциновый состав, 45 содержащий иммуногенные конструкции А β -пептида по настоящему изобретению, необязательно образующие стабильный иммуностимулирующий комплекс с CpG-олигомерами, которые необязательно дополнены минеральными солями в качестве адьюванта, для введения пациентам, имеющим риск болезни Альцгеймера или имеющим болезнь Альцгеймера. В этих вариантах осуществления фармацевтические композиции, которые содержат иммуногенные конструкции А β -пептида и вакциновые 45 составы, полученные на их основе, могут индуцировать антитела против полноразмерного А β ₁₋₄₂ пептида, ингибируя, *in vitro*, образование фибрилл и снижая,

in vitro, цитотоксичность в отношении нейрональных клеток на примере клеточных линий PC12, опосредуемую агрегированными Аβ-олигомерами. В некоторых вариантах осуществления у животных или пациентов, которым вводили вакциные составы на основе иммуногенных конструкций Аβ-пептида, развивались значительные уровни 5 антител против полноразмерного пептида Аβ₁₋₄₂, и было обнаружено, что они выводят такой токсический Аβ-пептид из центральной нервной системы на периферию, что демонстрируется повышенными уровнями Аβ₁₋₄₀ в плазме и сыворотке реципиентов вакцин.

10 В другом аспекте настоящего изобретения было неожиданно обнаружено, что вакциные составы, содержащие иммуногенные конструкции Аβ-пептида, можно преимущественно применять внутримышечно у теплокровных животных, особенно людей, страдающих деменцией альцгеймеровского типа. В другом аспекте настоящего изобретения предусматривается дозированная форма для внутримышечного введения 15 двух иммуногенных конструкций Аβ-пептида (SEQ ID NO: 64 и 65). Предпочтительной дозированной формой для внутримышечной инъекции является вакциный состав, содержащий от 30 мкг до 1000 мкг/0,5 мл пептидных иммуногенных конструкций в комплексе с CpG-олигомерами, дополненные 0,5 мл минеральных солей в качестве 20 адьюванта, предпочтительно от 100 мкг до 400 мкг/0,5 мл, и более предпочтительно 300 мкг/0,5 мл. Дозированная форма является стабильной в течение более чем 2 лет и ее можно хранить при 2-8°C до момента времени непосредственно перед применением. 25 Дозированную форму предпочтительно вводят посредством внутримышечной инъекции шприцом теплокровному животному, особенно в плечо. Для нагревания дозированной формы дозированную форму можно держать при температуре окружающей среды в течение приблизительно от 15 минут до 45 минут, например 30 минут. Предпочтительно, перед извлечением лекарственного вещества флаконы осторожно переворачивают несколько раз для диспергирования потенциальных невидимых невооруженным глазом частиц.

30 В другом аспекте настоящего изобретения неожиданно было обнаружено, что вакциные составы, содержащие иммуногенные конструкции Аβ-пептида, можно преимущественно применять внутримышечно у теплокровных животных, особенно макаков-резус и людей, страдающих деменцией альцгеймеровского типа, для индукции высокоспецифических антител, в основном направленных против N-конца Аβ-пептида, 35 соответствующего Аβ₁₋₁₀-пептиду с аминокислотой "аспарагиновая кислота (D)", экспонированной на наружной части олигомеров Аβ₁₋₄₂-пептида, агрегатов или в сенильных бляшках, что демонстрируется исследованиями по точному картированию эпитопов. В другом аспекте настоящего изобретения неожиданно было обнаружено, что вакциные составы, содержащие иммуногенные конструкции Аβ-пептида, можно преимущественно применять внутримышечно у теплокровных животных, особенно у 40 макаков-резус и людей, страдающих деменцией альцгеймеровского типа, для индукции специфических антител, в основном направленных против N-конца Аβ₁₋₄₂-пептида у всех животных и у всех пациентов, которым вводят такие вакциные составы, таким образом, достигая 100% уровня антителного ответа, что является чрезвычайно редким в истории разработки вакцин. В другом аспекте настоящего изобретения было 45 неожиданно обнаружено, что вакциные составы, содержащие иммуногенные конструкции Аβ-пептида по настоящему изобретению, можно преимущественно применять внутримышечно у пациентов в возрасте 60 лет или старше и у категории с мягкой болезнью Альцгеймера клинически со значительным улучшением показателей

когнитивной способности (ADAS-Cog, ADCS-CGIC, MMSE), что является беспрецедентным с момента первого исследования иммунотерапии пациентов с болезнью Альцгеймера.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу предупреждения и

- 5 лечения деменции альцгеймеровского типа у пациентов-людей, включающему введение от 30 мкг до 750 мкг, предпочтительно от 100 мкг до 400 мкг, более предпочтительно приблизительно 300 мкг пациентам-людям, нуждающимся в этом, приблизительно один раз в 12 недель, предпочтительно приблизительно один раз в 26 недель, и особенно предпочтительно приблизительно один раз в 52 недели, в зависимости от антителного
- 10 ответа пациента, направленного на полноразмерный Аβ-пептид, после первичной иммунизации тремя инъекциями на 0, 4 и 8 неделях после первоначальной иммунизации.

Пригодность вакциновых составов и иммуногенных конструкций Аβ-пептида для лечения упомянутых выше нарушений может быть далее подтверждена в подходящих клинических испытаниях, например испытаниях, описанных в примерах, например, с

- 15 применением всего трех доз на 0, 4 и 12 неделях, причем каждый раз применяя 300 мкг/0,5 мл/доза вакцинового состава на последующий период более 9 месяцев. Могут существовать дополнительные иммунизации один раз в три, шесть или 12 месяцев в соответствии с титрами антител.

Пригодные клинические испытания представляют собой открытые испытания или,

- 20 в частности, рандомизированные двойные слепые плацебо-контролируемые параллельные испытания у пациентов с риском болезни Альцгеймера или с симптомами болезни Альцгеймера.

В настоящем описании также описан способ экономичного изготовления и контроля качества иммуногенных конструкций пептида Аβ, а также система доставки, способная 25 защищать животных и пациентов, имеющих риск болезни Альцгеймера или болезнь Альцгеймера.

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к моноклональным антителам человека против А β ₁₋₄₂, индуцируемым у пациентов, которым вводят вакциновые составы иммуногенных конструкций Аβ-пептида по настоящему изобретению. Эффективный 30 способ получения моноклональных антител человека из В-клеток, выделенных из крови пациента-человека, описан Elisabetta Traggiai et al, in Nature Medicine 10, 871-875 (2004), которая включена в настоящее описание в качестве ссылки.

Ссылки:

- 35 Green RC, Schneider LS, Amato DA, et al., "Effect of Tarenflurbil on Cognitive Decline and Activities of Daily Living in Patients with Mild Alzheimer Disease." Journal of the American Medical Association 2009; 302(23):2557-2564.

Hardy J. Amyloid, "The Presenilins, and Alzheimer's Disease." Trends in Neurosciences 1997; 20(4):154-159.

- 40 Hartmann T, Bieger SC, Bruhl, et al. "Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease Abeta40/42 amyloid peptides." Nature Medicine 1997: 3(9):1016-1020.

Katial RK, Sachanandani D, Pinney C, Lieberman MM. "Cytokine production in cell culture by peripheral blood mononuclear cells from immunocompetent hosts." Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 1998; 5(1):78-81.

- 45 Lacor PN. "Advances on the understanding of the origins of synaptic pathology in Alzheimer's disease." Current Genomics 2007; 8(8):486-508.

Moore V, Chapter 2. In: Synthetic Peptides: A Users Guide. Grant GA, ed. New York: WH Freeman and Company: 1992; 63-67.

Morgan D. "Immunotherapy for Alzheimer's Disease." Journal of Internal Medicine 2011; 269

(1):54-63.

Orgogozo JM, Gilman S, Dartigues JF, et al. "Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization." *Neurology* 2003; 61(1):46-54.

Rockenstein EM, McConlogue L, Tan H, et al. "Levels and alternative splicing of amyloid beta protein precursor (APP) transcripts in brains of APP transgenic mice and humans with Alzheimer's disease." *Journal of Biological Chemistry*. 1995; 270(47):28257-28267.

Rockenstein E, Mallory M, Mante M, et al. "Early formation of mature amyloid-beta protein deposits in a mutant APP transgenic model depends on levels of A-beta(1-42)." *Journal of Neuroscience Research* 2001; 66(4):573-582.

10 Sokoll KK. "Stabilized synthetic immunogen delivery system," In U.S. Patent Application Publication No US 2004/0009897 A1. United States: United Biomedical Inc.; 2004.

Solomon B, Koppel R, Frankel D, Hanan-Aharon E. "Disaggregation of Alzheimer beta-amyloid by site directed mAb." *Proceedings National Academy of Sciences USA*. 1997; 94(8):4109-4112.

15 Tabira, T. "Immunization therapy for Alzheimer disease: a comprehensive review of active immunization strategies." *Tohoku Journal of Experimental Medicine* 2010; 220(2):95-106.

Traggiai E, Becker S, Subbarao K, et al. "An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells." *Nature Medicine* 2004; 10(8): 871-875.

Wang CY. "Artificial T helper epitopes as immune stimulators for synthetic peptide immunogens." U.S. Patent No. 6,713,301 B1. United States: United Biomedical Inc.; 2004.

20 Wang CY. "Immunogenic peptide composition comprising measles virus F protein T helper cell epitope (MVHTh1-16) and N-terminus of beta-amyloid peptide." U.S. Patent No. 6,906,169, United States: United Biomedical Inc.; 2005.

25 Wang CY. "Immunogenic peptide composition comprising a promiscuous helper T cell epitope and an N-terminal fragment of Abeta(1-42) peptide." U.S. Patent No. 7,951,909, United States: United Biomedical Inc.; 2011.

Wang CY. "Immunogenic peptide composition for the prevention and treatment of Alzheimer's disease." U.S. Patent No. 8,232,373, United States: United Biomedical Inc.; 2012.

Wang CY, Finstad CL, Walfield AM, et al. "Site-specific UBITh amyloid-beta vaccine for immunotherapy of Alzheimer's disease." *Vaccine* 2007; 25(16):3041-3052.

30 Wang CY, Looney DJ, Li ML, et al. "Long-term high-titer neutralizing activity induced by octameric synthetic HIV-1 antigen." *Science* 1991; 254(5029):285-288.

Wang CY, Walfield AM. "Site-specific peptide vaccines for immunotherapy and immunization against chronic diseases, cancer, infectious diseases, and for veterinary applications." *Vaccine* 2005; 23(17-19):2049-2056.

35 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На фиг.1 представлена блок-схема, на которой указан процесс разработки, открытия до коммерциализации (индустриализации), вакцинного состава в соответствии с конкретным вариантом осуществления, описанным в настоящем описании. Настоящее изобретение включает разработку пептидного иммуногена, разработку пептидной

40 композиции, разработку вакцинного состава, разработку функционального исследования антигенностии *in vitro*, разработку исследования иммуногенностии и эффективности *in vivo*, разработку режима дозирования и разработку клинического протокола, обобщенные на этой схеме. Детальная оценка каждой из этих стадий с приятными и неприятными неожиданностями, которые привели к конечному успеху

45 коммерциализации высокобезопасного и эффективного вакцинного состава на основе рациональной разработки, далее описана в настоящем описании.

На фиг.2А проиллюстрирован профиль ВЭЖХ высокоочищенной иммуногенной конструкции Аβ-пептида (SEQ ID NO: 65) с временем оценки 20 минут.

На фиг.2В иллюстрируется профиль ВЭЖХ для высокоочищенной иммуногенной конструкции Аβ-пептида (SEQ ID NO: 64) с временем элюирования 21 минута.

На фиг.2С представляет собой профиль масс-спектрометрии (MALDI-TOF) с измеренной молекулярной массой 3892,274 для иммуногенной конструкции Аβ-пептида (SEQ ID NO: 65), которая имеет теоретическую молекулярную массу 3892,52, что демонстрирует высокую точность молекулярной природы соединений, используемых в качестве активного фармацевтического ингредиента в составе вакцины UBI AD (UB-311).

На фиг.2D представлен профиль масс-спектрометрии (MALDI-TOF) с измеренной

молекулярной массой 4374,568 для иммуногенной конструкции Аβ-пептида (SEQ ID NO: 64), которая имеет теоретическую молекулярную массу 4374,07, что демонстрирует высокую точность молекулярной природы соединений, используемых в качестве активного фармацевтического ингредиента в составе вакцины UBI AD (UB-311).

На фиг.2Е иллюстрируются профили ВЭЖХ высокоочищенных иммуногенных

конструкций Аβ-пептида (SEQ ID NO: 65 и 64) с временем элюирования 20 и 21 минута, соответственно. Две иммуногенные конструкции Аβ-пептида (SEQ ID NO: 64 и 65) были экстрагированы из препарата вакцинного состава UB-311 после хранения при 2-8°C в течение 3 лет, демонстрируя ожидаемый профиль ВЭЖХ с временем элюирования при таком же молярном соотношении, как и предшествующее соотношение при смешении, что иллюстрирует высокоточную природу такого вакцинного состава, полученного с использованием рациональной разработки.

На фиг.3А иллюстрируются связывающие мотивы HLA класса II пептида Th SEQ ID NO: 46 на основе тщательного поиска в литературе. Было принято решение использовать комбинацию двух иммуногенных конструкций Аβ-пептида (SEQ ID NO: 64 и 65) для расширения иммунных ответов путем максимального охвата генетического фона пациентов, которым вводят вакцину.

На фиг.3В иллюстрируются связывающие мотивы HLA класса II пептида Th SEQ ID NO: 47 на основе тщательного поиска в литературе. Было принято решение использовать комбинацию двух иммуногенных конструкций Аβ-пептида (SEQ ID NO: 64 и 65) для расширения иммунных ответов путем максимального охвата генетического фона пациентов, которым вводят вакцину.

На фиг.4 иллюстрируется кинетика антителного ответа в течение периода 26-недель у морских свинок на вакцинные составы, включающие различные количества (от 0, 10, 30, 100 до 300 мкг на дозу 0,5 мл) иммуногенных конструкций Аβ-пептида (SEQ ID NO: 64 и 65) в комбинации с фиксированным количеством минеральных солей.

На фиг.5А представлена схема получения стабильных иммуностимулирующих комплексов пептид/CpG посредством ассоциации/нейтрализации электрических зарядов между иммуногенными конструкциями Аβ-пептида и CpG-олигодезоксинуклеотидом (ODN).

На фиг.5В представлена схема, являющаяся продолжением фиг.5А, для получения вакцинной суспензии на основе минеральных солей, содержащей такие иммуностимулирующие комплексы и минеральную соль на основе алюминия.

На фиг.6 иллюстрируется кинетика антителного ответа на вакцинные составы в количестве иммуногенных конструкций Аβ-пептида 300 мкг/0,5 мл/доза в присутствии различных адъювантов (Alhydrogel/NaCl+CpG ODN; Adjuphos/NaCl+CpG ODN; и NaCl +CpG ODN) у павианов в течение 10 недель.

Фиг.7: Исследование иммуногенности у морских свинок вакцины UBI AD, содержащей иммуногенные конструкции Аβ-пептида (SEQ ID NO: 64 и 65 в эквимолярном

соотношении) после хранения в течение 2 лет при 2-8°C. Вакцина UBI AD оставалась высокоиммуногенной и стабильной после стандартного протокола первичной и усиливающей (3 wpi) иммунизации.

Фиг.8А: Сосуды головного мозга человека с AD не окрашиваются

5 иммуногистохимически фракциями IgG из доиммунной сыворотки павиана.

Фиг.8В: Сосуды головного мозга человека с AD демонстрируют иммуногистохимическое окрашивание очищенным IgG из гипериммунных сывороток от павианов, иммунизированных эквимолярным соотношением иммуногенных конструкций Аβ-пептида SEQ ID NO: 62 и 63.

10 Фиг.8С: Сосуды головного мозга человека AD не окрашиваются иммуногистохимически очищенным IgG из гипериммунных сывороток, описанных для фиг.8В, которые предварительно инкубировали с А β ₁₋₁₄-пептидом. На этой фигуре показано, что предварительная инкубация с А β ₁₋₁₄-пептидом устранила всю 15 иммунореактивность в отношении сосудов головного мозга очищенного IgG из гипериммунной сыворотки, что демонстрирует высокую специфичность гипериммунных сывороток при вакцинации вакцинным составом, содержащим иммуногенные конструкции Аβ-пептида (SEQ ID NO: 62 и 63).

20 Фиг.8Д: Сосуды головного мозга человека с AD демонстрируют иммуногистохимическое окрашивание очищенным IgG из гипериммунных сывороток, описанных для фиг.8В, которые предварительно инкубировали с посторонним пептидом.

Фиг.8Е: Амилоидные бляшки из головного мозга человека с AD не окрашиваются иммуногистохимически фракциями IgG из доиммунных сывороток павиана.

25 Фиг.8F: Амилоидные бляшки из головного мозга человека с AD демонстрируют иммуногистохимическое окрашивание очищенным IgG из гипериммунных сывороток от павианов, иммунизированных эквимолярным соотношением иммуногенных конструкций Аβ-пептида SEQ ID NO: 62 и 63.

30 Фиг.8Г: Амилоидные бляшки из головного мозга человека с AD не окрашиваются иммуногистохимически очищенным IgG из гипериммунных сывороток, описанных для фиг.8В, которые предварительно ингибировали с А β ₁₋₁₄-пептидом. На этой фигуре показано, что предварительная инкубация с А β ₁₋₁₄-пептидом устранила всю 35 иммунореактивность в отношении сосудов головного мозга очищенного IgG из гипериммунной сыворотки, что демонстрирует высокую специфичность гипериммунных сывороток при вакцинации вакцинным составом, содержащим иммуногенные конструкции Аβ-пептида (SEQ ID NO: 62 и 63).

Фиг.8Н: Амилоидные бляшки из головного мозга человека с AD демонстрируют иммуногистохимическое окрашивание очищенным IgG из гипериммунных сывороток, описанных для фиг.8В, которые предварительно инкубировали с посторонним пептидом.

40 Фиг.9: Исследование иммуногенности вакцины UBI AD у взрослых павианов P. anubis. (Часть А) Отдельных павианов иммунизировали на 0, 3, 6 неделях (стрелки) посредством 300 мкг на дозу вакцины UBI AD, составленной в минеральных солях (♦, ▲, ●, ■) и анализировали в отношении титров антител против Аβс использованием ELISA. Следует отметить, что у трех из четырех павианов индуцировались титры антител против Аβ после первой иммунизации. (Часть В) Индивидуальных павианов иммунизировали 45 после периода покоя из 72 недель на 78, 81 и 104 неделях (стрелки) посредством 300 мкг (низкая доза, ●, ■) или 1200 мкг (высокая доза, ♦, ▲) вакцины UBI AD, составленной в минеральных солях, и анализировали в отношении титров антител против Аβ. Следует отметить, что у всех четырех павианов развивались выраженные ответы антител против

А β после однократной усиливающей иммунизации вакциной. В конце периода исследования в течение 2 лет все павианы оставались здоровыми и активными.

Фиг.10А: Эффект вакцины UBI AD в профилактическом режиме на морфологию коры головного мозга молодых трансгенных мышей, сверхэкспрессирующих hAPP751.

Образцы, полученные от трансгенных мышей, которым вводили только адьювант, отвечающих мышей, которым вводили вакцину UBI AD, и мышей без введения анализировали в отношении нагрузки бляшками амилоида-бета, и было обнаружено сниженное количество бляшек и "более низкий средний размер бляшек на мкм²" у отвечающих мышей, которым вводили UBI AD, по сравнению с мышами, которым не проводили введение, и мышами, которым вводили только адьювант.

Фиг.10В: Эффект вакцины UBI AD в режиме профилактики на морфологию гиппокампа головного мозга молодых трансгенных мышей, сверхэкспрессирующих hAPP751. Образцы головного мозга, полученные из трансгенных мышей, которым вводили адьювант отдельно, отвечающих мышей, которым вводили вакцину UBI AD, и мышей, которым не проводили введение, анализировали в отношении нагрузки бляшками амилоида-бета и обнаружили сниженное число бляшек и "более низкий средний размер бляшек на мкм²" у отвечающих мышей, которым вводили UBI AD, по сравнению с мышами без введения и мышами, которым вводили адьювант отдельно.

Фиг.11А: Эффект вакцины UBI AD в профилактическом режиме на концентрацию пептида амилоида β ($A\beta_{1-42}$) в экстрактах тканей головного мозга из молодых трансгенных мышей, сверхэкспрессирующих hAPP751. Небольшие протофибриллы получали из фракции биохимических экстрактов тканей головного мозга с Triton X-100. Было обнаружено, что трансгенные отвечающие мыши, которым вводили вакцину UBI AD, имеют значительно меньше протофибрилл по сравнению с фракциями Triton X-100 экстрактов тканей головного мозга из трансгенных мышей без введения.

Фиг.11В: Эффект вакцины UBI AD в профилактическом режиме на концентрацию пептида амилоида β ($A\beta_{1-42}$) в экстрактах ткани головного мозга от молодых трансгенных мышей, сверхэкспрессирующих hAPP751. Большие олигомеры и фибриллы были получены из фракции детергента SDS биохимических экстрактов тканей головного мозга. Было обнаружено, что трансгенные отвечающие мыши, которым вводили вакцину UBI AD, имеют значительно меньшие олигомеры и фибриллы по сравнению с фракциями SDS экстрактов тканей головного мозга из трансгенных мышей без введения.

Фиг.12: Средние титры антитела против $A\beta_{1-14}$ после введения вакцины UBI AD у пациентов. На график нанесены два набора данных, причем один набор данных получен между 0 и 24/26 неделями (n=17, сплошная линия) в ходе периода испытания, а другой набор данных получен в период наблюдения (n 13, пунктирная линия) между 0 и 48 неделями. Log₁₀ титров антитела против $A\beta_{1-14}$ снижался с течением времени, но оставался положительным у всех пациентов в конце исследования (неделя 48).

Фиг.13: Средние показатели ADAS-Cog (закрашенный круг), MMSE (незакрашенный круг) и титры антитела против $A\beta_{1-14}$ (закрашенные столбики) между 0 и 48 неделями у пациентов в возрасте ≥ 60 лет и с исходным показателем MMSE ≥ 20 , которые проходили испытание вакцины UBI AD.

Фиг.14: Изменение средних показателей ADAS-Cog на протяжении периода 12 месяцев между вакцинированными UBI AD пациентами с мягкой AD и старше 60 лет (закрашенный круг) и пациентами из группы плацебо с мягкой AD из испытания

таренфлурбила (закрашенный треугольник). Шесть пациентов в возрасте ≥ 60 с мягкой AD продемонстрировали улучшение со снижением показателей при оценке через 4, 6, 12 месяцев (изменение -3,00) после иммунизации вакциной против UBI AD на 0, 4, 12 неделях по сравнению с пациентами с мягкой AD, которым вводили плацебо в испытании 5 таренфлурбила (Green et al., JAMA 2009; 302(23):257-2564), и они продемонстрировали низкий ответ с увеличенными показателями (изменение 3,81) в течение того же периода времени.

Фиг.15А: Исследование иммуногенности у пациентов, которым вводили вакцину UBI AD, в клинических испытаниях фазы I. Образцы сыворотки от всех 19 пациентов 10 с болезнью Альцгеймера от мягкой до умеренной оценивали до обработки (V1/V2; светло-серые столбики) и после иммунизации на 16 неделе (V7; черные столбики) в отношении антител против А β . Титры антител (\log_{10}) к мономеру А β_{1-28} оценивали с помощью теста ELISA с использованием образцов сыворотки, взятых при посещении до введения и на 16 неделе, через 4 недели после последней из трех вакцинаций вакциной 15 UBI AD, доставляемой на 0, 4 и 12 неделях. В образцах до введения обнаружена небольшая реактивность антител или не обнаружена реактивность антител (таким образом, отсутствуют столбики в большинстве парных сравнений данных). У всех пациентов индуцировался высокий титр антител против А β после введения мономера А β_{1-28} , который локализован на N-конце А β -пептида, как проиллюстрировано на фиг.16.

Фиг.15Б: Исследование иммуногенности у пациентов, которым вводили вакцину UBI AD, в клинических испытаниях фазы I. Образцы сыворотки от всех 19 пациентов 20 с болезнью Альцгеймера от мягкой до умеренной оценивали до обработки (V1/V2; светло-серые столбики) и после иммунизации на 16 неделе (V7; черные столбики) в отношении антител против А β . Титры антител (\log_{10}) к мономеру А β_{1-28} оценивали с помощью теста ELISA с использованием образцов сыворотки, взятых при посещении до введения и на 16 неделе, через 4 недели после последней из трех вакцинаций вакциной 25 UBI AD, доставляемой на 0, 4 и 12 неделях. В образцах до введения обнаружена небольшая реактивность антител или не обнаружена реактивность антител (таким образом, отсутствуют столбики в большинстве парных сравнений данных). У всех пациентов индуцировался высокий титр антител против А β после введения мономера 30 А β_{1-28} , который локализован на N-конце А β -пептида, как проиллюстрировано на фиг.16.

Фиг.15С: Исследование иммуногенности у пациентов, которым вводили вакцину UBI AD, в клинических испытаниях фазы I. Образцы сыворотки от всех 19 пациентов 35 с болезнью Альцгеймера от мягкой до умеренной оценивали до обработки (V1/V2; светло-серые столбики) и после иммунизации на 16 неделе (V7; черные столбики) в отношении антител против А β . Титры антител (\log_{10}) к мономеру А β_{1-28} оценивали с помощью теста ELISA с использованием образцов сыворотки, взятых при посещении до введения и на 16 неделе, через 4 недели после последней из трех вакцинаций вакциной 40 UBI AD, доставляемой на 0, 4 и 12 неделях. В образцах до введения обнаружена небольшая реактивность антител или не обнаружена реактивность антител (таким образом, отсутствуют столбики в большинстве парных сравнений данных). У всех пациентов индуцировался высокий титр антител против А β после введения мономера 45 А β_{1-28} , который локализован на N-конце А β -пептида, как проиллюстрировано на фиг.16.

Фигура 16: Картирование эпитопов для точного анализа специфичности на N-конце А β_{1-42} с использованием сывороток от иммунизированных пациентов с болезнью Альцгеймера. Преобладающий эпитоп, распознаваемый антителами в образцах сыворотки, полученных на 16 неделе от пациентов, иммунизированных вакциной UBI

AD, является специфическим для пептида A β ₁₋₁₀. На этом графике представлен типичный положительный ответ при картировании эпитопа у одного пациента (P210), которому вводили три дозы вакцины UBI AD и у которого индуцировались антитела против A β с log₁₀ титра антител 2,198 в отношении пептида A β ₁₋₁₄. Для картирования эпитопов сыворотку разбавляли 1:50. Высота пика указывает на половинную максимальную ингибиторную концентрацию (IC₅₀) образца пациента в отношении различных 10-мерных пептидов A β (SEQ ID NO: 6, 8-30). Наблюдают один основной пик, что соответствует иммунореактивности, высокоспецифичной к N-концевой последовательности A β SEQ ID NO: 6 (A β ₁₋₁₀: DAEFRHDSGY).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к отдельным иммуногенным конструкциям A β -пептида, пептидным композициям, содержащим эти иммуногенные конструкции A β -пептида и их смеси, к фармацевтическим композициям, содержащим эти пептидные композиции в вакцинном составе, причем индивидуальные иммуногенные конструкции A β -пептида содержат N-конец A β -пептида (от A β ₁₋₁₀ до A β ₁₋₁₄) в качестве В-клеточных (B) эпитопов, связанный через спейсерный остаток(ки) с гетерологичными эпитопами Т-хелперных клеток (Th) из белков патогенов, которые действуют совместно, стимулируя образование специфических антител, направленных против N-конца A β ₁₋₄₂ пептида, обеспечивая защитные иммунные ответы у пациентов, имеющих риск болезни Альцгеймера или имеющих болезнь Альцгеймера.

Также настоящее изобретение относится к способам лечения и предупреждения болезни Альцгеймера. В описанных способах используются фармацевтические композиции, включающие суспензионный вакциновый состав, содержащий иммуногенные конструкции A β -пептида, необязательно образующие стабильный иммуностимулирующий комплекс с в высокой степени отрицательно заряженным олигонуклеотидом, таким как СрG-олигомеры, посредством электростатической ассоциации, причем эти комплексы, кроме того, необязательно дополнены минеральными солями в качестве адьюванта, для введения пациентам, имеющим риск болезни Альцгеймера или имеющим болезнь Альцгеймера. Также настоящее изобретение включает способы использования вакциновых составов, в частности, в режимах дозирования, способах дозирования и дозированных формах для введения вакциновых составов, содержащих иммуногенные конструкции A β -пептида, для профилактики и лечения пациентов, имеющих риск болезни Альцгеймера или имеющих болезнь Альцгеймера.

Настоящее изобретение также относится к способу экономичного производства и контроля качества иммуногенных конструкций A β -пептида и вакцинового состава, способных защищать животных и пациентов, имеющих болезнь Альцгеймера или имеющих риск болезни Альцгеймера. Настоящее изобретение относится к стабилизированному иммуностимулирующему комплексу и к способу получения стабилизированного иммуностимулирующего комплекса. Более конкретно, настоящее изобретение относится к стабилизированным синтетическим иммуностимулирующим комплексам, содержащим иммуногенные конструкции A β -пептида и в высокой степени отрицательно заряженный олигонуклеотид, такой как СрG-олигомеры, которые пригодны в вакциновых системах доставки с улучшенными иммунными ответами *in vivo*. Эти иммуностимулирующие комплексы также являются пригодными для получения вакциновых составов, сконструированных для функционирования в качестве депо для контролируемого высвобождения.

В следующем аспекте настоящее изобретение относится моноклональным антителам человека против А β ₁₋₄₂, индуцируемым В-клетками, выделенными из крови пациента, которому ранее вводили вакцинные составы иммуногенных конструкций А β -пептида по настоящему изобретению.

⁵ (а) Пептид амилоида-бета (А β)

В статье Wikipedia под названием "Beta amyloid" представлен современный обзор по этой теме (http://en.wikipedia.org/wiki/Beta_amyloid). Интернет-ссылка на эту статью представлена в настоящем описании в качестве ссылки.

¹⁰ Амилоид-бета (А β или А-бета) представляет собой пептид из 36–43 аминокислот, который процессируется из белка-предшественника амилоида. А β является основным компонентом отложений, встречающихся в головном мозге пациентов с болезнью Альцгеймера. Были обнаружены доказательства того, что А β является в высокой степени многофункциональным пептидом со значительной непатологической активностью.

¹⁵ А β образуется после последовательного расщепления белка-предшественника амилоида (APP) - трансмембранный гликопротеина с неопределенной функцией. APP может процессироваться α -, β - и γ -секретазами; белок А β образуется посредством последовательного действия β - и γ -секретаз. γ -секретаза, которая продуцирует С-конец А β -пептида, осуществляет расщепление в трансмембранный области APP и может ²⁰ образовывать ряд изоформ длиной 36–43 аминокислотных остатков. Наиболее распространенными изоформами являются А β ₁₋₄₀ (SEQ ID NO: 2) и А β ₁₋₄₂ (SEQ ID NO: 1); более длинная форма, как правило, продуцируется посредством расщепления, которое происходит в эндоплазматической сети, в то время как более короткая форма ²⁵ продуцируется расщеплением в транс-сети Гольджи (Hartmann T, et al., 1997; Nature Medicine 3:1016-1020). Форма А β ₁₋₄₀ является более распространенной из этих двух форм, однако А β ₁₋₄₂ (SEQ ID NO: 1) является более фибриллогенной и, таким образом, ассоциированной с болезненными состояниями.

³⁰ Аутосомно-доминантные мутации в APP вызывают наследственную болезнь Альцгеймера с ранним возникновением (семейная AD или FAD). Эта форма AD составляет не более 10% всех случаев, и основное большинство случаев AD не сопровождается такими мутациями. Однако семейная болезнь Альцгеймера, вероятно, является результатом измененного протеолитического процессинга. Увеличение либо общих уровней А β , либо относительной концентрации А β ₁₋₄₀ и А β ₁₋₄₂ (где первый из ³⁵ них является более концентрированным в цереброваскулярных бляшках, а второй в нейротических бляшках) вовлечено в патогенез как семейной, так и спорадической болезни Альцгеймера.

⁴⁰ Вследствие более гидрофобной природы А β ₁₋₄₂ является наиболее амилоидогенной формой пептида. Однако известно, что центральная последовательность KLVFFAE (А β ₁₆₋₂₂) (SEQ ID NO: 31) самостоятельно образует амилоид и, вероятно, образует сердцевину фибриллы.

⁴⁵ "Амилоидная гипотеза", состоящая в том, что бляшки ответственны за патологию болезни Альцгеймера, признается большинством исследователей. Альтернативная гипотеза состоит в том, что олигомеры амилоида, а не бляшки, ответственны за заболевание. У мышей, которые получены способами генной инженерии для экспрессии олигомеров, но не бляшек (APP^{E693Q}), развивается заболевание. Более того, мыши, которые, помимо этого, получены способами инженерии для преобразования

олигомеров в бляшки ($\text{APP}^{\text{E693Q}} \times \text{PS1}\Delta\text{E9}$), имеют не большее ухудшение, чем мыши, у которых присутствует только олигомер. Для определения состояния агрегации (олигомеры) $\text{A}\beta$ -пептида *in vitro* можно использовать атомно-силовую микроскопию, которая может визуализировать молекулярные поверхности в наномасштабе.

⁵ Существует множество различных способов измерения амилоида-бета. Его можно измерять полуколичественно посредством иммуногистохимического окрашивания, которое также позволяет определение положения. $\text{A}\beta$ может быть в основном сосудистым, как при церебральной амилоидной ангиопатии, или может находиться в сенильных бляшках и сосудистых областях.

¹⁰ Одним высокочувствительным способом измерения $\text{A}\beta$ является количественный твердофазный иммуноферментный анализ (qELISA), в котором используется пара антител, которая распознает $\text{A}\beta$.

¹⁵ Соединения для визуализации, особенно соединение Pittsburgh compound B (6-OH-BTA-1, тиофлавин) и флорбетапир F18 (18F-AV-45), могут селективно связываться с амилоидом-бета *in vitro* и *in vivo*. Этот способ в комбинации с визуализацией с использованием позитронно-эмиссионной томографии (PET), используют для визуализации областей отложений бляшек у пациентов с болезнью Альцгеймера.

(b) В-клеточные эпитопы: N-конец $\text{A}\beta$ -пептида

²⁰ Настоящее изобретение относится к новой пептидной композиции для получения высокого титра олигоклональных антител со специфичностью в отношении N-конца $\text{A}\beta$ -пептида с перекрестной реактивностью в отношении растворимого $\text{A}\beta_{1-42}$ и бляшek в головном мозге пациентов с AD. Специфичность к участку пептидной композиции посредством попыток рациональной разработки минимизирует получение антител, которые направлены на посторонние участки на белках-носителях.

²⁵ В таблице 1 представлен ряд коротких линейных пептидов, включающих пептидный фрагмент(ы) N-конца $\text{A}\beta_{1-42}$. Пептиды $\text{A}\beta_{1-42}$ (SEQ ID NO: 1) и $\text{A}\beta_{1-28}$ (SEQ ID NO: 3) являются достаточно длинными для индукции иммунного ответа без необходимости в белке-носителе. Однако более короткие N-концевые пептиды $\text{A}\beta$, такие как $\text{A}\beta_{1-14}$, $\text{A}\beta_{1-}$

³⁰ 12, $\text{A}\beta_{1-10}$ (SEQ ID NO: 4-6), сами по себе являются неиммуногенными, как показано в таблице 4 примера 7 (при сравнении группы 3 с группами 1 и 2 в исследовании иммуногенности). Этот результат подтверждает присутствие аутологичного T-хелперного эпитопа (Th) между аминокислотами 15-28, который сообщает иммуногенность $\text{A}\beta_{1-28}$ пептиду. Короткие $\text{A}\beta$ -фрагменты могут быть подвергнуты

³⁵ иммунному усилиению посредством химического связывания с белком-носителем, например, гемоцианином лимфы улитки (KLH), как показано в группе 4 таблицы 6 примера 7. Основным недостатком таких вакцин "А β пептид(ы)-носитель" является то, что большинство (>90%) антител, индуцированных комбинациями, представляют собой нефункциональные антитела, направленные против белка-носителя KLH, как показано в таблице 6, группа 4, примера 7, и обладают потенциалом к эпитопной супрессии.

⁴⁰ Пептидные иммуногены по настоящему изобретению включают 10-14 аминокислот (10-14-мер) N-концевого фрагмента $\text{A}\beta$ -пептида, начинаясь аминокислотой Asp (D) в положении 1. Полностью синтетические пептидные иммуногены, содержащие эти фрагменты $\text{A}\beta$ -пептида, также содержат эпитопы T-хелперных клеток (Th) (например SEQ ID NO: 33-47), имеющие множество связывающих мотивов МНС класса II, которые индуцируют иммунный ответ, который сфокусирован исключительно на N-концевых участках-мишениях на $\text{A}\beta_{1-42}$ пептиде с высокой перекрестной реактивностью в

отношении А β ₁₋₄₂ пептида и сенильных бляшек в головном мозге пациентов с АД.

(с) Гетерологичные Т-хелперные клеточные эпитопы (Th-эпитопы)

Т-клеточные эпитопы презентируются на поверхности антигенпредставляющей клетки, где они связаны с молекулами МНС. Т-клеточные эпитопы, презентируемые молекулами МНС класса I, как правило, представляют собой пептиды длиной от 8 до 11 аминокислот, в то время как молекулы МНС класса II презентируют более длинные пептиды длиной 13-17 аминокислот, и неклассические молекулы МНС также презентируют непептидные эпитопы, такие как гликолипиды.

Т-хелперные клетки (Th-клетки) представляют собой подгруппу лимфоцитов, которые являются типом лейкоцитов, которые играют важную роль в иммунной системе, в частности, в адаптивной иммунной системе. Они способствуют активности других иммунных клеток посредством высвобождения Т-клеточных цитокинов. Они необходимы для переключения классов В-клеточных антител, для активации и роста цитотоксических Т-клеток и для максимизации бактерицидной активности фагоцитов, таких как макрофаги.

Т-хелперные эпитопы (Th-эпитопы) представляют собой Т-клеточные эпитопы, которые презентируются на поверхности антигенпредставляющей клетки, где они связываются с молекулами МНС класса II и имеют длину от 13 до 17 аминокислот, которые специфически распознаются Т-хелперными клетками, как описано выше.

Пептиды, связывающиеся с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса II, необходимы для инициации и регуляции иммунных ответов.

Прогнозирование пептидов, которые связываются с конкретной молекулой МНС, играет важную роль для определения потенциальных кандидатов для вакцин.

Связывающая бороздка в МНС класса II является открытой с двух сторон, что позволяет связываться пептидам длиннее 9-мера. Установление консенсусного мотива, способствующего связыванию пептидов с молекулой МНС класса II, является трудным вследствие различной длины связывающихся пептидов и варьирующего положения 9-мерной связывающей сердцевины. Уровень трудности возрастает, когда молекула является неспецифической и связывается с большим количеством низкоаффинных пептидов.

На протяжении последних двух десятилетий автор настоящего изобретения и ее бригада идентифицировали множество потенциальных Th-эпитопов с неспецифическими связывающими мотивами для молекул МНС класса II различных видов (например, человек, свинья, крупный рогатый скот и т.д.) из белков множества патогенов для применения в качестве гетерогенных Th-эпитопов для разработки конструкций пептидных иммуногенов (Wang CY, 2004; патент США № 6713301 B1 и Wang CY, 2005; патент США № 6906169), где специфические В-клеточные эпитопы-мишени (например, фрагменты А β -пептида) связаны либо с N-концом, либо с С-концом таких Th-эпитопов для усиления иммуногенности, что приводит к высоким титрам специфических антител, направленных против В-клеточных эпитопов, посредством рациональной разработки (5, 6). Также следует подчеркнуть, что рационально разработанные иммуногены, используемые в вакцине, подлежат подтверждению таких Th-эпитопов посредством экспериментальной иммунизации в качестве части процесса скрининга (например, пример 7, таблицы 4, 5, 6 и 7) для селекции оптимальных Th-эпитопов для применения в вакцинах составах. Идеальный Th-эпитоп должен содержать множество неспецифических мотивов связывания МНС класса II для обеспечения максимальной активации Т-хелперных клеток, что приводит к инициации и регуляции иммунных ответов, и обычно они сами по себе являются молчальными с иммунной точки зрения,

т.е. ни одно из антител, индуцируемых иммуногенными конструкциями, не направлено против Th-эпитопов (например, группы 1, 2 и 3 таблицы 6 примера 7; и группа 1 таблицы 7 примеров 8 и 9), таким образом, обеспечивая высокосфокусированный иммунный ответ, направленный в основном на В-клеточные эпитопы-мишени.

- 5 Th относится к последовательности аминокислот (природные или неприродные аминокислоты), которая содержит Th-эпитоп. Th-домен рассматриваемых пептидов имеет от приблизительно 9 до приблизительно 25 аминокислот, предпочтительно от приблизительно 13 до приблизительно 17 аминокислот. Th-сегмент и его функциональные иммунологические аналоги содержат непрерывный участок Th-эпитопа,
- 10 который является достаточным для усиления или стимуляции иммунного ответа на N-концевой фрагмент А β ₁₋₄₂ пептида из от приблизительно 10 до приблизительно 14 аминокислотных остатков (SEQ ID NO: 4-6).

Th-эпитопы по настоящему изобретению включают, но не ограничиваются ими, эпитопы, происходящие из чужеродных патогенов, как проиллюстрировано в таблице 15 2 (SEQ ID NO: 33-41). Кроме того, Th-эпитопы включают идеализированные искусственные Th и идеализированные искусственные комбинаторные Th (SEQ ID NO: 42-47). Пептиды, содержащие комбинаторные Th, получают одновременно в едином твердофазном пептидном синтезе в tandemе с N-концевыми последовательностями А β -пептида(ов). Участки Th также включают иммунологические аналоги.

- 20 Иммунологические аналоги Th включают усиливающие иммунитет аналоги, перекрестно реагирующие аналоги и сегменты любого из этих Th-эпитопов. Функциональные иммунологические аналоги Th, кроме того, включают консервативные замены, вставки, делеции и инсерции от одного до приблизительно пяти аминокислотных остатков в Th-эпитопе, которые по существу не модифицируют Th-стимулирующую функцию Th-
- 25 эпитопа, как наилучшим образом иллюстрируется в нескольких версиях Th-эпитопа, происходящего из 1-5 Th (SEQ ID NO: 34, 41, 42, 44 и 46) белка слияния вируса кори MVF и из 1-3 Th (SEQ ID NO: 43, 45, 47) поверхностного антигена HBsAg вируса гепатита B.

Иммуногенные конструкции А β -пептида по настоящему изобретению имеют Th-эпитоп из от приблизительно 13 до приблизительно 20 аминокислотных остатков, ковалентно связанных через "спейсер A" с С-концом N-концевого фрагмента А β ₁₋₄₂-пептида, а также его перекрестно-реактивных или функциональных аналогов.

Перекрестно-реактивные и функциональные аналоги иммуногенных конструкций А β -пептида (например, SEQ ID NO: 48-65) в соответствии с изобретением, кроме того, могут содержать консервативные замены, вставки, делеции или инсерции от одного до приблизительно пяти аминокислотных остатков при условии, что пептидные аналоги способны индуцировать иммунные ответы, перекрестно реактивные в отношении пептидов А β ₁₋₄₂. Консервативные замены, вставки и инсерции можно проводить с 40 использованием природных или неприродных аминокислот, как определено в настоящем описании.

Предпочтительными пептидными иммуногенами по настоящему изобретению являются пептиды, содержащие N-концевой фрагмент А β ₁₋₄₂ пептида (SEQ ID NO: 4-6) или перекрестно реагирующие с ним иммунологические аналоги; спейсер (например ε-Lys, Gly или ε-Lys-Lys-Lys); и Th-эпитоп, который выбран из эпитопов, приведенных в таблице 2 (SEQ ID NO: 34, 37, 38, 40-47) (см. результаты исследования иммуногенности в таблице 4 примера 7).

Функциональные иммунологические аналоги (например, различные

последовательности Th MvF, SEQ ID NO: 34, 41, 42, 44 и 46; и Th HBsAg, SEQ ID NO: 43, 45, 47) пептидов Th-эпитопов, также являются эффективными и включены в качестве части настоящего изобретения. Функциональные иммунологические аналоги иммуногенных конструкций Аβ-пептида включают варианты SEQ ID NO: 49-51, 54-55, 57-65 и/или гомологи SEQ ID NO: 49-51, 54-55, 57-65, которые сохранят по существу ту же иммуногенность, что и у исходного пептида SEQ ID NO: 51 и 60. Например, варианты, которые являются функциональными аналогами, могут иметь консервативную замену в положении аминокислоты; изменение общего заряда; ковалентное связывание с другой частью или аминокислотные вставки, инсерции или делеции; и/или любую их комбинацию.

Консервативные замены представляют собой замены, когда один аминокислотный остаток заменяет другой аминокислотный остаток со сходными химическими свойствами. Например, неполярные (гидрофобные) аминокислоты включают аланин, лейцин, изолейцин, валин, пролин, фенилаланин, триптофан и метионин; полярные нейтральные аминокислоты включают глицин, серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин и глутамин; положительно заряженные (основные) аминокислоты включают аргинин, лизин и гистидин; и отрицательно заряженные (кислотные) аминокислоты включают аспарагиновую кислоту и глутаминовую кислоту.

В конкретном варианте осуществления функциональный аналог обладает по меньшей мере 50% идентичностью с исходной аминокислотной последовательностью. В другом варианте осуществления функциональный аналог обладает по меньшей мере 80% идентичностью с исходной аминокислотной последовательностью. В другом варианте осуществления функциональный аналог обладает по меньшей мере 85% идентичностью с исходной аминокислотной последовательностью. В другом варианте осуществления функциональный аналог обладает по меньшей мере 90% идентичностью с исходной аминокислотной последовательностью.

В одном варианте осуществления функциональный иммунологический аналог конкретного пептида содержит ту же аминокислотную последовательность, что и исходный пептид, и, кроме того, включает три остатка лизина (Lys-Lys-Lys), присоединенных к N-концу пептида. В этом варианте осуществления включение трех остатков лизина в исходную пептидную последовательность изменяет общий заряд исходного пептида, но не изменяет функцию исходного пептида, как проиллюстрировано для серии пептидов Th MVF (таблицы 2-7).

В таблице 2 идентифицирован другой вариант функционального аналога пептида Th-эпитопа. В частности, SEQ ID NO: 34 и 41 Th MVF1 и Th MVF2 представляют собой функциональные аналоги SEQ ID NO: 44 и 46 Th MVF4 и Th MVF5, поскольку они отличаются рамкой считывания аминокислот вследствие делеции (SEQ ID NO: 34 и 41) или включения (SEQ ID NO: 44 и 46) двух аминокислот на каждом из N- и C-концов. Различия между этими двумя сериями аналогичных последовательностей не влияют на функцию Th-эпитопов, содержащихся в этих последовательностях (например, группы 7, 8, 14 таблицы 4 в примере 7 против группы 1 таблицы 5 в примере 7 и группы 1 таблицы 7 в примере 8).

В других вариантах гетерологичные эпитопные пептиды Th могут презентироваться в качестве комбинаторной последовательности, которая содержит смесь аминокислотных остатков, представленных в конкретных положениях в пептидном каркасе, исходя из вариабельных остатков гомологов для этого конкретного пептида. Сборку комбинаторных пептидов можно синтезировать в одном процессе посредством добавления смеси намеченных защищенных аминокислот вместо одной конкретной

аминокислоты в конкретном положении в процессе синтеза. Такие комбинаторные сборки гетерологичных эпитопных пептидов Th могут обеспечить широкий охват Th-эпитопов у животных, имеющих разнообразный генетический фон. Репрезентативные комбинаторные последовательности гетерологичных пептидов Th-эпитопов включают SEQ ID NO: 42-45, которые представлены в таблице 2. Пептиды Th-эпитопов по настоящему изобретению обеспечивают широкую реактивность и иммуногенность у животных и пациентов из генетически разнообразных популяций.

Как правило, иммуногенная конструкция А β -пептида по настоящему изобретению соответствует следующей формуле:

(N-концевой фрагмент А β ₁₋₄₂-пептида)-(A)_o-(Th)-X

где (N-концевой фрагмент А β ₁₋₄₂-пептида) представляет собой В-клеточный эпитоп, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4-6, имеющий от приблизительно 10 до приблизительно 14 аминокислотных остатков;

каждый A независимо представляет собой аминокислоту или линкерную группу, выбранную из группы, состоящей из аминокислоты, Lys-, Gly-, Lys-Lys-Lys-, (α , ϵ -N)Lys или ϵ -N-Lys-Lys-Lys-Lys (SEQ ID NO: 32);

каждый Th содержит аминокислотную последовательность, которая представляет собой эпитоп Т-хелперных клеток, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34, 37, 38, 40-47 и их функциональных иммунологических аналогов;

X представляет собой α -COOH или α -CONH₂ аминокислоты; и

о равно от 0 до приблизительно 4.

Иммуногенная конструкция А β -пептида по настоящему изобретению содержит от приблизительно 20 до приблизительно 50 аминокислотных остатков, предпочтительно от приблизительно 25 до приблизительно 40 аминокислотных остатков.

Конформационное разделение, обеспечиваемое спайсером (A), обеспечивает более эффективные взаимодействия между презентируемой иммуногенной конструкцией А β -пептида и соответствующими Th-клетками и В-клетками и, таким образом, повышает иммуногенность иммуногенных конструкций А β -пептида или перекрестно-реагирующих с ним функциональных иммунологических аналогов.

(d) Композиции:

(i) Пептидные композиции:

Композиции по настоящему изобретению могут содержать одну или несколько иммуногенных конструкций А β -пептида. Пептидные композиции, которые содержат смесь иммуногенных конструкций А β -пептида с двумя или более Th-эпитопами, можно получать в фармацевтическом/вакцинном составе для обеспечения синергического повышения иммунной эффективности в более широкой генетической популяции вследствие более широкого охвата МНС класса II. Такие композиции могут обеспечить улучшенный иммунный ответ на фрагменты А β ₁₋₄₂-пептида.

Например, композиции могут содержать иммуногенные конструкции А β -пептида, как показано в таблице 3 (SEQ ID NO: 48-65), их гомологи, аналоги и/или комбинации. Более конкретно, пептидные композиции могут содержать иммуногенные конструкции А β -пептида, имеющие последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 62, 63, 64 и 65, их гомологов, аналогов и/или комбинаций (например SEQ ID NO: 62 и 63 в качестве эквимолярной смеси, как показано в примере 7, или SEQ ID NO: 64 и 65 в качестве другой эквимолярной смеси в примерах 8, 9 и 10).

(ii) Фармацевтические композиции:

Настоящее изобретение также относится к композициям, содержащим смесь

иммуногенных конструкций Аβ-пептида, которые представляют собой фармацевтические композиции для лечения и/или предупреждения деменции альцгеймеровского типа у пациентов, имеющих риск AD или имеющих AD.

Композиции можно получать в жидкой форме (например, растворы или суспензии).

- 5 Как правило, композиции получают в виде инъецируемых препаратов, в качестве либо жидких растворов, либо суспензий. Также жидкие носители могут быть приготовлены перед инъекцией. Дополнительные составы, пригодные для других способов введения, включают составы для перорального и интраназального применений. Эффективные дозы композиций по настоящему изобретению для лечения описанных выше состояний
- 10 варьируются в зависимости от множества различных факторов, включая способ введения, заданную область введения, физиологическое состояние пациента, то, является ли пациент человеком или животным, другие вводимые лекарственные средства и то, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Обычно, пациентом является человек, однако также можно лечить не являющихся человеком
- 15 млекопитающих, включая трансгенных млекопитающих.

Фармацевтические композиции составляют так, чтобы они содержали эффективное количество иммуногенной конструкции Аβ-пептида и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтические композиции также составляют в подходящей единичной дозированной форме, обычно содержащей от приблизительно 0,5 мкг до приблизительно

- 20 1 мг иммуногена на кг массы тела. При доставке посредством множества доз фармацевтические композиции можно удобным образом разделять на единичные дозированные формы с соответствующим количеством. Вводимая дозировка зависит от возраста, массы тела и общего состояния здоровья пациента, как хорошо известно в области вакцинации и терапии.

25 (iii) Фармацевтические вакцинныe составы:

В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую иммуногенные конструкции Аβ-пептида, используют для индукции иммунного ответа на N-конец Аβ-пептида у реципиента вакцины. Фармацевтические композиции, содержащие иммуногенные конструкции Аβ-пептида по настоящему

- 30 изобретению, можно использовать в качестве вакцины для профилактики и лечения деменции альцгеймеровского типа у реципиентов вакцины или пациентов, имеющих риск AD или имеющих AD.

Кроме того, композиции могут содержать носители и/или другие добавки в фармацевтически приемлемой системе доставки. Таким образом, композицию,

- 35 содержащую иммуногенные конструкции Аβ-пептида, можно составлять в качестве фармацевтического вакцинного состава с использованием адьювантов, фармацевтически приемлемых носителей или других ингредиентов, включая иммунологические адьюванты, обычно предоставляемые в вакцинных составах. Иммунологический адьювант определяют как "любое вещество, которое действует, ускоряя, продлевая
- 40 или усиливая антигенспецифический иммунный ответ без какого-либо самостоятельного специфического антигенного эффекта, используемое в комбинации со специфическими антигенами вакцины". Существует множество известных адьювантов, которые широко используются, включая масла, соли алюминия и виросомы. Наиболее распространенными адьювантами в вакцинах для человека являются две
- 45 распространенные соли, включающие фосфат алюминия (например, Adjuphos) и гидроксид алюминия (например, Alhydrogel). Способы выбора минеральных солей и определения предпочтительной концентрации минеральной соли для использования или комбинаций минеральных солей хорошо известны специалистам в данной области.

Другие ингредиенты, которые также можно использовать в качестве адьювантов в рамках настоящего изобретения, включают липозин, сапонин, сквален, L121, эмульсиген, монофосфориллипид А (MPL), QS21, ISA35, ISA206, ISA50V, ISA51 и ISA720, а также другие эффективные адьюванты и эмульгаторы. В конкретном варианте осуществления 5 носителем для доставки и адьювантом является Montanide™ ISA51 (композиция масляного вакцинного адьюванта, содержащая растительное масло и манид олеат для получения эмульсий типа "вода в масле"), Tween® 80 (также известный как: полисорбат 80 или полиоксиэтилен (20) сорбитан моноолеат), CpG-олигонуклеотид и/или любую их комбинацию. В другом варианте осуществления фармацевтическая 10 композиция представляет собой эмульсию типа "вода в масле в воде" (т.е. w/o/w) с Emulsigen или Emulsigen D в качестве адьюванта.

Фармацевтические композиции, такие как вакцины, можно составлять в качестве 15 составов с немедленным высвобождением или с замедленным высвобождением. Кроме того, фармацевтические композиции можно составлять для индукции системного или локализованного мукозального иммунитета посредством заключения иммуногена в 20 микрочастицы и совместного введения с микрочастицами. Такие системы доставки без труда определит специалист в данной области.

Различные вакцинные составы, содержащие иммуногенные конструкции Аβ-пептида по настоящему изобретению, являются эффективными для защиты от и лечения деменции 25 альцгеймеровского типа у реципиентов вакцин или пациентов, имеющих риск AD или имеющих AD.

(iv) Иммуностимулирующие комплексы Аβ-пептида:

В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция может 30 содержать иммуностимулирующие комплексы, содержащие (a) CpG-олигонуклеотид и (b) иммуногенные конструкции Аβ-пептида. Такие иммуностимулирующие комплексы специально адаптированы так, чтобы они выступали в качестве адьюванта и в качестве стабилизатора пептидного иммуногена. Иммуностимулирующие комплексы имеют 35 формы частиц, которые могут эффективно презентировать иммуногенные конструкции Аβ-пептида клеткам иммунной системы для индукции иммунного ответа.

Иммуностимулирующие комплексы можно составлять в качестве суспензии для 40 парентерального введения. Иммуностимулирующие комплексы также можно составлять в форме эмульсий типа w/o, в качестве суспензии в комбинации с минеральной солью или с гелеобразующим полимером *in situ* для эффективной доставки иммуногенных конструкций Аβ-пептида к клеткам иммунной системы реципиента хозяина после парентерального введения для индукции иммунного ответа против Аβ с защитным 45 эффектом. Настоящее изобретение относится к стабилизированному иммуностимулирующему комплексу, содержащему катионную иммуногенную конструкцию Аβ-пептида и анионную молекулу, или олигонуклеотид или полинуклеотид, и их комбинации, и к способу стабилизации катионной иммуногенной конструкции Аβ-пептида посредством образования комплекса с анионной молекулой, или олигонуклеотидом или полинуклеотидом посредством электростатической ассоциации. Стабилизированный иммуностимулирующий комплекс может быть включен в фармацевтическую композицию в качестве системы доставки иммуногена.

Иммуногенная конструкция Аβ-пептида, представляющая собой "катионный пептид", 50 как описано в настоящем описании, относится к пептиду, который является положительно заряженным при pH в диапазоне от 5,0 до 8,0. Суммарный заряд на пептиде или пептидных коктейлях вычисляют путем приписывания заряда +1 за каждый лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H), заряда -1 за каждую аспарагиновую кислоту

(D) или глутаминовую кислоту (E) и заряда 0 за другую аминокислоту в последовательности. Вклады зарядов от N-концевых аминогрупп (+1) и C-концевых карбоксилатных групп (-1) каждого пептида эффективно взаимно нейтрализуют друг друга, когда они являются незамещенными. Заряды суммируют для каждого пептида и выражают в качестве суммарного среднего заряда. Пригодный пептидный иммуноген имеет суммарный средний положительный заряд +1. Предпочтительно, пептидный иммуноген имеет суммарный положительный заряд в диапазоне, который превышает +2.

"Анионная молекула", как описано в настоящем описании, относится к молекуле, которая является отрицательно заряженной при pH в диапазоне 5,0-8,0. Суммарный отрицательный заряд на олигомере или полимере вычисляют путем присвоения заряда -1 за каждую фосфодиэфирную или фосфоротиоатную группу в олигомере. Пригодным анионным олигонуклеотидом является одноцепочечная молекула ДНК с 8-64 нуклеотидными основаниями, имеющая число повторов CpG-мотива в диапазоне от 1 до 10. Предпочтительно, иммуностимулирующие одноцепочечные молекулы ДНК с CpG содержат 18-48 нуклеотидных оснований, причем число повторов CpG-мотива находится в диапазоне от 3 до 8.

Более предпочтительно анионный олигонуклеотид соответствует формуле: 5' X¹CGX² 3', где С и G являются неметилированными; и X¹ выбран из группы, состоящей из А (аденин), G (гуанин) и T (тимин); и X² представляет собой С (цитозин) или Т (тимин). Или, анионный олигонуклеотид соответствует формуле: 5' (X³)₂CG(X⁴)₂ 3', где С и G являются неметилированными; и X³ выбран из группы, состоящей из А, Т или G; и X⁴ представляет собой С или Т.

Конечный иммуностимулирующий комплекс имеет форму частиц размером, как правило, находящимся в диапазоне 1-50 микрометров, и он зависит от множества факторов, включающих относительную стехиометрию заряда и молекулярную массу взаимодействующих элементов. Иммуностимулирующий комплекс в форме частиц имеет дополнительное преимущество обеспечения адъювантных свойств и активации специфических иммунных ответов *in vivo*. Кроме того, стабилизированный иммуностимулирующий комплекс является пригодным для получения вакцинных составов посредством различных процессов, включая использование эмульсий типа "вода в масле", суспензий минеральных солей и полимерных гелей.

35 (e) Способы производства

Настоящее изобретение также относится к способам производства иммуногенных конструкций Аβ-пептида, композиций и фармацевтических композиций, вакцинных составов для индукции иммунных ответов и защиты пациентов, имеющих риск AD или имеющих.

40 (i) Способы производства иммуногенных конструкций Аβ-пептида

Пептидные иммуногены по настоящему изобретению можно получать способами химического синтеза, хорошо известными специалисту в данной области. См., например, Moore V. Chapter 2, Synthetic Peptides: A User's Guide, ed. GA Grant, W. H. Freeman & Co., New York, NY, 1992, p. 63-67. Таким образом, пептиды можно синтезировать с использованием автоматизированных технологий твердофазного синтеза Merrifield с α-NH₂, защищенным химическими группами либо t-Вос, либо F-тос, с использованием аминокислот с защищенными боковыми цепями, например, на устройстве для синтеза пептидов Applied Biosystems Peptide Synthesizer Model 430A или 431. Получение пептидных

конструкций, содержащих пептиды комбинаторной библиотеки для Тн-эпитопов можно проводить путем предоставления смеси альтернативных аминокислот для связывания в данном вариабельном положении.

После полной сборки желаемого пептидного иммуногена смолу обрабатывают

5 стандартными способами для отщепления пептида от смолы и деблокирования функциональных групп на боковых цепях аминокислот. Свободный пептид очищают посредством ВЭЖХ и охарактеризовывают биохимически, например, посредством анализа аминокислот или посредством секвенирования. Способы очистки и охарактеризации пептидов хорошо известны специалисту в данной области.

10 Иммуноген по настоящему изобретению также можно получать в качестве разветвленного полимера посредством синтеза желаемой пептидной конструкции прямо на смоле с разветвленной поли-лизиловой сердцевиной (Wang, et al., Science, 1991; 254: 285-288).

15 Качество пептидов, получаемых посредством этого химического процесса, можно контролировать и определять и, в результате, можно гарантировать воспроизводимость антигенности, иммуногенности и выхода. Подробное описание производства пептида или пептидных иммуногенных конструкций, родственных А β , посредством твердофазного пептидного синтеза представлено в примере 1.

В течение 25 лет опыта иммунологических применений синтетических пептидов 20 заявитель обнаружил, что диапазон структурной вариабельности, который позволяет сохранение намеченной иммунологической активности, является значительно более широким, чем диапазон структурной вариабельности, который обеспечивает сохранение специфической активности лекарственного средства у низкомолекулярного лекарственного средства или желаемых видов активности и нежелательной токсичности, 25 которые встречаются в крупных молекулах, которые совместно продуцируются с лекарственными средствами биологического происхождения. Таким образом, пептидные аналоги, либо намеренно сконструированные, либо неизбежно продуцируемые вследствие ошибки синтетического процесса в качестве смеси побочных продуктов, имеющих последовательность с делецией, которые имеют хроматографические и 30 иммунологические свойства, сходные со свойствами предполагаемого пептида, часто являются настолько же эффективными, как и очищенный препарат желаемого пептида. Сконструированные аналоги и непредусмотренные смеси аналогов являются эффективными при условии, что разработана методика различия QC для мониторинга, как процесса производства, так и процесса оценки продукта, чтобы гарантировать 35 воспроизводимость и эффективность конечных продуктов с использованием этих пептидов.

Пептиды также можно получать с использованием технологии рекомбинантных ДНК, включающей молекулы нукleinовых кислот, векторы и/или клетки-хозяева. По существу, молекулы нукleinовых кислот, кодирующие иммуногенные конструкции 40 А β -пептида и иммунологически функциональные аналоги иммуногенных конструкций А β -пептида и их аналоги/гомологи также охватываются настоящим описанием в качестве части настоящего изобретения. Аналогично, векторы, включающие экспрессирующие векторы, содержащие молекулы нукleinовых кислот, а также клетки-хозяева, содержащие векторы, также охватываются настоящим описанием в качестве части 45 настоящего изобретения.

Различные иллюстративные варианты осуществления также охватывают способы 46 производания иммуногенных конструкций А β -пептида и иммунологически функциональных аналогов иммуногенных конструкций А β -пептида. Например, способы

могут включать стадию инкубации клетки-хозяина, содержащей экспрессирующий вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую иммуногенные конструкции Аβ-пептида и/или их иммунологические функциональные аналоги, в таких условиях, в которых пептид и/или аналог экспрессируются. Более длинные синтетические пептидные иммуногены можно синтезировать хорошо известными способами рекомбинантных ДНК. Такие способы предоставлены в хорошо известных стандартных руководствах с детальными протоколами. Для конструирования гена, кодирующего пептид по настоящему изобретению, аминокислотную последовательность подвергают обратной трансляции для получения последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность, предпочтительно с кодонами, которые являются оптимальными для организма, в которых ген экспрессируется. Далее, синтетический ген получают, как правило, посредством синтеза олигонуклеотидов, которые кодируют пептид и любые регуляторные элементы, если необходимо. Синтетический ген встраивают в подходящий клонирующий вектор и трансфицируют в клетку-хозяина. Затем пептид экспрессируют в подходящих условиях, пригодных для выбранной экспрессирующей системы и хозяина. Пептид очищают и охарактеризовывают стандартными способами.

(ii) Способы производства иммуностимулирующих комплексов

Различные иллюстративные варианты осуществления также охватывают способы

получения иммуностимулирующих комплексов (ISC), содержащих иммуногенные конструкции Аβ-пептида и молекулу CpG-олигодезоксинуклеотида (ODN). В одном варианте осуществления, как проиллюстрировано на фиг.5А, стабилизированные иммуностимулирующие комплексы происходят из катионных пептидов и полианионной молекулы CpG ODN. На фиг.5А проиллюстрирована система самосборки, запускаемая электростатической нейтрализацией заряда. Стехиометрия молярного соотношения зарядов катионного пептида и анионного олигомера определяет степень ассоциации. Нековалентная электростатическая ассоциация пептидных иммуногенов и CpG ODN представляет собой полностью воспроизводимый процесс. Иммуностимулирующий комплекс пептид/CpG ODN подвергается самоагрегации и способствует презентации "профессиональным" антиген-процессирующими клеткам (APC) иммунной системы, таким образом, далее повышая иммуногенность комплексов. Эти комплексы без труда охарактеризовывают для контроля качества в процессе производства. ISC пептид/CpG являются хорошо переносимыми *in vivo*.

В одном варианте осуществления в вакцинном составе (вакцина UBI AD) используется

две иммуногенные конструкции Аβ-пептида (SEQ ID NO: 64 и 65), полученных в эквимолярном соотношении, смешанных с запатентованным CpG ODN, который приводит к самопроизвольному образованию иммуностимулирующих комплексов в растворе, как описано в примерах 8 и 9. Эта новая система в форме частиц, содержащая иммуногенные конструкции CpG ODN и Аβ-пептида, была сконструирована, чтобы воспользоваться преимуществами генерализованной В-клеточной митогенности, ассоциированной с использованием CpG ODN, но, тем не менее, стимулирует сбалансированные ответы типа Th-1/Th-2.

CpG ODN в описанном вакцинном составе на 100% связываются с иммуногеном в процессе, опосредуемом электростатической нейтрализацией противоположных зарядов, что приводит к образованию частиц микрометровых размеров. Форма частиц обеспечивает значительно сниженную дозировку CpG относительно общепринятого применения CpG-адъювантов, имеет меньший потенциал к неблагоприятным иммунным ответам и облегчает альтернативные каскады процессинга иммуногенов, включающие

антигенпредставляющие клетки (APC). Следовательно, описанные составы (вакцины UBI AD) являются концептуально новыми и обеспечивают преимущества путем ускорения стимуляции иммунных ответов посредством альтернативных механизмов.

(iii) Способы производства вакцинных составов

- 5 Различные иллюстративные варианты осуществления также охватывают вакцинныесоставы, в которых используются эмульсии типа "вода в масле" и суспензии сминеральными солями, как показано на фиг.5В. Чтобы сконструированная вакцина могла быть использована в большой популяции, в случае которой также целью введение является профилактика, безопасность становится другим важным учитываемым
- 10 фактором. Несмотря на применение эмульсий типа "вода в масле" у человека для многих вакцинных составов в клинических испытаниях, квасцы остаются основным адьювантом для применения в вакцинных составах вследствие десятилетий безопасного тестирования. Квасцы или его минеральные соли Adjuphos (фосфат алюминия) использовали в качествеадьювантов для получения для клинических применений, как проиллюстрировано в
- 15 примерах 8 и 9.

(f) Способы лечения и предупреждения болезни Альцгеймера

(i) Режимы лечения

- В профилактических применениях фармацевтические композиции вводят пациенту, предрасположенному к или имеющему риск болезни Альцгеймера в количестве, достаточном для устранения или снижения риска, уменьшения тяжести или замедления возникновения заболевания (биохимических, гистологических и/или поведенческих показателей), включая его осложнения и промежуточные патологические фенотипы при развитии заболевания.
- 20

В терапевтических применениях композиции вводят пациенту, предположительно страдающему или уже страдающему заболеванием, в количестве, достаточном для излечения или по меньшей мере частичной остановки симптомов заболевания (биохимических, гистологических и/или поведенческих симптомов), включая его осложнения и промежуточные патологические фенотипы при развитии заболевания.

25

В некоторых способах введение средства снижает или устраняет мягкое когнитивное нарушение у пациентов, у которых еще не развились характерная патология болезни Альцгеймера. Количество, достаточное для осуществления терапевтического или профилактического лечения, определяют как терапевтически или профилактически эффективную дозу. Как в профилактических, так и в терапевтических режимах, средства обычно вводят несколькими дозировками до тех пор, пока не достигнут достаточного иммунного ответа. Как правило, проводят мониторинг иммунного ответа и вводят повторные дозировки, если иммунный ответ начинает снижаться.

30

(ii) Пациенты, подлежащие лечению

Пациенты, подлежащие лечению, включают пациентов, которые имеют риск развития болезни Альцгеймера, но не демонстрируют симптомов, а также пациентов, которые 40 в настоящее время демонстрируют симптомы.

Термин "профилактическое лечение", как используют в рамках изобретения, относится к лечению, нацеленному на остановку патогенных процессов, ведущих к заболеванию.

Термин "лечение", как используют в рамках изобретения, относится к лечению, нацеленному на остановку патогенных процессов, которые приводят к прогрессированию заболевания, и/или имеющему симптоматические эффекты.

45

Практически каждый индивидуум имеет риск болезни Альцгеймера, если он или она живет достаточно долго. Таким образом, способы по настоящему изобретению можно проводить профилактически у общей популяции без необходимости в какой-либо оценке

риска у рассматриваемого пациента (т.е. любого живого индивидуума можно квалифицировать как пациента). Способы по настоящему изобретению являются особенно пригодными у пациентов, которые имеют известный генетический риск болезни Альцгеймера. Такие индивидуумы включают пациентов, имеющих родственников,

- 5, которые имеют это заболевание, и пациентов, риск у которых определен с использованием анализа генетических или биохимических маркеров. Генетические маркеры риска болезни Альцгеймера включают мутации в гене APP, в частности, мутации в положении 717 и положениях 670 и 671, называемые мутациями Hardy и Swedish, соответственно (см. Hardy J. Trends in Neurosciences 1997; 20:154-159). Другими
- 10 маркерами риска являются мутации в генах пресенилина, PS1 и PS2, и ApoE4, семейный анамнез AD, гиперхолестеринемия или атеросклероз.

Как правило, пациентов выбирают из группы риска пациентов, состоящей из пациентов с мягким когнитивным нарушением, пациентов с генотипами, известными тем, что они ассоциированы с болезнью Альцгеймера, пациентов с трисомией 21 (т.е.

- 15 потенциальные пациенты с синдромом Дауна), пациенты с суррогатными маркерами, указывающими на риск болезни Альцгеймера.

У бессимптомных пациентов лечение может начинаться в любом возрасте (например, 10, 20, 30 лет). Может не быть необходимым начало лечения до тех пор, пока пациент не достигнет 40, 50, 60 или 70 лет. В случае потенциальных пациентов с синдромом

- 20 Дауна, лечение можно начинать внутриутробно путем введения лекарственного средства матери или вскоре после рождения.

Пациентов, страдающих в настоящее время болезнью Альцгеймера, можно распознать по характерной деменции, которая, как используют в рамках изобретения, относится, в частности, к заболеванию, определяемому в соответствии с критериями Diagnostic and

- 25 Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edition (DSM-IV), а также по наличию факторов риска, описанных выше. Кроме того, доступен ряд диагностических тестов для идентификации пациентов, которые имеют AD. Они включают измерение уровней в CSF тау и A β ₁₋₄₂. Повышенные уровни тау или сниженные уровни A β ₁₋₄₂ означают присутствие AD. Пациентов, страдающих болезнью Альцгеймера, также можно
- 30 диагностировать с использованием критериев болезни Альцгеймера NINCDS-ADRDA.

Лечение, как правило, охватывает множество дозировок в течение периода времени. Мониторинг лечения можно проводить путем анализа антител или ответа активированных Т-клеток или В-клеток на лекарственное средство (например, A β ₁₋₄₂ ELISA) с течением времени. Если ответ снижается, показана усиливающая дозировка.

Накопились убедительные доказательства, указывающие на то, что A β -амилоидный пептид, основной компонент сенильных амилоидных бляшек, играет ключевую роль в AD. Успешная модифицирующая терапия AD, вероятно, включает продукты, которые влияют на отложение β -амилоида в головном мозге. A β -специфические антитела, активно индуцируемые иммунной системой или вводимые

- 40 пассивно, неизменно снижают нагрузку бляшками в различных моделях на трансгенных мышах. Однако первую клиническую попытку стимулировать иммунную систему пациентов AD для индукции антител против A β вынуждены были прекратить вследствие неприемлемых побочных эффектов (менингоэнцефалит у 6% пациентов, которым проводили введение, Orgogozo JM, et al. Neurology 2003; 61: 46-54.).

Неожиданно, в случае настоящего описанного состава (вакцина UBI AD), в котором используется две иммуногенных конструкции A β ₁₋₁₄-пептида (SEQ ID NO: 64 и 65) в эквимолярном соотношении, связанных с двумя идеализированными искусственными

эпитопами Т-хелперов, происходящими из белка слияния вируса кори (MVF) и поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg), соответственно, не возникало неблагоприятных иммунных реакций или случаев микрогеморрагии.

В одном аспекте описанного способа неожиданно было обнаружено, что

- 5 иммуногенные конструкции Аβ-пептида можно преимущественно применять внутримышечно у теплокровных животных, особенно людей, страдающих деменцией.

Во втором аспекте настоящее изобретение относится к дозированной форме для внутримышечного введения иммуногенных конструкций Аβ-пептида. Предпочтительной дозированной формой для внутримышечного введения иммуногенных конструкций

- 10 Аβ-пептида является вакцинnyй состав, содержащий от 30 мкг до 1000 мкг/0,5 мл/доза пептидных иммуногенных конструкций в комплексе с CpG ODN в присутствии минеральных солей в качестве адьюванта, предпочтительно, от 100 мкг до 400 мкг/0,5 мл/доза, и более предпочтительно 300 мкг/0,5 мл/доза. Дозированную форму можно держать при 2-8°C непосредственно до применения. Дозированную форму
- 15 предпочтительно вводят посредством внутримышечной инъекции шприцом теплокровному животному, в частности, в плечо. Для нагревания дозированной формы дозированную форму можно держать при температуре окружающей среды в течение приблизительно от 15 минут до 45 минут, например 30 минут. Предпочтительно, перед отменой лекарственного вещества флаконы осторожно переворачивают несколько раз
- 20 для диспергирования потенциальных невидимых невооруженным глазом частиц.

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к способу профилактики и лечения деменции у пациентов-людей, включающему введение от 30 мкг до 1000 мкг/0,5 мл на дозу, предпочтительно, от 100 мкг до 400 мкг/0,5 мл на дозу, более предпочтительно приблизительно 300 мкг/0,5 мл на дозу, пациентам-людям,

- 25 нуждающимся в этом, один раз в 12 недель, предпочтительно приблизительно один раз в 26 недель, в частности, приблизительно один раз в 52 недель, после первичной иммунизации на 0, 4 и 8 неделях. Частота инъекций может варьировать в зависимости от ответа пациента. Например, частота введения может варьировать, если инъекцию вводить в соответствии с титрами антител.

- 30 Полезность иммуногенных конструкций Аβ-пептида при лечении упомянутых выше нарушений можно подтверждать в подходящих клинических испытаниях, например, с использованием всего трех дозировок на 0, 4 и 12 недель, причем каждый раз используя 300 мкг/0,5 мл на дозу вакцинного состава, а затем наблюдения в течение периода более 9 месяцев, как описано в примерах. Можно проводить иммунизации во время
- 35 наблюдения один раз каждые три, шесть или 12 месяцев в зависимости от титров антител.

Пригодные клинические испытания представляют собой открытые испытания или, в частности, рандомизированные двойные слепые плацебо-контролируемые параллельные исследования у пациентов, имеющих риск болезни Альцгеймера или симптомы болезни Альцгеймера.

- 40 Конкретный вариант осуществления охватывает вакцинnyй состав (вакцина UBI AD), который содержит смесь двух иммуногенных конструкций Аβ-пептида (SEQ ID NO: 64 и 65), в каждой из которых имеется N-конец (Aβ₁₋₁₄, SEQ ID NO: 4) Аβ₁₋₄₂-пептида, синтетически связанный с эпитопами Т-хелперов (Th) (SEQ ID NO: 46 и 47), лишенный токсических эффектов, наблюдавшихся в случае аутологичных Th-эпитопов у пациентов, которым вводили вакцину AN-1792 (агрегированный Аβ₁₋₄₂, Elan/Wyeth). Исследования *in vitro* и исследования *in vivo* у небольших животных, павианов и макаков демонстрируют, что антитела индуцируются с ожидаемой специфичностью к N-концевому участку, и что эти антитела обладают функциональной иммуногенностью
- 45

для нейтрализации токсической активности Аβ и стимуляции устраниния бляшек.

Антитела, по-видимому, вытягивают Аβ₁₋₄₀ из ЦНС в периферический кровоток.

Результаты указывают на то, что вакцина не индуцирует клеточных ответов против Аβ₁₋₄₂. Вакцина UBI AD хорошо переносилась у яванских макаков в процессе

исследования острой и хронической токсичности с повторяющимися дозами.

Безопасность и иммуногенность вакцинного состава UBI AD, описанного в примерах 8 и 9, далее исследовали в испытании фазы I у пациентов с AD от мягкой до умеренной, и было обнаружено, что он индуцирует антитела со специфичностью к N-концу Аβ₁₋₁₄

пептида у всех 19 пациентов, таким образом, достигая беспрецедентной частоты ответа 100% после внутримышечной иммунизации на 0, 4 и 12 неделях, не вызывая каких-либо тяжелых или непереносимых неблагоприятных явлений. Подгруппа более пожилых пациентов с мягкой AD (n=6; возраст ≥60 лет с исходным MMSE ≥20)

продемонстрировала как высокие антителные ответы на вакцинный состав UBI AD,

так и улучшенные когнитивные и функциональные исходы, оцениваемые с помощью показателей (i) ADAS-Cog (AD Assessment Scale – Cognitive); (ii) ADCS-CGIC (Alzheimer Disease Cooperative Study – Clinical Global Impressions of Change); и (iii) MMSE (Mini-Mental State Exam) по сравнению с исходными показателями, в ходе основного испытания в течение 6 месяцев и после периода наблюдения в течение 6 месяцев. ADAS-Cog является наиболее популярным инструментом исследования когнитивной функции, используемым в клинических испытаниях. ADAS-Cog состоит из 11 заданий (70 баллов), которые определяют нарушения памяти, речи, праксиса, внимания и других когнитивных способностей, которые часто называют основными симптомами AD (увеличение показателя указывает на ухудшение). ADCS-CGIC представляет собой единый общий рейтинг изменений от исходного уровня (снижение показателя указывает на ухудшение).

MMSE является наиболее широко используемым устройством для скрининга когнитивной функции и обеспечивает показатель ориентации, запоминаемости, кратковременной памяти, функционирования речи (снижение показателя указывает на ухудшение). В испытании фазы II используют биомаркеры (молекулярная диагностика, визуализация головного мозга, генотипирование) для оценки эффективности вакцинного состава у пациента с мягкой AD, включающей оценку снижения прогрессирования заболевания путем увеличения посредством активной иммунизации антител против Аβ₁₋₁₄ в кровотоке, которое предположительно приводит к снижению концентрации токсических олигомеров Аβ в головном мозге.

(g) Конкретные варианты осуществления

Конкретные варианты осуществления настоящего изобретения включают, но не ограничиваются ими, следующие:

(1) Иммуногенная конструкция Аβ-пептида, содержащая следующую формулу: (N-концевой фрагмент Аβ₁₋₄₂ пептида)-(A)o-(Th)-X

где (N-концевой фрагмент Аβ₁₋₄₂ пептида) представляет собой В-клеточный эпитоп из Аβ, содержащий от приблизительно 10 до приблизительно 14 аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 5 и 6;

каждый А независимо представляет собой аминокислоту или линкерную группу, выбранную из группы, состоящей из аминокислоты, Lys-, Gly-, Lys-Lys-Lys-, (α, ε-N)Lys и ε-N-Lys-Lys-Lys (SEQ ID NO: 32);

каждый Th содержит аминокислотную последовательность, которая составляет эпитоп Т-хелперных клеток, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34, 37, 38, 40-47 и их функциональных иммунологических аналогов;

Х представляет собой α -COOH или α -CONH₂ аминокислоты; и о составляет от 0 до приблизительно 4.

(2) Иммуногенная конструкция А β -пептида согласно (1), где (N-концевой фрагмент А β ₁₋₄₂-пептида) представляет собой А β ₁₋₁₄ (SEQ ID NO: 4).

(3) Иммуногенная конструкция А β -пептида согласно (1), где А представляет собой ϵ -N-Lys-Lys-Lys-Lys (SEQ ID NO: 32).

(4) Иммуногенная конструкция А β -пептида согласно (1), где Th-эпитоп представляет собой SEQ ID NO: 45 или 46.

(5) Иммуногенная конструкция А β -пептида согласно (1), содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48-65.

(6) Иммуногенная конструкция А β -пептида согласно (1), по существу состоящая из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 62-65.

(7) Иммуногенная конструкция А β -пептида согласно (1), которая представляет собой SEQ ID NO: 62, 63, 64 и/или 65.

(8) Композиция, содержащая иммуногенную конструкцию А β -пептида по п.1.

(9) Фармацевтическая композиция, содержащая

а. иммуногенную конструкцию А β -пептида согласно (1); и

б. фармацевтически приемлемый носитель для доставки и/или адьювант.

(10) Вакцинальная композиция против болезни Альцгеймера, содержащая

а. иммуногенную конструкцию А β -пептида согласно (1); и

б. фармацевтически приемлемый носитель для доставки и/или адьювант.

(11) Вакцинальная композиция против болезни Альцгеймера, содержащая

а. иммуногенную конструкцию А β -пептида согласно (7); и

б. фармацевтически приемлемый носитель для доставки и/или адьювант.

(12) Вакцинальная композиция против болезни Альцгеймера согласно (10), где адьювант согласно (b) представляет собой минеральную соль алюминия, выбранную из группы, состоящей из alhydrogel (Al(OH)₃) или adjuphos (AlPO₄).

(13) Вакцинальная композиция против болезни Альцгеймера согласно (10), где пептидный антиген (a) смешан с CpG-олигодезоксинуклеотидом (ODN) с образованием стабилизированного иммуностимулирующего комплекса.

(14) Выделенное антитело или его эпитоп-связывающий фрагмент, которые связываются с компонентом (N-концевой фрагмент А β ₁₋₄₂-пептида) иммуногенной конструкции А β -пептида согласно (1).

(15) Выделенное антитело или его эпитоп-связывающий фрагмент согласно (14), которые специфически связываются с А β ₁₋₁₀ (SEQ ID NO: 6).

(16) Выделенное антитело или его эпитоп-связывающий фрагмент согласно (14), связанные с иммуногенной конструкцией А β -пептида по п.1.

(17) Выделенное антитело или эпитоп-связывающий фрагмент согласно (15), связанные с SEQ ID NO: 6.

(18) Композиция, содержащая выделенное антитело или его эпитоп-связывающий фрагмент согласно (14).

(19) Способ уменьшения тяжести или замедления возникновения деменции у пациентов-людей, включающий введение вакцинного состава согласно (10).

(20) Способ согласно (19), где указанный вакцинный состав вводят в водном растворе, содержащем от 10 мкг до 1000 мкг на дозу, пациентам, имеющим риск AD или имеющим AD.

(h) Дополнительные варианты осуществления

(1) Иммуногенная конструкция А β -пептида по настоящему изобретению, соответствующая следующей формуле:

(N-концевой фрагмент А β_{1-42} -пептида)-(A)_o-(Th)-X

где (N-концевой фрагмент А β_{1-42} -пептида) представляет собой В-клеточный эпитоп, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4-6 из от приблизительно 10 до 5 приблизительно 14 аминокислотных остатков;

каждый А независимо представляет собой аминокислоту или линкерную группу, выбранную из группы, состоящей из аминокислоты, Lys-, Gly-, Lys-Lys-Lys-, (α , ϵ -N)Lys или ϵ -N-Lys-Lys-Lys (SEQ ID NO: 32);

каждый Th содержит аминокислотную последовательность, которая составляет 10 эпитоп Т-хелперных клеток, выбранный из группы, включающей SEQ ID NO: 34, 37, 38, 40-47 и их функциональные иммунологические аналоги;

X представляет собой α -COOH или α -CONH₂ аминокислоты; и

о составляет от 0 до приблизительно 4.

(2) Вакцинальная композиция против болезни Альцгеймера (AD), содержащая

a. иммуногенную конструкцию А β -пептида согласно (1);

b. функциональный иммунологический аналог (a);

c. любую комбинацию (a) или (b); и

d. приемлемый носитель для доставки или адьювант.

(3) Вакцина против AD согласно (2), где адьювант согласно (d) представляет собой минеральную соль алюминия, представляющую собой alhydrogel (Al(OH)₃) или adjuphos (AlPO₄).

(4) Вакцина против AD согласно (2), где пептидный антиген согласно (a) смешан с

CpG-олигодезоксинуклеотидом (ODN) с образованием стабилизированного 25 иммуностимулирующего комплекса.

(5) Вакцинальная композиция против болезни Альцгеймера (AD), содержащая

a. иммуногенную конструкцию А β -пептида, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 49-51, 54, 55 и 57-65;

b. функциональный иммунологический аналог (a);

c. любую комбинацию (a) или (b); и

d. приемлемый носитель для доставки или адьювант.

(6) Вакцинальная композиция против болезни Альцгеймера (AD), содержащая

a. иммуногенную конструкцию А β -пептида согласно (5);

b. функциональный иммунологический аналог (a);

c. любую комбинацию (a) или (b); и

d. приемлемый носитель для доставки или адьювант.

(7) Вакцина против AD согласно (5), где адьювант согласно (d) представляет собой минеральную соль алюминия, представляющую собой alhydrogel (Al(OH)₃) или adjuphos 40 (AlPO₄).

(8) Вакцина против AD согласно (5), где пептидный антиген согласно (a), (b) или (c) смешан с CpG-олигодезоксинуклеотидом (ODN) с образованием стабилизированного иммуностимулирующего комплекса.

(9) Вакцина против AD согласно (5), где пептидный антиген согласно (a), (b) или (c) 45 смешан с CpG-олигодезоксинуклеотидом (ODN) с образованием стабилизированного иммуностимулирующего комплекса и где адьювант в (d) представляет собой минеральную соль алюминия, которая представляет собой alhydrogel (Al(OH)₃) или

adjuphos (AlPO_4).

(10) Вакцинальная композиция против болезни Альцгеймера (AD), содержащая а. иммуногенную конструкцию А β -пептида, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 62+63, 64+65;

- ⁵ б. функциональный иммунологический аналог (а);
в. любую комбинацию (а) или (б); и
д. приемлемый носитель для доставки или адьювант.

(11) Композиция, содержащая:

- а. иммуногенную конструкцию А β -пептида, содержащую смесь SEQ ID NO: 64 и SEQ ¹⁰ ID NO: 65; и

- б. смесь (а), дополнительно смешанную с CpG ODN.

(12) Фармацевтическая композиция, содержащая:

- а. иммуногенную конструкцию А β -пептида, содержащую смесь SEQ ID NO: 64 и SEQ ¹⁵ ID NO: 65;

- б. смесь (а), дополнительно смешанную с CpG ODN; и
с. Adjuphos.

(13) Фармацевтическая композиция, содержащая:

- а. иммуногенную конструкцию А β -пептида, содержащую смесь SEQ ID NO: 64 и SEQ ²⁰ ID NO: 65;

- б. смесь (а), дополнительно смешанную с CpG ODN; и
с. Alhydrogel.

(14) Способ уменьшения тяжести или замедления возникновения деменции у человека, включающий введение фармацевтической композиции согласно (13) человеку.

(15) Способ уменьшения тяжести или замедления возникновения деменции у человека, включающий введение фармацевтической композиции согласно (13) человеку в дозе 300 мкг/0,5 мл/доза.

(16) Способ уменьшения тяжести или замедления возникновения деменции у человека, включающий:

- а. введение фармацевтической композиции согласно (13) человеку в дозе 300 мкг/0,5 ³⁰ мл/доза; и

- б. дозирование на 0, 4 и 12 в качестве первичной иммунизации.

(17) Способ уменьшения тяжести или замедление возникновения деменции у человека, включающий:

- а. введение фармацевтической композиции согласно (13) человеку в дозе 300 мкг/0,5 ³⁵ мл/доза;

- б. дозирование на 0, 4 и 12 неделях в качестве первичной иммунизации; и

с. усиливающая иммунизация после стадии (б) один раз каждые 3 месяца и/или один раз каждые 6 месяцев и/или один раз каждые 12 месяцев.

(18) Способ согласно любому из (14)–(17), где введение осуществляют посредством внутримышечной инъекции.

(19) Способ согласно любому из (14)–(18), где человек имеет мягкую AD, MCI или не проявляет признаков или симптомов AD, но имеет возраст старше 60 лет.

(20) Способ согласно (19) где введение человеку осуществляют следующим образом:

- а. если человек имеет мягкую AD, введение предназначено для лечения AD;

⁴⁵ б. если человек имеет MCI, введение предназначено для предупреждения и/или снижения тяжести и/или замедления возникновения деменции; и

с. если человек не проявляет признаков или симптомов AD, но имеет возраст старше 60 лет, введение предназначено для предупреждения и/или снижения тяжести и/или

замедления возникновения деменции.

(21) Вакцина против AD согласно любому из (2)-(10), где пептидный антиген согласно (а) смешивают с CpG-олигонуклеотидом для формирования стабилизированного иммуностимулирующего комплекса.

⁵ (22) Вакцина против AD согласно вышеуказанному, где иммуногенная конструкция Аβ-пептида согласно (а) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17-20.

¹⁰ (23) Вакцина против AD согласно вышеуказанному, где иммуногенная конструкция Аβ-пептида согласно (а) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 и 20.

(24) Вакцина против AD согласно вышеуказанному, где общее количество пептидного антигена согласно (а) составляет от приблизительно 10 мкг до приблизительно 1 мг на дозу.

¹⁵ (25) Вакцина против AD согласно вышеуказанному, где носитель для доставки или адьювант выбран из группы, состоящей из Montanide ISA50V, полиоксиэтилен (20) сорбитанmonoолеата, Emulsigen, Emulsigen D и CpG-олигонуклеотида.

(26) Способ уменьшения тяжести или замедления возникновения деменции у пациентов-людей, включающий введение вакцинного состава согласно любому из вышеуказанных.

²⁰ (27) Способ согласно любому из вышеуказанных, где деменция представляет собой деменцию альцгеймеровского типа или сосудистую деменцию с амилоидной ангиопатией.

(28) Способ согласно любому из вышеуказанных, где деменция представляет собой деменцию, ассоциированную с болезнью Паркинсона или болезнью с тельцами Леви.

²⁵ (29) Способ согласно любому из вышеуказанных, где указанный вакцинный состав вводят в водном растворе, содержащем от 10 мкг до 1000 мкг на дозу пациентам, имеющим риск AD или имеющим AD. Также приемлемыми являются от 100 до 750 мкг на дозу или 300 мкг на дозу. 300 мкг может представлять собой намеченную дозу, используемую в клиническом испытании с эффективностью.

³⁰ (30) Введение может представлять собой введение один раз в 3 месяца и/или один раз в 6 месяцев и/или один раз в 12 месяцев.

(31) Введение может быть основано на титре антител, используемом для принятия решения о частоте введения вакцины.

³⁵ (32) Способ в соответствии с любым из вышеуказанных, где пациенты имеют риск развития болезни Альцгеймера и, кроме того, где пациенты выбраны из группы, состоящей из пациентов с мягким когнитивным нарушением, пациентов с генотипами, о которых известно, что они ассоциированы с болезнью Альцгеймера, пациентов с трисомией 21 и пациентов с суррогатными маркерами, указывающими на риск болезни Альцгеймера.

⁴⁰ (33) Способ согласно любому из вышеуказанных, где пациенты с генотипами, известными тем, что они ассоциированы с болезнью Альцгеймера, включают пациентов с генотипом ApoE4.

⁴⁵ (34) Способ согласно любому из вышеуказанных, где вакцинный состав, содержащий иммуногенную конструкцию Аβ-пептида согласно (а) и ее комбинацию, вводят для первичной иммунизации, состоящей из трех доз на 0, 4 и 12 неделях в количестве 300 мкг/0,5 мл на дозу.

(35) Способ согласно любому из вышеуказанных, где вакцинный состав вводят приблизительно один раз каждые три месяца, затем один раз каждые 6 месяцев, а затем один раз каждые 12 месяцев.

(36) Способ согласно любому из вышеуказанных, где В-клетки из крови пациентов, которым ранее вводили вакцинский состав, используют для получения и селекции моноклональных антител человека, нацеленных на N-конец Аβ-пептида, для профилактики и лечения AD.

⁵ (37) Способ индукции иммунного ответа у пациента, включающий проведение первичной иммунизации на 0, 4 и 12 неделях от исходной инъекции, за которой следует усиливающая иммунизация один раз в 3 месяца, один раз в 6 месяцев и наиболее предпочтительно один раз каждые 12 месяцев.

¹⁰ (38) Дозирование можно проводить в количестве от 10 мкг до 1000 мкг на дозу, предпочтительно от 100 мкг до 750 мкг, еще более предпочтительно 300 мкг на дозу.

(39) Путь введения любого из вышеуказанных может представлять собой любой стандартный путь, известный в данной области, такой как внутримышечный путь, подкожный, пероральный и т.д.

¹⁵ Фармацевтическая композиция, которая является пригодной в качестве вакцинного состава иммуногенной конструкции Аβ-пептида, содержит иммуногенную конструкцию Аβ-пептид и приемлемый носитель для доставки или адьювант, где иммуногенная конструкция Аβ-пептида имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

- ²⁰ a) SEQ ID NO: 49-51, 54, 55 и 57-65;
- b) гомолога (a);
- c) антигенно и иммуногенно функционального аналога (a) или (b),
- d) (a), (b) или (c), имеющих по меньшей мере одну консервативную аминокислотную замену, вставку аминокислоты и/или делецию аминокислоты; и
- e) любую комбинацию (a)-(d).

²⁵ В конкретном составе иммуногенная конструкция Аβ-пептида выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 62 и 63 и их смесей.

В другом конкретном составе иммуногенная конструкция Аβ-пептида выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 64 и 65 и их смесей.

³⁰ Другие составы дополнительно содержат эквимолярную смесь конкретных составов иммуногенных конструкций Аβ-пептида, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 62 и 63. Другие составы дополнительно содержат эквимолярную смесь конкретных составов иммуногенных конструкций Аβ-пептида, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 64 и 65.

³⁵ В конкретном составе количество эквимолярной смеси SEQ ID NO: 62 и 63 (или 64 и 65) составляет от приблизительно 1 мкг до приблизительно 1000 мкг на дозу.

В конкретном составе количество эквимолярной смеси SEQ ID NO: 62 и 63 (или 64 и 65) составляет от приблизительно 100 мкг до приблизительно 750 мкг на дозу.

В конкретном составе количество эквимолярной смеси SEQ ID NO: 62 и 63 (или 64 и 65) составляет приблизительно 300 мкг на дозу.

⁴⁰ Эффективность пептидной композиции по настоящему изобретению можно устанавливать путем инъекции животному, например, морским свинкам, павианам, яванским макакам или людям иммуногенной композиции, содержащей пептиды по изобретению. См. таблицы 4, 5, 6, 7 и 8 SEQ ID NO: 48-65. Гуморальный иммунный ответ направлен на N-концевой фрагмент Аβ₁₋₄₂-пептида из от приблизительно 10 до приблизительно 14 аминокислотных остатков. Подробное описание используемых методик представлено в примерах.

Следующие примеры служат для иллюстрации настоящего изобретения и не предназначены для ограничения объема изобретения.

ПРИМЕР 1**СИНТЕЗ ПЕПТИДОВ, РОДСТВЕННЫХ АМИЛОИДУ-БЕТА (Аβ)**

Способы синтеза смоделированных конструкций пептидов, родственных Аβ, которые были включены в усилия по разработке эффективной конструкции и состава вакцины, 5 нацеленных на Аβ, описаны. Пептиды можно синтезировать в мелкомасштабных количествах, которые пригодны для лабораторных поисковых и экспериментальных исследований, а также в крупномасштабных (килограммы) количествах, которые пригодны для промышленной продукции вакцинальных составов и серологических анализов.

10 Большой набор антигенных пептидов, родственных Аβ, имеющих последовательности длиной приблизительно 10-40 аминокислот, конструировали для скрининга и селекции наиболее оптимальных пептидных конструкций для применения в эффективной вакцине против AD. Репрезентативные пептиды Аβ₁₋₄₀, Аβ₁₋₄₂, N-концевые фрагменты Аβ-пептида Аβ₁₋₂₈, Аβ₁₋₁₄, Аβ₁₋₁₀, Аβ₁₅₋₄₂ и 10-мерный пептид, использованы для 15 картирования эпитопа в различных серологических анализах, представлены в таблице 1 (SEQ ID NO: 1-32). Каждая конструкция содержит фрагмент Аβ-пептида (с Аβ₁₋₁₀ по Аβ₁₋₁₄), который синтетически связан с тщательно сконструированным эпитопом Т-хелперных (Th) клеток, происходящим из белков патогенов, включая белок слияния 20 вируса кори (MVF) и белок поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg), указанные в таблице 2 (SEQ ID NO: 33-47) либо в единой последовательности (SEQ ID NO: 33-41, 46, 47), либо в комбинаторной библиотеке (SEQ ID NO: 42-45), для повышения иммуногенности их соответствующих иммуногенных конструкций Аβ-пептида. Восемнадцать репрезентативных иммуногенных конструкций Аβ-пептида, отобранных 25 из более чем 100 пептидных конструкций, идентифицированы в таблице 3 (SEQ ID NO: 48-65).

Все пептиды, использованные для исследований иммуногенности или сходных серологических испытаний для обнаружения и/или измерения антител против Аβ, синтезировали в мелком масштабе с использованием химии Fmoc на устройствах для 30 синтеза пептидов от Applied BioSystems Models 430A, 431 и/или 433. Каждый пептид получали посредством независимого синтеза на твердофазной подложке с защитой посредством Fmoc на N-конце и защитными группами боковых цепей трифункциональных аминокислот. Готовые пептиды отцепляли от твердой подложки, и защитные группы боковых цепей удаляли 90% трифтормукусной кислотой (TFA). 35 Препараты синтетических пептидов оценивали с использованием времяпролетной масс-спектрометрии с лазерной ионизацией и десорбицией из жидкой матрицы (MALDI-TOF), чтобы убедиться в правильном аминокислотном составе. Каждый синтетический пептид также оценивали посредством обращенно-фазовой ВЭЖХ (ОФ-ВЭЖХ) для подтверждения профиля синтеза и концентрации препарата.

40 Несмотря на строгий контроль процесса синтеза (включая пошаговый мониторинг эффективности присоединения), также продуцировались пептидные аналоги вследствие непреднамеренных событий в ходе циклов удлинения, включающих инсерцию, делецию, замену аминокислот и преждевременную терминацию. Таким образом, синтезированные препараты, как правило, включали множество пептидных аналогов помимо заданного 45 пептида. Несмотря на включение таких непреднамеренных пептидных аналогов, полученные препараты синтезированных пептидов, тем не менее, были пригодны для применения в иммунологических способах применения, включая иммунодиагностику (в качестве антигенов для улавливания антител) и вакцинацию (в качестве пептидных

иммуногенов). Главным образом, такие пептидные аналоги, либо преднамеренно сконструированные, либо полученные с использованием процесса синтеза в качестве смеси побочных продуктов, часто являются настолько же эффективными, как и очищенный препарат желаемого пептида, при условии, что разработана методика

5 определения QC для мониторинга, как процесса производства, так и процесса оценки продукта, чтобы гарантировать воспроизводимость и эффективность конечного продукта, в котором используются эти пептиды. Крупномасштабный пептидный синтез в количествах, составляющих от нескольких сотен грамм до нескольких килограмм, проводили на специализированном устройстве для автоматизированного синтеза

10 пептидов UBI2003 в масштабе от 15 ммоль до 50 ммоль.

Для активных ингредиентов, используемых в конечном вакцинном составе для клинических испытаний, пептидные конструкции А β -пептида очищали посредством препартивной ОФ-ВЭЖХ при пологом градиенте элюирования и охарактеризовывали с использованием масс-спектрометрии MALDI-TOF, анализа аминокислот и ОФ-ВЭЖХ,

15 в отношении чистоты и идентичности.

ПРИМЕР 2

СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ АНАЛИЗЫ И РЕАГЕНТЫ

Ниже подробно описаны серологические анализы и реагенты для оценки функциональной иммуногенности синтетических пептидных конструкций и их составов.

20 а. Испытания ELISA на основе пептидов А β ₁₋₄₂, А β ₁₋₄₀, А β ₁₋₂₈ или А β ₁₋₁₄ для анализа специфичности антител

Анализы ELISA для оценки образцов иммунной сыворотки, описанных в представленных ниже примерах, были разработаны, и они описаны ниже.

Лунки 96-луночных планшетов покрывали индивидуально в течение 1 часа при 37°C 25 посредством 100 мкл пептида-мишени А β ₁₋₄₂, А β ₁₋₄₀, А β ₁₋₂₈ или А β ₁₋₁₄ (SEQ ID NO: 1-4), в концентрации 2 мкг/мл (если нет иных указаний), в 10 мМ буфере NaHCO₃, pH 9,5 (если нет иных указаний).

Покрытые пептидом лунки инкубировали с 250 мкл 3% по массе желатина в PBS при 37°C 30 в течение 1 часа для блокирования участков неспецифического связывания белков, а затем проводили три промывания PBS, содержащим 0,05% по объему TWEEN® 20 и сушили. Сыворотки, подлежащие анализу, разбавляли 1:20 (если нет иных указаний) посредством PBS, содержащего 20% по объему нормальной сыворотки козы, 1% по массе желатина и 0,05% по объему TWEEN® 20. В каждую из лунок добавляли сто 35 микролитров (100 мкл) разбавленных образцов (например, сыворотка, плазма) и позволяли им реагировать в течение 60 минут при 37°C.

Затем лунки промывали шесть раз 0,05% по объему TWEEN® 20 в PBS для удаления не связавшихся антител. Конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP) 40 видоспецифические (например, мышь, морская свинка или человека) антитела козы против IgG использовали в качестве меченого индикатора для связывания с комплексом антитело/пептидный антиген, образовавшимся в положительных лунках. Сто микролитров меченного пероксидазой антитела козы против IgG при предварительно 45 титрованном оптимальном разведении и в 1% по объему нормальной сыворотке козы с 0,05% по объему TWEEN® 20 в PBS добавляли в каждую лунку и инкубировали при 37°C в течение дополнительных 30 минут. Лунки промывали шесть раз посредством 0,05% по объему TWEEN® 20 в PBS для удаления не связавшегося антитела и подвергали реакции с 100 мкл субстратной смеси, содержащей 0,04% по массе 3',3',5',5' - тетраметилбензидина (TMB) и 0,12% по объему пероксида водорода в натрий-цитратном

буфере в течение дополнительных 15 минут. Эту субстратную смесь использовали для обнаружения пероксидазной метки по образованию окрашенного продукта. Реакции останавливали добавлением 100 мкл 1,0 М H₂SO₄ и определяли поглощение при 450 нм (A₄₅₀). Для обнаружения Ig/IgG павиана и макака в качестве индикатора использовали конъюгированные с HRP реагенты козы против IgG человека с высокой перекрестной реактивностью в отношении IgG примата. Для определения сывороточного титра в случае клинических образцов от пациентов, включенных в испытания, использовали реагенты конъюгированного с HRP белка A/G, оптимально титрованные в ранее проверенных наборах для тестирования ELISA. Для определения титров антител у вакцинированных животных, которым вводили различные вакциновые составы Аβ-пептида, исследовали 10-кратные серийные разведения сывороток от 1:100 до 1:10000, и титр исследованной сыворотки, выраженный в качестве Log₁₀, вычисляли посредством линейно-регрессионного анализа A₄₅₀ с пороговым значением A₄₅₀, установленным на 0,5.

b. Оценка реактивности антител в отношении эпитопов Т-хелперных клеток на белкеносителе, пептидов Th или комбинаторной библиотеки пептидов Th с использованием испытаний на основе ELISA, специфических для белка-носителя, пептидов Th или комбинаторной библиотеки Th

Лунки 96-луночных планшетов для ELISA покрывали индивидуально в течение 1 часа при 37°C посредством 100 мкл белка-носителя, такого как KLH (гемоцианин лимфы улитки), пептида Th или комбинаторной библиотеки пептидов Th (SEQ ID NO: 44-47), в дозе 2 мкг/мл (если нет иных указаний) в 10 мМ буфере NaHCO₃, pH 9,5 (если нет иных указаний) в сходных анализах ELISA, проведенных, как описано выше. Для определения титров антител у вакцинированных животных, которым вводили различные вакциновые составы Аβ-пептида, исследовали 10-кратные серийные разведения сывороток от 1:100 до 1:10000, и титр исследованной сыворотки, выраженный в качестве Log₁₀, вычисляли посредством линейно-регрессионного анализа A₄₅₀ с пороговым значением A₄₅₀, установленным на 0,5.

c. Оценка с использованием точного анализа специфичности и картирования эпитопов в отношении Аβ и hAPP (белок-предшественник амилоида человека) посредством испытаний ELISA на основе 10-мерных пептидов кластера В-клеточных эпитопов

Точный анализ специфичности антител против Аβ у иммунизированных реципиентов или в вакцинах проводили посредством картирования эпитопов. В кратком изложении, лунки 96-луночных планшетов покрывали индивидуальными 10-мерными пептидами hAPP (SEQ ID NO: 6, 8-30) в дозе 0,5 мкг на 0,1 мл на лунку, а затем 100 мкл образцов сыворотки (разведение 1:100 в PBS) инкубировали в лунках планшета с 10-мером в двух экземплярах с последующими стадиями способа ELISA антител, описанного выше. Для анализа вакцин В-клеточных эпитопов и связанных с ними точных анализов специфичности антитела павиана, макака и человека против Аβ у иммунизированных реципиентов также предварительно абсорбировали с использованием Аβ₁₋₁₀ пептида (DAEFRHDSGY, SEQ ID NO: 6), модифицированных синтетических пептидов Аβ с заменами на N-конце или постороннего контрольного пептида, а затем исследовали с использованием испытания ELISA с антителом против Аβ₁₋₂₈ для дополнительного подтверждения специфичности.

d. Оценка иммуногенности

Образцы доиммунной и иммунной сыворотки от человека или животных собирали

в соответствии с экспериментальными протоколами вакцинации и нагревали при 56°C в течение 30 минут для инактивации факторов комплемента сыворотки. После введения вакцинных составов получали образцы крови в соответствии с протоколами и оценивали их иммуногенность против конкретного участка(ов)-мишени. Исследовали серийно

5 разбавленные сыворотки и положительные титры выражали в качестве Log_{10} обратного значения разведения. Иммуногенность конкретного вакцинного состава оценивают по его способности индуцировать ответ В-клеточных антител с более высоким титром, направленный против желаемого специфического эпитопа в антигене-мишени при сохранении от низкой до ничтожно малой реактивности антител в отношении "эпитопов 10 Т-хелперных клеток", используемых для обеспечения усиления желаемых В-клеточных ответов.

е. Твердофазный иммуноферментный анализ для обнаружения пептидных антигенов, родственных А β , в крови и спинномозговой жидкости (CSF)

15 Высокочувствительный иммуноанализ А β_{1-40} (Invitrogen™ – BioSource™ Cytokines & Signaling, Camarillo, CA, USA) использовали для определения концентрации А β_{1-40} в сыворотке, плазме и CSF у яванских макаков в соответствии с инструкциями в наборе. Уровни А β_{1-42} находились ниже пределов обнаружения у нормальных макаков. Уровни А β_{1-40} и А β_{1-42} в плазме, CSF и химических экстрактах ткани головного мозга 20 трансгенных мышей hAPP751 определяли в соответствии с инструкциями иммуноанализа А β_{1-40} и А β_{1-42} (The Genetics Company Inc., Zurich-Schlieren, Switzerland). Количественное определение уровней А β_{1-40} в плазме пациентов с болезнью Альцгеймера от мягкой до умеренной определяли в соответствии с инструкциями в наборе (набор для анализа 25 амилоида β (1-40) человека, IBL, 27714). Уровни А β_{1-42} в плазме человека были ниже предела обнаружения.

ПРИМЕР 3

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Нормальные ткани взрослого человека (PhenoPath Laboratories Inc., Seattle, WA, USA) 30 и образцы головного мозга от случаев болезни Альцгеймера (Dr. Felicia Gaskin, University of Virginia, Charlottesville, VA, USA) получали из образцов патологии, полученных после вскрытия и/или хирургической операции. Образцы тканей яванского макака (Beijing Jo-Inn New Drug Research Center, Beijing, China) и образцы головного мозга трансгенных мышей hAPP (JSW-Research GmbH, Graz, Austria) получали при вскрытии. Ткани либо 35 быстро замораживали в жидком азоте, погружали в холодное соединение для заливки ОСТ и нарезали на срезы в замороженном виде, либо их фиксировали в формалине, заливали парафином и срезы получали стандартными методиками.

Непрямой иммунофлуоресцентный анализ криостатных срезов ткани проводили с 40 использованием доиммунной и гипериммунной сыворотки или очищенных IgG из морских свинок, трансгенных мышей hAPP, павианов и макаков или с использованием коммерчески доступных моноклональных антител мыши и конъюгированных с флуорохромом вторичных антител. Непрямое окрашивание иммунопероксидазой с использованием усиленного коммерчески доступного набора с avidinом-биотином проводили на срезах криосохраненных нормальных взрослых тканей с использованием 45 очищенных IgG морской свинки против А β , или на срезах головного мозга от контрольных макаков или макаков, которым вводили вакцину UBI AD (UB-311), с использованием коммерчески доступных моноклональных антител для обнаружения CD3, CD4, CD8 (подгруппы Т-лимфоцитов), CD11b (маркер активации клеток микроглии),

GFAP (астроциты) и конкретных А β -эпитопов. Иммуногистохимические анализы проводили в соответствии со стандартными лабораторными методиками исследования патологии.

ПРИМЕР 4

5 Т-КЛЕТОЧНЫЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ АНАЛИЗЫ В ОТНОШЕНИИ ПРОЛИФЕРАЦИИ ЛИМФОЦИТОВ И ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ

Методики функциональных анализов Т-клеток, включающих пролиферацию лимфоцитов и продукцию цитокинов для оценки активации Т-клеток, подробно описаны ниже.

- 10 а. Выделение, замораживание и размораживание мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC)

Гепаринизированную кровь собирали и PBMC выделяли центрифугированием в градиенте плотности Ficoll-Нураце. После двух промываний фосфатно-солевым буфером (PBS) PBMC ресусPENDИРОвали в среде для культивирования клеток, состоящей из RPMI 15 1640, дополненной 10% эмбриональной телячьей сывороткой (FCS). Для некоторых экспериментов выделенные PBMC замораживали, сохраняли в жидком N₂ и размораживали для последующего культивирования *in vitro*.

- 20 б. Анализ пролиферации Т-клеток и мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC)

25 PBMC от вакцинированных животных культивировали в количестве $2,5 \times 10^6$ клеток/мл в индивидуальных лунках 24-луночного планшета для культивирования (Nunc) в присутствии 10,0 мкг выбранной вакцинной иммуногенной композиции. Также включали отрицательные контрольные культуры, содержащие только PBMC без стимулирующего антигена. Все культуры содержали при 37°C в течение 3 суток в инкубаторе с 5,0% CO₂.

25 Супернатанты собирали через 3 суток после начала культивирования и уровни индивидуальных цитокинов измеряли с использованием количественного анализа, описанного выше.

30 Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) от павианов и от яванских макаков выделяли с использованием центрифугирования в градиенте Ficoll-hураце.

Для индуцируемой пептидом пролиферации и продукции цитокинов клетки (2×10^5 клеток на лунку) культивировали отдельно или с добавлением индивидуальных пептидных доменов (включая A β ₁₋₄₂, A β ₁₋₁₄, A β ₁₅₋₄₂, Th-пептиды и посторонний пептид в качестве отрицательного контроля). В качестве положительного контроля

- 35 использовали митогены (PHA, PWM, Con A). На 6 сутки в каждую из трех реплик лунок планшетов для культивирования клеток добавляли 1 мкКи ³H-тимицина (³H-TdR).

После инкубации в течение 18 часов клетки собирали и определяли включение ³H-TdR. Индекс стимуляции (S.I.) соответствует количеству импульсов в минуту (cpm) в

- 40 присутствии антигена, деленному на cpm в отсутствие антигена; значимым считали S.I. >3,0.

с. Оценка цитокинов, продуцированных культурами PBMC, до и после иммунизации вакциной UBI AD

- Анализы цитокинов (IL-2, IL-6, IL-10, IL-13, TNF- α , IFN- γ) из культур PBMC яванских 45 макаков проводили на аликоватах культуральной среды отдельно или в присутствии различных доменов А β -пептида или митогенов. Для определения концентрации индивидуальных цитокинов использовали специфические наборы для исследования цитокинов обезьяны с помощью сэндвич-ELISA (U-CyTech Biosciences, Utrecht, The

Netherlands).

ПРИМЕР 5

ЖИВОТНЫЕ, ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ В ИССЛЕДОВАНИЯХ БЕЗОПАСНОСТИ, ИММУНОГЕННОСТИ, ТОКСИЧНОСТИ И ЭФФЕКТИВНОСТИ

5 Морские свинки: Исследования иммуногенности проводили у зрелых наивных взрослых самцов и самок морских свинок Duncan-Hartley (масса тела 300-350 г). В экспериментах использовали по меньшей мере 3 морских свинки на группу. Протоколы, вовлекающие морских свинок Duncan-Hartley (в возрасте 8–12 недель; Covance Research Laboratories, Denver, PA, USA) выполняли в соответствии с одобренными методиками

10 IACUC в виварии по контакту, а также в UBI в качестве спонсора.

Павианы анубис: Исследования иммуногенности у взрослых самцов павианов (*Papio anubis*, возраст от 8 до 10 лет; University of Oklahoma Health Sciences Center, Oklahoma City, OK, USA) проводили в соответствии с одобренными методиками IACUC в виварии по контакту, а также в UBI в качестве спонсора.

15 Яванские макаки: Исследования иммуногенности и исследования токсичности с повторяющимися дозами у взрослых самцов и самок обезьян (*Macaca fascicularis*, возраст приблизительно 4 года; Beijing Jo-Inn New Drug Research Center, Beijing, China) проводили в соответствии с одобренными методиками IACUC в виварии по контакту, а также в UBI в качестве спонсора.

20 Трансгенные мыши hAPP751: Исследования иммуногенности и эффективности у молодых трансгенных (*tg+*) мышей hAPP751 и их однопометных животных (возраст 14±2 недель) использовали в модели профилактики болезни Альцгеймера, и пожилых мышей *tg+* и их однопометных животных (возраст 52±2 недели) использовали в терапевтической модели. Оба исследования выполняли в соответствии с одобренными

25 методиками IACUC в виварии по контакту (JSW Research GmbH, Graz, Austria), а также в UBI в качестве спонсора.

tg+ мыши hAPP751 конститутивно сверхэкспрессируют белок-предшественник амилоида человека (hAPP), содержащий мутацию London (V717I) и двойные мутации Swedish (K670M/N671L) под регуляторным контролем промотора Thy-1 мыши

30 (Rockenstein, E, et al., 1995 и 2001). Отложение A β ₁₋₄₂ происходит в возрасте уже 3-4 месяцев с появлением зрелых бляшек в лобной коре, и в возрасте 5-7 месяцев образование бляшек распространяется на гиппокамп, таламус и обонятельную область у *tg+* мышей hAPP751. Эффекты внутримышечных вакцинаций в ходе периода 16 недель наблюдали в отношении антителного ответа с использованием анализа ELISA сыворотки и в

35 отношении отложения амилоида в головном мозге и нагрузки бляшками головного мозга, а также в отношении данных увеличенных уровней клеточной реактивности (например, инфильтрация Т-клеток, активация клеток микроглии) в головном мозге посредством иммунного окрашивания и посредством биохимической экстракции.

40 Перед иммунизацией образцы сыворотки и/или плазмы от индивидуальных животных исследовали в отношении присутствия заданных пептидов A β в соответствии со способами, описанными в этом примере выше. Каждое животное иммунизировали заданными конструкциями пептидов A β на дозу вакцинных составов, в зависимости от вида и протокола.

ПРИМЕР 6

45 ОБЩИЙ ВАКЦИННЫЙ СОСТАВ ДЛЯ ПЕРВОНАЧАЛЬНОГО РАНЖИРОВАНИЯ ИММУНОГЕННОСТИ ПЕПТИДНЫХ КОНСТРУКЦИЙ A β У МОРСКИХ СВИНОК И ПАВИАНОВ

Фармацевтические композиции и вакцины, использованные в каждом

эксперименте, более подробно описаны в разделе "Примеры" ниже. В кратком изложении составы, указанные для каждой из исследуемых групп, как правило, содержали все типы разработанных конструкций А β -пептида с фрагментом А β -пептида, связанным через различные типы спейсеров (например, εК или εК с ККК для повышения

5 растворимости пептидной конструкции) и вариант неспецифических эпитопов Т-хелперных клеток, включающий два набора искусственных эпитопов Т-хелперов, происходящих из слитого белка вируса кори и поверхностного антигена вируса гепатита В с фрагментом(ами) А β -пептида, связанным с N-концом разработанных пептидных конструкций. Более 100 разработанных конструкций пептидов А β первоначально
10 оценивали у морских свинок в отношении их относительной иммуногенности к полноразмерному А β_{1-42} и, кроме того, их перекрестной реактивности в отношении нативных бляшек из срезов головного мозга пациентов с AD. Конструкции пептидов А β приготавливали в эмульсии типа "вода в масле" с Seppic MontanideTM ISA51 в качестве одобренного масла для применения в вакцинах у человека, смешанного с минеральными
15 солями или Alhydrogel (квасцы) при различных количествах пептидных конструкций, как указано. Вакцины обычно получали путем растворения конструкций пептидов А β в воде в концентрации приблизительно 20-800 мкг/мл и составляли с MontanideTM ISA51 в виде эмульсий типа "вода в масле" (1:1 по объему) или с минеральными солями или
20 Alhydrogel (квасцы) (1:1 по объему). Вакциновые составы держали при комнатной температуре в течение приблизительно 30 минут и перемешивали посредством встряхивания в течение приблизительно от 10 до 15 секунд перед иммунизацией.

Некоторых животных иммунизировали посредством 2-3 доз специфического вакцинного состава, который вводили в момент времени 0 (первичная иммунизация) и
25 через 3 недели после первичной иммунизации (wpi) (усиливающая иммунизация), необязательно через 5 или 6 wpi для второй усиливающей иммунизации, внутримышечным путем. Затем этих иммунизированных животных исследовали для оценки иммуногенности различных синтетических иммуногенов пептида А β , присутствующих в вакцинном составе, а также их перекрестной реактивности в
30 отношении А β_{1-28} и полноразмерного А β_{1-42} . Затем иммуногены пептида А β с мощной иммуногенностью при первоначальном скрининге у морских свинок исследовали как в эмульсии типа "вода в масле" с минеральными солями, так и в составах на основе квасцов у павианов, для которых определено, что они имеют сходный профиль иммунного ответа с человеком, для режимов дозирования в ходе определенного периода,
35 определяемого протоколами иммунизации.

Только наиболее перспективных кандидатов для иммуногенных пептидов А β далее тщательно оценивали перед включением в конечные вакциновые составы для исследования иммуногенности, продолжительности, токсичности и эффективности в доклинических исследованиях в соответствии с GLP при подготовке для предоставления
40 заявки Investigational New Drug application и клинических испытаний у пациентов с болезнью Альцгеймера.

ПРИМЕР 7

ОБОСНОВАНИЕ РАЗРАБОТКИ, СКРИНИНГ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ И
45 ОПТИМИЗАЦИЯ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ ВАКЦИННЫХ СОСТАВОВ,
ВКЛЮЧАЮЩИХ ИММУНОГЕННЫЕ КОНСТРУКЦИИ А β_{1-14} -ПЕПТИДА ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ДЕМЕНЦИИ АЛЬЦГЕЙМЕРСКОГО ТИПА

История разработки: Каждая вакцина или иммунотерапевтический продукт требуют их собственной цели разработки и подхода на основе конкретного механизма

заболевания и белка(ов)-мишени, требуемого для вмешательства. Мишени моделирования при разработке могут включать клеточные белки, вовлеченные в каскад заболевания, или инфекционный агент, в который может быть вовлечено несколько белков из патогена. Процесс от исследования до коммерциализации является очень 5 длительным процессом, выполнение которого, как правило, требует одного или нескольких десятилетий.

После выбора молекулы-мишени требуется тщательный процесс серологического подтверждения. Идентификация и определение распределения В-клеточных и Т-клеточных эпитопов в молекуле-мишени является важной для молекулярной разработки 10 вакцины. После выявления мишени В-клеток проводят последующие поисковые исследования иммуногенности у мелких животных для оценки функциональных свойств антител, индуцированных вакцинными составами разработанных пептидов. Затем такое серологическое исследование проводят у животных заданного вида для дальнейшего подтверждения иммуногенности и функциональных свойств 15 индуцированных вакциной антител. Все исследования проводят в нескольких параллельных группах с сыворотками, полученными от иммунизированных реципиентов для оценки. Также проводят ранние исследования иммуногенности у заданного вида или у не являющегося человеком примата в случае вакцин для человека для дальнейшего подтверждения иммуногенности и направления разработки. Затем заданные пептиды 20 приготавливают в различных смесях для оценки тонких различий функциональных свойств, связанных с соответствующими взаимодействиями среди пептидных конструкций при использовании в комбинациях для подготовки к соответствующей разработке состава. После дополнительных оценок устанавливают конечные пептидные конструкции, пептидные композиции и их составы, а также соответствующие физические 25 параметры составов, что приводит к конечному процессу разработки продукта.

Обширный опыт по разработке позволяет разработку вакцинных продуктов следующего поколения открытия до коммерциализации, как показано на фиг.1, ускоренными темпами.

а. Разработка и подтверждение подходящих происходящих из А β ₁₋₁₄пептидных

30 конструкций для вакцинных составов с потенциалом к лечению пациентов с болезнью Альцгеймера

В качестве продолжения предшествующего изобретения, описанного автором настоящего изобретения (Wang CY. патент США № 6906169, United States: United Biomedical Inc.; 2005; Wang CY. патент США № 7951909, United States: United Biomedical Inc.; 2011; Wang CY. патент США № 8232373, United States: United Biomedical Inc.; 2012.), дальнейшее уточнение В-клеточного эпитопа из молекулы А β привело к тому, что А β ₁₋₁₄-пептид, лишенный С-концевого домена последовательности, которая экспрессирует 35 аутологичные эпитопы Т-хелперов, часто присутствующие у пациентов с болезнью Альцгеймера, которые могут вызывать тяжелый побочный эффект, такой как менингоэнцефалит, был выбран в качестве В-клеточного эпитопа-мишени при 40 разработке для включения в вакциновые составы.

Для получения наиболее мощных пептидных конструкций для включения в вакциновые составы, большой набор неспецифических эпитопов Т-хелперов, происходящих из 45 различных патогенов, или искусственных эпитопов Т-хелперов, дополнительно сконструированных из последовательности белка слияния вируса кори (MVF) или белка поверхностного антигена гепатита В (HBsAg), включали в исследования иммуногенности у морских свинок. Репрезентативное исследование 16 происходящих из А β ₁₋₁₄ пептидных

конструкций представлено в таблице 3 (SEQ ID NO: 48, 51-65), где пептид А β ₁₋₁₄ был связан через εК в качестве спейсера с индивидуальными неспецифическими эпитопами Т-хелперов. Пептидные иммуногенные конструкции составляли в эмульсиях типа "вода

5 в масле" MontanideTM ISA51 и исследовали у морских свинок в отношении их соответствующей иммуногенности посредством введения соответствующих вакцинных составов, приготовленных в дозе 100 мкг/0,5 мл в стандартной эмульсии ISA51 для первичной иммунизации через 0 wpi и усиливающей иммунизации через 3 wpi.

10 Предварительный анализ иммуногенности подтвердил присутствие признака структуры Т-клеточного эпитопа на С-конце А β ₁₋₄₂, где делеция пептидной последовательности из аминокислот 15-28 последовательности А β приводила к тому, что последовательность А β ₁₋₁₄ сама по себе становилась неиммуногенной (таблица 4, группы 1-3).

Предварительное ранжирование Т-хелперных эпитопов, использованных для восстановления и усиления иммуногенности пептида А β ₁₋₁₄, в возрастающем порядке

15 представлено в таблице 4, причем сначала приведена наиболее слабая пептидная конструкция: Th Schistosoma mansoni (SEQ ID NO: 56) < 1 Th Clostridium tetani (SEQ ID NO: 48) < Th Bordetella pertussis (SEQ ID NO: 52) < 2 Th Clostridium tetani (SEQ ID NO: 53) < дифтерийный Th (SEQ ID NO: 54) < Th Plasmodium falciparum (SEQ ID NO: 55), причем Th холерного токсина (SEQ ID NO: 57) ранжировался среди искусственных эпитопов

20 Т-хелперов, происходящих из MVF (SEQ ID NO: 51, 58, 59) и HBsAg (SEQ ID NO: 60).

Происходящую из А β ₁₋₁₄ пептидную конструкцию (SEQ ID NO: 51) также можно конструировать в качестве разветвленной тетramerной структуры, как показано в (SEQ ID NO: 61), в качестве мощной пептидной иммуногенной конструкции. В общем, упомянутое выше исследование иммуногенности подтвердило пригодность конкретных 25 происходящих из А β ₁₋₁₄ конструкций (SEQ ID NO: 51, 57-61) в качестве иммуногена для применения для конструирования конечного вакцинного состава для индукции антител, направленных на N-конец полноразмерного А β ₁₋₄₂ пептида - основного биохимического компонента сенильных бляшек у пациентов с AD.

30 b. Расширение охвата МНС с использованием происходящих из А β ₁₋₁₄ конструкций с различными неразборчивыми эпитопами Т-хелперов

При разработке вакцины для лечения пациентов с разнообразным генетическим фоном важно осуществление разработки для охвата максимальной популяции с разнообразным генетическим фондом. Таким образом, был исследован синергичный

35 эффект иммуногенности таких комбинаций происходящих из А β ₁₋₁₄ пептидных иммуногенных конструкций. Поскольку неразборчивые эпитопы Т-хелперов,

происходящие из MVF и HBsAg, находятся среди наиболее мощных эпитопов для обеспечения такого усиления иммуногенности, то разрабатывали комбинацию пептидных конструкций, содержащих два этих эпитопа Т-хелперов для такого

40 исследования. Формы комбинаторных библиотек эпитопов Т-хелперов как для MVF, так и для HBsAg (SEQ ID NO: 44 и 45), конструировали, как показано в таблице 2, учитывая максимальный охват связывающего мотива МНС, в виде происходящих из А β ₁₋₁₄ конструкций (SEQ ID NO: 62 и 63) и их, индивидуально или в комбинации,

45 оценивали в отношении иммуногенности у морских свинок после схемы первичной иммунизации (0 wpi) и двух усиливающих иммунизаций (3 и 5 wpi) в количестве 100 мкг/0,5 мл на дозу. Как показано в таблице 5, смесь двух иммуногенов в равном соотношении по массе индуцировала значительный иммунный ответ по сравнению с иммунным ответом, индуцируемым соответствующими индивидуальными пептидными

конструкциями.

с. Разработка простого иммуногена, включающего заданный В-клеточный эпитоп, связанный с тщательно отобранными эпипотапами Т-хелперов с множеством связывающих мотивов МНС индуцирует сфокусированный и однородный иммунный ответ, нацеленный

5 только на В-клеточный эпипотоп

Гипериммунные сыворотки через 8 недель после первоначальной иммунизации (wpi) собирали от иммунизированных реципиентов для исследования с соответствующими эпипотапами Т-хелперов, использованными для усиления иммуногенности В-клеточных эпипотапов. Гипериммунные сыворотки получали от сходных иммунизированных

10 реципиентов, которым проводили сходную схему первичной иммунизации и усиливающей иммунизации связанным с KLH пептидом A β ₁₋₁₄, который получали

посредством химического связывания с присоединенным остатком цистеина на N-конце пептида A β ₁₋₁₄. Как можно видеть из таблицы 6, у всех хозяев, иммунизированных

15 разработанными иммуногенными конструкциями A β ₁₋₁₄-пептида (SEQ ID NO: 62 и 63) либо отдельно, либо в комбинации, индуцировались желаемые высокие титры антител

против A β ₁₋₁₄ с перекрестной реактивностью в отношении A β ₁₋₄₂, являющегося

мишенью, в то время как незначительная перекрестная реактивность индуцировалась

против двух эпипотапов Т-хелперов (SEQ ID NO: 44 и 45), или она не индуцировалась. В

20 противоположность этому, несмотря на относительную иммуногенность, индуцируемую общепринятым белком-носителем KLH, в отношении эпипотапа A β ₁₋₁₄ (титры Log₁₀ от 2,2 до 3,9), очень высокий антителный ответ, направленный на белок-носитель KLH,

индуцировался у всех животных, причем очень высокие титры (GeoMean для титра Log₁₀ 6,2), вновь подтверждали наблюдение, что уникальный "фокусированный" ответ,

25 направленный на "заданный В-клеточный эпипотап" был исходом иммунизации этими рационально разработанными пептидными иммуногенными конструкциями на основе понимания структуры и функции В-клеточных и Т-клеточных эпипотапов.

d. Оценка иммуногенности у павианов после первичной иммунизации (0 wpi) и

30 усиливающих иммунизаций (3 и 6 wpi) вакцинными составами, содержащими различные количества конструкций A β ₁₋₁₄ (SEQ ID NO: 62 и 63) в эмульсии типа "вода в маслсе"

ISA 51 и в квасцах

Перед дальнейшим продвижением работы по разработке для исследования функциональных свойств антител, индуцируемых этими иммуногенными конструкциями

35 A β ₁₋₁₄-пептида, проводили оценку относительной иммуногенности вакцинных составов, включающих эти пептидные конструкции (SEQ ID NO: 62 и 63 в эквимолярном соотношении) в различных количествах в двух различных составах, наиболее часто используемых в исследовании у человека, у павианов - вида животных, которые индуцируют иммунные ответы, наиболее сходные по масштабу с иммунными ответами у человека. Все вакцинные составы вводили животным в количестве 0,5 мл на дозу.

40 Первоначальная заданная доза для дальнейшего применения составляла 100 мкг/мл, таким образом, эту дозу вводили трем животным. Также проводили оценку относительной иммуногенности между более мощным составом типа "вода в масле"

ISA51 против более слабого, но, тем не менее, наиболее часто используемого адьюванта

45 - квасцов, в одинаковой дозе 100 мкг. В случае исследуемой системы эмульсии типа "вода в масле" проводили оценку увеличения дозы, используя 25 мкг, 100 мкг и 400 мкг на дозу. Первым наблюдением этого исследования были сниженные иммунные ответы

(более чем на один Log₁₀ в титрах антител), индуцированные составом на основе квасцов

по сравнению с составом эмульсии типа "вода в масле" ISA с одинаковым содержанием пептидного иммуногена, вводимого в количестве 100 мкг в 0,5 мл на дозу. Хотя первоначально заданным количеством для последующего введения вакцинного состава иммунизированным реципиентам было 100 мкг на дозу, наблюдали увеличение

5 иммунного ответа при увеличении дозирования от 25 мкг, до 100 мкг, до 400 мкг, соответственно как показано в таблице 7. Таким образом, для разработанных иммуногенных конструкций А β ₁₋₁₄-пептида (SEQ ID NO: 62 и 63) или пептидных иммуногенных конструкций их аналогов дополнительно будут исследовать дозы выше 100 мкг.

10 ПРИМЕР 8

КРИТЕРИИ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ УСПЕШНОЙ ИММУНОТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ДЕМЕНЦИИ АЛЬЦГЕЙМЕРСКОГО ТИПА

Стратегия UBI для разработки иммунотерапевтической вакцины включает разработку собственных Th-эпитопов, связанных с заданной последовательностью В-клеточного эпитопа на основе технологии для преодоления "собственного" барьера и ограничений вследствие генетического разнообразия, и для разработки оптимального вакцинного состава на основе пептидов, который является безопасным, уникальным, поддающимся охарактеризации, экономичным, эффективным, стабильным и масштабируемым (сокращенно обозначаемый SUCCESS) (Wang CY, et al., 2005; Sokoll KK, 2004). Особое внимание было уделено первоначальной фазе конструирования, чтобы обеспечить возможность охарактеризации выбранных пептидных иммуногенов, которые будут включены в фазу разработки программы создания вакцинного состава, с точки зрения одобрения регулирующим учреждением, поскольку эта вакцина, после того, как будет показано, что она является эффективной у пациентов после испытания фазы III, может быть первой вакциной полностью на основе синтетических пептидов, когда-либо вводимой пациентам на основе многомилионных доз в истории человечества. Особое внимание при разработке качестве пептидов, выбранных из множества пептидов, для которых уже показано, что они приводят к значительным желаемым иммунным ответам, было уделено "растворимости" индивидуальных используемых пептидов, выходу химии синтеза и препятствиям при очистке, присущим разработке последовательностей, когда дело доходит до мельчайших деталей. Общепризнанный адьювант с высоким коэффициентом безопасности также является важным учитываемым фактором, среди многих приемлемых возможностей для выбора. Необходимо учитывать равновесие между коэффициентом безопасности и масштабом иммуногенности. Таким образом, когда иммуногенность снижается вследствие коэффициента безопасности, необходимо учесть, какие другие признаки вакцинного состава могут быть включены для дальнейшего повышения иммунного ответа. Вновь, в основе успеха вакцины лежит ее способность индуцировать желаемый иммунный ответ в настолько крупной и широкой популяции с разнообразным генетическим фоном, насколько это возможно, таким образом, также очень важным учитываемым фактором является широкий охват главного комплекса гистосовместимости (MHC).

Ввиду вышеуказанных соображений, для достижения вакцины SUCCESS, нацеленной на N-конец молекулы А β , будут выбраны пептиды с одной последовательностью вместо комбинаторной формы, несмотря на их относительно более слабую иммуногенность по сравнению с их аналогами в формате комбинаторной библиотеки. Растворимость пептидов также является ключевым фактором для исследования, поскольку более высокомощные усиливающие иммуногенность эпитопы Т-хелперов обычно содержат длинный участок гидрофобных аминокислотных остатков, что, таким образом, приводит

к тому, что соответствующие пептиды становятся нерастворимыми. Особое внимание следует уделять тому, будут ли высокозаряженные остатки, такие как Asp, Glu, Lys и Arg, добавлены в конкретные положения для повышения растворимости пептида. Для достижения высокого выхода при синтезе, химические реакции, вовлеченные во все 5 синтетические процессы, а также полученные промежуточные соединения, тщательно исследовали для получения оптимальных последовательностей конечного пептида, который будет принят в качестве ключевого ингредиента вакцинного состава. После сбалансированного рассмотрения всех высококачественных пептидных кандидатов с точки зрения аспектов иммуногенности, было выбрано две иммуногенных конструкции 10 А β ₁₋₁₄-пептида (SEQ ID NO: 64 и 65), причем пептид с SEQ ID NO: 64 происходит из серии MVF и пептид с SEQ ID NO: 65 происходит из серии HBsAg, и их далее анализировали для дальнейшего исследования в вакцинных составах.

Эти пептиды синтезировали и очищали до высокой частоты, как показано на фиг.2А, 2В, 2Е. Профили ВЭЖХ в отношении обоих пептидов из SEQ ID NO: 65 и 64 в 15 обращенно-фазовом анализе с пологим градиентом продемонстрировали время элюирования 20 и 21 минуту, соответственно. Анализ MALDI-TOF этих очищенных пептидов дал молекулярную массу 3892,274 (с теоретической величиной 3892,52) для пептида с SEQ ID NO: 65 и 4374,568 (с теоретической величиной 4374,04) для пептида SEQ ID NO: 64, оба с высокой точностью, как показано на фиг.2С и 2D.

Оба пептида "Th" SEQ ID NO: 46 и 47, использованных для усиления иммуногенности А β ₁₋₁₄, тщательно оценивали в отношении их мотивов связывания в различных 20 популяциях, как показано на фиг.3А и 3В. Включение двух неспецифических эпитопов Т-хелперов в конструкцию вакцины для обеспечения максимального охвата генетического фона всех пациентов является безопасным. Из проанализированного 25 процентного охвата, эта вакцина будет иметь очень обоснованную вероятность охвата большой популяции, или даже всей популяции, пациентов, которым вводят вакцину, что является важным фактором для обоснования тщательных усилий к исследованию и разработке, распространяющихся на вакцину высокой клинической ценности.

Чтобы сконструированная вакцина могла быть использована в большой популяции, 30 в случае которой также целью введения является профилактика, безопасность становится другим важным учитываемым фактором. Несмотря на применение эмульсий типа "вода в масле" у человека для многих вакцинных составов в клинических испытаниях, квасцы остаются основным адъювантом для применения в вакцинных составах вследствие 35 десятилетий безопасного тестирования. Квасцы или их минеральные соли Adjuphos (фосфат алюминия) рассматривали для применения в качестве адъювантов для получения для клинических применений.

а. Оценка иммуногенности у морских свинок после первичной иммунизации (0 wpi) и усиливающих иммунизаций (3 и 5 wpi) вакцинными составами, содержащими различные 40 количества высокоочищенных иммуногенных конструкций А β ₁₋₁₄-пептида (SEQ ID NO: 64 и 65) с фиксированным количеством минеральных солей

После выбора двух высокоочищенных иммуногенных конструкций А β ₁₋₁₄-пептида (SEQ ID NO: 64 и 65) из многих иммуногенных кандидатов для разработки вакцины UBI AD для доклинических и клинических испытаний смесь этих двух пептидов в 45 эквимолярном соотношении исследовали в отношении ее иммуногенности в присутствии фиксированного количества (0,5 мл) квасцов/минеральных солей в исследовании дозирования у морских свинок, как показано на фиг.4. Различные количества пептидной смеси, содержащей упомянутые выше две иммуногенных конструкции А β ₁₋₁₄ пептида

(SEQ ID NO: 64 и 65) от 0 мкг, 10 мкг, 30 мкг, 100 мкг до 300 мкг в 0,5 мл минеральных солей (фосфат алюминия, Adjuphos) исследовали у морских свинок на основе схемы иммунизации 0, 3 и 5 wpi (недели после первоначальной иммунизации) с наблюдением иммуногенности в течение периода 26 недель. На пике иммунного ответа, который

5 произошел приблизительно через 5 недель после первоначальной иммунизации, животные, которым вводили 300 мкг на дозу, имели наиболее высокий иммунный ответ, после которых следовали животные, которым вводили дозу 100 мкг и 30 мкг, а затем дозу 10 мкг со сходным ранжированием иммунного ответа на протяжении периода 26 недель, в ходе которого проводили наблюдение. Таким образом, наиболее высокая

10 доза 300 мкг на 0,5 мл Adjuphos считается оптимальным условием иммунизации и будет использована в качестве ориентира для исследования иммуногенности в других родственных составах в различных видах.

15 б. Средства для дальнейшего повышения иммуногенности вакцинных составов посредством образования иммуностимулирующих комплексов (ISC) между пептидами и олигонуклеотидами

20 Имманентным признаком квасцов или ассоциированных с ними минеральных солей в качестве адьюванта является то, что иммуногенность ассоциированного с ними вакцинного состава также будет снижена приблизительно на один Log₁₀ в титре в отношении его целевых В-клеточных эпитопов Aβ₁₋₁₄ (согласно оценке в сходном исследовании в примере 7). Таким образом, исследуют средства для дальнейшего повышения иммуногенности вакцинного состава.

25 Более конкретно, в составе UBI, как показано на фиг.5А, стабилизированный иммуностимулирующий комплекс (ISC) образован катионными пептидами и полианионной CpG-олигодезоксинуклеотидной (ODN) молекулой (верхняя панель) (Sokoll KK, 2004). Он представляет собой самостоятельно собирающуюся систему, запускаемую посредством электростатической нейтрализации заряда. Стхиометрия молярного соотношения зарядов катионного пептида и анионного олигомера определяет степень ассоциации. Нековалентная электростатическая ассоциация пептидных иммуногенов и CpG ODN является полностью воспроизводимым процессом. Агрегаты пептид/иммуностимулирующий комплекс CpG ODN способствуют презентации "профессиональным" антигенпресенирующим клеткам (APC) иммунной системы, таким образом, далее усиливая иммуногенность комплексов. Эти комплексы легко характеризовывать для контроля качества в процессе производства. ISC пептид/CpG хорошо переносится *in vivo*.

35 Затем иммуностимулирующие комплексы можно комбинировать с адьювантом минеральная соль/соль алюминия, формирующим водную суспензию, как показано на нижней панели фиг.5В.

40 Мотивы CpG охарактеризованы в качестве агонистов Toll-подобного рецептора 9 (TLR9), встречающегося на подгруппе дендритных клеток (pDC) и В-клеток. Toll-подобные рецепторы обладают способностью распознавать четкие молекулярные паттерны, характерные для распространенных чужеродных вторгающихся в организм агентов, таких как бактерии, вирусы и паразиты. В частности, неметилированные синтетические последовательности CpG способны связывать и активировать TLR9. В качестве мощных В-клеточных митогенов, агонисты TLR9 являются эффективными в отношении индукции мощных антителных иммунных ответов. Механизм действия CpG вовлекает, в том числе, развитие антителенных антител длительного действия.

Ввиду клинического испытания пептидной вакцины AN1792 А β ₁₋₄₂, которое оказалось неуспешным как в отношении иммуногенности, индуцируя только у 30% пациентов антитела, направленные против заданной агрегированной вакцины против А β ₁₋₄₂, так и в том отношении, что оно привело к 6% пациентов с подобными менингоэнцефалиту побочными эффектами, адьюванты на основе алюминия, используемые в рамках настоящего изобретения для вакцины UBI AD, известны тем, что они стимулируют иммунные ответы типа Th-2 (т.е. цитокины IL-4 и IL-5). Кроме того, иммуностимулирующие комплексы иммуногенной конструкции А β -пептида/CpG ODN имеют форму частиц. Процессинг иммуногенов в форме частиц облегчается посредством APC, которые имеют тенденцию к ответу типа Th-2.

В общем, CpG-олигонуклеотиды безопасно использовали в нескольких клинических испытаниях у человека (>1000 пациентов). Происходящие из пептида/CpG ODN иммуностимулирующие комплексы легко охарактеризовывать. Было показано, что стабильные в физиологических условиях и хорошо переносимые *in vivo* комплексы на основе CpG, происходящие из различных пептидных иммуногенов, отдельно или в комбинации с минеральными солями, являются эффективными у мышей, морских свинок, свиней, собак, крупного рогатого скота, павианов и макаков с минимальными сообщенными неблагоприятными явлениями. Минеральные соли на основе алюминия являются единственными адьювантами, включенными в настоящее время лицензированные вакцины в США. Вакцинные композиции с использованием этих адьювантов являются экономичными и известно, что они эффективно масштабируются. Лицензированы конкретные вакциновые/адьювантовые составы относительно адьюванта отдельно. UBI исследовали и разработали уникальные композиции. Описанные выше признаки вакцины UBI AD для лечения деменции, имеют все элементы, требуемые, чтобы она представляла собой вакцину SUCCESS.

ПРИМЕР 9

СОСТАВЛЕНИЕ ВАКЦИНЫ UBI AD ДЛЯ ВНУТРИМЫШЕЧНОЙ ИНЬЕКЦИИ

Пептидная иммуногенная конструкция А β ₁₋₁₄-εK-KKK-MvF5 Th (SEQ ID NO: 64) и

30 пептидная иммуногенная конструкция А β ₁₋₁₄-εK-HBsAg3 Th (SEQ ID NO: 65) являются катионными при физиологических значениях pH. На фиг.2A, 2B, 2C (слева) проиллюстрированы профили ВЭЖХ для двух пептидов отдельно и в смеси с эквимолярным соотношением. На фиг.2D и 2E (справа) проиллюстрированы профили, охарактеризованные с использованием масс-спектрометрии MALDI-TOF, для двух 35 пептидов с молекулярной массой (Да) 3892 и 4374, соответственно. Добавление полианионного CpG ODN приводит к нейтрализации заряда и немедленной "самосборке" иммуностимулирующих комплексов (ISC) в растворе. Стехиометрия молярных соотношений зарядов катионный пептид: анионный CpG определяет степень ассоциации. Вакцину UBI AD получали поэтапно: ISC приготавливали в воде для инъекций с 40 эквимолярной смесью двух иммуногенных конструкций А β -пептида с приблизительно равным молярным соотношением заряда с CpG ODN.

а. Оценка иммуногенности в течение периода 10 недель у павианов после первичной иммунизации (0 wpi) и после усиливающих иммунизаций (3 и 6 wpi) вакциновыми составами, содержащими 300 мкг/0,5 мл высокоочищенных иммуногенных конструкций 45 А β ₁₋₁₄ пептида (SEQ ID NO: 64 и 65), образующих иммуностимулирующие комплексы с CpG-олигомерами в отсутствие или в присутствие квасцов или adjuphos в качестве адьюванта

Исходя из первого исследования уровня иммуногенности и дозирования у морских

свинок с использованием высокоочищенных иммуногенных конструкций А β ₁₋₁₄ пептида (SEQ ID NO: 64 и 65), смесь 300 мкг, содержащую две иммуногенные конструкции А β ₁₋₁₄ пептида (SEQ ID NO: 64 и 65) в эквимолярном соотношении, получали в качестве иммуностимулирующих комплексов с CpG-олигомерами, как описано выше. Затем их составляли либо с квасцами, либо с adjuphos, или без адьюванта, для иммунизации павианов в количестве 300 мкг пептида на дозу для внутримышечной инъекции, исходя из протокола иммунизации на 0, 3, 6 неделях с уровнями специфических антител, наблюдаемыми в ходе периода 10 недель. Павианов использовали для такой оценки иммуногенности и оценки конечного состава перед переходом к испытаниям у человека, поскольку это вид животных индуцирует иммунные ответы, масштаб которых наиболее схож с масштабом иммунных ответов у человека. Все вакцинныесоставы вводили животным в количестве 0,5 мл на дозу и двум животным на группу. Как показано на фиг.6, при количестве 300 мкг в 0,5 мл на дозу все три состава в присутствии или в отсутствие квасцов или adjuphos в качестве адьюванта, продемонстрировали иммуногенность, находящуюся приблизительно на одном и том же уровне в пределах 0,5 Log₁₀ по масштабу, как продемонстрировано с помощью ELISA в отношении пептида А β ₁₋₁₄. Состав ISC значительно усиливал иммуногенность, которую проявлял пептид отдельно. Однако после наблюдения в течение периода от 8 до 10 недель, состав на основе Adjuphos сохранял значительно более высокий иммунный ответ по сравнению с другими двумя группами, с увеличением от 0,5 до 1 Log₁₀ в масштабе ответа (т.е., приблизительно в 3-10 раз более мощный). Посредством этой тщательной калибровки иммуногенности у павианов с использованием высоко сходных составов, разработанных так, чтобы они имели высокий коэффициент безопасности, с использованием

высокоочищенных рационально разработанных пептидов, индуцирующих в высокой степени сфокусированные и желаемые иммунные ответы без каких-либо усложняющих факторов вследствие адьюванта, вакцинный состав UBI AD был окончательно получен для дальнейшего исследования у приматов и человека в отношении иммуногенности, специфичности, функциональных свойств, связанных с индуцированными антителами, острой и хронической токсичности и, наконец, клинической эффективности, как проиллюстрировано в следующих примерах.

б. Получение вакцинного состава UBI AD для исследования иммуногенности, острой токсичности, хронической токсичности, эффективности и клинической безопасности, переносимости и эффективности.

ISC приготавливали в воде для инъекций с эквимолярной смесью двух иммуногенных конструкций А β -пептида (SEQ ID NO: 64 и 65), которую далее смешивали с CpG в приблизительно равном молярном соотношении заряда пептидов и CpG ODN. CpG ODN в вакцинных составах UBI AD на 100% связываются с пептидными иммуногенными конструкциями в процессе, опосредуемом электростатической нейтрализацией противоположных зарядов, что приводит к образованию частиц микрометрового размера. Форма частиц обеспечивает значительно сниженную дозировку CpG ODN относительно общепринятого применения CpG-адьювантов, она обладает меньшим потенциалом к неблагоприятным ответам врожденного иммунитета, и способствует альтернативным каскадам процессинга иммуногенов, включающим профессиональные антигенпредставляющие клетки (APC). К предварительно образованным ISC последовательно добавляли минеральную соль алюминия, солевой раствор для обеспечения тоничности и консервант. Среди солей алюминия использовали фосфат алюминия вместо геля на основе квасцов, исходя из результатов исследования

иммуногенности у павиана, для лучшего поддержания иммуногенности.

с. Исследование стабильности и иммуногенности вакцинного состава UBI AD

Вакцинный состав UBI AD, приготовленный в количестве 300 мкг в 0,5 мл на дозу с фосфатом алюминия (Adjuphos) в качестве адьюванта в избытке 20%, получали, как описано выше, и им заполняли 1-мл стерильный стеклянный флакон и хранили при 2-8°C в течение 2 лет. Образцы извлекали в соответствии с протоколом испытания стабильности. Все физические параметры удовлетворяли нормам контроля качества (QC). Иммуногенные конструкции Аβ₁₋₁₄-пептида подвергали декомплексации от CpG-олигодезоксинуклеотида (ODN) и адьюванта adjuphos и анализировали с использованием ВЭЖХ в соответствии с аналитическими нормами для каждого пептида. Как показано в наиболее нижней панели слева на фиг.2С две иммуногенных конструкции Аβ₁₋₁₄-пептида (SEQ ID NO: 64 и 65) продемонстрировали эквимолярную смесь двух соответствующих пептидов с ожидаемым временем элюирования при анализе ВЭЖХ.

Флаконы, содержащие вакцинный состав UBI AD, извлекали для исследования иммуногенности у морских свинок. Исследовали две группы, каждая из которых имела по шесть животных, причем одна из них представляла собой группу вакцины, где вводили 300 мкг на дозу на 0 и 3 wpi, в то время как в другой группе вводили вакцинный состав плацебо (т.е. тот же состав без двух пептидных иммуногенных конструкций). Как показано на фиг.7, значительной иммуногенности достигали у всех животных при однократном введении, достигая пика ответа через 5 wpi после усиливающей иммунизации на 3 wpi. Иммунные сыворотки, взятые через 8 wpi, далее исследовали в отношении их реактивности к соответствующим пептидам Th, использованным для обеспечения усиления иммуногенности. Как показано в таблице 8, небольшая реактивность, или даже отсутствие реактивности, была направлена на пептиды Th, далее подтверждая "иммунную молчащую" природу этих двух пептидов Th, таким образом, обеспечивая в высокой степени сфокусированный иммунный ответ, направленный исключительно на N-конец Аβ-пептида. Таким образом, вакцинный состав UBI AD состоит из четко определенных химических реагентов, в отличие от исторической вакцинной промышленности, связанной исключительно с не являющимися хорошо охарактеризованными биологическими материалами, индуцируя сфокусированный иммунный ответ в соответствии с разработкой, и является более широко реактивным, чем моноклональные антитела и, таким образом, более эффективным, и, тем не менее, значительно более чистым, чем общепринятый конъюгированный тип вакцин пептид-носитель, таким образом, обеспечивая высокий коэффициент безопасности.

ПРИМЕР 10

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ОКРАШИВАНИЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА С БОЛЕЗНЬЮ АЛЬЦГЕЙМЕРА ДЛЯ ОЦЕНКИ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ ВАКЦИНЫ UBI AD

Гипериммунные сыворотки от павианов групп 3 и 4, иммунизированных иммуногенными конструкциями Аβ-пептидов (SEQ ID NO: 62 и 63) в эквимолярном соотношении, описанном в примере 7, объединяли с фракцией IgG, очищенной и исследованной в отношении их реактивности к головному мозгу человека с AD. Как показано на фиг.8, окрашивание, как церебральных сосудов, так и амилоидных бляшек, обнаруживалось в случае очищенного IgG из гипериммунных сывороток, но не из аналогичных фракций IgG из доиммунных сывороток. Предварительная инкубация иммунных сывороток с Аβ₁₋₁₄ пептидом поглощала всю иммунореактивность в

отношении как церебральных сосудов, так и амилоидных бляшек, но не поглощала в случае постороннего пептида, что демонстрирует высокую специфичность реактивности антитела против А β в иммунных сыворотках посредством вакцинации вакцинным составом, содержащим иммуногенные конструкции А β -пептидов (SEQ ID NO: 62 и 63).

5 Другое иммуногистопатологическое исследование с использованием IgG доиммунных и гипериммунных морских свинок проводили на криостатных срезах нормальных тканей взрослого человека для мониторинга специфичности и нежелательной аутореактивности антител. Панель тканей человека (N=32) подвергали скринингу в отношении иммунореактивности с использованием очищенного IgG против А β ₁₋₁₄ от 10 морских свинок, иммунизированных иммунотерапевтической вакциной UBI AD, и сравнивали с доиммунным очищенным IgG из тех же животных. Профили иммунного окрашивания, наблюдаемые на срезах нормальных взрослых тканей, исследовал сертифицированный клинический патолог в PhenoPath Laboratories. За исключением слабой иммунной реактивности некоторых мышечных тканей (например, эндометрий), 15 все исследованные ткани взрослого человека были отрицательными, в отличие от сильной положительной реактивности в отношении сенильных бляшек в одном из трех образцов взрослого головного мозга и положительного иммунного окрашивания церебральной жидкости в образцах спинного мозга.

ПРИМЕР 11

20 ИССЛЕДОВАНИЯ ИММУНОГЕННОСТИ ПРОТОТИПНЫХ ВАКЦИННЫХ СОСТАВОВ UBI AD У ВЗРОСЛЫХ ПАВИАНОВ

В части А протокола четырех взрослых самцов павианов иммунизировали на 0, 3 и 6 неделях иммуногенами А β ₁₋₁₄ пептида (общее количества пептида на дозу 300 мкг) в комплексе с запатентованными иммуностимулирующими комплексами (ISC) и 25 составленными с адьювантами на основе минеральных солей алюминия. Составы ISC/минеральная соль приводили к выраженным ответам антител против А β у всех животных (фиг.9А). Не было отмечено неблагоприятных реакций области инъекции.

Целями части В протокола были: (1) мониторинг безопасности и реактогенности участка инъекции при повторяющемся воздействии при заданной клинической дозе и 30 при в четыре раза более высокой дозе, (2) мониторинг иммуногенности в исследовании с увеличением дозы и (3) оценка кинетики ответа антител на сенсибилизирующий антиген. Затем этих животных содержали в покое в течение 72 недель. За этот промежуток времени сывороточные уровни антител против А β снижались в 10–100 раз. Через 78 и 81 неделю после первоначальной инъекции (фиг.9В) четырем животным 35 вводили вакцины либо в дозах 300 мкг пептида животным номер 564 и 565, либо в дозах 1200 мкг животным номер 556 и 561. Ответы на сенсибилизирующий антиген быстро восстанавливали пик титров антител у всех четырех павианов. К 104 неделе титры антител начали снижаться и у животных вновь восстанавливались пики титров 40 посредством усиливающих доз на 104 неделе. Кинетику сывороточных ответов антител против А β определяли на 0, 2, 5, 6, 8, 10, 78, 81, 84, 88, 92, 96, 100, 104, 107 и 111 неделе посредством ELISA для антител против А β ₁₋₂₈-пептида. Не наблюдали реакций области инъекции у животных, которым вводили дозу 300 мкг. Однако некоторое покраснение и воспаление отмечали в областях инъекции у павианов, которым вводили высокую 45 дозу (1200 мкг) только на 78 неделе; эта временная реакция полностью устранилась в пределах одной недели. Не сообщалось о каких-либо неблагоприятных явлениях или проблемах безопасности на протяжении 2 лет, в течение которых оценивали павианов.

ПРИМЕР 12

АНАЛИЗ НЕЙРОТОКСИЧНОСТИ IN VITRO ДЛЯ ИНГИБИРОВАНИЯ ФИБРИЛЛОГЕНЕЗА И ЗАЩИТЫ ОТ ОПОСРЕДУЕМОЙ А β ₁₋₄₀ ТОКСИЧНОСТИ ПОСРЕДСТВОМ АНТИТЕЛА ПРОТИВ А β

В анализаах нейротоксичности использовали клеточную линию феохромацитомы крысы PC-12 и выдержаные растворы пептида А β ₁₋₄₀, как ранее описано Solomon B, et al. (Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94:4109-4112). Пептидный раствор охарактеризовывали в отношении образования фибрилл по связыванию конго красного. На 6 и 9 сутки раствор связывал эквивалентные количества красителя, как показано по поглощению при A₅₄₀ нм. Это наблюдение обеспечило доказательства образования токсических агрегатов А β ₁₋₄₀; препарат на 9 сутки исследовали на токсичность в отношении клеток PC-12.

Клетки PC-12 выращивали в культуре тканей, и суспензировали в среде для анализа, и помещали в лунки 96-луночных круглодонных планшетов для культивирования тканей, 5×10³ клеток/лунка в 100 мкл. Токсичность инкубированного при 37°C пептида (т.е. агрегированный А β ₁₋₄₀) и свежеполученного пептида (т.е. неагрегированного) исследовали при 25 и 6,5 мкМ в двух экземплярах. Контроли представляли собой клетки PC-12 только со средой для анализа. Планшеты инкубировали в течение 48 часов при 37°C в инкубаторе с CO₂. Токсичность в отношении клеток определяли с использованием анализа цитотоксичности Promega CytoTox 96®. Лизис определяли по поглощению при A₄₉₂ нм и результаты представлены в качестве процента цитотоксичности по сравнению с лизисом 100%.

Оценка in vitro вакцины UBI AD в отношении функциональной иммуногенности

Анализ нейротоксичности с использованием клеточной линии феохромацитомы крысы PC-12 и выдержанных растворов пептида А β ₁₋₄₀, охарактеризованных как являющиеся токсичными, использовали для оценки функциональной эффективности антителенного ответа на вакцину UBI AD. Выдержанный раствор А β ₁₋₄₀-пептида исследовали в отношении токсичности на клетках PC-12 после предварительной инкубации в течение одного часа в присутствии сыворотки против А β морской свинки или павиана из протоколов иммунизации животных. Сыворотки против А β исследовали в разведениях 1:30 и 1:90. Конечные результаты были представлены в качестве процентного ингибирования агрегации фибрилл А β ₁₋₄₀ и процентной защиты клеток PC-12 от опосредуемой фибриллами А β ₁₋₄₀ цитотоксичности. Доиммунные сыворотки, полученные на 0 неделе обоих экспериментов по иммунизации, включали в качестве контролей. Иммунные сыворотки морских свинок и павианов, полученные на 5 и 8 неделях, в разведениях как 1:30, так и 1:90, обеспечили значительное ингибирование (50-70% для сывороток морских свинок в случае образцов крови, взятых как через 5, так и через 8 недель, в разведениях как 1:30, так и 1:90) по сравнению с фоновым ингибированием от 5 до 10% для доиммунных сывороток в соответствующих разведениях; и (75 и 50% для сывороток павиана в случае образцов крови, полученных как через 5, так и через 8 недель, в разведениях 1:30 и 1:90, соответственно) по сравнению с 15% фоновым ингибированием для доиммунной сыворотки павиана в анализе ингибирования фибриллогенеза. Аналогично, для этих условий была обнаружена защита клеток PC-12 от опосредуемой А β ₁₋₄₀ токсичности в диапазоне от 60 до 80% по сравнению с фоновыми результатами, полученными для доиммунных сывороток, как от морских свинок, так и от павианов. Эти результаты определяют функциональную

нейтрализующую активность против токсического А β_{1-40} пептида у антител, индуцированных иммунизацией пептидными иммуногенами амилоида- β UBITh®.

ПРИМЕР 13

ЭФФЕКТЫ ВАКЦИНЫ UBI AD В ПРОФИЛАКТИЧЕСКОМ РЕЖИМЕ НА МОРФОЛОГИЮ ГОЛОВНОГО МОЗГА И КОНЦЕНТРАЦИЮ ПЕПТИДА АМИЛОИДА- β (А β_{1-42}) В ОБРАЗЦАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА МОЛОДЫХ ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ, СВЕРХЭКСПРЕССИРУЮЩИХ hAPP751

Авторы настоящего изобретения оценивали эффекты вакцины UBI AD в профилактическом режиме на морфологию головного мозга и концентрацию пептида амилоида- β (А β_{1-42}) в образцах головного мозга молодых трансгенных (tg+) мышей, сверхэкспрессирующих hAPP751 с мутациями Swedish и London, и их нетрансгенных (ntg) однопометных животных (Rockenstein EM, et al., 1995 и 2001).

Молодых трансгенных (tg+) мышей иммунизировали вакциной UBI AD в возрасте ~14 недель в профилактическом режиме. Когда ткани головного мозга имmunогистохимически окрашивали антителами против А β_{1-42} для определения амилоидных бляшек, результаты для этих отвечающих молодых tg+ мышей показали, что нагрузка бляшками снижалась. Когда ткани головного мозга вакцинированных молодых tg+ мышей биохимически экстрагировали и оценивали в отношении уровней А β_{1-42} с использованием количественного анализа, результаты для молодых отвечающих tg+ мышей показали снижение отложения А β . Оба из этих параметров указывают на то, что снижение нагрузки А β_{1-42} коррелирует с антителным ответом на вакцину UBI AD.

Кроме того, определение процентной относительной активации клеток микроглии с использованием антитела против CD11b и Т-клеточной инфильтрации с использованием антитела против CD3 не обеспечило доказательств увеличенной активации иммунных клеток в головном мозге молодых tg+ животных, которым вводили вакцину AD, по сравнению с tg+ контрольными животными без введения.

a. Общая цель:

Оценить эффекты внутримышечных вакцинаций в течение периода от 12 до 16 недель посредством иммунотерапевтической вакцины UBI AD на отложение амилоида в головном мозге и нагрузку бляшками головного мозга, а также на уровень пептида амилоида- β (А β_{1-42}) человека в плазме.

Трансгенные животные конститутивно сверхэкспрессируют белок-предшественник амилоида человека (hAPP) с мутациями London (717) и Swedish (670/671) под регуляторным контролем промотора Thy-1 мыши (Rockenstein EM, et al., 1995 и 2001). Отложение А β_{1-42} происходит уже в возрасте 3-4 месяцев с появлением зрелых бляшек в лобной коре и в возрасте 5-7 месяцев образование бляшек распространяется на гиппокамп, таламус и зону корковой проекции обонятельного пути у tg+ мышей hAPP751.

b. Обобщение протокола для профилактического режима

Трансгенных (tg+) мышей hAPP751 и их нетрансгенных (ntg) однопометных животных (14 + 2 недель) отбирали для оценки эффектов вакцины UBI AD на отложение А β в головном мозге и нагрузку бляшками А β головного мозга. Всего 33 tg+ мышей и 10 ntg мышей распределяли на 4 группы: tg+ мыши плацебо-контроля (n=10), которым инъецировали только адьювант; tg+ экспериментальные мыши (n=13), которым инъецировали вакцину UBI AD (90 мкг на дозу 150 мкл); tg+ контрольные мыши (n=10);

и ntg контрольные мыши без введения (n=10). Всего вводили три дозы на 0, 3, 12 неделях и дополнительную дозу вводили на 16 неделе. На 25,5 неделе проводили мониторинг всех мышей в отношении пространственного обучения с использованием теста водного лабиринта Морриса. Мышей наблюдали в течение дополнительных 4 недель, а затем умерщвляли.

5 c. Определение титра антител против А β ₁₋₂₈

У всех tg+ и ntg мышей проводили взятие крови на 0, 3, 6, 9, 12, 16, 19, 22 и 29 неделях. Сыворотку отделяли для определения титров антител против А β ₁₋₂₈ с использованием А β ₁₋₂₈ ELISA. Ни одна из tg+ мышей, которым вводили плацебо, и tg+ мышей, которым не проводили введение, не имела поддающихся обнаружению титров антител против А β ₁₋₂₈. Однако молодые tg+ мыши, которым вводили по меньшей мере две инъекции вакцины UBI AD, имели поддающиеся обнаружению титры антител.

10 d. Морфология головного мозга и анализ отложений амилоида и нагрузки бляшками

15 В конце прижизненного исследования, при умерщвлении, мышам проводили транскардиальную перфузию физиологического (0,9%) солевого раствора, головной мозг мышей быстро извлекали, разрезали на полушария и готовили для дальнейшего анализа. Левые полушария замораживали и позднее анализировали, как описано в разделе e ниже. Правые полушария фиксировали заливкой свежим 4% 20 параформальдегидом в PBS, pH 7,4, в течение одного часа. Затем полушария переносили в 15% раствор сахарозы для криозащиты. На следующие сутки головной мозг замораживали на льду и хранили при -80°C до применения для гистологического исследования. Криостатные срезы (толщиной 10 нм) окрашивали H&E, регистрировали и оценивали в отношении целостности нейронального слоя и макроскопической 25 морфологии. Криостатные срезы тканей оценивали с использованием моноклонального антитела 4G8 (против А β ₁₇₋₂₄) для определения отложения А β и нагрузки бляшками в коре и гиппокампе. Число бляшек и площадь, охватываемую бляшками, количественно определяли, и средняя величина для девяти срезов ткани из 5 различных слоев сагиттального среза головного мозга каждого животного обеспечивала статистически 30 значимую величину для каждого животного. Оценивали семь tg+ мышей в группе, в которой вводили вакцину UBI AD, и семь tg+ мышей в контрольной группе без введения. Результаты выражены в качестве процента нагрузки бляшками А β ₁₋₂₈ животных, 35 которым вводили вакцину UBI AD (n=7) относительно животных, которым не проводили введение (n=7) (фиг.10A, 10B), и они соответствуют средней относительной нагрузке бляшками, обнаруженной в 9 срезах ткани посредством иммуноhistохимии. Также включено сравнение tg+ мышей, отвечающих на вакцину UBI AD, и животных, которым не проводили введение, в коре головного мозга (0,22% против 0,32%) и в гиппокампе (0,20% против 0,29%); сниженная нагрузка бляшками отмечена у животных, которым вводили вакцину, с высоким уровнем ответа.

40 e. Определение А β ₁₋₄₂ посредством биохимического фракционирования тканей головного мозга

Животных умерщвляли, и головной мозг готовили, как описано в разделе ниже. Левое полушарие головного мозга замораживали отдельно и позднее растворимые 45 фракции четырех экстрактов головного мозга оценивали в отношении уровней пептида А β ₁₋₄₂ с использованием высокочувствительных наборов ELISA для обнаружения антигена А β ₁₋₄₂, изготавливаемых The GENETICS Company, Switzerland; уровни А β ₁₋₄₂ определяли путем сравнения со стандартом, предоставленным производителем.

Результаты, полученные для четырех фракций головного мозга, приведены в качестве нг/г влажной массы головного мозга. Левое полушарие головного мозга (включая bulbus olfactorius) каждого животного экстрагировали TRIS-забуференным солевым раствором (TBS), детергентом Triton X-100, детергентом SDS и муравьиной кислотой (FA) для охарактеризации и оценки А β ₁₋₄₂ и фракции исследовали в двух экземплярах.

В кратком изложении, экстракт TBS содержит растворимую в воде фракцию А β ₁₋₄₀ и А β ₁₋₄₂ ткани головного мозга. Для растворения остальных пептидов бета-амилоида необходимы детергенты и кислоты. Triton X-100 представляет собой олигопроизводное этиленгликоля с двумя свойствами: изооктиловый остаток с бензольным кольцом разрушает аполярные ван-дер-ваальсовы силы и повторяющиеся остатки -O-CH₂-CH₂- дезинтегрируют водородные связи. SDS имеет сходный двухсторонний эффект, однако он является более сильнодействующим и нарушает всю вторичную структуру: А β пептид становится линейным и пептидная цепь распрямляется. Муравьиная кислота является сильнейшим растворителем и разрушает, в основном, водородные связи. Можно предположить, что TBS солюбилизирует олигомерные структуры. Triton солюбилизирует полимеры меньших размеров, такие как протофибриллы. SDS нарушает остальные целые структуры и оставшаяся часть, содержащая прочные комплексы нерастворимых фибрилл, может быть разделена в FA, в основном, на мономеры. Таким образом, для оценки статуса полимеризации бета-амилоида и эффективности антиамилоидогенного исследуемого соединения исследуют все четыре фракции.

Количественный ELISA для А β и биохимические экстракции исследуют, ассоциирован ли ответ антител против А β у отвечающих tg+ мышей, которым вводили вакцину (вакцина UBI AD), со сниженной нагрузкой А β по сравнению с tg+ мышами без введения.

Особенно следует отметить сниженные общие уровни А β ₁₋₄₂ у tg+ мышей, отвечающих на вакцину UBI AD, когда уровни А β ₁₋₄₂ в каждом из четырех биохимических экстрактов ткани головного мозга сравнивают с результатами для контрольных tg+ животных без введения (фиг.11A, 11B).

f. Определение активации клеток микроглии

Криостатные срезы тканей оценивали в отношении активированных клеток микроглии с использованием антитела против CD11b; средний размер объекта оценивали в качестве доли площади для ряда объектов в каждом срезе в качестве среднего показателя кластеризации клеток микроглии; средняя величина для 9 срезов из 5 различных слоев сагиттального среза головного мозга каждого животного обеспечивала статистически значимую величину для животного.

Результаты для tg+ мышей, которым вводили вакцину (n=7) относительно tg+ мышей, которым не проводили введение (n=7), выраженные в качестве процента площадей CD11b-положительных клеток в коре головного мозга и гиппокампе, продемонстрировали, что животные после введения имели более низкие средние проценты окрашенных площадей по сравнению с tg+ контрольными животными без введения. Эти результаты указывают на то, что животные, которым вводили вакцину, не демонстрируют увеличенных количеств активированных клеток микроглии по сравнению с трансгенными мышами без введения.

g. Определение инфильтрации Т-клеток в ткани головного мозга

Криостатные срезы тканей оценивали для определения количества Т-клеток в коре головного мозга, гиппокампе и в кровеносных сосудах, и клетки тщательно подсчитывали. Средняя величина для девяти срезов тканей из 5 различных слоев сагиттального среза головного мозга обеспечивает статистически значимую величину

для животного. Результаты для tg+ мышей (n=7), которым вводили вакцину, относительно контрольных tg+ мышей, которым не проводили введение (n=7), выраженные в качестве количества CD3-положительных Т-клеток, окрашенных в коре головного мозга и гиппокампе, и количества Т-клеток, окрашенных в кровеносных

5 сосудах, указывают на то, что животные, которым вводили вакцину, демонстрируют небольшое снижение среднего количества иммуноокрашенных Т-клеток, посчитанных в коре головного мозга, гиппокампе и кровеносных сосудах, по сравнению с контрольными tg+ животными, которым не проводили введение.

g. Заключение

10 Трансгенным мышам hAPP751 проводили 3 или 4 внутримышечных инъекции в течение периода 16 недель вакцины UBI AD или плацебо-вакцины. Животные имели хорошую общую переносимость вакцины UBI AD, особенно учитывая высокую концентрацию иммуногенных конструкций A β ₁₋₁₄ пептида UBI, вводимых на дозу (90 мкг/150 мкг) у этих животных. У отвечающих животных наблюдали сниженную нагрузку 15 A β -бляшками и сниженные уровни A β ₁₋₄₂ в 4 экстрактах тканей головного мозга от этих животных. Снижение отложения A β и бляшек также показано с использованием имmunогистохимии. Отсутствуют доказательства активации клеток микроглии или инфильтрации Т-клеток в головном мозге tg+ мышей hAPP751, которым вводили вакцину.

ПРИМЕР 14

20 КАРТИРОВАНИЕ ЭПИТОПОВ АНТИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА НА ВАКЦИНУ UBI AD В ОТНОШЕНИИ БЕЗОПАСНОСТИ

Испытания ELISA с использованием планшетов, покрытых пептидами A β ₁₋₁₄ (SEQ ID NO: 4), A β ₁₋₂₈ (SEQ ID NO: 3), A β ₁₇₋₄₂ (SEQ ID NO: 67), MvF5 Th (SEQ ID NO: 46), 25 HBsAg3 Th (SEQ ID NO: 47) в качестве антигенов твердой фазы, оценивали в отношении специфичности антильного ответа на вакцину UBI AD в сыворотках от иммунизированных морских свинок и павианов. Высокий титр антител против A β , индуцированных вакциной, обнаруживался в случае антигенов A β ₁₋₁₄ и A β ₁₋₂₈ (таблица 1); однако существовало опасение, что A β ₁₋₂₈ также обнаруживал дополнительные 30 антитела вследствие "распространения В-клеточного эпитопа" за пределы аминокислоты 14, являясь источником потенциально неблагоприятной перекрестной реактивности.

Для разрешения этих опасений гипериммунные антисыворотки морских свинок и гипериммунные антисыворотки павианов также исследовали с использованием A β ₁₇₋₄₂-пептида способом ELISA. Титры ELISA указывают на то, что распространение эпитопа не обнаруживалось в исследованных гипериммунных образцах. Гипериммунные сыворотки продемонстрировали усиленное связывание с A β ₁₋₂₈-пептидом, но не реагировали с A β ₁₇₋₄₂. Гипериммунные сыворотки не реагировали ни с пептидными доменами Th MvF5 (SEQ ID NO: 46), ни с пептидными доменами Th HBsAg3 (SEQ ID NO: 47). В способе точного картирования эпитопов для локализации преобладающего участка(ов) связывания антител до конкретных остатков в области мишени 40 синтезировали 24 перекрывающихся 10-мерных пептида в области N-концевого остатка аспарагиновой кислоты "D" последовательности A β ₁₋₁₄-пептида и соседней области белка-предшественника пептида амилоида- β человека (hAPP) для охвата всей длины 45 A β ₁₋₁₄ плюс соседние положения APP (таблица 9). Эти гнездные пептиды использовали по отдельности для покрытия лунок микропланшетов для титрования в качестве твердофазных иммуноадсорбентов для тестов ELISA. Планшет положительного

контроля для ELISA покрывали А β ₁₋₂₈. Его исследовали в отношении связывания антитела с сывороткой от иммунизированных павианов, полученной на 0, 10, 84 и 111 неделях. Сыворотки павианов подвергали серийному разведению и анализировали на планшетах, покрытых 10-мерным пептидом в концентрации 5 мкг/мл. Как и ожидалось, пептид (DAEFRHDSGY) с SEQ ID NO: 6, соответствующий N-концевому 10-меру А β ₁₋₁₄ (SEQ ID NO: 4), сильно реагировал с иммунными сыворотками от всех четырех павианов. "D" в положении 1 А β ₁₋₁₄ был ключевым для специфичности антитела. Делекция "D" или модификация положения 1 на "E" (глутаминовая кислота) приводили к значительному снижению связывания с 10-мерными пептидами, что указывает на высокую специфичность антител павиана в отношении А β ₁₋₁₀ (SEQ ID NO: 6) и на низкую вероятность возникновения участков распознавания антител, перекрестно реагирующих с иммуногенными конструкциями А β -пептидов где-либо еще на А β ₁₋₄₂-пептиде или его предшественнике. Кроме того, картирование эпитопа для точного определения специфичности, распознаваемой иммунными сыворотками, далее подтверждали конкурентным ингибиением с использованием ELISA, как показано в таблице 10. В целом, эти данные об эпитопах антител продемонстрировали, что антитела, индуцированные иммунотерапевтической вакциной UBI AD, являющейся кандидатом, были направлены специфически на N-концевой домен А β , но не на участки после остатка 14 и не на домены Th MvF5 и Th HBsAg3.

ПРИМЕР 15

АНТИТЕЛЬНЫЙ ОТВЕТ И УРОВНИ А β 1-40 В СЫВОРОТКЕ И CSF ОТ ЯВАНСКИХ МАКАКОВ, У КОТОРЫХ ПРОВОДИЛИ МНОГОКРАТНЫЕ ИММУНИЗАЦИИ ВАКЦИНОЙ UBI AD

Кинетика ответа на вакцину показала, что у четырех из шести макаков в группе низкой дозы 2 (150 мкг на 0,25 мл) и у всех шести макаков в группе высокой дозы 3 (750 мкг на 1,25 мл) индуцировались антитела против иммуногенных конструкций А β ₁₋₁₄-пептида, перекрестно реагирующих с А β ₁₋₄₂, после первой иммунизации.

Как показано в таблице 11, у животных, как с низкой дозой, так и с высокой дозой, поддерживался высокий титр антител в ходе исследования (до 27 недели). Точная специфичность антительного ответа посредством картирования эпитопов (таблица 12) с сыворотками от четырех макаков на группу, иммунизированных три раза (9 WPI) и пять раз (15 WPI) либо высокой (750 мкг), либо низкой (150 мкг) дозами вакцины UBI AD показала выраженную специфичность в отношении N-концевого А β ₁₋₁₀-пептида (DAEFRHDSGY) (SEQ ID NO: 6) у всех четырех животных на группу, аналогично тому, что наблюдали в случае иммунной сыворотки из более раннего исследования на павианах (таблица 9). В отличие от профиля реактивности, наблюдавшегося у павианов, некоторую умеренную реактивность наблюдали для всех четырех животных в отношении пептидов SEQ ID NO: 20-22, окружающих остатки RHD в положениях 4, 5 и 6 N-конца А β ₁₋₄₂-пептида. Не было отмечено дополнительной реактивности в отношении других 10-мерных пептидов за пределами четырех упомянутых выше пептидов для любых исследованных образцов макаков.

Эффекты вакцины UBI AD на уровни А β ₁₋₄₀ в сыворотках и CSF определяли с использованием коммерчески доступных наборов для иммуноанализа. Как показано в таблице 13, концентрацию А β ₁₋₄₀ после вакцинации определяли в сыворотке через 0, 15, 21 и 25,5 недель и в CSF в момент умерщвления (15 неделя + 1 день или 27 недель). Уровни А β ₁₋₄₀ в сыворотке оценивали у макаков, которым вводили вакцину UBI AD,

однако нормальные уровни были выявлены у животных, которым вводили плацебо-вакцину. Напротив, уровни А β ₁₋₄₀ сохраняли стационарное состояние в цереброспинальной жидкости (CSF) макаков, которым вводили либо плацебо, либо вакцину UBI AD. Эти результаты подтверждают "гипотезу периферического стока" в качестве режима действия для антител против А β , посредством которого антитела ускоряют выход А β -пептидов из головного мозга в периферическую циркуляторную систему.

ПРИМЕР 16

КЛЕТОЧНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ У ЯВАНСКИХ МАКАКОВ, КОТОРЫМ ПРОВОДИЛИ МНОГОКРАТНЫЕ ИММУНИЗАЦИИ ВАКЦИНОЙ UBI AD

Образцы мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) выделяли из цельной крови, взятой на 15, 21 и 25,5 неделях, а затем культивировали в присутствии различных А β -пептидов. Как показано в таблице 14, не наблюдали ответов в виде пролиферации лимфоцитов, когда в культуральную среду добавляли А β ₁₋₁₄-пептид. Однако положительные ответы в виде пролиферации отмечали, когда А β ₁₋₄₂-полипептид или А β ₁₇₋₄₂-полипептид (SEQ ID NO: 67) добавляли в некоторые культуры PBMC.

Образцы PBMC, взятые через 15, 21 и 25,5 недель, также исследовали в отношении секреции цитокинов в присутствии А β -пептидов или митогена РНА. Как показано в таблице 15, три цитокина (IL-2, IL-6, TNF- α) продемонстрировали поддающуюся обнаружению секрецию в ответ на полноразмерный А β ₁₋₄₂-пептид, но не на А β ₁₋₁₄-пептид; активация секреции цитокинов не обнаруживалась в образцах после введения вакцины UBI AD, по сравнению с образцами после введения плацебо-вакцины. Уровни трех других цитокинов (IL-10, IL-13, IFN- γ), исследованных в присутствии А β -пептидов, были ниже предела обнаружения анализа во всех культурах PBMC.

Макаков иммунизировали вакциной UBI AD, имеющей только N-концевые А β ₁₋₁₄ пептидные иммуногены с чужеродными эпитопами Т-хелперов без домена А β ₁₇₋₄₂ пептида, что указывает на то, что положительные результаты пролиферации, отмеченные в культурах PBMC в присутствии пептида А β ₁₋₄₂, не были связаны с ответом на вакцину UBI AD, а вместо этого представляли собой фоновый ответ на нативный А β .

Эти результаты подтверждают безопасность вакцины UBI AD, которая имеет только А β ₁₋₁₄ и чужеродные эпитопы Т-хелперов, что демонстрирует, что она не индуцирует потенциально воспалительные аутоиммунные клеточно-опосредуемые иммунные ответы на А β -пептид у нормальных макаков. Напротив, неблагоприятные явления, ассоциированные с энцефалитом в клинических испытаниях вакцины AN-1792, были приписаны, частично, включению Т-клеточных эпитопов в фибриллярный/агрегированный иммуноген А β ₁₋₄₂ этой вакцины.

ПРИМЕР 17

СРАВНЕНИЕ ИММУНОГЕННОСТИ ВАКЦИНЫ UBI AD НА РАЗЛИЧНЫХ УРОВНЯХ У МОРСКИХ СВИНОК, МАКАКОВ И ПАВИАНОВ

После тщательного исследования различных иммуногенных конструкций А β -пептидов в отношении их пригодности в качестве ключевых ингредиентов вакцины против AD, выбирали пептидные конструкции с SEQ ID NO: 64 и 65 для планирования и разработки вакциновых составов. Выбранный вакциновый состав, содержащий две пептидные иммуногенные конструкции, образующие иммуностимулирующие комплексы с CpG-олигомерами и дополненные минеральными солями Adjuphos (вакцина UBI AD), тщательно исследовали, как описано в примерах 8-15 для калибровки их иммуногенности

в различных видах (морские свинки, макаки и павианы) и режимов дозирования для получения для их применения в клинических испытаниях. В таблице 16 обобщенно представлена доза пептида против частоты ответа (количество животных с положительными титрами/общее число исследованных животных) после одной или 5 двух доз, и масса тела каждого животного вида для оценки схем дозирования вакцины UBI AD. Исходя из анализа, является предпочтительным выбор уровня на дозу, составляющий более 100 мкг, основываясь на данных для всех исследуемых видов, для получения значительного показателя ответа после однократной дозы, которая после усиления обеспечит высокую или практически полную частоту ответа. Для исследования 10 у человека было выбрано 300 мкг на дозу 0,5 мл вакцины UBI AD. В клинических испытаниях фазы I пациентов иммунизировали на 0, 4, 12 неделях. Через четыре недели после одной дозы, 2 из 19 включенных в испытание пациентов имели положительные титры антител против А β ; через четыре недели после двух доз, на 8 неделе, 17 из 19 15 пациентов были положительными; и через четыре недели после трех доз, на 16 неделе, все 19 пациентов были положительными и оставались положительными до конца испытания фазы I на 24-26 неделях.

ПРИМЕР 18

КЛИНИЧЕСКОЕ ИСПЫТАНИЕ ФАЗЫ I УКАЗЫВАЕТ НА ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ВАКЦИНЫ UBI AD (UB-311)

20 Пептид А β является основной терапевтической мишенью при AD, исходя из патологических, биохимических и генетических данных, которые подтверждают его роль в процессе заболевания. Целью активной иммунотерапии А β , такой как вакцина UBI AD (UB-311), является стимуляция иммунного ответа для индукции устойчивых антител против А β , которые улавливают избыток А β -пептидов из кровотока и 25 препятствуют или замедляют ухудшение когнитивной способности.

Клинические испытания фазы I UB-311 под названием "открытое исследование фазы I для оценки безопасности, переносимости и иммуногенности иммунотерапевтической вакцины UBI AD (UB-311) у пациентов с болезнью Альцгеймера от мягкой до умеренной" проводили на основе одобренного конечного клинического протокола. Было включено 30 всего 19 пациентов с AD от мягкой до умеренной. Каждому пациенту проводили три внутримышечных инъекции исследуемого лекарственного средства (UB-311) на 0, 4 и 12 неделях. Общая продолжительность исследования составляла 24-26.

В дополнение к оценке данных безопасности, переносимости, иммуногенности и эффективности, полученных в клинических испытаниях UB-311 фазы I, описан 35 экспериментальный анализ связывания антителом эпиптапа, уровней А β -пептида и иммунных функций исследуемых пациентов для научных целей. Результаты для крови, взятой до и после иммунизации UB-311 на 0, 4, 8, 12, 16 и 24/26 неделях для выделения мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) и образцов сыворотки/плазмы для серологического анализа и анализа иммуногенности включают (1) титры антител 40 против А β , (2) картирование эпиптапа, (3) уровни А β ₁₋₄₀ в плазме, и (4) анализ пролиферации лимфоцитов и цитокинов *in vitro*.

В исследование было включено всего 19 пациентов с болезнью Альцгеймера (AD) от мягкой до умеренной, и им проводили три внутримышечных инъекции иммунотерапевтической вакцины UBI AD (UB-311) на 0, 4 и 12 неделях.

45 UB-311 продемонстрировала удовлетворительные профили безопасности и переносимости при введении пациентам с клинически документированной AD от мягкой до умеренной. Частота неблагоприятных явлений (AE), которые однозначно, вероятно или возможно связаны с UB-311, предусматривалась в качестве конечного результата

для оценки безопасности лечения UB-311. В ходе периода исследования было сообщено о 16 связанных с лечением эпизодах АЕ у 9 из 19 пациентов. Среди связанных с лечением АЕ были небольшие реакции в области инъекции (5 пациентов), умеренная тревожность (2 пациентов) и небольшое увеличение скорости оседания эритроцитов (2 индивидуума).

- 5 Все связанные с лечением АЕ оценивали как категория 1 (мягкие) или 2 (умеренные) по тяжести и не было предпринято никаких действий в связи с этими эпизодами. Один пациент с анкилозирующим спондилитом и сахарным диабетом в медицинском анамнезе сообщил о тяжелом неблагоприятном явлении (SAE) herpes zoster в ходе периода наблюдения. Пациента сразу госпитализировали после возникновения явления, и было
- 10 проведено соответствующее лечение. SAE был определен как имеющий маловероятную причинную обусловленность и пациент был выписан и больницы через две недели вследствие его улучшенного состояния.

Оценивали переносимость UB-311. Все 19 пациентов завершили лечение и ни один из них не отказался от исследования раньше времени, несмотря на возникновение АЕ.

- 15 Таким образом, переносимость составила 100%.

ПРИМЕР 19

**ВВЕДЕНИЕ ВАКЦИНЫ UB-311 ИНДУЦИРОВАЛО АНТИТЕЛА,
ОБЛАДАЮЩИЕ СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ К Н-КОНЦУ А β ₁₋₁₄ ДОМЕНА, У ВСЕХ
ПАЦИЕНТОВ**

- 20 Как показано на фиг.12, изменение уровней антител против А β ₁₋₁₄ измеряли на 0, 4, 8, 12, 16 и 24-26 неделях для оценки иммуногенности вакцины UB-311. Средняя величина уровней антител против А β ₁₋₁₄, преобразованная в log₁₀ для всех пациентов на 0 неделе (до лечения) составила 1,14, немного возрастала до 1,21 на 4 неделе, значительно
- 25 возрастила до 2,00 и 1,91 на 8 и 12 неделях, достигала пика 2,70 на 16 неделе (4 недель после третьей иммунизации), и снижалась до 2,28 на 24-26 неделях.

Титры антител преобразовывали в Log₁₀ и их величины на 0 неделе использовали в качестве исходного уровня. Сравнимую тенденцию наблюдали для всех трех титров специфических антител. Средняя величина изменения титров антител немного возрастала на 4 неделе, за исключением мономерных антител против А β ₁₋₄₂, в момент времени, когда пациентам уже ввели первую дозу UB-311 на 0 неделе, но перед второй дозой. Титры антител также возрастили на 8 неделе после введения второй дозы пациентам на 4 неделе. После введения третьей дозы на 12 неделе, пиковое среднее изменение титров антител было обнаружено на 16 неделе.

- 35 ПРИМЕР 20

**НЕВРОЛОГИЧЕСКИЕ, КОГНИТИВНЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ТЕСТЫ
ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВАКЦИНЫ UB-311 ПРИ БОЛЕЗНИ
АЛЬЦГЕЙМЕРА ОТ МЯГКОЙ ДО УМЕРЕННОЙ**

- Эффективность UB-311 оценивали посредством измерения изменений показателя ADAS-Cog, показателя MMSE и ADCS-CGIC у 19 пациентов. Показатель ADAS-Cog и ADCS-CGIC оценивали на 0 неделе (V2), 16 неделе (V7) и 24-26 неделях. Показатель MMSE измеряли при предварительном скрининге (V1), на 16 неделе и на 24-26 неделях. Среди пациентов увеличение показателя ADAS-Cog на 1,42 и 0,79 наблюдали от 0 недели до 16 недели и от 16 недели до 24-26 недель, соответственно. Средний показатель ADAS-Cog среди пациентов на исходном уровне составил 26,26, возрастал до 27,68 на 16 неделе и немногого снижался до 28,47 на 24-26 неделях. Более того, снижение показателя MMSE 0,32 и 0,79 было выявлено от посещения для предварительного скрининга до 16 недели и от 16 недели до 24-26 недель (фиг.13).

Средний показатель MMSE для пациентов при посещении для предварительного скрининга составил 19,16. Показатель снижался до 18,84 на 16 неделе, и до 18,05 на 24-26 неделях при последнем посещении. Примечательно, что, несмотря на измеренные средние показатели по двум шкалам, распределение показателей для отдельных 5 пациентов было довольно разбросанным, и, таким образом, динамика по двум шкалам представлялась стабильной.

Что касается оценки ADCS-CGOC, более 35% пациентов продемонстрировали улучшение на 16 неделе, через 4 недели после последнего введения (третья доза). Эти показатели улучшения снижались до более чем 18% в популяции пациентов после 10 длительного прекращения введения на 24-26 неделях. На 16 неделе немного меньше половины пациентов не имели изменения ADCS-CGIC, и эта категория пациентов несколько возрастала до более чем 50% от всех пациентов после дополнительных 8-10 недель периода наблюдения без введения после 16 недели. При сравнении соотношения 15 пациентов с улучшением и ухудшением, положительные результаты были показаны на 16 неделе, что говорит в пользу исследуемого продукта, но не на 24-26 неделях (12 недель после последней дозы вакцины).

В анализе подгрупп результаты продемонстрировали, что более пожилые пациенты с мягкой AD (возраст >60 лет и исходный уровень MMSE >20) имели лучший ответ на вакцину UB-311, демонстрируя (1) снижение на 3 балла среднего значения ADAS-Cog 20 (по сравнению с увеличением на 3,81 баллов в группе плацебо из испытания таренфлурбила фазы II в течение периода 12 месяцев), (2) стабильный средний показатель MMSE (по сравнению со снижением на 2,04 балла в группе плацебо из испытания таренфлурбила фазы II в течение периода 12 месяцев), как показано на фиг.14, и (3) более высокая доля с улучшением и отсутствие изменения показателя ADCS-CGIC. О 25 таком улучшении трех из трех показателей когнитивной способности у пациентов с мягкой AD в возрасте >60 лет никогда не сообщалось, и оно было воспринято с наибольшим энтузиазмом.

ПРИМЕР 21

ФЕРМЕНТНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ (ELISA) ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ АНТИТЕЛ ЧЕЛОВЕКА К МОНОМЕРАМ A β ₁₋₂₈, МОНОМЕРАМ A β ₁₋₄₂ или ОЛИГОМЕРАМ A β ₁₋₄₂

Исследование болезни Альцгеймера продемонстрировало, что агрегаты A β и происходящие из A β олигомеры играют центральную роль в патогенезе AD. О связывании олигомеров A β с нейронами, экспрессирующими субъединицы NR1 и NR2B 35 глютаматного рецептора N-метил-D-аспартатного типа (NMDA) (NMDA-R) сообщалось Lacor PN в Current Genomics 2007; 8:486-508. Когда A β олигомеры связываются с NR1 и NR2B на гиппокампальных нейрональных клетках, это связывание лиганд-рецептор приводит к значительному снижению количества синаптических окончаний, которое 40 ассоциировано с дефицитом памяти и когнитивным дефицитом и деменцией. Недавно результаты исследования *in vitro* в клетках и клинических испытаний показали, что антитела против олигомера A β способны блокировать это связывание и защищать нейроны от токсичности A β -олигомера. Вакцина UBI AD (UB-311) содержит два 45 пептидных иммуногена, причем каждый пептид включает короткий N-концевой A β -пептид (A β ₁₋₁₄), синтетически связанный с отличающимся смешенным в направлении Th2 N-концевым пептидным эпитопом. Для оценки иммуногенности ответа на вакцину UBI AD был разработан иммуноферментный тест на антитела против A β (ELISA) для обнаружения *in vitro* антител к мономерам A β ₁₋₂₈, мономерам A β ₁₋₄₂ и олигомерам A β ₁₋

42·

Мономеры А β ₁₋₂₈, мономеры А β ₁₋₄₂ или олигомеры А β ₁₋₄₂ предварительно наносили на лунки микропланшетов в качестве иммобилизованных антигенов. В ходе анализа образцы сыворотки подвергали серийному разведению 1:10 от 1:100 до 1:100000 и добавляли в предварительно покрытые микропланшеты. Антитела против А β ₁₋₂₈, против мономера или олигомера А β ₁₋₄₂, при их наличии, связываются с иммобилизованными антигенами. После промывания лунок для удаления не связавшихся антител и других компонентов сыворотки в каждую лунку добавляли 10 стандартизованный препарат конъюгированного с пероксидазой хрена рекомбинантного белка A/G и позволяли им реагировать со связанными антителами. Несвязанный коньюгат удаляли путем промывания лунок и в каждую лунку добавляли раствор субстрата, содержащий 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМВ) и пероксид водорода. Желтая окраска развивалась пропорционально количеству присутствующих 15 специфичных к А β антител при их наличии в исследованных образцах сыворотки. Реакцию фермент-субстрат завершали добавлением разбавленного раствора серной кислоты. Затем проводили определение изменения цвета, которое происходило в каждой лунке, посредством спектрофотометрического измерения поглощения в устройстве для считывания микропланшетов с длиной волны 450 нм (A₄₅₀). Для вычисления 20 относительного титра антител использовали программу для вычисления титра UBI® ELISA.

Показано, что А β -олигомеры являются наиболее токсичными для нейронов по сравнению с А β -мономерами или амилоидными бляшками. Целью активной иммунотерапии является индукция продуцирования антител, специфичных в отношении 25 не только мономеров А β , но также олигомеров А β . Образцы сыворотки, полученные от 19 пациентов с AD от мягкой до умеренной на 0 неделе (исходный уровень), 4 и 12 перед каждой инъекцией UB 311 и на 8, 16 и 24 неделях анализировали в отношении титров антител против А β . На фиг.15 представлены титры антител против мономера А β ₁₋₂₈, против мономера А β ₁₋₄₂ и против олигомера А β ₁₋₄₂ при скрининговом посещении 30 (V1/V2) и на 16 неделе (V7), через четыре недели после последней иммунизации UB-311 для каждого из 19 включенных в исследование пациентов.

ПРИМЕР 22

КАРТИРОВАНИЕ ЭПИТОПА: КОНКУРЕНТНЫЙ ФЕРМЕНТНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ ИНГИБИРОВАНИЯ СВЯЗЫВАНИЯ (ЕІА) ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ АНТИТЕЛ ЧЕЛОВЕКА К Н-КОНЦЕВОМУ ПЕПТИДУ

Картирование эпитопов использовали для идентификации участков связывания или эпитопов антител против А β ₁₋₁₄ на линейных перекрывающихся 10-мерных аминокислотных последовательностях А β -пептида (между остатками 9 и 24 на А β) с 40 использованием тестов ELISA. Оценивали клинические образцы сыворотки от 19 пациентов. Результаты на 16 неделе после 3 иммунизаций на 0, 4 и 12 неделях представлены ниже (фиг.16).

Синтетический А β ₁₋₂₈-пептид был выбран в качестве неподвижного антигена и предварительно нанесен в концентрации 2 мкг/мл на лунки микропланшетов. Перед 45 экспериментом каждый образец сыворотки разбавляли 1:50, 1:100, 1:200 и 1:400 и исследовали для определения оптимального разведения. Образцы сыворотки против А β в оптимальном разведении смешивали со сконструированными 10-мерными пептидами по отдельности в качестве жидкофазного иммуносорбента. Смесь подвергали

серийному разведению 1:5 серийно разбавленной сывороткой перед переносом в предварительно покрытый А β ₁₋₂₈ планшет. В качестве контроля использовали сыворотку А β в оптимальном разведении отдельно. В ходе анализа 10-мерные пептиды специфически связывались с предпочтительным участком связывания антитела и конкурентно ингибировали связывание антитела против А β и иммобилизованного антигена. После промывания лунок для удаления несвязанных антител и других компонентов сыворотки стандартизованный препарат конъюгированного с пероксидазой хрена рекомбинантного белка A/G добавляли в каждую лунку и позволяли ему реагировать со связанными антителами. После промывания лунок для удаления несвязанного конъюгата в каждую лунку добавляли раствор субстрата, содержащий пероксид водорода и 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМВ). Желтая окраска развивалась пропорционально количеству присутствующих А β -специфических антител, при их наличии, в исследованных образцах сыворотки. Реакцию фермент-субстрат завершали добавлением разбавленного раствора серной кислоты. Затем определяли изменение цвета в каждой лунке спектрофотометрически в устройстве для считывания микропланшетов при длине волны 450 нм (A₄₅₀) с использованием программы IC₅₀ 5X (Molecular devices). Связывание антител против А β и иммобилизованного антигена в контрольной лунке соответствует максимальному связыванию (100%), и половинную максимальную ингибиторную концентрацию (IC₅₀) 10-мерного пептида использовали в качестве показателя эпитопной специфичности.

ПРИМЕР 23

ПРЕОБЛАДАЮЩИЙ ЭПИТОП, РАСПОЗНАВАЕМЫЙ АНТИТЕЛАМИ В ОБРАЗЦАХ СЫВОРОТКИ ОТ ПАЦИЕНТОВ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ UB-311, БЫЛ СПЕЦИФИЧЕСКИМ ДЛЯ А β ₁₋₁₀ ПЕПТИДА

В способе точного картирования эпитопа для локализации предпочтительных участков связывания антител до конкретных остатков в области-мишени (таблица 17), синтезировали 24 перекрывающихся 10-мерных пептидов (SEQ ID NO: 6, 8-30) вместе с последовательностью пептида А β ₁₋₁₄ (SEQ ID No 4) и соседней областью белка-предшественника амилоида- β человека (hAPP), для охвата всей длины А β ₁₋₁₄, начиная с N-концевого остатка аспарагиновой кислоты "D" вместе с соседними положениями hAPP (фиг.16). Образцы сыворотки, собранные от 19 пациентов, исследовали перед иммунизацией и на 16 неделе после введения трех доз UB-311. Образцы до обработки имели сходные уровни антитела против А β (данные не представлены). Как и ожидалось, преобладающий антительный ответ во всех 19 образцах, для которых были получены положительные карты эпитопов, был направлен на свободный N-конец А β (SEQ ID No: 6), как показано на фиг.16 и в таблице 17. Более конкретно, пептид DAEFRHDSGY, соответствующий N-концу 10-мера А β ₁₋₁₄ наиболее сильно реагировал с иммунизированными сыворотками от всех 19 пациентов. Дополнительные антительные ответы со слабой реактивностью в отношении других 10-мерных пептидов А β были обнаружены у 8 из 19 пациентов. Образцы сыворотки, полученные на 4, 8, 12 и 24-26 неделе от некоторых, но не от всех пациентов, также исследовали, и они продемонстрировали согласующиеся результаты (данные не представлены). В общем, эти данные демонстрируют, что большинство антител, индуцированных UB-311, было направлено конкретно на N-концевой домен А β , но не на участки после остатка 14.

ПРИМЕР 24

УРОВЕНЬ А β ₁₋₄₀ ПЕПТИДА ПОВЫШАЛСЯ В ПЛАЗМЕ ПОСЛЕ ТРЕХ

ИММУНИЗАЦИЙ ВАКЦИНОЙ UBI AD (UB-311)

В настоящее время изменение концентрации в плазме А β ₁₋₄₀ (SEQ ID NO: 2), А β ₁₋₄₂ (SEQ ID No: 1) или соотношения А β ₁₋₄₂:А β ₁₋₄₀ не ассоциируют в значительной степени с ответом на лечение как в условиях клинических испытаний, так и при модифицирующем заболевание лечении или у пациентов с AD, которым вводили ингибиторы холинэстеразы. Тем не менее, уровни А β в плазме были предложены в качестве возможного биомаркера AD.

В предшествующем исследовании авторов изобретения уровни А β ₁₋₄₀ в сыворотке были повышены у макаков, которым вводили вакцину UBI AD, однако нормальные уровни отмечали у животных, которым вводили плацебо-вакцину. Эти результаты показали, что "гипотеза периферического стока" может представлять собой способ действия для антител против А β . Это явление также наблюдали в настоящем исследовании, хотя титры антитела против А β были значительно более высокими у макаков после шести иммунизаций UB-311, чем титры антител у человека после трех иммунизаций. Как показано в таблице 18, уровни А β ₁₋₄₀ в плазме 12 парных случаев с образцами плазмы с А β ₁₋₄₀, исследованные до обработки UB-311 и на 16 неделе (четыре недели после третьей иммунизации) сравнивали с сывороточными концентрациями антитела против А β ₁₋₂₈ на 16 неделе. Все титры антител были отрицательными перед иммунизацией UB-311. Восемь пациентов с титрами антител против А β ₁₋₂₈ выше log₁₀ 2,4 имели повышенные титры А β ₁₋₄₀ после введения вакцины UBI AD (UB-311); в то время как титры у трех из 4 пациентов с уровнями антител ниже log₁₀ 2,0 не были повышены после введения. Увеличенные уровни А β ₁₋₄₀ были небольшими в большинстве случаев с одним исключением (пациент P109), в случае которого был обнаружен необычно высокий уровень А β ₁₋₄₀ в плазме перед иммунизацией и значительно более высокий уровень (1031,9 пг/мл) после иммунизации. Причина очень высокого А β ₁₋₄₀ остается неясной. Ни один из пациентов не имел поддающиеся измерению уровни А β ₁₋₄₂ пептида в плазме.

ПРИМЕР 25

ИММУНИЗАЦИЯ UB-311 НЕ СТИМУЛИРУЕТ ЛИМФОЦИТЫ (РВМС) ЧЕЛОВЕКА В ПРИСУТСТВИИ ПЕПТИДОВ А β ₁₋₁₄ ИЛИ А β ₁₋₄₂

Появление новых вакцин и увеличение количества в высокой степени освещенных сообщений, которые утверждают о связи между определенными иммунизациями и аутоиммунным заболеванием, привели к обеспокоенности общества в отношении риска иммунизации. Пролиферацию лимфоцитов и продукцию цитокинов в ответ на стимуляцию антигеном можно использовать для оценки того, является ли иммунная система гиперактивированной после вакцинации, и какой каскад(ы), при их наличии, вовлечен. Целью настоящего исследования была оценка безопасности иммуногена (А β ₁₋₁₄) UB-311 путем измерения индекса стимуляции (SI) пролиферации лимфоцитов в отсутствие и в присутствии пептидов А β или митогена РНА в качестве положительного контроля, а также концентрации цитокинов в культивируемых лимфоцитах от пациентов с AD до и после трех иммунизаций UB 311 на 16 неделе.

Мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) от пациентов с AD выделяли центрифугированием в градиенте Ficoll-hyraque. Для индуцируемой пептидом пролиферации и продукции цитокинов клетки ($2,5 \times 10^5$ на лунку) культивировали в трех

экземплярах отдельно или с добавлением индивидуальных пептидных доменов (в конечной концентрации 10 мкг/мл), включая А β ₁₋₁₄ (SEQ ID NO: 4), А β ₁₋₁₆ (SEQ ID NO: не включен), А β ₁₋₂₈ (SEQ ID NO: 3), А β ₁₇₋₄₂ (SEQ IDN NO: не включен), А β ₁₋₄₂ (SEQ ID NO: 1) и посторонний 38-мерный пептид (p1412). Культуры инкубировали при 37°C с 5% CO₂ в течение 72 часов, а затем из каждой лунки извлекали 100 мкл супернатанта и замораживали при -70°C для анализа цитокинов. В каждую лунку добавляли десять мкл культуральной среды, содержащей 0,5 мкКи ³H-тимидина (³H-TdR, Amersham, каталожный номер № TRK637) и инкубировали в течение 18 ч, а затем проводили обнаружение включения радиоизотопа посредством подсчета с использованием жидкостной сцинтилляции. В качестве положительного контроля для пролиферации лимфоцитов использовали митоген фитогемагглютинин (РНА). Клетки, культивированные отдельно без А β -пептида или митогена РНА, использовали в качестве отрицательных и положительных контролей. Индекс стимуляции (SI) вычисляли в качестве среднего количества импульсов в мин (срт) для экспериментальных культур в трех экземплярах с А β -пептидом, деленного на среднее значение срт культур с отрицательным контролем в трех экземплярах; SI>3,0 считали значительным пролиферативным ответом.

Образцы мононуклеарных клеток периферической крови выделяли из цельной крови, взятой на 0 неделе (исходный уровень) и 16 неделе (4 недель после третьей дозы), а затем культивировали в отсутствие или в присутствии различных А β -пептидов. Как показано в таблице 19, не наблюдали значительного пролиферативного ответа лимфоцитов, когда А β ₁₋₁₄, другие А β -пептиды или p1412 (посторонний контрольный пептид) добавляли в культуральную среду. Как и ожидалось, положительные пролиферативные ответы наблюдали, когда в культуральную среду добавляли митоген РНА. Наблюдение сходных ответов с РНА до и после иммунизации UB 311 (p=0,87) указывает на отсутствие значительного изменения иммунных функций исследуемых пациентов (таблица 19).

ПРИМЕР 26

ИММУНИЗАЦИЯ UB-311 НЕ СТИМУЛИРУЕТ ЦИТОКИНЫ ЧЕЛОВЕКА В ПРИСУТСТВИИ ПЕПТИДА А β ₁₋₁₄

Анализы цитокинов (IL-2, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ) в культурах РВМС проводили для аликвот культуральной среды только с клетками или в присутствии доменов А β -пептида или РНА. Наборы для сэндвич-ELISA для определения специфических цитокинов человека (U-CyTech Biosciences, Utrecht, The Netherlands) использовали для определения концентраций (пг/мл) индивидуальных цитокинов в соответствии с инструкциями изготовителя. Образцы РВМС, собранные на 0 и 16 неделях, также исследовали в отношении секреции цитокинов либо с клетками отдельно (отрицательный контроль), либо в присутствии А β -пептидов, p1412 (посторонний пептид) или митогена РНА (положительный контроль) после культивирования в течение 3 суток. Поддающийся количественному определению диапазон набора составляет от 5 до 320 пг/мл. Любая измеренная концентрация ниже 5 пг/мл или выше 320 пг/мл указана как ниже предела количественного определения (BQL) или выше предела количественного определения (AQL), соответственно. Однако для статистического подсчета BQL или AQL заменяли нижним (5 пг/мл) или верхним (320 пг/мл) пределом количественного определения, соответственно. Средние концентрации каждого цитокина на 0 неделе и 16 неделе представлены в таблице 20. Как и ожидалось, происходило значительное увеличение продукции цитокинов в присутствии положительного контроля РНА, за исключением

IL-2. Продукцию цитокинов в ответ на стимуляцию A β ₁₋₁₄, или другими A β -пептидами наблюдали на исходном уровне (0 неделя) и 16 неделе, однако большинство величин оказались сходными с соответствующими отрицательными контролями (клетки отдельно).

5 Для оценки изменения клеточно-опосредуемого иммунного ответа после иммунизации изменение средних концентраций цитокинов от исходного уровня до 16 недели сравнивали с изменением для отрицательных контролей и исследовали с использованием парного знакового рангового критерия Уилкоксона. Четыре цитокина (IFN- γ , IL-6, IL-10, TNF- α) продемонстрировали заметное увеличение секреции в ответ на 10 полноразмерный A β ₁₋₄₂-пептид; это наблюдение может быть следствием конформационных эпитопов агрегатов A β ₁₋₄₂. Активация секреции цитокинов не обнаруживалась в A β ₁₋₁₄ или других A β -пептидах.

Обобщение: вакцина UBI AD содержит два пептидных иммуногена, каждый из 15 которых имеет свободный N-концевой A β ₁₋₁₄-пептид, синтетически связанный с эпитопами Th MvF5 и Th HBsAg3, соответственно. Анализ пролиферации лимфоцитов и анализ цитокинов *in vitro* использовали для оценки влияния иммунизации вакциной UBI AD на клеточный иммунный ответ. Не наблюдали пролиферативных ответов лимфоцитов, когда A β ₁₋₁₄ пептид или любые другие A β -пептиды добавляли в 20 культуральную среду, как показано в таблице 19. Активация секреции цитокинов лимфоцитами у иммунизированных вакциной UBI AD пациентов не обнаруживалась при введении A β ₁₋₁₄ и других A β -пептидов, за исключением A β ₁₋₄₂, который индуцировал существенное увеличение уровня четырех цитокинов (IFN- γ , IL-6, IL-10, TNF- α) после 25 иммунизации UB 311 на 16 неделе по сравнению с уровнями на 0 неделе до введения (таблица 20). Увеличение высвобождения цитокинов посредством Т-клеточных ответов Th2-типа, более вероятно, является несвязанным с ответом на вакцину UBI AD, поскольку в случае A β ₁₋₁₄ не была обнаружена активация. Ответ на A β ₁₋₄₂ предположительно является фоновым ответом на нативный A β , который может быть 30 сходным с нативным эпитопом Т-хелперов, идентифицированным на A β ₁₋₄₂. Наблюдали отсутствие продукции IL-2 в ответ на PHA, что согласуется с данными, сообщенными Katial RK, et al. в Clin Diagn Lab Immunol 1998; 5:78-81, в сходных экспериментальных 35 условиях с нормальными PBMC человека. В заключение, эти результаты показали, что вакцина UBI AD не индуцировала потенциально воспалительные клеточно-опосредуемые иммунные ответы против собственных антигенов у пациентов с болезнью Альцгеймера от мягкой до умеренной, которые участвовали в клинических испытаниях фазы I, таким образом, далее демонстрируя безопасность вакцины UBI AD (UB-311).

40 Таблица 1
Пептид A β ₁₋₄₂ и его сегменты, используемые в серологических анализах

Положения аминокислот в A β или APP	SEQ ID NO:	Последовательность
A β ₁₋₄₂ или APP 770 (D672-A713)	1	DAEFR HDSGY EVHHQ KLVFF AEDVG SNKGA IIGLM VGGVV IA
A β ₁₋₄₀ или APP 770 (D672-V711)	2	DAEFR HDSGY EVHHQ KLVFF AEDVG SNKGA IIGLM VGGVV

A β ₁₋₂₈ или APP 770 (D672-K699)	3	DAEFR HDSGY EVHHQ KLVFF AEDVG SNK
A β ₁₋₁₄ или APP 770 (D672-H685)	4	DAEFR HDSGY EVHH
A β ₁₋₁₂ или APP 770 (D672-Y683)	5	DAEFR HDSGY EV
A β ₁₋₁₀ или APP 770 (D672-Y681)	6	DAEFR HDSGY
A β ₁₅₋₄₂ или APP 770 (Q686-A711)	7	QKLVF FAEDV GSNKG AIIGL MVGGV VIA

	A β ₋₉₋₁ или APP 770 (T663-D672)	8	TEEIS EVKMD
	A β ₋₈₋₂ или APP 770 (E664-A673)	9	EEISE VKMDA
	A β ₋₇₋₃ или APP 770 (E665-E674)	10	EISEV KMDAE
	A β ₋₆₋₄ или APP 770 (I666-F675)	11	ISEVK MDAEF
5	A β ₋₅₋₅ или APP 770 (S667-R676)	12	SEVKM DAEFR
	A β ₋₄₋₆ или APP 770 (E668-H677)	13	EVKMD AEFRH
	A β ₋₃₋₇ или APP 770 (V669-D678)	14	VKMDA EFRHD
	A β ₋₂₋₈ или APP 770 (K670-S679)	15	KMDAE FRHDS
	A β ₋₁₋₉ или APP 770 (M671-R680)	16	MDAEF RHDSG
10	A β ₁₋₁₀ или APP 770 (D672-Y681)	6	DAEFR HDSGY
	A β ₂₋₁₁ или APP 770 (A673-E682)	17	AEFRH DSGYE
	A β ₃₋₁₂ или APP 770 (E674-V683)	18	EFRHD SGYEV
	A β ₄₋₁₃ или APP 770 (F675-H684)	19	FRHDS GYEVH
15	A β ₅₋₁₄ или APP 770 (R676-H685)	20	RHDSG YEVHH
	A β ₆₋₁₅ или APP 770 (H677-Q686)	21	HDSGY EVHHQ
	A β ₇₋₁₆ или APP 770 (D678-K687)	22	DSGYE VHHQK
	A β ₈₋₁₇ или APP 770 (S679-L688)	23	SGYEV HHQKL
	A β ₉₋₁₈ или APP 770 (G680-V689)	24	GYEVH HQKLV
20	A β ₁₀₋₁₉ или APP 770 (Y681-F690)	25	YEVHH QKLVF
	A β ₁₁₋₂₀ или APP 770 (E682-F691)	26	EVHHQ KLVFF
	A β ₁₂₋₂₁ или APP 770 (V683-A692)	27	VHHQK LVFFA
	A β ₁₃₋₂₂ или APP 770 (H684-E693)	28	HHQKL VFFAE
	A β ₁₄₋₂₃ или APP 770 (H685-D694)	29	HQKLV FFAED
25	A β ₁₅₋₂₄ или APP 770 (Q686-V695)	30	QKLVF FAEDV
	A β ₁₆₋₂₂ или APP 770 (D687-E693)	31	KLVFFAE
	Спейсер А	32	ϵ K-KKK
	A β или APP 770 (D672-K687)	66	DAEFR HDSGY EVHHQ K
	A β или APP 770 (L688-A713)	67	LVFF AEDVG SNKGA IIGLM VGGVV IA

30

35

40

45

Таблица 2

Выбранные неразборчивые эпитопы Т-хелперов для применения в разработке

происходящих из Аβ₁₋₄₂ пептидных иммуногенных конструкций

	Описание	SEQ ID NO:	Последовательность
5	Clostridium tetani1 Th	33	KKQYIKANSKFIGITEL
10	MvF1 Th	34	LSEIKGVIVHRLEGV
Bordetella pertussis Th	35	GAYARCPNGTRALTV AELRGNAEL	
Clostridium tetani2 Th	36	WVRDIIDDFTNESSQKT	
15	Дифтерийный Th	37	DSETADNLEKTVAAL SILPGHGC
Plasmodium falciparum Th	38	DHEKKHAKMEKASSVFNVVNS	
20	Schistosoma mansoni Th	39	KWFKTNAPNGVDEKHRH
Th холерного токсина	40	ALNIWDRFDVFCTLGATTGYLKGNS	
25	MvF2 Th	41	ISEIKGVIVHKIEGI
KKKMvF3 ThR	42	K K K I S I S E I K G V I V H K I E G I L F T R T T R T T K K K L F L L T K L L T L P Q S L D R R R I K I I R I I I L I R V R V V V V V I V F F F F F F V F F	
30	HBsAg1 Th	43	I S I S E I K G V I V H K I E T I L F T R T T R K K K I I T I T R I I T I P Q S L D F F L L L I T T I
35	MvF4 Th	44	
HBsAg2 Th	45		
MvF5 Th	46	ISITEIKGVIVHRIETILF	
HBsAg3 Th	47	KKIITITRIITIITTID	

40

45

Таблица 3

Усиление иммуногенности пептида А β ₁₋₁₄ происходящими из патогенного белка эпипотами Th, включая идеализированные искусственные эпипоты Th, для индукции специфических антител против N-конца А β ₁₋₄₂-пептида при разработке иммуногенных конструкций А β -пептида

	Описание	SEQ ID NO:	Последовательность
5	A β ₁₋₁₄ -εK-Clostridium tetani1 Th	48	DAEFRHDSGYEVHH-εK-KKQYIKANSKFIGITEL
	A β ₁₋₁₀ -εK-MvF1 Th	49	DAEFRHDSGY-εK-LSEIKGVIVHRLEGV
	A β ₁₋₁₂ -εK-MvF1 Th	50	DAEFRHDSGYEV-εK-LSEIKGVIVHRLEGV
	A β ₁₋₁₄ -εK-MvF1 Th	51	DAEFRHDSGYEVHH-εK-LSEIKGVIVHRLEGV
	A β ₁₋₁₄ -εK-Bordetella pertussis Th	52	DAEFRHDSGYEVHH-εK-GAYARCPNGTRALTVaelrgnael
	A β ₁₋₁₄ -εK-Clostridium tetani2 Th	53	DAEFRHDSGYEVHH-εK-WVRDIIDDFTNESSQKT
	A β ₁₋₁₄ -εK-дифтерийный Th	54	DAEFRHDSGYEVHH-εK-DSETADNLEKTVAALSILPGHGC
	A β ₁₋₁₄ -εK-Plasmodium falciparum Th	55	DAEFRHDSGYEVHH-εK-DHEKKHAKMEKASSVFNVVNS
10	A β ₁₋₁₄ -εK-Schistosoma mansoni Th	56	DAEFRHDSGYEVHH-εK-KWFKTNAPNGVDEKRRH
	A β ₁₋₁₄ -εK-Th холерного токсина	57	DAEFRHDSGYEVHH-εK-ALNIWDRFDVFCTLGATTGYLKGNS
	A β ₁₋₁₄ -εK-MvF2 Th	58	DAEFRHDSGYEVHH-εK-ISEIKGVIVHKIEGI
	A β ₁₋₁₄ -εK-KKKMvF3 Th	59	D A E F R H D S G Y E V H H - ε K - K K K - I S I S E I K G V I V H K I E G I L F T R T T R T T
	A β ₁₋₁₄ -εK-HBsAg1 Th	60	D A E F R H D S G Y E V H H - ε K - K K K L F L L T K L L T L P Q S L D R R R I K I I R I I I L I R V R V V V V V V I V F F F F F V F F
	(A β ₁₋₁₄) ₄ -(εK) ₂ -εK-MvF1 Th	61	(DAEFRHDSGYEVHH) ₄ -εK ₂ -εK-LSEIKGVIVHRLEGV
	A β ₁₋₁₄ -εK-KKK-MvF4 Th	62	D A E F R H D S G I E V H H - ε K - K K K - I S I S E I K G V I V H K I E T I L F T R T T R
	A β ₁₋₁₄ -εK-HBsAg2 Th	63	D A E F R H D S G Y E V H H - ε K - K K K - I I T I T R I I T I P Q S L D F F L L L I T T I
25	A β ₁₋₁₄ -εK-KKK-MvF5 Th	64	DAEFRHDSGYEVHH-εK-KKK-ISITEIKGVIVHRIETILF
	A β ₁₋₁₄ -εK-HBsAg3 Th	65	DAEFRHDSGYEVHH-εK-KKK-IITITRITIITTID

Таблица 4
Оценка иммуногенности у морских свинок при первичной иммунизации (0 wpi) и усиливающей иммунизации (4 wpi) вакциными составами, содержащими различные происходящие из А β пептидные иммуногенные конструкции

№ группы	Описание происходящей из А β пептидной иммуногенной конструкции в вакцином составе	SEQ ID NO:	ID животного	0 wpi	4 wpi	6 wpi	8 wpi
				A β ₁₋₄₂ ELISA			
				ELISA, Титр Log ₁₀	ELISA, Титр Log ₁₀	ELISA, Титр Log ₁₀	ELISA, Титр Log ₁₀
40	A β ₁₋₄₂ пептид	1	2723	0,438	3,574	3,460	3,744
			2724	0,570	2,582	2,684	2,649
			2725	0,630	3,232	3,279	2,958
			Геометрическое среднее значение	0,540	3,101	3,123	3,084
45	A β ₁₋₂₈ пептид	3	2726	0,330	3,768	3,572	3,369
			2727	0,440	3,690	3,688	3,759
			2728	0,350	3,683	3,879	3,960
			Геометрическое среднее значение	0,370	3,713	3,711	3,688
3	A β ₁₋₁₄ пептид	4	2729	0,620	1,235	1,212	1,241

			2730	0,570	1,142	1,113	1,151	
			2731	0,420	1,211	1,114	1,189	
			Геометрическое среднее значение	0,529	1,195	1,145	1,193	
5	4	$\text{A}\beta_{1-14}\text{-eK-Clostridium tetani} \text{ Th}$	48	2763	0,591	1,736	2,532	2,920
				2764	0,582	1,943	0,968	1,511
				2765	0,514	0,890	1,591	2,435
				Геометрическое среднее значение	0,561	1,443	1,574	2,207
10	6	$\text{A}\beta_{1-10}\text{-eK-MVF1} \text{ Th}$	49	2757	0,424	4,124	4,622	4,523
				2758	0,649	4,034	4,322	4,372
				2759	0,753	4,275	4,555	4,364
				Геометрическое среднее значение	0,592	4,143	4,498	4,419
15	7	$\text{A}\beta_{1-12}\text{-eK-MVF1} \text{ Th}$	50	2760	0,342	4,356	4,732	4,534
				2761	0,563	4,574	4,352	4,623
				2762	0,733	4,356	4,623	4,733
				Геометрическое среднее значение	0,521	4,427	4,566	4,629
20	5	$\text{A}\beta_{1-14}\text{-eK-MVF1} \text{ Th}$	51	2766	0,342	4,744	4,854	4,878
				2767	0,647	4,500	5,337	4,777
				2768	0,182	5,074	4,791	4,601
				Геометрическое среднее значение	0,343	4,767	4,988	4,751
25	8	$\text{A}\beta_{1-14}\text{-eK-Bordetella pertussis} \text{ Th}$	52	2769	0,648	2,235	3,571	2,686
				2770	0,415	2,284	4,203	3,799
				2771	0,488	1,331	2,541	2,202
				Геометрическое среднее значение	0,508	1,894	3,366	2,822
30	9	$\text{A}\beta_{1-14}\text{-eK-Clostridium tetani} 2 \text{ Th}$	53	2772	0,714	1,843	2,818	2,761
				2773	1,165	3,370	1,297	1,828
				2774	0,886	1,398	3,112	3,165
				Геометрическое среднее значение	0,903	2,055	2,249	2,518
35	10	$\text{A}\beta_{1-14}\text{-eK-дифтерийный} \text{ Th}$	54	2775	0,314	3,674	4,675	4,358
				2776	0,233	0,780	1,587	1,695
				2777	0,780	3,629	4,473	3,718
				Геометрическое среднее значение	0,385	2,183	3,214	3,017
40	11	$\text{A}\beta_{1-14}\text{-eK-Plasmodium falciparum} \text{ Th}$	55	2778	0,868	3,941	3,856	3,382
				2779	0,464	1,926	2,549	2,633
				2780	0,627	4,350	3,723	3,218
				Геометрическое среднее значение	0,632	3,208	3,320	3,060
45	12	$\text{A}\beta_{1-14}\text{-eK-Schistosoma mansoni} \text{ Th}$	56	2781	0,968	0,395	2,475	2,583
				2782	0,754	1,101	2,554	2,692
				2783	0,680	1,882	0,881	1,250
				Геометрическое среднее значение	0,792	0,935	1,773	2,056
45	13	$\text{A}\beta_{1-14}\text{-eK-Th холерного токсина}$	57	2784	0,836	4,218	4,735	4,287
				2785	1,111	4,704	5,357	5,347

			2786	0,497	4,252	4,698	4,600
			Геометриче- ское среднее значение	0,773	4,386	4,921	4,724
5	14	Aβ ₁₋₁₄ -εK-MVF2 Th	58	2787	1,333	5,347	5,398
				2788	0,546	5,495	5,409
				2789	0,705	5,658	5,745
				Геометриче- ское среднее значение	0,801	5,498	5,515
10	15	Aβ ₁₋₁₄ -εK-MVF3 Th	59	2790	0,701	4,943	5,678
				2791	0,360	3,468	5,745
				2792	0,494	4,759	5,319
				Геометриче- ское среднее значение	0,500	4,337	5,577
15	16	Aβ ₁₋₁₄ -εK-HBsAg1 Th	60	2793	0,880	3,199	4,561
				2794	0,911	4,817	4,303
				2795	0,761	4,567	5,328
				Геометриче- ское среднее значение	0,848	4,129	4,711
20	17	(Aβ ₁₋₁₄) ₄ -εK- MVF1 Th	61	2796	0,479	5,041	5,585
				2797	0,973	4,385	4,831
				2798	0,345	3,919	4,698
				Геометриче- ское среднее значение	0,544	4,425	5,023

Таблица 5
Оценка иммуногенности у морских свинок после первичной иммунизации (0 wpi) и усиливающей иммунизации (4 wpi) вакцинными составами, содержащими две происходящих из Aβ₁₋₁₄ пептидных иммуногенных конструкции и их комбинацию

№ группы	описание иммуногенной кон-струкции Aβ ₁₋₁₄ -пептида в вак-цинном составе	SEQ ID NO:	ID животного	0 wpi	3 wpi	5 wpi	8 wpi
				Aβ ₁₋₄₂ ELISA	Aβ ₁₋₄₂ ELISA	Aβ ₁₋₄₂ ELISA	Aβ ₁₋₄₂ ELISA
				ELISA, Титр Log ₁₀	ELISA, Титр Log ₁₀	ELISA, Титр Log ₁₀	ELISA, Титр Log ₁₀
30	1	Aβ ₁₋₁₄ -εK-KKK- MvF4 Th	62	1935	0,587	4,362	4,579
				1936	0,414	3,684	4,543
				1937	0,390	4,393	3,652
				1938	0,179	3,768	3,648
				1939	0,331	3,726	3,673
				1940	0,350	3,732	4,787
				Геометрическое сред- нее значение	0,354	3,932	4,117
40	2	Aβ ₁₋₁₄ -εK- HBsAg2 Th	63	1929	0,288	2,720	3,502
				1930	0,507	2,817	3,559
				1931	0,721	2,860	3,575
				1932	0,548	2,315	3,776
				1933	0,619	2,322	3,742
				1934	0,234	2,687	3,459
				Геометрическое сред- нее значение	0,450	2,610	3,600
45	3	Aβ ₁₋₁₄ -εK-KKK- MvF4 Th + Aβ ₁₋₁₄ -εK-HBsAg2 Th в эквимолярном соотношении	62+63	1923	0,298	4,759	4,880
				1924	0,554	4,619	4,979
				1925	0,299	4,835	4,791
				1926	0,635	4,831	4,710
				1927	0,911	5,097	4,278
				1928	0,890	5,188	4,721
				Геометрическое сред- нее значение	0,542	4,884	4,721

Таблица 6

Оценка антител, направленных против пептидов Th или элемента белка-носителя в иммуногенах, при первичной иммунизации (0 wpi) и усиливающей иммунизации (4 wpi) вакциными составами, содержащими две происходящих из $\text{A}\beta_{1-14}$ пептидных иммуногенных конструкций и их комбинации, у морских свинок

№ группы	Описание конструкции $\text{A}\beta_{1-14}$ -пептида в вакцином составе	SEQ ID NO:	ID животного	8 wpi			
				$\text{A}\beta_{1-42}$ ELISA (SEQ ID NO: 1)	MvF4 Th ELISA (SEQ ID NO: 44)	HBsAg2 Th ELISA (SEQ ID NO: 45)	KLH-ELISA
				ELISA, Титр Log ₁₀	ELISA, Титр Log ₁₀	ELISA, Титр Log ₁₀	ELISA, Титр Log ₁₀
1	$\text{A}\beta_{1-14}-\epsilon\text{K-KKK-MvF4 Th}$	62	1935	4,447	0,268	0,288	N/A
			1936	4,217	0,216	0,504	N/A
			1937	4,358	0,196	0,621	N/A
			1938	4,283	0,179	0,360	N/A
			1939	4,163	0,332	0,519	N/A
			1940	3,813	0,286	0,233	N/A
			Геометрическое среднее значение	4,208	0,240	0,397	N/A
2	$\text{A}\beta_{1-14}-\epsilon\text{K-HBsAg2 Th}$	63	1929	3,596	0,575	0,431	N/A
			1930	3,653	0,423	0,257	N/A
			1931	3,696	0,380	0,345	N/A
			1932	3,681	0,279	0,563	N/A
			1933	3,836	0,336	0,365	N/A
			1934	3,744	0,425	0,354	N/A
			Геометрическое среднее значение	3,700	0,393	0,375	N/A
3	$\text{A}\beta_{1-14}-\epsilon\text{K-KKK-MvF4 Th} + \text{A}\beta_{1-14}-\epsilon\text{K-HBsAg2 Th}$ в эквимолярном соотношении по массе	62+63	1923	4,803	0,350	0,631	N/A
			1924	4,702	0,724	0,350	N/A
			1925	4,955	0,324	0,391	N/A
			1926	5,150	0,394	0,452	N/A
			1927	4,313	0,520	0,368	N/A
			1928	5,206	0,528	0,364	N/A
			Геометрическое среднее значение	4,845	0,455	0,417	N/A
4	KLH-(C)- $\text{A}\beta_{1-14}$	4	1968	3,626	N/A	N/A	7,006
			1969	3,981	N/A	N/A	7,167
			1970	2,227	N/A	N/A	4,658
			1971	3,005	N/A	N/A	5,593
			1974	2,527	N/A	N/A	7,000
			1975	2,599	N/A	N/A	7,000
			Геометрическое среднее значение	2,931	N/A	N/A	6,326

Таблица 7

Оценка иммуногенности у павианов при первичной иммунизации (0 wpi) и усиливающих иммунизациях (3 и 6 wpi) вакциными составами, содержащими различные количества происходящих из $\text{A}\beta_{1-14}$ пептидных иммуногенных конструкций (SEQ ID NO: 62+63) в ISA51 эмульсии типа w/o и в квасцах

№ группы	Описание вакцинного состава	ID животного	0 wpi	5 wpi	8 wpi	10 wpi	14 wpi
			$\text{A}\beta_{1-42}$ ELISA Титр Log ₁₀				
1	SEQ ID NO:62+SEQ ID NO:63 в эквимолярном соотношении в количестве 100 мкг в 0,5 мл квасцов (alhydro-gel)	X798	1,397	2,463	2,985	2,337	1,478
2	SEQ ID NO:62+SEQ ID NO:63 в эквимолярном соотношении в количестве 25 мкг в 0,5 мл эмульсия типа (w/o) ISA51	X1498	1,394	3,462	3,236	2,422	1,774
3	SEQ ID NO:62+SEQ ID NO:63 в эквимолярном	X299	1,140	3,038	3,427	3,345	2,205

	соотношении в количестве 100 мкг в 0,5 мл эмульсии типа (w/o) ISA51						
--	---	--	--	--	--	--	--

5		X1098	1,610	3,987	4,460	4,662	3,666				
		X398	1,541	3,926	4,353	4,095	2,972				
10	4	Геометрическое среднее значение	1,414	3,623	4,052	3,997	2,885				
		SEQ ID NO:62+SEQ ID NO:63 в эквимолярном соотношении в количестве 100 мкг в 0,5 мл эмульсии типа (w/o) ISA51	X1198	1,696	3,696	5,051	5,115				
15		Описание пептидной конструкции Аβ ₁₋₁₄ в вакцинном составе	SEQ ID NO:	ID животного	8 wpi						
					Аβ ₁₋₄₂ ELISA (SEQ ID NO: 1)	MvF 5 Th ELISA (SEQ ID NO: 46)	HBsAg3 Th ELISA (SEQ ID NO: 47)				
20	1	Aβ ₁₋₁₄ -εK-KKK-MvF5 Th + Aβ ₁₋₁₄ -εK-HBsAg3 Th в эквимолярном соотношении	64+65	2123 2124 2125 2126 2127 2128 Геометрическое среднее значение	ELISA Титр Log ₁₀	ELISA Титр Log ₁₀	ELISA Титр Log ₁₀				
					4,683	0,210	0,314				
25					3,884	0,325	0,421				
					3,923	0,433	0,311				
30					3,578	0,542	0,554				
					3,348	0,520	0,381				
35					3,482	0,403	0,415				
					3,792	0,387	0,392				

Таблица 8							
Оценка антител (из сывороток морских свинок 8 wpi), направленных против пептидов Th в иммуногенных конструкциях Аβ-пептидов при первичной иммунизации (0 wpi) и усиливающей иммунизации (4 wpi) вакцинным составом, содержащим две иммуногенные конструкции Аβ ₁₋₁₄ -пептида							
№ группы	Описание пептидной конструкции Аβ ₁₋₁₄ в вакцинном составе	SEQ ID NO:	ID животного	8 wpi			
				Aβ ₁₋₄₂ ELISA (SEQ ID NO: 1)	MvF 5 Th ELISA (SEQ ID NO: 46)	HBsAg3 Th ELISA (SEQ ID NO: 47)	
20	1	Aβ ₁₋₁₄ -εK-KKK-MvF5 Th + Aβ ₁₋₁₄ -εK-HBsAg3 Th в эквимолярном соотношении	64+65	2123	4,683	0,210	0,314
				2124	3,884	0,325	0,421
				2125	3,923	0,433	0,311
				2126	3,578	0,542	0,554
				2127	3,348	0,520	0,381
				2128	3,482	0,403	0,415
				Геометрическое среднее значение	3,792	0,387	0,392

Таблица 9

Картирование эпитопа для точного анализа специфичности на N-конце Аβ₁₋₄₂ с использованием сывороток от вакцинированных павианов, полученных в период иммунизации (от 0 до 111 wpi)

Пептид SEQ ID NO:	Последовательность пептида	Титры ELISA (Log ₁₀)			
		Недели после иммунизации			
		0	10	84	111
8	T E E I S E V K M D	0,23	0,26	0,16	0,15
9	E E I S E V K M D A	0,24	0,30	0,21	0,22
10	E I S E V K M D A E	0,23	0,25	0,16	0,14
11	I S E V K M D A E F	0,20	0,20	0,15	0,13
12	S E V K M D A E F R	0,21	0,24	0,16	0,13
13	E V K M D A E F R H	0,19	0,23	0,16	0,14
14	V K M D A E F R H D	0,27	0,46	0,48	0,55
15	K M D A E F R H D S	0,26	0,36	0,41	0,51
16	M D A E F R H D S G	0,26	0,32	0,16	0,17
6	D A E F R H D S G Y	0,26	3,26	3,65	3,21
17	A E F R H D S G Y E	0,25	0,35	0,25	0,19
18	E F R H D S G Y E V	0,24	0,30	0,18	0,18
19	F R H D S G Y E V H	0,20	0,40	0,22	0,30
20	R H D S G Y E V H H	0,23	0,34	0,27	0,41
21	H D S G Y E V H H Q	0,21	0,40	0,18	1,14

22	D S G Y E V H H Q K	0,32	0,78	0,64	0,76
23	S G Y E V H H Q K L	0,13	0,49	0,51	0,78
24	G Y E V H H Q K L V	0,13	0,27	0,19	0,12
25	Y E V H H Q K L V F	0,16	0,43	0,15	0,22
26	E V H H Q K L V F F	0,17	0,26	0,13	0,13
27	V H H Q K L V F F A	0,16	0,23	0,12	0,11
28	H H Q K L V F F A E	0,19	0,22	0,13	0,12
29	H Q K L V F F A E D	0,18	0,21	0,13	0,13
3	A β ₁₋₂₈ D A E F R H D S G Y E V H H Q K L V F F A E D V G S N K	0,12	3,26	3,57	3,32

Таблица 10 Картирование эпитопов посредством ELISA конкурентного ингибиования с гипериммунными сыворотками от павианов						
Концентрация пептида (мкг/мл)	Процентное (%) ингибиование в ELISA после предварительного поглощения пептида из сыворотки					
	A β ₁₋₂₈ (SEQ ID NO: 3)	A β ₁₋₁₀ (SEQ ID NO: 6)	A β _{[1]-9} (SEQ ID NO: 16)	A β ₂₋₁₁ (SEQ ID NO: 17)	A β ₃₋₁₂ (SEQ ID NO: 18)	A β ₁₇₋₄₃ (SEQ ID NO: 67)
32	99	97	39	19	3	7
	8	93	93	17	6	0
	2	72	82	8	0	5
	1	63	72	4	0	10
	0,5	50	55	9	0	9
	0,25	34	37	8	3	5
	0	0	0	0	0	0

50% ингибиование A β ₁₋₁₀-пептида происходит при приблизительно 0,3 мкг/мл.

10 Специфичность антитела против A β павиана в основном нацелена на N-концевую аспарагиновую кислоту (D).

15 Картирование эпитопов с использованием 10-мерных пептидов A β белка-предшественника амилоида человека (hAPP), обнаруженных с использованием образцов иммунной сыворотки павианов, демонстрирует специфичность в отношении N-концевого A β ₁₋₁₀-пептида.

20 Таблица 11
Эффект повторных доз вакцины UBI AD на титрах антител (Log₁₀) у яванских макак

Группа мкг/доза	Время (неделя)							
	0	3	6	9	12	15	21	После 27
0	0,838±0,410	1,249±0,190	1,169±0,206	1,790±0,408	1,382±0,392	1,199±0,261	1,068±0,142	0,860±0,257
150	1,056±0,186	2,252±0,702	3,507±0,493	3,714±0,461	3,287±0,577	3,905±0,669	3,580±0,315	3,644±1,403
750	0,829±0,185	3,169±0,487	4,217±0,415	4,316±0,416	3,784±0,278	3,977±0,125	4,027±0,222	3,596±0,080

35 N = 6 макак на группу (недели 0, 3, 6, 9, 12 и 15)

N = 3 макаки на группу (недели 21, 27)

Таблица 12

Анализы специфичности антисывороток, взятых на 9 и 15 неделях от яванских макаков, иммунизированных плацебо-вакциной (0 мкг /доза) или вакциной UBI AD (150 мкг/доза или 750 мкг/доза)

SEQ ID NO:	Последовательность	0 мкг/доза		150 мкг/доза		750 мкг/доза	
		9 WPI	15 WPI	9 WPI	15 WPI	9 WPI	15 WPI
8	T E E I S E V K M D	0,065	0,054	0,075	0,084	0,061	0,078
9	E E I S E V K M D A	0,061	0,060	0,082	0,092	0,081	0,076
10	E I S E V K M D A E	0,053	0,070	0,060	0,056	0,064	0,053
11	I S E V K M D A E F	0,059	0,055	0,055	0,058	0,063	0,062
12	S E V K M D A E F R	0,045	0,047	0,056	0,053	0,054	0,050
13	E V K M D A E F R H	0,047	0,041	0,046	0,047	0,054	0,047

14	V K M D A E F R H D		0,050	0,043	0,068	0,053	0,061	0,054
15	K M D A E F R H D S		0,056	0,055	0,065	0,031	0,069	0,062
16	M D A E F R H D S G		0,049	0,041	0,056	0,061	0,051	0,056
6	D A E F R H D S G Y	N-конец	0,051	0,053	0,691	0,725	0,972	1,682
17	A E F R H D S G Y E		0,045	0,054	0,058	0,059	0,054	0,060
18	E F R H D S G Y E V		0,054	0,046	0,047	0,060	0,042	0,052
19	F R H D S G Y E V H		0,051	0,060	0,085	0,076	0,066	0,096
20	R H D S G Y E V H H		0,054	0,060	0,296	0,400	0,453	0,461
21	H D S G Y E V H H Q		0,059	0,052	0,266	0,494	0,419	0,332
22	D S G Y E V H H Q K		0,042	0,051	0,270	0,289	0,405	0,197
10	S G Y E V H H Q K L		0,051	0,048	0,097	0,071	0,077	0,082
24	G Y E V H H Q K L V		0,042	0,047	0,055	0,067	0,052	0,059
25	Y E V H H Q K L V F		0,042	0,036	0,092	0,069	0,069	0,058
26	E V H H Q K L V F F		0,034	0,034	0,044	0,051	0,042	0,044
27	V H H Q K L V F F A		0,037	0,039	0,046	0,082	0,057	0,083
15	H H Q K L V F F A E		0,038	0,040	0,044	0,052	0,046	0,032
29	H Q K L V F F A E D		0,048	0,051	0,050	0,058	0,047	0,050
30	Q K L V F F A E D V		0,044	0,047	0,043	0,055	0,062	0,059
3	A β ₁₋₂₈	DAE F R H D S G Y E V H H Q K L V F F A E D V G S N K	NA	0,087	NA	3,107	NA	3,069

NA = не доступно

20	Таблица 13 Концентрация A β ₁₋₄₀ (пг/мл) у яванских макаков до и после введения вакцины UBI AD в сыворотке (верхняя панель) и спинномозговой жидкости (нижняя панель)																				
	A β ₁₋₄₀ в сыворотке																				
25	<table border="1"><thead><tr><th>Доза вакцины</th><th>0 wpi (n=6)</th><th>15 wpi (n=6)</th><th>21 wpi (n=3)</th><th>26 wpi (n=3)</th></tr></thead><tbody><tr><td>0 мкг (контроль)</td><td>61,7±12,7</td><td>63,0±16,8</td><td>63,7±12,2</td><td>52,7±2,5</td></tr><tr><td>150 мкг</td><td>53,9±6,3</td><td>127,4±23,8</td><td>144,8±17,3</td><td>158,0±38,1</td></tr><tr><td>750 мкг</td><td>56,8±7,7</td><td>138,2±18,9</td><td>144,5±22,5</td><td>118,0±20,9</td></tr></tbody></table>	Доза вакцины	0 wpi (n=6)	15 wpi (n=6)	21 wpi (n=3)	26 wpi (n=3)	0 мкг (контроль)	61,7±12,7	63,0±16,8	63,7±12,2	52,7±2,5	150 мкг	53,9±6,3	127,4±23,8	144,8±17,3	158,0±38,1	750 мкг	56,8±7,7	138,2±18,9	144,5±22,5	118,0±20,9
Доза вакцины	0 wpi (n=6)	15 wpi (n=6)	21 wpi (n=3)	26 wpi (n=3)																	
0 мкг (контроль)	61,7±12,7	63,0±16,8	63,7±12,2	52,7±2,5																	
150 мкг	53,9±6,3	127,4±23,8	144,8±17,3	158,0±38,1																	
750 мкг	56,8±7,7	138,2±18,9	144,5±22,5	118,0±20,9																	
30	A β ₁₋₄₀ в спинномозговой жидкости																				
	<table border="1"><thead><tr><th>Доза вакцины</th><th>15 wpi (n=3)</th><th>28 wpi (n=3)</th></tr></thead><tbody><tr><td>0 мкг (контроль)</td><td>56,4±6,0</td><td>59,7±5,9</td></tr><tr><td>150 мкг</td><td>63,9±6,5</td><td>67,6±5,4</td></tr><tr><td>750 мкг</td><td>57,5±5,9</td><td>54,3±2,9</td></tr></tbody></table>	Доза вакцины	15 wpi (n=3)	28 wpi (n=3)	0 мкг (контроль)	56,4±6,0	59,7±5,9	150 мкг	63,9±6,5	67,6±5,4	750 мкг	57,5±5,9	54,3±2,9								
Доза вакцины	15 wpi (n=3)	28 wpi (n=3)																			
0 мкг (контроль)	56,4±6,0	59,7±5,9																			
150 мкг	63,9±6,5	67,6±5,4																			
750 мкг	57,5±5,9	54,3±2,9																			

35	Таблица 14 Пролиферация, выраженная в качестве индекса стимуляции в мононуклеарных клетках периферической крови яванского макака при сокультивировании с различными A β -пептидами						
	Пептидный домен	Индекс стимуляции (S.I.) [положительный S.I.>4,0]					
	Группа 1, плацебо-вакцина, контроль	Группа 2, вакцина UBITh® AD (низкая доза)	Группа 3, вакцина UBITh® AD (высокая доза)				
40	A β ₁₋₁₄	--	(1,5)	--	(0,2)	--	(1,2)
	A β ₁₋₁₆	++	(12,7)	+	(7,8)	+	(7,9)
	A β ₁₇₋₄₂	++++	(83,7)	++++	(46,9)	++++	(56,6)
	A β ₁₋₄₂	++	(16,0)	++	(15,1)	++	(15,5)
	A β ₁₋₁₄ (SEQ ID NO: 4) DAEFRHDSGYEVHH A β ₁₋₁₆ (SEQ ID NO: 66) DAEFRHDSGYEVHHQK A β ₁₇₋₄₂ (SEQ ID NO: 67) LVFFAEDVGSNKGAIGLMVGVVIA A β ₁₋₄₂ (SEQ ID NO: 1) DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIGLMVGVVIA						

45	Таблица 15 Измерение концентрации цитокинов в мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC) яванского макака при стимуляции пептидами A β ₁₋₁₄ , A β ₁₋₄₂ или митогеном PHA (фитогемагглютинин) ^a				
	Цитокин	Доза вакцины	Концентрация цитокина ^b (пг/мл)		
			A β ₁₋₁₄	A β ₁₋₄₂	PHA

		Плацебо	BDL ^c	23,3±13,1	90,6±12,4
		150 мкг	BDL	19,4±9,7	96,1±13,3
		750 мкг	BDL	25,2±11,8	97,5±6,6
5	IL-6	Плацебо	BDL	23,1±11,7	69,1±12,0
		150 мкг	BDL	15,0±9,1	70,6±15,7
		750 мкг	BDL	23,4±10,5	66,2±7,3
10	TNF-α	Плацебо	BDL	9,2±5,3	91,0±29,1
		150 мкг	BDL	7,9±4,8	96,1±22,2
		750 мкг	BDL	7,8±5,9	89,0±13,7

^a Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) от шести яванских макаков культивировали в течение 24 часов после последней иммунизации (15 wpi) в отсутствие или в присутствии Аβ-пептидов или митогена РНА. Культуральные супернатанты исследовали в отношении поддающихся обнаружению концентраций каждого цитокина (IL2, IL6 и TNFα) с использованием коммерческих тестов ELISA (U-CyTech Biosciences, Utrecht, The Netherlands).

^b Результат показан в качестве среднего значения ± стандартное отклонение.

^c BDL, ниже уровня обнаружения.

Таблица 16
Сравнение иммуногенности вакцины UBI AD при различных уровнях доз у морских свинок, макаков-резус и павианов

Вид [BW]	Доза пептида (мкг) ²		Титр антител, Log ₁₀ >2 ³	
	на животное	на кг массы тела	Через 3 недели после 1 дозы	Через 3 недели после 2 доз
Морская свинка [300–400 грамм]	1	2,5–3,3	0/3 ⁴	0/3
	3	7,5–10	0/3	0/3
	10	25–33	0/6	5/6
	30	75–100	1/6	6/6
	100	250–333	2/3	3/3
	300	750–1000	2/3	3/3
Макак [4–5 кг]	150	30–37,5	4/6	6/6
	750	150–187,5	6/6	6/6
Павиан [10–15 кг]	300 – A ¹	20–30	3/4	4/4
	300 – B ¹	20–30	2/2	2/2
	1200	80–120	2/2	2/2

¹ Павианов иммунизировали в части А на 0 и 3 неделях и в части В на 78 и 81 неделях (после периода покоя 72 недели).

² Каждый 1 мл дозы содержал 600 мкг пептида.

³ Величины Log₁₀>2 считаются положительными титрами антител против Аβ.

⁴ Числа соответствуют количеству животных с положительными титрами/общее число исследованных животных.
BW: масса тела

35

40

45

Таблица 17

Картирование эпитопа для точного анализа специфичности на N-конце А β_{1-42} с использованием сывороток от всех вакцинированных пациентов (16 wpi)

SEQ ID NO:	Последовательность пептида	Положение А β	Пациенты																
			P101	P102	P103	P104	P105	P106	P107	P108	P109	P201	P202	P203	P204	P205	P206	P207	P208
8	TEEI SEVKMD	-9-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	EEI SEVKMDA	-8-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	EI SEVKMDAE	-7-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	I SEVKMDAEF	-6-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	SEVKMDAEFR	-5-5	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	EVKMDAEFRH	-4-6	1	0	0	0	0	0	0	0	58	0	0	0	0	1	0	0	0
14	VKMDAEFRHD	-3-7	31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	13
15	KMDAEFRHDS	-2-8	94	0	0	0	0	0	0	0	2	7	0	12	0	0	0	0	52
16	MDAEFRHDSG	-1-9	420	12	0	0	0	0	0	0	19	116	0	17	0	0	2	6	0
6	DAEFRHDSGY	N-конец	1-10	1983	1669	36	1721	3840	5193	2838	948	1675	1034	42313	1284	274	81	1797	6024
17	AEFRHDSGYE	2-11	2	0	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0	0	0	0	0
18	EFRHDSGYEV	3-12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	FRHDSGYEVH	4-13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	RHDSGYEVHH	5-14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	HDSGYEVHHQ	6-15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	DSGYEVHHHQK	7-16	214	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	SGYEVHHHQKL	8-17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	GYEVHHHQKLV	9-18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0
25	YEVHHHQKLVF	10-19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0
26	EVHHHQKLVFF	11-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	VHHHQKLVFFA	12-21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	27	0	0	0
28	HHQKLVFFAE	13-22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	HQKLVFFAED	14-23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	QKLVFFAEDV	15-24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	DAEFRHDSGYEVHHHQKLVFFAEDVGNSN	1-28	685	161	220	295	450	715	1163	478	430	339	509	279	284	39	226	906	1157
25																			1321

Таблица 18

Анализ концентраций А β_{1-40} (пг/мл) в плазме пациентов с AD до и после иммунизации вакциной UBI AD и корреляция с титром антител против А β_{1-28} (Log₁₀) в нисходящем порядке

ID пациента (n = 12)	Ab против А β_{1-28} (Log ₁₀), 16 неделя	А β_{1-40} (пг/мл), 0 неделя	А β_{1-40} (пг/мл), 16 неделя	А β_{1-40} (пг/мл) 16 неделя – 0 неделя
P207	3,504	72,6	114,5	41,9
P105	3,164	53,5	75,1	21,6
P106	3,048	124,9	145,8	20,9
P109	2,778	492,9	1031,9	639,0
P108	2,622	29,3	44,4	15,1
P208	2,594	85,2	129,9	44,7
P206	2,462	90,2	102,1	11,9
P204	2,420	30,7	45,1	14,4
P205	1,989	77,7	72,0	-5,7
P107	1,790	147,0	92,7	-54,3
P209	1,467	58,6	87,7	29,1
P210	1,449	44,4	32,6	-11,8

Данные полужирным шрифтом соответствуют увеличенным уровням А β_{1-40} на 16 неделе после иммунизаций вакциной UBI AD на 0, 4 и 12 неделях.

Таблица 19

Средние индексы стимуляции мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC) от пациентов, полученными на 0 неделе и 16 неделе, при сокульттивировании с различными А β -пептидами

Пептид (SEQ ID NO:)	0 неделя	16 неделя	Разность	Парный t-критерий
	Среднее значение (SD)	Среднее значение (SD)	Среднее значение (SD)	значение p
A β_{1-14} (SEQ ID NO: 4)	0,93 (0,36)	0,90 (0,22)	-0,03 (0,39)	0,73
A β_{1-16} (SEQ ID NO: 66)	0,92 (0,30)	0,98 (0,25)	0,06 (0,40)	0,54

5	A β ₁₋₂₈ (SEQ ID NO: 3)	0,96 (0,30)	1,04 (0,34)	0,08 (0,56)	0,55
	A β ₁₇₋₄₂ (SEQ ID NO: 67)	0,96 (0,34)	1,04 (0,29)	0,08 (0,49)	0,47
	A β ₁₋₄₂ (SEQ ID NO: 1)	0,97 (0,38)	1,08 (0,49)	0,10 (0,53)	0,40
	p1412*	0,87 (0,22)	0,99 (0,33)	0,11 (0,34)	0,18
	PHA	28,73 (14,24)	27,75 (32,85)	-0,98 (26,57)	0,87

* p1412 представляет собой посторонний контрольный пептид.

Статистический анализ: Различия пролиферации лимфоцитов между 0 неделей и 16 неделей исследовали с использованием парного t-критерия.

Различия между изменением средних концентраций цитокинов (16 неделя против 0 недели) в ответ на пептиды

А β и контроли исследовали с использованием парного знакового рангового критерия Уилкоксона. Уровни статистической значимости определяли с использованием 2-сторонних критериев ($p<0,05$). Для всех статистических анализов использовали R (версия 2.13.0).

Таблица 20

Средние концентрации цитокинов (SD) (пг/мл)¹, продуцируемых мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC) от пациентов, полученными на 0 неделе и 16 неделе, при сокульттивировании с различными А β -пептидами

Пептид (SEQ ID NO:)	Th1				Th2				Оба	
	IL-2		IFN- γ		IL-6		IL-10		TNF- α	
	0 неделя	16 неделя	0 неделя	16 неделя	0 неделя	16 неделя	0 неделя	16 неделя	0 неделя	16 неделя
A β ₁₋₁₄ (4)	31,06 (32,48)	31,20 (24,29)	13,52 (16,88)	16,07 (12,88)	31,34 (29,67)	50,74 (51,97)	5,67 (1,56)	5,62 (1,58)	36,82 (62,84)	39,84 (51,69)
A β ₁₋₁₆ (66)	31,42 (31,38)	35,98 (23,93)	14,95 (16,14)	13,76 (14,19)	52,50 (31,68)	50,35 (42,63)	5,70 (1,63)	5,81 (1,78)	47,42 (72,17)	47,25 (69,73)
A β ₁₋₂₈ (3)	36,73 (34,29)	40,55 (27,99)	15,99 (23,57)	20,68 (24,39)	31,74 (25,38)	42,27 (41,84)	5,61 (1,52)	6,17 (2,46)	41,59 (66,53)	51,20 (67,78)
A β ₁₇₋₄₂ (67)	24,59 (-25,68)	29,15 (21,17)	9,67 (9,74)	13,58 (15,63)	>44,55 (70,86) ³	46,90 (51,30)	5,34 (0,86)	5,56 (1,54)	15,60 (18,44)	24,78 (39,26)
A β ₁₋₄₂ (1)	23,06 (17,65)	27,34 (16,86)	13,42 (16,12)	>44,84 (77,34)	>141,25 (130,11) ⁴	>202,02 (121,32) ⁵	11,13 (22,68)	31,90 (50,21)	>31,63 (71,46) ³	>88,78 ⁶ (132,91)
p1412	30,88 (27,42)	39,96 (25,97)	14,40 (18,39)	21,72 (29,89)	31,81 (52,12)	60,69 (95,80)	5,25 (0,64)	5,18 (0,53)	17,14 (23,50)	20,85 (29,26)

РНК	10,38 ⁷ (11,34)	12,84 ⁷ (6,49)	>320,00 (0,00) ²	>318,91 (4,77) ²	>320,00 (0,00) ²	>320,00 (0,00) ²	173,83 (84,75)	>162,77 (99,70)	>313,01 (30,48) ²	>300,87 (46,51) ²
Клеточный контроль	33,36 (24,91)	38,83 (33,08)	13,81 (12,29)	17,84 (18,24)	45,86 (41,93)	65,31 (76,54)	5,88 (2,45)	5,73 (1,59)	44,32 (70,90)	46,72 (67,76)

1. Поддающийся количественному определению диапазон анализа составляет от 5 до 320 пг/мл.

2. Концентрации у 90% или более пациентов были выше предела количественного определения (AQL), т.е. 320 пг/мл.

3. Один пациент имел величину AQL.

4. Шесть пациентов имели величины AQL.

5. Восемь пациентов имели величины AQL.

6. Четыре пациента имели величины AQL.

7. Отсутствие продукции IL-2, наблюдаемое в ответ на митоген РНК, согласуется с данными, сообщенными Katial et al., 1998, в сходных экспериментальных условиях.

(57) Формула изобретения

1. Фармацевтическая композиция для профилактики и/или лечения деменции альцгеймеровского типа, включающая:

a) комбинацию иммуногенных конструкций А β пептида с последовательностями

SEQ ID NO: 62 и 63; и

b) фармацевтически приемлемый носитель для доставки и/или адьювант.

2. Фармацевтическая композиция по п. 1, где фармацевтически приемлемым носителем для доставки и/или адьювантом согласно (b) является фосфат алюминия (AlPO4).

3. Фармацевтическая композиция по п. 1, дополнительно содержащая СрG-

олигодезоксинуклеотид (ODN).

4. Фармацевтическая композиция по п. 1, где иммуногенные конструкции А β пептида комбинации согласно (a) присутствуют в равном молярном соотношении.

5. Фармацевтическая композиция по п. 3, где фармацевтически приемлемым носителем

для доставки и/или адъювантом является фосфат алюминия (AlPO4).

6. Фармацевтическая композиция по п. 1, дополнительно содержащая СрG-олигодезоксинуклеотид (ODN),

где иммуногенные конструкции Аβ пептида согласно (а) присутствуют в равном

5 молярном соотношении, и

где иммуногенные конструкции Аβ пептида и СрG-олигодезоксинуклеотид находятся в форме стабилизированного иммуностимулирующего комплекса, и

где фармацевтически приемлемым носителем для доставки и/или адъювантом согласно (б) является фосфат алюминия (AlPO4).

10 7. Фармацевтическая композиция для профилактики и/или лечения деменции альцгеймеровского типа, состоящая из:

а) комбинации иммуногенных конструкций Аβ пептида с последовательностями SEQ ID NO: 62 и 63;

б) СрG-олигодезоксинуклеотида (ODN); и

15 в) фармацевтически приемлемого носителя для доставки и/или адъюванта,

где иммуногенные конструкции Аβ пептида согласно (а) и СрG-олигодезоксинуклеотид согласно (б) находятся в форме стабилизированного иммуностимулирующего комплекса, и

где фармацевтически приемлемым носителем для доставки и/или адъювантом

20 согласно (с) является фосфат алюминия (AlPO4).

8. Способ выработки антител у человека, которые распознают N-конец амилоида-бета (Аβ) у человека, включающий:

введение человеку фармацевтической композиции по п. 1.

9. Способ профилактики болезни Альцгеймера (AD) у человека, включающий:

25 введение человеку фармацевтической композиции по п. 1.

10. Способ лечения болезни Альцгеймера (AD) у пациента, включающий:

введение человеку фармацевтической композиции по п. 1.

11. Фармацевтическая композиция для профилактики и/или лечения деменции альцгеймеровского типа, включающая:

30 а) комбинацию иммуногенных конструкций Аβ пептида с последовательностями SEQ ID NO: 64 и 65; и

б) фармацевтически приемлемый носитель для доставки и/или адъюванта.

12. Фармацевтическая композиция по п. 11, где фармацевтически приемлемым носителем для доставки и/или адъювантом согласно (б) является фосфат алюминия (AlPO4).

35 13. Фармацевтическая композиция по п. 11, дополнительно содержащая СрG-олигодезоксинуклеотид (ODN).

14. Фармацевтическая композиция по п. 11, где иммуногенные конструкции Аβ пептида комбинации согласно (а) присутствуют в равном молярном соотношении.

40 15. Фармацевтическая композиция по п. 13, где фармацевтически приемлемым носителем для доставки и/или адъювантом является фосфат алюминия (AlPO4).

16. Фармацевтическая композиция по п. 11, дополнительно содержащая СрG-олигодезоксинуклеотид (ODN),

где иммуногенные конструкции Аβ пептида согласно (а) присутствуют в равном молярном соотношении, и

где иммуногенные конструкции Аβ пептида и СрG-олигодезоксинуклеотид находятся в форме стабилизированного иммуностимулирующего комплекса, и

где фармацевтически приемлемым носителем для доставки и/или адъювантом

согласно (b) является фосфат алюминия (AlPO4).

17. Фармацевтическая композиция для профилактики и/или лечения деменции альцгеймеровского типа, состоящая из:

а) комбинации иммуногенных конструкций А β пептида с последовательностями SEQ

5 ID NO: 64 и 65;

б) CpG-олигодезоксинуклеотида (ODN); и

с) фармацевтически приемлемого носителя для доставки и/или адьюванта,

где иммуногенные конструкции А β пептида согласно (а) и CpG-

10 олигодезоксинуклеотид согласно (б) находятся в форме стабилизированного

иммуностимулирующего комплекса, и

где фармацевтически приемлемым носителем для доставки и/или адьювантом согласно (с) является фосфат алюминия (AlPO4).

18. Способ выработки антител у человека, которые распознают N-конец амилоида-бета (A β) у человека, включающий:

15 введение человеку фармацевтической композиции по п. 11.

19. Способ профилактики болезни Альцгеймера (AD) у человека, включающий:

введение человеку фармацевтической композиции по п. 11.

20. Способ лечения болезни Альцгеймера (AD) у пациента, включающий:

введение человеку фармацевтической композиции по п. 11.

20

25

30

35

40

45

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Wang, Chang-Yi

<120> ПЕПТИДНАЯ ВАКЦИНА ДЛЯ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ИММУНОТЕРАПИИ ДЕМЕНЦИИ АЛЬЦГЕЙМЕРОВСКОГО ТИПА

<130> 1004263.211WO (2032-WO)

<140> PCT/US2013/37865

<141> 2013-04-23

<150> 13843883

<151> 2013-03-15

<160> 67

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 42

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (1)..(42)

<223> А-бета 1-42 или APP 770(D672-A713)

<400> 1

Asp	Ala	Glu	Phe	Arg	His	Asp	Ser	Gly	Tyr	Glu	Val	His	His	Gln	Lys
1															15

Leu	Val	Phe	Phe	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Ser	Asn	Lys	Gly	Ala	Ile	Ile
				20				25					30		

Gly	Leu	Met	Val	Gly	Gly	Val	Val	Ile	Ile						
				35			40								

<210> 2

<211> 40

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (1)..(40)

<223> А-бета 1-40 или APP770(D672-V711)

<400> 2

Asp	Ala	Glu	Phe	Arg	His	Asp	Ser	Gly	Tyr	Glu	Val	His	His	Gln	Lys
1															15

Leu	Val	Phe	Phe	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Ser	Asn	Lys	Gly	Ala	Ile	Ile
				20				25					30		

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
 35 40

<210> 3
 <211> 28
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ПЕПТИД
 <222> (1)..(28)
 <223> А-бета 1-28 или APP770 (D672-K699)

<400> 3

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys
 20 25

<210> 4
 <211> 14
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ПЕПТИД
 <222> (1)..(14)
 <223> А-бета 1-14 или APP770 (D672-H685)

<400> 4

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His
 1 5 10

<210> 5
 <211> 12
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ПЕПТИД
 <222> (1)..(12)
 <223> А-бета 1-12 или APP 770 (D672-V683)

<400> 5

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val
 1 5 10

<210> 6
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(10)
<223> А-бета 1-10 или APP 770(D672-Y681)

<400> 6

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr
1 5 10

<210> 7
<211> 28
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(28)
<223> А-бета 15-42 или APP 770(Q686-A711)

<400> 7

Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala
1 5 10 15

Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
20 25

<210> 8
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(10)
<223> А-бета -9-1 или APP 770(T663-D672)

<400> 8

Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Lys Met Asp
1 5 10

<210> 9
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(10)
<223> А-бета -8-2 или APP 770(E664-A673)

<400> 9

Glu Glu Ile Ser Glu Val Lys Met Asp Ala
 1 5 10

<210> 10
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ПЕПТИД
 <222> (1)..(10)
 <223> А-бета -7-3 или APP 770(E665-E674)

<400> 10

Glu Ile Ser Glu Val Lys Met Asp Ala Glu
 1 5 10

<210> 11
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ПЕПТИД
 <222> (1)..(10)
 <223> А-бета -6-4 или APP 770(I666-F675)

<400> 11

Ile Ser Glu Val Lys Met Asp Ala Glu Phe
 1 5 10

<210> 12
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ПЕПТИД
 <222> (1)..(10)
 <223> А-бета -5-5 или APP 770(S667-R676)

<400> 12

Ser Glu Val Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg
 1 5 10

<210> 13
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> PROPEP
 <222> (1)..(10)

<223> А-бета -4-6 или APP 770(E668-H677)

<400> 13

Glu Val Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg His
1 5 10

<210> 14

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (1)..(10)

<223> А-бета -3-7 или APP 770(V669-D678)

<400> 14

Val Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg His Asp
1 5 10

<210> 15

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (1)..(10)

<223> А-бета -2-8 или APP 770(K670-S679)

<400> 15

Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser
1 5 10

<210> 16

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (1)..(10)

<223> А-бета -1-9 или APP 770(M671-G680)

<400> 16

Met Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly
1 5 10

<210> 17

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(10)
<223> А-бета 2-11 или APP 770 (A673-E682)

<400> 17

Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu
1 5 10

<210> 18
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(10)
<223> А-бета 3-12 или APP 770 (E674-V683)

<400> 18

Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val
1 5 10

<210> 19
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(10)
<223> А-бета 4-13 или APP 770 (F675-H684)

<400> 19

Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His
1 5 10

<210> 20
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(10)
<223> А-бета 5-14 или APP 770 (R676-H685)

<400> 20

Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His
1 5 10

<210> 21

<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(10)
<223> А-бета 6-15 или APP 770 (H677-Q686)

<400> 21

His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln
1 5 10

<210> 22
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(10)
<223> А-бета 7-16 или APP 770 (D678-K687)

<400> 22

Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10

<210> 23
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(10)
<223> А-бета 8-17 или APP 770 (S679-L688)

<400> 23

Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu
1 5 10

<210> 24
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(10)
<223> А-бета 9-18 или APP 770 (G680-V689)

<400> 24

Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val

1 5 10

<210> 25
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(10)
<223> А-бета 10-19 или APP 770(Y681-F690)
<400> 25

Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe
1 5 10

<210> 26
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(10)
<223> А-бета 11-20 или APP 770(E682-F691)
<400> 26

Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe
1 5 10

<210> 27
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(10)
<223> А-бета 12-21 или APP 770(V683-A692)
<400> 27

Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala
1 5 10

<210> 28
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(10)
<223> А-бета 13-22 или APP 770(H684-E693)

<400> 28

His	His	Gln	Lys	Leu	Val	Phe	Phe	Ala	Glu
1				5				10	

<210> 29

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (1)..(10)

<223> А-бета 14-23 или APP 770 (H685-D694)

<400> 29

His	Gln	Lys	Leu	Val	Phe	Phe	Ala	Glu	Asp
1				5				10	

<210> 30

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (1)..(10)

<223> А-бета 15-24 или APP 770 (Q686-V695)

<400> 30

Gln	Lys	Leu	Val	Phe	Phe	Ala	Glu	Asp	Val
1				5				10	

<210> 31

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (1)..(7)

<223> А-бета 16-22 или APP 770 (K687-E693)

<400> 31

Lys	Leu	Val	Phe	Phe	Ala	Glu
1				5		

<210> 32

<211> 4

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

10

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(1)
<223> эпсилон-К

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(4)
<223> спейсер А

<400> 32

Lys Lys Lys Lys
1

<210> 33
<211> 17
<212> БЕЛОК
<213> Clostridium tetani

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(17)
<223> Clostridium tetani 1 Th

<400> 33

Lys Lys Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu			
1	5	10	15

Leu

<210> 34
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Вирус кори

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(15)
<223> MvF1 Th

<400> 34

Leu Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly Val			
1	5	10	15

<210> 35
<211> 24
<212> БЕЛОК
<213> Bordetella pertussis

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(24)
<223> Bordetella pertussis Th

11

<400> 35

1	Gly Ala Tyr Ala Arg Cys Pro Asn Gly Thr Arg Ala Leu Thr Val Ala
5	10
	15

Glu Leu Arg Gly Asn Ala Glu Leu
20

<210> 36

<211> 17

<212> БЕЛОК

<213> Clostridium tetani

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (1)..(17)

<223> Clostridium tetani 2 Th

<400> 36

Trp Val Arg Asp Ile Ile Asp Asp Phe Thr Asn Glu Ser Ser Gln Lys			
1	5	10	15

Thr

<210> 37

<211> 23

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (1)..(23)

<223> diphtheria bacilli - Дифтерийный Th

<400> 37

Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Val Ala Ala Leu Ser			
1	5	10	15

Ile Leu Pro Gly His Gly Cys
20

<210> 38

<211> 21

<212> БЕЛОК

<213> Plasmodium falciparum

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (1)..(21)

<223> Plasmodium falciparum Th

12

<400> 38

Asp	His	Glu	Lys	Lys	His	Ala	Lys	Met	Glu	Lys	Ala	Ser	Ser	Val	Phe
1					5				10						15

Asn	Val	Val	Asn	Ser
				20

<210> 39

<211> 17

<212> БЕЛОК

<213> Schistosoma mansoni

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (1)..(17)

<223> Schistosoma mansoni Th

<400> 39

Lys	Trp	Phe	Lys	Thr	Asn	Ala	Pro	Asn	Gly	Val	Asp	Glu	Lys	His	Arg
1					5				10						15

His

<210> 40

<211> 25

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (1)..(25)

<223> Th холерного токсина

<400> 40

Ala	Leu	Asn	Ile	Trp	Asp	Arg	Phe	Asp	Val	Phe	Cys	Thr	Leu	Gly	Ala
1					5				10						15

Thr	Thr	Gly	Tyr	Leu	Lys	Gly	Asn	Ser
					20			25

<210> 41

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Вирус кори

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (1)..(15)

<223> MvF 2 Th

<400> 41

Ile Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Ile Glu Gly Ile
 1 5 10 15

<210> 42
 <211> 22
 <212> БЕЛОК
 <213> Вирус кори

<220>
 <221> ПЕПТИД
 <222> (1)..(22)
 <223> KKKMvF 3 Th

<220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (7)..(7)
 <223> S или T

<220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (10)..(10)
 <223> K или R

<220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (11)..(11)
 <223> G или T

<220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (15)..(15)
 <223> H или T

<220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (16)..(16)
 <223> K или R

<220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (19)..(19)
 <223> G или T

<400> 42

Lys Lys Lys Ile Ser Ile Xaa Glu Ile Xaa Xaa Val Ile Val Xaa Xaa
 1 5 10 15

Ile Glu Xaa Ile Leu Phe
 20

<210> 43
 <211> 18
 <212> БЕЛОК
 <213> Вирус гепатита B

<220>
 <221> ПЕПТИД

<222> (1)..(18)
 <223> HBsAg 1 Th

 <220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (1)..(1)
 <223> К или R

 <220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (2)..(2)
 <223> К или R

 <220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (3)..(3)
 <223> К или R

 <220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (4)..(4)
 <223> L или I или V или F

 <220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (5)..(5)
 <223> F или K или R

 <220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (6)..(6)
 <223> L или I или V или F

 <220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (7)..(7)
 <223> L или I или V или F

 <220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (9)..(9)
 <223> K или R

 <220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (10)..(10)
 <223> L или I или V или F

 <220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (11)..(11)
 <223> L или I или V или F

 <220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (13)..(13)
 <223> L или I или V или F

 <220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (15)..(15)
 <223> Q или L или I или V или F

 <220>

<221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (17)..(17)
 <223> L или I или V или F

<220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (18)..(18)
 <223> D или R

<400> 43

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Pro Xaa Ser		
1	5	10
		15

Xaa Xaa

<210> 44
 <211> 19
 <212> БЕЛОК
 <213> Вирус кори

<220>
 <221> ПЕПТИД
 <222> (1)..(19)
 <223> MvF 4 Th

<220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (4)..(4)
 <223> S или T

<220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (7)..(7)
 <223> K или R

<220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (8)..(8)
 <223> G или T

<220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (12)..(12)
 <223> H или T

<220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (13)..(13)
 <223> K или R

<400> 44

Ile Ser Ile Xaa Glu Ile Xaa Xaa Val Ile Val Xaa Xaa Ile Glu Thr		
1	5	10
		15

Ile Leu Phe

<210> 45
 <211> 18
 <212> БЕЛОК
 <213> Вирус гепатита В

<220>
 <221> ПЕПТИД
 <222> (1)..(18)
 <223> HBsAg 2 Th

<220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (4)..(4)
 <223> I или F

<220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (5)..(5)
 <223> I или F

<220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (6)..(6)
 <223> T или L

<220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (7)..(7)
 <223> I или L

<220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (11)..(11)
 <223> I или L

<220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (14)..(14)
 <223> P или I

<220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (15)..(15)
 <223> Q или T

<220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (16)..(16)
 <223> S или T

<220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (17)..(17)
 <223> L или I

<400> 45

Lys	Lys	Lys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Thr	Arg	Ile	Xaa	Thr	Ile	Xaa	Xaa	Xaa
1															15

Xaa Asp

<210> 46
<211> 19
<212> БЕЛОК
<213> Вирус кори

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(19)
<223> MvF 5 Th

<400> 46

Ile Ser Ile Thr Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Ile Glu Thr
1 5 10 15

Ile Leu Phe

<210> 47
<211> 18
<212> БЕЛОК
<213> Вирус гепатита В

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(18)
<223> HBsAg 3 Th

<400> 47

Lys Lys Lys Ile Ile Thr Ile Arg Ile Ile Thr Ile Ile Thr Thr
1 5 10 15

Ile Asp

<210> 48
<211> 32
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(14)
<223> А-бета 1-14

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (15)..(15)
<223> эпсилон К в качестве спейсера

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (16)..(32)

<223> Clostridium tetani 1 Th

<400> 48

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Lys Lys
1 5 10 15

Lys Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu
20 25 30

<210> 49

<211> 26

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (1)...(10)

<223> А-бета 1-10

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (11)...(11)

<223> эпсилон К в качестве сплайсера

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (12)...(26)

<223> MvF 1 Th

<400> 49

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Lys Leu Ser Glu Ile Lys
1 5 10 15

Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly Val
20 25

<210> 50

<211> 28

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (1)...(12)

<223> А-бета 1-12

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (13)...(13)

<223> эпсилон К в качестве сплайсера

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (14)...(28)

<223> MvF 1 Th

<400> 50

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val Lys Leu Ser Glu			
1	5	10	15

Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly Val	
20	25

<210> 51

<211> 30

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (1)..(14)

<223> А-бета 1-14

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (15)..(15)

<223> эпсилон К в качестве сплайсера

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (16)..(30)

<223> MvF 1 Th

<400> 51

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Lys Leu			
1	5	10	15

Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly Val		
20	25	30

<210> 52

<211> 39

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (1)..(14)

<223> А-бета 1-14

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (15)..(15)

<223> эпсилон К в качестве сплайсера

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (16)..(39)

<223> Bordetella pertussis Th

<400> 52

20

Asp	Ala	Glu	Phe	Arg	His	Asp	Ser	Gly	Tyr	Glu	Val	His	His	Lys	Gly
1						5								15	

Ala	Tyr	Ala	Arg	Cys	Pro	Asn	Gly	Thr	Arg	Ala	Leu	Thr	Val	Ala	Glu
20								25					30		

Leu	Arg	Gly	Asn	Ala	Glu	Leu								
						35								

<210> 53
<211> 32
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(14)
<223> А-бета 1-14

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (15)..(15)
<223> эпсилон К в качестве спейсера

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (16)..(32)
<223> Clostridium tetani 2 Th

<400> 53

Asp	Ala	Glu	Phe	Arg	His	Asp	Ser	Gly	Tyr	Glu	Val	His	His	Lys	Trp
1						5								15	

Val	Arg	Asp	Ile	Ile	Asp	Asp	Phe	Thr	Asn	Glu	Ser	Ser	Gln	Lys	Thr
			20					25					30		

<210> 54
<211> 38
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(14)
<223> А-бета 1-14

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (15)..(15)
<223> эпсилон К в качестве спейсера

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (16)..(38)
<223> Дифтерийный Th

<400> 54

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Lys Asp			
1	5	10	15

Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Val Ala Ala Leu Ser Ile		
20	25	30

Leu Pro Gly His Gly Cys	
35	

<210> 55

<211> 36

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (1)..(14)

<223> А-бета 1-14

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (15)..(15)

<223> эпсилон К в качестве спейсера

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (16)..(36)

<223> Plasmodium falciparum Th

<400> 55

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Lys Asp			
1	5	10	15

His Glu Lys Lys His Ala Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser Val Phe Asn		
20	25	30

Val Val Asn Ser	
35	

<210> 56

<211> 32

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (1)..(14)

<223> А-бета 1-14

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (15)..(15)

<223> эпсилон К в качестве спейсера

<220>
 <221> ПЕПТИД
 <222> (16)..(32)
 <223> Schistosoma mansoni Th

 <400> 56

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Lys Lys
 1 5 10 15

Trp Phe Lys Thr Asn Ala Pro Asn Gly Val Asp Glu Lys His Arg His
 20 25 30

<210> 57
 <211> 40
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ПЕПТИД
 <222> (1)..(14)
 <223> А-бета 1-14

<220>
 <221> ПЕПТИД
 <222> (15)..(15)
 <223> эпсилон К в качестве спейсера

<220>
 <221> ПЕПТИД
 <222> (16)..(40)
 <223> Th холерного токсина

<400> 57

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Lys Ala
 1 5 10 15

Leu Asn Ile Trp Asp Arg Phe Asp Val Phe Cys Thr Leu Gly Ala Thr
 20 25 30

Thr Gly Tyr Leu Lys Gly Asn Ser
 35 40

<210> 58
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ПЕПТИД
 <222> (1)..(14)
 <223> А-бета 1-14

<220>
 <221> ПЕПТИД

<222> (15)..(15)
 <223> эпсилон К в качестве спейсера

 <220>
 <221> ПЕПТИД
 <222> (16)..(30)
 <223> MvF 2 Th

 <400> 58

 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Lys Ile
 1 5 10 15

 Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Ile Glu Gly Ile
 20 25 30

 <210> 59
 <211> 37
 <212> БЕЛКОК
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> ПЕПТИД
 <222> (1)..(14)
 <223> А-бета 1-14

 <220>
 <221> ПЕПТИД
 <222> (15)..(15)
 <223> эпсилон К в качестве спейсера

 <220>
 <221> ПЕПТИД
 <222> (16)..(37)
 <223> KKKMvF 3 Th

 <220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (22)..(22)
 <223> S или T

 <220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (25)..(25)
 <223> K или R

 <220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (26)..(26)
 <223> G или T

 <220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (30)..(30)
 <223> H или T

 <220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (31)..(31)
 <223> K или R

<220>

<221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
<222> (34)..(34)
<223> G или T

<400> 59

Asp	Ala	Glu	Phe	Arg	His	Asp	Ser	Gly	Tyr	Glu	Val	His	His	Lys	Lys
1						5				10				15	

Lys	Lys	Ile	Ser	Ile	Xaa	Glu	Ile	Xaa	Xaa	Val	Ile	Val	Xaa	Xaa	Ile
20						25							30		

Glu	Xaa	Ile	Leu	Phe
				35

<210> 60

<211> 33

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (1)..(14)

<223> А-бета 1-14

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (15)..(15)

<223> эпсилон К в качестве спейсера

<220>

<221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК

<222> (16)..(16)

<223> K или R

<220>

<221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК

<222> (17)..(17)

<223> K или R

<220>

<221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК

<222> (18)..(18)

<223> K или R

<220>

<221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК

<222> (19)..(19)

<223> L или I или V или F

<220>

<221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК

<222> (20)..(20)

<223> F или K или R

<220>

<221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК

<222> (21)..(21)

<223> L или I или V или F

<220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (22)..(22)
 <223> L или I или V или F

<220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (24)..(24)
 <223> K или R

<220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (25)..(25)
 <223> L или I или V или F

<220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (26)..(26)
 <223> L или I или V или F

<220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (28)..(28)
 <223> L или I или V или F

<220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (30)..(30)
 <223> Q или L или I или V или F

<220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (32)..(32)
 <223> L или I или V или F

<220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (33)..(33)
 <223> D или R

<400> 60

Asp	Ala	Glu	Phe	Arg	His	Asp	Ser	Gly	Tyr	Glu	Val	His	His	Lys	Xaa
1														15	

Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Thr	Xaa	Xaa	Xaa	Thr	Xaa	Pro	Xaa	Ser	Xaa
						20				25			30		

Xaa

<210> 61
 <211> 31
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ПЕПТИД
 <222> (1)..(14)

<223> (А-бета 1-14) x 4 в качестве разветвленного пептида

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (15)..(15)

<223> (эпсилон К) x 2 в качестве линкера

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (16)..(16)

<223> эпсилон К в качестве связываемого спейсера

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (17)..(31)

<223> MvF 1 Th

<400> 61

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Lys Lys
1 5 10 15

Leu Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly Val
20 25 30

<210> 62

<211> 37

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (1)..(14)

<223> А-бета 1-14

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (15)..(15)

<223> эпсилон К в качестве связываемого спейсера

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (16)..(37)

<223> KKK- MvF 4 Th

<220>

<221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК

<222> (22)..(22)

<223> S или T

<220>

<221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК

<222> (25)..(25)

<223> K или R

<220>

<221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК

<222> (26)..(26)

<223> G или T

<220>

<221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (30)..(30)
 <223> Н или Т

<220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (31)..(31)
 <223> К или R

<400> 62

Asp	Ala	Glu	Phe	Arg	His	Asp	Ser	Gly	Tyr	Glu	Val	His	His	Lys	Lys
1						5				10				15	

Lys	Lys	Ile	Ser	Ile	Xaa	Glu	Ile	Xaa	Xaa	Val	Ile	Val	Xaa	Xaa	Ile
				20				25				30			

Glu	Thr	Ile	Leu	Phe
			35	

<210> 63
 <211> 33
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ПЕПТИД
 <222> (1)..(14)
 <223> А-бета 1-14

<220>
 <221> ПЕПТИД
 <222> (15)..(15)
 <223> эпсилон К в качестве связываемого спейсера

<220>
 <221> ПЕПТИД
 <222> (16)..(33)
 <223> HBsAg 2 Th

<220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (19)..(19)
 <223> I или F

<220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (20)..(20)
 <223> I или F

<220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (21)..(21)
 <223> T или L

<220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (22)..(22)
 <223> I или L

<220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (26)..(26)
 <223> I или L

<220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (29)..(29)
 <223> P или I

<220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (30)..(30)
 <223> Q или T

<220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (31)..(31)
 <223> S или T

<220>
 <221> ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (32)..(32)
 <223> L или I

<400> 63

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Lys Lys
 1 5 10 15

Lys Lys Ile Ile Thr Ile Thr Arg Ile Ile Thr Ile Pro Gln Ser Leu
 20 25 30

Asp

<210> 64
 <211> 37
 <212> ВЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ПЕПТИД
 <222> (1)..(14)
 <223> А-бета 1-14

<220>
 <221> ПЕПТИД
 <222> (15)..(15)
 <223> эпсилон K в качестве связываемого спейсера

<220>
 <221> ПЕПТИД
 <222> (16)..(37)
 <223> KKK-MvF 5 Th

<400> 64

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Lys Lys
 1 5 10 15

Lys Lys Ile Ser Ile Thr Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Ile
 20 25 30

Glu Thr Ile Leu Phe
 35

<210> 65
 <211> 33
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ПЕПТИД
 <222> (1)..(14)
 <223> А-бета 1-14

<220>
 <221> ПЕПТИД
 <222> (15)..(15)
 <223> эпсилон К в качестве связываемого спейсера

<220>
 <221> ПЕПТИД
 <222> (16)..(33)
 <223> HBsAg 3 Th

<400> 65

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Lys Lys
 1 5 10 15

Lys Lys Ile Ile Thr Ile Arg Ile Ile Thr Ile Ile Thr Thr Ile
 20 25 30

Asp

<210> 66
 <211> 16
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ПЕПТИД
 <222> (1)..(16)
 <223> А-бета 1-16 или APP 770(D672-K687)

<400> 66

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15

<210> 67
 <211> 26

<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

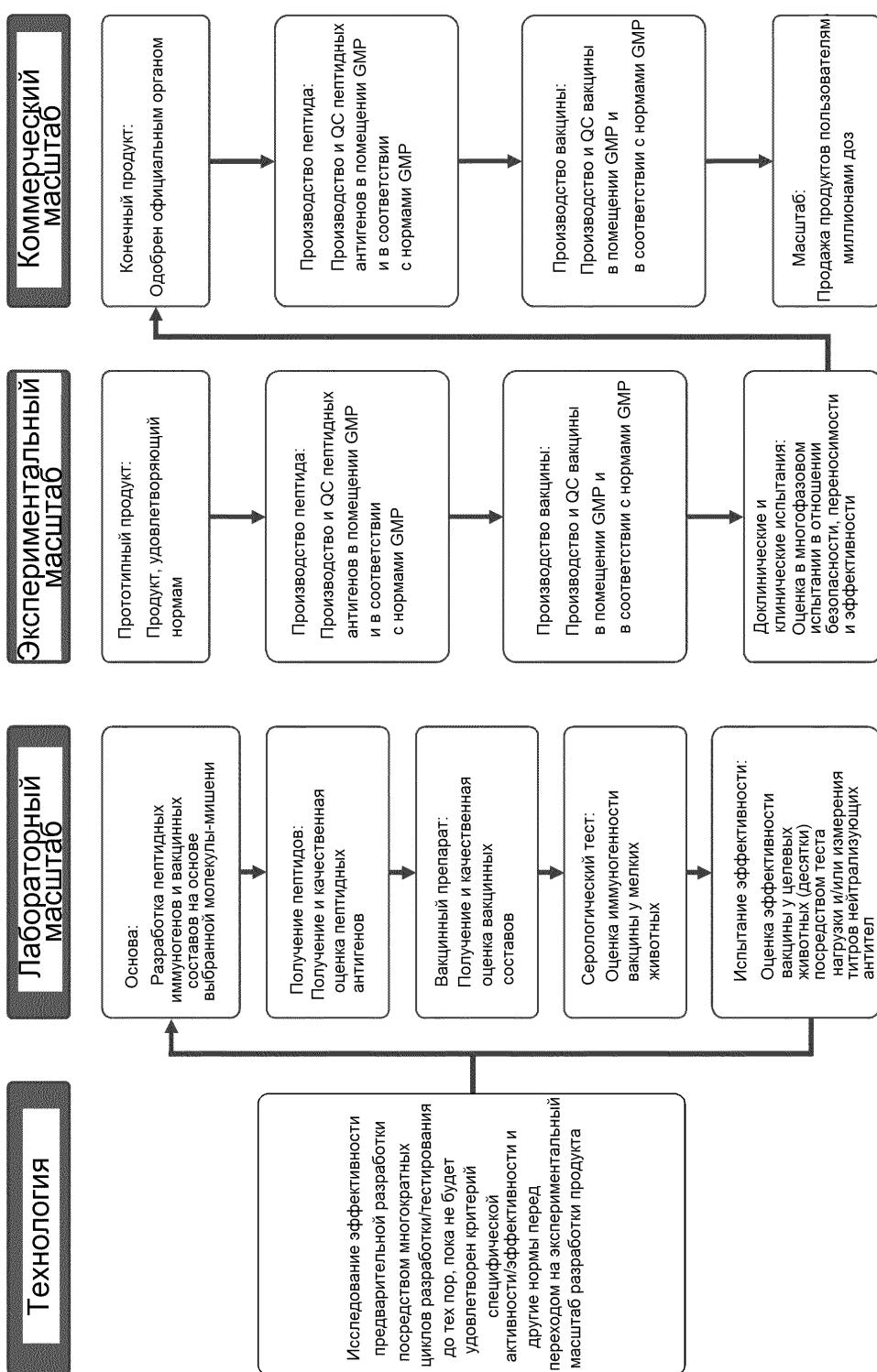
<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(26)
<223> А-бета 17-42 или APP 770(L688-A713)

<400> 67

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
1 5 10 15

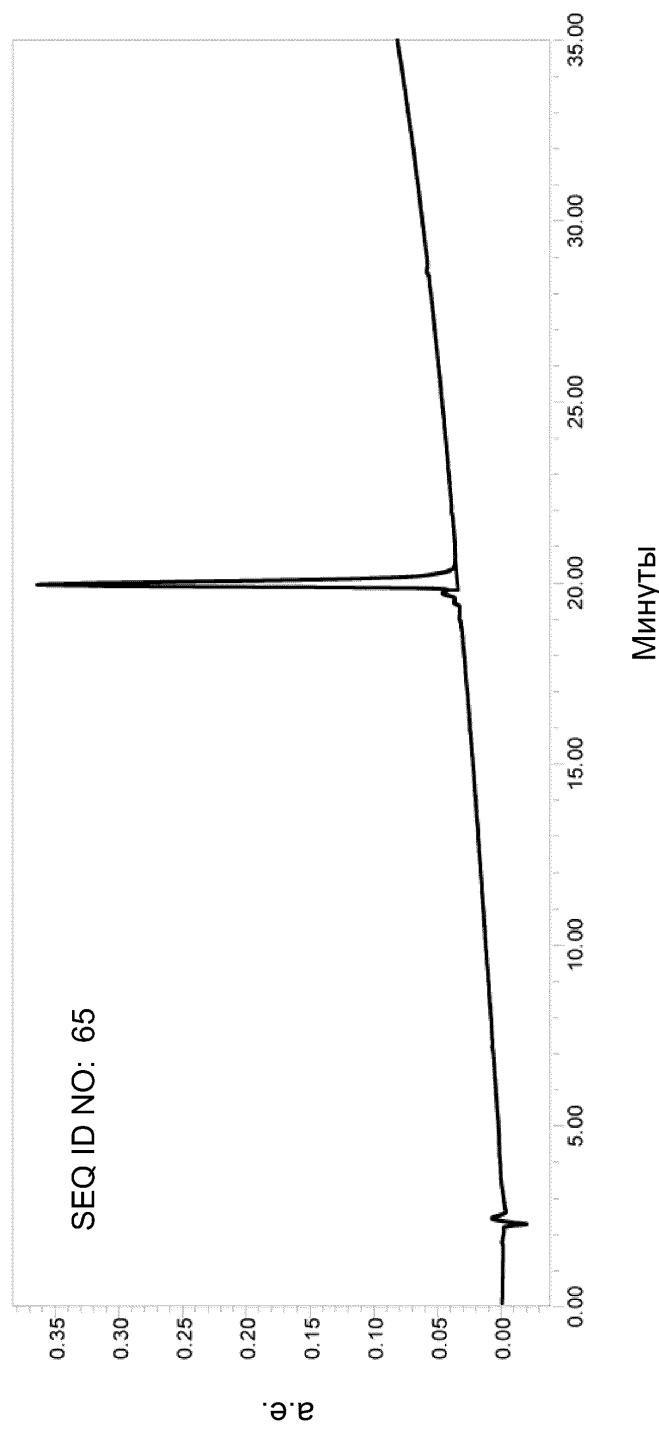
Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
20 25

ФИГ.1



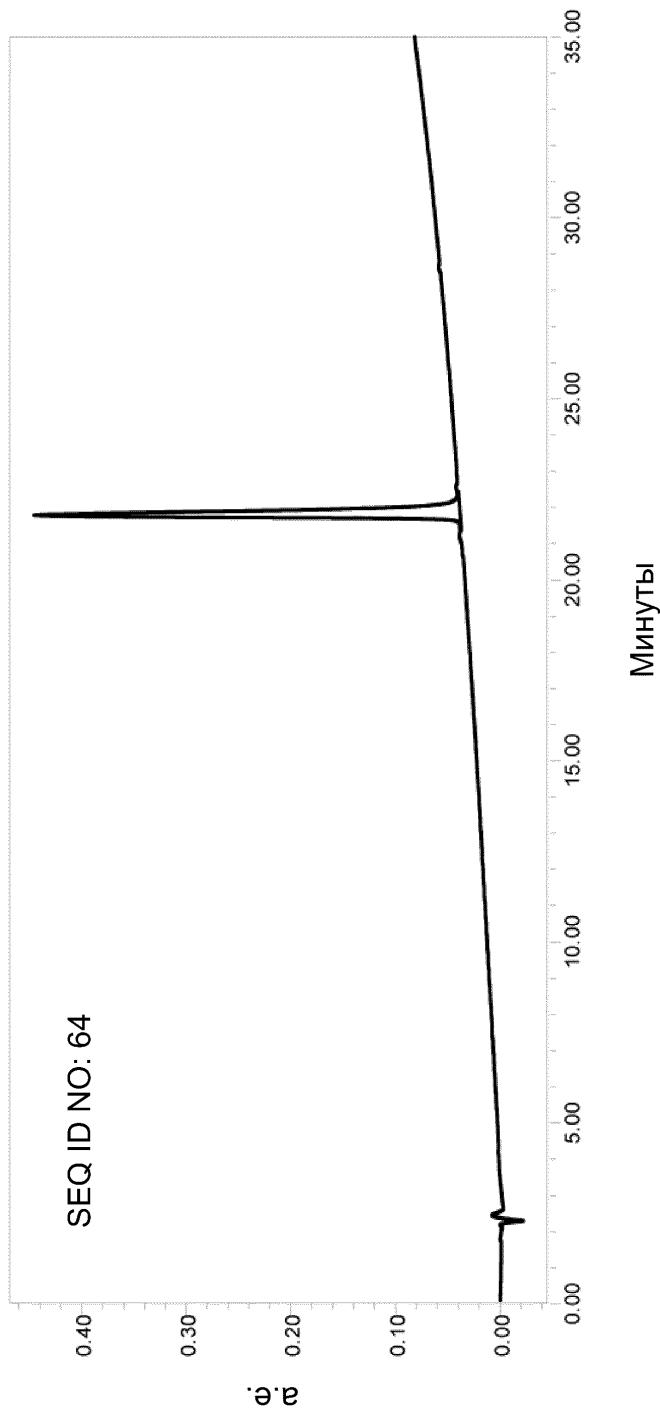
2/26

ФИГ. 2А

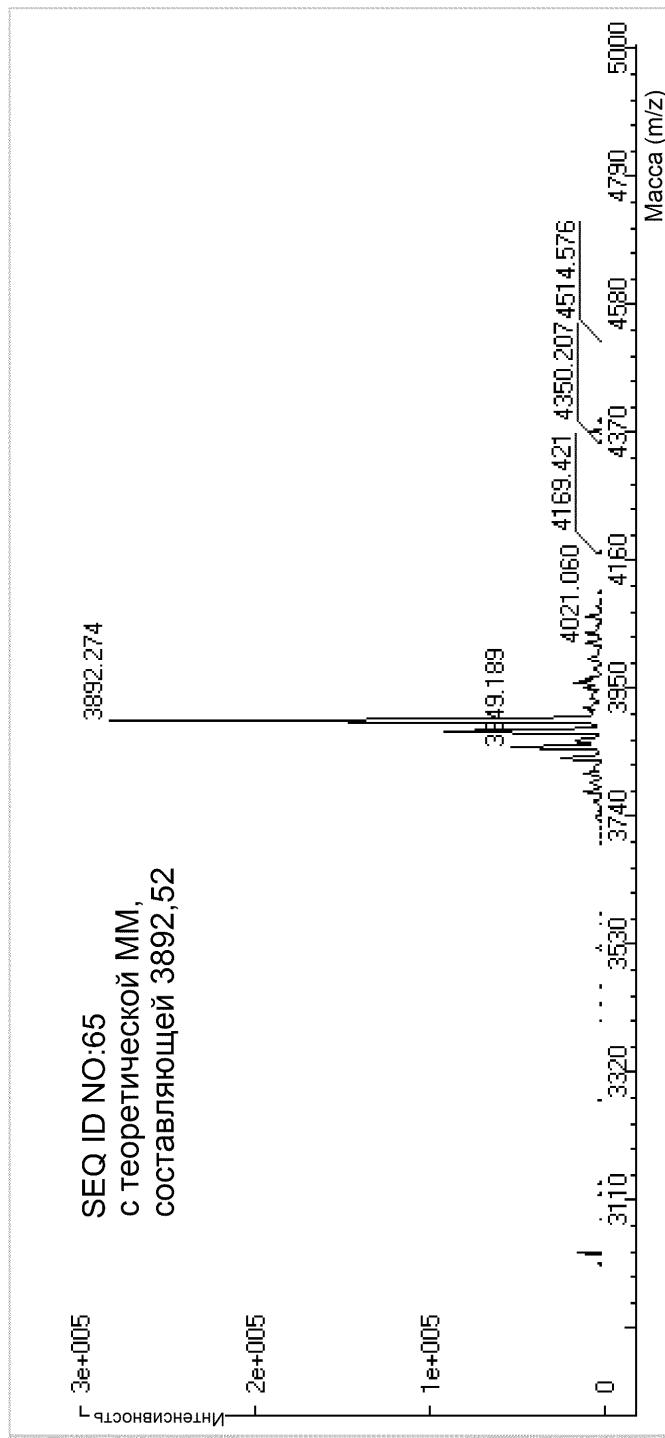


3/26

ФИГ.2В

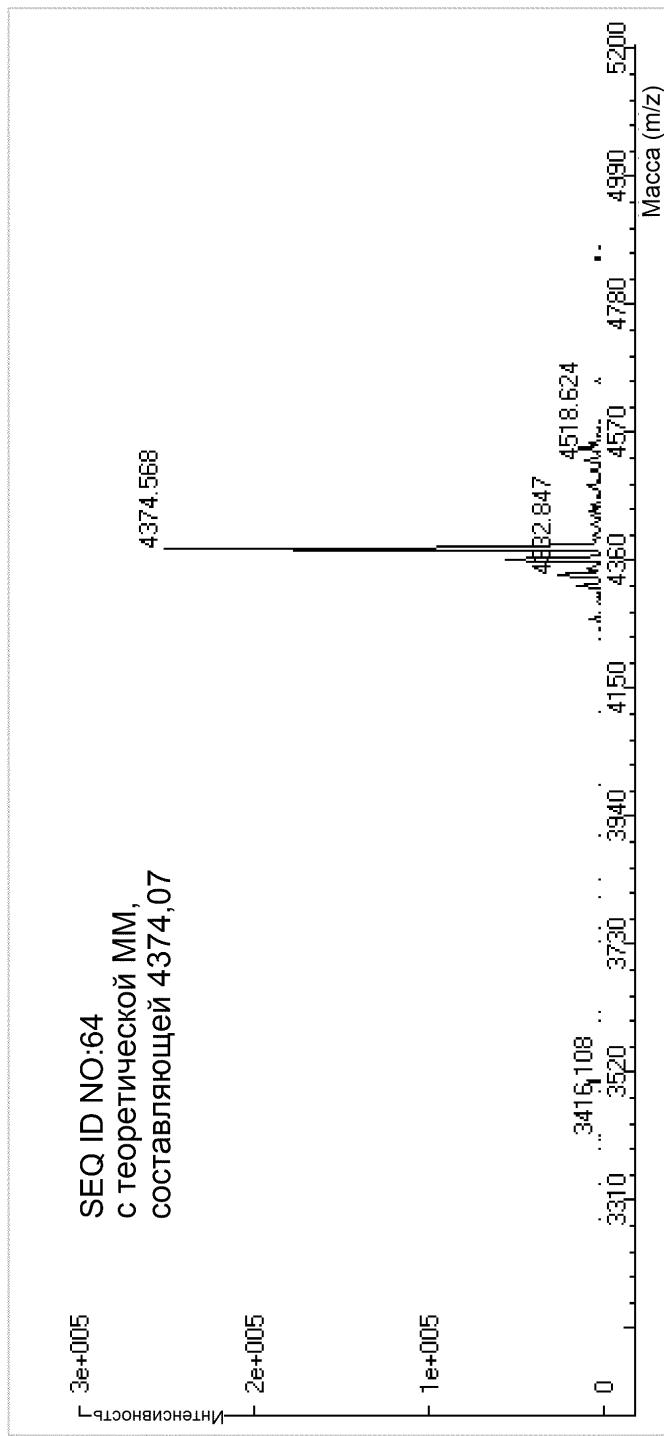


ΦΙΓ. 2C



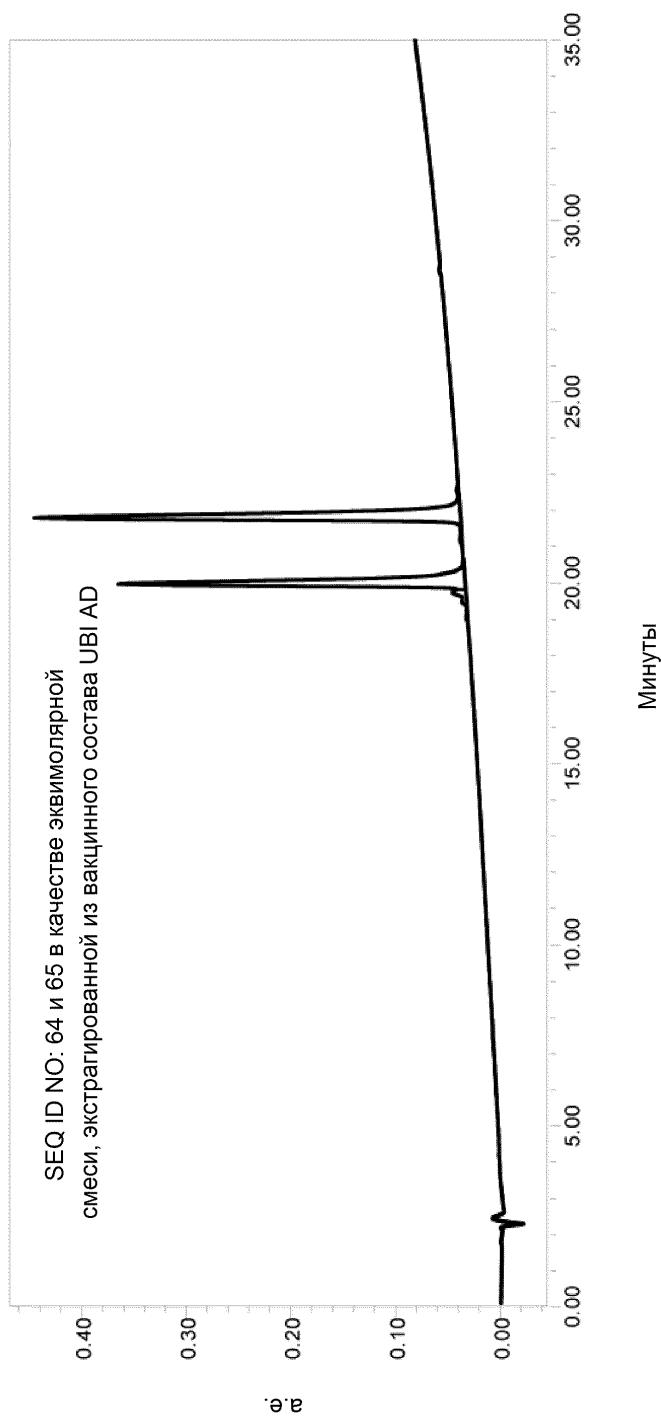
5/26

ФИГ.2D



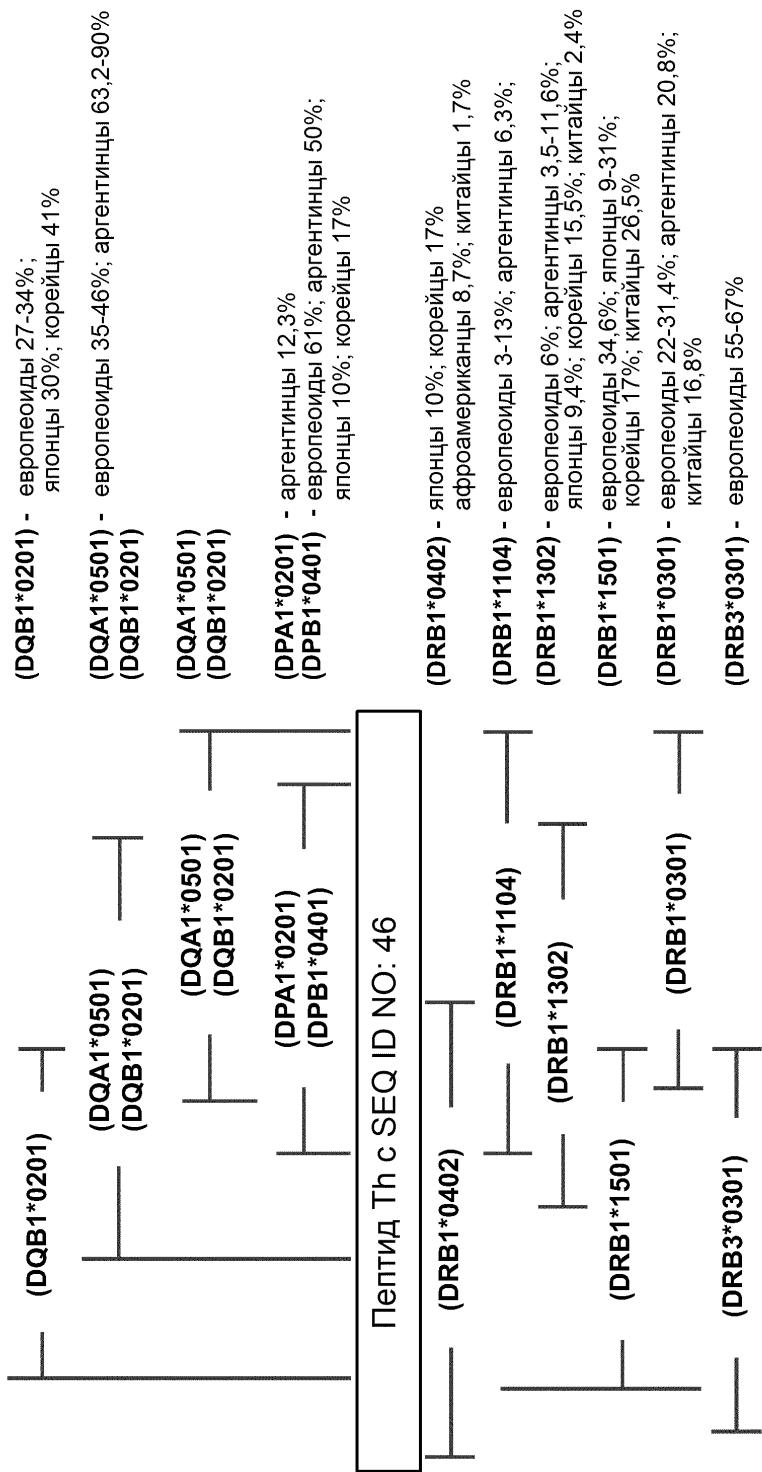
6/26

ФИГ.2Е



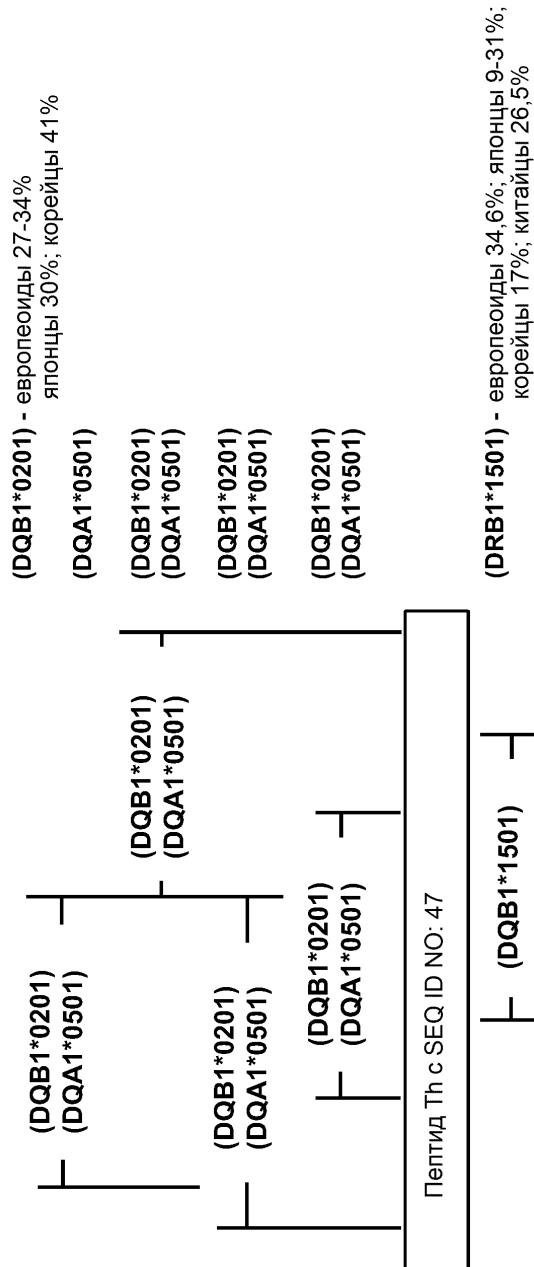
ФИГ.3А

Мотивы пептида Th с SEQ ID NO: 46 для связывания с HLA класса II

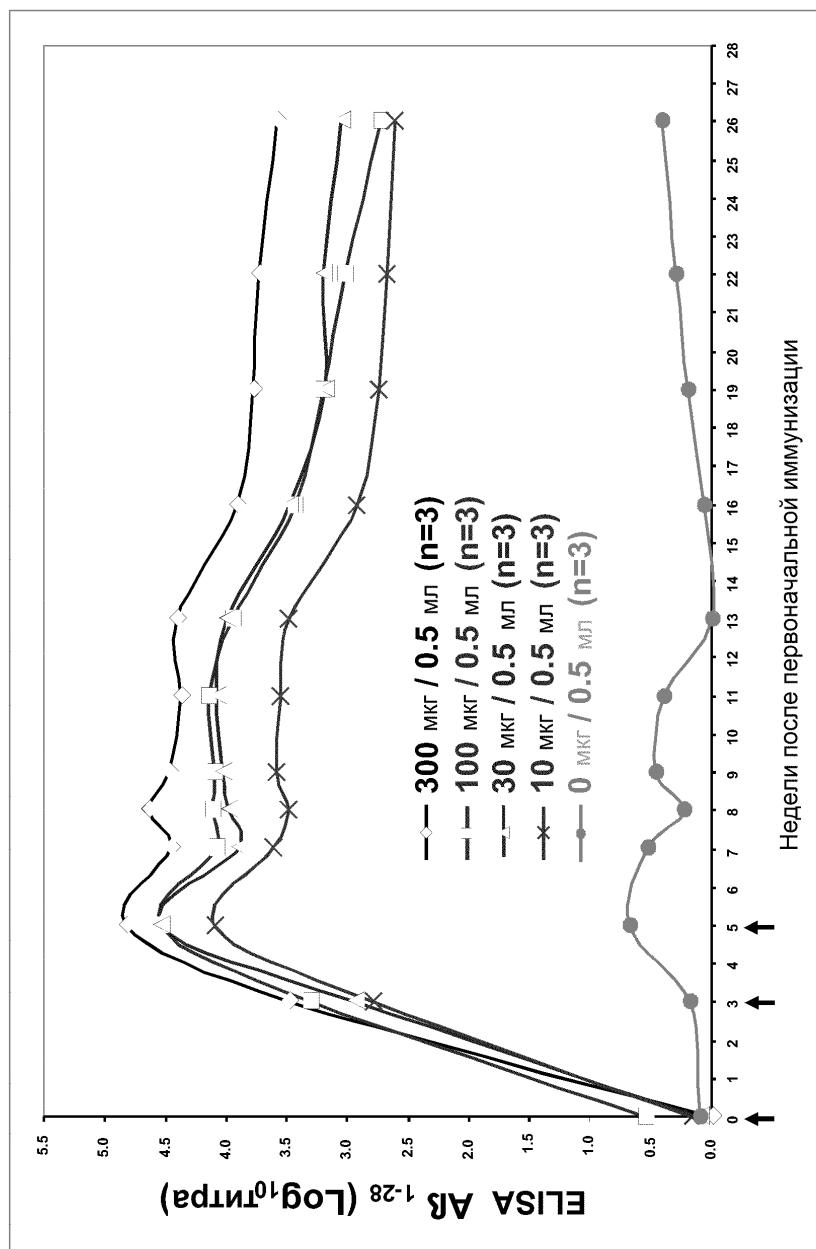


ФИГ.3В

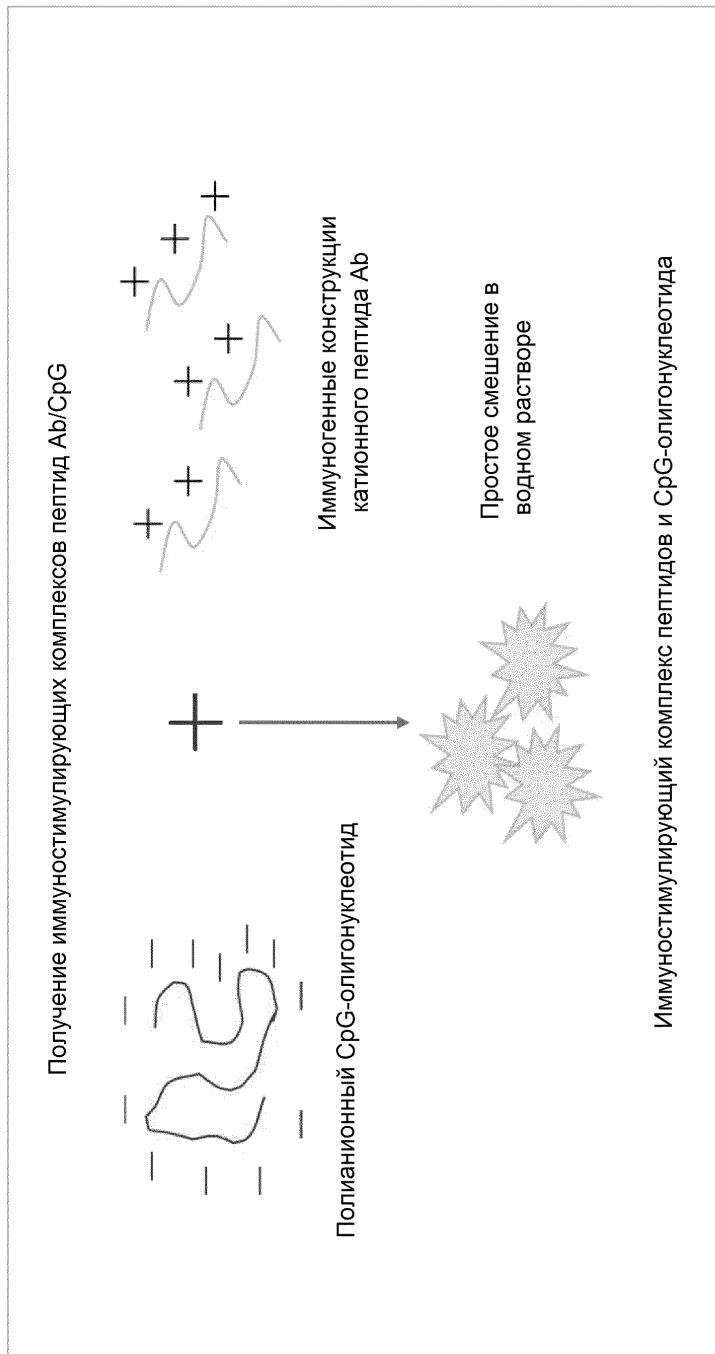
Мотивы пептида Th с SEQ ID NO: 47 для связывания с HLA класса II



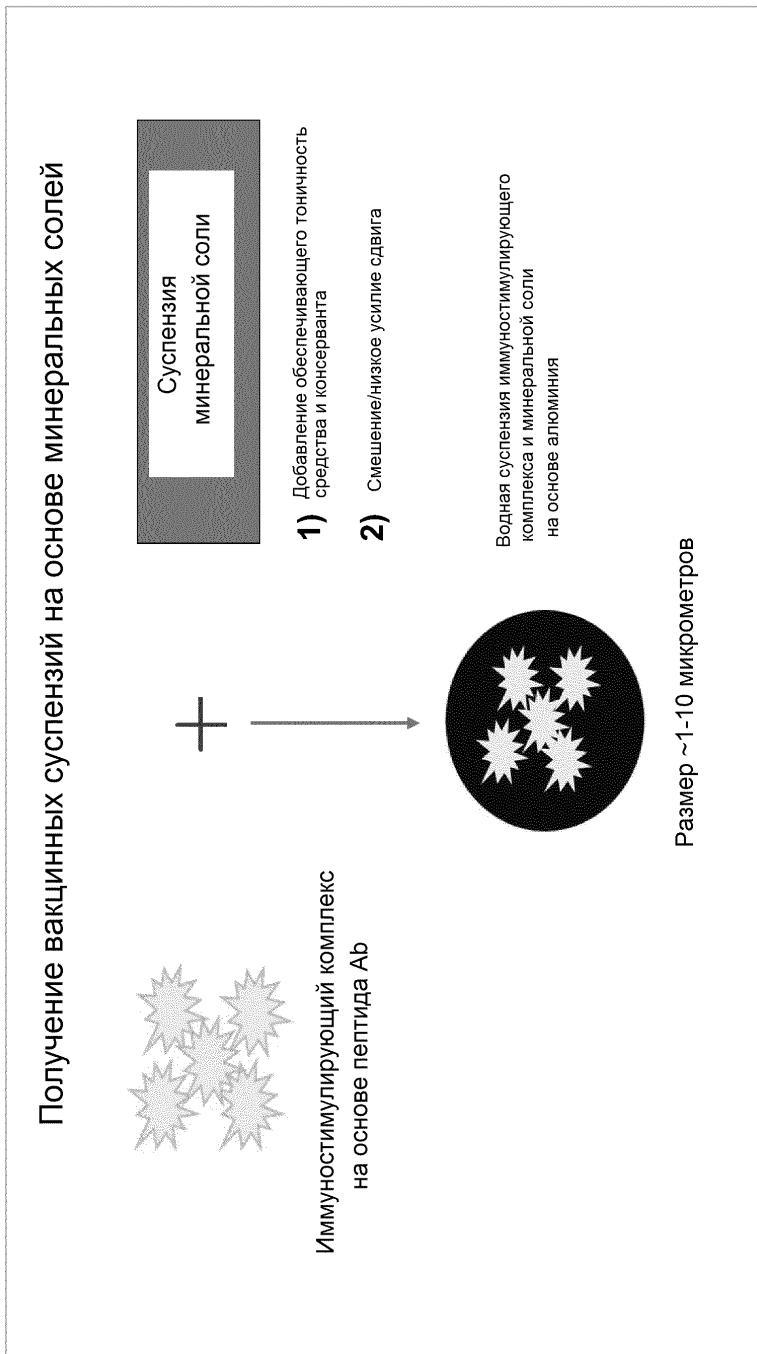
ФИГ.4



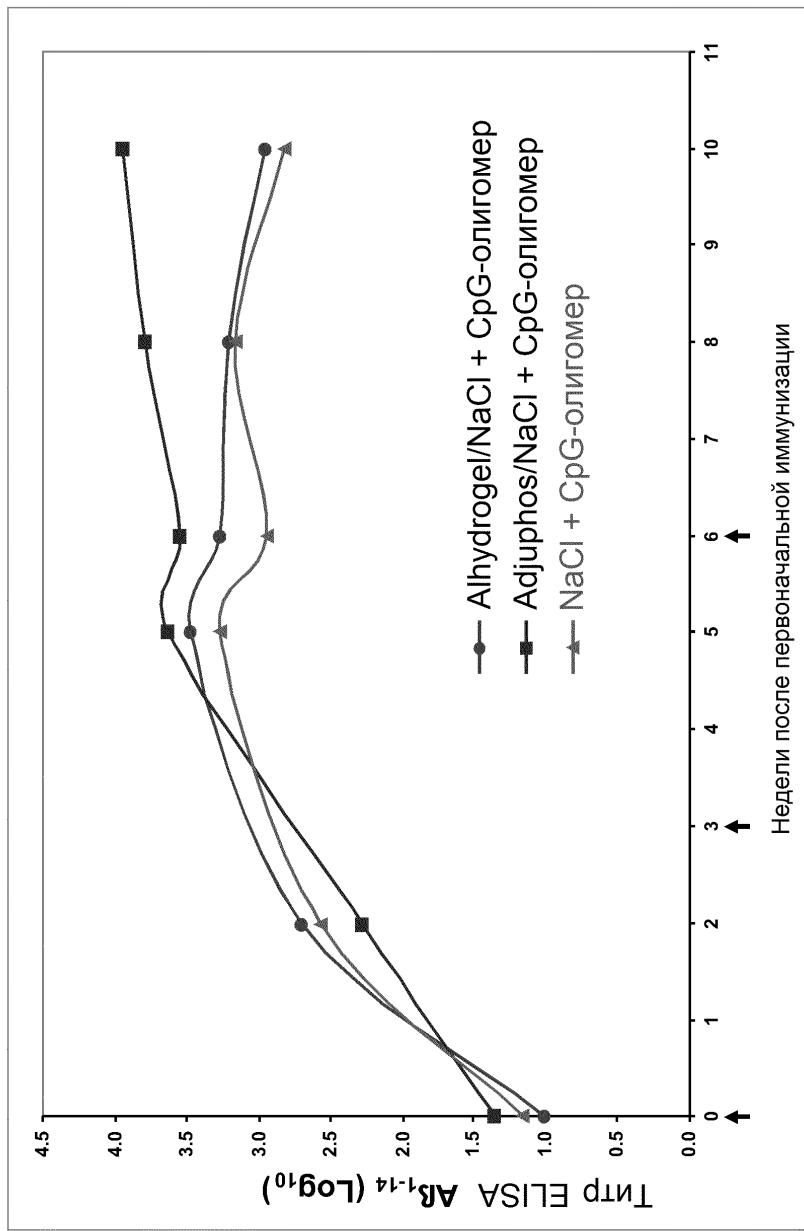
ФИГ. 5А



ФИГ.5В



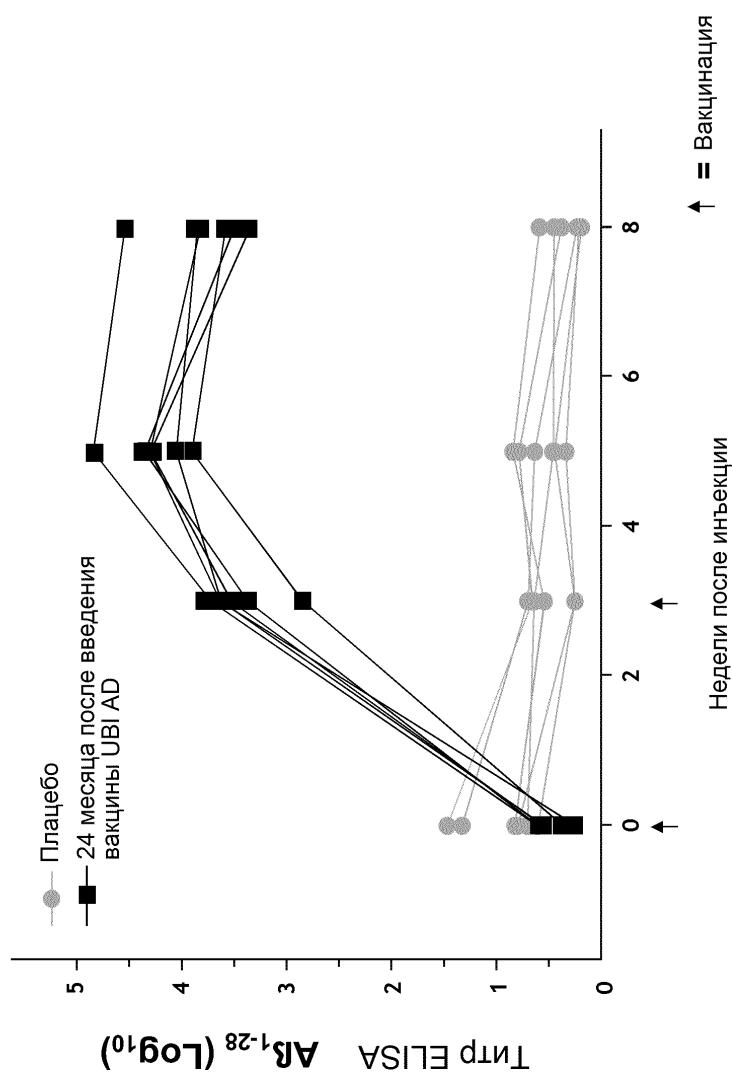
ФИГ.6

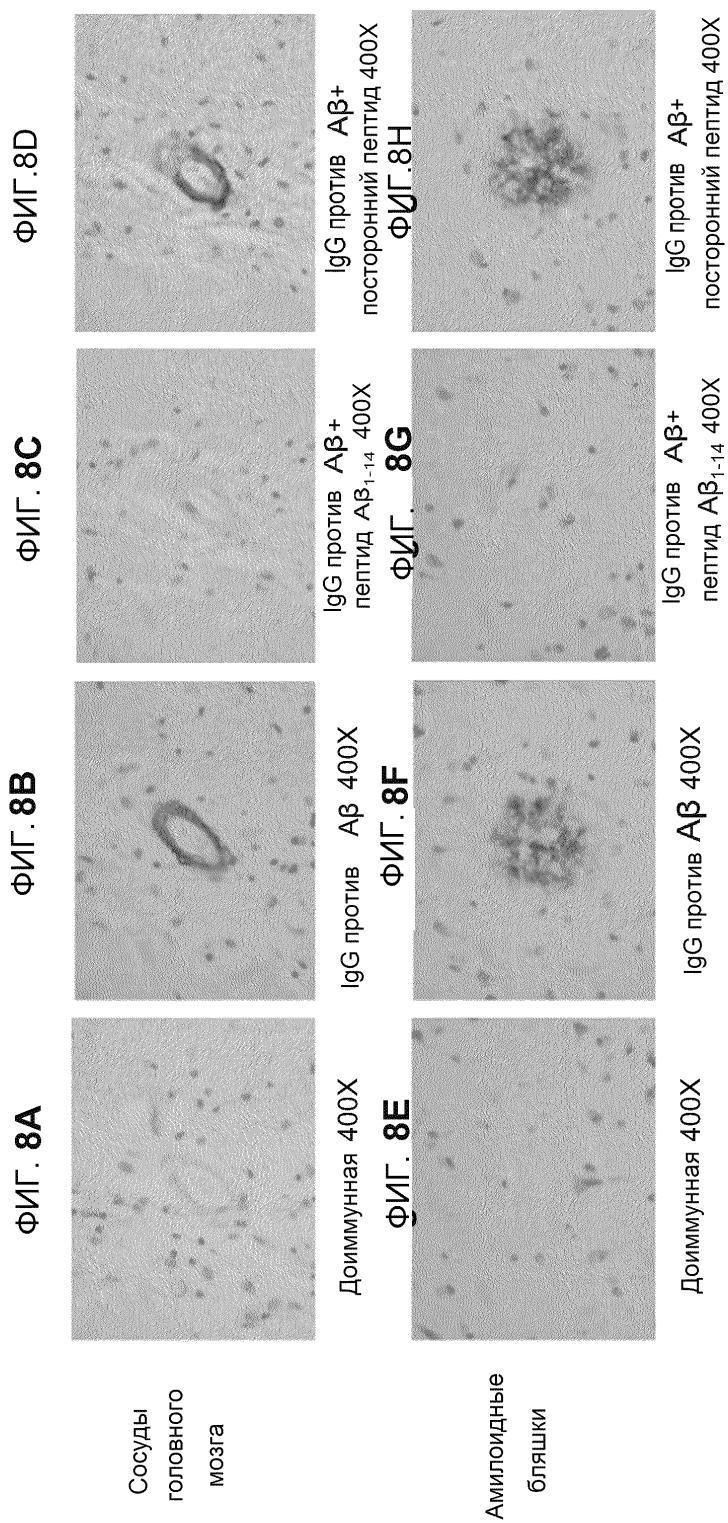


↑: Иммунизация вакцинными составами 300 мкг/0,5 мл/доза, содержащими происходящие из Ab_{1-14} пептидные конструкции с SEQ ID NO: 64 и 65

13/26

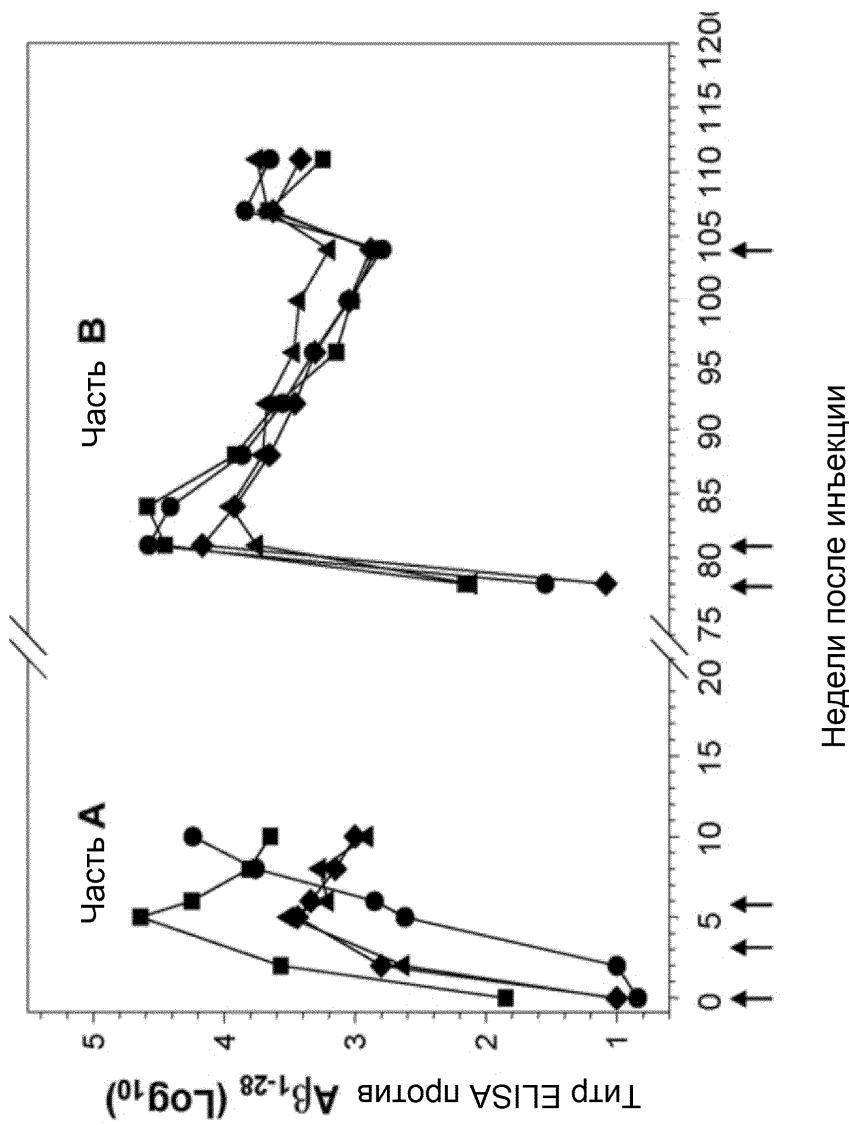
ФИГ.7





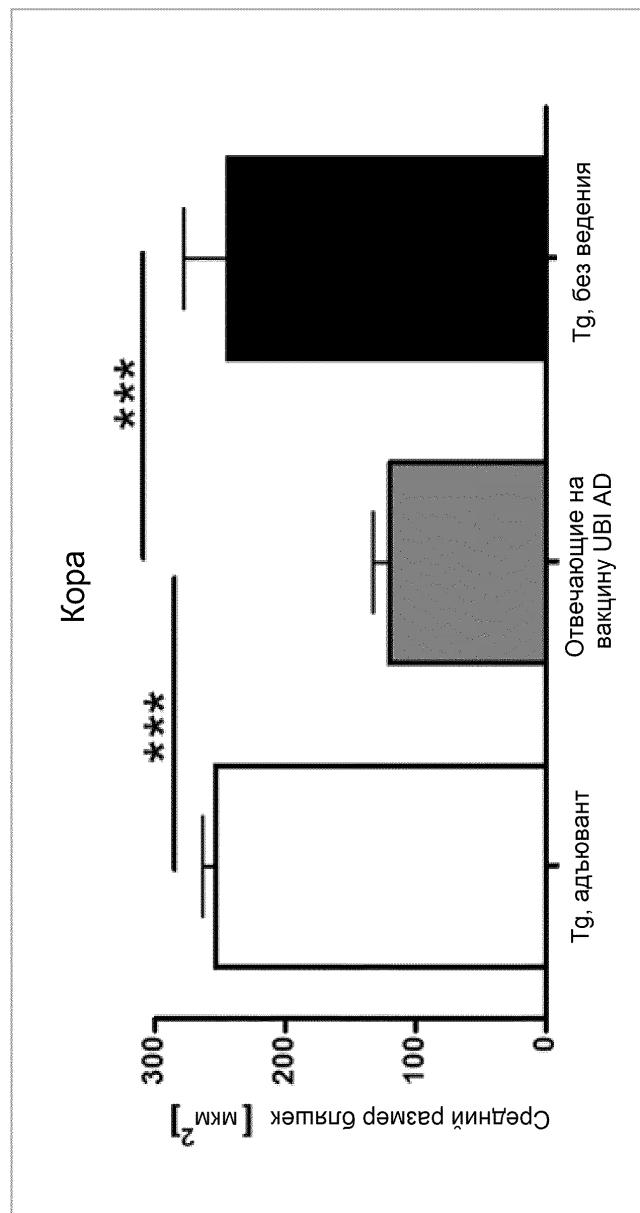
15/26

ФИГ.9

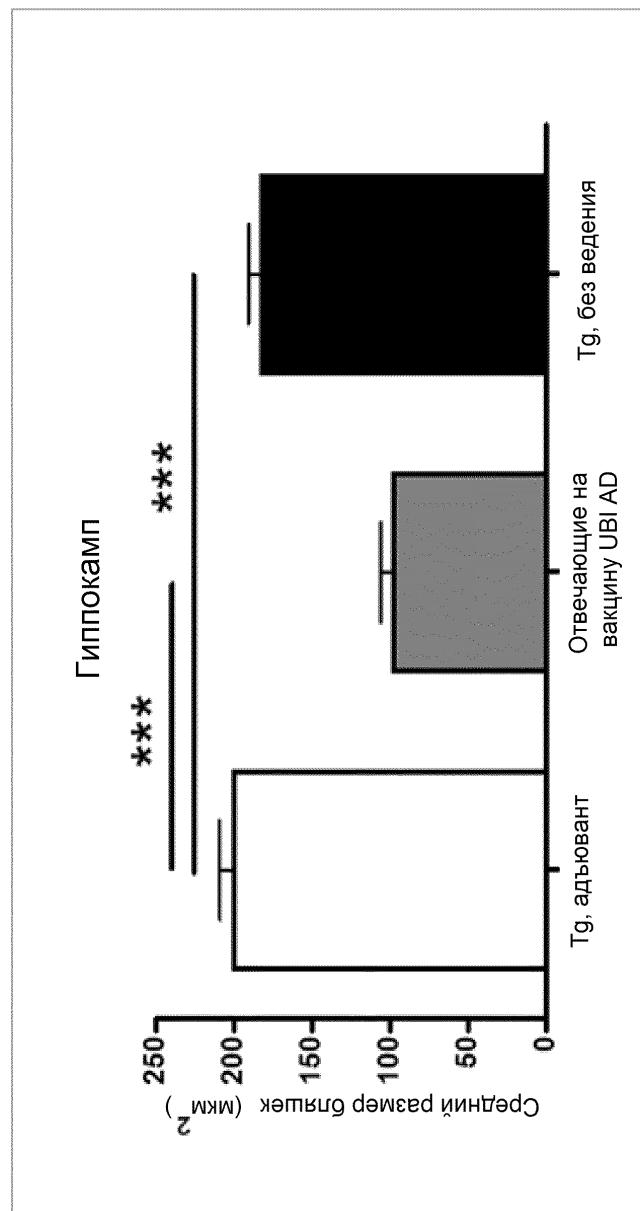


16/26

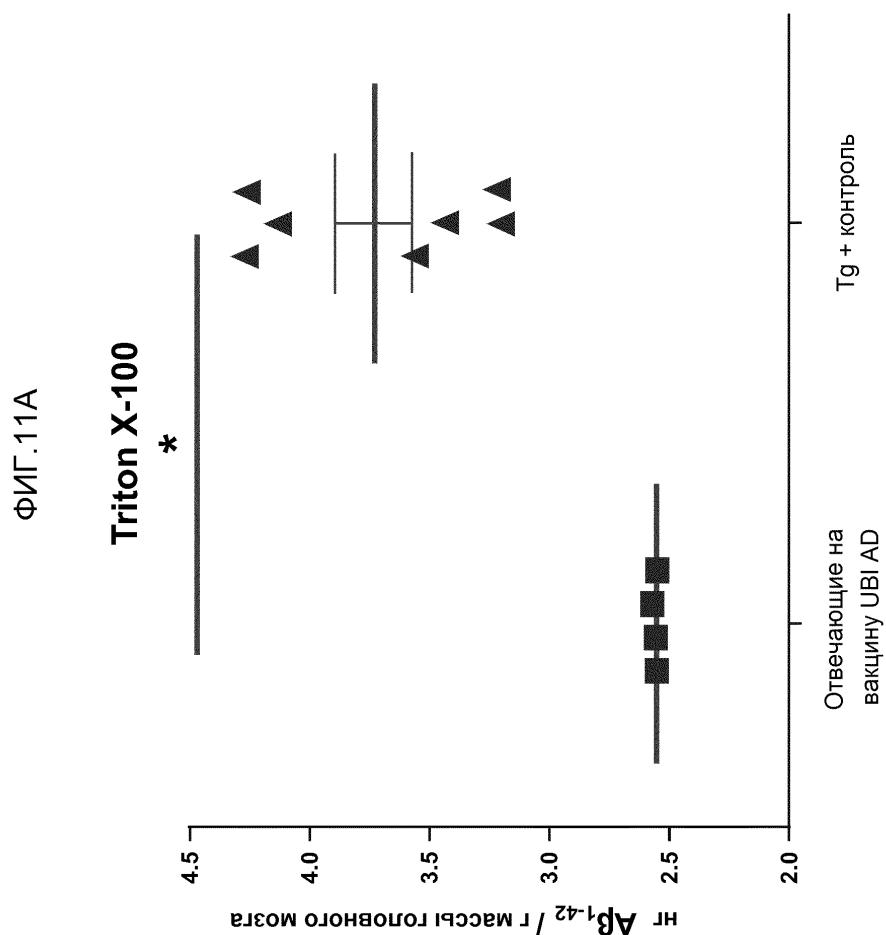
ФИГ.10А



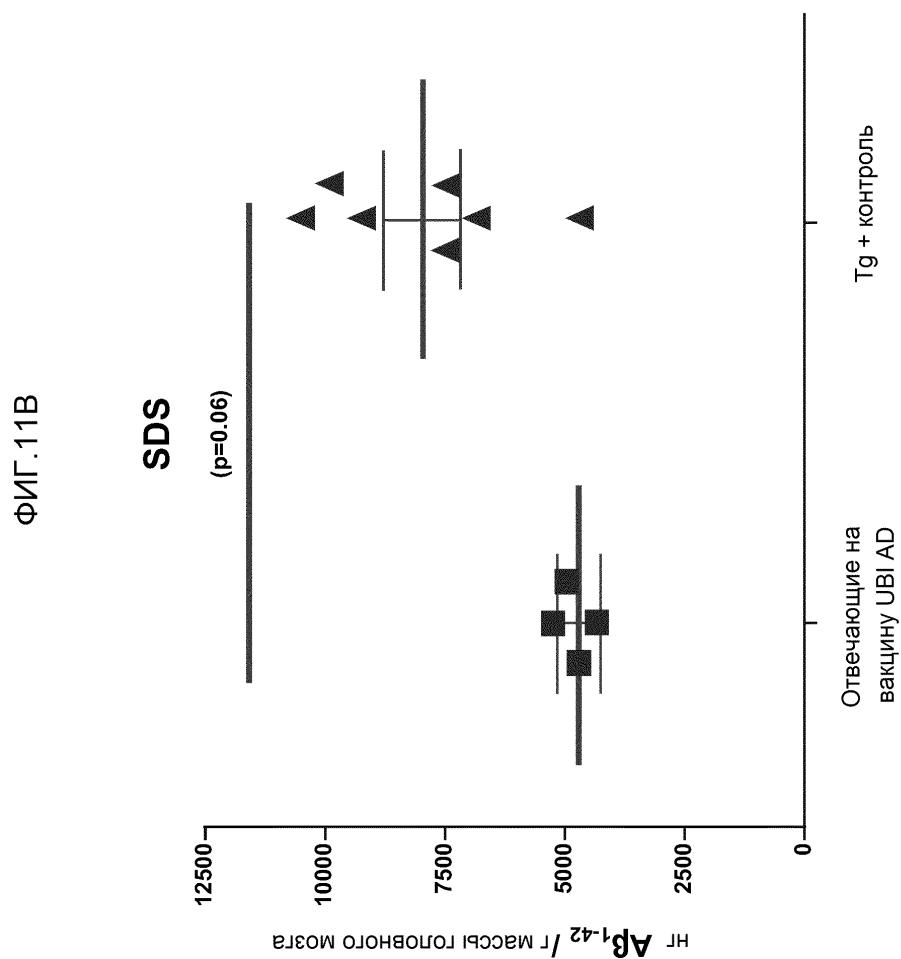
ФИГ.10В



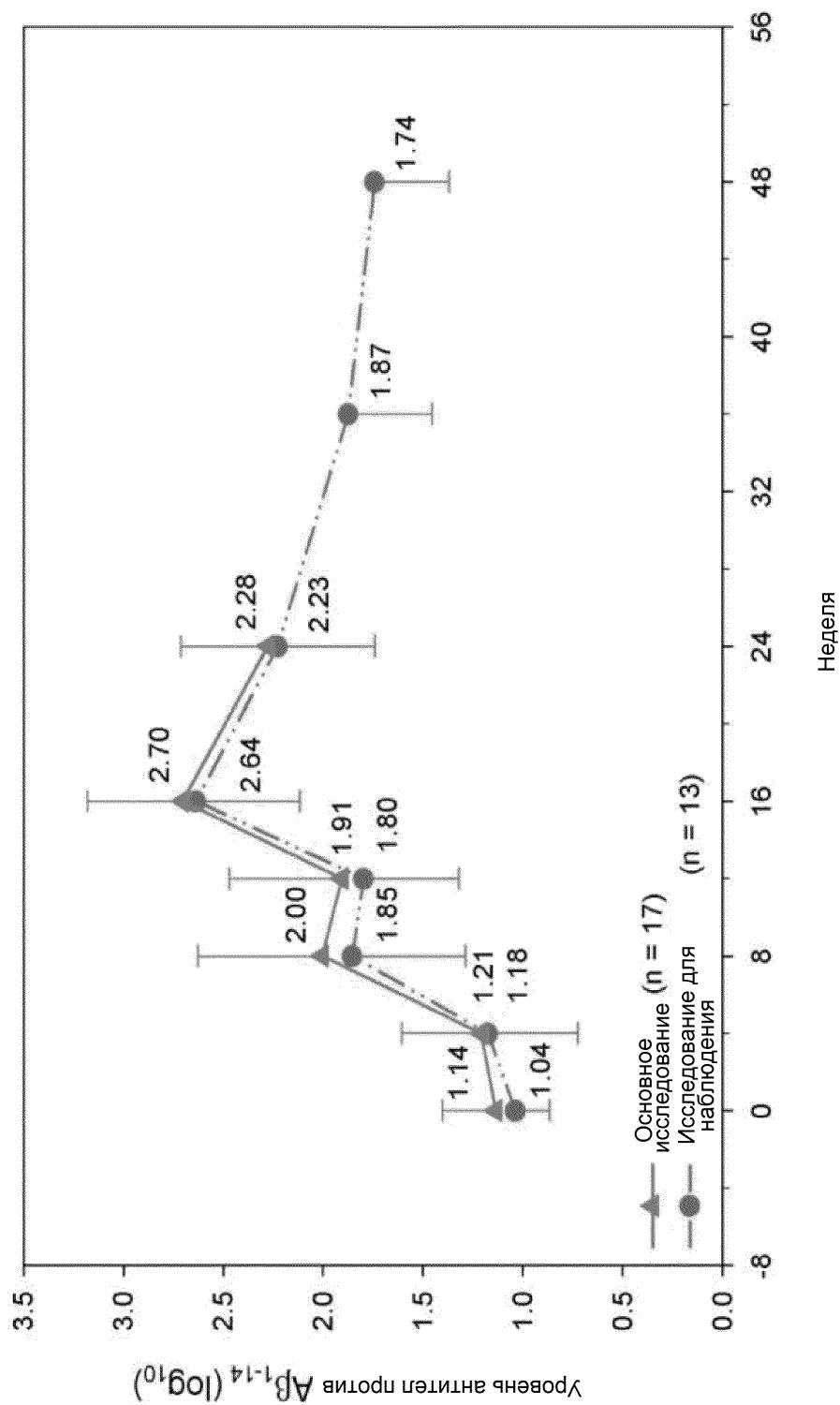
18/26



19/26

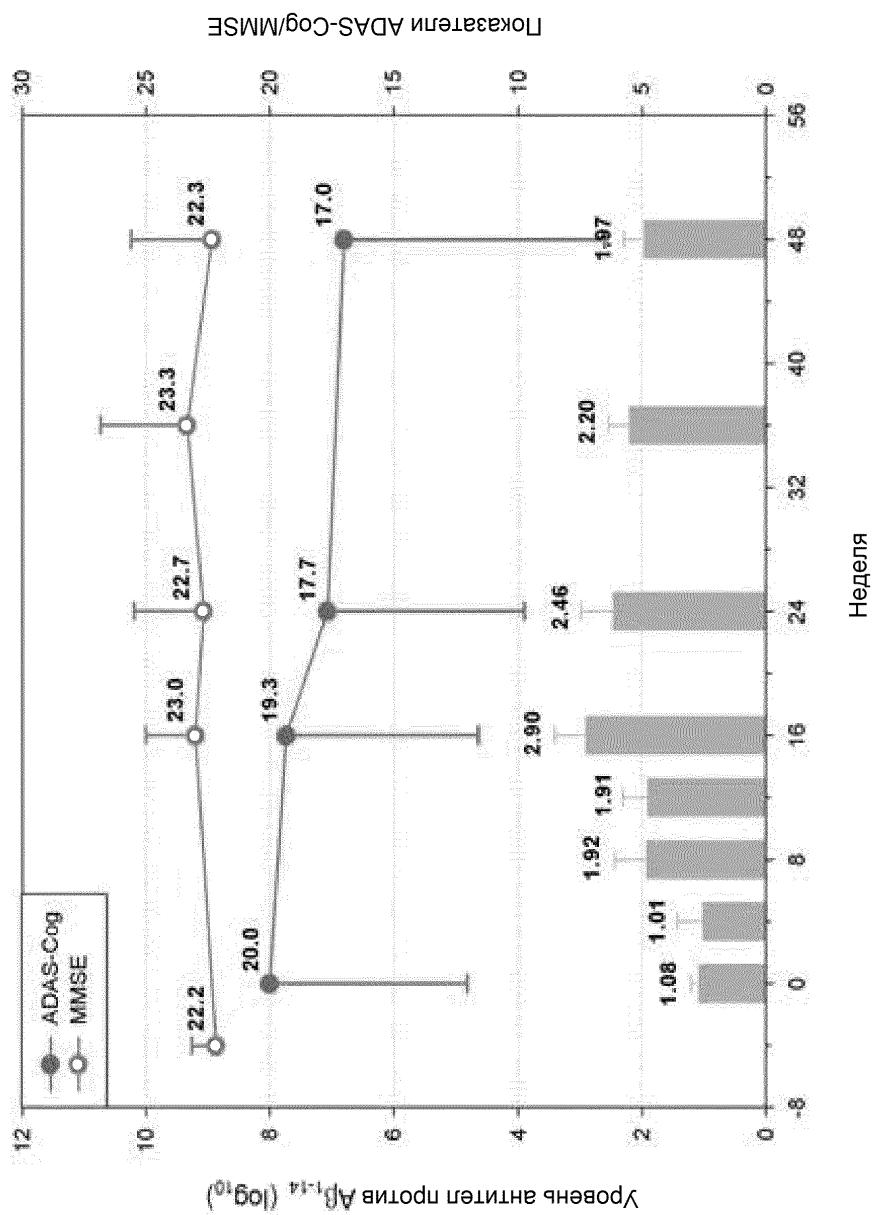


ФИГ.12



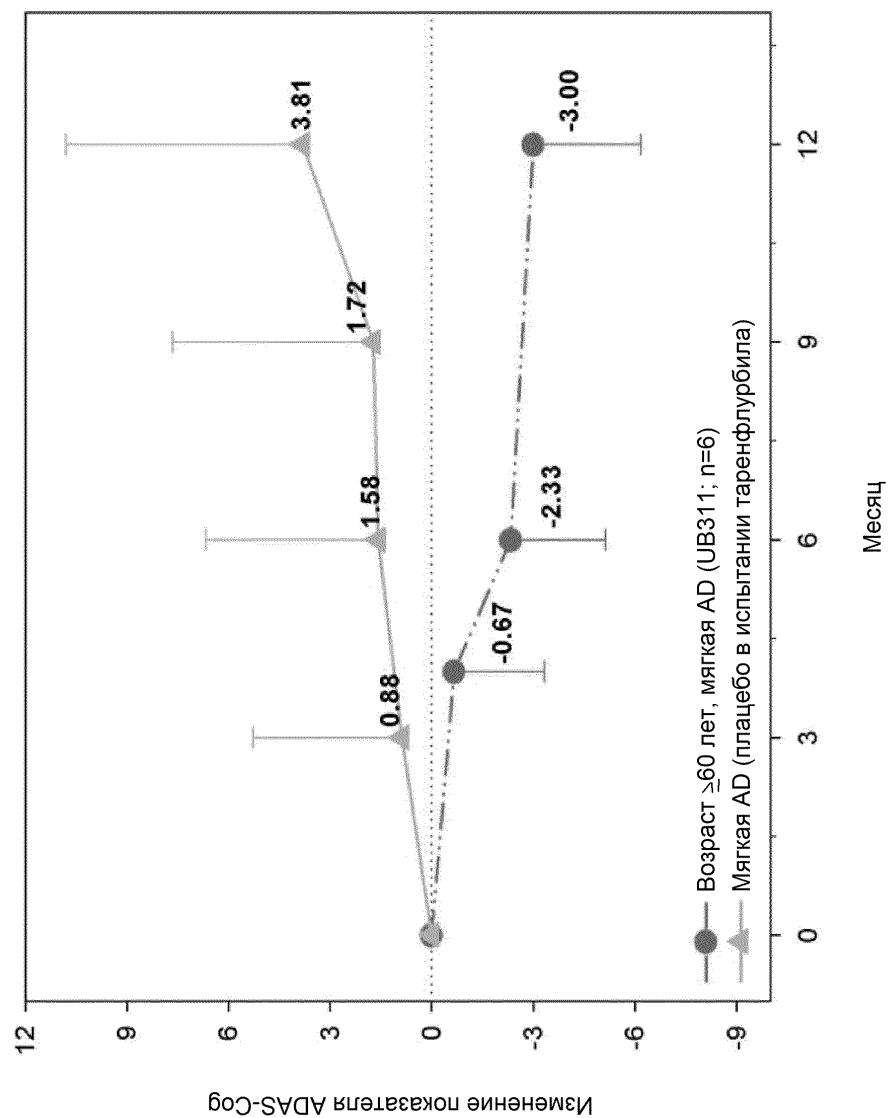
21/26

ФИГ.13

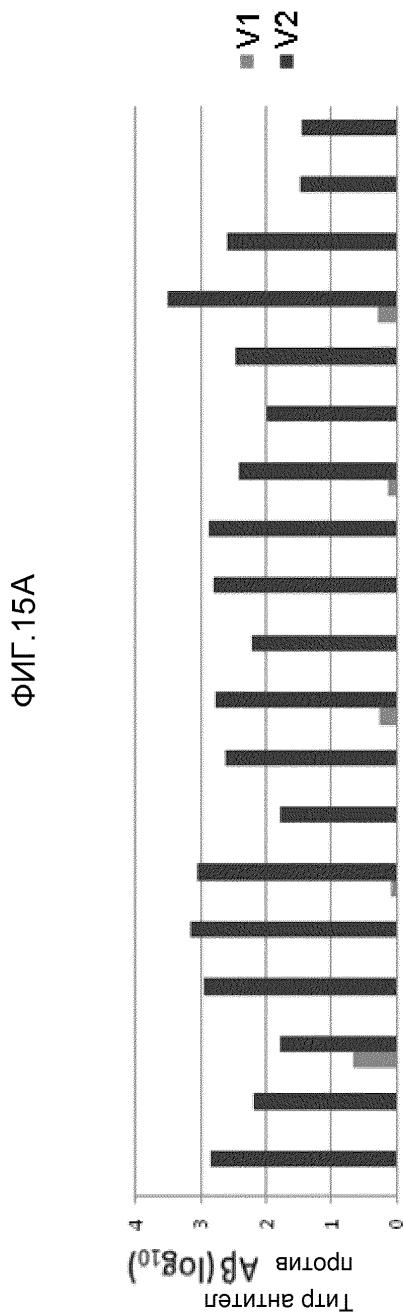


22/26

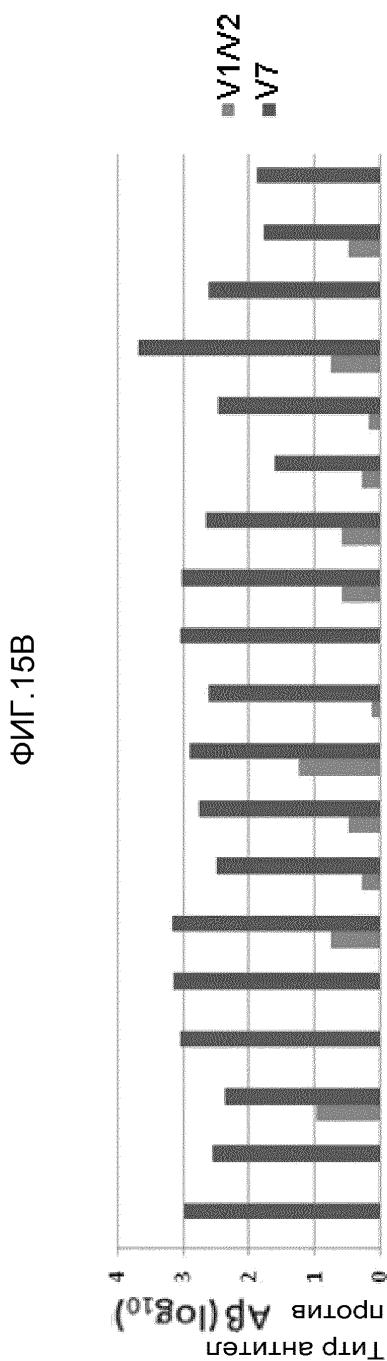
ФИГ.14



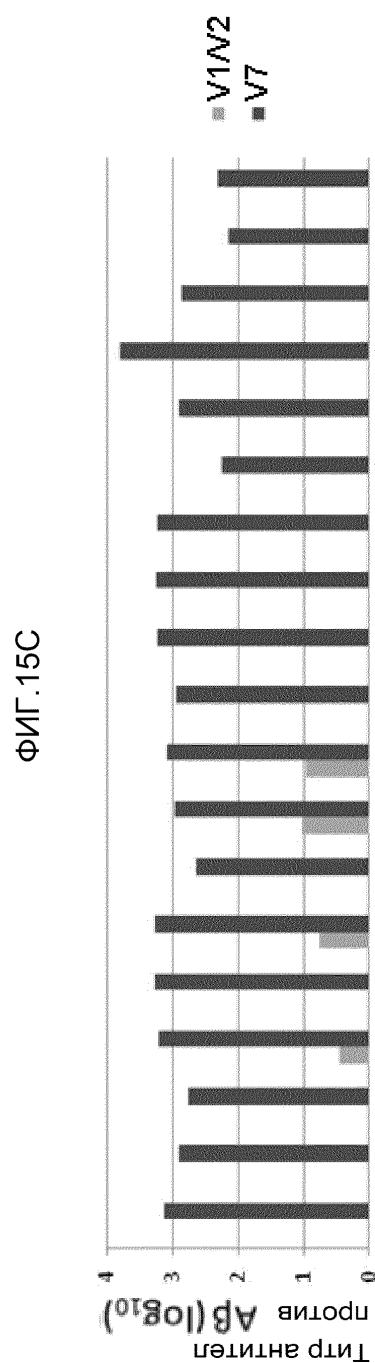
23/26



24/26



25/26



26/26

ФИГ. 16

