



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **107571** (13) **C2**
(51) МПК**A61K 39/385** (2006.01)**A61K 38/10** (2006.01)**A61K 9/127** (2006.01)**A61P 25/28** (2006.01)ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

(21) Номер заявки: а 2011 12528	(72) Винахідник(и): Пфайфер Андреа (DE/CH), Мус Андреас (DE/CH), Ван Льовен Фред (BE), Пільгрєн Марія (SE/CH)
(22) Дата подання заявки: 01.04.2010	(73) Власник(и): АС ІММУНЕ С.А., EPFL INNOVATION PARK Building B, 1015 Lausanne, Switzerland (CH), КАТОЛІКЕ УНІВЕРСИТЕЙТ ЛЬОВЕН, KU Leuven Research & Development, Waaistraat 6 - box 5105, 3000 Leuven, Belgium (BE)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 26.01.2015	(74) Представник: Петров Андрій Володимирович, реєстр. №139
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 09157303.0	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: US 2008/050383 A1, 28.02.2008 WO 2005/080986 A1, 01.09.2005 MUHS ANDREAS ET AL: "Liposomal vaccines with conformation-specific amyloid peptide antigens define immune response and efficacy in APP transgenic mice" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 104, no. 23, June 2007 (2007-06), pages 9810-9815, XP002542049
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 03.04.2009	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: EP	
(41) Публікація відомостей про заявку: 10.07.2012, Бюл.№ 13	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 26.01.2015, Бюл.№ 2	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ РСТ/EP2010/054418, 01.04.2010	

(54) ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ**(57) Реферат:**

Винахід стосується ліпосомальної конструкції, яка містить модифікований антигенний пептид або його модифікований функціональний фрагмент, що являє собою фосфопептид тау-білка або його фрагмент, і модифікована шляхом зв'язування з жирною кислотою, вуглецевий каркас якої складається з щонайменше 10 атомів вуглецю, що полегшує вбудовування в ліпідний бішар ліпосоми, і реконструйована у ліпосомі таким чином, що пептид презентується на поверхні ліпосоми, де зазначена жирна кислота ковалентно зв'язана з кожним з кінців пептиду або пептидного фрагменту за допомогою щонайменше однієї, переважно однієї або двох амінокислот, таких, наприклад, як лізин, глутамінова кислота та цистеїн, і де пептид або фрагмент має амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO: 2 - SEQ ID NO: 9. Крім того винахід також стосується застосування такої ліпосомальної конструкції у складі фармацевтичної композиції, зокрема вакцини, а також лікування нейродегенеративних захворювань із застосуванням такої ліпосомальної конструкції.

UA 107571 C2

Даний винахід відноситься до способів і композицій, призначених для терапевтичного та діагностичного застосування при лікуванні захворювань і порушень, які викликаються або асоційовані з нейрофібрилярними сплетіннями. Зокрема, винахід відноситься до способів і композицій, призначених для терапевтичного та діагностичного застосування при лікуванні таупатій, включаючи хворобу Альцгеймера (AD).

Нейрофібрилярні сплетіння є основним нейропатологічною відмітною ознакою AD. Вони утворюються в результаті агрегації гіперфосфільованого тау-білка та його конформерів. Для AD характерна ця патологія, що відрізняється цілим рядом нейрогенеративних таупатій, зокрема специфічними типами фронтотемпоральної деменції (деменція лобово-скроневого типу) (FTD).

Тау-білок представляє собою легко розчинний "не укладений природним шляхом" білок, що має авідність до зв'язування з мікротрубочками (MT), підсилюючи їх скріплення та стабільність. MT мають вирішальне значення для цілісності цитоскелета нейронів і, отже, для правильного формування та функціонування нейронних ланцюгів, тобто для забезпечення здатності до пізнання та пам'яті. Зв'язування тау-білка з MT контролюється процесом динамічного фосфільовання та дефосфільовання, що було продемонстровано головним чином *in vitro* і на клітинах, що не відносяться до нейронів. Внаслідок наявності великої кількості можливих сайтів фосфільовання (>80), точна роль кожного з них та ідентифікація відповідальних за їх фосфільовання кіназ залишаються в основному не з'ясованими *in vivo*.

При AD у головному мозку таупатологія розвивається пізніше, чим амілоїдна патологія та, тому, очевидно, у відповідь на амілоїдну патологію, що представляє собою сутність гіпотези про амілоїдний каскад. Це засновано та підтверджено дослідженнями на страждаючих AD і синдромом Дауна пацієнтах і підтверджується дослідями, проведеними на трансгенних мишах з комбінованою амілоїдною і таупатологією (Lewis та ін., 2001; Oddo та ін., 2004; Ribe та ін., 2005; Muyliaert та ін., 2006; 2008; Terwel та ін., 2008).

Точний час виникнення обох патологій у страждаючих AD людей, а також механізми, що зв'язують амілоїдну та таупатологію, залишаються в значній мірі не вивченими, але існує припущення про те, що в них бере участь активація нейронних шляхів передачі сигналів, які діють на або за допомогою GSK3 і cdk5, що представляють собою основні "тау-кінази" (див. огляд Muyliaert та ін., 2006, 2008).

Гіпотези про те, що таупатія представляє собою не невинну побічну дію, а є основним патологічним "знаряддям" при AD, засновані на надійних генетичних, патологічних та експериментальних даних, які повністю узгоджуються один з одним:

- у випадках ранньої сімейної AD, що є наслідком мутацій амілоїдного білка-попередника (APP) або пресеніліну, облігатною причиною патогенезу є нагромадження амілоїду, але незмінно патологія включає паралельну таупатію, ідентичну тій, яка має місце у випадках спорадичної AD, що починається в старшому віці,

- серйозність когнітивної дисфункції та деменції корелює з таупатією, але не з амілоїдною патологією, що було підтверджено останнім часом результатами, отриманими на фазі 1 і 2 декількох клінічних досліджень, що включають PIB-PET-візуалізацію амілоїда (візуалізація методом PET (емісійна позитронна томографія) з використанням трейсера PIB (Pittsburg Compound-B)) та ідентифікацію цілого ряду "помилкових позитивів", а саме, що мають нормальну когнітивну здатність індивідуумів з високим завантаженням амілоїдом головного мозку,

- при сімейній FTD таупатія провокується мутантним тау-білком і викликає нейродегенерацію безпосередньо, без амілоїдною патології,

- на експериментальних створених на мишах моделях установлено, що когнітивні дефекти, обумовлені амілоїдною патологією, практично повністю усуваються при відсутності тау-білка (Roberson та ін., 2007).

Узяті в сукупності відомості підтверджують гіпотезу про те, що тау-білок відіграє вирішальну роль у зниженні когнітивної функції при AD і родинних нейродегенеративних таупатіях.

Найбільш широко застосовуваним лікуванням AD є пасивна імунотерапія з використанням специфічних МАт для усунення амілоїдних пептидів та їх агрегатів, які, як передбачається, є нейротоксичними або синаптотоксичними.

Предбачається, що імунотерапія, спрямована на таупатологію, заснована на протидії патологічним конформерам тау-білка, які, як відомо або як передбачається, викликають нейродегенерацію. Амілоїдна патологія, що визиває AD та внутрішньонейронні агрегати гіперфосфільованого тау-білка, імовірно, мають синергічну дію на визиваючий когнітивні порушення та дегенерацію каскад патологічних подій, що приводить при AD до стану від помірного погіршення когнітивної здатності (MCI) до серйозної деменції. Таким чином,

комбінація медикаментозного лікування, спрямованого на таупатологію та спрямованого на амілоїдну патологію (або будь-яку іншу патологію), представляє собою переважний і значно більш ефективний шлях лікування AD.

Відомо лише небагато інших терапевтичних підходів, спрямованих проти тау-білка, вони включають в основному застосування:

- інгібіторів кіназ, які, імовірно, підвищують фосфолювання тау-білка до патологічних рівнів,
- сполук, які блокують агрегацію гіперфосфільованого тау-білка в цитоплазмі.

Ці підходи мають різними недоліками з позицій специфічності та ефективності, виникає проблема, пов'язана зі спробами модифікувати метаболізм APP та амілоїду, усе це свідчить про важливість продовження пошуку додаткових підходів до лікування, включаючи імунотерапію, спрямовану на тау-білок.

Практично не вживалось спроб виявити, не говорячи вже про те, щоб здійснити спрямований вплив на них, патологічні тау-конформери *in vivo*. На фазі II клінічного випробування Aβ42 не розглядали, не аналізували досить глибоко зв'язану зі сплетінням патологію (Nicoll та ін., 2003; Masliah та ін., 2005). З іншого боку, результати спрямованої на амілоїд експериментальної імунотерапії, отримані на доклінічній мишачій моделі з комбінованою AD-подібною патологією, продемонстрували, що вона виявляла також вплив на таупатологію, хоча тау-агрегати при цьому зберігались (Oddo та ін., 2004).

Певні сумніви викликала можливість здійснення відповідної внутрішньоклітинної імунотерапії, спрямованої на тау-білок. Вони були зняті після експериментального дослідження таупатології на мишачій моделі, проведеного в останні роки Asuni зі співавторами (Asuni та ін., 2007). Ці дослідники продемонстрували зниження зв'язаної зі сплетінням патології та функціональні поліпшення при вакцинації з використанням отриманим з тау-білка фосфільованого пептиду (фосфор-пептид). Ці дані узгоджуються з опублікованими результатами імунотерапії, спрямованої на α-синуклеїн, які були отримані раніше на моделі хвороби Паркінсона (PD) (Masliah та ін., 2005), і на супероксиддисмутази, які були отримані на моделі аміотрофічного бічного склерозу (ALS) (Urushitani та ін., 2007). Ці два захворювання є прикладами хвороб, пов'язаних із внутрішньоклітинними білками, які приводять до нейродегенерації в результаті дії поки не повністю вивчених механізмів. З іншого боку, повнорозмірний рекомбінантний тау-білок, який продукується бактеріями, і який виділяють із них, очевидно, не придатний у якості вакцини, хоча можливо, що застосовувані ад'юванти, тобто повний ад'ювант Фрейнда та коклюшевий токсин, могли впливати на негативний результат, отриманий у цьому дослідженні (Rosenmann та ін., 2006).

Існує виражена потреба в розробці пасивної та/або активної імунотерапії, яка могла б протистояти дії патологічних білкових конформерів, які, як відомо або як передбачається, викликають нейродегенеративні порушення, такі як амілоїдна патологія при AD, що викликається, наприклад, внутрішньонейронними агрегатами гіперфосфільованого тау-білка, яка настільки ж типова для AD, що й амілоїдна патологія.

Існуючу виражену потребу можна задовольнити відповідно до цього винаходу шляхом розробки методів пасивної або активної імунізації з використанням вакцин на основі ліпосом (Nicolau та ін., 2002; Muhs та ін., 2007) і МАт на основі фосфо-пептидів, що імітують основні патологічні фосфо-епітопу тау-білка. Ці комбіновані дії дозволяють створювати нові специфічні МАт до лінійних і конформаційних простих і складних фосфо-епітопів тау-білка, які, імовірно, відповідальні за синапто- та нейротоксичність при таупатологіях, включаючи AD.

У цьому винаході запропоновані нові способи та антигенні пептиди, що пропонуються у винаході та представлені в цьому описі, та їх функціональні фрагменти, включаючи композиції, які містять зазначені антигенні пептиди або їх фрагменти, призначені для одержання високоспецифічної, що перш за все має конформаційну специфічність, імунної відповіді в організмі, але, перш за все в організмі тварини, зокрема ссавця або людини, які мають високу ефективність і мають здатність попереджати або полегшувати таупатії або симптоми, асоційовані з таупатіями, групою захворювань і порушень, які асоційовані з утворенням нейрофібрилярних ушкоджень, основної патології головного мозку в цій групі нейродегенеративних порушень.

Даний винахід відноситься також до антитіл, перш за все до моноклональних антитіл, включаючи їх функціональні фрагменти, і фармацевтичних композицій, які містять зазначені антитіла, що утворились в результаті високоспецифічної, що перш за все має конформаційну специфічність, імунної відповіді в організмі при введенні антигенного пептиду, що пропонується у винаході, та представленого в цьому описі, або його функціонального фрагменту та композиції, яка містить зазначений антигенний пептид або його фрагмент, для попередження або полегшення таупатій або симптомів, асоційованих з таупатіями, групою захворювань і

порушень, які асоційовані з утворенням нейрофібрилярних ушкоджень, основної патології головного мозку в цій групі нейродегенеративних порушень.

Зазначену групу нейродегенеративних порушень можна розділити на дві субкатегорії. До першої категорії відносяться захворювання або порушення, які характеризуються одночасним існуванням тау- та амілоїдної патології, включаючи (але, не обмежуючись тільки ними) хворобу Альцгеймера, хворобу Крейцфельда-Якоба, боксерську деменцію, синдром Дауна, хворобу Герстманна-Штреусслера-Шейнкера, міозит з тільцями включення, церебральну амілоїдну ангіопатію, пов'язану з білком-пріоном, і травматичне ушкодження головного мозку.

До другої категорії відносяться захворювання або порушення без чіткої амілоїдною патології, включаючи (але, не обмежуючись тільки ними) комплекс аміотрофічного бічного склерозу/ паркінсонізму-деменції (синдром Гуама), деменцію, пов'язану з накопиченням аргірофільних зерен, кортикобазальну дегенерацію, дифузійні нейрофібрилярні сплетіння з кальцифікацією, фронтотемпоральну деменцію з паркінсонізмом, зчеплену із хромосомою 17, хворобу Галлервордена-Шпатца, множинну системну атрофію, хворобу Німанна-Піка типу С, хворобу Піка, субкортикальний гліоз прогресуючий, супрануклеарний паненцефаліт, прогресуючий (прогресуючий краснуший параліч).

Зокрема, даний винахід відноситься до нових способів і фармацевтичних композицій, які містять антигенні пептиди, що пропонуються у винаході та представлені в цьому описі, або їх функціональні фрагменти, та антитіла, перш за все моноклональні антитіла, включаючи їх функціональні фрагменти, які можна одержувати шляхом введення антигенних пептидів, що пропонуються у винаході та представлених у цьому описі, або їх функціональних фрагментів тварині-хазяїнові для відновлення або поліпшення, але, перш за все для повного відновлення когнітивної здатності до запам'ятовування, у ссавця, перш за все у людини, яка страждає захворюванням або порушенням, асоційованим з утворенням нейрофібрилярних ушкоджень.

Таким чином, об'єктом винаходу є антигенний пептид, перш за все модифікований антигенний пептид або його функціональний фрагмент, і фармацевтичні композиції, які містять зазначений антигенний пептид або його функціональний фрагмент, де пептид можна одержувати з тау-білка. Зокрема, винахід відноситься до антигенного пептиду, перш за все антигенного фосфо-пептиду або його функціонального фрагменту, що імітує основний патологічний фосфо-епітоп тау-білка, де пептид або його фрагмент додатково модифікований шляхом його приєднання до носія або реконструкції в носії, до фармацевтичної композиції, яка містить зазначений антигенний пептид або його функціональний фрагмент, і до способу одержання зазначеного пептиду або його функціонального фрагменту та фармацевтичної композиції відповідно, для лікування захворювань і порушень, які викликаються або асоційовані з утворенням нейрофібрилярних ушкоджень, основної патології головного мозку при таупатії, які являють собою гетерогенну групу нейродегенеративних захворювань або порушень, включаючи захворювання або порушення, які характеризуються одночасною наявністю тау- та амілоїдної патології, включаючи (але, не обмежуючись тільки ними) хворобу Альцгеймера, хворобу Крейцфельда-Якоба, боксерську деменцію, синдром Дауна, хворобу Герстманна-Штреусслера-Шейнкера, міозит з тільцями включення, церебральну амілоїдну ангіопатію, пов'язану з білком-пріоном, травматичне ушкодження головного мозку, а також інші захворювання або порушення без чіткої амілоїдною патології, включаючи (але, не обмежуючись тільки ними) комплекс аміотрофічний бічний склероз/паркінсонізму-деменції (синдром Гуама), не-гуамовського типу хворобу моторних нейронів, пов'язану з нейрофібрилярними сплетіннями, деменцію, пов'язану з накопиченням аргірофільних зерен, кортикобазальну дегенерацію, дифузійні нейрофібрилярні сплетіння з кальцифікацією, фронтотемпоральну деменцію з паркінсонізмом, зчеплену із хромосомою 17, хворобу Галлервордена-Шпатца, множинну системну атрофію, хворобу Німанна-Піка типу С, хворобу Піка, субкортикальний гліом, прогресуючий, супрануклеарний паненцефаліт, прогресуючий, підгострий склерозуючий паненцефаліт, деменцію, пов'язану тільки зі сплетіннями, постенцефалітний паркінсонізм, міотонічну дистрофію.

Один з варіантів здійснення винаходу відноситься до антигенного пептиду або його функціонального фрагменту та фармацевтичних композицій, які містять зазначений антигенний пептид або його функціональний фрагмент, де пептид або фрагмент містить від 5 амінокислотних залишків до 30 амінокислотних залишків, перш за все від 10 амінокислотних залишків до 25 амінокислотних залишків, перш за все від 12 амінокислотних залишків до 22 амінокислотних залишків, перш за все від 14 амінокислотних залишків до 20 амінокислотних залишків, перш за все від 16 амінокислотних залишків до 18 амінокислотних залишків відповідно, амінокислотної послідовності, вибраної із групи послідовностей, які представлені в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID

NO: 8 і SEQ ID NO: 9, де характерною рисою цих послідовностей є схема фосфолювання, асоційована з патологічним станом або порушенням, перш за все зі станом або порушенням, асоційованим з утворенням нейрофібрилярних ушкоджень.

Одним із варіантів здійснення винаходу є молекула нуклеїнової кислоти або її фрагменти, що кодує(ють) антигенний пептид або його функціональний фрагмент, вибраний із групи послідовностей, які представлені в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 і SEQ ID NO: 9.

Одним із варіантів здійснення винаходу є антигенний пептид, перш за все антигенний пептид, модифікований відповідно до цього винаходу, або його функціональний фрагмент і фармацевтична композиція, яка містить зазначений антигенний пептид або його функціональний фрагмент, де амінокислотна послідовність пептиду або фрагменту ідентична щонайменше на 80 %, переважно щонайменше на 85 %, переважно щонайменше на 90 %, переважно щонайменше на 95 %, переважно щонайменше на 98 %, переважно щонайменше на 99 % послідовності, представленої в SEQ ID NO: 2, і має практично таку ж імуногенну активність, що й зазначений антигенний пептид, послідовність якого представлена в SEQ ID NO: 2, де амінокислотний залишок, що відповідає амінокислотному залишку 18 (P-Tyr₁₈) SEQ ID NO: 2, є фосфольованим (T1).

Одним із варіантів здійснення винаходу є антигенний пептид, перш за все антигенний пептид, модифікований відповідно до цього винаходу, або його функціональний фрагмент і фармацевтична композиція, яка містить зазначений антигенний пептид або його функціональний фрагмент, де амінокислотна послідовність пептиду або фрагменту представлена в SEQ ID NO: 2, у якій амінокислотний залишок 18 (P-Tyr₁₈) є фосфольованим (T1).

Одним із варіантів здійснення винаходу є антигенний пептид, перш за все антигенний пептид, модифікований відповідно до цього винаходу, або його функціональний фрагмент і фармацевтична композиція, яка містить зазначений антигенний пептид або його функціональний фрагмент, де амінокислотна послідовність пептиду або фрагменту ідентична щонайменше на 80 %, переважно щонайменше на 85 %, переважно щонайменше на 90 %, переважно щонайменше на 95 %, переважно щонайменше на 98 %, переважно щонайменше на 99 %, послідовності, представленої в SEQ ID NO: 3 і SEQ ID NO: 4 відповідно, і має практично таку ж імуногенну активність, що й зазначений антигенний пептид, послідовність якого представлена в SEQ ID NO: 3, де щонайменше один, переважно щонайменше 2, переважно щонайменше 3, але найбільш переважно всі амінокислотні залишки, що відповідають амінокислотним залишкам 202 (P-Ser₂₀₂), 205 (P-Thr₂₀₅), 212 (P-Thr₂₁₂) і 214 (P-Ser₂₁₄) SEQ ID NO: 3 і 4 відповідно, є фосфольованими.

Одним із варіантів здійснення винаходу є антигенний пептид, перш за все антигенний пептид, модифікований відповідно до цього винаходу, або його функціональний фрагмент і фармацевтична композиція, яка містить зазначений антигенний пептид або його функціональний фрагмент, де амінокислотна послідовність пептиду або фрагменту представлена в SEQ ID NO: 3 і SEQ ID NO: 4 відповідно, у яких щонайменше один, переважно щонайменше 2, переважно щонайменше 3, але найбільш переважно усі амінокислотні залишки 202 (P-Ser₂₀₂), 205 (P-Thr₂₀₅), 212 (P-Thr₂₁₂) і 214 (P-Ser₂₁₄) є фосфольованими.

Одним із варіантів здійснення винаходу є антигенний пептид, перш за все антигенний пептид, модифікований відповідно до цього винаходу, або його функціональний фрагмент і фармацевтична композиція, яка містить зазначений антигенний пептид або його функціональний фрагмент, де амінокислотна послідовність пептиду або фрагменту ідентична щонайменше на 80 %, переважно щонайменше на 85 %, переважно щонайменше на 90 %, переважно щонайменше на 95 %, переважно щонайменше на 98 %, переважно щонайменше на 99 %, послідовності, представленої в SEQ ID NO: 4, і має практично таку ж імуногенну активність, що й зазначений антигенний пептид, послідовність якого представлена в SEQ ID NO: 4, де щонайменше один, переважно щонайменше 2 амінокислотних залишку, що відповідають амінокислотним залишкам 202 (P-Ser₂₀₂) і 205 (P-Thr₂₀₅) SEQ ID NO: 4, є фосфольованими.

Одним із варіантів здійснення винаходу є антигенний пептид, перш за все антигенний пептид, модифікований відповідно до цього винаходу, або його функціональний фрагмент і фармацевтична композиція, яка містить зазначений антигенний пептид або його функціональний фрагмент, де амінокислотна послідовність пептиду або фрагменту представлена в SEQ ID NO: 4, у якій щонайменше один, переважно щонайменше 2 амінокислотних залишку 202 (P-Ser₂₀₂) і 205 (P-Thr₂₀₅) є фосфольованими.

Одним із варіантів здійснення винаходу є антигенний пептид, перш за все антигенний пептид, модифікований відповідно до цього винаходу, або його функціональний фрагмент і

5

10

15

25

35

45

50

60

функціональний фрагмент, де амінокислотна послідовність пептиду або фрагменту представлена в SEQ ID NO: 7, у якій щонайменше один, переважно щонайменше 2, переважно щонайменше 3, але переважно всі амінокислотні залишки 202 (P-Ser₂₀₂), 205 (P-Thr₂₀₅), 212 (P-Thr₂₁₂) і 214 (P-Ser₂₁₄) SEQ ID NO: 7 є фосфольованими.

5 Одним із варіантів здійснення винаходу є антигенний пептид, перш за все антигенний пептид, модифікований відповідно до цього винаходу, або його функціональний фрагмент і фармацевтична композиція, яка містить зазначений антигенний пептид або його функціональний фрагмент, де амінокислотна послідовність пептиду або фрагменту ідентична
10 щонайменше на 80 %, переважно щонайменше на 85 %, переважно щонайменше на 90 %, переважно щонайменше на 95 %, переважно щонайменше на 98 %, переважно щонайменше на 99 %, послідовності, представленої в SEQ ID NO: 8, і має практичну таку ж імуногенну активність, що й зазначений антигенний пептид, послідовність якого представлена в SEQ ID NO: 8, де амінокислотний залишок, що відповідає амінокислотному залишку 409 (P-Ser₄₀₉) SEQ ID NO: 8, є фосфольованим.

15 Одним із варіантів здійснення винаходу є антигенний пептид, перш за все антигенний пептид, модифікований відповідно до цього винаходу, або його функціональний фрагмент і фармацевтична композиція, яка містить зазначений антигенний пептид або його функціональний фрагмент, де амінокислотна послідовність пептиду або фрагменту представлена в SEQ ID NO: 8, у якій амінокислотний залишок, що відповідає амінокислотному
20 залишку 409 (P-Ser₄₀₉) SEQ ID NO: 8, є фосфольованим.

Одним із варіантів здійснення винаходу є антигенний пептид, перш за все антигенний пептид, модифікований відповідно до цього винаходу, або його функціональний фрагмент і фармацевтична композиція, яка містить зазначений антигенний пептид або його функціональний фрагмент, де амінокислотна послідовність пептиду або фрагменту ідентична
25 щонайменше на 80 %, переважно щонайменше на 85 %, переважно щонайменше на 90 %, переважно щонайменше на 95 %, переважно щонайменше на 98 %, переважно щонайменше на 99 %, послідовності, представленої в SEQ ID NO: 9, і має практичну таку ж імуногенну активність, що й зазначений антигенний пептид, послідовність якого представлена в SEQ ID NO: 9, де амінокислотний залишок, що відповідає амінокислотному залишку 404 (P-Ser₄₀₄) SEQ ID
30 NO: 9, є фосфольованим.

Одним із варіантів здійснення винаходу є антигенний пептид, перш за все антигенний пептид, модифікований відповідно до цього винаходу, або його функціональний фрагмент і фармацевтична композиція, яка містить зазначений антигенний пептид або його функціональний фрагмент, де амінокислотна послідовність пептиду або фрагменту
35 представлена в SEQ ID NO: 9, у якій амінокислотний залишок, що відповідає амінокислотному залишку 404 (P-Ser₄₀₄) SEQ ID NO: 9, є фосфольованим.

Даний винахід відноситься також до антигенного пептиду, модифікованого відповідно до цього винаходу, або його функціональному фрагменту та до фармацевтичних композицій, які містить зазначений модифікований антигенний пептид або його функціональний фрагмент, де
40 пептид практично ідентичний зазначеним вище антигенним пептидам, послідовності яких представлені в SEQ ID NO: 2-9, і має практичну таку ж імуногенну активність, що й зазначені антигенні пептиди, послідовності яких представлені в SEQ ID NO: 2-9, але конкретний варіант пептидного фрагменту представляє собою консервативно модифікований варіант одного із зазначених фрагментів, при цьому зміни приводять до заміни однієї або декількох амінокислот,
45 переважно від 1 до 10 амінокислот, більш переважно від 1 до 6 амінокислот, ще більш переважно від 1 до 4 амінокислот, але найбільш переважно від 1 до 3 амінокислот, на хімічно подібну амінокислоту. Таблиці консервативних заміні, що приводять до одержання функціонально подібних амінокислот, добре відомі в даній області та представлені нижче в цьому описі. Консервативні заміни переважно слід здійснювати таким чином, щоб загальний
50 чистий заряд пептиду, а також розподіл заряду по молекулі пептиду, залишались практично такими ж.

Під обсяг даного винаходу підпадає також варіант пептидного фрагменту, переважно варіант антигенного пептиду, модифікованого відповідно до цього винаходу, і фармацевтична композиція, яка містить зазначений варіант пептидного фрагменту, де пептид практично
55 ідентичний зазначеним вище фрагментам, що пропонуються у винаході, і має практичну таку ж біологічну активність, що й зазначені фрагменти, при цьому в ньому один або кілька амінокислотних залишків вилучені в результаті делеції.

Наступним варіантом винаходу є пептид, що пропонується у винаході, або його функціональний фрагмент у формі полімера, вибраний з групи, що включає 2-мер, 3-мер, 4-мер,
60 5-мер, 6-мер, 7-мер, 8-мер, 9-мер, 10-мер, 11-мер, 12-мер, 13-мер, 14-мер, 15-мер, 16-мер, 20-

мер, 30-мер та 50-мер, при цьому мономерні одиниці вказаного полімеру завжди є ідентичними або представляють собою різні мономерні одиниці та вибрані із групи, що включає пептид, що пропонується у винаході та представлений у цьому описі, переважно пептид, послідовність якого представлена в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 і SEQ ID NO: 9, або його функціональний фрагмент і варіанти пептидів.

В одному з варіантів здійснення винаходу антигенний пептид, що пропонується у винаході та представлений у цьому описі, або його функціональний фрагмент модифікують шляхом приєднання до носія або реконструкції в носії, перш за все носії, який також функціонує в якості ад'юванта, з одержанням надмолекулярної антигенної конструкції. У конкретному варіанті здійснення винаходу антигенний пептид, що пропонується у винаході та представлений у цьому описі, або його функціональний фрагмент модифікують шляхом приєднання або реконструкції в ліпосомі, наприклад, з одержанням "надмолекулярної антигенної конструкції", яка описана в опублікованій міжнародній заявці на патент WO 2005/081872, опис якої повністю включений в цей опис в якості посилання. Антигенний пептид або його функціональний фрагмент додатково модифікують таким чином, щоб він мав здатність до унікальної презентації антигенного пептиду на поверхні носія, що приводить до підвищеної експозиції антигену та, зрештою, до створення антитіл, які відрізняються високим ступенем конформаційної чутливості. Зокрема, антигенний пептид, що пропонується у винаході та представлений у цьому описі, модифікують за допомогою асоціації з ліпофільним або гідрофобним фрагментом, що полегшує вбудовування в ліпідний бішар ліпосоми-носія/імунного ад'юванта, перш за все з ліпофільним або гідрофобним фрагментом, який функціонує в якості "якоря" для закріплення пептиду в бішарі ліпосоми та має розмір, який забезпечує розташування пептиду в безпосередній близькості від поверхні ліпосоми та стабілізує його в такому положенні.

В іншому варіанті здійснення винаходу ліпофільний або гідрофобний залишок представляє собою жирну кислоту, тригліцерид або фосфоліпід, перш за все жирну кислоту, тригліцерид або фосфоліпід, які містять вуглецевий C₁₂-C₂₄-ланцюг, але найбільш переважно представляє собою пальмітинову кислоту.

У конкретному варіанті здійснення винаходу антигенний пептид, що пропонується у винаході та представлений у цьому описі, або його функціональний фрагмент модифікують за допомогою щонайменше двох молекул пальмітинової кислоти, ковалентно пов'язаних з N- та C-кінцями зазначеного антигенного пептиду або його функціонального фрагменту, або шляхом реконструкції в носії, що представляє собою ліпосому.

В одному з варіантів здійснення винаходу кожний з пептидів або фрагментів у кон'югатах зшитий із чотирма молекулами пальмітинової кислоти; у результаті вони є тетратетрапальмітованими.

В одному з варіантів здійснення винаходу дві молекули пальмітинової кислоти зшивають із N-кінцем і дві молекули пальмітинової кислоти зшивають із C-кінцем пептиду або фрагменту.

У додатковому варіанті здійснення даного винаходу антигенний пептид, що пропонується у винаході та представлений у цьому описі, або його функціональний фрагмент модифікують за допомогою асоціації з ліпофільним або гідрофобним фрагментом, таким, наприклад, як пальмітинова кислота, і реконструюють у ліпосомі, при цьому препарат у вигляді ліпосоми може містити також ад'юванти, такі, наприклад, як ліпід А, квасці, фосфат кальцію, інтерлейкін-1 та/або мікрокапсули з полісахаридів і білків, але перш за все детоксифікований ліпід А, такий як монофосфорильний або дифосфорильний ліпід А, або квасці, що дозволяє одержувати надмолекулярну антигенну конструкцію.

Одним із варіантів здійснення винаходу є надмолекулярна конструкція, що пропонується у винаході та представлена в цьому описі, яка містить із розрахунку на одну молекулу носія один або декілька антигенних пептидів, переважно два або більшу кількість антигенних пептидів, що пропонуються у винаході та представлених у цьому описі, або їх функціональних фрагментів.

В одному з варіантів здійснення винаходу молекула-носії представляє собою ліпосому.

В одному з варіантів здійснення винаходу два або більша кількість антигенних пептидів представляють собою однакові або різні пептиди, перш за все пептиди, вибрані із групи, що включає SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 і SEQ ID NO: 9, або їх функціональні фрагменти та варіанти пептидів.

Одним із варіантів здійснення винаходу є надмолекулярна конструкція, що пропонується у винаході та представлена в цьому описі, яка містить із розрахунку на одну молекулу носія комбінацію двох або більшої кількості антигенних пептидів, послідовності яких представлені в SEQ ID NO: 3 і SEQ ID NO: 4, або їх функціональних фрагментів.

Одним із варіантів здійснення винаходу є антитіло, перш за все моноклональне антитіло,

включаючи будь-який функціональний еквівалент антитіла або його функціональні фрагменти, де антитіло розпізнає та зв'язується з фосфольованим патологічним конформером тау-білка або тими фрагментами конформера, які обумовлюють патологічні властивості зазначеного конформера, перш за все з патологічним фосфо-епітопом тау-білка.

5 Зокрема, даний винахід відноситься до антитіла, перш за все моноклонального антитіла, включаючи будь-який функціональний еквівалент антитіла або його функціональні фрагменти, де антитіло розпізнає та зв'язується з високою специфічністю з фосфольованим патологічним конформером тау-білка або тими фрагментами конформера, які обумовлюють патологічні властивості зазначеного конформера, перш за все з патологічним фосфо-епітопом тау-білка.

10 У конкретному варіанті здійснення винаходу антитіло, перш за все моноклональне антитіло, включаючи будь-який функціональний еквівалент антитіла або його функціональні фрагменти, що пропонуються у винаході, зв'язується з патологічним конформером тау-білка або тими фрагментами конформера, які обумовлюють патологічні властивості зазначеного конформера, перш за все з патологічним фосфо-епітопом тау-білка, з афінністю, яка щонайменше на 40 %, переважно щонайменше на 50 %, переважно щонайменше на 60 %, переважно по крайній мірі на 70 %, переважно щонайменше на 80 %, переважно щонайменше на 90 %, 95 % та аж до 100 % вище, чим афінність зв'язування з нефосфольованим, непатологічним конформером тау-білка.

20 Конкретним варіантом здійснення винаходу є антитіло, перш за все моноклональне антитіло, включаючи будь-який функціональний еквівалент антитіла або його функціональні фрагменти, що пропонуються у винаході, який зв'язується специфічно з нейрофібрилярними сплетіннями (NFT) і волокнами нейропілію в головному мозку людини, що страждає хворобою Альцгеймера.

25 Іншим об'єктом даного винаходу є антитіла, перш за все моноклональні антитіла або їх функціональні фрагменти, які безпосередньо та специфічно зв'язуються з епітопом на тау-білці або з комбінацією епітопів, перш за все з епітопом, специфічним для фосфольованого патологічного конформера тау-білка, перш за все з патологічним фосфо-епітопом тау-білка, таким, наприклад, як епітоп, який представляє собою або входить у пептидну послідовність, вибрану із групи послідовностей, представлених в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 і SEQ ID NO: 9, і варіанти їх фрагментів.

30 Зокрема, даний винахід відноситься до антитіла, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, перш за все моноклонального антитіла, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, які можна одержувати імунізацією придатної тварини антигенним пептидом, зокрема пептидною композицією, що пропонується у винаході та представленій вище в цьому описі, перш за все композицією, яка містить антигенний пептид, що має амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 і SEQ ID NO: 9, включаючи функціональний фрагмент або варіанти їх фрагментів.

Одним із варіантів здійснення винаходу є антитіло, перш за все моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, де антитіло відрізняється властивостями антитіла, яке продукується клітинною лінією гібридами ACI-41-Ab1, депонованої 3 березня 2010 р. під реєстраційним номером DSM ACC3043.

45 Більш конкретно, винахід відноситься до антитіла, перш за все моноклонального антитіла, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, яке продукується клітинною лінією гібридами ACI-41-Ab1, депонованої 3 березня 2010 р. під реєстраційним номером DSM ACC3043.

Одним із варіантів здійснення винаходу є антитіло, перш за все моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, де антитіло відрізняється властивостями антитіла, яке продукується клітинною лінією гібридами 2B6, депонованої 10 березня 2010 р. під реєстраційним номером DSM ACC3044.

Більш конкретно, винахід відноситься до антитіла, перш за все моноклонального антитіла, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, яке продукується клітинною лінією гібридами 2B6, депонованої 10 березня 2010 р. під реєстраційним номером DSM ACC3044.

Одним із варіантів здійснення винаходу є антитіло, перш за все моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, де антитіло відрізняється властивостями антитіла, яке продукується клітинною лінією гібридами 3A8, депонованої 10 березня 2010 р. під реєстраційним номером DSM ACC3045.

Іншим конкретним варіантом здійснення винаходу є клітинна лінія гібридами 6H1, депонована 10 березня 2010 р. під реєстраційним номером DSM ACC3049.

Іншим конкретним варіантом здійснення винаходу є клітинна лінія гібридами 7C2, депонована 10 березня 2010 р. під реєстраційним номером DSM ACC3050.

5 Під обсяг винаходу підпадають також субклони та клони, що представляють собою варіанти зазначених вище конкретних клітинних ліній гібридом, які зберігають здатність продукувати антитіло, що має здатність до специфічного зв'язування з тау-білком, що пропонується в цьому винаході.

10 Конкретним варіантом здійснення винаходу є фармацевтична композиція та спосіб одержання фармацевтичної композиції, яка містить антигенний пептидний фрагмент, перш за все антигенний пептидний фрагмент, модифікований за допомогою приєднання до носія та/або реконструкції в носії, перш за все носії, що представляє собою ліпосому, що пропонується у винаході та представлену в цьому описі, або його функціональний фрагмент у комбінації з фармацевтично прийнятним носієм та/або розріджувачем та/або ексципієнтом, призначена для

15 збереження або поліпшення, перш за все для повного відновлення когнітивної здатності до запам'ятовування, у тварини, перш за все у ссавця або в людини, яка страждає порушенням пам'яті.

Одним із варіантів здійснення винаходу є фармацевтична композиція, яка містить антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти,

20 перш за все моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, що пропонується в цьому винаході, у терапевтично ефективній кількості в комбінації з фармацевтично прийнятним носієм та/або розріджувачем та/або ексципієнтом.

Ще одним об'єктом винаходу є фармацевтична композиція, що пропонується у винаході та представлена в цьому описі, та/або спосіб лікування захворювань і порушень, які викликаються або асоційовані з утворенням нейрофібрилярних ушкоджень, основної патології головного мозку при таупатії, які представляють собою гетерогенну групу нейродегенеративних захворювань або порушень, включаючи захворювання або порушення, які характеризуються

25 одночасним існуванням тау- та амілоїдної патології, включаючи (але не обмежуючись тільки ними) хворобу Альцгеймера, хворобу Крейцфельда-Якоба, боксерську деменцію, синдром Дауна, хворобу Герстманна-Штреусслера-Шейнкера, міозит з тільцями включення, церебральну амілоїдну ангіопатію, пов'язану з білком-пріоном, травматичне ушкодження головного мозку, а також інші захворювання або порушення без чіткої амілоїдної патології, включаючи (але, не обмежуючись тільки ними) комплекс аміотрофічний бічний склероз / паркінсонізм-деменція

30 (синдром Гуама), не-гуамовського типу хворобу моторних нейронів, пов'язану з нейрофібрилярними сплетіннями, деменцію, пов'язану з накопиченням аргірофільних зерен, кортикобазальну дегенерацію, дифузійні нейрофібрилярні сплетіння з кальцифікацією, фронтотемпоральну деменцію з паркінсонізмом, зчеплену із хромосомою 17, хворобу Галлервордена-Шпатца, множинну системну атрофію, хворобу Німанна-Піка типу С, хворобу Піка, субкортикальний гліом, прогресуючий, супрануклеарний паненцефаліт, прогресуючий, підгострий склерозуючий паненцефаліт, деменцію, зв'язану тільки зі сплетіннями, постенцефалітний паркінсонізм, міотонічну дистрофію, де спосіб складається в тому, що тварині, зокрема ссавцеві або людині, вводять фармацевтичну композицію, що пропонується у

35 винаході та представлену в цьому описі, у терапевтично ефективній кількості в комбінації з фармацевтично прийнятним носієм та/або розріджувачем та/або ексципієнтом.

Конкретним варіантом здійснення винаходу є фармацевтична композиція, що пропонується у винаході та представлена в цьому описі, та/або спосіб збереження або поліпшення, перш за все для повного відновлення когнітивної здатності до запам'ятовування, у тварини, перш за все у ссавця або людини, яка страждає порушенням пам'яті, де спосіб складається в тому, що

40 тварині, зокрема ссавцеві або людині вводять фармацевтичну композицію, що пропонується у винаході та представлену в цьому описі, у терапевтично ефективній кількості в комбінації з фармацевтично прийнятним носієм та/або розріджувачем та/або ексципієнтом.

Наступним об'єктом винаходу є фармацевтична композиція та спосіб одержання зазначеної композиції, а також спосіб індукції імунної відповіді у тварини, перш за все у ссавця або людини, що страждає захворюванням і станом, які викликаються або асоційовані з утворенням нейрофібрилярних ушкоджень, який полягає в тому, що тварині або людині вводять фармацевтичну композицію, що пропонується у винаході, у терапевтично ефективній кількості в комбінації з фармацевтично прийнятним носієм та/або розріджувачем та/або ексципієнтом.

Одним із варіантів здійснення винаходу є спосіб індукції імунної відповіді у тварини, перш за

60 все у ссавця або людини, що страждає нейрофібрилярними ушкодженнями, які приводять до

таупатії, що досягає такого рівня, щоб можна було зберігати або поліпшувати симптоми, асоційовані із цим захворюванням або станом, такі, наприклад, як погіршення пам'яті, перш за все аж до повного відновлення вихідного стану.

5 Фармацевтична композиція, що містить антигенний пептид, що пропонується у винаході та представлений у цьому описі, яка при введенні тварині, перш за все ссавцеві, але переважно людині приводить головним чином до утворення антитіл незапальних Th2-підтипів, наприклад, ізотипу IgG1 і IgG2b, та/або незалежних від Т-клітин антитіл підкласів IgG, таких, наприклад, як IgG3, та/або не приводить до істотного підвищення рівня маркерів запалення в головному мозку, вибраних із групи, що включає IL-1 β , IL-6, IFN- γ і TNF α .

10 Згідно з іншим об'єктом винаходу фармацевтичну композицію, що містить антигенний пептид, що пропонується у винаході та представлений у цьому описі, можна застосовувати для індукції незалежної від Т-клітин імунної відповіді при лікуванні захворювання, стану або порушення в пацієнта, перш за все хворої тварини або людини, перш за все пацієнта, який потребує зазначеної незалежної від Т-клітин відповіді, такого, наприклад, як пацієнт із імунною толерантністю або пацієнт із активованими Т-клітинами, у якій антигенний пептид модифікований за допомогою приєднання до носія та/або реконструкції в носії, перш за все ліпосомному носії, у результаті чого антиген презентується на поверхні носія, перш за все ліпосоми.

20 В одному з варіантів здійснення винаходу антигенна композиція, що пропонується у винаході та представлена в цьому описі, має ефективність у якості імуностимулятора.

У конкретному варіанті здійснення винаходу зазначений пептидний антиген презентується у вигляді масиву з великою кількістю повторів на поверхні ліпосоми. В іншому конкретному варіанті здійснення винаходу зазначений антиген не містить Т-клітинний епітоп.

25 В одному з варіантів здійснення винаходу антигенну композицію, що пропонується у винаході та представлену в цьому описі, застосовують для лікування пацієнта з імунною толерантністю або пацієнта з активованими Т-клітинами, перш за все пацієнта з ослабленим імунітетом, зокрема пацієнта, що страждає аутоімунним захворюванням, перш за все пацієнта з Т-клітинним дефіцитом, зокрема з Т-клітинним дефіцитом, обумовленим виснаженням у зазначеного пацієнта CD-4-Т-клітин та/або зі зниженим рівнем експресії CD14 та/або CD40L на CD-4-Т-клітинах.

Антитіла, що пропонуються у винаході, можна застосовувати в способі діагностування асоційованого з тау-білком захворювання або стану в пацієнта, який полягає в тому, що визначають імуноспецифічне зв'язування антитіла або його активного фрагменту з епітопом тау-білка в зразку або *in situ*, який включає стадії, на яких

35 (а) приводять у контакт зразок або специфічну частину організму або область організму, який/яка, як очікується, може містити тау-білок, з антитілом, яке зв'язується з епітопом тау-білка;

(б) дають можливість антитілу зв'язатися з тау-білком з утворенням імунологічного комплексу;

(в) виявляють утворення імунологічного комплексу; і

40 (г) установлюють кореляцію між присутністю або відсутністю імунологічного комплексу та присутністю або відсутністю тау-білка в зразку або специфічній частині або області організму.

Одним із варіантів здійснення є спосіб діагностування схильності пацієнта до асоційованого з тау-білком захворювання або стану, який полягає в тому, що визначають імуноспецифічне зв'язування моноклонального антитіла або його активного фрагменту з епітопом тау-білка в зразку або *in situ*, який включає стадії, на яких

45 (а) приводять у контакт зразок або специфічну частину організму або область організму, який/яка, як очікується, може містити тау-антиген, з антитілом, що пропонується у винаході та представленим у цьому описі, де антитіло зв'язується з епітопом тау-білка;

(б) дають можливість антитілу зв'язатись з тау-антигеном з утворенням імунологічного комплексу;

50 (в) виявляють утворення імунологічного комплексу; і

(г) установлюють кореляцію між присутністю або відсутністю імунологічного комплексу та присутністю або відсутністю тау-антигену в зразку або специфічній частині або області організму,

55 (д) здійснюють порівняння кількості зазначеного імунологічного комплексу з нормальним контрольним значенням,

при цьому збільшення кількості агрегатів у порівнянні з нормальним контрольним значенням свідчить про те, що пацієнт страждає або має ризик розвитку асоційованого з тау-білком захворювання або стану.

60 Наступним варіантом здійснення винаходу є спосіб моніторингу мінімальних залишкових

ознак захворювання в пацієнта після лікування антитілом або композицією за одним із попередніх пунктів, який полягає в тому, що:

(а) приводять у контакт зразок або специфічну частину організму або область організму, який/яка, як очікується, може містити тау-антиген, з антитілом, що пропонується у винаході та представленим у цьому описі, де антитіло зв'язується з епітопом тау-білка;

(б) дають можливість антитілу зв'язатись з тау-антигеном з утворенням імунологічного комплексу;

(в) виявляють утворення імунологічного комплексу; і

(г) установлюють кореляцію між присутністю або відсутністю імунологічного комплексу та присутністю або відсутністю тау-антигену в зразку або специфічній частині або області організму,

(д) здійснюють порівняння кількості зазначеного імунологічного комплексу з нормальним контрольним значенням,

при цьому збільшення кількості агрегатів у порівнянні з нормальним контрольним значенням свідчить про те, що пацієнт усе ще страждає мінімальними залишковими ознаками захворювання.

Наступним варіантом здійснення винаходу є спосіб прогнозування сприйнятливості пацієнта до лікування антитілом або композицією за одним із попередніх пунктів, який полягає в тому, що:

(а) приводять у контакт зразок або специфічну частину організму або область організму, який/яка, як очікується, може містити тау-антиген, з антитілом, що пропонується у винаході та представленим у цьому описі, де антитіло зв'язується з епітопом тау-білка;

(б) дають можливість антитілу зв'язатись з тау-антигеном з утворенням імунологічного комплексу;

(в) виявляють утворення імунологічного комплексу; і

(г) установлюють кореляцію між присутністю або відсутністю імунологічного комплексу та присутністю або відсутністю тау-антигену в зразку або специфічній частині або області організму,

(д) здійснюють порівняння кількості зазначеного імунологічного комплексу до, і після початку лікування,

при цьому зниження кількості агрегатів свідчить про те, що існує висока ймовірність того, що пацієнт буде мати сприйнятливості до лікування.

Згідно з іншим варіантом здійснення винаходу антитіло, що пропонується у винаході, можна застосовувати в тест-наборі для виявлення та діагностування асоційованих з тау-білком захворювань і станів.

Зокрема, запропонований тест-набір, призначений для виявлення та діагностування асоційованих з тау-білком захворювань і станів, який містить антитіла, що пропонується у винаході, зокрема тест-набір, який містить контейнер, що включає одне або кілька антитіл, що пропонується у цьому винаході, та інструкції із застосування антитіл для зв'язування з тау-антигеном з утворенням імунологічного комплексу, так, щоб присутність або відсутність імунологічного комплексу корелювала із присутністю або відсутністю тау-антигена.

Ці та інші об'єкти, особливості та переваги даного винаходу повинні стати більш якими після ознайомлення із прикладним докладним описом варіантів здійснення винаходу та прикладеною формулою винаходу.

Короткий опис креслень і послідовностей

На кресленнях показано:

на фіг. 1а – результати аналізу антитіл до Tau5-20 [pY18] ізо типу IgG у мишей дикого типу (WT), імунізованих вакциною ACI-33. Аналіз антитіл до Tau5-20 [pY18] ізо типу IgG здійснювали в сироватці мишей дикого типу лінії C57BL/6, яким вводили шляхом 3 ін'єкцій ACI-33 у дні d0, d13 і d28 і відбирали зразки крові в d-1, d27 і d47. Результати виражені у вигляді середніх значень ОГ + стандартне відхилення для групи, що складається з 6 мишей;

на фіг. 1б – результати аналізу антитіл до Tau5-20 [pY18] ізо типу IgG в ТКО-мишах, імунізованих ACI-33. Аналіз антитіл до Tau5-20 [pY18] ізо типу IgG здійснювали в сироватці мишей дикого типу лінії C57BL/6, яким вводили шляхом 3 ін'єкцій ACI-33 в d0, d13 і d28 і відбирали зразки крові в d-1, d27 і d47. Результати виражені у вигляді середніх значень ОГ + стандартне відхилення для групи, що складається з 6 мишей;

на фіг. 2а – результати аналізу антитіл до Tau393-408 [pS396/pS404] ізо типу IgG в WT-мишах, імунізованих ACI-35. Аналіз антитіл до Tau393-408 [pS396/pS404] ізо типу IgG здійснювали в сироватці мишей дикого типу лінії C57BL/6, яким вводили шляхом 5 ін'єкцій ACI-35 в d0, d16, d30, d99 і d113 і відбирали зразки крові в d-1, d28, d42, d98 і d126. Результати

виражені у вигляді середніх значень ОГ + стандартне відхилення для групи, що складається з 6 мишей;

на фіг. 2б – результати аналізу антитіл до Tau393-408 [pS396/pS404] ізо типу IgG в ТКО-мишах, імунізованих АСІ-35. Аналіз антитіл до Tau393-408 [pS396/pS404] ізо типу IgG здійснювали в сироватці ТКО-мишей, яким вводили шляхом 5 ін'єкцій АСІ-35 в d0, d16, d30, d99 і d113 і відбирали зразки крові в d-1, d28, d42, d98 і d126. Результати виражені у вигляді середніх значень ОГ + стандартне відхилення для групи, що складається з 6 мишей;

на фіг. 3а – результати аналізу антитіл до Tau401-418 [pS404/S409] ізо типу IgG в WT-мишах, імунізованих АСІ-36. Аналіз антитіл до Tau401-418 [pS404/S409] ізо типу IgG здійснювали в сироватці мишей дикого типу лінії C57BL/6, яким вводили шляхом 3 ін'єкцій АСІ-36 в d0, d13 і d28 і відбирали зразки крові в d-1, d27 і d47. Результати виражені у вигляді середніх значень ОГ + стандартне відхилення для групи, що складається з 6 мишей;

на фіг. 3б – результати аналізу антитіл до Tau401-418 [pS404/S409] ізо типу IgG в ТКО-мишах, імунізованих АСІ-36. Аналіз антитіл до Tau401-418 [pS404/S409] ізо типу IgG здійснювали в сироватці ТКО-мишей, яким вводили шляхом 3 ін'єкцій АСІ-36 в d0, d13 і d28 і відбирали зразки крові в d-1, d27 і d47. Результати виражені у вигляді середніх значень ОГ + стандартне відхилення для групи, що складається з 6 мишей;

фіг. 4а/4б – результати аналізу антитіл до Tau206-221 [pT212/pS214] і до Tau196-211 [pS202/pT205] ізо типу IgG в WT-мишах, імунізованих АСІ-41. Аналіз антитіл до Tau206-221 [pT212/pS214] і до Tau196-211 [pS202/pT205] ізо типу IgG здійснювали в сироватці мишей дикого типу лінії C57BL/6, яким вводили шляхом 3 ін'єкцій АСІ-41 в d0, d20 і d35 і відбирали зразки крові в d-1, d34 і d48. Результати виражені у вигляді середніх значень ОГ + стандартне відхилення для групи, що складається з 6 мишей; одну і ту ж сироватку оцінювали з використанням обох фосфолізованих тау-пептидів (pTau, pTau-пептиди);

на фіг. 4в/4г – результати аналізу антитіл до Tau206-221 [pT212/pS214] і до Tau196-211 [pS202/pT205] ізо типу IgG в ТКО-мишах, імунізованих АСІ-41. Аналіз антитіл до Tau206-221 [pT212/pS214] і до Tau196-211 [pS202/pT205] ізо типу IgG здійснювали в сироватці ТКО, яким вводили шляхом 3 ін'єкцій АСІ-41 в d0, d20 і d35 і відбирали зразки крові в d-1, d34 і d48. Результати виражені у вигляді середніх значень ОГ + стандартне відхилення для групи, що складається з 6 мишей; одну і ту ж сироватку оцінювали з використанням обох pTau-пептидів;

на фіг. 5а – результати аналізу антитіл до Tau5-20 [pY18] ізо типів IgG і IgM в WT-мишах, імунізованих АСІ-33. Аналіз антитіл до Tau5-20 [pY18] ізо типів IgG1, -2а, -2b, -3 і IgM здійснювали в сироватці C57BL/6-мишей через 47 днів після першої імунізації з використанням АСІ-33. Результати виражені у вигляді середніх значень ОГ при застосуванні розведення 1/100 (IgG1), 1/100 (IgG2а), 1/100 (IgG2b), 1/100 (IgG3) і 1/3200 (IgM) + стандартне відхилення для групи, що складається з 6 мишей;

на фіг. 5б – результати аналізу антитіл до Tau5-20 [pY18] ізо типів IgG і IgM в ТКО-мишах, імунізованих АСІ-33. Аналіз антитіл до Tau5-20 [pY18] ізо типів IgG1, -2а, -2b, -3 і IgM здійснювали в сироватці ТКО-мишей через 47 днів після першої імунізації з використанням АСІ-33. Результати виражені у вигляді середніх значень ОГ при застосуванні розведення 1/100 (IgG1), 1/100 (IgG2а), 1/100 (IgG2b), 1/100 (IgG3) і 1/3200 (IgM) + стандартне відхилення для групи, що складається з 6 мишей;

на фіг. 6а – результати аналізу антитіл до Tau393-408 [pS396/pS404] ізо типів IgG і IgM в WT-мишах, імунізованих АСІ-35. Аналіз антитіл до Tau393-408 [pS396/pS404] ізо типів IgG1, -2а, -2b, -3 і IgM здійснювали в сироватці C57BL/6-мишей через 42 дні після першої імунізації з використанням АСІ-35. Результати виражені у вигляді середніх значень ОГ при застосуванні розведення 1/100 (IgG1), 1/1600 (IgG2а), 1/1600 (IgG2b), 1/800 (IgG3) і 1/1600 (IgM) + стандартне відхилення для групи, що складається з 6 мишей;

на фіг. 6б – результати аналізу антитіл до Tau393-408 [pS396/pS404] ізо типів IgG і IgM в ТКО-мишах, імунізованих АСІ-35. Аналіз антитіл до Tau393-408 [pS396/pS404] ізо типів IgG1, -2а, -2b, -3 і IgM здійснювали в сироватці ТКО-мишей через 42 дні після першої імунізації з використанням АСІ-35. Результати виражені у вигляді середніх значень ОГ при застосуванні розведення 1/100 (IgG1), 1/1600 (IgG2а), 1/1600 (IgG2b), 1/800 (IgG3) і 1/1600 (IgM) + стандартне відхилення для групи, що складається з 6 мишей;

на фіг. 7а – результати аналізу антитіл до Tau401-418 [pS404/S409] ізо типів IgG і IgM в WT-мишах, імунізованих АСІ-36. Аналіз антитіл до Tau401-418 [pS404/S409] ізо типів IgG1, -2а, -2b, -3 і IgM здійснювали в сироватці C57BL/6-мишей через 47 днів після першої імунізації з використанням АСІ-36. Результати виражені у вигляді середніх значень ОГ при застосуванні розведення 1/100 (IgG1), 1/400 (IgG2а), 1/400 (IgG2b), 1/100 (IgG3) і 1/400 (IgM) + стандартне відхилення для групи, що складається з 6 мишей;

на фіг. 7б – результати аналізу антитіл до Tau401-418 [pS404/S409] ізотипів IgG і IgM ТКО-мишах, імунізованих ACI-36. Аналіз антитіл до Tau401-418 [pS404/S409] ізотипів IgG1, -2a, -2b, -3 і IgM здійснювали в сироватці ТКО-мишей через 47 днів після першої імунізації з використанням ACI-36. Результати виражені у вигляді середніх значень ОГ при застосуванні розведення 1/100 (IgG1), 1/400 (IgG2a), 1/400 (IgG2b), 1/100 (IgG3) і 1/400 (IgM) + стандартне відхилення для групи, що складається з 5 мишей;

на фіг. 8а – результати аналізу антитіл до Tau196-211 [pS202/pT205] ізотипів IgG і IgM в WT-мишах, імунізованих ACI-41. Аналіз антитіл до Tau196-211 [pS202/pT205] ізотипів IgG1, -2a, -2b, -3 і IgM здійснювали в сироватці C57BL/ 6-мишей через 48 днів після першої імунізації з використанням ACI-41. Результати виражені у вигляді середніх значень ОГ при застосуванні розведення 1/100 (IgG1), 1/100 (IgG2a), 1/3200 (IgG2b), 1/1600 (IgG3) і 1/3200 (IgM) + стандартне відхилення для групи, що складається з 6 мишей;

на фіг. 8б – результати аналізу антитіл до Tau196-211 [pS202/pT205] ізотипів IgG і IgM в ТКО-мишах, імунізованих ACI-41. Аналіз антитіл до Tau196-211 [pS202/pT205] ізотипів IgG1, -2a, -2b, -3 і IgM здійснювали в сироватці ТКО-мишей через 48 днів після першої імунізації з використанням ACI-41. Результати виражені у вигляді середніх значень ОГ при застосуванні розведення 1/100 (IgG1), 1/100 (IgG2a), 1/3200 (IgG2b), 1/1600 (IgG3) і 1/3200 (IgM) + стандартне відхилення для групи, що складається з 6 мишей;

на фіг. 9а/9б - супернатанти гібридом з T25-колб, отримані після вакцинації з використанням ACI-36: TAUIR-скринінг (скринінг на основі імунореактивного фарбування тау-білка) і Тау-ELISA-скринінг. 9а: TAUIR-фарбування старих biGT-мишей з використанням нерозведеного супернатанта. 9б: Аналіз титрів антитіл до рТау-пептиду T4.5, до Тау-пептиду T4.6, до рТау-білка та до Тау-білка в зразках клонів нерозведеного супернатанта. Результати виражені у вигляді ОГ;

на фіг. 10а/10б/10в - супернатанти гібридом з T25-колб, отримані після вакцинації з використанням ACI-41: TAUIR-скринінг і Тау-ELISA-скринінг. 10а: TAUIR-фарбування старих biGT-мишей з використанням нерозведеного супернатанта. 9б: Аналіз титрів антитіл до рТау-пептиду T8.5, до Тау-пептиду T8.6, до рТау-білка та до Тау-білка в зразках нерозведеного клону супернатанта. Результати виражені у вигляді ОГ; 10в: Аналіз титрів антитіл до рТау-пептиду T9.5, до Тау-пептиду T9.6, до рТау-білка та до Тау-білка в зразках клонів нерозведеного супернатанта. Результати виражені у вигляді ОГ;

фіг. 11 – результати аналізу супернатанта гібридами на планшеті, сенсibilізованому T8: Tau206-221 [pT212/pS214], T9: Tau196-211 [pS202/pT205] і hP-Tau. Аналіз антитіл до Tau206-221 [pT212/pS214], до Tau196-211 [pS202/pT205] і до hP-Tau із клонів супернатанта гібридами. Результати виражені у вигляді ОГ. Той самий супернатант тестували в нерозведеному стані при використанні як рТау-пептидів, так і hP-Тау-пептидів;

на фіг. 12 – результати фарбування клоном антитіла ACI-41-Ab1 (T89-F4) NFT у головному мозку людей, що страждали AD. Зрізи головного мозку пацієнтів, що страждали AD (а, б та в), пацієнтів, що страждали PSP (прогресуючий супрануклеарний параліч) (г, д та є) і здорових контрольних індивідуумів (ж, з та і) офарблювали, використовуючи AT100 (а, г та ж) або ACI-41-Ab1 (T89-F4) у розведеннях 1/1 (б, д та з) або 1/30 (в, є та і);

на фіг. 13 – результати фарбування антитілом 5D10 NFT у головному мозку людей, що страждали AD. Зрізи кори головного мозку пацієнтів, що страждали AD офарблювали, використовуючи антитіла 5D10 (а) або AT100 (б);

на фіг. 14 – результати аналізу антитіл до Tau393-408 [pS396/pS404] ізотипу IgG у мишей, імунізованих ACI-35. Аналіз антитіл до Tau393-408 [pS396/pS404] ізотипу IgG здійснювали в плазмі C57BL/ 6-мишей, яким вводили шляхом 3 ін'єкцій ACI-35 в d0, d14 і d28 і відбирали зразки крові в d-7, d7, d21, d35 і d56. Результати виражені у вигляді середніх значень ОГ + стандартне відхилення для групи, що складається з 10 мишей;

на фіг. 15 – результати аналізу антитіл до Tau393-408 [pS396/pS404] ізотипів IgG у мишей, імунізованих ACI-35. Аналіз антитіл до Tau393-408 [pS396/pS404] ізотипів IgG1, -2a, -2b і -3 здійснювали в плазмі C57BL/ 6-мишей через 35 днів після першої імунізації ACI-35. Результати виражені у вигляді середнього значення ОГ при застосуванні ненасичуючого розведення 1/1600 (IgG1), 1/3200 (IgG2a), 1/3200 (IgG2b) та 1/800 (IgG3) + стандартне відхилення для групи, що складається з 10 мишей

на фіг. 16а: - результати аналізу антитіл до Tau393-408 [pS396/S404] ізотипу IgM у мишей, імунізованих ACI-35. Аналіз антитіл до Tau393-408 [pS396/S404] ізотипу IgM здійснювали в плазмі C57BL/ 6-мишей через 35 днів після першої імунізації ACI-35. Результати виражені у вигляді середніх значень ОГ при застосуванні розведення 1/6400 + стандартне відхилення для групи, що складається з 10 мишей;

на фіг. 166 – результати аналізу антитіл до Tau393-408 ізо типу IgG у мишей, імунізованих ACI-35. Аналіз антитіл до Tau393-408 ізо типу IgG здійснювали в плазмі C57BL/ 6-мишей через 35 днів після першої імунізації ACI-35. Результати виражені у вигляді середніх значень ОГ при застосуванні розведення 1/100 + стандартне відхилення для групи, що складається з 10 мишей;

на фіг. 17 – результати аналізу проліферації клітин із селезінки, повторно стимульованої Con A або pTau/ Tau-пептидом. Аналіз проліферації тау-специфічних Т-клітин здійснювали з використанням МТТ в d56. У кожній групі поєднували спленоцити з 10 мишей і повторно стимулювали ConA, Tau393-408 [pS396/S404]- або Tau393-408-пептидами;

на фіг. 18 – результати ELISPOT-аналізу виробництва цитокінів спленоцитами, повторно стимульованими Tau393-408 [pS396/S404]- і Tau393-408-пептидами. Здійснювали ELISPOT-аналіз виробництва цитокінів Р-Tau/ Tau-специфічними Т-клітинами. У кожній групі поєднували спленоцити з 10 мишей і повторно стимулювали Tau393-408 [pS396/S404]- і Tau393-408-пептидами;

на фіг. 19 - результати аналізу антитіл до Tau5-20 [pY18] ізо типу IgG в мишах, імунізованих ACI-33. Аналіз антитіл до Tau5-20 [pY18] ізо типу IgG здійснювали в сироватці TPLH-мишей, яким вводили шляхом 5 ін'єкцій ACI-33 в d0, d13, d28, d91 і d133 і відбирали зразки крові в d-1, d27, d41, d76, d104 і d135. Результати виражені у вигляді середнього значення ОГ + стандартне відхилення для групи мишей. d-1 n=10 мишей. d27, d41 і d76 n=9 мишей, 1 миша загинула через бійку. d104 n=6, 3 миші загинули в результаті патології. d135 n=2, 4 миші загинули в результаті патології;

на фіг. 20 - результати аналізу антитіл до Tau393-408 [pS396/pS404] ізо типу IgG у мишей, імунізованих ACI-35. Аналіз антитіл до Tau393-408 [pS396/pS404] ізо типу IgG здійснювали в сироватці TPLH-мишей, яким вводили шляхом 5 ін'єкцій ACI-35 в d0, d13, d27, d91 і d133 і відбирали зразки крові в d-1, d26, d40, d75, d103, d145 і d155. Результати виражені у вигляді середнього значення ОГ + стандартне відхилення для групи мишей. d-1 і d26 n=10 мишей, d40 n=9 мишей, d75 n=6 мишей, d103 і d145 n=4 миші, d155 n=3 миші. Усі миші загинули в результаті патології;

на фіг. 21 – результати аналізу антитіл до Tau206-221 [pT212, pS214] ізо типу IgG у мишей, імунізованих ACI-39. Аналіз антитіл до Tau206-221 [pT212, pS214] ізо типу IgG здійснювали в сироватці TPLH-мишей, яким вводили шляхом 5 ін'єкцій ACI-39 в d0, d13, d28, d91 і d133 і відбирали зразки крові в d-1, d27, d41, d76, d104 і d135. Результати виражені у вигляді середнього значення ОГ + стандартне відхилення для групи мишей. d-1, d27 і d41 n=10 мишей, d76 n=7 мишей, d104 n=6 мишей, d135 n=2 миші. Всі миші загинули в результаті патології;

на фіг. 22 – результати аналізу антитіл до Tau196-211 [pS202, pT205] ізо типу IgG у мишей, імунізованих ACI-40. Аналіз антитіл до Tau196-211 [pS202, pT205] ізо типу IgG здійснювали в сироватці TPLH-мишей, яким вводили шляхом 5 ін'єкцій ACI-40 в d0, d13, d28, d91 і d133 і відбирали зразки крові в d-1, d27, d41, d76, d104 і d135. Результати виражені у вигляді середнього значення ОГ + стандартне відхилення для групи мишей. d-1, d27 і d41 n=10 мишей, d76 n=8 мишей, d104 n=6 мишей, d135 n=5 мишей. Всі миші загинули в результаті патології;

на фіг. 23 – результати аналізу антитіл до Tau5-20 [pY18] ізо типів IgG і IgM у мишей, імунізованих ACI-33. Аналіз антитіл до Tau5-20 [pY18] ізо типів IgG1, -2a, -2b, -3 і IgM здійснювали в сироватці TPLH-мишей в d41 після трьох імунізацій ACI-33. Результати виражені у вигляді середнього значення ОГ при застосуванні ненасичуючого розведення 1/100 (IgG1), 1/200 (IgG2a), 1/100 (IgG2b), 1/100 (IgG3) та 1/100 (IgM) + стандартне відхилення для групи, що складається з 9 мишей.

на фіг. 24 – результати аналізу антитіл до Tau393-408 [pS396/pS404] ізо типів IgG і IgM у мишей, імунізованих ACI-35. Аналіз антитіл до Tau393-408 [pS396/pS404] ізо типів IgG1, -2a, -2b, -3 і IgM здійснювали в сироватці TPLH-мишей в d40 після трьох імунізацій ACI-35. Результати виражені у вигляді середнього значення ОГ при застосуванні ненасичуючого розведення 1/100 (IgG1), 1/100 (IgG2a), 1/100 (IgG2b), 1/100 (IgG3) и 1/100 (IgM) + стандартне відхилення для групи, що складається з 9 мишей.

на фіг. 25 – результати аналізу антитіл до Tau206-221 [pT212, pS214] ізо типів IgG і IgM у мишей, імунізованих ACI-39. Аналіз антитіл до Tau206-221 [pT212, pS214] ізо типів IgG1, -2a, -2b, -3 і IgM здійснювали в сироватці TPLH-мишей в d41 після трьох імунізацій ACI-39. Результати виражені у вигляді середнього значення ОГ при застосуванні ненасичуючого розведення 1/100 (IgG1), 1/200 (IgG2a), 1/200 (IgG2b), 1/100 (IgG3) и 1/100 (IgM) + стандартне відхилення для групи, що складається з 10 мишей.

на фіг. 26 – результати аналізу антитіл до Tau196-211 [pS202, pT205] ізо типів IgG і IgM у мишей, імунізованих ACI-40. Аналіз антитіл до Tau196-211 [pS202, pT205] ізо типів IgG1, -2a, -2b, -3 і IgM здійснювали в сироватці TPLH-мишей в d41 після трьох імунізацій ACI-40. Результати

виражені у вигляді середнього значення ОГ при застосуванні ненасичуючого розведення 1/100 (IgG1), 1/400 (IgG2a), 1/200 (IgG2b), 1/800 (IgG3) и 1/100 (IgM) + стандартне відхилення для групи, що складається з 10 мишей.

на фіг. 27 – результати аналізу титрів антитіл ізо типу IgG при обробці різними Тау-пептидами та –білками в мишах, імунізованих ACI-33. Аналіз титрів антитіл ізо типу IgG здійснювали в d-1 і d41 у сироватці TPLH-мишей після 3 ін'єкцій ACI-33. Результати виражені у вигляді середніх значень ОГ + стандартне відхилення для групи, що складається з 9 мишей;

на фіг. 28 – результати аналізу титрів антитіл ізо типу IgG до різних Тау-пептидів і –білків у мишей, імунізованих ACI-35. Аналіз титрів антитіл ізо типу IgG здійснювали в d-1 і d40 у сироватці TPLH-мишей після 3 ін'єкцій ACI-35. Результати виражені у вигляді середніх значень ОГ + стандартне відхилення для групи, що складається з 9 мишей;

на фіг. 29 – результати аналізу титрів антитіл ізо типу IgG до різних Тау-пептидів і –білків у мишей, імунізованих ACI-39. Аналіз титрів антитіл ізо типу IgG здійснювали в d-1 і d41 у сироватці TPLH-мишей після 3 ін'єкцій ACI-39. Результати виражені у вигляді середніх значень ОГ + стандартне відхилення для групи, що складається з 10 мишей;

на фіг. 30 – результати аналізу титрів антитіл ізо типу IgG до різних Тау-пептидів і –білків у мишей, імунізованих ACI-40. Аналіз титрів антитіл ізо типу IgG здійснювали в d-1 і d41 у сироватці TPLH-мишей після 3 ін'єкцій ACI-40. Результати виражені у вигляді середніх значень ОГ + стандартне відхилення для групи, що складається з 10 мишей;

на фіг. 31 – дані, отримані за допомогою Rotarod-тесту, для мишей, імунізованих ACI-33, у порівнянні з мишами, яким вводили ЗФР. Rotarod-тести здійснювали на п'яти різних вікових групах мишей, позначених згідно з віком (у місяцях) TPLH-мишей;

на фіг. 32 - кореляція між титрами антитіла до Tau5-20 [pY18] і даними Rotarod-тесту. Кореляцію визначали на TPLH-мишах віком 7,8 місяців, яким вводили ACI-33. Титри антитіла до сироватки мишей визначали за допомогою ELISA (ОГ), а дані Rotarod-тесту виражали у вигляді періоду часу, на протязі якого тварини залишались на обладнанні (час);

на фіг. 33 - результати Rotarod-тесту для мишей, імунізованих ACI-35, у порівнянні з мишами, яким вводили ЗФР. Результати Rotarod-тесту представлені для TPLH-мишей віком 9,5 місяців, імунізованих ACI-35, щодо обробленої ЗФР контрольної групи. ACI-35 n=5 і ЗФР n=4, інші миші загинули в результаті патології, виявленої при застосуванні цієї моделі;

на фіг. 34 - результати кількісної оцінки CD3+CD4+, отримані за допомогою FACS, для безтимусних мишей і мишей дикого типу, оброблених ACI-33. Наведений відсоток, клітин, що перебувають в "вікні" позитивно пофарбованих за CD3 і CD4, серед "голих" або WT-мишей, оброблених ACI-33. Ліва панель: схематичне зображення FACS-аналізу для груп, що складаються із двох особин, "голих" і wt-мишей. Права панель: кожний стовпчик відповідає середнім значенням і СКО для груп, що складаються із 6 мишей. Миші №№ 5 і 6: "голі" миші; миші №№ 7 і 8: миші дикого типу;

на фіг. 35 - результати аналізу антитіл до Tau5-20 [pY18] ізо типу IgG в "голих" мишах і WT-мишах, імунізованих ACI-33. Аналіз антитіл до Tau5-20 [pY18] ізо типу IgG здійснювали в сироватці "голих" і WT-мишей, яким вводили шляхом 3 ін'єкцій ACI-33 в d0, d14 та d28 і відбирали зразки крові в d2, d7, d21, d35 і d56. Результати виражені у вигляді середніх значень ОГ + стандартне відхилення для групи, що складається з 6 мишей;

на фіг. 36 – результати аналізу антитіл до Tau5-20 [pY18] ізо типів IgG і IgM в "голих" мишах і WT-мишах, імунізованих ACI-33. Аналіз антитіл до Tau5-20 [pY18] ізо типів IgG1, -2a, -2b, -3 і IgM у сироватці "голих" і WT-мишей здійснювали в d35 після трьох імунізацій ACI-33. Результати виражені у вигляді середніх значень ОГ при застосуванні ненасичуючого розведення 1/100 (IgG1), 1/100 (IgG2a), 1/100 (IgG2b), 1/100 (IgG3) и 1/100 (IgM) + стандартне відхилення для групи, що складається з 6 мишей.

на фіг. 37 – результати аналізу титрів антитіл ізо типу IgG до різних Тау-пептидів і –білків в "голих" мишах і WT-мишах, імунізованих ACI-33. Аналіз титрів антитіл ізо типу IgG здійснювали в d35 у сироватці "голих" і WT-мишей після 3 ін'єкцій ACI-33. Результати виражені у вигляді середніх значень ОГ + стандартне відхилення для групи, що складається з 6 мишей.

SEQ ID NO: 1 –амінокислотна послідовність контрольної послідовності T5: Tau 379-408 [pS396, pS404],

SEQ ID NO: 2 – амінокислотна послідовність послідовності 1 (T1): Tau 5-20 [pY18],

SEQ ID NO: 3 - амінокислотна послідовність послідовності 8 (T8): Tau 206-221 [pT212, pS214],

SEQ ID NO: 4 - амінокислотна послідовність послідовності 9 (T9): Tau 196-211 [pS202, pT205],

SEQ ID NO: 5 - амінокислотна послідовність послідовності 3 (T3): Tau 393-408 [pS396, pS404],

SEQ ID NO: 6 - амінокислотна послідовність послідовності 4 (T4): Tau 401-418 [pS404, pS409],

SEQ ID NO: 7 - амінокислотна послідовність послідовності 2 (T2): Tau 200-216 [pS202+pT205 & pT212+pS214],

5 SEQ ID NO: 8 - амінокислотна послідовність послідовності 10 (T10): Tau 407-418 [pS409],

SEQ ID NO: 9 - амінокислотна послідовність послідовності 11 (T11): Tau 399-408 [pS404].

Визначення понять

10 Поняття "поліпептид", "пептид" і "білок" у контексті даного опису використовують взаємозамінно, і вони означають біологічну молекулу, що складається з амінокислот, зчеплених пептидною зв'язком.

Поняття "пептиди" означає ланцюг амінокислот (як правило, L-амінокислот), альфа-атоми вуглецю яких зчеплені через пептидні зв'язки, утворені в результаті реакції конденсації між карбоксильною групою альфа-вуглецю однієї амінокислоти та аміногрупою на альфа-вуглеці іншої амінокислоти. Кінцева амінокислота на одному кінці ланцюга (тобто амінокінцева) має вільну аміногрупу, а кінцева амінокислота на іншому кінці ланцюга (тобто карбоксикінцева) має вільну карбоксильну групу. Так, поняття "амінокінець" (скорочено N-кінець) відноситься до вільної альфа-аміногрупи амінокислоти на амінокінці пептиду або альфа-аміногрупі (іміногрупа, коли вона бере участь в утворенні пептидних зв'язків) амінокислоти в будь-якому іншому положенні усередині пептиду. Аналогічно цьому, поняття "карбоксикінець" (скорочено C-кінець) відноситься до вільної карбоксильної групи амінокислоти на карбоксикінці пептиду або карбоксильної групи амінокислоти в будь-якому іншому положенні усередині пептиду.

20 Поняття "його фрагмент" або "фрагмент" у контексті даного опису відносяться до функціонального пептидного фрагменту, який має практично таку ж (біологічну) активність, що й пептиди, представлені в цьому описі (наприклад, представлені в SEQ ID NO: 2-9 відповідно), тобто зазначені фрагменти усе ще мають здатність викликати високоспецифічну, що перш за все має конформаційну специфічність, імунну відповідь в організмі, але перш за все в організмі тварини, зокрема ссавця або людини, яка має високу ефективність і має здатність попереджати або полегшувати таупатії або симптоми, асоційовані з таупатіями. Зокрема, зазначені фрагменти усе ще містять специфічний патологічний фосфо-епітоп або -епітопи тау-пептиду, які застосовують і які зазначені в цьому описі.

Як правило, амінокислоти, з яких складається пептид, нумерують у певному порядку, починаючи з амінокінця та збільшуючи номери в напрямку до карбоксикінця пептиду. Таким чином, при вказівці того, що одна амінокислота іде за іншою, вважається, що амінокислота розташована ближче до карбоксикінця пептиду, чим попередні амінокислоти.

35 Поняття "залишок" у контексті даного опису відноситься до амінокислоти, яка включена в пептид за допомогою амідного зв'язку. Так, амінокислота може представляти собою амінокислоту, що зустрічається в природних умовах, або, якщо не є інших обмежень, може представляти собою відомі аналоги амінокислот, що зустрічаються в природних умовах, які функціонують аналогічно амінокислотам, що зустрічаються в природних умовах (тобто амінокислотні міметики). Крім того, міметики, що містять амідний зв'язок включають модифікації пептидного каркасу, добре відомі фахівцям у даній області.

45 Вираження "складається практично з" у контексті даного опису вживається для вказівки того, що виключена наявність якого-небудь із елементів, які можуть помітно змінювати характерні властивості пептидів, до яких це вираження відноситься. Так, при описі пептиду вираження "складається практично з..." виключає наявність будь-яких амінокислотних замін, додавань або делецій, які можуть помітно змінювати біологічну активність зазначеного пептиду.

Крім того, фахівцеві в даній області повинно бути очевидно, що згадані вище окремі заміни, делеції або додавання, які змінюють, доповнюють або елімінують індивідуальну амінокислоту або невеликий відсоток амінокислот (як правило, менше 5 %, більш переважно менше 1 %) в послідовності, що кодується, представляють собою консервативно модифіковані варіанти, при яких зміни приводять до заміни амінокислоти на хімічно подібну амінокислоту. Таблиці консервативних замін функціонально подібних амінокислот добре відомі в даній області. Нижче представлено 6 груп, кожна з яких містить амінокислоти, що є консервативними замінами одна одної:

- 55 1) аланін (A), серин (S), треонін (T);
 2) аспарагінова кислота (D), глютамінова кислота (E);
 3) аспарагін (N), глютамін (Q);
 4) аргінін (R), лізин (K);
 5) ізолейцин (I), лейцин (L), метіонін (M), валін (V); і
 60 6) фенілаланін (F), тирозин (Y), триптофан (W).

Поняття "виділений" або "біологічно чистий" відносяться до матеріалу, який у значній мірі або практично вільний від компонентів, які в нормі супроводжують його в нативному стані. Так, пептиди, представлені в цьому описі, не містять матеріали, які в нормі асоційовані з їхнім оточенням *in situ*. Як правило, виділені імунотенні пептиди, представлені в цьому описі, мають чистоту, що складає щонайменше приблизно 80 %, звичайно щонайменше приблизно 90 % і переважно щонайменше приблизно 95 % при оцінці на основі інтенсивності смуг пофарбованих сріблом гелів.

Чистоту білка можна визначати численними методами, добре відомими в даній області, такими як електрофорез у поліакриламідному гелі зразка білка з наступною візуалізацією шляхом фарбування. Для певних цілей необхідний високе розрішення і для очищення можна використовувати РХВР або аналогічні методи.

Коли імунотенні пептиди є відносно короткими (тобто складаються менш чим приблизно з 50 амінокислот), їх часто синтезують за допомогою стандартних методів хімічного синтезу пептидів.

Твердофазний синтез, при якому С-кінцеву амінокислоту послідовності приєднують до нерозчинної підложки з наступним послідовним додаванням інших амінокислот послідовності, представляє собою переважний метод хімічного синтезу імунотенних пептидів, представлених у цьому описі. Методи твердофазного синтезу відомі фахівцям у даній області.

В іншому варіанті представлені в цьому описі імунотенні пептиди синтезують за допомогою методу рекомбінантних нуклеїнових кислот. Як правило, він передбачає створення нуклеотидної послідовності, яка кодує пептид, перенос нуклеїнової кислоти в касету експресії під контроль конкретного промотору, експресію пептиду в хазяїні, виділення пептиду, що експресується, або поліпептиду та при необхідності ренатурацію пептиду. З літератури відомі методики, що дають фахівцям в даній області достатню інформацію для здійснення зазначених процедур.

Після їх експресії рекомбінантні пептиди можна очищати за допомогою стандартних методик, включаючи осадження сульфатом амонію, афінну хроматографію на колонках, колонкову хроматографію, гель-електрофорез і т.і. Для застосування як терапевтичних агентів переважними є практично чисті композиції, гомогенні приблизно на 50-95 %, і найбільш переважно гомогенні на 80-95 % або більше.

Фахівцям в даній області повинно бути очевидним, що після хімічного синтезу, біологічної експресії або очищення конформація імунотенних пептидів може суттєво відрізнятись від нативної властивої пептидам конформації. У цьому випадку часто необхідно денатурувати і відновлювати антипроліферативний пептид, і потім здійснювати повторне укладання пептиду з одержанням переважної конформації. Методи відновлення та денатурації білків і індукції повторного укладання добре відомі фахівцям у даній області.

Антигенність очищеного білка можна підтверджувати, наприклад, демонструючи реакцію з імунною сироваткою або антисироваткою, що продукується проти самого білка.

У контексті даного опису згадування однини може позначати "один або декілька" і, якщо не зазначено інше, то воно включає множину.

Поняття "виявлення" або виявлений" у контексті даного опису означає застосування відомих методик для виявлення біологічних молекул, таких як імунохімічні або гістологічні методи, і відносяться до якісного або кількісного виявлення присутності або визначення концентрації досліджуваної біологічної молекули.

Поняття "виділена" відноситься до біологічної молекули, вільної щонайменше від деяких компонентів, з якими вона зв'язана в природних умовах.

Поняття "антитіло", "антитіла" або "їх функціональні фрагменти" у контексті даного опису мають відоме з даної області значення та відносяться до молекул або активних фрагментів молекул, які зв'язуються з відомими антигенами, перш за все до молекул імуноглобулінів і до імунологічно активних фрагментів молекул імуноглобулінів, тобто молекул, які містять імуноспецифічний сайт зв'язування, що зв'язується з антигеном. Імуноглобулін, що пропонується у винаході, може відноситись до будь-якого типу (IgG, IgM, IgD, IgE, IgA і IgY) або класу (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 і IgA2) або підкласам молекул імуноглобуліну.

Відповідно до цього винаходу маєтсья на увазі, що до "антитіл" відносяться моноклональні антитіла, поліклональні, химерні, однокланові, біспецифічні, симіанізовані (що включають ділянки, мавпячих антитіл), людські та гуманізовані антитіла, а також їх активні фрагменти. Наприклад, до активних фрагментів молекул, які зв'язуються з відомими антигенами, відносяться Fab- і F(ab')₂-фрагменти, включаючи продукти експресійної бібліотеки Fab-фрагментів імуноглобулінів, та фрагменти будь-яких антитіл, що зв'язуються з епітопом, та їх зазначених фрагментів.

Зазначені активні фрагменти можна одержувати з антитіла, що пропонується в цьому винаході, за допомогою численних методик. Наприклад, очищені моноклональні антитіла можна розщеплювати ферментом, таким як пепсин, і піддавати РХВР-гель-фільтрації. Потім відповідну фракцію, що містить Fab-фрагменти, можна збирати та концентрувати за допомогою фільтрації через мембрану та т.і. Додатковий опис загальних методик виділення активних фрагментів антитіл див., наприклад, в Khaw B. A. та ін., J. Nucl. Med. 23, 1982, сс. 1011-1019; Rousseaux та ін., Methods Enzymology, 121, 1986, сс. 663-669, вид. Academic Press.

Поняття "гуманізоване антитіло" відноситься до типу сконструйованого антитіла, у якому CDR отримані з імуноглобуліну-донора з організму, крім людини, а інші виведені з імуноглобуліну частини молекули отримані з одного (або декількох) людського(их) імуноглобуліну(ів).

Гуманізоване антитіло може представляти собою також антитіло з варіабельною областю, у якій один або кілька каркасних ділянок мають людські амінокислоти або амінокислоти приматів. Крім того залишки, що підтримують каркас (залишки каркасної ділянки) можна змінювати для збереження афінності до зв'язування. Методи одержання "гуманізованих антитіл" добре відомі фахівцям у даній області (див., наприклад, Queen та ін., Proc. Natl Acad Sci USA, 86, 1989, сс. 10029-10032 (1989), Hodgson та ін., Bio/Technology, 9, 1991, с. 421).

"Гуманізоване антитіло" можна одержувати також за допомогою нового підходу генетичної інженерії, який дозволяє одержувати поліклональні антитіла, що нагадують людські, з дозрілою афінністю у великих тварин, таких, наприклад, як кролики (<http://www.rctech.com/bioventures/therapeutic.php>).

Поняття "моноклональне антитіло" добре відоме в даній області та відноситься до антитіла, яке в великих кількостях одержують у лабораторних умовах з індивідуального клону і яке розпізнає тільки один антиген. Моноклональні антитіла, як правило, створюють шляхом злиття В-клітини, що продукує антитіла, як правило, з коротким періодом життя, зі швидко зростаючою клітиною, такою як ракова клітина (іноді її називають "імморталізованою клітиною"). Гібридна клітина, що утворилась, або гібридома швидко розмножується, створюючи клон, який продукує антитіло в великих кількостях.

Поняття "антиген" відноситься до повного агента або його фрагменту, який може індукувати імунну відповідь в організмі, перш за все в організмі тварини, більш переважно ссавця, включаючи людину. Поняття включає імуногени та області, відповідальні за антигенність, або антигенні детермінанти.

У контексті даного опису поняття "розчинний" позначає частково або повністю розчинний у водному розчині.

У контексті даного опису поняття "імуногенні" відносяться до субстанцій, які викликають або підсилюють виробництво антитіл, Т-клітин і інших реактивних імунних клітин, спрямованих проти імуногенного агента, та які беруть участь в імунній відповіді в організмі людини або тварин.

Імунна відповідь має місце, коли в організмі індивідуума продукується достатня кількість антитіл, Т-клітин та інших реактивних імунних клітин проти введених імуногенних композицій, що пропонуються у цьому винаході, для ослаблення або полегшення підлягаючого лікуванню порушення.

Поняття "гібридома" відомо в даній області та звичайним фахівцям у даній області та відноситься до клітини, отриманої шляхом злиття, що продукує антитіло клітини та імморталізованої клітини, наприклад, клітини множинної мієломи. Ця гібридна клітина має здатність забезпечувати постійне постачання антитіл (див. вище визначення поняття "моноклональне антитіло" і нижче розділ "Приклади", у яких метод злиття описаний більш докладно).

Поняття "носії" у контексті даного опису означає структуру, у яку антигенний пептид або надмолекулярну конструкцію можна вбудовувати або з якої їх можна асоціювати, здійснюючи тим самим презентацію або забезпечуючи доступність антигенних пептидів або фрагменти пептиду для імунної системи людини або тварин. Будь-яку частку, яку можна застосовувати для лікування тварин або людини, таку, наприклад, як пухирець, частку або тільце, що складається із часток, можна використовувати в якості носія в контексті даного винаходу.

Поняття "носії" відноситься також і до методів введення, які забезпечують транспортування композиції надмолекулярних антигенних конструкцій, що містять антигенний пептид, до необхідних областей за допомогою механізмів введення. Одним із прикладів такої системи введення є система, у якій використовують колоїдні метали, такі як колоїдне золото.

Білки-носії, які можна застосовувати в композиціях надмолекулярних антигенних конструкцій, що пропонуються у цьому винаході, включають (але, не обмежуючись ними) білок, що зв'язує мальтозу "MBP"; бичачий сироватковий альбумін "BSA"; гемоціанін лімфи равлика

"KLH"; яєчний білок, флагелін; тироглобулін; сироватковий альбумін будь-яких видів; гамма-глобулін будь-яких видів; сингенні клітини; сингенні клітини, що несуть антигени Ia; і полімери D-та/або L-амінокислот.

У надмолекулярній антигенній конструкції, що пропонується в цьому винаході, ліпосома може виконувати подвійну функцію, у тому плані, що її можна застосовувати в якості носія, що містить описану вище надмолекулярну конструкцію, і в той же час вона може виконувати функцію ад'юванта, що підвищує або стимулює імунну відповідь у тварині- або людині-мішені, що підлягає лікуванню терапевтичною вакциною, що пропонується у винаході. Слід розуміти також, що композиції надмолекулярних антигенних конструкцій, що пропонуються у цьому винаході, можуть містити також додаткові ад'юванти, включаючи (але, не обмежуючись тільки ними) гемоціанін лімфи равлика (KLH), бичачий сироватковий альбумін (БСА) та інші ад'юванти, такі, наприклад, як ліпід А, квасці, фосфат кальцію, інтерлейкін 1 та/або мікрокапсули полісахаридів і білків, але перш за все детоксифікований ліпід А, такий як монофосфорильний або дифосфорильний ліпід А, або квасці, додаткові консерванти, розріджувачі, емульгатори, стабілізатори та інші компоненти, які є відомими і які знайшли застосування у відомих з існуючого рівня техніки вакцинах. Крім того, будь-яку відому в даній області систему ад'ювантів можна застосовувати в композиції, що пропонується в цьому винаході. До таких ад'ювантів відносяться (але, не обмежуючись ними) неповний ад'ювант Фрейнда, повний ад'ювант Фрейнда, полідисперсний β -(1,4)-зв'язаний ацетилований маннан ("Acemannan"), Titermax® (ад'юванти на основі сополімеру поліоксietiлену-поліоксипропілеуа фірми Cytrx Corporation), модифіковані ліпідні ад'юванти фірми Chiron Corporation, ад'юванти, що є похідними сапоніну фірми Cambridge Biotech, убиті Bordetella pertussis, ліпополісахарид (LPS) грамнегативних бактерій, великі полімерні аніони, такі як сульфат декстрану, і неорганічні гелі, такі як квасці, гідроксид алюмінію або фосфат алюмінію.

Крім того, поняття "ефективна кількість" відноситься до кількості антигенної/ імуногенної композиції, яке при введенні людині або тварині викликає імунну відповідь. Ефективна кількість легко може визначати фахівець у даній області за допомогою загальноприйнятих процедур.

Поняття "пацієнт із імунною толерантністю" у контексті даного опису відноситься до хворої тварини або людини, для якої характерна обмежена здатність реагувати на антигени, перш за все на чужі антигени, але перш за все на нові антигени, такі, наприклад, як нові антигени, що присутні при знову виникаючих захворюваннях. Така обмежена здатність може бути зв'язана, щонайменше частково, із хронологічним віком CD4⁺-Т-клітин. Крім того, "пацієнт із імунною толерантністю" може відрізнятися порушенням довгостроковою CD4⁺-Т-клітинною імунною відповіддю на вплив антигену в результаті порушень проліферації та секреції цитокінів Т-клітинами пам'яті в процесі вторинних імунних відповідей.

Поняття "пацієнт із активованими Т-клітинами" у контексті даного опису відноситься до хворої тварини або людини, для якої характерна Т-клітинна активація та у якого додаткова стимуляція Т-клітинної відповіді може супроводжуватись медичним ризиком.

Поняття "пацієнт із ослабленим імунітетом" у контексті даного опису відноситься до хворої тварини або людини, яка має імунну систему, порушену в результаті віку, хвороби, такої як хвороба, пов'язана з ВІЛ, рак, або в результаті лікування, наприклад, лікування запальних захворювань таких як (але, не обмежуючись тільки ними) ревматоїдний артрит, псоріаз, системний червоний вовчок, грануломатоз Вегенера і т.д.

При створенні даного винаходу продемонстровано, що індукована антитілом відповідь на антигенну композицію, що пропонується у винаході, в основному є незалежною від Т-клітин. Для доказу цього використовували модель, створену на "голих" мишах, де "голих" мишей вакцинували та гуморальні імунні відповіді оцінювали для виміру відповіді на А β -специфічне антитіло, індуковане антигенною композицією, що пропонується у винаході, в імунізованих "голих" мишей. "Голі" миші несуть мутацію Foxp1nu і в результаті мають знижену Т-клітинну функцію через відсутність нормального тимусу.

Поняття "фармацевтично ефективна кількість" у контексті даного опису відноситься до дози діючої речовини у фармацевтичній композиції, необхідної для лікування або щонайменше часткового припинення симптомів захворювання, порушення або стану, що підлягає лікуванню, або будь-яких пов'язаних з ними ускладнень.

Конкретним варіантом здійснення даного винаходу є застосування презентації антигену, перш за все на поверхні молекули носія, такого як ліпосома, що приводить до більш ефективної доступності та стабілізації переважної конформації антигену, що зрештою приводить до одержання високоспецифічної імунної відповіді, перш за все незалежної від Т-клітин імунної відповіді, і приводить до утворення антитіл з унікальними властивостями.

Зокрема, здійснюють презентацію антигенного пептиду на поверхні молекули носія у вигляді

масиву з великою кількістю повторів, перш за все масив, що містить повтори, містить щонайменше 10 повторюваних антигенних одиниць/молекулу носія, переважно щонайменше 50 повторюваних антигенних одиниць/молекулу носія, переважно щонайменше 100 повторюваних антигенних одиниць/молекулу носія, переважно щонайменше 200 повторюваних антигенних одиниць/молекулу носія, переважно щонайменше 300 повторюваних антигенних одиниць/молекулу носія, переважно щонайменше 400 повторюваних антигенних одиниць/молекулу носія, переважно щонайменше 500 повторюваних антигенних одиниць/молекулу носія.

Модифікований фосфольований пептидний антиген, що пропонується у винаході та представлений у цьому описі, перш за все фосфольований пептидний антиген, що імітує основний патологічний фосфо-епітоп тау-білка, можна синтезувати за допомогою модифікованого методу, описаного в Nicolau та ін., Proc Natl. Acad. Sci USA 99, 2002, сс. 2332-2337. Цей підхід передбачає східчає складання конструкції за допомогою твердофазного пептидного синтезу на амідній смолі на основі стандартної Fmoc/tBu-хімії. Потім ортогональні захисні групи кінцевих лізінів можна видаляти та вільні аміногрупи ацилювати пальмітиновою кислотою.

Видалення захисних груп бічних ланцюгів і супутнє вивільнення пептиду зі смоли можна здійснювати в кислих умовах, які забезпечують одержання необхідного тетрапальмітоїлованого фосфо-пептиду у вигляді неочищеного продукту.

Потім можна одержувати кінцевий продукт високого ступеня чистоти та підтверджувати його ідентичність і чистоту відомими в даній області методами, такими, наприклад, як мас-спектрометрія з іонізацією електроспреем та/або РХВР-аналіз.

Одним із варіантів здійснення даного винаходу є імуногенна композиція, яка містить фосфольований пептидний антиген, що пропонується у винаході та представлений у цьому описі, що імітує основний патологічний фосфо-епітоп тау-білка, де пептидний антиген модифікують таким чином, щоб він мав здатність підтримувати та стабілізувати певну конформацію антигену. Ця певна конформація приводить до індукції сильної та високоспецифічної імунної відповіді при введенні тварині або людині.

Одним зі шляхів досягнення формування та стабілізації необхідної конформації антигенного пептиду є презентація антигенного пептиду у вигляді приєднаного або включеного або реконструйованого, частково або повністю, у носії, перш за все носії, який може функціонувати також у якості ад'юванта.

Відповідно до цього винаходу носій може представляти собою, наприклад, пухирець, тільце, що складається із часток або молекулу; бактеріальні мембранні білки, білки *Отр* ентеробактерій, наночастини, міцели, золоті частки, мікрочастинки та/або віросоми або будь-які інші засоби, які можуть служити в якості носія/ад'юванта для антигенного пептиду, але перш за все ліпосому.

У конкретному варіанті здійснення винаходу антигенний пептид приєднують або вбудовують або реконструюють у носії завдяки слабким взаємодіям, такими, наприклад, як взаємодія Ван-дер-Ваальса, гідрофобна або електростатична взаємодія, або комбінація двох або більшої кількості зазначених типів взаємодій, у результаті пептид презентується в специфічній конформації, яка підтримується та стабілізується шляхом обмеження зрушення тривимірної структури антигенного пептиду, у результаті чого конформаційні зміни попереджуються або в значній мірі обмежуються.

Коли пухирець, частку або тільце, що складається із часток, застосовують у якості носія/ад'юванта, наприклад, ліпосому, то композицію антигенного пептиду можна вибирати так, щоб її загальний чистий заряд був ідентичний заряду на поверхні носія/ад'юванта, до якого пептид приєднаний. Електростатичні сили відштовхування, які мають ефективність між однакою зарядженою поверхнею носія/ад'юванта та антигенного пептиду, але перш за все між однакою зарядженою поверхнею носія та амінокислотними залишками, з яких складається антигенний пептид, і більш переважно між однакою зарядженою поверхнею носія та однакою зарядженими амінокислотними залишками, з яких складається антигенний пептид, можуть приводити до того, що антигенний пептид здобуває певну високоспецифічну та стабілізовану конформацію, яка гарантує високу біологічну активність. У результаті антигенний пептид експонується та презентується в конформації, яка має високу біологічну активність і дозволяє імунній системі цільового організму вільно взаємодіяти з антигенними детермінантами, що входять в антигенну конструкцію в біологічно активній конформації, що при введенні тварині або людині приводить до сильної та специфічної для конформації імунної відповіді, що приводить, наприклад, до утворення високого титру антитіл у цільовому організмі.

Імуногенну відповідь можна додатково підсилювати при використанні ліпосоми в якості

носія, оскільки ліпосома може функціонувати в якості ад'юванта, що підсилює або стимулює імунну відповідь в організмі тварини- або людини-мішені, що підлягає лікуванню за допомогою фармацевтичної композиції, що пропонується у винаході. Ліпосома необов'язково може містити також додатковий ад'ювант, такий, наприклад, як ліпід А, квасці, фосфат кальцію, інтерлейкін 1 та/або мікрокапсули з полісахаридів і білків, але переважно детоксифікований ліпід А, такий як монофосфорильний або дифосфорильний ліпід А, або квасці.

У конкретному варіанті здійснення винаходу антигенний пептид, що пропонується у винаході та описаний вище, перш за все антигенний пептид, загальний чистий заряд якого є негативним, застосовують у реконструйованому в ліпосомі виді, перш за все у ліпосомі, компоненти якої вибирають так, щоб загальний чистий заряд головної групи ліпосоми був негативним. Зокрема, ліпосома складається з компонентів, вибраних із групи, що включає диміристоїлфосфатидилхолін (DMPC), диміристоїлфосфатидилетаноламін (DMPEA), диміристоїлфосфатидилгліцерин (DMPG) і холестерин, і необов'язково містить також монофосфорильний ліпід А або будь-який інший ад'ювант, який можна застосовувати в обсязі даного винаходу, такий, наприклад, як квасці, фосфат кальцію, інтерлейкін 1 та/або мікрокапсули з полісахаридів і білків.

Іншим конкретним варіантом здійснення винаходу є модифікований антигенний пептид, що пропонується у винаході та описаний вище, ковалентно зв'язаний з молекулою якірного типу, яку можна вбудовувати в носій/ад'ювант, фіксуючи тим самим пептид з носієм/ад'ювантом і здійснюючи його презентацію на поверхні молекули носія/ад'юванта або в безпосередній близькості від її поверхні так, щоб електростатичні сили ставали ефективними, як описано вище.

Коли ліпосоми застосовують у якості носія/ад'юванта, антигенна пептидна конструкція, як правило, має гідрофобний хвіст, який вбудовується в мембрану ліпосоми при її формуванні. Крім того, антигенні пептиди можна модифікувати так, щоб вони містили гідрофобний хвіст, який можна вбудовувати в ліпосому.

Антигенна композиція, що пропонується в цьому винаході, як правило, містить пептиди, модифіковані з метою посилення антигенної дії, при цьому зазначені пептиди можна модифікувати шляхом пегелювання (використовуючи поліетиленгліколь або модифікований поліетиленгліколь), або модифікувати за допомогою інших методів, наприклад, з використанням пальмітинової кислоти, як описано вище, поліамінокислот (наприклад, полігліцину, поліглістидину), полісахаридів (наприклад, полігалактуринової кислоти, полімолочної кислоти, полігліколіду, хітину, хітозану), синтетичних полімерів (поліаміди, поліуретани, складні поліефіри) або сополімерів (наприклад, полі(метакрилової кислоти) і N-(2-гідрокси)пропілметакриламід) і т.і.

Конкретним варіантом здійснення винаходу є антигенні пептиди, що пропонуються у винаході та описані вище, які в результаті модифікації містять гідрофобний хвіст, у результаті зазначені пептиди можна вбудовувати в ліпосому. Зокрема, фосфоліпований пептидний антиген, що пропонується у винаході та представлений у цьому описі, який імітує основний патологічний фосфо-епітоп тау-білка, можна модифікувати за допомогою ліпофільного або гідрофобного фрагменту, який полегшує вбудовування в ліпідний бішар носія/ад'юванта. Ліпофільні або гідрофобні фрагменти, що пропонуються в цьому винаході, можуть представляти собою жирні кислоти, тригліцериди та фосфоліпіди, перш за все жирні кислоти, тригліцериди та фосфоліпіди, у яких вуглецевий каркас жирної кислоти містить щонайменше 10 атомів вуглецю, перш за все ліпофільні фрагменти, що включають жирні кислоти, вуглецевий каркас яких складається щонайменше приблизно з 14 атомів вуглецю та до приблизно до 24 атомів вуглецю, при цьому кожна індивідуальна кількість атомів вуглецю в цьому діапазоні підпадає під обсяг даного винаходу. Зокрема, винахід відноситься до антигенного пептиду, що пропонується у винаході та описаному вище, який у результаті модифікації містить гідрофобний хвіст, перш за все гідрофобний хвіст, який складається з гідрофобних фрагментів, у яких вуглецевий каркас містить щонайменше 14 атомів вуглецю, але переважно 16 атомів вуглецю. Прикладами гідрофобних фрагментів є (але, не обмежуючись ними) пальмітинова кислота, стеаринова кислота, міристинова кислота, лауринова кислота, олеїнова кислота, лінолева кислота, ліноленова кислота та холестерин або 1,3-фосфатидилетаноламін (DSPE). У конкретному варіанті здійснення даного винаходу гідрофобний фрагмент представляє собою пальмітинову кислоту.

В одному з варіантів здійснення винаходу антигенний пептид, що пропонується у винаході та представлений у цьому описі, ковалентно зв'язують із ліпофільним або гідрофобним фрагментом. У контексті даного винаходу ковалентне зв'язування антигенного пептиду можна здійснювати за допомогою амінокислотних залишків, які подовжують амінокислотні

послідовності, що відповідають послідовностям антигенного пептиду, що пропонується у винаході, зокрема, на його кінці(ях), перш за все на N- і С-кінці(ях), і з якими зв'язуються залишки жирних кислот.

Зокрема, кожний кон'югат містить щонайменше чотири молекули жирної кислоти, вуглецевий ланцюг якої включає від С12 до С24, перш за все вуглецевий ланцюг якої складається з С16, де молекули жирної кислоти ковалентно пов'язані з N- і С-кінцями антигенних пептидів. Можна передбачати також інші розподіли, у тому числі усередині амінокислотної послідовності. Ці пептиди також зв'язують ковалентно з молекулами жирних кислот.

Таким чином, фармацевтичні композиції, що пропонуються в цьому винаході, можуть містити ліпосоми, що представляють собою ліпосоми в яких можна реконструювати очищені або частково очищені або модифіковані антигенні пептиди, що пропонуються у винаході та представлені в цьому описі. Крім того, у ліпосомах можна реконструювати пептидні фрагменти. Даний винахід відноситься також до антигенних пептидних фрагментів, модифікованих з метою підвищення їх антигенності. Наприклад, антигенні фрагменти та ад'юванти можна приєднувати до пептиду або змішувати з ним. Прикладами антигенних фрагментів і ад'ювантів є (але, не обмежуючись тільки ними) ліпофільні мурамільні дипептидні похідні, неіонні блок-сополімери, гідроксид алюмінію або фосфат алюмінію, та їх суміші.

Ліпосоми, які можна застосовувати в композиціях, що пропонуються у цьому винаході, представляють собою ліпосоми, відомі фахівцям у даній області. Можна використовувати будь-які стандартні ліпіди, застосовувані для приготування ліпосом. Для створення композицій, що пропонуються у цьому винаході, можна застосовувати стандартні, що складаються із двох або декількох шарів, ліпосоми. Хоча можна застосовувати будь-який метод приготування ліпосом, відомий фахівцям у даній області, найбільш переважні ліпосоми одержують згідно з методом, описаним в Alving та ін., Infect. Immun. 60, 1992, сс. 2438-2444, публікація включена в цей опис в якості посилання. Ліпосома може необов'язково містити ад'ювант або імуномодулятор або обидва зазначених агента. Переважним імуномодулятором є ліпід А, перш за все детоксифікований ліпід А, такий, наприклад, як монофосфорильний або дифосфорильний ліпід А.

Ліпосоми можна одержувати також методом ін'єкції в перехресному потоці, який описаний, наприклад, в Wagner та ін., Journal of Liposome Research т. 12(3), 2002, сс. 259 – 270. При ін'єкції ліпідних розчинів у водній буферній системі ліпіди мають тенденцію утворювати "осади (преципітати)" з наступною самоагрегацією в пухирці. Розмір отриманих пухирців залежить від таких факторів як концентрація ліпиду, швидкість перемішування, швидкість ін'єкції та вибір ліпідів. Призначена для одержання система може складатись з модуля для ін'єкції в перехресному потоці, ємностей для полярної фази (наприклад, розчин ЗФР-буфера), ємності для етанольного/ліпідного розчину та обладнання для створення тиску, але перш за все обладнання для створення тиску азоту. У той час як водний або полярний розчин нагнітають насосом через модуль для перехресної ін'єкції, етанольний/ліпідний розчин ін'єкують у полярну фазу за допомогою різних величин прикладеного тиску.

Таким чином, в одному з варіантів здійснення винаходу модифікований антигенний пептид, що пропонується у винаході та представлений у цьому описі, можна додатково модифікувати шляхом реконструкції (відновлення) у ліпосомах, які складаються з фосфоліпідів і холестерину (фосфатидилетаноламін, фосфатидилгліцерин, холестерин у різних молярних відношеннях). Можна застосовувати інші фосфоліпіди. Ліпід А застосовують у концентрації приблизно 40 мкг/пмоль фосфоліпідів.

Ліпосома може мати подвійну функцію, оскільки її можна застосовувати в якості носія, що містить описану вище надмолекулярну конструкцію, і в той же час вона може виконувати функцію ад'юванта для посилення або стимуляції імунної відповіді в організмі тварини- або людини-мішені, що підлягає лікуванню терапевтичною вакциною, що пропонується у винаході. Необов'язково ліпосома, крім того, може містити додатковий ад'ювант або імуномодулятор або обидва зазначених агента, такий, наприклад, як ліпід А, квасці, фосфат кальцію, інтерлейкін-1 та/або мікрокапсули з полісахаридів і білків, але перш за все ліпід А, більш переважно детоксифікований ліпід А, такий як монофосфорильний або дифосфорильний ліпід А, або квасці.

У конкретному варіанті здійснення винаходу ліпосоми, що включають ліпід А, застосовують у якості ад'юванта для приготування фармацевтичної композиції, що пропонується у винаході. Диміристоїлфосфатидилхолін, -гліцерин і холестерин змішують, зокрема в молярному співвідношенні 9:1:7. Потім додають сильний імуномодулятор, такий, наприклад, як монофосфорильний ліпід А, у прийнятній концентрації, перш за все у концентрації від 30 до 50

мг на ммоль, більш переважно 40 мг на ммоль фосфоліпідів. Потім додають модифікований антигенний пептид у молярному співвідношенні пептиду та фосфоліпідів від 1:30 до 1:200, перш за все у молярному співвідношенні від 1:50 до 1:120, більш переважно 1:100. Розчинники видаляють, наприклад, випарюванням, та плівку, що утворилася, гідрують стерильним

буферним розчином, таким як ЗФР.

Конкретним варіантом здійснення винаходу є антигенний пептид, що пропонується у винаході та представлений у цьому описі, модифікований щонайменше двома молекулами пальмітинової кислоти, ковалентно зв'язаних з N- і C-кінцями антигенного пептиду, реконструйований у ліпосомном носії.

Пальмітоїлування, що створює якір для пептиду в бішарі ліпосоми завдяки відносно невеликій довжині залишку C₁₆₋₀-жирної кислоти, приводить до того, що пептид презентується на поверхні ліпосоми або безпосередньо поблизу її поверхні.

Фармацевтичну композицію, що пропонується в цьому винаході, яка містить пептидний антиген, що пропонується у винаході та представлений у цьому описі, перш за все фосфо-пептид, що імітує основні патологічні фосфо-епітопи тау-білка, перш за все у фармацевтично ефективній кількості, можна приготувати у формі рідкого розчину або суспензії, що ін'єкується, або також у твердій формі, придатній для солюбілізації перед ін'єкцією, наприклад, у вигляді набору, призначеного для застосування композиції, що пропонується у винаході, відповідно описаному нижче методу.

Прийнятні фармацевтичні носії, розріджувачі та/або ексципієнти добре відомі в даній області, і до них відносяться, наприклад, забуферені фосфатом фізіологічні розчини, вода, емульсії, такі як емульсії типу масло/вода, різні типи змочувальних агентів, стерильні розчини і т.д.

Препаративну форму фармацевтичної композиції, що пропонується у винаході, можна одержувати за допомогою загальноприйнятої методології, відомої фахівцям у даній області.

Фармацевтичну композицію, що пропонується в цьому винаході, яка містить пептидний антиген, що пропонується у винаході та представлений у цьому описі, перш за все фосфо-пептид, що імітує основні патологічні фосфо-епітопи тау-білка, перш за все у фармацевтично ефективній кількості, можна вводити людині або тварині, що страждає таупатією, для індукції імунної відповіді в зазначеній людини або тварини з метою полегшення симптомів, асоційованих із захворюванням, або відновлення стану, властивого здоровим індивідуумам, не уражених захворюванням.

Композиції, що пропонуються в цьому винаході, вводять людині або тварині за допомогою будь-яких загальноприйнятих стандартних шляхів введення у твердій, рідкій формі або у вигляді аерозолі, що містять прийнятну фармацевтично ефективну дозу. Як правило, композицію можна вводити з використанням місцевого, орального, ректального, назального або парентерального (наприклад, внутрішньовенного, підшкірного або внутрішньом'язового) шляхів введення. Крім того, композицію можна включати в матрицю, що забезпечує пролонговане вивільнення, наприклад, з біорозкладаваних полімерів, полімери можна імплантувати в область, у яку потрібно здійснювати введення, наприклад, в область пухлини. Метод передбачає введення однократної дози, введення повторних доз із попередньо встановленими тимчасовими інтервалами та пролонговане введення на протязі попереднього певного періоду часу.

У конкретному варіанті здійснення винаходу антигенну конструкцію, що пропонується у винаході, перш за все композицію вакцини, яка містить антигенну конструкцію у фармацевтично прийнятній формі, вводять у вигляді повторюваних доз, перш за все 1-15 доз, більш переважно 2-10 доз, більш переважно 3-5 доз і ще більш переважно 3 доз, з тимчасовими інтервалами, що становлять 1-20 тижнів, перш за все з тимчасовими інтервалами, що становлять 1-10 тижнів, перш за все з тимчасовими інтервалами, що становлять 1-6 тижнів, більш переважно з тимчасовими інтервалами, що становлять 1-4 тижня та ще більш переважно з тимчасовими інтервалами від 2 до 3 тижнів. Імунну відповідь оцінюють в отриманих зразках сироватки/плазми через прийнятний проміжок часу після ревакцинації, перш за все через 3-10 днів після ревакцинації, більш переважно через 4-8 днів після ревакцинації та більш переважно через 7 днів після ревакцинації, і визначають імуногенність антигенної конструкції за допомогою відомої методології, перш за все за допомогою одного зі звичайно застосовуваних імуноаналізів, таких, наприклад, як ELISA.

Зокрема, композицію антигенного пептиду, що пропонується у винаході, вводять парентерально, але перш за все за допомогою внутрішньочеревинної, внутрішньовенної, підшкірної та внутрішньом'язової ін'єкції.

Препарати для парентерального введення включають стерильні водні або неводні розчини,

суспензії та емульсії. До неводних розчинників відносяться (але, не обмежуючись тільки ними) пропіленгліколь, поліетиленгліколь, рослинна олія, така як маслинова олія, і органічні складні ефіри, що ін'єкуються, такі як етилолеат. Водні розчинники можна вибирати із групи, що включає воду, спиртові/ водні розчини, емульсії або суспензії, включаючи фізіологічний розчин і забуферені середовища. Наповнювачі для парентерального введення включають розчин хлориду натрію, декстрозу Рінгера, декстрозу та хлорид натрію, лактований розчин Рінгера або рідкі жири. Наповнювачі для внутрішньовенного введення представляють собою добавки для заповнення дефіциту рідини або живильних речовин, електролітні добавки (наприклад, на основі декстрози Рінгера) та інші речовини. Можуть бути присутнім також консерванти, такі, наприклад, як антимікробні засоби, антиоксиданти, хелатуючі агенти, інертні гази та ін.

Доза композиції повинна залежати від стану, що підлягає лікуванню, конкретної застосовуваної композиції та інших клінічних факторів, таких як вага, розмір і стан пацієнта, площа поверхні тіла, конкретна сполука або композиція, що підлягає введенню, інші одночасно застосовувані лікарські засоби та шлях введення.

Фармацевтичну композицію, що пропонується у винаході, можна вводити в комбінації з іншими біологічно активними субстанціями та процедурами, призначеними для лікування захворювань, перш за все нейродегенеративних захворювань. Інші біологічно активні субстанції можуть бути компонентами тієї ж композиції, яка вже містить фармацевтичну композицію, що пропонується у винаході, у формі суміші, при цьому фармацевтичну композицію, що пропонується у винаході, і іншу біологічно активну субстанцію змішують у фармацевтично прийнятним розчинником та/або носієм, або вони можуть бути присутніми окремо у вигляді компоненту інших композицій, які можуть надходити в продаж окремо або разом у формі набору, що складається з компонентів.

Фармацевтичну композицію, що пропонується у винаході, можна вводити в комбінації з іншою(ми) біологічно активною(ми) субстанцією або субстанціями по черзі або послідовно. Наприклад, фармацевтичну композицію, що пропонується у винаході, можна вводити одночасно з першою додатковою біологічно активною субстанцією або послідовно після або до введення фармацевтичної композиції. Якщо вибрана прийнятна схема, при якій більше однієї, що має додатково біологічну активність, субстанції вводять у комбінації щонайменше з однієї фармацевтичною композицією, що пропонується у винаході, то сполуку або субстанції можна частково вводити одночасно, частково послідовно в різних комбінаціях.

Іншим об'єктом даного винаходу є суміші фармацевтичної композиції, що пропонується у винаході, і необов'язково однієї або декількох додаткових біологічно активних субстанцій, а також способи застосування фармацевтичної композиції, що пропонується у винаході, або їх сумішей, включаючи композиції, які містять зазначену фармацевтичну композицію або суміші фармацевтичних композицій, призначені для профілактичного та/або терапевтичного лікування та/або полегшення таупатій, групи захворювань і порушень, які асоційовані з утворенням нейрофібрилярних ушкоджень, що представляють собою основну патологію головного мозку в цій групі нейродегенеративних порушень, що включає (але, не обмежуючись тільки ними) хворобу Альцгеймера, хворобу Крейцфельда-Якоба, боксерську деменцію, синдром Дауна, хворобу Герстманна-Штреусслера-Шейнкера, міозит з тільцями включення та церебральну амілоїдну ангіопатію, пов'язану з білком-пріоном, травматичне ушкодження головного мозку, а також комплекс аміотрофічний бічний склероз / паркінсонізм-деменцію (синдром Гуама), не-гуамовського типу хворобу моторних нейронів, пов'язану з нейрофібрилярними сплетіннями, деменцію, пов'язану з накопиченням аргірофільних зерен, кортикобазальну дегенерацію, дифузійні нейрофібрилярні сплетіння з кальцифікацією, фронтотемпоральну деменцію з паркінсонізмом, зчеплену із хромосомою 17, хворобу Галлервордена-Шпатца, множинну системну атрофію, хворобу Німанна-Піка типу С, хворобу Піка, субкортикальний гліом, прогресуючий, супрануклеарний паненцефаліт, прогресуючий, підгострий склерозуючий паненцефаліт, деменцію, зв'язану тільки зі сплетіннями, постенцефалітний паркінсонізм, міотонічну дистрофію.

Суміші, що пропонуються у винаході, можуть містити крім фармацевтичної композиції, що пропонується у винаході, біологічно активну субстанцію, таку, наприклад, як відомі сполуки, застосовувані для медикаментозного лікування таупатій та/або амілоїдозів, групи захворювань і порушень, асоційованих з амілоїдом або амілоїдоподібним білком, таким як амілоїдний β -білок, який бере участь у патогенезі хвороби Альцгеймера.

У наступному варіанті здійснення винаходу інша біологічно активна субстанція або сполука може представляти собою також терапевтичний засіб, який можна застосовувати для лікування захворювань і порушень, які викликаються або асоційовані з амілоїдом або амілоїдоподібними білками, включаючи амілоїдоз, що викликається амілоїдом β , або їх можна застосовувати для

медикаментозного лікування інших неврологічних порушень.

Інша біологічно активна субстанція або сполука може мати біологічну дію, опосередковувану таким же або подібним механізмом, що й терапевтична вакцина, що пропонується у винаході, або мати неспоріднений механізм дії або комбінацію споріднених та/або неспоріднених механізмів дії.

Як правило, інша біологічно активна сполука може представляти собою енхансери нейтронної трансмісії, психотерапевтичні лікарські засоби, інгібітори ацетилхолінестерази, блокатори кальцієвих каналів, біогенні аміни, транквілізатори на основі бензодіазепінів, підсилювачі синтезу, накопичення або вивільнення ацетилхоліну, агоністи постсинаптичного рецептора ацетилхоліну, інгібітори моноаміноксидази-А або -В, антагоністи рецептора Метил-D-аспартатглютамата (NMDA), нестероїдні протизапальні лікарські засоби, антиоксиданти та антагоністи серотонергічного рецептора.

Зокрема, суміш, що пропонується у винаході, може містити щонайменше одну або іншу біологічно активну сполуку, вибрану із групи, що включає сполуки проти окисного стресу, антиапоптозні сполуки, хелати металів, інгібітори репарації ДНК, такі як пірензепін та його метаболіти, 3-аміно-1-пропансульфонову кислоту (3APS), 1,3-пропандисульфонат (1,3PDS), активатори секретаз, інгібітори β - і γ -секретаз, тау-білки, нейромедіатор, руйнівники β -складчастої конформації, протизапальні молекули або інгібітори холінестерази (ChEI), такі як такрин, рівастигмін, донепезил та/або галантамін, та інші лікарські засоби та харчові добавки, у комбінації з терапевтичною вакциною, що пропонується у винаході, і необов'язково фармацевтично прийнятним носієм та/або розріджувачем та/або ексципієнтом.

Відповідно до ще одного варіанту здійснення винаходу суміші, що пропонуються у винаході, можуть містити ніацин або мемантин у комбінації з терапевтичною вакциною, що пропонується у винаході, і необов'язково фармацевтично прийнятним носієм та/або розріджувачем та/або ексципієнтом.

Ще одним варіантом здійснення винаходу є суміші, які містять "атипичні антипсихотичні засоби", такі, наприклад, як клозапін, зипрасидон, рісперидон, арипіпразол або оланзапін, призначені для лікування позитивних або негативних психотичних симптомів, включаючи галюцинації, марення, порушення мислення (що проявляються у вираженій непослідовності дій, психічному розладі, розладі асоціативного мислення) та ексцентричну або неорганізовану поведінку, а також ангедонію, знижену емоційну реакцію, апатію та відмову від суспільства, у комбінації з терапевтичною вакциною, що пропонується у винаході, необов'язково фармацевтично прийнятним носієм та/або розріджувачем та/або ексципієнтом.

У конкретних варіантах здійснення винаходу композиції та суміші, що пропонуються у винаході та описані вище, містять фармацевтичну композицію, що пропонується у винаході, і біологічно активну субстанцію відповідно в терапевтично або профілактично ефективній кількості.

Інші сполуки, які можна застосовувати в сумішах у комбінації з фармацевтичною композицією, що пропонується у винаході, описані, наприклад, в WO 2004/058258 (див. перш за все на с. 16 і с. 17), включаючи мішені терапевтичних лікарських засобів (сс. 36-39), алкансульфонові кислоти та алкансірчану кислоту (сс. 39-51), інгібітори холінестерази (сс. 51-56), антагоністи NMDA-рецептора (сс. 56-58), естрогени (сс. 58-59), нестероїдні протизапальні лікарські засоби (сс. 60-61), антиоксиданти (сс. 61-62), агоністи рецепторів, що активуються пероксисомальними проліфераторами (PPAR) (сс. 63-67), засоби, що знижують рівень холестерину (сс. 68-75); інгібітори амілоїду (сс. 75-77), інгібітори утворення амілоїду (сс. 77-78), хелатори металів (сс. 78-79), антипсихотичні засоби та антидепресанти (сс. 80-82), харчові добавки (сс. 83-89) і сполуки, що підвищують доступність біологічно активних субстанцій у головному мозку (див. сс. 89-93) та проліки (сс. 93 і 94), зазначений документ включений у даний опис як посилання, але перш за все сполуки, згадані на зазначених вище сторінках.

Приклади

Приклад 1: Вакцини

Вісім послідовностей, виведених з фосфольованого тау-білка, використовували в якості антигенів для створення вакцин. У якості контролю використовували імуногенний пептид, що застосовувався раніше (Asuni та ін., 2007).

Таблиця 1: Опис тау-послідовностей

Опис	Вакцина	Послідовність
T5: контрольна послідовність: Тау 379-408 [pS396, pS404]	ACI-37	RENAKAKTDHGAEIVYKS(p)PVVSGDTS(p) PRHL (n=30) (SEQ ID NO: 1)
T1: Послідовність 1: Тау 5-20 [pY18]	ACI-33	RQEFVEMEDHAGTY(p)GL (n=16) SEQ ID NO: 2)
T8: Послідовність 8: Тау 206-221 [pT212, pS214]	ACI-39	PGSRRT(p)PS(p)LPTPPTTR (n=16) (SEQ ID NO: 3)
T9: Послідовність 9: Тау 196-211 [pS202, pT205]	ACI-40	GYSSPGS(p)PGT(p)PGSRRT (n=16) (SEQ ID NO: 4)
T3: Послідовність 3: Тау 393-408 [pS396, pS404]	ACI-35	VYKS(p)PVVSGDTS(p)PRHL (n=16) (SEQ ID NO: 5)
T4: Послідовність 4: Тау 401-418 [pS404, pS409]	ACI-36	GDTS(p)PRHLS(p)NVSSTGSID (n=18) (SEQ ID NO: 6)
T2: Послідовність 2: Тау 200-216 [pS202+pT205 і pT212+pS214]	ACI-34	PGS(p)PGT(p)PGSRRT(p)PS(p)LP (n=17) (SEQ ID NO: 7)
T10: Послідовність 10: Тау 407-418 [pS409]	ACI-42	HLS(p)NVSSTGSID (n=12) (SEQ ID NO: 8)
T11: Послідовність 11: Тау 399-408 [pS404]	ACI-43	VSGDTS(p)PRHL (n=10) (SEQ ID NO: 9)

Приклад 2: Одержання виведених з тау-білка тетрапальмітоїлованих фосфолінованих пептидів

Створювали за допомогою східчастого процесу антигенну пептидну послідовність, фланковану двома парами лізину, за допомогою твердофазного пептидного синтезу на амідній смолі, використовуючи стандартну Fmoc/tBu-хімію. Потім ортогональні захисні групи кінцевих лізину вибірково видаляли та вільні аміногрупи ацилювали пальмітиновою кислотою.

Видалення захисних груп бічних ланцюгів і одночасне відділення пептиду від смоли здійснювали в кислих умовах, що дозволяло одержувати необхідний тетрапальмітоїлований фосфолінований пептид у вигляді неочищеного продукту. Ідентичність і чистоту додатково підтверджували за допомогою мас-спектрометрії MALDI-TOF і PXBP-аналізу.

Послідовності виведених з тау-білка тетрапальмітоїлованих фосфолінованих пептидів:

T1: H-K(Pal)-K(Pal)-RQEFVEMEDHAGTY(P)GL-K(Pal)-K(Pal)-NH₂
T2: H-K(Pal)-K(Pal)-PGS(p)PGT(p)PGSRRT(p)PS(p)LP-K(Pal)-K(Pal)-NH₂
T3: H-K(Pal)-K(Pal)-VYKS(p)PVVSGDTS(p)PRHL-K(Pal)-K(Pal)-NH₂
T4: H-K(Pal)-K(Pal)-GDTS(p)PRHLS(p)NVSSTGSID-K(Pal)-K(Pal)-NH₂
T8: H-K(Pal)-K(Pal)-PGSRRT(p)PS(p)LPTPPTTR-K(Pal)-K(Pal)-NH₂
T9: H-K(Pal)-K(Pal)-GYSSPGS(p)PGT(p)PGSRRT-K(Pal)-K(Pal)-NH₂
T10: H-K(Pal)-K(Pal)-HLS(p)NVSSTGSID-K(Pal)-K(Pal)-NH₂
T11: H-K(Pal)-K(Pal)-VSGDTS(p)PRHL-K(Pal)-K(Pal)-NH₂

2.1: Синтез пептидного антигену T1

Ортогонально захищену амінокислоту Fmoc-Lys(Mtt)-OH (3 екв.) вносили вручну на амідну смолу (амідна MBHA (метилбензилгідріламін) смола Рінка, 1 екв., 0,26 ммоль) у присутності 2 екв. ДІК (діізопропілкарбодімід)/ГОВТ (1-гідроксибензотріазол) у ДМФ (диметилформамід). Потім смолу відмивали ДМФ (3 × 1 хв). Після видалення N-кінцевої Fmoc-групи за допомогою 25 % піперидина в ДМФ (1 × 1 хв і 2 × 15 хв) другий залишок Fmoc-Lys(Mtt)-OH (3 екв.) автоматично зшивали, використовуючи 5 екв. PyBOP (гексафторфосфат бензотріазол-1-ілокситрипірролідинофосфонія/ГОВТ/ДІЕА (діізопропілетиламін) у ДМФ (2 × 15 хв). Наступні 16 амінокислот, що несуть стандартні захисні групи Fmoc бічних ланцюгів, автоматично включали, застосовуючи раніше описаний протокол комбінації. Фосфолінування амінокислоти (фосфо-амінокислоти) інтродукували у вигляді монобензилових ефірів на фосфатній групі. Після кожної стадії комбінації здійснювали стадію відмивання ДМФ (3 × 30 с), стадію видалення Fmoc за допомогою 25 % піперидина в ДМФ (3 × 3 хв) і другу стадію відмивання ДМФ (6 × 30 с). Після комбінації Тур(PO(PBzl)₂) застосовували 0,5 % ДБУ (діазабіциклоундецен) у ДМФ для здійснення стадії видалення захисної групи Fmoc. Складання пептидної послідовності завершували, додаючи два останні залишки Fmoc-Lys(Mtt)-OH з використанням 2 екв. PyBOP/ГОВТ/ДІЕА в ДМФ.

Потім Mtt-групи (метилтритильні групи) кінцевих залишків лізину вибірково відчеплювали в атмосфері азоту шляхом обробки смоли (1 екв. 600 мг, 0,092 ммоль) 10 мл дегазованої суміші ТІПС (триізопропілсиліловий ефір)/ТФК/ДХМ (дихлорметан) (1:1:98) на протязі декількох циклів по 10 хв. Смолу відмивали ДХМ (×3) і ДМФ (×3). Потім пальмітинову кислоту (20 екв., 473 мг, 1,85 ммоль) зшивали із зазначеними аміногрупами з вилученими захисними групами, використовуючи ТБТУ (тетрафторборат тетраметил-О-(бензотріазол)-1-іл)уронію (20 екв. 593 мг, 1,85 ммоль) і ДІЕА (40 екв. 643 мкл, 3,70 ммоль) у ДХМ/ДМФ (1:1) (6 мл). Смолу відмивали ДХМ (×5) і ДМФ (×5). Потім N-кінцеву Fmoc-групу видаляли за допомогою 20 % дегазованого піперидину в ДМФ (3 × 10 хв) і смолу відмивали ДМФ (×3) і ДХМ (×5). І, нарешті, здійснювали одночасне розщеплення смоли та видалення захисних груп бічних ланцюгів в атмосфері азоту з використанням дегазованої суміші ТФК/ТІПС/Н₂О/ЕДТ (1,2-етандитріол) (95:1:2,5:2,5) (4 мл) на протязі 4,5 г. Після розтирання в холодному діетиловому ефірі одержували неочищений продукт Т1 у вигляді твердої речовини білого кольору (189 мг, вихід 60 %) із чистотою 56 % (за даними РХВР-аналізу). За допомогою мас-спектроскопії MALDI-TOF підтверджували ідентичність основного продукту (m/z очікуване: 3427,12 [МН⁺], виявлене: 3426,87).

2.2: Синтез пептидного антигену Т3

Ортогонально захищену амінокислоту Fmoc-Lys(Mtt)-ОН (3 екв.) вносили вручну на амідну смолу (амідна MBHA-смола Рінка, 1 екв., 0,4 ммоль) у присутності PyBOP/ГОБТ/ДІЕА в ДМФ. Потім смолу відмивали ДМФ (3×1 хв). Після видалення N-кінцевої Fmoc-групи за допомогою 25 % піперидину в ДМФ (1 × 1 хв і 2 × 15 хв) другий залишок Fmoc-Lys(Mtt)-ОН (3 екв.) зшивали, використовуючи такі ж умови завантаження. Наступні 16 амінокислот, що несуть стандартні захисні групи Fmoc бічних ланцюгів, включали вручну, застосовуючи раніше описаний протокол комбінації. Фосфолювання амінокислоти інтродукували у вигляді монобензилових ефірів на фосфатній групі. Тривалість реакції комбінації визначали за допомогою TNBT- (нітроблакитний тетразолій) тесту або хлоранільного тесту після проліну. При необхідності здійснювали другу реакцію комбінації з використанням 2 екв. захищених Fmoc амінокислот у присутності ДІК/ГОБТ або ГАТУ (гексафторфосфат О-(7-азабензотріазол-1-іл) тетраметилуронію)/ДІЕА. Після кожної стадії комбінації здійснювали стадію відмивання ДМФ (3 × 1 хв), стадію видалення Fmoc за допомогою 25 % піперидину в ДМФ (1 × 1 хв і 2 × 15 хв) і другу стадію відмивання ДМФ (7 × 1 хв). Після комбінації першої Ser(PO(PBzl)ОН) 0,5 % ДБУ в ДМФ застосовували для здійснення стадії видалення захисних груп Fmoc. Складання пептидної послідовності завершували, додаючи два останні залишки Fmoc-Lys(Mtt)-ОН.

Потім Mtt-групи кінцевих залишків лізину вибірково відчеплювали в атмосфері азоту шляхом обробки смоли (1 екв. 195 мг, 0,01 ммоль) 10 мл ТІПС/ТФК/ДХМ (1:1:98) на протязі декількох циклів по 10 хв. Смолу відмивали ДХМ (×3) і ДМФ (×3). Потім пальмітинову кислоту (20 екв., 51 мг, 0,2 ммоль) зшивали із зазначеними аміногрупами з вилученими захисними групами, використовуючи ТБТУ (20 екв. 64 мг, 0,2 ммоль) і ДІЕА (40 екв., 70 мкл, 0,4 ммоль) у ДХМ/ДМФ (1:1) (2 мл). Смолу відмивали ДХМ (×5) і ДМФ (×5). Потім N-кінцеву Fmoc-групу видаляли за допомогою 20 % піперидину в ДМФ (3 × 10 хв) і смолу відмивали ДМФ (×3) і ДХМ (×3). І, нарешті, здійснювали одночасне розщеплення смоли та видалення захисних груп бічних ланцюгів в атмосфері азоту з використанням суміші ТФК/ТІПС/Н₂О (95:1,5:2,5) (2 мл) на протязі 2 г. Після розтирання в холодному діетиловому ефірі одержували неочищений продукт Т3 у вигляді твердої речовини білого кольору (34 мг, вихід 100 %) із чистотою 67 % (за даними РХВР-аналізу). За допомогою мас-спектроскопії MALDI-TOF підтверджували ідентичність основного продукту (m/z очікуване: 3365,15 [МН⁺], виявлене: 3369,66).

2.3: Синтез пептидного антигену Т4

Ортогонально захищену амінокислоту Fmoc-Lys(Mtt)-ОН (5-кратний надлишок) автоматично зшивали з амідною смолою Tentagel R RAM (0,19 ммоль/г, 750 мг, 0,1425 ммоль), використовуючи ДЦКІ (дициклогексилкарбодіімід) і ГОБТ у якості активуючих агентів у ДМФ. Після видалення N-кінцевої Fmoc-групи другий залишок Fmoc-Lys(Mtt)-ОН (5-кратний надлишок) зшивали в присутності ДЦКІ та ГОБТ. Наступні 16 амінокислот, що несуть стандартні захисні групи бічних ланцюгів, автоматично включали, застосовуючи аналогічні протоколи комбінації/видалення захисних груп. Фосфо-амінокислоти інтродукували у вигляді монобензилових ефірів на фосфатній групі. Здійснювали подвійні комбінації на протязі 60 хв для всіх залишків з наступною стадією кепірування за допомогою оцтового ангідриду. Складання пептидної послідовності завершували, додаючи два останні залишки Fmoc-Lys(Mtt)-ОН.

Потім Mtt-групи кінцевих залишків лізину вибірково відчеплювали шляхом обробки смоли (1 екв. 750 мг, 0,075 ммоль) 10 мл ТІПС/ТФК/ДХМ (1:1:98) на протязі декількох циклів по 10 хв. Смолу відмивали ДХМ (×3) і ДМФ (×3). Потім пальмітинову кислоту (20 екв., 51 мг, 0,2 ммоль)

зшивали із зазначеними аміногрупами з вилученими захисними групами, використовуючи ТБТУ (20 екв. 482 мг, 1,5 ммоль) і ДІЕА (40 екв., 536 мкл, 3,0 ммоль) у ДХМ/ДМФ (1:1) (7 мл). Смолу відмивали ДХМ (×5) і ДМФ (×5). Потім N-кінцеву Fmoc-групу видаляли за допомогою 20 % піперидину в ДМФ (3 × 10 хв) і смолу відмивали ДМФ (×3) і ДХМ (×3). І, нарешті, здійснювали одночасне відщеплення від смоли та видалення захисних груп бічних ланцюгів з використанням суміші ТФК/ТІПС/Н₂О (95:2,5:2,5) (6 мл) на протязі 3,5 г. Після розтирання в холодному діетиловому ефірі одержували неочищений продукт Т4 у вигляді твердої речовини білого кольору (96 мг, вихід 37 %) із чистотою 50 % (за даними РХВР-аналізу). За допомогою мас-спектроскопії MALDI-TOF підтверджували ідентичність основного продукту (m/z очікуване: 3455,10 [МН⁺], виявлене: 3456,13).

2.4: Синтез пептидного антигену Т8

Ортогонально захищену амінокислоту Fmoc-Lys(Mtt)-ОН (5 екв. 781 мг, 1,25 ммоль) вносили вручну на амідну РЕГА-смолу Рінка (1 екв., 0,33 ммоль/г, 758 г), використовуючи ДІПКДІ (діізопропілкарбодіімід) (5 екв., 196 мл, 1,25 ммоль) і ГОБТ (5 екв., 169 мг, 1,25 ммоль) у ДМФ (5 мл) для двох реакцій комбінації, які здійснювали на протязі 8 г. Потім смолу відмивали ДМФ (× 5). Після видалення N-кінцевої Fmoc-групи за допомогою 20 % піперидину в ДМФ (7 мл × 3 × 5 хв) другий залишок Fmoc-Lys(Mtt)-ОН (10 екв., 1,56 г, 2,5 ммоль) зшивали в присутності ТБТУ (10 екв., 803 мг, 2,5 ммоль), ГОБТ (10 екв., 338 мг, 2,5 ммоль) і ДІЕА (20 екв., 871 мл, 5,0 ммоль). Наступні 16 амінокислот, що несуть стандартні захисні групи бічних ланцюгів, включали вручну, застосовуючи аналогічні протоколи циклів комбінації/видалення захисних груп/відмивання. Фосфолювання амінокислоти інтродукували винятково у вигляді монобензилових ефірів на фосфатній групі (10 екв.) за допомогою ТБТУ (10 екв.), ГОБТ (5 екв.) і ДІЕА (15 екв.) у ДМФ. У процесі синтезу час реакції комбінації становив 1 г. Складання пептидної послідовності завершували, додаючи два останні залишки Fmoc-Lys(Mtt)-ОН.

Потім Mtt-групи кінцевих залишків лізину вибірково відщеплювали шляхом обробки пептидильної смоли (1 екв. 385 мг, 0,019 ммоль) 10 мл ТІПС/ТФК/ДХМ (1:1:98) на протязі декількох циклів по 10 хв. Смолу відмивали ДХМ (×3) і ДМФ (×3). Потім пальмітинову кислоту (20 екв., 968 мг, 3,8 ммоль) зшивали із зазначеними аміногрупами з вилученими захисними групами, використовуючи ТБТУ (20 екв., 1,21 г, 3,8 ммоль) і ДІЕА (40 екв., 1,31 мл 7,6 ммоль) у ДХМ/ДМФ (1:1) (4 мл). Смолу відмивали ДХМ (×5) і ДМФ (×5). Потім N-кінцеву Fmoc-групу видаляли за допомогою 20 % піперидину в ДМФ (3 × 10 хв) і смолу відмивали ДМФ (×3) і ДХМ (×3). І, нарешті, здійснювали одночасне відщеплення від смоли та видалення захисних груп бічних ланцюгів з використанням суміші ТФК/ТІПС/Н₂О (95:2,5:2,5) (4 мл) на протязі 3,5 г. Після розтирання в холодному діетиловому ефірі одержували неочищений продукт Т8 у вигляді твердої речовини білого кольору (50, 2 мг, вихід 10 %) із чистотою 55 % (за даними РХВР-аналізу). За допомогою мас-спектроскопії MALDI-TOF підтверджували ідентичність основного продукту (m/z очікуване: 3331,17 [МН⁺], виявлене: 3335,19).

2.5: Синтез пептидного антигену Т9

Ортогонально захищену амінокислоту Fmoc-Lys(Mtt)-ОН (3 екв.) вносили вручну на амідну смолу (амідна МВНА-Смола Рінка, 1 екв., 0,4 ммоль) у присутності РуВОР/ГОБТ/ДІЕА в ДМФ. Потім смолу відмивали ДМФ (3×1 хв). Після видалення N-кінцевої Fmoc-групи за допомогою 25 % піперидину в ДМФ (1 × 1 хв і 2 × 15 хв) другий залишок Fmoc-Lys(Mtt)-ОН (3 екв.) зшивали, використовуючи такі ж умови завантаження. Наступні 16 амінокислот, що несуть стандартні захисні групи бічних ланцюгів, включали, застосовуючи раніше описаний протокол комбінації. Фосфолювання амінокислоти інтродукували у вигляді монобензилових ефірів на фосфатній групі. Тривалість реакції комбінації визначали за допомогою TNBT-тесту або хлоранільного тесту після проліну. При необхідності здійснювали другу реакцію комбінації з використанням 2 екв. захищеної Fmoc амінокислоти в присутності ДІК/ГОБТ або ГАТУ/ДІЕА. Після кожної стадії комбінації здійснювали стадію відмивання ДМФ (3 × 1 хв), стадію видалення Fmoc за допомогою 25 % піперидину в ДМФ (1 × 1 хв і 2 × 15 хв) і другу стадію відмивання ДМФ (7 × 1 хв). Після комбінації Thr(PO(PBzl)OH) використовували 0,5 % ДБУ в ДМФ для здійснення стадії видалення захисної групи Fmoc. Складання пептидної послідовності завершували, додаючи два останні залишки Fmoc-Lys(Mtt)-ОН.

Потім Mtt-групи кінцевих залишків лізину вибірково відщеплювали шляхом обробки смоли (1 екв., 650 мг, 0,156 ммоль) 10 мл ТІПС/ТФК/ДХМ (1:1:98) на протязі декількох циклів по 10 хв. Потім смолу відмивали ДХМ (×3) і ДМФ (×3). Пальмітинову кислоту (20 екв., 1,01 г, 3,15 ммоль) зшивали із зазначеними аміногрупами з вилученими захисними групами, використовуючи ТБТУ (20 екв. 814 мг, 3,5 ммоль) і ДІЕА (40 екв., 1,1 мл, 6,3 ммоль) у ДХМ/ДМФ (1:1) (6 мл). Смолу відмивали інтенсивно ДХМ (×5) і ДМФ (×5). Потім N-кінцеву Fmoc-групу видаляли за допомогою 20 % піперидину в ДМФ (3 × 10 хв) і смолу знову відмивали ДМФ (×3) і ДХМ (×3). І, нарешті,

здійснювали одночасне відщеплення від смоли та видалення захисних груп бічних ланцюгів з використанням суміші ТФК/ТІПС/Н₂О (95:2,5:2,5) (9 мл) на протязі 3 г. Після розтирання в холодному діетиловому ефірі одержували неочищений продукт Т9 у вигляді твердої речовини білого кольору (291 мг, вихід 59 %) із чистотою 69 % (за даними РХВР-аналізу). За допомогою мас-спектроскопії MALDI-TOF підтверджували ідентичність основного продукту (m/z очікуване: 3172,98 [МН⁺], виявлене: 3172,90).

2.6: Синтез пептидного антигену Т10

Тетрапальмітоїлований пептид Т10 одержували за допомогою протоколу, аналогічного описаному для Т9 (масштаб пептидного синтезу: 0,25 ммоль). Крім того, псевдопролін [psi(Gly-Ser)] застосовували в якості конструктивного елемента перед послідовністю Asn-Val-Ser-Ser, вбудовування якої було проблематичним. Одержували неочищений продукт Т10 у вигляді твердої речовини білого кольору (809 мг, кількісний вихід) із чистотою 56 % (за даними РХВР-аналізу). За допомогою мас-спектроскопії MALDI-TOF підтверджували ідентичність основного продукту (m/z очікуване: 2761,9 [МН⁺], виявлене: 2759,2).

2.7: Синтез пептидного антигену Т11

Тетрапальмітоїлований пептид Т11 одержували за допомогою протоколу, аналогічного описаному для Т9 (масштаб пептидного синтезу: 0,25 ммоль). Одержували неочищений продукт Т11 у вигляді твердої речовини білого кольору (495 мг, вихід 76 %) із чистотою 80 % (за даними РХВР-аналізу). За допомогою мас-спектроскопії MALDI-TOF підтверджували ідентичність основного продукту (m/z очікуване: 2613,8 [МН⁺], виявлене: 2612,2).

Приклад 3: Одержання вакцин (процес А)

Виведений з тау-білка тетрапальмітоїлований фосфольований пептид зважували (кількість див. у таблиці 2, нижче) і поміщали в скляну круглодонну колбу місткістю 250 мл. Потім зважували диміристоїлфосфатидилхолін (DMPC), диміристоїлфосфатидилгліцерин (DMPG), холестерин і ад'ювант, що представляє собою монофосфорильний ліпід А (MPLA) (усі фірми Avanti Polar Lipids Inc., шт. Алабама, США) і додавали в молярному співвідношенні 9:1:7:0,2 відповідно. Потім додавали хлороформ, одержуючи прозорий розчин із дрібними частками. Після обережного перемішування на протязі 15 хв органічний розчинник видаляли випарюванням при зниженому тиску при 40 °С, а потім у глибокому вакуумі на протязі 3 г. Тонку плівку, що утворювалася, регідратували шляхом додавання стерильного ЗФР у багатошаровій витяжній шафі та обережно перемішували при КТ (кімнатна температура) на протязі 18 г. Кінцеве молярне співвідношення пептид/фосфоліпід становило 1:100. Потім суспензію ліпосом розділяли на аліквоти у стерильних фальконовських пробірках місткістю 15 мл (5 мл продукту/пробірку) перед зберіганням при 2-8 °С. Кінцева концентрація пептиду становила 40 мкМ.

Приклад 4: Характеристики ліпосомальних вакцин на основі тау-пептидів

4.1. Методи

4.1.1 Кількісна оцінка пептиду, DMPC і холестерину за допомогою РХВР

Для аналізу ліпосомальних вакцин на основі тау-пептидів (ACI-33, ACI-35, ACI-36, ACI-39, ACI-40 і ACI-41, їх всі приготувляли згідно із процесом А, описаним в прикладі 3), приготувляли зразки шляхом додавання води (20 мкл) до зразка вакцини (20 мкл) у скляному флаконі для РХВР, потім додавали ізопропанол (140 мкл) і ТФК (20 мкл). Розведений в 5 раз зразок короткочасно струшували перед ін'єкцією (20 мкл). Аналіз здійснювали, використовуючи С3-колонку зі зверненою фазою типу Zorbax 300SB-B3 (250 × 4,6 мм, 5 мкм, 300Å, фірма Agilent) термостатовану до 75 °С, здійснюючи виявлення при 207 і 214 нм. Для елюювання застосовували наступні розчинники: розчинник Б, 95 % ізопропанолу, 5 % води, 0,1 % ТФК; розчинник А, 10 % ацетонітрилу, 90 % води, 0,1 % ТФК. Застосовували градієнт від 40 % Б до 60 % Б на протязі 20 хв при швидкості потоку 1 мл/хв. Для калібрування індивідуально використовували стандарти тау-пептидів (Т1, Т3, Т4, Т8 і Т9) і DMPC/холестерину в різних концентраціях. Для тау-пептидів приготувляли матковий розчин концентрації 1 мг/мл у ТФК/iPrOH/Н₂О (1:7:2) і здійснювали серійні розведення (1:1), починаючи з концентрації 400 мкг/мл до 12,5 мкг/мл. Для ліпідів приготувляли маткові розчини концентрації 8,0 мг/мл для DMPC і 3,5 мг/мл для холестерину в 70 % ізопропанолу та 30 % води та розводили (1:5), (1:10) і (1:50) за допомогою такої ж суміші.

4.1.2. Кількісна оцінка MPLA за допомогою РХВР

MPLA у ліпосомальної вакцині на основі тау-пептидів оцінювали за допомогою РХВР із виявленням УФ-детектором після дериватизації ад'юванта за допомогою хромофора 3,5-динітробензілоксиаміну (DNBA), що має активність при УФ-опроміненні. У цілому, метод полягав у наступному: 20 мкл ліпосомальних тау-конструкцій додавали в розчин DNBA у піридині (10 мг/мл, загальний обсяг 100 мкл), витримували при 60 °С на протязі 3 год. і потім

піридин видаляли випарюванням. Гранули, що утворились, повторно солюбілізували за допомогою суміші хлороформ/метанол (2:1, об/об) для РХВР-аналізу. Для калібрування використовували MPLA (фірма Avanti Polar Lipids) у чотирьох різних концентраціях і дериватизували та аналізували в ліпосомальних тау-конструкціях. РХВР-аналіз здійснювали за допомогою колонки зі зверненою фазою фірми Agilent типу XDB-C18 (250×4,6 мм, 120 Å, 5 мкм), термостатованою до 50 °С, здійснюючи виявлення при 254 нм. Для елювання застосовували наступні розчинники: розчинник А, 95 % ацетонітрилу, 5 % води, 4,8 мМ фосфорної кислоти; розчинник Б, 95 % ізопропанолу, 5 % води, 4,8 мМ фосфорної кислоти. Застосовували градієнт від 10 % Б до 70 % Б на протязі 30 хв при швидкості потоку 1 мл/хв.

4.1.3 Потенціал поверхні ліпосом

Зразки ліпосомальних тау-конструкцій розводили в 100 раз 3ФР. Аналіз здійснювали за допомогою обладнання Zetasizer Nano (фірма Малверн, США) при 25 °С. Вибір тривалості вимірів і потенціалу здійснювали в автоматичному режимі, як правило, застосовували потенціал 50 мВ. Дані трансформували автоматично за допомогою рівняння Смолуховського, використовуючи програму DTS 5.0 (фірма Малверн) для розрахунку зета-потенціалу. Оскільки ліпосомальні тау-конструкції складались із суміші DMPC/DMPG/холестерин/MPLA у молярному співвідношенні 9:1:7:0,2; очікуваний чистий заряд повинен бути негативним.

4.1.4 Конформаційний аналіз за допомогою кругового дихроїзму (CD)

Ліпосомальні тау-конструкції розводили (1:1) 3ФР із одержанням кінцевої концентрації пептиду 18 мкМ. Ліпосоми ідентичного складу, але без тау-пептиду, застосовували в якості контрольного розчину для віднімання фонового рівня. CD-спектри реєстрували на спектрополяриметрі Jasco-815, постаченому кварцовою кюветою з довжиною оптичного шляху 0,1 см (фірма Hellma, Німеччина), при 23 °С. Виміри здійснювали при довжинах хвиль 195-250 нм із шириною смуги 1,0 нм і розрішенням 0,5 нм. Застосовували швидкість сканування 50 нм/хв і час відповіді 1 с. Контрольні спектри осереднювали (за результатами 8 сканувань) і віднімали із середніх результатів 8 сканувань спектрів кожного зразка. Отриманий спектр ($[\theta]_{\text{obs}}$, у градуссах) згладжували після перетворення в середню молярну еліптичність залишків ($[\theta]$, градуси·см²·дмолі⁻¹) відповідно до рівняння $[\theta] = [\theta]_{\text{obs}} \times (\text{MRW}/10Ic)$, в якому MRW означає середню молекулярну масу залишків (ММ/кількість залишків), І означає довжину оптичного шляху (см) та с означає концентрацію (г/см³).

4.1.5 ThT-флуоресцентний аналіз

Оцінку ThT (тіофлавін Т)-флуоресценції здійснювали за допомогою рідера для титраційних мікропланшетів типу Infinite M200 (фірма Tecan Group Ltd, Швейцарія). Загальна процедура полягала в наступному: ліпосомальні тау-конструкції розводили в 3ФР із одержанням різних концентрацій (таблиця 2). Ліпосоми такого ж складу, але без тау-пептиду розводили аналогічно та застосовували в якості негативного контролю (партія ACI-35-081015-B). ДО 98 мкл розчину кожної вакцини або контрольного розчину додавали ThT (2 мкл, 1,2 мМ у воді) з одержанням кінцевої концентрації 24 мкМ. Після короточасного перемішування аліквоту з кожного зразка (70 мкл) додавали в чорний прозорий 384-лунковий титраційний мікропланшет фірми Perkin Elmer і флуоресценцію визначали при довжині хвилі 485 нм через 30 хв після збудження при довжині хвилі 440 нм. Ширина смуги збудження становила 9 нм, а ширина смуги випускання 20 нм. γ-циклодекстрин застосовували в якості внутрішнього контролю. Здійснювали серійні 2-кратні розведення в 3ФР, починаючи з маткового розчину концентрації 640 мМ у 3ФР, одержуючи 320, 160 і 80 мМ контрольні розчини γ-Циклодекстрину.

Таблиця 2: Зразки, приготовлені для ThT-аналізу

Пептид	Вакцина	Партія	Розведення	Конц. пептиду (мкг/мл)
Т1	ACI-33	ACI-33-081031-A	2-кратне	23
		ACI-33-081031-A	3-кратне	15
		ACI-33-081031-A	4-кратне	7,7
		ACI-33-081031-A	12-кратне	3,8
Т3	ACI-35	ACI-35-081015-A	2-кратне	39
		ACI-35-081015-A	3-кратне	26
		ACI-35-081015-A	4-кратне	20
		ACI-35-081015-A	12-кратне	5
Т4	ACI-36	ACI-36-081110-A	2-кратне	16,5
		ACI-36-081110-A	3-кратне	11
		ACI-36-081110-A	4-кратне	8,3
		ACI-36-081110-A	12-кратне	2,1

Пептид	Вакцина	Партія	Розведення	Конц. пептиду (мкг/мл)
T8	ACI-39	ACI-39-090202-A	2-кратне	24
		ACI-39-090202-A	3-кратне	16
		ACI-39-090202-A	4-кратне	12
		ACI-39-090202-A	12нкратне	4
T9	ACI-40	ACI-40-090202-A	2-кратне	30
		ACI-40-090202-A	3-кратне	20
		ACI-40-090202-A	4-кратне	15
		ACI-40-090202-A	12-кратне	5
T8+T9	ACI-41	ACI-41-081204-A	2-кратне	11,5
		ACI-41-081204-A	3-кратне	7,7
		ACI-41-081204-A	4-кратне	5,8
		ACI-41-081204-A	12нкратне	1,
Негативний контроль	Негативний контроль	ACI-35-081015-B	2-кратне	н.о.
		ACI-35-081015-B	3-кратне	н.о.
		ACI-35-081015-B	4-кратне	н.о.
		ACI-35-081015-B	12-кратне	н.о.

4.2. Результати

4.2.1 Кількісна оцінка пептиду, DMPC і холестерину за допомогою PXBP

На PXBP-хроматограмі при довжині хвилі виявлення 207 нм, яку одержували після ін'єкції зразків вакцин, видна присутність тау-пептиду, DMPC і холестерину (див. таблицю 3). На основі каліброваних кривих, для побудови яких використовували стандарти, розраховували кількість кожного компонента вакцини. Виявлений вміст тау-пептиду, DMPC і холестерину в ліпосомальних суспензіях, що містять тау-пептиди, виявився близьким до необхідних величин.

4.2.2 Кількісна оцінка MPLA за допомогою PXBP

На PXBP-хроматограмі при довжині хвилі виявлення 254 нм, яку одержували після ін'єкції зразка DNBA-дериватизованої містячої тау-пептид вакцини, видна присутність міченого MPLA (див. таблицю 3). На основі каліброваної кривої, для побудови якої використовували стандарт, розраховували кількість MPLA в містячих тау-пептид ліпосомальних вакцинах. Виявлений вміст MPLA у ліпосомальних суспензіях, що містять тау-пептиди, виявився близьким до необхідних величин.

4.1.3 Потенціал поверхні ліпосом

Дані про вимірний зета-потенціал ліпосомальних вакцин, що містять тау-пептид, представлено в таблиці 3.

4.2.4 Конформаційний аналіз тау-пептиду в ліпосомальних вакцинах за допомогою CD

Конформацію містячих тау-пептид ліпосомальних вакцин, приготовлених відповідно до описаного вище методу, визначали за допомогою кругового дихроїзму. Результати представлено в таблиці 3.

4.2.5. ThT-аналіз тау-пептиду в ліпосомальних вакцинах

Агреговані стану тау-пептидів ліпосомальних вакцин (отриманих з використанням описаного вище процесу А), визначені за допомогою флуориметричного ThT-аналізу, представлено в таблиці 3.

Таблиця 3. Узагальнення характеристик вакцин

Вакцина	Компонент	Час утримування	Необхідне значення (мкг/мл)	Результат (мкг/мл)	Потенціал поверхні ліпосом (мВ)	Конформація за даними кругового дихроїзму	ThT-аналіз (агрегація пептиду), флуоресцентний сигнал
ACI-33	пептид T1	19,3 хв	130	46	-18,7	Змішана конформація, що включає бета-складку і бета-поворот	Агрегація
	Холестерин	11,2 хв	1027	923			
	DMPC	10,0 хв	2314	2463			
	DMPG	н.о.	261	nd			
	MPLA	39,8 хв	135	62			
ACI-35	пептид T3	19,5 хв	130	78	-19,2	Довільна спіральна конформація	Відсутність агрегації
	Холестерин	11,6 хв	1046	1438			
	DMPC	10,3 хв	2357	nd			

Вакцина	Компонент	Час утримування	Необхідне значення (мкг/мл)	Результат (мкг/мл)	Потенціал поверхні ліпосом (мВ)	Конформація за даними кругового дихроїзму	ThT-аналіз (агрегація пептиду), флуоресцентний сигнал
	DMPG	н.о.	266	nd			
	MPLA	29,7 хв	135	124			
ACI-36	пептид T4	20,3 хв	130	33	-17,8	Довільна спіральна конформація з визначеною часткою бета-складок	Агрегація
	Холестерин	11,2 хв	1018	1387			
	DMPC	10,0 хв	2296	nd			
	DMPG	н.о.	259	nd			
	MPLA	29,7 хв	135	83			
ACI-39	пептид T8	19,3 хв	130	48	-16,8	Бета-складчата конформація	Відсутність агрегації
	Холестерин	11,8 хв	1056	1906			
	DMPC	10,5 хв	2381	4316			
	DMPG	н.о.	269	nd			
	MPLA	30,9 хв	135	144			
ACI-40	пептид T9	21,0 хв	130	60	-14,7	Довільна спіральна конформація	Відсутність агрегації
	холестерин	11,8 хв	1109	1655			
	DMPC	10,5 хв	2500	2894			
	DMPG	н.о.	269	nd			
	MPLA	30,9 хв	135	122			
ACI-41	пептид T8+T9	18,3 хв + 19,9 хв	65+65	23+34	-17,3	Суміш довільної спіральної та бета-складчатої конформації	Відсутність агрегації
	холестерин	11,2 хв	1109	34			
	DMPC	9,9 хв	2500	1574			
	DMPG	н.о.	282	3829			
	MPLA	30,9 хв	135	80			

Приклад 5: Імуногенність пальмітоїлованих тау-антигенів для мишей дикого типу та Тау-/- КО мишей

5.1. Методи

5.1.1 Миші з "виключеним" геном tau (ТКО)

Для "вимикання" гену tau використовували вектор, що забезпечує спрямований перенос, за допомогою якого вбудовували кДНК EGFP (посилений зелений флуоресцентний білок) в екзон 1 у рамці зчитування гена з ендеогенним ініціюючим кодоном. У результаті одержували злитий білок з першими 31 амінокислотами (ак) тау-білка, за якими розташовувався EGFP (описано в Tucker KL. та ін., Nature Neuroscience, 2001). Делецію гена підтверджували вестерн-блоттингом лізатів усього головного мозку. Оцінка рівнів тау-білка за допомогою декількох антитіл до тау-білка свідчила про те, що всі ізоформи тау-білка були відсутні в гомозиготному мутанті та їх рівень був знижений на 50 % у гетерозиготному мутанті. Мутації підтримували в генетичному фоні C57BL/6.

5.1.2 Одержання вакцини

Вакцини одержували за допомогою процесу А, описаного в прикладі 3.

5.1.3 Імунізації

Мишам лінії C57BL/6 або Тау-/- КО (ТКО) вводили за допомогою і.р. ін'єкцій вакцину (ACI-33, ACI-35, ACI-36 і ACI-41), здійснюючи три обробки (схема 1) (таблиця 4).

У випадку імунізації ACI-33, ACI-35, ACI-36 і ACI-41 здійснювали три імунізації з 2-тижневими інтервалами між кожним введенням в (день (d)0, d13, d28), як проілюстровано на схемі 1. За 1 день (d-1) до перших імунізацій, потім після другої (d27) і третьої (d47) імунізації відбирали зразки крові та одержували сироватку. Для одержання сироватки давали утворюватись згустку в зразках крові на протязі ночі, з наступним одержанням супернатанту після центрифугування. Визначали титри специфічних для фосфольованих тау-пептидів (рТау) антитіл у вигляді IgG і IgM і підкласів IgG-ізо типу за допомогою ELISA. У якості контролю визначали також за допомогою ELISA титри антитіла у вигляді IgG, що не має специфічності у відношенні рТау.

Таблиця 4: Імунізація мишей

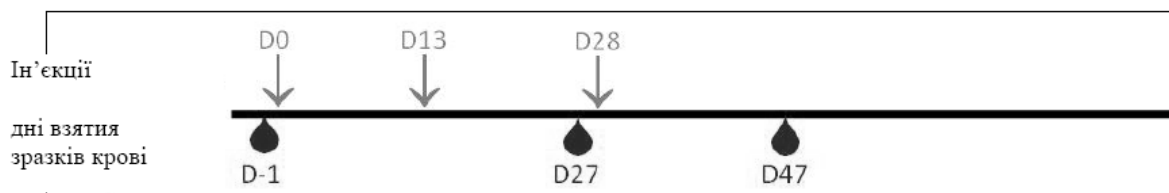
Група	Лінія мишей	Вік (міс.)	Кількість та стать тварин	Обробка/обсяг ^а	Партія вакцини	Шлях введення ^б	Рівень дози, кількість пептиду мкг/дозу ^в	Кількість MPLA мкг/дозу ^в
ACI-33 (T1 пептид)	WT	6	3 ♂ 3 ♀	ACI-33 0,2 мл	ACI-33-081031-A	i.p.	9	12
	KO	4-5	3 ♂ 3 ♀	ACI-33 0,2 мл	ACI-33-081031-A	i.p.	9	12
ACI-35 (T3 пептид)	WT	6	3 ♂ 3 ♀	ACI-35 0,2 мл	ACI-35-081015-A	i.p.	16	23
	KO	6-8	3 ♂ 3 ♀	ACI-35 0,2 мл	ACI-35-081015-A	i.p.	16	23
ACI-36 (T4 пептид)	WT	6	3 ♂ 3 ♀	ACI-36 0,2 мл	ACI-36-081110-A	i.p.	7	13
	KO	4	3 ♂ 3 ♀	ACI-36 0,2 мл	ACI-36-081110-A	i.p.	7	13
ACI-41 (T8+T9 пептид)	WT	7	3 ♂ 3 ♀	ACI-41 0,2 мл	ACI-41-081204-A	i.p.	5	7
	KO	4	3 ♂ 3 ♀	ACI-41 0,2 мл	ACI-41-081204-A	i.p.	5	7

^а: теоретичний обсяг

^б: i.p.: внутрішньобрюшинно

^в: кількість, виміряна після аналізу

Схема 1: Режим імунізацій і відбору крові при застосуванні ACI-33, ACI-35, ACI-36 і ACI-41



5.1.4 Кількісна оцінка специфічних для тау-пептидів антитіл

Специфічні для рТау-пептидів антитіла у вигляді IgG визначали за допомогою ELISA у трьох зразках сироватки, отриманих при відборі крові. Специфічні для тау-пептиду IgG визначали в сироватці, отриманій в дні d-1 і d47. Специфічні для рТау-пептидів антитіла ізотипів IgM і IgG визначали за допомогою ELISA у зразку сироватки, отриманому при відборі крові в d47. Планшети сенсibiliзували 10 мкг/мл відповідного тау-пептиду на протязі ночі при 4 °C. Після відмивання кожної лунки з використанням 3ФР-0,05 % Твін 20 і блокади за допомогою 1 % БСА в 3ФР-0,05 % Твін 20 у планшети вносили серійні розведення сироватки та інкубували при 37 °C на протязі 2 г. Після відмивання планшети інкубували з кон'югованим з лужною фосфатазою (AP) антимішачим повним антитілом у вигляді IgG (фірма Jackson Laboratories, Балтімор, шт. Пенсільванія, США) або з ізотипспецифічними антитілами (кон'югований з пероксидазою із хрину (HRP) антимішачий IgM, кон'югований з AP антимішачий IgG1, кон'югували з біотином антимішачі IgG2a і IgG3, які одержували від фірми Pharmingen BD, Сан-Дієго, шт. Каліфорнія, США, і кон'югований з HRP антимішачий IgG2b фірми Zymed Laboratories, Сан-Франциско, шт. Каліфорнія) на протязі 2 год. при 37 °C. Після відмивання планшети інкубували з рNPP (пара-нітрофенілфосфат), що представляє собою фосфатний субстрат для AP, або ABTS (2,2'-азино-біс(3-етилбензтіазолин-6-сульфонова кислота)), що представляє собою субстрат для HRP, і зчитували при 405 нм за допомогою планшет-рідера для ELISA. Додаткову стадію здійснювали для кон'югованих з біотином антитіл, при цьому планшети інкубували на протязі 45 хв із комплексом стрептавідин-HRP (фірма R&D Systems, Міннеаполіс, шт. Міннесота, США) перед виявленням за допомогою ABTS. Результат виражали у вигляді ОГ (оптична густина) для

першого розведення та ненасичуючого розведення в випадку IgG та ОГ для ненасичуючого розведення в випадку ізотипів IgG та IgM.

5.1.5 Зв'язування антитіл до тау-пептидів з тау-сплетіннями на зрізах головного мозку трансгенних тварин (TAUPIR)

Зв'язування антитіл, що присутні у сироватці вакцинованих тварин, зі сплетіннями в зрізах головного мозку здійснювали за допомогою ТАУPIR-імуногістохімії.

Застосовувані зрізи головного мозку одержували із трансгенних тварин Тау Р301L (TPLH: найбільш довга ізоформа (441 ак) людського тау-білка з мутацією Р301L) на кінцевій стадії життя та зі старих (віком >15 місяців) мишей, що несуть 2 трансгени (двічі трансгенні миші лінії biGT (трансгенні миші лінії GSK-3, схрещені з мишами лінії TPLH).

Зрізи головного мозку відмивали на протязі 5 хв у ЗФР, потім інкубували на протязі 15 хв при КТ в 1,5 % H_2O_2 у ЗФР:MeOH (1:1) для блокади ендогенної пероксидази. Після трикратного відмивання зрізів у ЗФРТ (ЗФР/0,1 % Тритон X100) їх інкубували на протязі 30 хв при КТ у блокувальному розчині, що включає ЗФР+10 % FCS (фетальна теляча сироватка). Інкубацію із сироваткою, що містить антитіла до тау-білка, здійснювали на протязі ночі при 4 °C. Сироватку розводили в ЗФРТ/10 % FCS, використовуючи декілька азличних серійних розведень від 1/2500 до 1/10000. Зрізи відмивали тричі в ЗФРТ перед інкубацією з кон'югованим HRP козячим антимишачим вторинним антитілом (фірми Dako, Глоstrup, Данія)) у ЗФРТ/10 % FCS на протязі 1 год. при КТ. Перед виявленням зрізи відмивали тричі в ЗФРТ і інкубували в 50 мМ Тріс/HCl pH 7,6 на протязі 5 хв. Виявлення здійснювали шляхом інкубації зрізів на протязі 3 хв у діамінобензидині (DAB: 1 таблетка в 10 мл 50 мМ Тріс/HCl+3 мкл 30 % H_2O_2) (фірма MP Biomedicals, Солон шт. Огайо, США). Реакцію припиняли шляхом трикратного відмивання зрізів у ЗФРТ. Потім зрізи переносили на пластини із силанізованого скла та сушили на повітрі на теплій пластині при 50 °C на протязі 2 г. Контрастне фарбування здійснювали шляхом інкубації з гематоксиліном Майєра (фірма Fluka Chemie, Бухс, Швейцарія) на протязі 1 хв із наступною стадією відмивання на протязі 4 хв у проточній водопровідній воді. Зрізи дегідратували, поміщаючи їх у баню з 50 %, 70 %, 90 % і двічі 100 % етанолу, а потім двічі на 1 хв у ксилол. І, нарешті, зрізи поміщали в середовище DePeX (фірма BDH Chemicals Ltd., Пул, Великобританія), закриваючи скляним покривним склом

5.1.6 Вестерн-блоттинг (ВБ)

Аналіз зв'язування антитіл, що перебувають у сироватці вакцинованих тварин, з рТау в екстрактах головного мозку трансгенних тварин здійснювали за допомогою ВБ.

Для гомогенізації головного мозку мишей дикого типу FVB, мишей ліній TPLH, biGT і мишей з "виключеним" геном Тау (ТКО) використовували наступний буфер: 25 мМ Тріс/HCl pH 7,6, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЕДТКА, 1 мМ ЕГТК, 30 мМ NaF, 0,2 мМ Na_3VO_4 , 1 мМ оадаєва кислота, 1 мМ фенілметилсульфонілфторид (ФМСФ), 5 мМ $Na_4P_2O_7$, 1 таблетка повного коктейлю інгібіторів протеаз (СРІС) на загальний обсяг 12 мл. Для одержання гомогенату всього головного мозку головний мозок гомогенізували на льоді в 1 об./масу півкулі (мл/г) за допомогою обладнання, що приводиться в дію мотором, типу гомогенізатора Поттера (скляна пробірка/тефлонова маточка) при 700 об/хв.

Гомогенат усього головного мозку розводили у співвідношенні 1:1 буфером для зразка (125 мМ Тріс/HCl pH 6,8, 4 % (мас./об.) додецилсульфат натрію (ДСН), 20 % гліцерину, 0,01 % бромфенолового синього) + 5 % бета-меркапт-етанолу, потім швидко нагрівали до 95 °C. Зразки витримували 5 хв, розводили 1/4 у буфері для зразка, знову нагрівали до 95 °C, потім охолоджували та центрифугували при 14000 об/хв на протязі 5 хв до одержання прозорого дебрису, який не солюбілізували. Супернатанти збирали та вносили на гель для здійснення ДСН-ПААГ. Перенос на нітроцелюлозну мембрану (Hybond-ECL) здійснювали в буфері для переносу (25 мМ Тріс pH 8,6, 190 мМ гліцин, 20 % метанолу). Мембрану переносили в блокувальний розчин (0,1 % Твін в TBS (50 мМ Тріс/HCl, pH 7,6, 150 мМ NaCl) + 5 % сухого молока) перед інкубацією на протязі ночі при 4 °C з мишачою сироваткою, розведеною блокувальним розчином. Інкубацію із вторинним кон'югованим з HRP козячим антимишачим антитілом (фірма Dako, Глоstrup, Данія), розведеним у співвідношенні 1/10000 у блокувальному розчині, здійснювали при КТ на протязі 1 г. Для виявлення використовували застосовувані для вестерн-блоттинга ECL-реагенти фірми GE Healthcare.

5.2. Результати

5.2.1 Специфічність антитіл із сироватки вакцинованих мишей

Сироватку з вакцинованих мишей оцінювали за допомогою ELISA відносно специфічності присутніх у ній антитіл до рТау-пептидів і тау-пептидів, тау-сплетінням за допомогою ТАУPIR-аналізу, а до рТау-пептидів за допомогою вестерн-блоттинга.

Вакцина ACI-33 індукувала відповідь у вигляді антитіл до Тау5-20 [pY18] ізотипу IgG після

і.р.-ін'єкції. Після двох імунізацій (d27), IgG-відповідь залишалася стабільною, при цьому не виявлено посилення після третьої імунізації (d47) (фіг. 1а: WT-миші, односпрямований дисперсійний аналіз, $P < 0,05$ при порівнянні результатів, отриманих в d-1, з результатами, отриманими в d27, $P < 0,001$ при порівнянні результатів, отриманих в d-1, з результатами, отриманими в d47, і фіг. 1б: ТКО-миші, односпрямований дисперсійний аналіз, $P < 0,001$ при порівнянні результатів, отриманих в d-1, з результатами, отриманими в дні d27/47).

Вакцина ACI-35 індукувала сильну відповідь у вигляді антитіл до Tau393-408 [pS396/pS404] ізотипу IgG після і.р.-ін'єкції. Після двох імунізацій (d28), IgG-відповідь залишалася стабільною (d42, 98 і 126), при цьому не виявлено посилення після третьої імунізації (d42) і відсутність посилення при відборі зразків крові до, між або після ревакцинації (фіг. 2а: WT-миші: односпрямований дисперсійний аналіз, $P < 0,0001$ при порівнянні результатів, отриманих в d-1 з результатами, отриманими в дні d28/42/98/126, і фіг. 2б: ТКО-миші: односпрямований дисперсійний аналіз, $P < 0,0001$ при порівнянні результатів, отриманих в d-1, з результатами, отриманими в дні d28/42/98/126).

Вакцина ACI-36 індукувала відповідь у вигляді антитіл до Tau401-418 [pS404/S409] ізотипу IgG після і.р.-ін'єкції. Після двох імунізацій (d27), IgG-відповідь залишалася стабільною, при цьому не виявлено посилення після третьої імунізації (d47) (фіг.3а: WT-миші: односпрямований дисперсійний аналіз, $P < 0,001$ при порівнянні результатів, отриманих в d-1 з результатами, отриманими в d27, $P < 0,0001$ при порівнянні результатів, отриманих в d-1 з результатами, отриманими в d47, і фіг. 3б: ТКО-миші: односпрямований дисперсійний аналіз, $P < 0,0001$ при порівнянні результатів, отриманих в d-1 з результатами, отриманими в дні d27/47).

Вакцина ACI-41 після і.р.-ін'єкції індукувала сильну відповідь у вигляді IgG до пептидів Tau206-221 [pT212/pS214] і Tau196-211 [pS202/pT205]. Після двох імунізацій (d347), IgG-відповідь залишалася стабільною, при цьому не виявлено посилення після третьої імунізації (d48) (фіг. 4а: WT-миші, антитіла до Tau206-221 [pT212/pS214]-IgG, односпрямований дисперсійний аналіз, $P < 0,0001$ при порівнянні результатів, отриманих в d-1 з результатами, отриманими в дні d34/48); (фіг. 4б: WT-миші, антитіла до Tau196-211 [pS202/pT205]-IgG, односпрямований дисперсійний аналіз, $P < 0,0001$ при порівнянні результатів, отриманих в d-1 з результатами, отриманими в дні d34/48); (фіг. 4в: ТКО-миші, антитіла до Tau206-221 [pT212/pS214]-IgG, односпрямований дисперсійний аналіз, $P < 0,0001$ при порівнянні результатів, отриманих в d-1 з результатами, отриманими в дні d34/48); (фіг. 4г: ТКО-миші, антитіла до Tau196-211 [pS202/pT205]-IgG, односпрямований дисперсійний аналіз, $P < 0,0001$ при порівнянні результатів, отриманих в d-1 з результатами, отриманими в дні d34/48).

Сироватку з вакцинованих мишей додатково оцінювали відносно специфічності антитіл до тау-пептидів за допомогою ТАУPIR-імуногістохімії та вестерн-блоттинга. Дані, отримані для всіх ліпосомальних конструкцій і для кожної мишачої моделі, узагальнені нижче в таблиці 5.

Таблиця 5: Узагальнення даних про специфічність антитіл із сироватки вакцинованих мишей

Вакцина	Миші	ELISA (кількість позитивних/загальна кількість мишей)	ТАУPIR (кількість позитивних/загальна кількість мишей)	Вестерн-блоттинг (кількість позитивних/загальна кількість мишей)
ACI-33	WT	4/6	2/6	1/6
	КО	5/6	2/6	2/6
ACI-35	WT	5/6; 1†	5/6; 1†	5/6; 1†
	КО	6/6	3/6	6/6
ACI-36	WT	5/6	4/6	1/6
	КО	5/6; 1†	3/6; 1†	1/6; 1†
ACI-41	WT	6/6	4/6	4/6
	КО	6/6	1/6	3/6

5.2.2 Аналіз ізотопічної відповіді в імунізованих мишей дикого типу лінії C57BL/6 і Tau-/- КО (ТКО)

ACI-33

Вакцина ACI-33 індукувала в WT-мишей титри антитіл усіх ізотипів IgG2a, -2b і -3, а також IgM після трьох і.р.-імунізацій (фіг. 5а; WT-миші). При цьому практично був відсутній IgG1 і виявлена значима відмінність між титрами IgG1 і IgG2b і -3 (фіг. 5а; WT-миші; односпрямований дисперсійний аналіз, $P < 0,05$ при порівнянні IgG1 з IgG3, $P < 0,001$ при порівнянні IgG1 з IgG2b).

Вакцина ACI-33 індукувала в ТКО-мишей титри антитіл усіх ізотипів IgG2a, -2b і -3, а також IgM після трьох і.р.-імунізацій (фіг. 5б; ТКО-миші). При цьому практично був відсутній IgG1 і

виявлена значима відмінність між титрами антитіл цього підкласу та іншими IgG-ізотипами (фіг. 5б, односпрямований дисперсійний аналіз, $P < 0,05$ при порівнянні IgG1 з IgG2a/IgG3, $P < 0,001$ при порівнянні IgG1 з IgG2b).

ACI-35

5 Вакцина ACI-35 індукувала в WT-мишей титри антитіл усіх IgG-ізотипів, а також IgM після трьох і.р.-імунізацій (фіг. 6а; WT-миші). Значима відмінність виявлена тільки для IgM-відповіді, яка була більш високою у порівнянні з IgG3-відповіддю (фіг. 6а; WT-миші, односпрямований дисперсійний аналіз, $P < 0,05$ при порівнянні IgM з IgG3).

10 Вакцина ACI-35 індукувала в ТКО-мишей більш високі титри антитіл усіх IgG-ізотипів, а також IgM після трьох і.р.-імунізацій (фіг. 6б; ТКО-миші).

ACI-36

Вакцина ACI-36 індукувала в WT-мишей титри антитіл усіх IgG-ізотипів, а також IgM після трьох і.р.-імунізацій (фіг. 7а; WT-миші).

15 Вакцина ACI-36 індукувала в ТКО-мишей титри антитіл усіх IgG-ізотипів а також IgM після трьох і.р.-імунізацій (фіг. 7б; ТКО-миші). Виявлений статистично значимий більш високий рівень IgG2b у порівнянні з IgG1 (фіг. 7б; ТКО-миші, односпрямований дисперсійний аналіз, $P < 0,05$ при порівнянні IgG2b з IgG1).

ACI-41

20 Вакцина ACI-41 індукувала в WT-мишей високі титри антитіл до Tau196-211 [pS202/pT205] усіх IgG-ізотипів а також IgM після трьох і.р.-імунізацій (фіг. 8а; WT-миші).

Вакцина ACI-41 індукувала в ТКО-мишей високі титри антитіл до Tau196-211 [pS202/pT205] усіх IgG-ізотипів а також IgM після трьох і.р.-імунізацій (фіг.8б; ТКО-миші).

5.3. Висновок

25 Вакцина на основі тау-пептиду індукувала титри IgG в організмі всіх мишей. Виявлена низька гуморальна імунна відповідь у вигляді IgG1 у порівнянні з IgG2b і IgG3 у мишей, імунізованих ACI-33. У мишей, вакцинованих усіма іншими вакцинами на основі тау-пептидів, індукувались порівнянні титри антитіл усіх IgG2a, -2b і 3-ізотипів, а також IgM.

30 Антитіла, що утворились при вакцинації мишей вакциною на основі тау-пептиду, специфічно зв'язувались з рТау-пептидами та слабо зв'язувались з тау-пептидами. Антитіла, що утворились, також мали здатність розпізнавати сплетіння в головному мозку Тау-трансгенних мишей і розпізнавати рТау з головного мозку Тау-трансгенних мишей при аналізі за допомогою ВБ.

Приклад 6: Створення та скринінг гібридом та антитіл

35 Метою даного дослідження було створення та скринінг МАт (моноклональних антитіл) до тау-білка. Гібридами створювали шляхом злиття селезінки мишей, імунізованих тау-пептидом, із клітинною лінією міеломи. Гібридами оцінювали відносно реактивності як до фосфольованого, так і до нефосфольованого повнорозмірного тау-білка, а також як до фосфольованих, так і до нефосфольованих антигенних тау-пептидів, застосовуваним у препараті вакцин. Скринінг гібридом відносно реактивності супернатантів гібридом до тау-сплетінням здійснювали за допомогою імуногістохімії з використанням зрізів головного мозку Тау-трансгенних мишей.

6.1. Методи

6.1.1 Злиття

45 Для створення гібридом використовували мишей дикого типу лінії C57BL/6, вакцинованих ACI-33 (Tau5-20 [pY18]) і ACI-35. Мишей ревакцинували вакциною ACI-33 у день 0, потім знову в день 4, і злиття здійснювали в день 7. 173×10^6 (ACI-33) спленоцитів з імунізованих мишей зливали із клітинами міеломи лінії SP2-O-Ag14, використовуючи співвідношення 5 спленоцитів/1 клітину міеломи.

50 Для створення гібридом використовували мишей дикого типу лінії C57BL/6, вакцинованих ACI-36 (Tau401-418 [pS404/S409]). Мишей ревакцинували вакциною ACI-36 у день 0, потім знову в день 4, і злиття здійснювали в день 7. 84×10^6 спленоцитів з імунізованих мишей зливали із клітинами міеломи лінії SP2-O-Ag14, використовуючи співвідношення 5 спленоцитів/1 клітину міеломи.

55 Для створення гібридом використовували мишей дикого типу лінії C57BL/6, вакцинованих ACI-41 (суміш Tau206-221 [pT212/pS214] і Tau196-211 [pS202/pT205]). Мишей ревакцинували вакциною ACI-41 у день 0, потім знову в день 4, і злиття здійснювали в день 8. 162×10^6 спленоцитів з імунізованих мишей зливали із клітинами міеломи лінії SP2-O-Ag14, використовуючи співвідношення 5 спленоцитів/1 клітину міеломи.

Три злиття здійснювали в 8× 9-лункових планшетах, і клони позначали згідно з номером планшета (1-8), потім ряду (A-G) і, нарешті, колонки (1-12).

60 6.1.2 Метод скринінгу для відбору клонів

Спочатку 8 9-лункових планшетів піддавали двічі скринінгу відносно експресії IgG. Потім клони, для яких виявлена позитивна експресія, переносили в 24-лункові планшети та клітинні супернатанти (=клони) зростаючих клітин оцінювали за допомогою скринінгу на основі Tau-ELISA та імуногістохімічного скринінгу на основі TAUIR. Позитивні супернатанти за даними ELISA та/або TAUIR переносили в T25-колби та клони знову піддавали скринінгу відносно експресії IgG, скринінгу за допомогою Tau-ELISA і TAUIR.

6.1.3 IgG-скринінг

ELISA-планшети сенсibiliзували 50 мкл/лунку антимишачого антитіла у вигляді IgG (фірма CER Groupe, Марлойє, Бельгія) у буфері для сенсibiliзації на протязі 16 год. при 4 °C. Після відмивання планшетів з використанням 3ФР/Твін вносили блокувальний розчин з розрахунку 100 мкл/лунку на протязі 1 год. при КТ. 50 мкл нерозведеного супернатанту гібридами інкубували на протязі 1 год. при КТ. Після стадії відмивання в планшети вносили суміш кон'югованих з пероксидазою із хрину (HRP) антимишачих IgG1, IgG2a, IgG2b і IgG3 (фірма Ab Serotec, Ролі, штат Північна Кароліна, США) на протязі 1 год. при КТ. Після кінцевого відмивання здійснювали виявлення за допомогою TMB (3-3',5,5'-тетраметилбензидин), фосфатазного субстрату для HRP, і планшети зчитували при 405 нм, використовуючи планшет-рідер для ELISA. Результати виражали у вигляді величин ОГ (оптична густина)

6.1.4 Скринінг гібридом за допомогою Tau-ELISA

Скринінг гібридом за допомогою ELISA здійснювали, використовуючи рТау-пептид (ACI-33, T1.5: Tau5-20 [pY18]; ACI-36, T4.5: Tau401-418 [pS404/S409]; ACI-41, T8.5: Tau206-221 [pT212/pS214] і T9.5: Tau196-211 [pS202/pT205] PolyPeptide Laboratories, Хіллерод, Данія), відповідний тау-пептид (ACI-33, T1.6: Tau5-20; ACI-36, T4.6: Tau401-4; ACI-41, T8.6: Tau206-221 і T9.6: Tau196-211, PolyPeptide Laboratories, Хіллерод, Данія), фосфольований повнорозмірний (441 ак) тау-білок (рТау-білок, Vandebroek та ін., 2005) і повнорозмірний (441 ак) тау-білок (Тау-білок, фірма SignalChem, Річмонд, Канада). І, нарешті, у якості негативного контролю застосовували бичачий сироватковий альбумін (БСА).

Планшети сенсibiliзували 10 мкг/мл відповідного тау-пептиду та 1 мкг/мл відповідного тау-білка на протязі ночі при 4 °C. Після відмивання кожної лунки за допомогою 3ФР-0,05 % Твін 20 і блокади 1 % БСА в 3ФР-0,05 % Твін 20, у планшети додавали нерозведений супернатант гібридами або середовище як негативний контроль і інкубували при 37 °C на протязі 2 г. Після відмивання планшети інкубували з кон'югованим з лужною фосфатазою (AP) повним антимишачим антитілом у вигляді IgG (фірма Jackson Laboratories, Балтімор, шт. Пенсільванія, США) на протязі 2 год. при 37 °C. Після відмивання планшети інкубували з рNPP (пара-нітрофенілфосфат), фосфатазним субстратом для AP, і зчитували при 405 нм, використовуючи планшет-рідер для ELISA. Результати виражали у вигляді величин ОГ (оптична густина).

6.1.5 Імуногістохімічний (ІГХ) скринінг гібридом: зв'язування антитіл до тау-пептидів зі сплетіннями в зрізах головного мозку трансгенних мишей (TAUIR)

TAUIR-експерименти здійснювали згідно із протоколом, описаним у прикладі 5.1.5.

6.1.6 IgG-скринінг супернатантів гібридом з T25-колб

Планшети для ELISA сенсibiliзували 5 мкг/мл антимишачого антитіла у вигляді IgG, специфічного у відношенні F(ab')₂-фрагменту (фірма Jackson Laboratories, Балтімор, шт. Пенсільванія, США) у карбонатному-бікарбонатному буфері для сенсibiliзації, рН 9,6 (фірма Sigma, Бухс, Швейцарія) на протязі ночі при 4 °C. Після відмивання планшетів нерозведений супернатант гібридами, застосовуване в якості позитивного контролю антитіло у вигляді IgG1 (6E10 у концентрації 1 мкг/мол: фірма Covance, Емервілл, шт. Каліфорнія, США) або негативний контроль (тільки культуральне середовище) інкубували на протязі 1 год. при КТ. Після стадії відмивання інкубували на планшетах на протязі 2 год. при 37 °C використовуваний у якості вторинного антитіла кон'югований з AP козячий антимишачий IgG (підкласи 1+2a+2b+3)-Fc-фрагмент специфічний (фірма Jackson Laboratories, Балтімор, шт. Пенсільванія, США). Після кінцевого відмивання здійснювали виявлення, використовуючи рNPP (пара-нітрофенілфосфат), фосфатазний субстрат для AP, і планшети зчитували при 405 нм, використовуючи планшет-рідер для ELISA. Результати виражали у вигляді ОГ (оптична густина).

6.2. Результати

ACI-33-гібридами

Клітинні супернатанти з 8× 9-лункових планшетів, що утворились після злиття, піддавали скринінгу відносно виробництва IgG. Установлено, що з 768 протестованих лунок (8×96 лунок) 277 лунок виявились позитивними відносно експресії IgG та їх вміст переносили в 24-лункові планшети. В 24-лункових планшетах вирощували 79 клонів і супернатант цих клітин аналізували. Потім позитивні клони переносили в T25-колби та супернатанти піддавали

скринінгу відносно виробництва IgG за допомогою ELISA і TAUIR (таблиця 6).

Таблиця 6:

Скринінг клонів з 24-лункових планшетів		Скринінг клонів з T25-колб		
Позитивні згідно ELISA	Позитивні згідно TAUIR	Позитивні згідно IgG-скринінгу	Позитивні згідно ELISA	Позитивні згідно TAUIR
1A7		1A7		
	1A11			
	1C11	1C11		
2C9		2C9		
3C3		3C3	3C3	
3C5		3C5		
3E8		3E8		
3G10	3G10	3G10	3G10	
6C10	6C10	6C10	6C10	6C10
6F3		6F3		
6F8		6F8		

- 5 Тільки один клон, а саме 6C10, виявився позитивним за результатами всіх 3 скринінгів і він був відібраний для субклонування.

ACI-36-гібридами

- 10 Клітинні супернатанти з 8× 9-лункових планшетів, що утворились після злиття, піддавали скринінгу відносно виробництва IgG. Установлено, що з 768 протестованих лунок (8×96 лунок) 333 лунки виявились позитивними відносно експресії IgG та їх вміст переносили в 24-лункові планшети. В 24-лункових планшетах вирощували 75 клонів і супернатант цих клітин аналізували. Потім позитивні клони переносили в T25-колби та супернатанти піддавали скринінгу відносно виробництва IgG за допомогою ELISA і TAUIR (таблиця 7).

- 15 Таблиця 7:

Скринінг клонів з 24-лункових планшетів		Скринінг клонів з T25-колб		
Позитивні згідно ELISA	Позитивні згідно TAUIR	Позитивні згідно IgG-скринінгу	Позитивні згідно ELISA	Позитивні згідно TAUIR
2B6	2B6	2B6	2B6	2B6
2F9	2F9	2F9	2F9	2F9
2G1		2G1	2G1	2G1
3A8	3A8	3A8	3A8	3A8
3B9		3B9	3B9	3B9
3F11	3F11	3F11		3F11
	4A3			4A3
4C1		4C1	4C1	4C1
4C12		4C12	4C12	4C12
4E12		4E12	4E12	4E12
5E10		5E10	5E10	
5F5		5F5	5F5	
7D6	7D6	7D6	7D6	7D6
6H1		6H1	6H1	6H1

- 20 З метою відбору клонів для наступних стадій розподіляли за рангом усі супернатанти, позитивні згідно IgG/ELISA/ TAUIR-скринінгів, на основі результатів, отриманих за допомогою ELISA- і TAUIR-аналізу. Розподіл за рангом результатів, отриманих за допомогою ELISA і TAUIR, здійснювали згідно із процедурою, описаною в розділі "Методи". TAUIR-фарбування

виявилося практично ідентичним для п'яти перших клонів і відповідало результатам, отриманим за допомогою ELISA. Клон 4C12 відкидали, оскільки він був виявлений у тому ж планшеті, що й клон 4C1, що підвищувало ймовірність того, що ці два клони були однаковими (розпізнавали той самий епітоп). Відбирали 4 найбільш активних клони, а саме, 3A8, 2B6, 4C1 і 6H1. Інші 6 клонів (4C12, 2G1, 2F9, 7D6, 3B9, 4E12) підтримували для можливого повторного застосування.

Розподіл за рангом 10 клонів, що виявились позитивними за результатами ELISA-скринінгу та ТАУПІР-скринінгу, здійснювали для відбору найбільш активних клонів (таблиця 8). Сірим кольором позначено 5 найбільш активних клонів.

Таблиця 8: Розподіл за рангом клонів, позитивних за результатами ELISA- і ТАУПІР-аналізу

Ранжування результатами ELISA-аналізу	за Ранжування результатами ТАУПІР-аналізу
3A8	6H1
2B6	4C1
4C1	3A8
6H1	4C12
4C12	2B6
2G1	2F9
2F9	3B9
7D6	2G1
3B9	7D6
4E12	4E12

ACI-41-гібридами

Клітинні супернатанти з 8×9-лункових планшетів, що утворились після злиття, піддавали скринінгу відносно виробництва IgG. Установлено, що з 768 протестованих лунок (8×96 лунок) 215 лунок виявились позитивними відносно експресії IgG та їх вміст переносили в 24-лункові планшети. В 24-лункових планшетах вирощували 81 клон і супернатант цих клітин аналізували. Потім позитивні клони переносили в T25-колби та супернатанти піддавали скринінгу відносно виробництва IgG, за допомогою ELISA- і ТАУПІР-аналізу (таблиця 9).

Таблиця 9:

Скринінг клонів з 24-лункових планшетів		Скринінг клонів з T25-колб		
Позитивні згідно ELISA	Позитивні згідно ТАУПІР	Позитивні згідно IgG- скринінгу	Позитивні згідно ELISA	Позитивні згідно ТАУПІР
	3D11	3D11		3D11
4H6		4H6		4H6
5D10	5D10	5D10	5D10	5D10
5E6	5E6			
5F10		5F10		
6B7		6B7	6B7	
7C2	7C2	7C2	7C2	7C2
	8G8			8G8
	8H8	8H8		8H8

Тільки клони 5D10 і 7C2 виявились позитивним за результатами всіх 3 скринінгів та їх відбирали для субклонування. Клон 5D10 зв'язувався тільки з пептидом T8.5, а клон 7C2 зв'язувався із двома пептидами з вакцини ACI-41 (T8.5 і T9.5) (фіг. 10).

Субклон 5D10A4, отриманий з 5D10, виявився специфічним для рТау- пептиду.

6.3. Висновок

Встановлено, що створені антитіла мали високу специфічність у відношенні рТау-пептидів, але відрізнялися лише невисокою здатністю до зв'язування з нефосфільованими пептидами.

На основі результатів, отриманих при здійсненні трьох злиттів (ACI-33, ACI-36 і ACI-41), у цілому 7 клонів депонували в DSMZ (таблиця 10) і відбирали для наступного субклонування.

Таблиця 10: Перелік депонованих гібридом

Антиген	Вакцина	Назва гібридоми	Реєстраційний номер	Дата депонування
T8: Tau206-221 [pT212/pS214] + T9: Tau196-211 [pS202/pT205]	ACI-41	ACI-41-Ab1	DSM ACC3043	3 березня 2010 р.
T4: Tau 401-418 [pS404, pS409]	ACI-36	2B6	DSM ACC3044	10 березня 2010 р.
T4: Tau 401-418 [pS404, pS409]	ACI-36	3A8	DSM ACC3045	10 березня 2010 р.
T4: Tau 401-418 [pS404, pS409]	ACI-36	4C1	DSM ACC3046	10 березня 2010 р.
T8: Tau206-221 [pT212/pS214] + T9: Tau196-211 [pS202/pT205]	ACI-41	5D10A3	DSM ACC3047	10 березня 2010 р.
T1: Tau 5-20 [pY18]	ACI-33	6C10	DSM ACC3048	10 березня 2010 р.
T4: Tau 401-418 [pS404, pS409]	ACI-36	6H1	DSM ACC3049	10 березня 2010 р.
T8: Tau206-221 [pT212/pS214] + T9: Tau196-211 [pS202/pT205]	ACI-41	7C2	DSM ACC3050	10 березня 2010 р.

5 Приклад 7: Специфічне фарбування зрізів головного мозку людини, що страждала AD двома антитілами (ACI-41-Ab1 і 5D10), отриманими з мишей, вакцинованих ACI-41

Метою даного дослідження було вивчення результатів фарбування нейрофібрилярних сплетень (NFT) у головному мозку людини, що страждала хворобою Альцгеймера (AD), за допомогою антитіла ACI-41-Ab1 (9H3-субклон Т89-F4) і 5D10, отриманих із двох різних злиттів спленоцитів мишей, імунізованих вакциною ACI-41. Для цієї мети застосовували аналіз імунореактивного фарбування фосфольованого тау-білка (TAUPIR) зрізів головного мозку людини, що страждала AD.

7.1. Методи

7.1.1 Створення антитіла 5D10

15 Антитіло 5D10 створювали згідно з методом, описаним у прикладі 9.

7.1.2 Створення антитіла ACI-41-Ab1

7.1.2.1 Злиття

20 Мишей дикого типу лінії C57BL/6, вакцинованих ACI-41 (вакцина ACI-41 містить суміш двох фосфольованих тау-пептидів, Tau206-221 [pT212/pS214] і Tau196-211 [pS202/pT205]), використовували для одержання гібридоми. Мишей ревакцинували пептидами, що входять в ACI-41, за 5 днів до злиття. 58×10^6 спленоцитів з імунізованої миші зливали із клітинами мієломи лінії SP2/0-O-Ag 14, використовуючи співвідношення 5 спленоцитів/1 клітину мієломи. У результаті злиття одержували 10×96 -лункових планшетів, які потім піддавали скринінгу для виявлення клонів, що представляють інтерес.

7.1.2.2 ELISA-скринінг гібридом

25 Скринінг гібридом за допомогою ELISA здійснювали, використовуючи планшети, сенсibilізовані T8: Tau206-221 [pT212/pS214], T9: Tau196-211 [pS202/pT205] або

гіперфосфольованим (hP)- тау-пептидом (hP-Tau) (див. опис у розділі, у якому представлений метод вестерн-блоттингу).

Планшети сенсibilізували 2 мкг/мл hP-Tau на протязі ночі при кімнатній температурі (КТ). Після відмивання кожної лунки 3ФР і блокади 2 % FCS у 3ФР супернатант гібридами вносили в планшети та інкубували на протязі 1 год. при КТ. Після стадії відмивання планшети інкубували з кон'югованим з пероксидазою повним козячим антимішачим AffiniPure Ig (виявлення IgG+IgM, фірма Дакко Глоструп, Данія) у 3ФР, 1 % FCS на протязі 1 год. при КТ. Планшети проявляли за допомогою ТМВ (3,3",5,5'-тетраметилбензидин). Реакцію припиняли, додаючи 2н. H₂SO₄ і зчитували при 450 нм, використовуючи планшет-рідер для ELISA. Результати виражали у вигляді оптичної густоти (ОГ) для кожного клону гібридами.

При застосуванні пептидів (негіперфосфольованих) планшети сенсibilізували 10 мкг/мл пептиду Tau206-221 [pT212/pS214] або Tau196-211 [pS202/pT205] на протязі ночі при 4 °С. Після відмивання 3ФР і блокади 2 % NHS у 3ФР супернатант гібридами вносили в планшети та інкубували на протязі 1 год. при кімнатній температурі (КТ). Після стадії відмивання планшети інкубували з біотинілованим антимішачим IgG (фірми Vector labs) у 3ФР, 1 % NHS на протязі 1 год. при КТ. Здійснювали додаткову стадію для кон'югованих з біотином антитіл і планшети інкубували на протязі 30 хв, використовуючи комплекс стрептавідин-HRP (ABC-набір, фірма Vector labs) перед виявленням. Після стадії відмивання планшети проявляли за допомогою ТМВ (3,3",5,5'-тетраметилбензидин). Реакцію припиняли, додаючи 2н. H₂SO₄ і зчитували при 450 нм, використовуючи планшет-рідер для ELISA. Результати виражали у вигляді оптичної густоти (ОГ) для кожного клону гібридами.

7.1.2.3 ІГХ-скринінг гібридом: зв'язування антитіл до тау-пептидів зі сплетіннями в зрізах головного мозку трансгенних мишей (TAUPIR-аналіз)

Зв'язування зі сплетіннями антитіл, що продукуються клітинами гібридами, здійснювали за допомогою імуногістохімічного аналізу (ІГХ) на зрізах головного мозку Тау-трансгенних мишей.

Вивчали зрізи головного мозку старих (віком >20 місяців) двічі трансгенних мишей лінії biGT (трансгенні миші лінії GSK-3, схрещені з мишами лінії TPLH (миші, що експресують найбільш довгу ізоформу людського тау-білка (441 ак) з мутацією P301L) і мишей з "виключеним" геном Тау (ТКО) у якості негативного контролю.

TAUPIR-фарбування здійснювали згідно із протоколом, описаним у прикладі 5.1.5.

7.1.2.4 Скринінг гібридом методом вестерн-блоттингу (ВБ)

Зв'язування антитіл, що продукуються клітинами гібридом, з рТау в екстрактах головного мозку трансгенних тварин та/або з екстрактом, що містять hP-Tau, здійснювали за допомогою ВБ.

Для гомогенізації головного мозку мишей дикого типу FVB, мишей ліній TPLH, biGT і з "виключеним" геном Тау (ТКО) використовували наступний буфер: 25 mM Tris/HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 1 mM ЕДТКА, 1 mM ЕГТК, 30 mM NaF, 0,2 mM Na₃VO₄, 1 nM оокадаєвої кислоти, 1 mM фенілметилсульфонілфторид (ФМСФ), 5 mM Na₄P₂O₇, 1 таблетка повного коктейлю інгібіторів протеаз (CPIC) на загальний обсяг 12 мл. Для одержання гомогенату всього головного мозку головний мозок гомогенізували на льоді в 1 об'ємі/масу півкулі (мл/г) за допомогою обладнання, що приводиться в дію мотором, типу гомогенізатора Поттера (скляна пробірка/тефлонова маточка) при 700 об/хв.

Для одержання екстракту, що містить hP-Tau, головний мозок мишей ліній TPLH і ТКО гомогенізували, використовуючи наступний буфер: 100 mM MES pH 6,8, 1mM β-омеркапт-етанол, 5 mM ЕДТК, 2,5 mM ФМСФ, 5 мкг/мл хлорметилкетону тозил-L-лізину (TLCK), 100 mM NaF, 1 nM оокадаєвої кислота, 0,2 mM Na₃VO₄ і 1 таблетка повного коктейлю інгібіторів протеаз (CPIC) на загальний обсяг 12 мл. Головний мозок гомогенізували на льоді в 6 об'ємах/масу півкулі (мл/г) за допомогою обладнання, що приводиться в дію мотором, типу гомогенізатора Поттера (скляна пробірка / тефлонова маточка) при 700 об/хв. Гомогенат центрифугували при 20000×g на протязі 30 хв при 4 °С і супернатант переносили та швидко нагрівали до 95 °С, витримували при цій температурі на протязі 10 хв, потім охолоджували на льоді, що тане. Здійснювали стадію центрифугування, потім супернатант розділяли на аліквоти і зберігали при -20 °С у вигляді фракції, позначеної "hP-Tau".

Гомогенат усього головного мозку розводили в співвідношенні 1:1 буфером для зразка (125 mM Tris/HCl, pH 6,8, 4 % (мас./об.) додецилсульфат натрію (ДСН), 20 % гліцерину, 0,01 % бромфенолового синього) + 5 % бета-меркапт-етанолу, потім швидко нагрівали до 95 °С. Зразки витримували 5 хв, розводили ¼ у буфері для зразка, знову нагрівали до 95 °С, потім охолоджували та центрифугували при 14000 об/хв на протязі 5 хв до одержання прозорого дебрису, який не солюбілізували. Супернатанти збирали та вносили на гель для здійснення ДСН-ПААГ. Перенос на нітроцеллюлозну мембрану (Hybond-ECL) здійснювали в буфері для

переносу (25 мМ Тріс рН 8,6, 190 мМ гліцину, 20 % метанолу). Мембрану переносили в блокувальний розчин (0,1 % Твін в ТБС (50 мМ Тріс/НСІ, рН 7,6, 150 мМ NaCl) + 5 % сухого молока) перед інкубацією на протязі ночі при 4 °С з нерозведеним супернатантом гібридами. Інкубацію із вторинним кон'югованим з HRP козячим антимишачим антитілом (фірма Dako, Глоструп, Данія), розведеним у співвідношенні 1/10000 у блокувальному розчині, здійснювали при КТ на протязі 1 г. Для виявлення використовували застосовувані для вестерн-блоттингу ECL-реагенти фірми GE Healthcare.

7.1.3 Зв'язування антитіл до фосфольованих тау-пептидів з тау-сплетіннями в головному мозку людини, що страждала AD

Клони антитіл до фосфольованого тау-пептиду ACI-41-Ab1 (субклон 9H3 T89-F4) (мишачий IgM-ізотип) і 5D10 (мишачий IgG-ізотип) створювали шляхом двох різних злиттів з використанням спленоцитів вакцинованих ACI-41 мишей. Вакцина ACI-41 містить суміш двох фосфольованих тау-пептидів, Tau206-221 [pT212/pS214] і Tau196-211 [pS202/pT205]. Аналіз зв'язування клону антитіла T89-F4 зі сплетіннями в зрізах головного мозку, отриманих з головного мозку людини, що страждала AD, проводили за допомогою ТАУPIR- імуногістохімії. Застосовували зрізи кори головного мозку індивідуумів, що страждали AD, прогресуючим супрануклеарним паралічем (PSP), і здорових людей як контроль. Зрізи головного мозку відмивали на протязі 5 хв у ЗФР, потім інкубували на протязі 15 хв при КТ в 1,5 % H₂O₂ у суміші ЗФР:MeOH (1:1) для блокади ендогенної пероксидази. Після трикратного відмивання зрізів у ЗФРТ (ЗФР/0,1 % Тритон X100) їх інкубували на протязі 30 хв при КТ у блокувальному розчині, що включає ЗФР+10 % FCS (фетальна теляча сироватка). Інкубацію з первинними антитілами (клон 9H3 T89-F4, 5D10 і AT100 у якості позитивного контролю) здійснювали на протязі ночі при 4 °С. Зрізи відмивали тричі в ЗФРТ перед інкубацією з кон'югованим HRP козячим антимишачим вторинним антитілом (фірма Dako, Глоструп, Данія)) у ЗФРТ/10 % FCS на протязі 1 год. при КТ. Перед виявленням зрізи відмивали тричі в ЗФРТ і інкубували в 50 мМ Тріс/НСІ рН 7,6 на протязі 5 хв. Виявлення здійснювали шляхом інкубації зрізів на протязі 3 хв у діамінобензидині (DAВ: 1 таблетка в 10 мл 50 мМ Тріс/НСІ+3 мкл 30 % H₂O₂) (фірма MP Biomedicals, Солон, шт. Огайо, США). Реакцію припиняли шляхом трикратного відмивання зрізів у ЗФРТ. Потім зрізи переносили на пластини із силанізованого скла та сушили на повітрі на теплій пластині при 50 °С на протязі 2 г. Контрастне фарбування здійснювали шляхом інкубації з гематоксиліном Майєра (фірма Fluka Chemie, Бухс, Швейцарія) на протязі 1 хв із наступною стадією відмивання на протязі 4 хв у проточній водопровідній воді. У зрізів видаляли парафін, поміщаючи їх двічі на 5 хв у ксилол і двічі на 1 хв в 100 % EtOH, потім відмивали щораз на протязі 1 хв в 90 %, 70 %, 50 % EtOH і дистильованій воді. Для виявлення антигену зрізи кип'ятили на протязі 10 хв в 0,01 М розчині лимонної кислоти (рН 6,0) і охолоджували на протязі 20 хв. Та, нарешті, зрізи поміщали в DePeX (фірма BDH Chemicals Ltd., Пул, Великобританія), закриваючи скляним покривним склом. Пофарбовані зрізи досліджували мікроскопічно з використанням оптики з епіфлуоресцентним освітленням і ЗСDD-камери (фірма Leica, Ветцлар, Німеччина). Одержували зображення та аналізували їх за допомогою виділеної програми (IM500, фірма Leica).

7.2. Результати

7.2.1 Скринінг гібридом

Скринінг за допомогою ELISA здійснювали згідно із процедурою, описаною в розділі "Методи", відбирали 172 клони гібридом і переносили в 12-лункові планшети. Потім здійснювали ELISA для оцінки специфічності антитіл до рТау-пептидів Tau206-221 [pT212/pS214], Tau196-211 [pS202/pT205] та/або містячим hP-Тау екстракту. Це дозволяло одержати 25 позитивних у відношенні рТау-пептидів клонів і 21 клон, що має специфічність у відношенні hP-Тау (фіг. 11).

Імуногістохімічні дослідження проводили паралельно з ELISA-аналізом. Виявлені різні схеми фарбування в клонах, перенесених в 12-лункові планшети. Неспецифічне гліальне, ядерне та цитоплазматичне фарбування виявлено в деяких зрізах головного мозку мишей лінії biGT, інкубованих з нерозведеним супернатантом відібраних клонів.

Супернатант клону 9H3 (ACI-41-Ab1) офарблював з високою специфічністю структури цитоплазматичних сплетень.

ВБ-скринінг відносно головного мозку та містячих hP-Тау екстрактів з різних ліній мишей здійснювали, використовуючи нерозведений супернатант відібраних гібридом. Не було виявлено ніякої реакції з тау-пептидами в жодному із протестованих супернатантів гібридом.

7.2.2 Фарбування нейрофібрилярних сплетень у зрізах головного мозку людини, що страждала хворобою Альцгеймера

Здатність клонів антитіл ACI-41-Ab1 (субклон 9H3 T89-F4) і 5D10 зв'язуватись з NFT у

головному мозку людини, що страждала AD, оцінювали за допомогою TAUIR-імуногістохімії. Було встановлено, що клон антитіла до фосфолізованого тау-пептиду T89-F4 зв'язувався з місткими фосфолізованню тау-пептидами NFT у головному мозку людини, що страждала AD (фіг. 12).

Здатність антитіла 5D10 зв'язуватись з NFT у зрізах кори головного мозку людини, що страждала AD, оцінювали за допомогою TAUIR-імуногістохімії. Було встановлено, що клон антитіла до фосфолізованого тау-пептиду 5D10 зв'язувався з місткими фосфолізованню тау-пептидами NFT і нитками нейрофілію в зрізах кори головного мозку людини, що страждала AD (фіг. 13.).

7.3. Висновки

Скринінг створених шляхом вакцинації ACI-41 клонів гібридом за допомогою ELISA дозволив виявити 36 клонів, які зв'язувались з фосфолізованими пептидами та/або екстрактами повнорозмірного hP-Tau. Скринінг за допомогою TAUIR цих 36 клонів підтвердив фарбування структур цитоплазматичних сплетіннь одним із клонів (9H3), а саме, ACI-41-Ab1.

Для двох антитіл ACI-41-Ab1 (9H3-F4) і 5D10 продемонстровано специфічне зв'язування з NFT і нитками нейрофілію в зрізах головного мозку людини, що страждала AD.

Приклад 8: Ефективність вакцини ACI-35, отриманої за допомогою двох різних процесів, відносно індукції рТау-специфічної IgG-відповіді після і.р.- або s.c.-імунізації мишей дикого типу (C57BL/6)

Метою даного дослідження була оцінка ефективності вакцини ACI-35 (Tau393-408 [pS396/pS404]), отриманої за допомогою двох різних процесів, процесу А для одержання ACI (процес А ACI) або процесу L3 для одержання ACI (процес L3 ACI), відносно індукції титрів антитіл після підшкірної (s.c.) або внутрішньовенної (i.p.) ін'єкції мишам дикого типу лінії C57BL/6. Мишей імунозували тричі з 2-тижневими інтервалами та відбирали зразки крові за 1 тиждень до першої ін'єкції та потім через 1 тиждень після кожної імунізації. Загальні анти-рТау (Tau393-408 [pS396/pS404]) IgG-відповіді оцінювали за допомогою ELISA. Крім того профіль ізотипів у гуморальній імунній відповіді аналізували після 3 імунізацій для оцінки розподілу різних підкласів IgG, а також IgM. Аналізували титри антитіл до відповідних не-рТау (Tau393-408)-пептидів. Т-клітинні відповіді, індуковані ACI-35, оцінювали за допомогою ELISPOT-методу.

8.1. Методи

8.1.1 Одержання вакцини ACI-35 за допомогою процесу А ACI

Вакцини ACI-35 одержували згідно із протоколом, описаним у прикладі 3. Потім ліпосомальну суспензію (партія ACI-35-081103-B) розділяли на аліквоти та зберігали при 2-8 °C. Кінцеве співвідношення пептид / фосфоліпід становило 1:100.

8.1.2 Одержання вакцини ACI-35 за допомогою процесу L3 ACI

Виведений з тау-білка тетрапальмітоїлований фосфо-пептид Tau393-408 [pS396/pS404] (людський тау-пептид 393-408 з фосфогрупою на S396 і S404) (4,0 мг) вносили в 25-мілілітровий скляний флакон у який додавали гексафторізопропанол (ГФІП) (5 мл). Це прозорий розчин потім додавали при перемішуванні до розчину диміристоїлфосфатидилхоліну (DMPC), диміристоїлфосфатидилгліцерину (DMPG), холестерину та ад'юванта, що представляє собою монофосфорильний ліпід А (MPLA) (усі препарати одержували від фірми Avanti Polar Lipids Inc. шт. Алабама, США) у хлороформі (35 мл) (молярне співвідношення 9:1:7:0,2 відповідно). розчин, що потім утворювався, фільтрували через гідрофобну фільтруючу мембрану з політетрафторетилену (PTFE) з розміром пор 0,2 мкм в 250-мілілітрову круглодонну скляну колбу. Потім органічний розчинник видаляли випарюванням при зниженому тиску при 40 °C, а потім у глибокому вакуумі на протязі 3 г. Тонку плівку, що утворилася, регідратували шляхом додавання ЗФР (40 мл) і обережно перемішували при КТ на протязі 18 г. Потім суспензію ліпосом (партія ACI-35-081103-A) розділяли на аліквоти і зберігали при 2-8 °C. Кінцеве співвідношення пептид/фосфоліпід становило 1:100.

8.1.3 Імунізації

13-тижневим мишам лінії C57BL/6 (по 10 мишей на групу) вводили шляхом s.c.- або і.р.-ін'єкцій вакцину тричі з 2-тижневими інтервалами між введення (дні (d) 0, d14, d28) згідно з таблицею 11. За 1 тиждень до (d-7) першої імунізації, потім через 7 після ін'єкцій (тобто в дні d7, d21, d35) і в момент умертвіння (d56) збирали зразки крові та одержували плазму. Титри Tau393-408 [pS396/pS404]-специфічних антитіл у вигляді IgG і IgM і профіль підкласів IgG-ізотипів визначали за допомогою ELISA. Використовували в якості контролю титри не-рТау393-408-специфічного антитіла у вигляді IgG визначали за допомогою ELISA.

Таблиця 11: Імунізація мишей

Група	Кількість і стать тварин	Обробка/обсяг ^а	Партія вакцини	Процес	Шлях введення ^б	Рівень дози, кількість пептиду мкг/дозу ^в	Кількість MPLA мкг/дозу ^в
1	10 самок	ACI-35 0,2 мл	ACI-35-081103-A	L3 ACI	i.p.	10	16
2	10 самок	ACI-35 0,2 мол	ACI-35-081103-A	L3 ACI	s.c.	10	16
3	10 самок	ACI-35 0,2 мол	ACI-35-081103-B	A ACI	i.p.	13	19
4	10 самок	ACI-35 0,2 мол	ACI-35-081103-B	A ACI	s.c.	13	19

^а: теоретичний об'єм^б: s.c.: підшкірно^в: кількість, виміряна після аналізу

8.1.4 Кількісна оцінка специфічних для тау-пептидів антитіл

- 5 Специфічні для Tau393-408 [pS396/pS404] антитіла у вигляді IgG визначали за допомогою ELISA в 5 зразках плазми, отриманих після відбору крові. Специфічні для Tau393-408 антитіла у вигляді IgG, специфічні для Tau393-408 [pS396/pS404] антитіла ізотипів IgM і IgG визначали за допомогою ELISA у зразках плазми, отриманих після відбору крові в d35. Планшети
- 10 сенсibiliзували 10 мкг/мл відповідного тау-пептиду на протязі ночі при 4 °C. Після відмивання кожної лунки 3ФР-0,05 % Твін 20 і блокади за допомогою 1 % БСА в 3ФР-0,05 % Твін 20 серійні розведення плазми вносили в планшети та інкубували при 37 °C на протязі 2 г. Після відмивання планшети інкубували з кон'югованим з лужною фосфатазою (AP) антимишачим антитілом у вигляді IgG (фірма Jackson Laboratories, Балтімор, шт. Пенсільванія, США) або ізотипспецифічними антитілами (кон'югований з пероксидазою із хрину (HRP) антимишачий IgM,
- 15 кон'югований з AP антимишачий IgG1, кон'югований з біотином антимишачі IgG2a і IgG3, які одержували від фірми Pharmingen BD, Сан-Дієго, шт. Каліфорнія, США, і кон'югований з HRP антимишачий IgG2b фірми Zymed Laboratories, Сан-Франциско, шт. Каліфорнія) на протязі 2 год. при 37 °C. Після відмивання планшети інкубували з pNPP (пара-нітрофенілфосфат), що представляє собою фосфатазний субстрат для AP, або ABTS (2,2'-азино-біс(3-етилбензтіазолін-6-сульфонова кислота)), що представляє собою субстрат для HRP, і
- 20 зчитували при 405 нм за допомогою планшет-рідера для ELISA. Додаткову стадію здійснювали для кон'югованих з біотином антитіл, при цьому планшети інкубували на протязі 45 хв із комплексом стрептавідин-HRP (фірма R&D Systems, Міннеаполіс, шт. Міннесота, США) перед виявленням за допомогою ABTS. Результати виражали у вигляді ОГ (оптична густина) для першого розведення та ненасичуючого розведення у випадку ізотипу IgG та ОГ для ненасичуючого розведення у випадку ізотипів IgG та IgM.

8.1.5 Кількісна оцінка специфічного для тау-пептидів виробництва цитокінів Т-клітинами за допомогою ELISPOT

- 30 Виробництво цитокінів Tau393-408 [pS396/pS404]- і Tau 408-специфічними Т-клітинами оцінювали за допомогою ELISPOT. Призначені для мультискринінга 96-лункові нітроцелюлозні планшети (фірма Millipore, Молшем, Франція) сенсibiliзували на протязі ночі моноклональними антитілами до мишачих IFN-γ і IL-4 згідно з інструкціями виробника (фірма Pharmingen BD, Сан-Дієго, шт. Каліфорнія, США). Суспензії окремих клітин одержували із селезінки імунізованих мишей і інкубували із серійними розведеннями Tau393-408 [pS396/pS404] і Tau393-408 (10 і 1 мкг/мл) і конкаваліном А (5 мкг/мл, фірма Amersham) при 37 °C в 5 % CO₂ на протязі 72 г. Потім планшети відмивали та інкубували на протязі 1 год. при 37 °C з біотинілованими моноклональними антитілами до мишачих IFN-γ і IL-4. Після відмивання планшети інкубували на протязі 1 год. при 37 °C з кон'югатом стрептавідин-HRP і після відмивання плями проявляли, додаючи субстрат (АЕС, 3-аміно-9-етилкарбазол). Кількість плям на лунку підраховували візуалізацією за допомогою стереомікроскопа та результат виражали у вигляді кількості плям на 10⁶ клітин. У якості негативних контролів використовували селезінку необроблених мишей.

8.1.6 Нерадіоактивний аналіз клітинної проліферації

Суспензії окремих клітин одержували із селезінки імунізованих мишей і інкубували із серійними розведеннями Tau393-408 [pS396/pS404] і Tau393-408 (10 і 1 мкг/мл) і конкаваліном А (5 мкг/мл, фірма Amersham) при 37 °С в 5 % CO₂ на протязі 72 г. Для кількісної оцінки проліферації використовували набір для нерадіоактивного аналізу проліферації клітин (МТТ) (фірма Promega, Дюбендорф, Швейцарія) згідно з інструкціями виробника. У цілому, метод полягав у наступному: 15 мкл розчину барвника додавали в кожну лунку та планшети інкубували на протязі 4 год. при 37 °С. Потім додавали з розрахунку 100 мкл розчинів для солюбілізації /припинення реакції та планшети інкубували при 4 °С ще на протязі мінімум 1 г. ОГ вимірювали при довжинах хвиль 570 нм і 690 нм.

8.2. Результати

8.2.1 Оцінка гуморальної імунної відповіді, індукованої різними вакцинами

Вакцина ACI-35 індукувала сильну анти-рTau393-408 [pS396/pS404] IgG-відповідь після і.р.- або с.с.-ін'єкції незалежно від використовованого процесу одержання вакцини. У цілому, високі титри антитіл були присутні вже через 7 днів першої імунізації вакциною. При використанні того самого процесу більш висока відповідь виявлена при застосуванні с.с.-ін'єкції в порівнянні з і.р.-ін'єкцією в d21 і d35 у тварин, вакцинованих отриманою згідно із процесом L3 ACI вакциною (фіг. 14, двунаправлений дисперсійний аналіз, $P < 0,001$ d21/d35) і в d21, d35 і d56 у тварин, яким вводили вакцину, отриману згідно із процесом А ACI (фіг. 14, двунаправлений дисперсійний аналіз, $P < 0,001$ d21/d35, $P < 0,01$ d56). Для тварин, яких вакцинували за допомогою і.р.-ін'єкцій, відповідь виявилася більш високою при використанні отриманої згідно із процесом L3 ACI вакцини, в порівнянні з отриманою згідно із процесом А ACI вакциною в узятих відразу після імунізації зразках крові (d7 і d21) (фіг. 14, двунаправлений дисперсійний аналіз, $P < 0,001$ d7/d21), у той час як не виявлено відмінностей для тварин, яких обробляли шляхом с.с.-ін'єкцій. У цілому, вакцини, отримані за допомогою розглянутих двох процесів, очевидно, є еквівалентними, якщо застосовують с.с.-ін'єкцію.

Аналіз результат ОГ при ненасичуючому розведенні підтвердив різницю і.р.- або с.с.-ін'єкцій при застосуванні отриманої за допомогою різних процесів вакцини ACI-35. У цілому, результати залишались такими ж, демонструючи, що с.с.-ін'єкція приводила до одержання більш високих титрів Ат, чим і.р.-ін'єкція, і що у випадку с.с.-ін'єкцій не виявлено істотні відмінності між двома процесами одержання вакцини.

Для визначення ізотипів індукованих вакциною антитіл, плазму, отриману в d35, аналізували за допомогою специфічного для ізотипу IgG ELISA. ACI-35 індукувала всі групи антитіл до рTau393-408 [pS396/pS404]- IgG, тобто ізотипи IgG1, IgG2a, IgG2b і IgG3. IgG2b був домінантним ізотипом, що характеризувався більш високими величинами ОГ навіть при розведенні 1/3200. Для підкласу IgG1 виявлена більш висока відповідь при с.с.-ін'єкції в порівнянні з і.р.-ін'єкцією при використанні вакцин, отриманих за допомогою обох процесів (фіг. 15, односпрямований дисперсійний аналіз, $P < 0,05$). Такі ж відмінності виявлені для підкласу IgG3. Для підкласів IgG2a і -2b не виявлено відмінностей ні між протестованими вакцинами, отриманими за допомогою двох процесів, ні при використанні і.р.- або с.с.-ін'єкції вакцини.

Не виявлено відмінності між двома вивченими процесами одержання вакцин відносно гуморальних імунних відповідей у вигляді анти-рTau393-408 [pS396/pS404]-IgM, хоча виявлені суттєво більш високі титри IgM при застосуванні і.р.-ін'єкції в порівнянні з с.с.-ін'єкцією (фіг.16а, односпрямований дисперсійний аналіз, $P < 0,001$).

У всіх групах аналізували також титри антитіл до нефосфольованого Tau393-408. Специфічні для Tau393-408 антитіла у вигляді IgG виявлені у всіх групах, але зазначені титри виявились нижчими, чим титри антитіл до рTau393-408 [pS396/pS404]. Не виявлено відмінностей в титрах антитіл до Tau393-408 у вигляді IgG при застосуванні отриманих двома процесами вакцин або залежно від шляху введення (фіг. 16б, односпрямований дисперсійний аналіз, $P > 0,05$).

Дані про середні значення перших трьох титрів IgG до різних тау-пептидів представлено в таблиці 12.

Таблиця 12: Середні значення перших трьох титрів антитіл до Tau393-408 [pS396/S404] у вигляді IgG (ОГ при розведенні 1/100)

Вакцина на основі рТау-пептиду	Процес одержання вакцини	Шлях введення	d7	d21	d35	Середнє значення
Tau393-408 [pS396/pS404]	L3 ACI	i.p.	1,899	2,284	1,825	2,003
		s.c.	1,485	2,956	2,444	2,295
	A ACI	i.p.	0,902	1,467	1,708	1,359
		s.c.	1,276	2,964	2,426	2,222

5 8.2.2 Оцінка Т-клітинної відповіді, індукованої ACI-35

Повторна стимуляція *in vitro* спленоцитів ConA, рTau393-408 [pS396/pS404]- або Tau 408-пептидами не приводила до відмінностей у проліферації між тестованими групами (фіг. 17), але вона виявилася позитивною у випадку ConA.

10 Повторна стимуляція з використанням Tau393-408 [pS396/S404] у дозі 10 мкг/мл індукувала секрецію цитокінів, яка виявилася вищою в спленоцитах з вакцинованих мишей у порівнянні з необробленими мишами (фіг. 18). Ін'єкція s.c. отриманої згідно із процесом L3 ACI вакцини індукувала більш високий рівень обох аналізованих цитокінів, при цьому була відсутня помітна відмінність між рівнями IFN- γ та IL-4. Ін'єкція i.p. або s.c. отриманої згідно із процесом A ACI вакцини, індукувала секрецію цитокінів, головним чином IL-4, і рівні виявились більш високими при використанні i.p.-ін'єкції. Повторна стимуляція Tau393-408 [pS396/S404] у дозі 1 мкг/мл індукувала секрецію цитокінів, порівнянну з повторною стимуляцією з використанням Tau393-408 [pS396/S404] у дозі 10 мкг/мл.

15 При повторній стимуляції з використанням не-Tau 408-пептиду отримані результати, порівнянні з отриманими при використанні відповідного рТау-пептиду (фіг. 18). І в цьому випадку вакцина, отримана згідно із процесом A ACI, індукувала секрецію цитокінів, серед яких переважав IL-4.

8.3. Висновок

25 Вакцина ACI-35 індукувала високі титри IgG уже після першої імунізації незалежно від процесу її одержання та шляху введення. При порівнянні виявилось, що s.c.-ін'єкція вакцин незалежно від застосовуваного процесу їх одержання приводила до виникнення більш високих титрів антитіл у вигляді IgG. I.p.-ін'єкція ACI-35, отриманої згідно із процесом A ACI, індукувала більш низькі титри IgG1 і IgG3 у порівнянні з іншою групою. I.p.-ін'єкція ACI-35 індукувала суттєво більш високі титри IgM, чим s.c.-ін'єкція. І, нарешті, у всіх групах виявлені титри IgG до не-рТау 408-пептиду.

30 Повторна стимуляція з використанням рТау- або тау-пептидів індукувала виробництво цитокінів за даними ELISPOT-аналізу, які головним чином представляли собою IL-4 в організмі мишей, вакцинованих вакциною, яку одержували згідно із процесом A ACI.

Приклад 9: Імуногенність містячої тау-пептид вакцини для Tau P301L-трансгенних мишей (TPLH)

35 Метою даного дослідження був аналіз імуногенності анти-тау-вакцинації з використанням підшкірної (s.c.) ін'єкції містячих тау-пептиди ліпосомальних вакцин (ACI-33, ACI-35, ACI-39 і ACI-40) для Tau P301 L-трансгенних мишей.

9.1. Методи

9.1.1 Тау P301 L-трансгенні миші (TPLH)

40 Гомозиготних за Тау P301L трансгенних мишей (TPLH) з генетичним фоном FVB/N застосовували для оцінки ефективності s.c.-вакцинації за допомогою ACI-33 або ACI-35. В організмі цих мишей відбувалася експресія найбільш довгої ізоформи людського тау-білка з мутацією P301L під контролем мишачого промотору *thy1*. Клінічні симптоми проявлялись в мишей у віці 6-7 місяців і в старих TPLH-мишей розвивалася смертельна таупатія із прогресуючим нейронним збудженням і утворенням нейрофібрилярних сплетінь (NFT). На кінцевій стадії вони втрачали вагу та раптово гинули (імовірно через проблеми, пов'язані з подихом (асфіксія), більшість у віці 9-11 місяців і все без винятку у віці до 12 місяців.

9.1.2 Одержання вакцин ACI-33 і ACI-35

Вакцини одержували згідно із процесом A, описаним в прикладі 3.

50 Потім ліпосомальну суспензію (партія ACI-33-081031-A і партія ACI-35-081015-A+ACI-35-090402-A) розділяли на аліквати і зберігали при 2-8 °C. Кінцеве молярне співвідношення

пептид/фосфоліпід становило 1:100.

9.1.3 Імунізації

ACI-33, ACI-39 і ACI-40

5 TPLH-мишам віком від 21 до 31 тижня (8-10 мишей на групу: суміш самок (♀) і самців (♂)) вводили шляхом s.c.-ін'єкцій вакцину п'ять раз (таблиця 13). Перші три імунізації здійснювали з 2-тижневими інтервалами між кожним введенням (дні (d) 0, d13, d28) згідно зі схемою 1. Потім тварин піддавали ревакцинації один раз на місяць на протязі двох місяців (у дні d91 і d133). За 1 день (d-1) до перших імунізацій, потім після другої (d27) і третьої (d41) імунізацій відбирали зразки крові. Відбір крові здійснювали також до, між і після ревакцинацій (у дні d76, d104, d135).
10 Для одержання сироватки давали утворюватись згустку в зразках крові на протязі ночі, потім одержували супернатант за допомогою центрифугування. Визначали титри специфічних для фосфольованих тау-пептидів антитіл у вигляді IgG і IgM і підкласів IgG-ізотипу за допомогою ELISA. Визначали також за допомогою ELISA титри антитіл у вигляді IgG, специфічних для не-рТау, повнорозмірного (441 ак) тау-білка та фосфольованого повнорозмірного (441 ак) тау-білка.

ACI-35

20 TPLH-мишам віком від 22 до 31 тижня (10 мишей на групу: суміш самок (♀) і самців (♂)) вводили шляхом s.c.-ін'єкцій вакцину п'ять раз (таблиця 13). Перші три імунізації здійснювали з 2-тижневими інтервалами між кожним введенням (дні (d) 0, d13, d27) згідно зі схемою 1. Потім тварин піддавали ревакцинації один раз на місяць на протязі двох місяців (у дні d91 і d133). За 1 день (d-1) до перших імунізацій, потім після другої (d26) і третьої (d40) імунізацій відбирали зразки крові. Відбір крові здійснювали також до, між і після ревакцинаціями (у дні d75, d103, d155). Для одержання сироватки давали утворюватись згустку в зразках крові на протязі ночі, потім одержували супернатант за допомогою центрифугування. Визначали титри специфічних для Тау393-408 [pS396/pS404]-пептиду антитіл у вигляді IgG і IgM і підкласів IgG-ізотипу за допомогою ELISA. Визначали також за допомогою ELISA титри антитіл у вигляді IgG, специфічних для не-Тау393-408р, повнорозмірного (441 ак) тау-білка та фосфольованого повнорозмірного (441 ак) тау-білка.

Таблиця 13: Імунізація мишей

30

Група	Кількість і стать тварин	Обробка/об'єм ^a	Партія вакцини	Шлях введення ^b	Рівень дози, кількість пептиду мкг/дозу ^b	Кількість MPLA мкг/дозу ^b
1	5 ♀ 5 ♂	ACI-33 0,2 мл	ACI-33-081031-A	s.c.	9	12
	5 ♀ 3 ♂	ЗФР 0,2 мл	N.A.	s.c.	N.A.	N.A.
2	5 ♀ 5 ♂	ACI-35 0,2 мл	ACI-35-081015-A ACI-35-090402-A	s.c.	16 8	23 27
	5 ♀ 5 ♂	ЗФР 0,2 мл	N.A.	s.c.	N.A.	N.A.
3	5 ♀ 5 ♂	ACI-39 0,2 мл	ACI-39-090202-A	s.c.	9,6	28,8
	5 ♀ 3 ♂	ЗФР 0,2 мл	N.A.	s.c.	N.A.	N.A.
4	5 ♀ 5 ♂	ACI-40 0,2 мл	ACI-40-090202-A	s.c.	12	24,4
	5 ♀ 3 ♂	ЗФР 0,2 мл	N.A.	s.c.	N.A.	N.A.

N.A. = неприйнятно

^a: теоретичний об'єм

^b: s.c.: підшкірно

^b: кількість, виміряна після аналізу

9.1.4 Кількісне визначення специфічних для тау-пептидів антитіл

У мишей, оброблених ACI-33, ACI-39 і ACI-40, визначали за допомогою ELISA антитіла у вигляді IgG, специфічні відповідно у відношенні Tau5-20 [pY18], Tau206-221 [pT212, pS214] і Tau196-211 [pS202, pT205], в 6 зразках сироватки, отриманих при відборі крові. Специфічні для Tau5-20, повнорозмірного (441ак) тау-білка та фосфольованого повнорозмірного (441 ак) IgG визначали в сироватці, отриманій в дні d-1 і d41. Специфічні для фосфольованих тау-пептидів антитіла ізотипів IgM і IgG визначали за допомогою ELISA у зразку сироватки, отриманому при відборі крові в d41.

У мишей, оброблених ACI-35, визначали за допомогою ELISA антитіла у вигляді IgG, специфічні відповідно у відношенні Tau393-408 [pS396/pS404], в 7 зразках сироватки, отриманих при відборі крові. Специфічні для Tau393-408, повнорозмірного (441 ак) тау-білка та фосфольованого повнорозмірного (441 ак) тау-білка IgG визначали в сироватці, отриманій в дні d-1 і d40. Специфічні для Tau393-408 [pS396/pS404] антитіла ізотипів IgM і IgG визначали за допомогою ELISA у зразку сироватки, отриманої при відборі крові в d40.

Планшети сенсibiliзували 10 мкг/мл відповідного тау-пептиду на протязі ночі при 4 °C. Після відмивання кожної лунки 3ФР-0,05 % Твін 20 і блокади за допомогою 1 % БСА в 3ФР-0,05 % Твін 20 у планшети вносили серійні розведення сироватки та інкубували при 37 °C на протязі 2 г. Після відмивання планшети інкубували з кон'югованим з лужною фосфатазою (AP) антимишачим повним антитілом у вигляді IgG (фірма Jackson Laboratories, Балтімор, шт. Пенсильванія, США) або з ізотипспецифічними антитілами (кон'югований з пероксидазою із хрину (HRP) антимишачий IgM, кон'югований з AP антимишачий IgG1, кон'юговані з біотином антимишачі IgG2a і IgG3, які одержували від фірми Pharmingen BD, Сан-Дієго, шт. Каліфорнія, США, і кон'югований з HRP антимишачий IgG2b фірми Zymed Laboratories, Сан-Франциско, шт. Каліфорнія) на протязі 2 год. при 37 °C. Після відмивання планшети інкубували з pNPP (пара-нітрофенілфосфат), що представляє собою фосфатазний субстрат для AP, або ABTS (2,2'-азино-біс(3-етилбензтіазолин-6-сульфонова кислота)), що представляє собою субстрат для HRP, і зчитували при 405 нм за допомогою планшет-рідера для ELISA. Додаткову стадію здійснювали для кон'югованих з біотином антитіл, при цьому планшети інкубували на протязі 45 хв із комплексом стрептавідин-HRP (фірма R&D Systems, Мінеаполіс, шт. Мінесота, США) перед виявленням за допомогою ABTS. Результат виражали у вигляді ОГ (оптична густина) для ненасичуючого розведення у випадку IgG, ізотипів IgG

9.1.5 Зв'язування антитіл до тау-пептидів з тау-сплетіннями на зрізах головного мозку трансгенної тварини (TAUIR-аналіз)

Зв'язування антитіл, що присутні у сироватці тварин, вакцинованих ACI-33, ACI-35, ACI-39 і ACI-40, зі сплетіннями на зрізах головного мозку здійснювали за допомогою TAUIR-імуногістохімії.

TAUIR-фарбування здійснювали згідно із протоколом, описаним у прикладі 5.1.5.

9.1.6 Вестерн-блоттінг (ВБ)

Вестерн-блоттінг здійснювали згідно із протоколом, описаним у прикладі 5.1.6, за винятком того, що відмивання здійснювали перед виявленням за допомогою розчину кон'югата Qdot 625 зі стрептавідином (фірма Invitrogen, шт. Каліфорнія) на протязі 30-60 хв при КТ.

9.2. Результати

9.2.1 Гуморальна імунна відповідь у вигляді IgG

При застосуванні всіх конструкцій вакцин виявлені титри специфічних антитіл у вигляді IgG. ACI-33 вакцина індукувала специфічну IgG-відповідь після s.c.-ін'єкції. Після двох імунізацій (d27) IgG-відповідь зберігалася стабільною, при цьому не виявлено її підвищення після третьої імунізації (d41) (фіг.19 односпрямований дисперсійний аналіз, $P < 0,001$ при порівнянні результатів, отриманих у день d-1, з результатами, отриманими в день d27, $P > 0,05$, при порівнянні результатів, отриманих у день d27, з результатами, отриманими в день d41). Зниження титру антитіл виявлено в d76 (фіг.19 односпрямований дисперсійний аналіз, $P < 0,001$ при порівнянні результатів, отриманих у день d41, з результатами, отриманими в день d76), і ревакцинація тварин знову приводила до невеликого підвищення титрів в d104.

Вакцина ACI-35 індукувала анти-Tau393-408 [pS396/pS404]-IgG-відповідь після s.c.-ін'єкції. Після двох імунізацій (d26) IgG-відповідь не підвищувалася після здійснення третьої імунізації (d40) (фіг. 20, односпрямований дисперсійний аналіз, $P < 0,001$ при порівнянні результатів, отриманих у день d-1, з результатами, отриманими в дні d26 and d40). Ревакцинація тварин знову приводила до підвищення титрів в d103 (фіг. 20, односпрямований дисперсійний аналіз, $P < 0,05$ при порівнянні результатів, отриманих у день d-1, з результатами, отриманими в день d104, і $P < 0,001$ при порівнянні результатів, отриманих у день d-1, з результатами, отриманими в день d145).

Вакцина ACI-39 індукувала анти- τ 206-221 [pT212, pS214]-IgG-відповідь після s.c.-ін'єкцій. Після двох імунізацій (d27) IgG-відповідь зберігалася стабільною, при цьому не виявлено її підвищення після третьої імунізації (d41) (фіг. 21, односпрямований дисперсійний аналіз, $P < 0,001$ при порівнянні результатів, отриманих у день d-1, з результатами, отриманими в дні d27/d41). Виявлено зниження титрів в d76 і ревакцинація тварин відновлювала титри до такого ж рівня після 3 імунізацій (фіг. 21, односпрямований дисперсійний аналіз, $P < 0,05$ при порівнянні результатів, отриманих у день d-1, з результатами, отриманими в день d76, і $P > 0,05$ при порівнянні результатів, отриманих у день d41, з результатами, отриманими в день d104).

Аналіз результатів, проведений при оцінці ОГ при ненасичуючому розведенні продемонстрував такі ж результати, що й одержані при насичуючому розведенні 1/100 (однонаправлений дисперсійний аналіз, $P < 0,05$ при порівнянні результатів, отриманих в день d-1, з результатами, отриманими в дні d27/d41/d104, і $P > 0,05$ при порівнянні результатів, отриманих в день d-1, з результатами, отриманими в d76).

Вакцина ACI-40 індукувала анти- τ 196-211 [pS202, pT205]-IgG-відповідь після s.c.-ін'єкції. Після двох імунізацій (d27) IgG-відповідь залишалася стабільною без підвищення після третьої імунізації (d41) (фіг. 22, односпрямований дисперсійний аналіз, $P < 0,001$ при порівнянні результатів, отриманих у день d-1, з результатами, отриманими в день d27, $P > 0,05$ при порівнянні результатів, отриманих у день d27, з результатами, отриманими в день d41). Виявлено зниження титрів антитіл в d76 (фіг. 22, односпрямований дисперсійний аналіз, $P < 0,001$ при порівнянні результатів, отриманих у день d41, з результатами, отриманими в день d76), і ревакцинація тварин знову приводила до підвищення титрів в d104.

Аналіз результатів, проведений при оцінці ОГ при ненасичуючому розведенні, продемонстрував такі ж результати, що й одержані при насичуючому розведенні 1/100 (однонаправлений дисперсійний аналіз, $P < 0,001$ при порівнянні результатів, отриманих в день d-1, з результатами, отриманими в день d27, $P > 0,05$ при порівнянні результатів, отриманих в день d27, з результатами, отриманими в день d41, та $P < 0,01$ при порівнянні результатів, отриманих у день d41, з результатами, отриманими в день d76).

9.2.2. Аналіз ізотипів

Вакцинація ACI-33 після трьох s.c.-імунізацій індукувала титр антитіл, головним чином представлених підкласами IgG2a і -2b (фіг. 23). Рівень IgG1, IgG3 і IgM був нижчим та виявлена значима відмінність між рівнями IgG2a/2b і IgG1/IgM (фіг. 23, односпрямований дисперсійний аналіз, $P < 0,05$ при порівнянні IgG1 з IgG2a/2b, $P < 0,001$ при порівнянні IgM з IgG2a/2b).

Вакцинація ACI-35 після трьох s.c.-імунізацій індукувала титр антитіл, головним чином представлених підкласами IgG2a і -2b (фіг. 24). Рівень IgG1 був нижчим та виявлена значима відмінність між рівнями IgG1 і IgG2a (фіг. 24, односпрямований дисперсійний аналіз, $P < 0,05$ при порівнянні IgG1 з IgG2a). Рівень IgG3 і IgM був нижчим та виявлена значима відмінність між рівнями IgG2a/2b і IgG3/IgM (фіг. 24, односпрямований дисперсійний аналіз, $P < 0,05$ при порівнянні IgG3/IgM з IgG2b, $P < 0,0001$ при порівнянні IgG3/IgM з IgG2a).

Вакцинація ACI-39 після трьох s.c.-імунізацій індукувала титр антитіл, головним чином представлених підкласами IgG2a і -2b (фіг. 25). Рівень IgG1, IgG3 і IgM був значно нижчим в порівнянні з титрами IgG2a/2b (фіг. 25, односпрямований дисперсійний аналіз, $P < 0,05$ при порівнянні IgG2b з IgG1/IgG3, $P < 0,01$ при порівнянні IgG2a з IgG1/IgG3, $P < 0,001$ при порівнянні IgG2a/2b з IgM).

Вакцинація ACI-40 після трьох s.c.-імунізацій індукувала титр антитіл, головним чином представлених підкласом IgG2b (фіг. 26, односпрямований дисперсійний аналіз, $P < 0,05$ при порівнянні IgG2b з IgG2a і $P < 0,001$ при порівнянні IgG2b з IgG1/IgG3/IgM). Титри IgG2a також виявились вище, чим титри IgM (фіг. 26, односпрямований дисперсійний аналіз, $P < 0,01$ при порівнянні IgG2a з IgM).

9.2.3 Специфічність антитіл

Титри IgG, індуковані трьома s.c.-ін'єкціями вакцин на основі τ -пептидів, аналізували також у відношенні різних τ -пептидів (p τ -пептид і τ -пептид) і білків (антитіло до фосфольованого повнорозмірного (441 ак) τ -білка (синонім антитіло до p τ -білка) і повнорозмірного (441 ак) τ -білка (синонім антитіло до τ -білка)).

У вакцинованих ACI-33 мишей зразок крові, отриманий в d-1, використовували в якості контролю для різних варіантів сенсibiliзації, виявлена відмінність між попередньо отриманим зразком крові та сироваткою, зібраною після трьох імунізацій у випадку сенсibiliзації τ 5-20 [pY18] і τ -білком (фіг. 27, односпрямований дисперсійний аналіз, $P < 0,001$ при порівнянні результатів, отриманих у день d-1, з результатами, отриманими в день d41 для τ 5-20 [pY18], $P < 0,05$ при порівнянні результатів, отриманих у день d-1, з результатами, отриманими в день d41 для τ -білка).

У вакцинованих ACI-35 мишей зразок крові, отриманий в d-1, використовували в якості контролю та виявлена значима відмінність між даними, отриманими в d-1 і d40, тільки відносно титрів антитіл до Tau393-408 [pS396/pS404] (фіг. 28, односпрямований дисперсійний аналіз, $P < 0,0001$ при порівнянні результатів, отриманих у день d-1, з результатами, отриманими в день d40 для титрів антитіла до Tau393-408 [pS396/pS404]). У d40 рівні антитіла, отримані при використанні Tau393-408 [pS396/pS404]-пептиду також значимо відрізнялись від рівнів, отриманих для всіх інших варіантів сенсibiliзації (фіг. 28, односпрямований дисперсійний аналіз, $P < 0,0001$ при порівнянні результатів, отриманих у день d40 для антитіла до Tau393-408 [pS396/pS404], з результатами, отриманими в день d40 для антитіла до Tau393-408/ рТау-білка/тау-білка).

У вакцинованих ACI-39 мишей зразок крові, отриманий в d-1, використовували в якості контролю, і тільки у випадку сенсibiliзації Tau206-221 [pT212, pS214] виявлена відмінність між попередньо отриманим зразком крові та сироваткою, зібраною після трьох імунізацій (фіг. 29; односпрямований дисперсійний аналіз, $P < 0,001$ d-1 відносно d41 для Tau206-221 [pT212, pS214]).

У вакцинованих ACI-40 мишей зразок крові, отриманий в d-1, використовували в якості контролю та була виявлена відмінність між результатами, отриманими для попередньо взятого зразка крові та зразком сироватки, узятим після здійснення 3 імунізацій, у випадку сенсibiliзації Tau196-211 [pS202, pT205] і Tau 196-211 (фіг. 30, односпрямований дисперсійний аналіз $P < 0,001$ при порівнянні результатів, отриманих у день d-1, з результатами, отриманими в день d41 для Tau196-211 [pS202, pT205], $P < 0,05$ при порівнянні результатів, отриманих у день d-1, з результатами, отриманими в день d41 для Tau196-211).

Мишачу сироватку використовували також для ТАУPIR-експериментів з метою рішення питання про те, чи можуть антитіла до тау-пептидів, що присутні в сироватці, розпізнавати сплетіння в зрізах головного мозку Тау-трансгенних тварин.

Здійснювали також ВБ-аналіз екстрактів головного мозку різних мишей, використовуючи мишачу сироватку або контрольне антитіло до Тау-5 для виявлення всіх форм тау-пептидів і білків (pTau і Тау).

Дані узагальнено в наведеній нижче таблиці 14.

Таблиця 14: Узагальнення даних ТАУPIR- і ВБ-експериментів на вакцинованих мишах лінії TPLH

Вакцина	ТАУPIR (кількість позитивних/загальна кількість мишей)	Вестерн-блоттінг (кількість позитивних/загальна кількість мишей)
ACI-33	6/10	3/9
ACI-35	4/10	0/4
ACI-39	7/10	1/5
ACI-40	10/10	3/7

9.3. Висновок

Титри антитіл до тау-пептидів аналізували на основі їх зв'язування з різними тау-пептидами та рТау-пептидами, а також повнорозмірними рТау-білками або тау-білками. Ліпосомальна імунізація з використанням містячих тау-пептиди вакцин приводила до утворення антитіл у вигляді IgG, які специфічно зв'язувались з рТау-пептидами та фосфольованим тау-білком і відрізнялись більш слабкою здатністю до зв'язування з нефосфольованими пептидами та білками.

Відносно IgG-ізотипів виявлена більш низька гуморальна імунна IgG1-відповідь у порівнянні з IgG2b- і IgG3-відповіддю. Виявлений низька IgM-відповідь, що залежить від шляху (s.c.) імунізації.

Специфічність антитіл, що утворились при імунізації мишей вакцинами на основі тау-пептидів, оцінювали за допомогою ТАУPIR-аналізу та встановлено, що практично для всіх зразків сироватки мишей характерний високий рівень зв'язування з тау-сплетіннями, що присутні в зрізах головного мозку несучих мутантний тау-білок тварин.

Приклад 10: Ефективність вакцинації ACI-33 або ACI-35, вивчена з використанням у якості моделі Тау P301L-трансгенних мишей

Метою даного дослідження був аналіз ефективності анти-тау-вакцинації з використанням підшкірної (s.c.) ін'єкції вакцин ACI-33 (Tau5-20 [pY18]) або ACI-35 (Tau393-408 [pS396/pS404]) на Тау P301L-трансгенних мишах. Мишей імунозували 5 раз і аналізували зміни поведінки за допомогою Rotarod-тесту (тест, що дозволяє оцінювати координацію рухів і фізичну

витривалість тварин) на протязі життя тварини.

10.1 Методи

10.1.1 Одержання вакцин

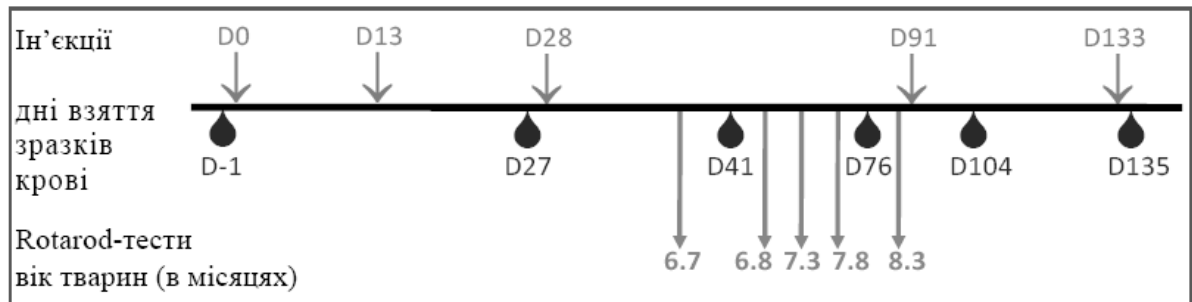
Вакцини ACI-33 і ACI-35 одержували згідно із протоколом, описаним у прикладі 3.

5

10.1.2.Імунізація

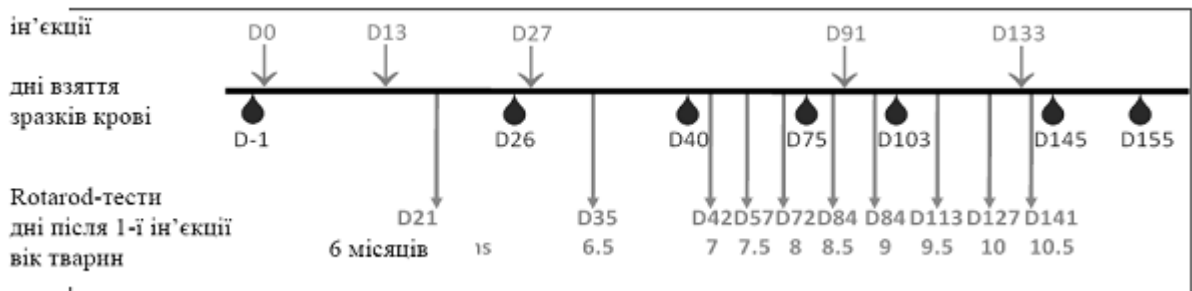
Тварин імунозували або ACI-33, або ACI-35 згідно із протоколом, описаним у прикладі 9 (схема 2 для ACI-33 і схема 3 для ACI-35)

Схема 2. Порядок імунізацій, відбору крові та здійснення Rotarod-тестів при імунізації ACI-33



10

Схема 3. Порядок імунізацій, відбору крові та здійснення Rotarod-тестів при імунізації ACI-35



15

10.1.3 Поведінка (Rotarod-тест)

Для спостереження за руховою активністю тварин здійснювали автоматичний Rotarod-тест. По п'ять мишей одночасно тестували на стрижні, що обертався (діаметр 3 см), розділеному непрозорими розділяючими перегородками. У процесі тесту швидкість обертання стрижня підвищувалась з 4 до 40 об/хв на протязі 5 хв. Для кожної миші визначали час знаходження на стрижні, що обертався, на протязі максимум 5 хв.

20

10.2 Результати

Для оцінки рухової активності TPLH-мишей після обробки ACI-33 або ЗФР піддавали Rotarod-тесту мишей, що мали п'яти різних віків (фіг. 31). Значима відмінність між тваринами, яким вводили ACI-33 і ЗФР, виявлена для тварин віком 7,3 місяця (фіг. 31, двунправлений дисперсійний аналіз $P < 0,001$ вік 7,3 місяця). Цей вплив ACI-33 на рухову поведінку мишей корелювало з титрами антитіл до Tau5-20 [pY18] у сироватці мишей віком 7,8 місяця (фіг. 32, г-критерій Спірмена $P < 0,001$).

25

Для оцінки моторної активності TPLH-мишей після обробки ACI-35 або ЗФР, мишей піддавали Rotarod-тесту (фіг. 33). Хоча не виявлено значимих відмінностей між обробленою та контрольною групою, для мишей віком 9,5 місяця можна виявити тенденцію до більш високої ефективності обробки ACI-35 мишей в Rotarod-тесті (фіг. 33, критерій Манна-Уїтні, $P = 0,1905$ вік 9,5 місяця).

30

10.3 Висновок

Вакцинація ACI-33 TPLH-мишей впливала на дефіцит рухової активності мишей щодо оброблених ЗФР тварин при оцінці за допомогою Rotarod-тесту. Ця позитивна дія корелювала з титрами антитіл до тау-пептидів у сироватці мишей.

35

Вакцинація ACI-35 TPLH-мишей приводила до певної тенденції відносно впливу на дефіцит рухової активності мишей віком 9,5 місяця відносно тварин, яких обробляли ЗФР, за даними Rotarod-тесту.

40

Приклад 11: Гуморальна імунна відповідь у вигляді антитіл до рТау в самок "голих" мишей

Метою даного дослідження була оцінка гуморальної імунної відповіді у вигляді антитіл до

pTau, індукованого ін'єкцією вакцини ACI-33 (Tau5-20 [pY18]) самкам "голих" мишей. "Голі" миші несуть мутацію $Foxn1^{nu}$, мають знижену Т-клітинну функцію через зниження відповідної функції вилочкової залози. Таким чином, метою даного дослідження є визначення того, чи є гуморальна імунна відповідь, індукована ACI-33, такою, що не залежить від Т-клітин.

"Голім" мишам з генетичним фоном C57BL/6- і відповідним мишам дикого типу такого ж поміту віком 11 або 13 тижнів, здійснювали підшкірну ін'єкцію (s.c.) вакцини. Мишей імунозували тричі з 2-тижневими інтервалами та відбирали зразки крові через 1 тиждень після кожної імунізації. Загальні IgG-відповіді у вигляді антитіл до pTau- (Tau5-20 [pY18])-пептиду оцінювали за допомогою ELISA. Крім того, аналізували профіль ізотипів гуморальної імунної відповіді після трьох імунізацій для оцінки розподілу підкласів IgG, а також IgM. Аналізували також титри антитіл до відповідного не-pTau- (Tau5-20)-пептиду, повнорозмірного (441 ак) тау-білка та фосфольованого повнорозмірного (441 ак) тау-білка.

Для підтвердження відсутності Т-клітин-хелперів в "голих" мишах оцінювали відсоток $D3^+/CD4^+$ -клітин за допомогою лазерного аналізатора клітин за інтенсивністю флуоресценції (FACS).

11.1 Методи

11.1.1. Одержання вакцини ACI-33

Вакцини ACI-33 одержували згідно з методом, описаним у прикладі 3.

Потім ліпосомальну суспензію (партія ACI-33-090818-A) розділяли на аліквоти і зберігали при 2-8 °C. Кінцеве молярне співвідношення пептид/фосфоліпід становило 1:100. Вакцини відправляли на фірму JSW Life Sciences GmbH (Австрія).

11.1.2 Імунізації

На фірмі JSW Life Sciences GmbH "голим" мишам (B6.Cg-Foxn1nu/J) з генетичним фоном C57BL/6 і відповідним мишам дикого типу такого ж поміту (6 ♀ мишей/групу) вводили шляхом s.c.-ін'єкцій ACI-33 тричі з 2-тижневими інтервалами між кожним введенням (день 0, 14, 28) згідно зі схемою, представленою в таблиці 15. Збирали зразки плазми з лицьової вени/артерії за 7 днів до та через 2, 4, 7, 21, 35 і 56 днів після першої ін'єкції. Титри Tau5-20 [pY18]-специфічних антитіл у вигляді IgG і IgM і профілі IgG-ізотипу визначали за допомогою ELISA. Також за допомогою ELISA визначали титри антитіл у вигляді IgG до не-pTau5-20, повнорозмірного (441 ак) тау-білка та фосфольованого повнорозмірного (441 ак) тау-білка. Зразки крові збирали також в d-7 для FACS-аналізу для визначення відсотка $CD3^+/CD4^+$ -клітин.

11.1.3 Кількісна оцінка специфічних для тау-пептидів антитіл

Специфічні антитіла у вигляді IgG до Tau5-20 [pY18] оцінювали кількісно за допомогою ELISA в 5 зразках сироватки, отриманої при відборі крові (d2, d7, d21, d35 і d56). Антитіла у вигляді IgG до Tau5-20, повнорозмірного (441 ак) тау-білка та фосфольованого повнорозмірного (441 ак) тау-білка визначали в сироватці, отриманій в d35. Специфічні для Tau5-20 [pY18] антитіла ізотипів IgM і IgG визначали за допомогою ELISA у сироватці зі зразків крові, отриманих в d35. Планшети сенсibiliзували відповідним тау-пептидом, узятим у концентрації 10 мкг/мл, та відповідним тау-білком, узятим у концентрації 1 мкг/мл, на протязі ночі при 4 °C. Після відмивання кожної лунки 3ФР-0,05 % Твін 20 і блокади за допомогою 1 % БСА в 3ФР-0,05 % Твін 20 у планшети вносили серійні розведення сироватки та інкубували при 37 °C на протязі 2 г. Після відмивання планшети інкубували з кон'югованим з лужною фосфатазою (AP) антимишачим повним антитілом у вигляді IgG (фірма Jackson Laboratories, Балтімор, шт. Пенсільванія, США) або з ізотипспецифічними антитілами (кон'югований з пероксидазою із хрину (HRP) антимишачий IgM, кон'югований з AP антимишачий IgG1, кон'югований з біотином антимишачі IgG2a і IgG3, які одержували від фірми Pharmingen BD, Сан-Дієго, шт. Каліфорнія, США, і кон'югований з HRP антимишачий IgG2b фірми Zymed Laboratories, Сан-Франциско, шт. Каліфорнія) на протязі 2 год. при 37 °C. Після відмивання планшети інкубували з pNPP (пара-нітрофенілфосфат), що представляє собою фосфатазний субстрат для AP, або ABTS (2,2'-азино-біс(3-етилбензтіазолин-6-сульфонова кислота)), що представляє собою субстрат для HRP, і зчитували при 405 нм за допомогою планшет-рідера для ELISA. Додаткову стадію здійснювали для кон'югованих з біотином антитіл, при цьому планшети інкубували на протязі 45 хв із комплексом стрептавідин-HRP (фірма R&D Systems, Міннеаполіс, шт. Міннесота, США) перед виявленням за допомогою ABTS. Результати виражали у вигляді величин ОГ (оптична густина) для ненасичуючого розведення у випадку IgG, ізотипів IgG та IgM.

11.1.4 Кількісна оцінка $CD3^+/CD4^+$ -клітин

Зразки крові мишей лізували за допомогою хлориду амонію до посвітління, потім центрифугували при 400×g на протязі 7 хв і дебрис ресуспендували в 3ФР, що містить ЕДТК. Потім клітини блокували за допомогою CD16/CD32-блокувального реагенту та офарблювали за

допомогою антитіл до CD4 (PE-кон'югат) і CD3 (PE-Cy5) на протязі 30 хв при 4 °С. Зразки відмивали 3ФР, ресуспендували в розчині фіксатора (DB Cellfix, розведений у співвідношенні 1:40 в BD FACS Flow) і оцінювали за допомогою цитометра BD FACS. Розраховували відсоток клітин у дискримінаційному вікні, позитивно офарбованих у відношенні CD3⁺ і CD4⁺ (Т-клітини-хелпери).

5

Таблиця 15: Імунізація мишей

Група	Кількість і стать тварин	Обробка/об'єм ^а	Партія вакцини	Процес отримання вакцини	Шлях введення ^б	Рівень дози, кількість пептиду мкг/дозу ^в	Кількість MPLA мкг/дозу ^в
1	6 ♀ "голих" мишей	ACI-33 0,2 мл	ACI-33- 090818-	ACI-A	s.c.	12,6	15,8
2	6 ♀ WT-мишей	ACI-33 0,2 мл	ACI-33- 090818-A	ACI-A	s.c.	12,6	15,8

^а: теоретичний об'єм

^б: s.c.: підшкірно

^в: кількість, виміряна після аналізу

11.2 Результати

11.2.1 Загальні відомості

10 Жодна із тварин не загинула, не досягши стану зрілості, і не виявлено ніяких побічних дій у процесі здійснення обробок. У всіх тваринних лінії B6.Cg-Foxn1nu/J був присутній типовий "nude"-фенотип, у той час миші дикого типу (wt) такого ж поміту мали нормальну вовну.

11.2.2 Кількісна оцінка CD3⁺/CD4⁺-клітин

15 CD3⁺/CD4⁺-фарбування з наступним FACS-аналізом продемонстрували істотне зниження кількості Т-клітин-хелперів (CD3⁺/CD4⁺-клітини) в "голих" мишей у порівнянні з wt-тваринами (фіг. 34).

11.2.3 Аналіз імунної відповіді

20 Титри антитіла до Tau5-20 [pY18] у вигляді IgG, що утворились при вакцинації ACI-33, аналізували з метою вивчення імуногенності вакцини у відношенні WT-мишей і "голих" мишей. Титр антитіл до Tau5-20 [pY18] у вигляді IgG у "голих" мишей аналізували з метою вирішення питання про те, чи є відповідь, індукована ACI-33, такою, що не залежить від функції Т-клітин. Вакцина індукувала IgG-відповідь на Tau5-20 [pY18] у "голих" мишей те не було виявлено значимої різниці між індукованою ACI-33 гуморальною імунною відповіддю у wt- або "голих" мишей у всі вивчені моменти часу (фіг 35; двонаправлений дисперсійний аналіз, P<0,05 при порівнянні всіх зразків крові, узятих в "голих" мишей, зі зразками, узятими в WT-мишей).

25 Вакцина ACI-33 індукувала в обох лініях мишей IgG-відповідь на Tau5-20 [pY18] після s.c.-ін'єкції, пік якого досягався після двох імунізацій (d27) (фіг. 35).

30 Вакцина ACI-33 індукувала титри антитіл однакового профілю для різних підкласів IgG і IgM в "голих" і WT-мишей, оскільки не виявлено значимих відмінностей між двома лініями мишей після трьох s.c.-імунізацій вакциною (фіг. 36, односпрямований дисперсійний аналіз, P>0,05 при порівнянні IgG1 в "голих" мишей з IgG1 в WT-мишей, IgG2a/2b в "голих" мишей з IgG2a/2b в WT-мишей, IgG3 в "голих" мишей з IgG3 в WT-мишей, IgM в "голих" мишей з IgM в WT-мишей). В обох лініях мишей виявлений суттєво більш низький рівень IgG1 у порівнянні з IgG2b і IgM (фіг. 36, односпрямований дисперсійний аналіз, "голі" миші: P<0,01 при порівнянні IgG1 з IgG2b або IgM; WT-миші: P<0,05 при порівнянні IgG1 з IgG2b або IgM). Крім того, в "голих" мишей виявлений суттєво більш низький рівень IgG1 у порівнянні з IgG3 (фіг. 36, односпрямований дисперсійний аналіз, "голі" миші: P<0,05 при порівнянні IgG1 з IgG3), і рівень IgG2a також виявився більш низьким у порівнянні з IgG2b, IgG3 і IgM (фіг. 36, односпрямований дисперсійний аналіз, "голі" миші: P<0,05 при порівнянні IgG2a з IgG2b, IgG3 або IgM).

40 Титри IgG, індуковані після третьої s.c.-ін'єкції ACI-33, аналізували також з використанням різних тау-пептидів (антитіла до Tau5-20 [pY18] і до Tau5-20) і білків (антитіла до фосфольованого повнорозмірного (441 ак) тау-білка (синонім антитіла до рТау-білка) і антитіла

до повнорозмірного (441 ак) тау-білка (синонім антитіла до тау-білка) (фіг. 37). Не виявлено відмінності в титрах антитіл до різних пептидів і білків між wt- і "голими" мишами. У групі "голих" мишей виявлена значима відмінність між титрами антитіл до Тау5-20 [pY18], які виявились вище, чим титри до Тау5-20 (фіг. 37, односпрямований дисперсійний аналіз, $P < 0,05$ при порівнянні титрів антитіл до Тау5-20 [pY18] з титрами антитіл до Тау5-20).

11.3 Висновок

Не зважаючи на невисокий відсоток $CD3^+$ і $CD4^+$ -клітин в "голих" мишах, вакцина ACI-33 індукувала сильну IgG-відповідь на Тау5-20 [pY18]. Стійкість гуморальної імунної відповіді та розподіл IgG-ізотипів виявились однаковими в wt-мишей і "голих" мишей, що дозволяє припустити незалежність зазначених параметрів від Т-клітин при вакцинації ACI-33. У порівнянні з імунокомпетентними мишами імунізація ACI-33 індукувала ідентичний титр антитіл і кінетику з подібним профілем IgG у мишей з дефіцитом Т-клітин. Крім того, титри антитіл до різних тау-пептидів і білків виявились подібними для імунокомпетентних мишей і мишей з дефіцитом Т-клітин. Ці дані свідчать про те, що ACI-33 індукувала незалежну від Т-клітин гуморальну імунну відповідь як в "голих", так і в wt-мишей.

Посилання

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

Депозити

Відповідно до Будапештського договору наступні клітинні лінії гібридом депоновані на ім'я фірми AC IMMUNE S.A. у Німецькій колекції мікроорганізмів і клітинних культур ГмБХ (DSMZ), Брауншвейг, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig:

Назва гібридоми	Реєстраційний номер	Дата депонування
ACI-41-Ab1	DSM ACC3043	3 березня, 2010 р.
2B6	DSM ACC3044	10 березня, 2010 р.
3A8	DSM ACC3045	10 березня, 2010 р.
4C1	DSM ACC3046	10 березня, 2010 р.
5D10A3	DSM ACC3047	10 березня, 2010 р.
6C10	DSM ACC3048	10 березня, 2010 р.
6H1	DSM ACC3049	10 березня, 2010 р.
7C2	DSM ACC3050	10 березня, 2010 р.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> АЦ Иммуно С.А.
К.У.Льовен Рісърч & Дивелопмент

<120> Фармацевтична композиція

<130> P2654 PCT BS

<150> 09157303.0

<151> 2009-04-03

<160> 9

<170> PatentIn, версія 3.4

<210> 1

<211> 30

<212> PRT

<213> ACI-37

<220>

<221> варіація

<222> (18)..(18)

<223> /заміна= «фосфольований серин»

<220>

<221> варіація

<222> (26)..(26)

<223> /заміна= «фосфольований серин»

<400> 1

Arg	Glu	Asn	Ala	Lys	Ala	Lys	Thr	Asp	His	Gly	Ala	Glu	Ile	Val	Tyr
1				5				10						15	

Lys	Ser	Pro	Val	Val	Ser	Gly	Asp	Thr	Ser	Pro	Arg	His	Leu
			20				25					30	

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> ACI-33

<220>

<221> варіація

<222> (14)..(14)

<223> /заміна= «фосфольований тирозин»

<400> 2

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

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> ACI-39

<220>

<221> варіація

```

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

```

```

<222> (4)..(4)
<223> /заміна= «фосфольований серин»

<220>
<221> варіація
<222> (9)..(9)
<223> /заміна= «фосфольований серин»

<400> 6

Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn val Ser Ser Thr Gly Ser
1          5          10          15

Ile Asp

<210> 7
<211> 17
<212> PRT
<213> ACI-34

<220>
<221> варіація
<222> (3)..(3)
<223> /заміна= «фосфольований серин»

<220>
<221> варіація
<222> (6)..(6)
<223> /заміна= «фосфольований треонін»

<220>
<221> варіація
<222> (13)..(13)
<223> /заміна= «фосфольований треонін»

<220>
<221> варіація
<222> (15)..(15)
<223> /заміна= «фосфольований серин»

<400> 7

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

Pro

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

<220>
<221> варіація
<222> (3)..(3)
<223> /заміна= «фосфольований серин»

<400> 8

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

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

<220>
<221> варіація
<222> (6)..(6)
<223> /заміна= «фосфольований серин»
<400> 9

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

```

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Ліпосомальна конструкція, яка містить модифікований антигенний пептид або його модифікований функціональний фрагмент, що являє собою фосфопептид тау-білка або його фрагмент, і модифікована шляхом зв'язування з жирною кислотою, вуглецевий каркас якої складається з щонайменше 10 атомів вуглецю, що полегшує вбудовування в ліпідний бішар ліпосоми, і реконструйована у ліпосомі таким чином, що пептид презентується на поверхні ліпосоми, де зазначена жирна кислота ковалентно зв'язана з кожним з кінців пептиду або пептидного фрагменту за допомогою щонайменше однієї, переважно однієї або двох амінокислот, таких, наприклад, як лізин, глутамінова кислота та цистеїн, і де пептид або фрагмент має амінокислотну послідовність, яка являє собою:
 - а) SEQ ID NO: 2 або амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 2, яка модифікована за допомогою консервативної заміни, делеції або інсерції щонайменше однієї, але не більш ніж 5 амінокислот, і при цьому усе ще зберігає такий же або практично такий же антигенний потенціал, що і немодифікована послідовність;
 - б) SEQ ID NO: 3 або амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 3, яка модифікована за допомогою консервативної заміни, делеції або інсерції щонайменше однієї, але не більш ніж 5 амінокислот, і при цьому усе ще зберігає такий же або практично такий же антигенний потенціал, що і немодифікована послідовність;
 - в) SEQ ID NO: 4 або амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 4, яка модифікована за допомогою консервативної заміни, делеції або інсерції щонайменше однієї, але не більш ніж 5 амінокислот, і при цьому усе ще зберігає такий же або практично такий же антигенний потенціал, що і немодифікована послідовність;
 - г) SEQ ID NO: 5 або амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 5, яка модифікована за допомогою консервативної заміни, делеції або інсерції щонайменше однієї, але не більш ніж 5 амінокислот, і при цьому усе ще зберігає такий же або практично такий же антигенний потенціал, що і немодифікована послідовність;
 - д) SEQ ID NO: 6 або амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 6, яка модифікована за допомогою консервативної заміни, делеції або інсерції щонайменше однієї, але не більш ніж 5 амінокислот, і при цьому усе ще зберігає такий же або практично такий же антигенний потенціал, що і немодифікована послідовність;
 - е) SEQ ID NO: 7 або амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 7, яка модифікована за допомогою консервативної заміни, делеції або інсерції щонайменше однієї, але не більш ніж 5 амінокислот, і при цьому усе ще зберігає такий же або практично такий же антигенний потенціал, що і немодифікована послідовність;
 - ж) SEQ ID NO: 8 або амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 8, яка модифікована за допомогою консервативної заміни, делеції або інсерції щонайменше однієї, але не більш ніж 5 амінокислот, і при цьому усе ще зберігає такий же або практично такий же антигенний потенціал, що і немодифікована послідовність; або
 - з) SEQ ID NO: 9 або амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 9, яка модифікована за допомогою консервативної заміни, делеції або інсерції щонайменше однієї, але не більш ніж 5 амінокислот, і при цьому усе ще зберігає такий же або практично такий же антигенний потенціал, що і немодифікована послідовність.
2. Ліпосомальна конструкція за п. 1, яка являє собою тау-білок людини, розташований між
 - а) положеннями 5 і 20, і в якому тирозин у положенні 18 є фосфорилованим;
 - б) положеннями 196-221, і в якому щонайменше одна, переважно щонайменше дві, переважно щонайменше три, але найбільш переважно всі чотири амінокислоти в положеннях 202, 205, 212, 214 є фосфорилованими;
 - в) положеннями 393 і 408, і в якому щонайменше одна з амінокислот, але найбільш переважно всі амінокислоти в положеннях 396 і 404 є фосфорилованими;
 - г) положеннями 401 і 418, і в якому щонайменше одна з амінокислот, але найбільш переважно всі амінокислоти в положеннях 404 і 409 є фосфорилованими;
 - д) положеннями 200 і 216, і в якому щонайменше одна з амінокислот, але найбільш переважно всі амінокислоти в положеннях 202 і 205 та/або в положеннях 212 і 214 є фосфорилованими;
 - е) положеннями 407 і 418, і в якому серин в положенні 409 є фосфорилованим; або
 - ж) положеннями 399 і 408, і в якому серин у положенні 404 є фосфорилованим.
3. Ліпосомальна конструкція за п. 1, де тау-білок має амінокислотну послідовність, ідентичну до:
 - а) SEQ ID NO: 2 щонайменше на 95 %, і має практично таку ж імуногенну активність, що й антигенний пептид, послідовність якого представлена в SEQ ID NO: 2, де амінокислотний

залишок, що відповідає амінокислотному залишку 18 (P-Tyr₁₈) SEQ ID NO: 2, є фосфорилованим (T1);

б) SEQ ID NO: 3 щонайменше на 95 %, і має практично таку ж імуногенну активність, що й антигенний пептид, послідовність якого представлена в SEQ ID NO: 3, де щонайменше один, переважно щонайменше два амінокислотні залишки, що відповідають амінокислотним залишкам 212 (P-Thr₂₁₂) і 214 (P-Ser₂₁₄) SEQ ID NO: 3, є фосфорилованими;

в) SEQ ID NO: 4 щонайменше на 95 %, і має практично таку ж імуногенну активність, що й антигенний пептид, послідовність якого представлена в SEQ ID NO: 4, де щонайменше один, переважно щонайменше два амінокислотні залишки, що відповідають амінокислотним залишкам 202 (P-Ser₂₀₂) і 205 (P-Thr₂₀₅) SEQ ID NO: 4, є фосфорилованими;

г) SEQ ID NO: 5 щонайменше на 95 %, і має практично таку ж імуногенну активність, що й антигенний пептид, послідовність якого представлена в SEQ ID NO: 5, де щонайменше один, але переважно всі амінокислотні залишки, що відповідають амінокислотним залишкам 396 (P-Ser₃₉₆) і 404 (P-Ser₄₀₄) SEQ ID NO: 5, є фосфорилованими;

д) SEQ ID NO: 6 щонайменше на 95 %, і має практично таку ж імуногенну активність, що й антигенний пептид, послідовність якого представлена в SEQ ID NO: 6, де щонайменше один, але переважно всі амінокислотні залишки, що відповідають амінокислотним залишкам 404 (P-Ser₄₀₄) і 409 (P-Ser₄₀₉) SEQ ID NO: 6, є фосфорилованими;

е) SEQ ID NO: 7 щонайменше на 95 %, і має практично таку ж імуногенну активність, що й антигенний пептид, послідовність якого представлена в SEQ ID NO: 7, де щонайменше один, переважно щонайменше два, переважно щонайменше три, але найбільш переважно всі амінокислотні залишки, що відповідають 202 (P-Ser₂₀₂), 205 (P-Thr₂₀₅), 212 (P-Thr₂₁₂) і 214 (P-Ser₂₁₄) SEQ ID NO: 7, є фосфорилованими;

ж) SEQ ID NO: 8 щонайменше на 95 %, і має практично таку ж імуногенну активність, що й антигенний пептид, послідовність якого представлена в SEQ ID NO: 8, де амінокислотний залишок, що відповідає амінокислотному залишку 409 (P-Ser₄₀₉) SEQ ID NO: 8, є фосфорилованим; або

з) SEQ ID NO: 9 щонайменше на 95 %, і має практично таку ж імуногенну активність, що й антигенний пептид, послідовність якого представлена в SEQ ID NO: 9, де амінокислотний залишок, що відповідає амінокислотному залишку 404 (P-Ser₄₀₄) SEQ ID NO: 9, є фосфорилованим.

4. Ліпосомальна конструкція за п. 1, де тау-білок має амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8 або SEQ ID NO: 9.

5. Ліпосомальна конструкція за будь-яким з пп. 1-4, де пептид або функціональний фрагмент складається з 5-25 амінокислотних залишків.

6. Ліпосомальна конструкція за будь-яким з пп. 1-4, де пептид містить основний патологічний фосфо-епітоп тау-білка.

7. Ліпосомальна конструкція за будь-яким з пп. 1-4, де пептид не містить Т-клітинний епітоп.

8. Ліпосомальна конструкція за будь-яким з пп. 1-4, де пептид презентується на поверхні ліпосоми у вигляді масиву з великою кількістю повторів.

9. Ліпосомальна конструкція за будь-яким з пп. 1-4, де пептид при введенні тварині або людині у формі фармацевтичної композиції має здатність викликати специфічну для конформації та не залежну від Т-клітин імунну відповідь.

10. Ліпосомальна конструкція за будь-яким з пп. 1-4, де гідрофобний фрагмент являє собою пальмітинову кислоту.

11. Ліпосомальна конструкція за будь-яким з пп. 1-4, де пептид додатково модифікований за допомогою зв'язування з гідрофільним фрагментом.

12. Ліпосомальна конструкція за п. 11, де гідрофільний фрагмент являє собою поліетиленгліколь.

13. Ліпосомальна конструкція за будь-яким з пп. 1-4, де тау-білок являє собою людський білок.

14. Ліпосомальна конструкція за будь-яким із попередніх пунктів або їх комбінація, призначена для застосування при лікуванні нейродегенеративних порушень, таких як таупатії.

15. Ліпосомальна конструкція за п. 14, призначена для застосування при лікуванні хвороби Альцгеймера.

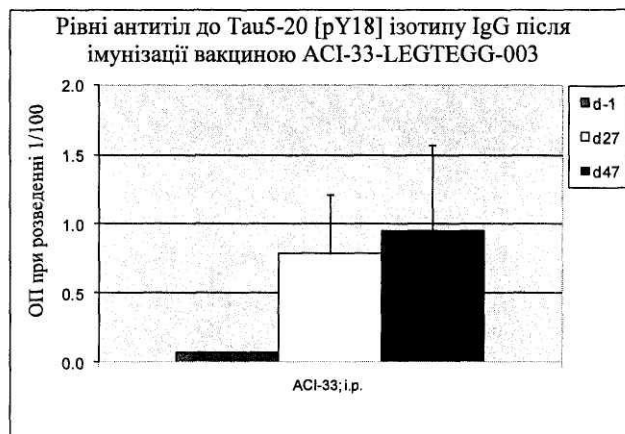
16. Фармацевтична композиція, що містить ліпосомальну конструкцію за будь-яким з пунктів 1-13 у комбінації з фармацевтично прийнятним носієм.

17. Фармацевтична композиція за п. 16, яка містить ліпосомальну конструкцію за будь-яким з пунктів 1-13 і додатково містить фармацевтично прийнятний ад'ювант та/або імуномодулятор.

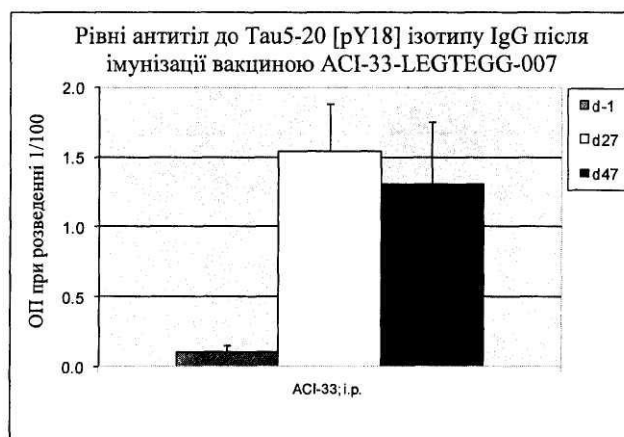
18. Фармацевтична композиція, яка являє собою вакцину, що містить антигенний пептид, послідовність якого представлена в SEQ ID NO: 5, де пептид модифікований пальмітиною кислотою, ковалентно зв'язаною з кожним з кінців пептиду, і яка додатково містить фармацевтично прийнятний ад'ювант та/або імуномодулятор.
19. Фармацевтична композиція, яка являє собою вакцину, що містить антигенний пептид, послідовність якого представлена в SEQ ID NO: 3, де пептид модифікований пальмітиною кислотою, ковалентно зв'язаною з кожним з кінців пептиду, і яка додатково містить фармацевтично прийнятний ад'ювант та/або імуномодулятор.
20. Фармацевтична композиція, яка являє собою вакцину, що містить антигенний пептид, послідовності якого представлені в SEQ ID NO: 3 та SEQ ID NO: 4, де пептиди модифіковані пальмітиною кислотою, ковалентно зв'язаною з кожним з кінців пептиду, і яка додатково містить фармацевтично прийнятний ад'ювант та/або імуномодулятор.
21. Фармацевтична композиція за будь-яким з пп. 18-20, де зазначений антигенний пептид, послідовності якого представлені в SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 3 та SEQ ID NO: 4, відповідно, являє собою тетрапальмітолований пептид, де два фрагменти пальмітинової кислоти зв'язані з кожним з кінців пептиду.
22. Фармацевтична композиція за будь-яким з пп. 17-20, у якій імуномодулятор являє собою детоксифікований ліпід А, такий, наприклад, як монофосфорильний або дифосфорильний ліпід А.
23. Фармацевтична композиція за будь-яким із пп. 16-20, призначена для застосування при лікуванні нейродегенеративного порушення, такого як таупатія.
24. Фармацевтична композиція за будь-яким із пп. 16-20, призначена для лікування захворювань і порушень, які викликаються або асоційовані з утворенням нейрофібрилярних ушкоджень, основної патології головного мозку при таупатії, які включають гетерогенну групу нейродегенеративних захворювань або порушень, включаючи захворювання або порушення, які характеризуються одночасним існуванням тау- і амілоїдної патології, включаючи (але, не обмежуючись тільки ними) хворобу Альцгеймера, хворобу Крейцфельда-Якоба, боксерську деменцію, синдром Дауна, хворобу Герстманна-Штреусслера-Шейнкера, міозит з тільцями включення, церебральну амілоїдну ангіопатію, пов'язану з білком-пріоном, травматичне ушкодження головного мозку, а також інші захворювання або порушення без чіткої амілоїдної патології, включаючи (але, не обмежуючись тільки ними) комплекс аміотрофічний бічний склероз/паркінсонізм-деменцію (синдром Гуама), негуамовського типу хворобу моторних нейронів, пов'язану з нейрофібрилярними сплетіннями, деменцію, пов'язану з накопиченням аргірофільних зерен,
25. кортикобазальну дегенерацію, дифузійні нейрофібрилярні сплетіння з кальцифікацією, фронтотемпоральну деменцію з паркінсонізмом, зчеплену із хромосомою 17, хворобу Галлервордена-Шпатца, множинну системну атрофію, хворобу Німанна-Піка типу С, хворобу Піка, прогресуючий субкортикальний гліоз, прогресуючий супрануклеарний паненцефаліт, підгострий склерозуючий паненцефаліт, деменцію, пов'язану тільки зі сплетіннями,
26. постенцефалітний паркінсонізм, міотонічну дистрофію.
25. Фармацевтична композиція за п. 24, призначена для застосування при лікуванні хвороби Альцгеймера.
26. Спосіб лікування нейродегенеративного захворювання або порушення, такого як таупатія, який полягає в тому, що тварині, переважно ссавцеві, але найбільш переважно людині, що страждає від зазначеного захворювання або порушення, вводять ліпосомальну конструкцію за будь-яким з пунктів 1-13 або фармацевтичну композицію за будь-яким із пп. 16-22.
27. Спосіб за п. 26 лікування захворювань і порушень, які викликаються або асоційовані з утворенням нейрофібрилярних ушкоджень, основної патології головного мозку при таупатії, які включають гетерогенну групу нейродегенеративних захворювань або порушень, включаючи захворювання або порушення, які характеризуються одночасним існуванням тау- і амілоїдної патології, включаючи (але, не обмежуючись тільки ними) хворобу Альцгеймера, хворобу Крейцфельда-Якоба, боксерську деменцію, синдром Дауна, хворобу Герстманна-Штреусслера-Шейнкера, міозит з тільцями включення, церебральну амілоїдну ангіопатію, пов'язану з білком-пріоном, травматичне ушкодження головного мозку, а також інші захворювання або порушення без чіткої амілоїдної патології, включаючи (але, не обмежуючись тільки ними) комплекс аміотрофічний бічний склероз/паркінсонізм-деменцію (синдром Гуама), негуамовського типу хворобу моторних нейронів, пов'язану з нейрофібрилярними сплетіннями, деменцію, пов'язану з накопиченням аргірофільних зерен, кортикобазальну дегенерацію, дифузійні нейрофібрилярні сплетіння з кальцифікацією, фронтотемпоральну деменцію з паркінсонізмом, зчеплену із хромосомою 17, хворобу Галлервордена-Шпатца, множинну

системну атрофію, хворобу Німанна-Піка типу С, хворобу Піка, прогресуючий субкортикальний гліоз, прогресуючий супрануклеарний паненцефаліт, підгострий склерозуючий паненцефаліт, деменцію, пов'язану тільки зі сплетіннями, постенцефалітний паркінсонізм, міотонічну дистрофію.

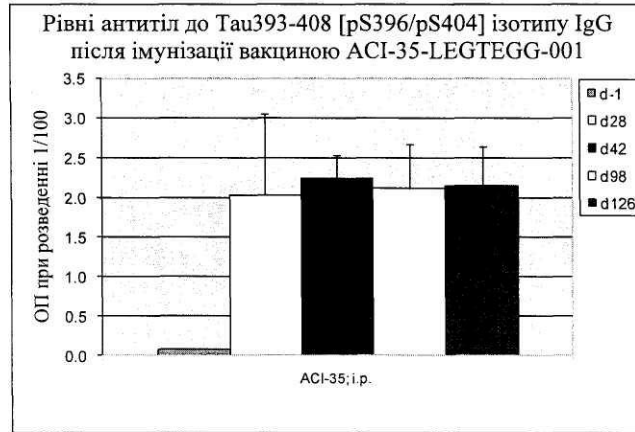
- 5 28. Спосіб за п. 26 або 27, де імунну відповідь індукують у тварини, переважно у ссавця або людини, що страждає від нейродегенеративного порушення, такого як таупатія, шляхом введення тварині або людині ліпосомальної конструкції або терапевтичної композиції за будь-яким із попередніх пунктів.



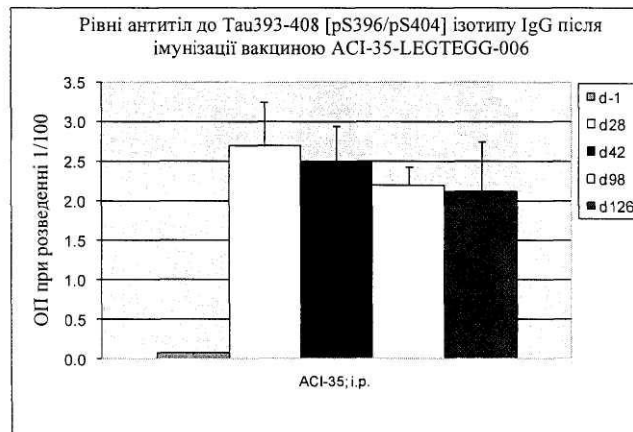
Фіг. 1a



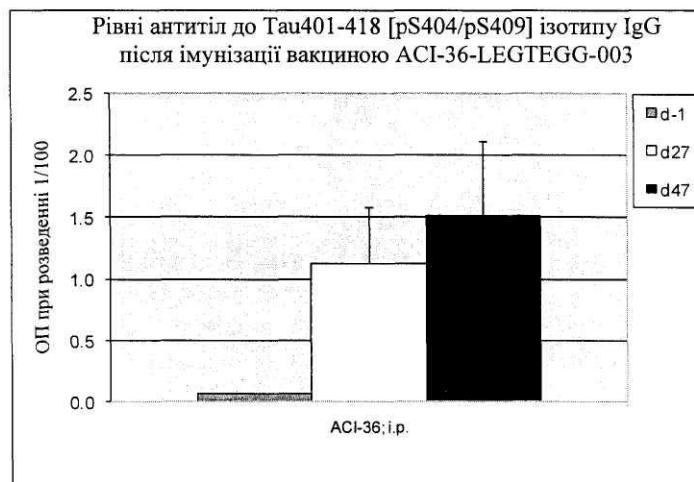
Фіг. 1б



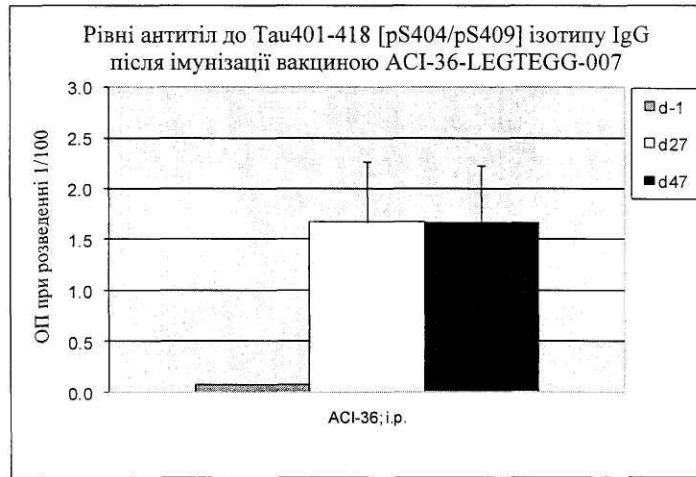
Фіг. 2а



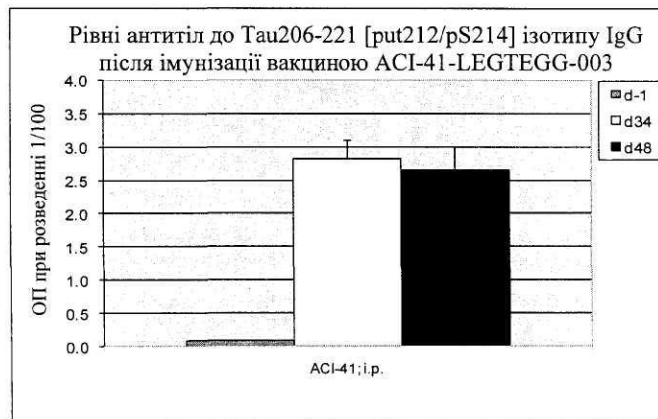
Фіг. 2б



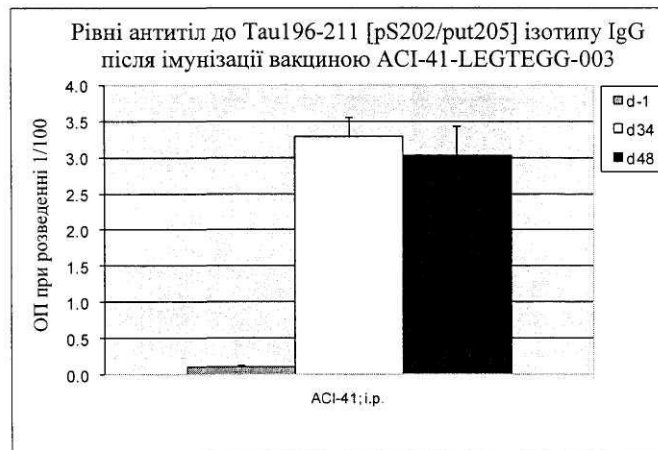
Фіг. 3а



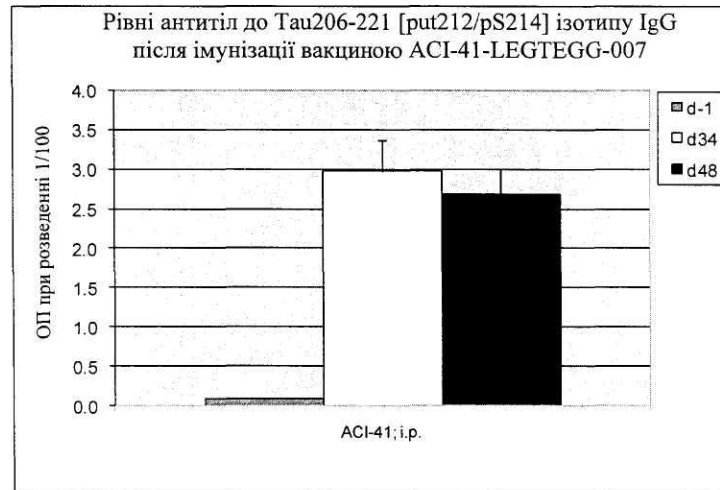
Фіг. 3б



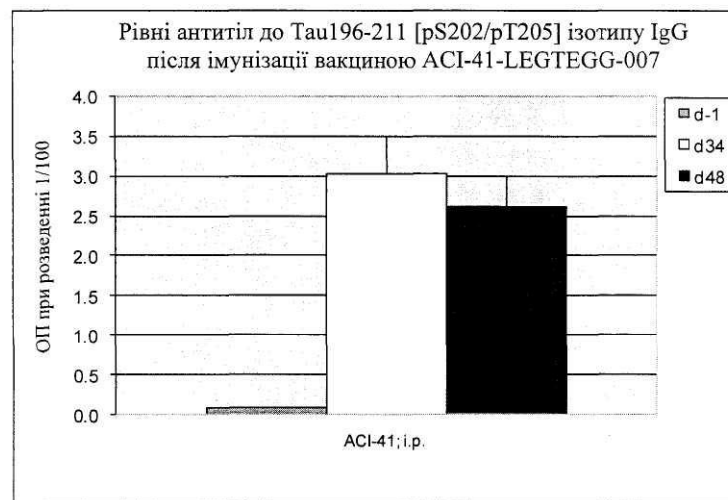
Фіг. 4а



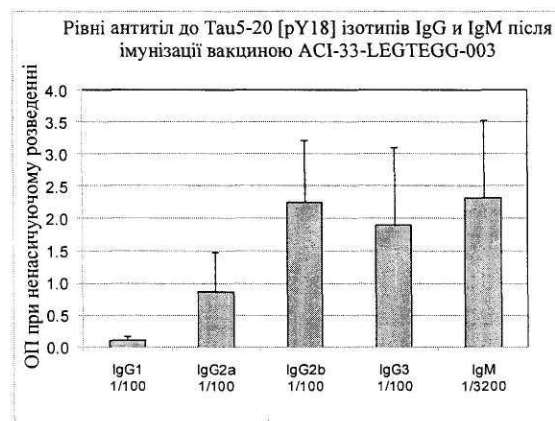
Фіг. 4б



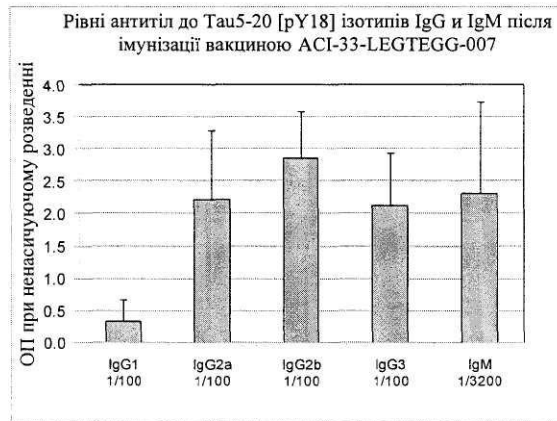
Фіг. 4в



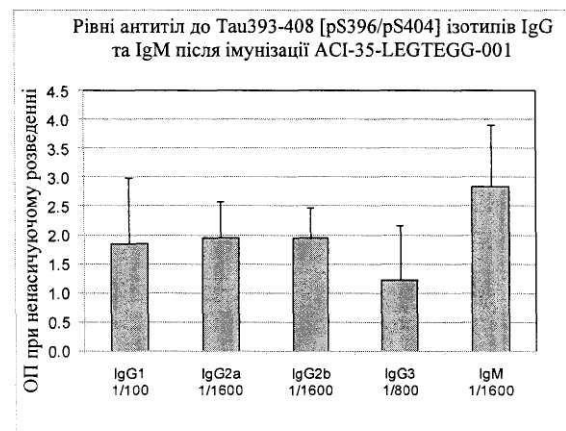
Фіг. 4г



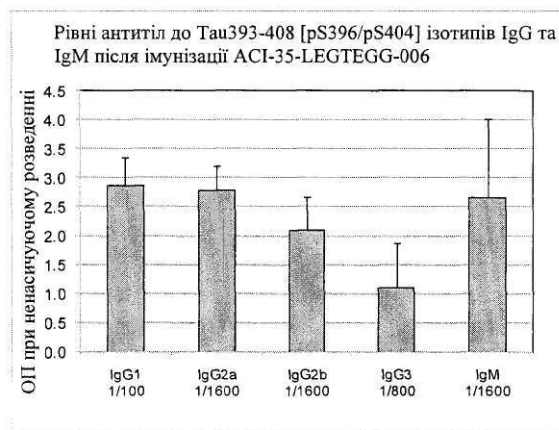
Фіг. 5а



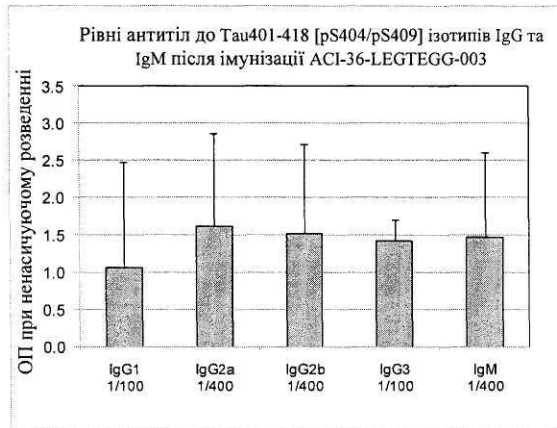
Фіг. 5б



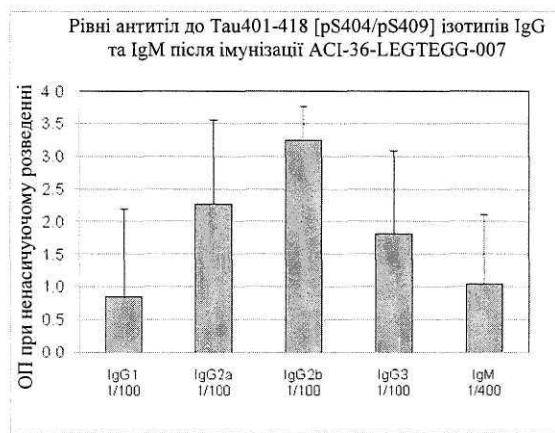
Фіг. 6а



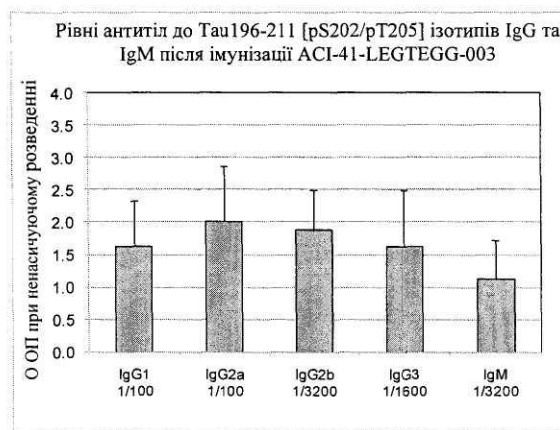
Фіг. 6б



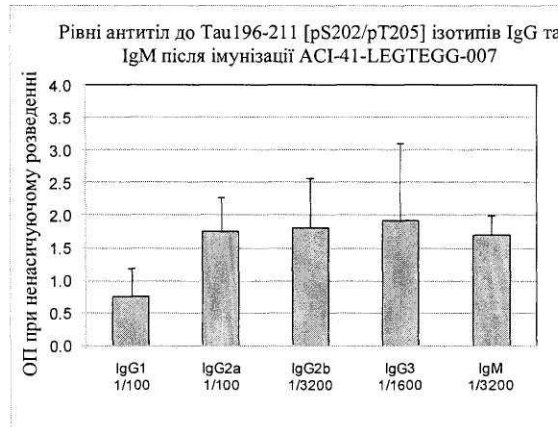
Фіг. 7a



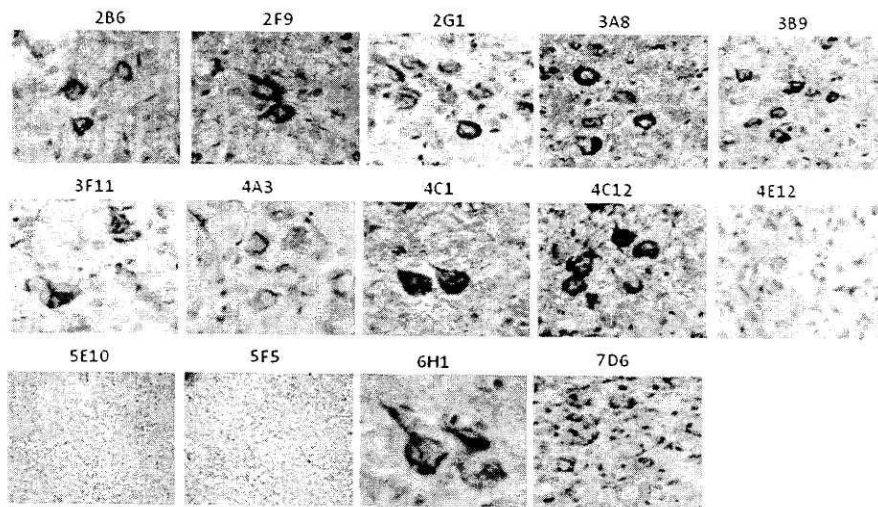
Фіг. 7б



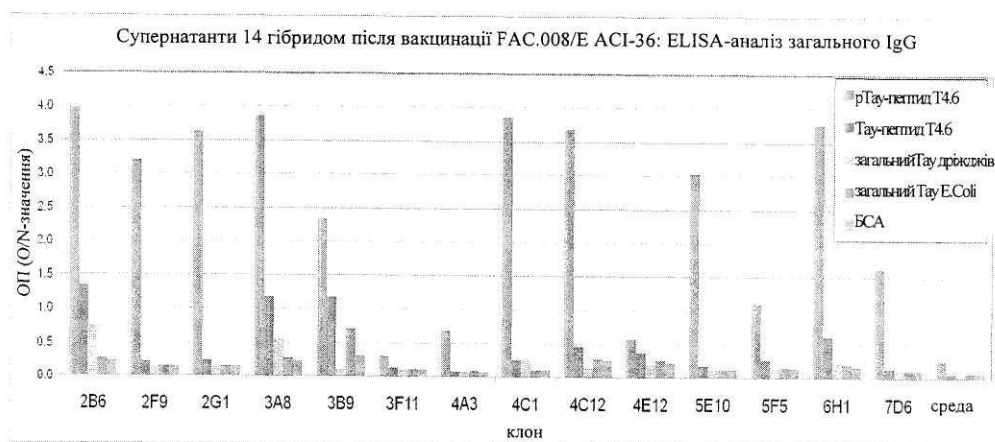
Фіг. 8a



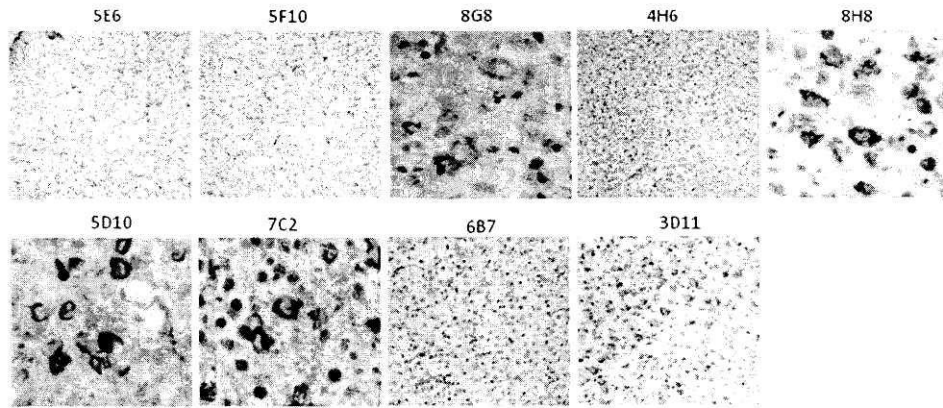
Фіг. 86



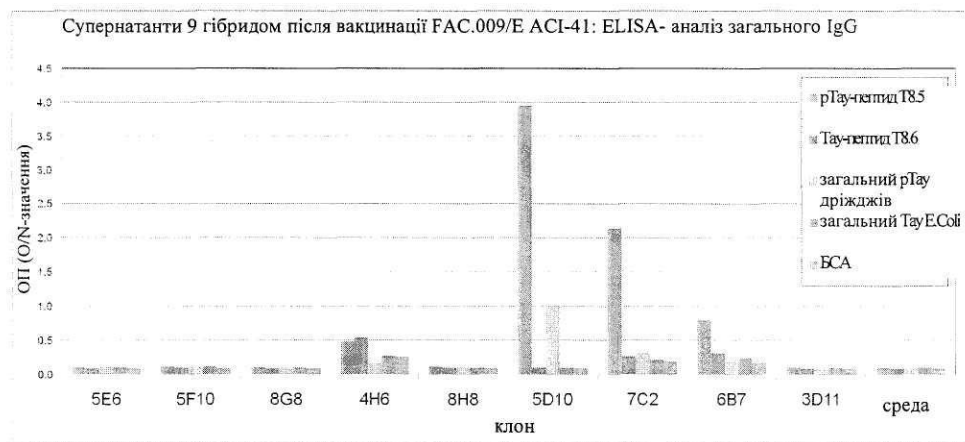
Фіг. 9a



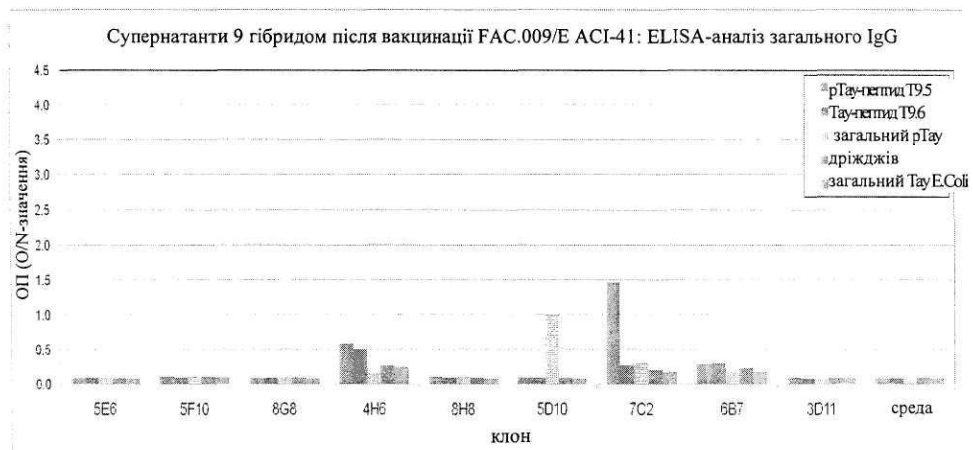
Фіг. 96



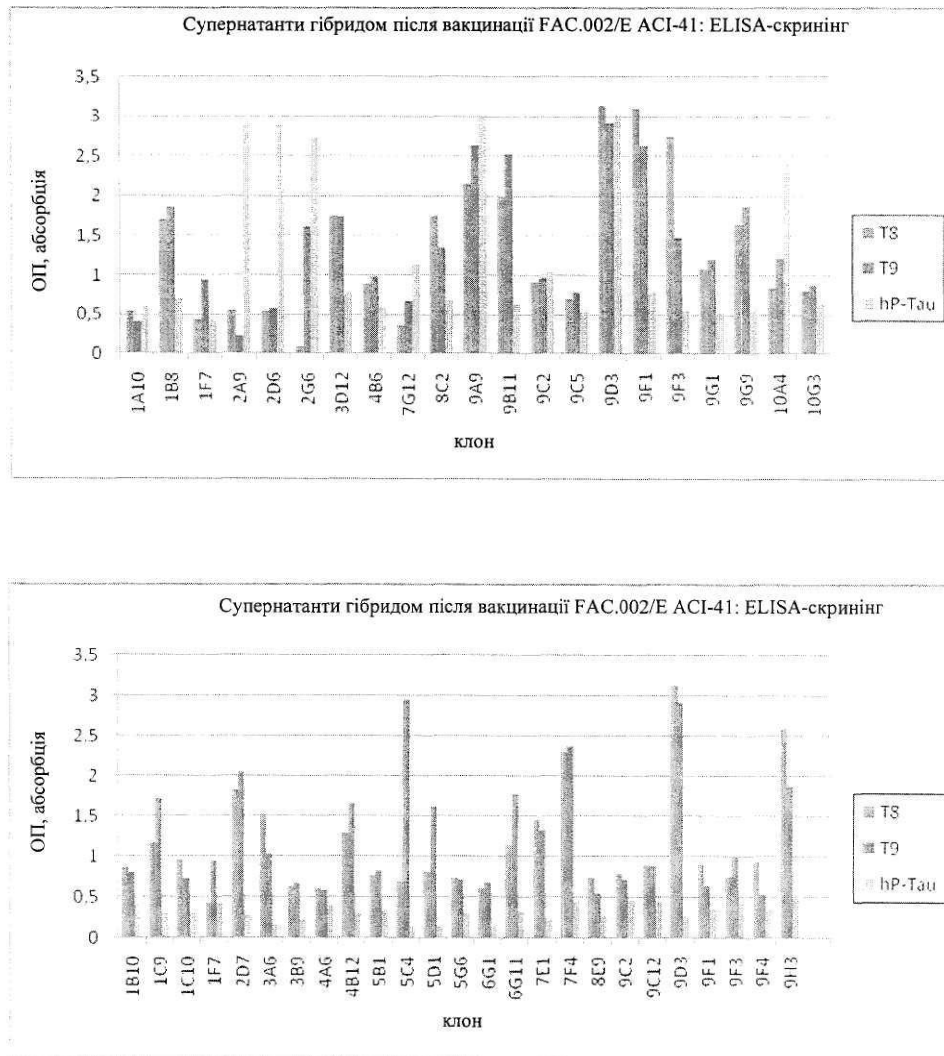
Фіг. 10а



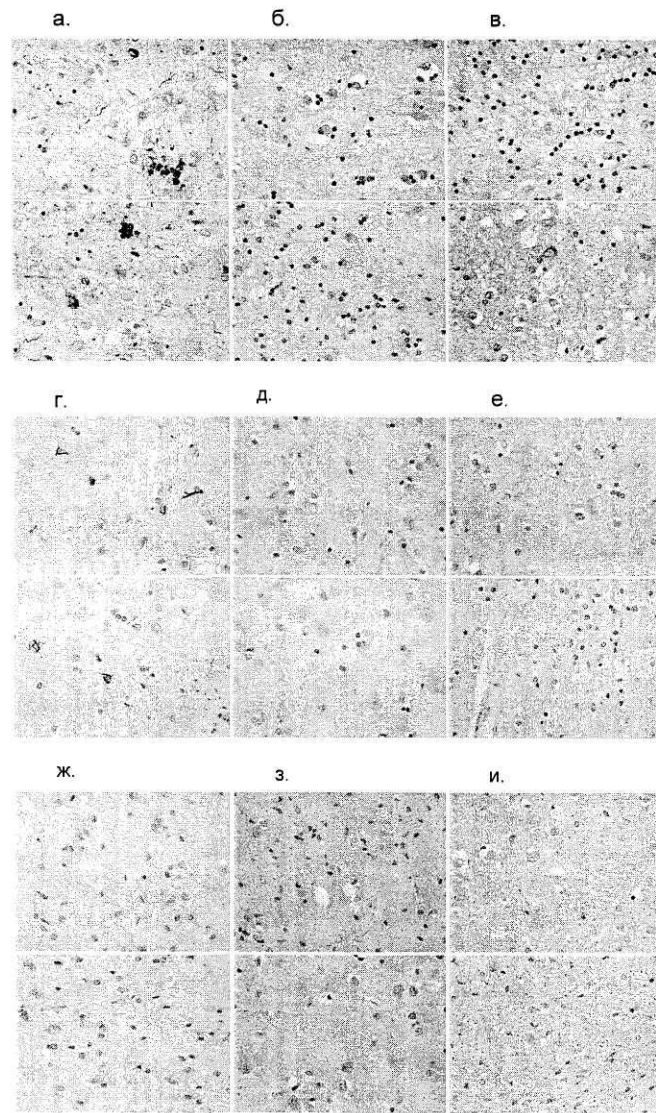
Фіг. 10б



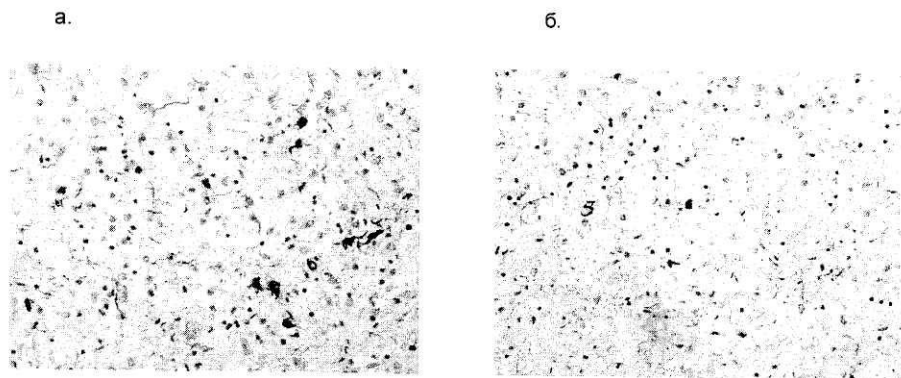
Фіг. 10в



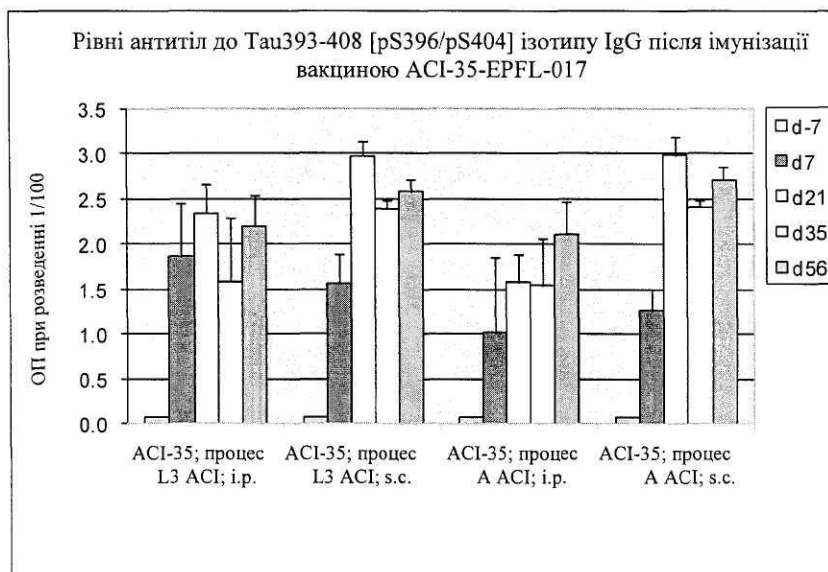
Фіг. 11



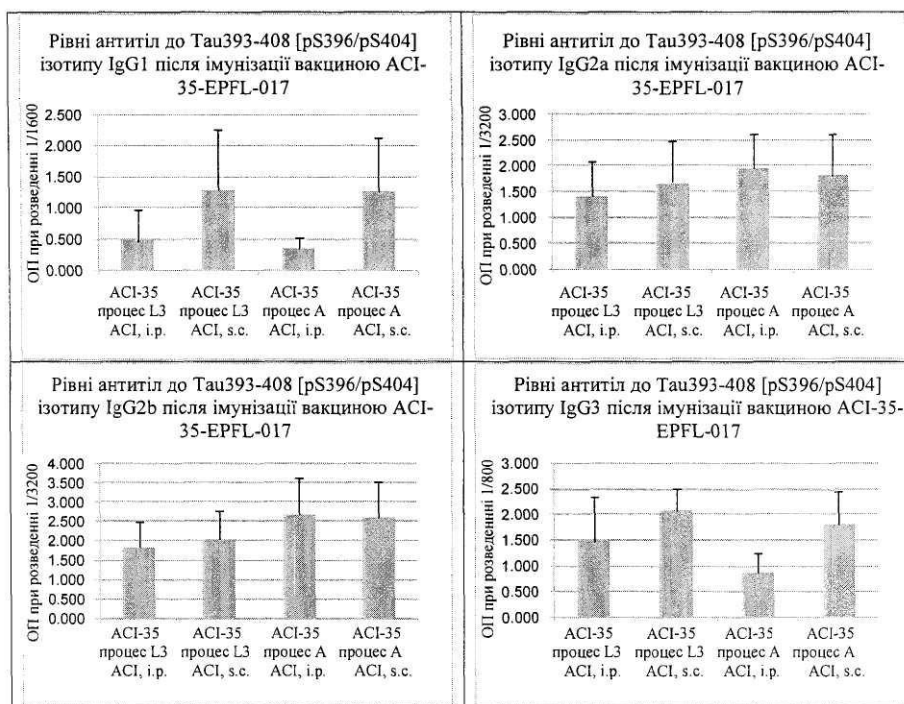
Фиг. 12



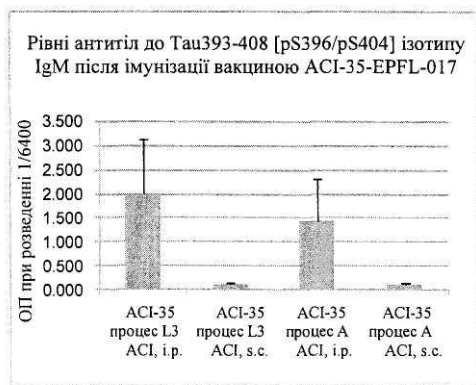
Фиг. 13



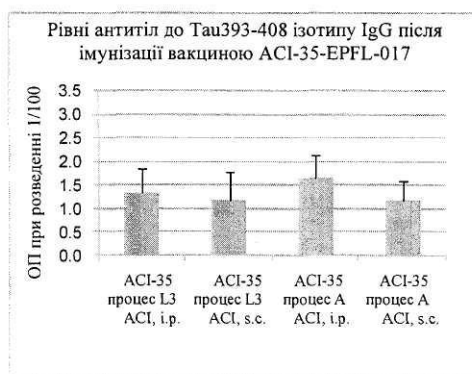
Фіг. 14



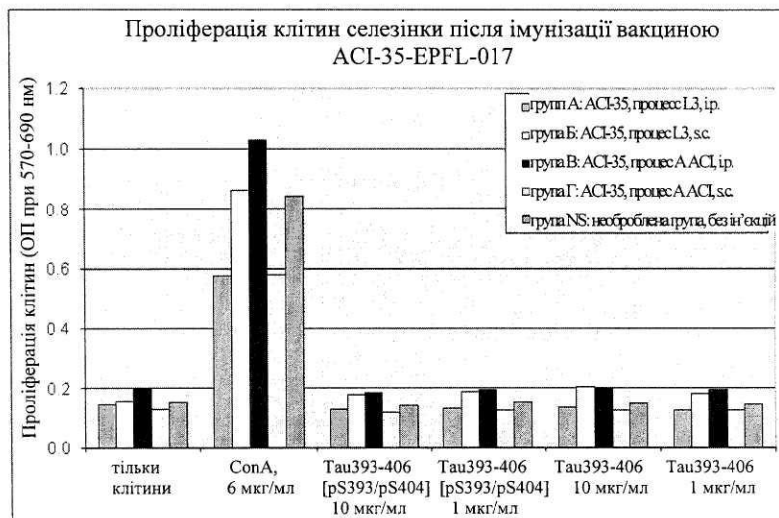
Фіг. 15



Фіг. 16а



Фіг. 16б



Фіг. 17

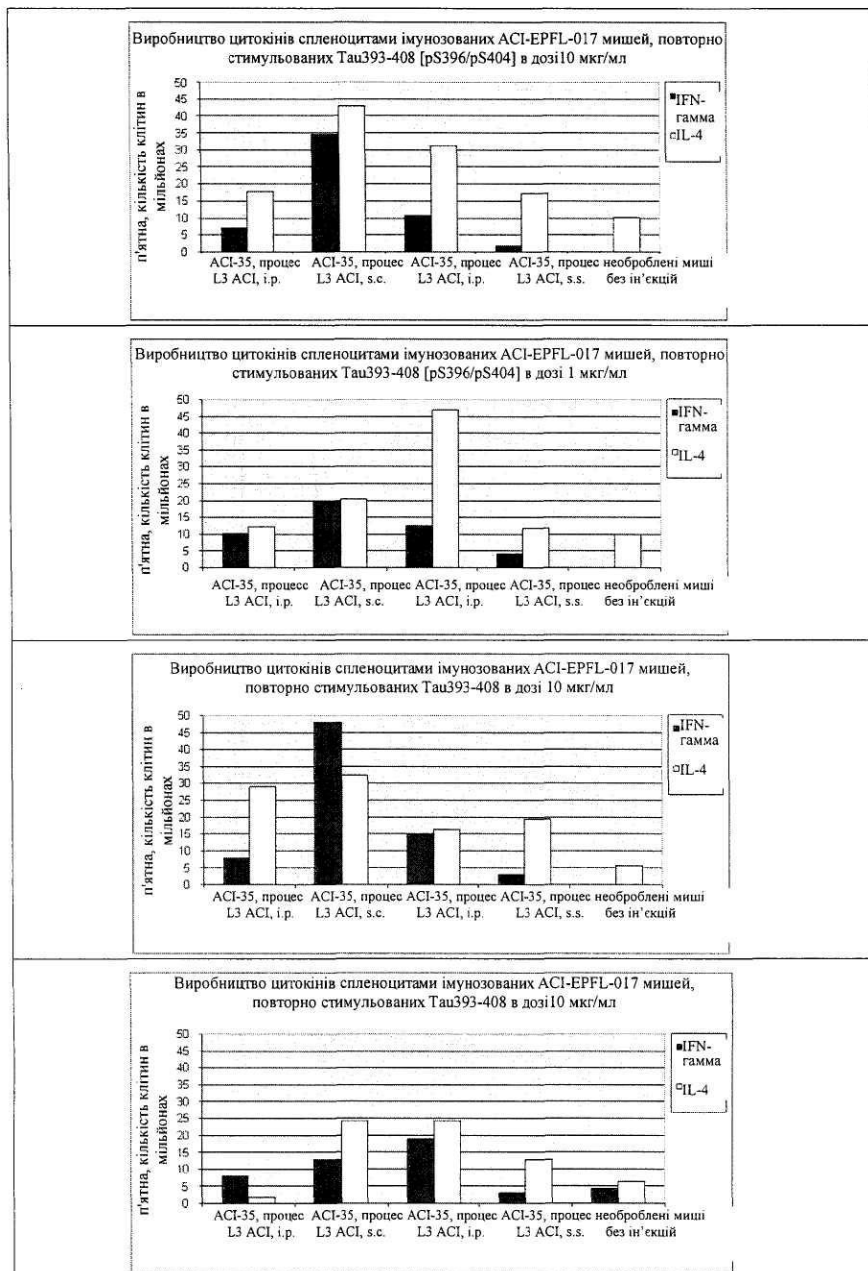
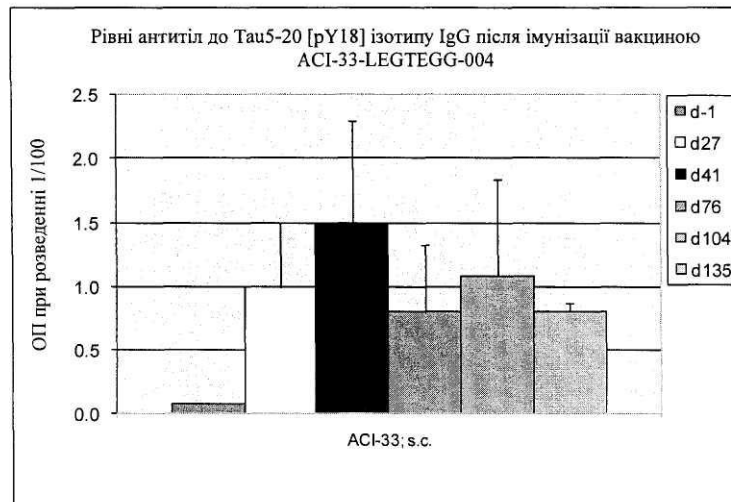
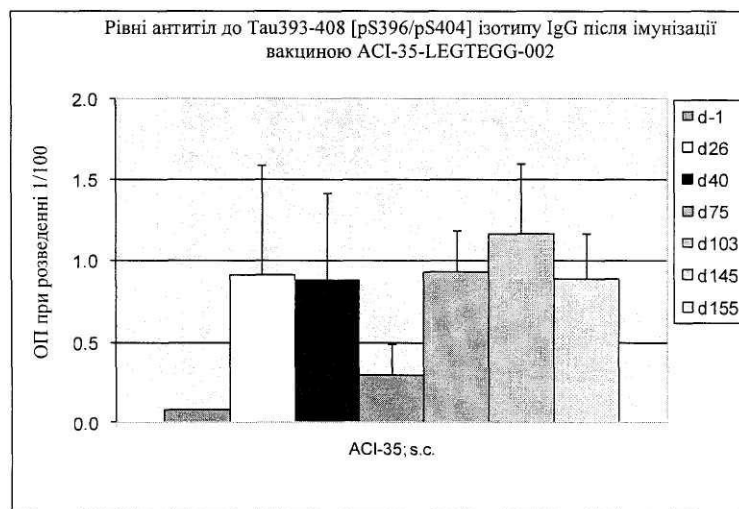


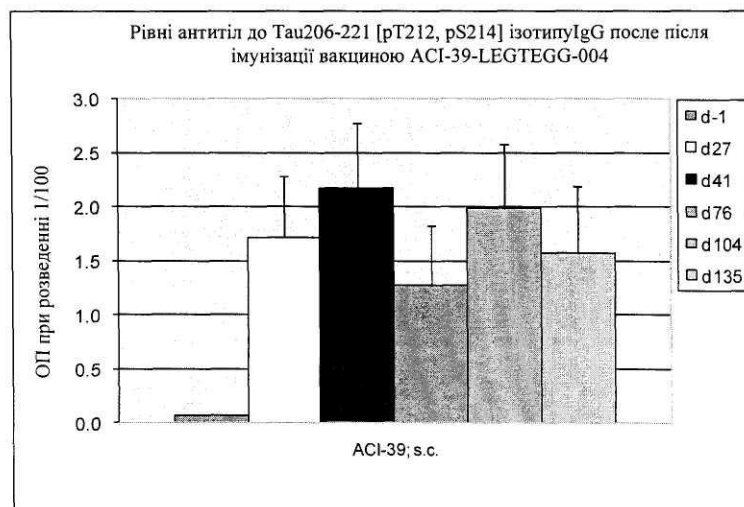
Fig. 18



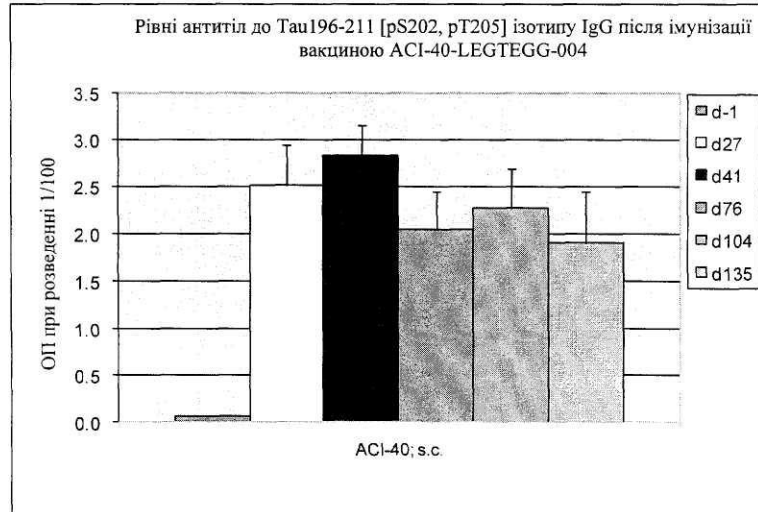
Фіг. 19



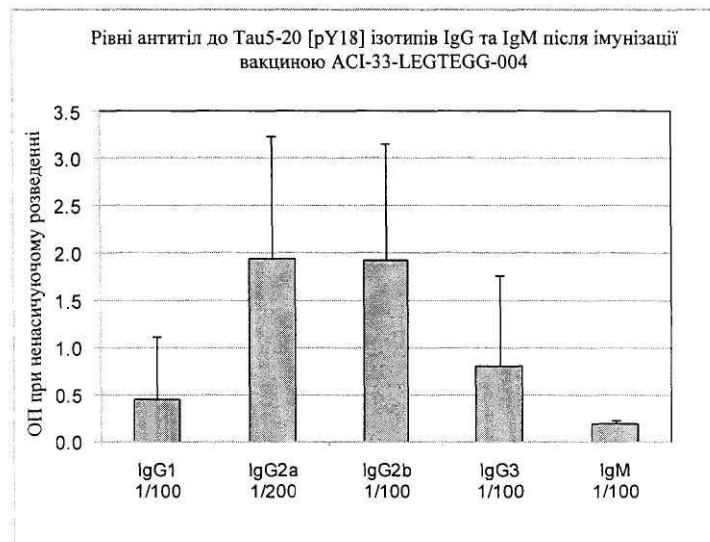
Фіг. 20



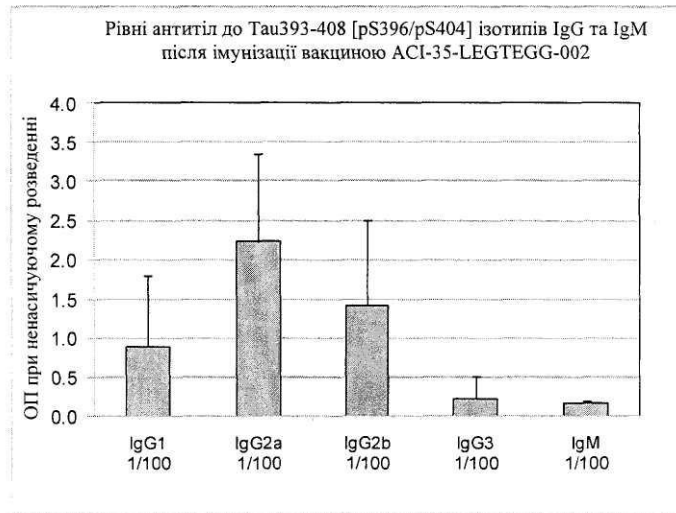
Фіг. 21



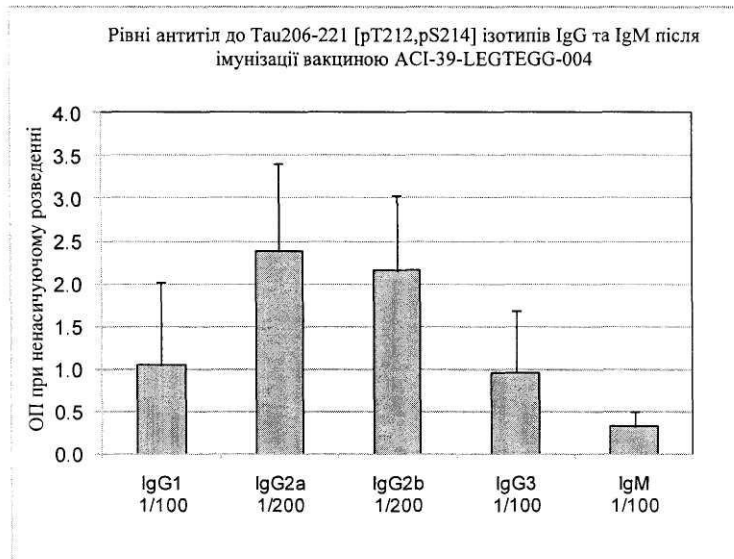
Фіг. 22



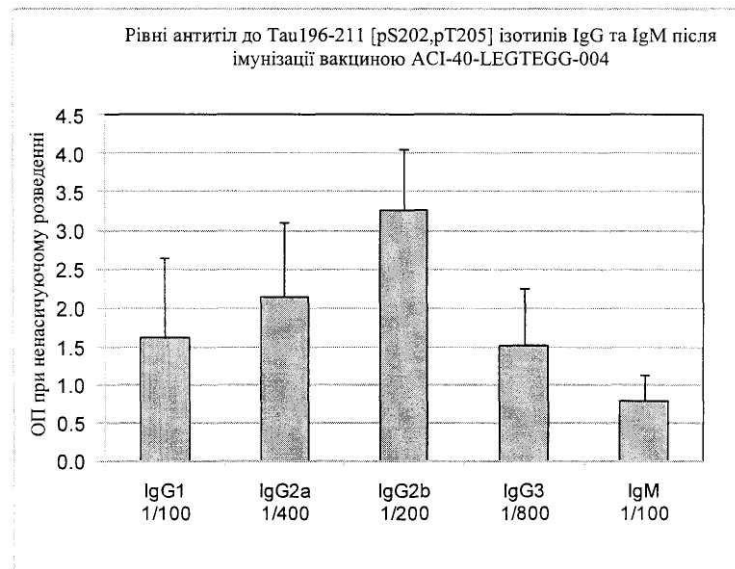
Фіг. 23



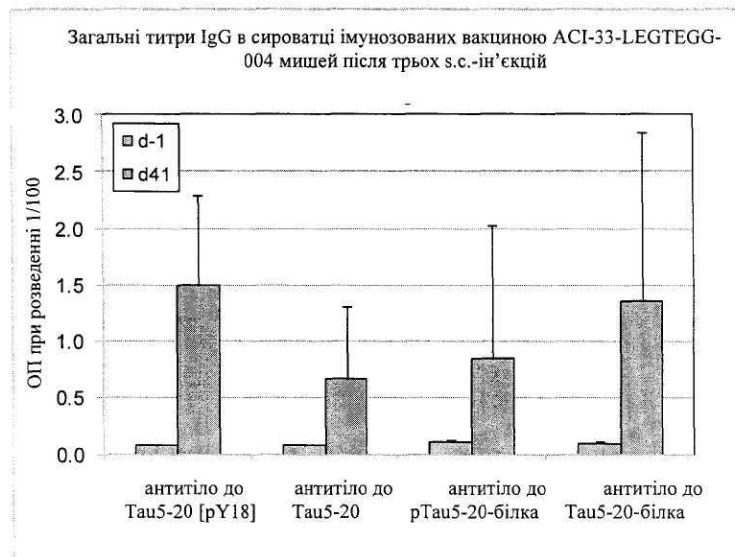
Фіг. 24



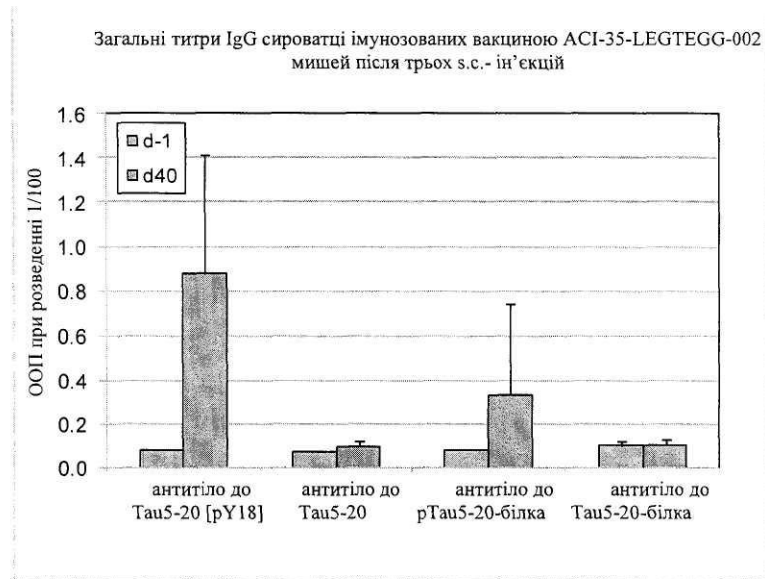
Фіг. 25



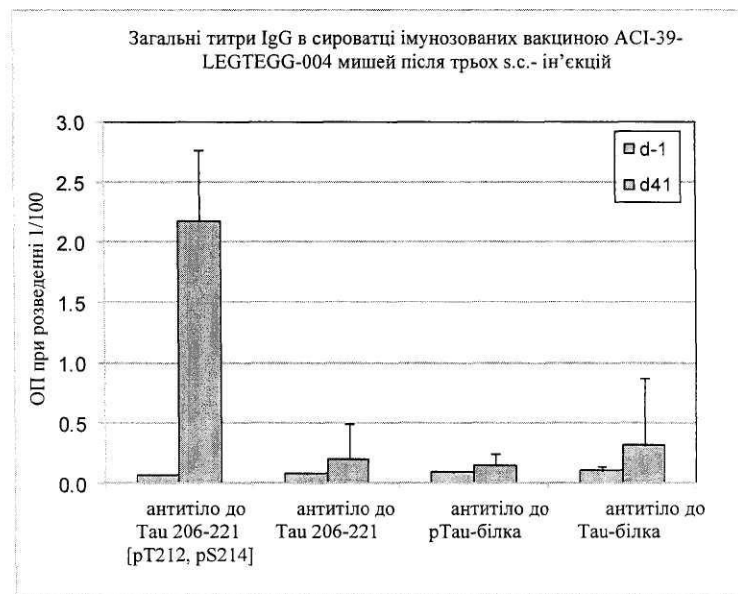
Фиг. 26



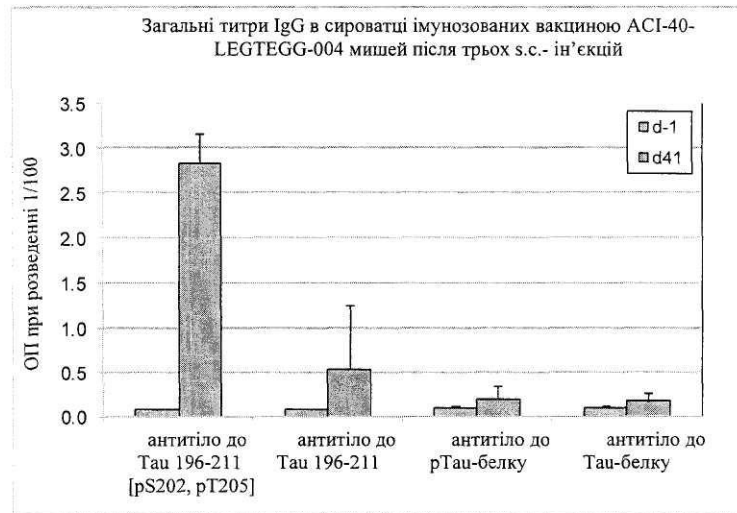
Фиг. 27



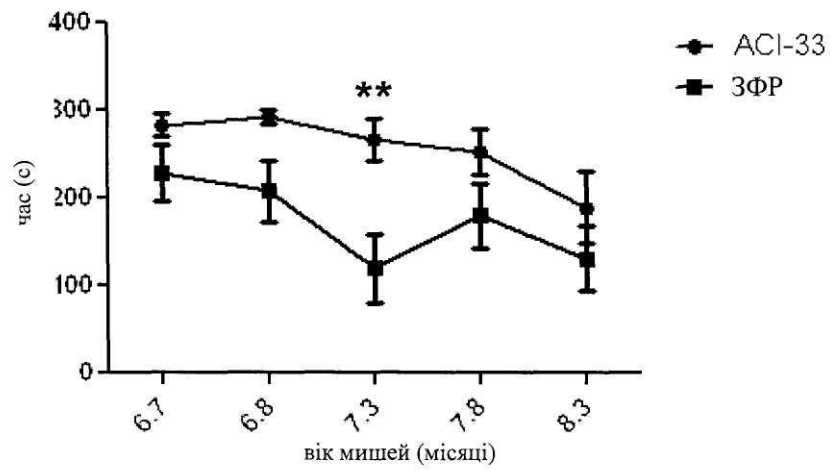
Фіг. 28



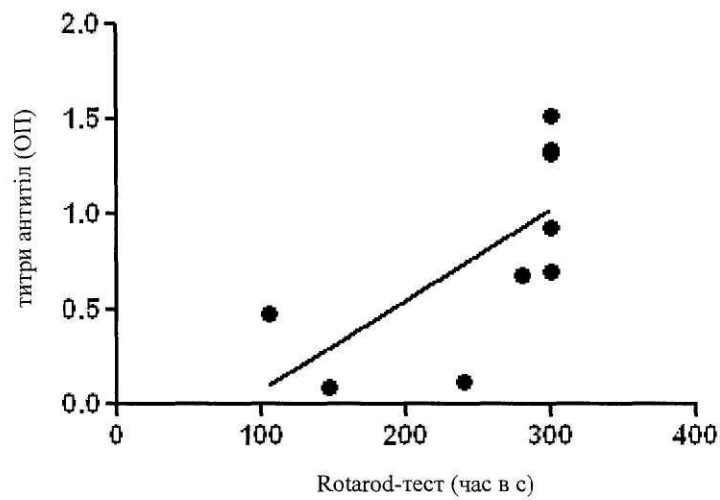
Фіг. 29



Фіг. 30



Фіг. 31



Фіг. 32

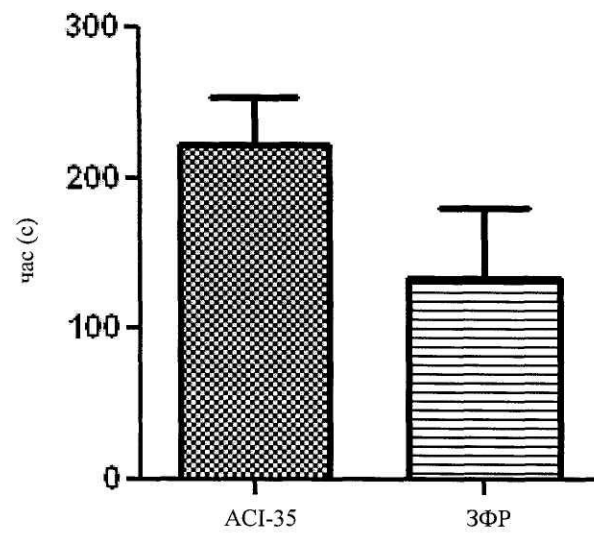
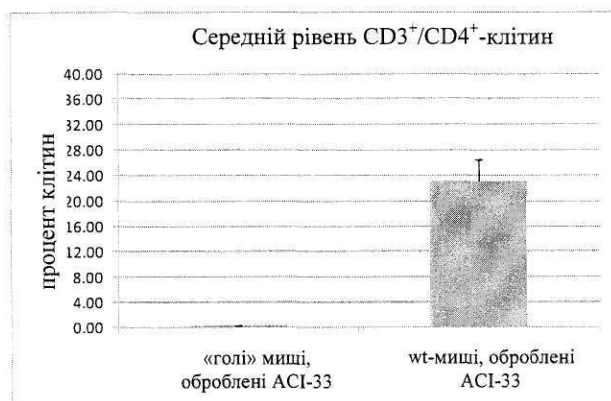
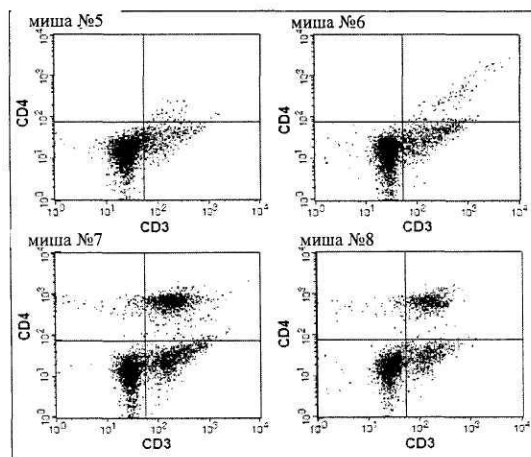
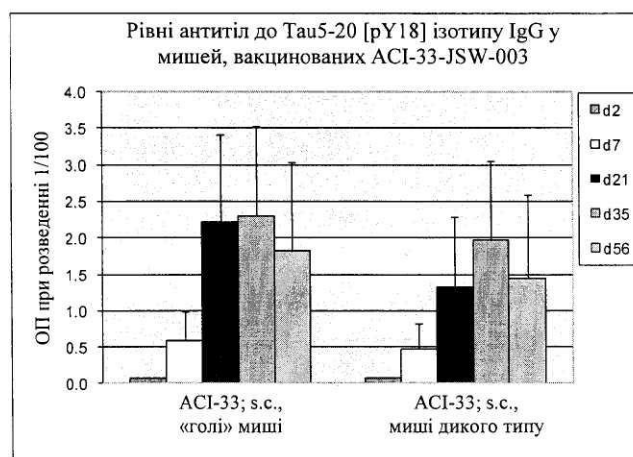


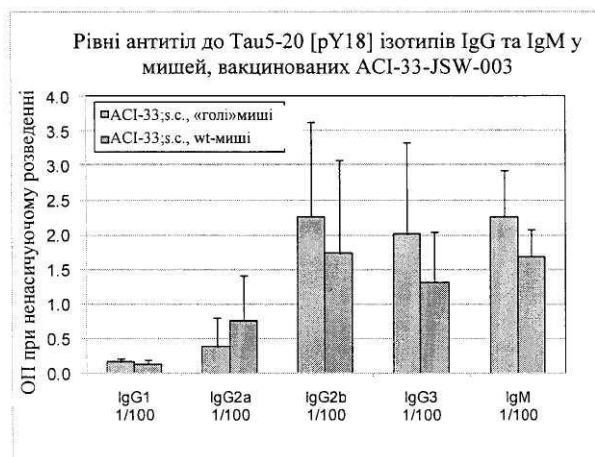
Fig. 33



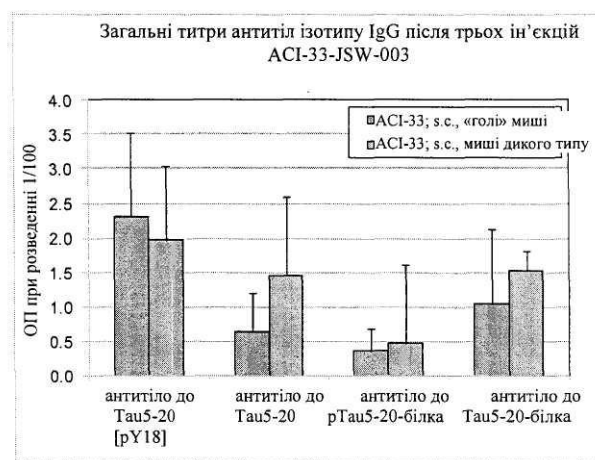
Фіг. 34



Фіг. 35



Фіг. 36



Фіг. 37