

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **044699**(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.09.25**

**(21)** Номер заявки  
**202092403**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2019.04.09**

**(51)** Int. Cl. **A61K 39/245** (2006.01)  
**A61K 39/145** (2006.01)  
**A61K 39/05** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**C07K 14/005** (2006.01)  
**A61P 25/28** (2006.01)  
**A61K 39/39** (2006.01)

**(54) ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ БЕТА-АМИЛОИДА**

**(31)** **18166659.5; 18202366.3**

**(32)** **2018.04.10; 2018.10.24**

**(33)** **EP**

**(43)** **2021.01.11**

**(86)** **PCT/EP2019/058980**

**(87)** **WO 2019/197414 2019.10.17**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**АС ИММЬЮН СА (CH)**

**(72)** Изобретатель:  
**Фиорини Эмма, Вукичевич Верхиль  
Мария, Пильгрэн Бош Мария (CH)**

**(74)** Представитель:  
**Парамонова К.В., Угрюмов В.М.,  
Христофоров А.А., Гизатуллин Ш.Ф.,  
Гизатуллина Е.М., Костюшенкова  
М.Ю., Лебедев В.В., Лыу Т.Н.,  
Строкова О.В. (RU)**

**(56)** AGADJANYAN M G ET AL.: "PROTOTYPE ALZHEIMER'S DISEASE VACCINE USING THE IMMUNODOMINANT B CELL EPITOPE FROM BETA-AMYLOID AND PROMISCUOUS T CELL EPITOPE PAN HLA DR-BINDING PEPTIDE", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, INC, US, vol. 174, no. 3, 1 January 2005 (2005-01-01), pages 1580-1586, XP008052934, ISSN:

0022-1767 cited in the application. The whole document, in particular, the PADRE-Abetal-15 vaccine

GHOCHIKYAN A ET AL.: "Refinement of a DNA based Alzheimer disease epitope vaccine in rabbits", HUMAN VACCINES AND IMMUNOTHERAPEUTICS, TAYLOR & FRANCIS, US, vol. 9, no. 5, 1 May 2013 (2013-05-01), pages 1002-1010, XP009173195, ISSN: 2164-5515, DOI: 10.4161/HV.23875. The whole document, in particular the vaccines and Table 1

M. PIHLGREN ET AL.: "TLR4- and TRIF-dependent stimulation of B lymphocytes by peptide liposomes enables T cell-independent isotype switch in mice", BLOOD, vol. 121, no. 1, 3 January 2013 (2013-01-03), pages 85-94, XP055552884, US ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2012-02-413831 cited in the application. The whole document, in particular, the methods

BOECKLER C ET AL.: "DESIGN OF HIGHLY IMMUNOGENIC LIPOSOMAL CONSTRUCTS COMBINING STRUCTURALLY INDEPENDENT B CELL AND T HELPER CELL PEPTIDE EPITOPES", EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WILEY VCH, WEINHEIM, vol. 29, no. 7, 1 January 1999 (1999-01-01), pages 2297-2308, XP000910025, ISSN: 0014-2980, DOI: 10.1002/(SICI)1521-4141(199907)29:07<2297::AID-IMMU2297>3.0.CO;2-5, the whole document

DIETHELM-OKITA B M ET AL.: "Universal epitopes for human CD4+ cells on tetanus and diphtheria toxins", JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, JID, UNIVERSITY OF CHICAGO PRESS, US, vol. 181, no. 3, 1 March 2000 (2000-03-01), pages 1001-1009, XP002734775, ISSN: 0022-1899, DOI: 10.1086/315324, the whole document

**(57)** Липосомальная вакцинная композиция содержит β-амилоид (Aβ)-производный пептидный антиген, представленный на поверхности липосомы. Вакцинная композиция также содержит пептид, содержащий универсальный Т-клеточный эпитоп, инкапсулированный внутри липосомы. Вакцинная композиция также содержит адьювант, который может составлять часть липосомы и может быть представлен по меньшей мере частично на поверхности липосомы. Эти вакцинные композиции используются для лечения, профилактики, индукции защитного иммунного ответа против или облегчения симптомов, связанных с заболеванием или состоянием, связанными с бета-амилоидом, или состоянием, характеризующимся потерей когнитивной способности памяти или связанным с ней. Вакцинные композиции могут быть обеспечены в виде набора. Также заявлены связанные способы получения липосомальной вакцинной композиции.

**B1****044699****044699 B1**

### Область техники

Настоящее изобретение относится к терапевтическим вакцинам против бета-амилоида и их применениям для лечения и профилактики заболевания. Вакцины содержат Аβ-производные пептидные В-клеточные антигены и Т-клеточные эпитопы.

#### Раскрытие настоящего изобретения

Болезнь Альцгеймера (AD) представляет собой тяжелое прогрессирующее дегенеративное нарушение, характеризующееся потерей когнитивных функций, включая память, а также потерей способности выполнять обычную повседневную деятельность. AD поражает приблизительно 40 миллионов пациентов во всем мире, и это число быстро растет по мере старения популяции. Основным neuropathological изменением в головном мозге пациентов с AD является гибель нейронов, в основном в областях, связанных с памятью и когнитивной деятельностью (Soto, 1999). Одним из наиболее ярких патологических признаков AD является обильное присутствие бета-амилоидных (Aβ) бляшек в головном мозге больных (Soto, 1999). Aβ-бляшки образованы пептидом Aβ длиной от 39 до 43 аминокислот, который в своей природной непатологической форме находится в конформации случайной спирали. При переходе в патологическое состояние он трансформируется в основном во вторичную структуру β-листа, спонтанно агрегируя в нерастворимые бляшки.

Немногочисленные доступные в настоящее время терапии для AD рассматриваются как преимущественно симптоматические по своему действию. Несмотря на значительные усилия, прилагаемые в течение многих лет для разработки терапий, на сегодняшний день нет ни одной одобренной терапии, модифицирующей AD. Были предприняты попытки разработать иммунотерапевтическое средство, которое бы нейтрализовало патологический Aβ в пораженном головном мозге в течение длительного периода времени (Winblad, 2014). Вакцины обладают преимуществом, стоящим в том, что они стимулируют иммунную систему для выработки пула немного различных, но весьма специфических антител, в то время как ответ может быть вызван повторно дополнительными вакцинациями, если это необходимо.

Однако подход активной иммунизации (вакцинации) против Aβ имеет несколько основных проблем. Бета-амилоид представляет собой, так называемый, аутоантиген, воздействию которого человеческий организм постоянно подвергается. Следовательно, довольно сложно нарушить иммунную толерантность и вызвать иммунный ответ против него. Кроме того, довольно сложно вызвать сильный иммунный ответ на вакцину у пожилых и больных людей, таких как пациенты с AD, из-за их ослабленной иммунной системы и уменьшенного количества иммунных клеток.

Несмотря на эти проблемы, в первоначальном исследовании вакцина на основе полноразмерного Aβ1-42 (AN1792) вызвала иммунный ответ и показала многообещающую эффективность с более медленным снижением когнитивных функций у пациентов, которые получили вакцину, чем у пациентов, получивших плацебо (Gilman, 2005). Однако у 6% подвергнутых лечению пациентов развился менингоэнцефалит, воспалительная реакция, которая, как полагают, является следствием опосредованного Т-клетками ответа на полноразмерный Aβ1-42 (Orgogozo, 2003).

Другая известная вакцина против Aβ, ACI-24, содержит последовательность из 15 аминокислот, полностью идентичную человеческой последовательности 1-15 бета-амилоида (WO 2007/068411). Этот пептидный антиген связан с липосомальным носителем с целью стимуляции антител против Aβ, избегая при этом менингоэнцефалита и кровоизлияния (Muhs, 2007, Pihlgren, 2013). Выбор пептида Aβ1-15, служащего в качестве антигена, был основан на том факте, что эта последовательность содержит В-клеточный эпитоп, но не имеет сильного Т-клеточного реакционного сайта полноразмерного Aβ1-42 (Monsonogo, 2003), который рассматривается как причина нежелательных воспалительных реакций. Было показано, что ACI-24 действует посредством одновременной активации В-клеточного рецептора, специфичного для Aβ1-15, и Toll-подобного рецептора 4 (TLR4), активируемых монофосфорил-липидом А (MPLA), адьювантом, присутствующим в вакцине ACI-24 (Pihlgren, 2013).

Активация пролиферации и продуцирования иммуноглобулина (Ig) В-клеток происходит путем перекрестного связывания рецептора Ig на поверхности В-клеток. Для того чтобы повысить продукцию антител второй сигнал может быть обеспечен хелперной Т-клеткой, активируемой Т-клеточным эпитопом. Т-клеточные эпитопы, представленные молекулами главного комплекса гистосовместимости (MHC) (для человека обозначается как антиген лейкоцитов человека (HLA)) на поверхности антигенпрезентирующей клетки (APC), способствуют дифференцировке когнатных хелперных Т-клеток, способных продуцировать IFNγ и IL-4. Высвобождение цитокинов и костимулирующие сигналы между активированными Т- и В-клетками усиливают иммунные ответы и переключение классов. После первичной вакцинации необученные Т-клетки пролиферируют и дифференцируются в эффекторные клетки. Небольшая часть этих клеток будет образовывать пул долгоживущих Т-клеток памяти, способных быстро пролиферировать при повторной встрече с когнатным пептидом после повторной вакцинации (Sallusto, 2010). Так называемые "универсальные" Т-клеточные эпитопы специфичны для Т-клеток, которые присутствуют у подавляющего большинства человеческой популяции. Обычно они происходят из антигенов, которым люди обычно подвергаются в течение своей жизни (например, столбняк, вирус гриппа и т.д.). Способность Т-клеточного эпитопа активировать Т-клетки является результатом по меньшей мере двух взаимо-

дополняющих свойств: i) аффинности связывания с бороздкой HLA, означающей силу связывания, а также ii) его способности связывать различные гаплотипы HLA неизбирательным образом, что означает способность охватывать очень разные в отношении различий в экспрессии молекул HLA человеческие популяции.

Существует потребность в разработке вакцины против Аβ, обладающей высокой иммуногенностью при сохранении хорошего профиля безопасности. Эта потребность была удовлетворена путем включения универсального Т-клеточного эпитопа в липосомальную вакцину АС1-24. Поскольку вакцина АС1-24 характеризуется присутствием Аβ1-15 на поверхности липосомы, включение универсальных Т-клеточных эпитопов на поверхность липосомы рассматривалось авторами настоящего изобретения как путь первого выбора для повышения эффективности вакцины. Однако неожиданно было обнаружено, что включение универсальных Т-клеточных эпитопов на поверхность липосомы не привело к повышению (или существенному повышению) эффективности вакцины. Таким образом, как раскрыто в настоящем документе, был принят подход инкапсуляции, который, как было показано, обеспечивает повышенную эффективность. Включение универсального Т-клеточного эпитопа внутрь липосомальной вакцины, как было показано в настоящем документе, повышает (или существенно геморрагия) эффективность вакцины при сохранении хорошего профиля безопасности благодаря активации Т-клеток, которая не направлена на Аβ. Однако при разработке такого подхода возникло несколько проблем. Во-первых, разработанные согласно настоящему изобретению универсальные Т-клеточные эпитопы имеют тенденцию быть гидрофобными, что затрудняет инкапсуляцию в липосомах. Во-вторых, с целью повышения иммуногенности часто комбинируют множество универсальных Т-клеточных эпитопов. Однако выход пептидного синтеза и вероятность успеха снижаются по мере увеличения длины пептидов. В-третьих, заряд выбранных универсальных Т-клеточных эпитопов влияет на эффективность инкапсуляции и экспериментальные условия, необходимые для обеспечения инкапсуляции, из-за отрицательно заряженной липосомальной мембраны.

Соответственно настоящее изобретение относится к липосомальной вакцинной композиции, содержащей:

а) β-амилоид (Аβ)-производный пептидный В-клеточный антиген, представленный на поверхности липосомы, и

б) пептид, содержащий универсальный Т-клеточный эпитоп, инкапсулированный внутри липосомы.

Особенно предпочтительная вакцинная композиция содержит вакцину АС1-24, модифицированную таким образом, что она включает пептид, содержащий универсальный Т-клеточный эпитоп, инкапсулированный внутри липосомы. Липосома является примером носителя. Таким образом, носителем обычно является липосома, но он может представлять собой любой носитель, который подходит для представления Аβ-производного пептидного антигена на поверхности таким же образом, как это достигается посредством липосомы (в которой Аβ-производный пептидный антиген принимает преимущественно конформацию β-листа), а также инкапсулирует пептид, содержащий универсальный Т-клеточный эпитоп. Примеры включают везикулы и корпускулярные тела.

Термин "универсальный Т-клеточный эпитоп" означает эпитоп, который является специфическим для Т-клеток, которые присутствуют у большей части человеческой популяции. Они обычно происходят из антигенов, которым люди обычно подвергаются в течение своей жизни. Примеры включают антигены, включенные в обычно применяемые вакцины. Конкретными примерами являются Т-клеточные эпитопы, включенные в столбняк, вирус гриппа и дифтерию, а также гемоцианин лимфы улитки (KLH) и вирус Эпштейна-Барр (EBV). "Универсальная" способность Т-клеточного эпитопа активировать Т-клетки является результатом по меньшей мере двух взаимодополняющих свойств: i) аффинности связывания с бороздкой HLA, означающей силу связывания, а также ii) его способности связывать различные гаплотипы HLA неизбирательным образом, что означает способность охватывать очень разные в отношении различий в экспрессии молекул HLA человеческие популяции. Универсальные Т-клеточные эпитопы могут связываться с большинством аллелей MHC класса II, присутствующих в человеческой популяции. Таким образом, универсальные Т-клеточные эпитопы, включенные в вакцинные композиции согласно настоящему изобретению, могут быть способны стимулировать CD4 Т-клеточный ответ. Таким образом, универсальные Т-клеточные эпитопы, включенные в вакцинные композиции согласно настоящему изобретению, могут быть способны стимулировать ответ хелперных Т-клеток, что усиливает продукцию (Аβ-специфических) антител В-клетками.

Универсальные Т-клеточные эпитопы, включенные в вакцинные композиции согласно настоящему изобретению, как правило, синтезируют посредством твердофазного синтеза. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления универсальные Т-клеточные эпитопы синтезируют твердофазным синтезом. Эта и другие практические проблемы инкапсуляции означают, что согласно некоторым неограничивающим вариантам осуществления пептид, содержащий универсальный Т-клеточный эпитоп, имеет длину не более 85, 80, 75 или 70 аминокислот. Минимальная длина пептида Т-клеточного эпитопа для обеспечения достаточной иммуногенности обычно составляет приблизительно 10 аминокислот. Таким образом, минимальная длина пептида обычно составляет приблизительно 10 аминокислот для обес-

печения получения Т-клеточного эпитопа с достаточной иммуногенностью. Согласно некоторым вариантам осуществления пептид имеет длину по меньшей мере 20 аминокислот. Согласно другим вариантам осуществления пептид имеет длину от 30 до 60 аминокислот, что основано на предпочтительной минимальной длине универсального Т-клеточного эпитопа и предпочтении в пептиде, содержащем по меньшей мере два, три или четыре (связанных) универсальных Т-клеточных эпитопа.

Также было обнаружено, что универсальные Т-клеточные эпитопы, подходящие для использования в соответствии с настоящим изобретением, обычно являются гидрофобными. Это создает дополнительные проблемы для их синтеза, очистки и инкапсуляции в липосомы из-за их взаимодействия с липидами. Процент гидрофобности вычисляют путем деления общего числа гидрофобных аминокислот (Phe, Ile, Leu, Met, Val, Trp, Ala и Pro) на общее число аминокислот либо в пептиде в целом, содержащем универсальный Т-клеточный эпитоп (при рассмотрении всего пептида), либо в отдельном Т-клеточном эпитопе (при рассмотрении каждого универсального Т-клеточного эпитопа отдельно) и умножения на 100. Гидрофобные аминокислоты в контексте настоящего изобретения определяются как лейцин (Leu), изолейцин (Ile), фенилаланин (Phe), триптофан (Trp), валин (Val), метионин (Met), пролин (Pro) и аланин (Ala).

Таким образом, в общем, пептид, содержащий универсальный Т-клеточный эпитоп, содержит по меньшей мере 30% гидрофобных аминокислот. Это означает, что по меньшей мере 30% аминокислот в пептиде в целом, содержащем универсальный Т-клеточный эпитоп, являются гидрофобными аминокислотами. Большинство протестированных пептидов, содержащих универсальные Т-клеточные эпитопы, содержат до 50% гидрофобных аминокислот. В некоторых случаях пептид может содержать по меньшей мере 35, 40, 45 или 50% гидрофобных аминокислот.

Для повышения уровней иммуногенности предпочтительно, чтобы вакцинная композиция содержала по меньшей мере два разных универсальных Т-клеточных эпитопа, инкапсулированных внутри липосомы. Из-за липосомальной емкости в сочетании с гидрофобностью пептидов и ограничениями синтеза, в идеале, каждый универсальный Т-клеточный эпитоп обычно имеет длину не более 30 аминокислот, предпочтительно не более 20 аминокислот, и еще более предпочтительно представляет собой область длиной приблизительно 10-20 аминокислот. Как поясняется далее в настоящем документе, авторы настоящего изобретения обнаружили, что более длинные универсальные Т-клеточные эпитопы можно эффективно укоротить до длины 10-20 аминокислот при сохранении иммуногенности. Укороченные пептиды были сконструированы путем селекции в последовательности каждого отдельного Т-клеточного эпитопа наиболее иммуногенной более короткой подпоследовательности, обычно длиной приблизительно 15 аминокислот, на основе предсказанных *in silico* горячих точек Т-клеточного эпитопа. Для выполнения этого анализа доступны различные программные обеспечения, включая платформу для скрининга иммуногенности EpiVax (доступна по ссылке <http://www.epivax.com>). Другие примеры включают SYFPEITHI (см. Hans-Georg Rammensee, Jutta Bachmann, Niels Nikolaus Emmerich, Oskar Alexander Bachor, Stefan Stevanovic: SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. Immunogenetics (1999) 50: 213-219; доступна по ссылке <http://www.syfpeithi.com>), SVMHC (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16844990>) и базу данных IEBD (Vita R, Overton JA, Greenbaum JA, Ponomarenko J, Clark JD, Cantrell JR, Wheeler DK, Gabbard JL, Hix D, Sette A, Peters B. The immune epitope database (IEDB) 3.0. Nucleic Acids Res. 2014 Oct 9. pii: gku938. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25300482; доступна по ссылке <http://www.iedb.org/>).

Согласно некоторым вариантам осуществления каждый универсальный Т-клеточный эпитоп содержит по меньшей мере 30% гидрофобных аминокислот. Это означает, что по меньшей мере 30% аминокислот в отдельном универсальном Т-клеточном эпитопе являются гидрофобными аминокислотами. Для специфических эпитопов это значение может составлять до 80% гидрофобных аминокислот. В некоторых случаях может быть по меньшей мере 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 или 80% гидрофобных аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления максимально может содержаться 80% гидрофобных аминокислот, что означает, что максимальный диапазон может составлять от 30 до 80% гидрофобных аминокислот.

Для того чтобы сбалансировать улучшенную иммуногенность с практическими проблемами инкапсуляции, вакцинная композиция может содержать два, три или четыре разных универсальных Т-клеточных эпитопа, инкапсулированных в носителе. Если инкапсулировано большее количество разных универсальных Т-клеточных эпитопов (особенно 3 или 4), их предпочтительно укоротить до длины приблизительно 10-20 аминокислот, как, например, приблизительно 15 аминокислот. Предпочтительно, чтобы множество разных универсальных Т-клеточных эпитопов были включены в один и тот же пептид, который инкапсулируют. Таким образом, синтетические пептидные конструкции, содержащие множество разных универсальных Т-клеточных эпитопов, представляют собой предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения. Согласно некоторым вариантам осуществления пептид содержит по меньшей мере два разных универсальных Т-клеточных эпитопа. В более конкретных вариантах осуществления пептид содержит два, три или четыре универсальных Т-клеточных эпитопа. Если в синтетическую пептидную конструкцию включены по меньшей мере два универсальных Т-клеточных эпитопа, они могут быть соединены линкером. Линкер используется для физического соединения универсальных Т-клеточных эпитопов друг с другом таким образом, чтобы не снижать иммуногенность связанных эпитопов. Подходящие линкеры для соединения аминокислот друг с другом хорошо известны в данной об-

ласти техники. Предпочтительные линкеры сами по себе являются линкерами на основе аминокислот, то есть пептидными линкерами. Таким образом, они могут соединять универсальные Т-клеточные эпитопы друг с другом посредством пептидных связей. Линкером является линкер, который обеспечивает правильный процессинг универсальных Т-клеточных эпитопов. Презентация антигена молекулами МНС класса II требует проникновения антигенов в эндосомальный-лизосомальный компартмент. Эти антигены затем процессируются протеолитическими ферментами, среди которых лизосомальные цистеиновые протеазы семейства папаина составляют важную подгруппу. Сгенерированные пептиды связываются с молекулами МНС класса II, и затем презентуются на поверхности профессиональных антигенпрезентирующих клеток (АРС), включая макрофаги, дендритные клетки (DC) и В-клетки (Lutzner and Kalbacher 2008). Таким образом, предпочтительно линкер содержит субстрат для лизосомальной цистеиновой протеазы семейства папаина. Линкер может содержать субстрат для одного или нескольких из катепсина S, катепсина В и катепсина L. Согласно некоторым вариантам осуществления линкер содержит, состоит по существу из или состоит из по меньшей мере двух или по меньшей мере трех аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления линкер содержит, состоит по существу из или состоит из аминокислот VVR, TVGLR, KVSVR, PMGAR или PMGLP.

Поэтому пептиды, содержащие два универсальных Т-клеточных эпитопа, могут представлять собой линейные пептиды в форме:

[универсальный Т-клеточный эпитоп 1]-[линкер]-[универсальный Т-клеточный эпитоп 2].

Поэтому пептиды, содержащие три универсальных Т-клеточных эпитопа, могут представлять собой линейные пептиды в форме:

[универсальный Т-клеточный эпитоп 1]-[линкер]-[универсальный Т-клеточный эпитоп 2]-[линкер]-[универсальный Т-клеточный эпитоп 3].

Поэтому пептиды, содержащие четыре универсальных Т-клеточных эпитопа, могут представлять собой линейные пептиды в форме:

[универсальный Т-клеточный эпитоп 1]-[линкер]-[универсальный Т-клеточный эпитоп 2]-[линкер]-[универсальный Т-клеточный эпитоп 3]-[линкер]-[универсальный Т-клеточный эпитоп 4].

Необходимо отметить, что линкеры не должны быть одинаковыми между каждой парой связанных универсальных Т-клеточных эпитопов. Таким образом, например, линкер между универсальным Т-клеточным эпитопом 1 и универсальным Т-клеточным эпитопом 2 может отличаться от линкера между универсальным Т-клеточным эпитопом 2 и универсальным Т-клеточным эпитопом 3. В случае четырех универсальных Т-клеточных эпитопов каждый из трех линкеров может быть отличным, или два линкера могут быть одинаковыми, а третий линкер может быть другим (в любом порядке). Согласно некоторым вариантам осуществления, где в пептид включено множество линкеров, они все являются одинаковыми.

При разработке подходящих пептидов для инкапсуляции авторы настоящего изобретения исследовали ряд источников универсальных Т-клеточных эпитопов. Согласно некоторым вариантам осуществления универсальные Т-клеточные эпитопы происходят из дифтерийного токсина, столбнячного токсина, вируса Эпштейна-Барр, гемагглютинина вируса гриппа и/или гемоцианина лимфы улитки. Поэтому специфические предпочтительные комбинации универсальных Т-клеточных эпитопов выбраны из:

а) комбинации универсального Т-клеточного эпитопа дифтерийного токсина и столбнячного токсина;

б) комбинации универсального Т-клеточного эпитопа вируса Эпштейна-Барр и столбнячного токсина;

с) комбинации универсального Т-клеточного эпитопа вируса Эпштейна-Барр, столбнячного токсина и гемоцианина лимфы улитки; или

д) комбинации универсального Т-клеточного эпитопа гемагглютинина вируса гриппа, дифтерийного токсина, столбнячного токсина и вируса Эпштейна-Барр.

Такие комбинации предпочтительно представлены в форме с линкером, как пояснено выше. Во избежание недопонимания, хотя комбинации предпочтительно включены в указанном порядке, они могут быть включены в альтернативном порядке.

Например, если имеется три универсальных Т-клеточных эпитопа А, В и С, они могут быть включены в любом из порядков АВС, АСВ, ВАС, ВСА, САВ или СВА.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к специфическим пептидам, содержащим множество разных универсальных Т-клеточных эпитопов. Такие пептиды предпочтительно включены в вакцинные композиции согласно настоящему изобретению. Таким образом, пептиды, применяемые согласно настоящему изобретению, содержат, состоят по существу из или состоят из аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1 (SAT42), SEQ ID NO: 2 (SAT43), SEQ ID NO: 3 (SAT44), SEQ ID NO: 4 (SAT47). Композиция этих пептидов пояснена более подробно ниже со ссылкой на табл. 2.

Согласно дополнительному аспекту настоящее изобретение относится к специфическим пептидам, содержащим один универсальный Т-клеточный эпитоп. Такие пептиды предпочтительно включены в вакцинные композиции согласно настоящему изобретению. Таким образом, пептиды, используемые согласно настоящему изобретению, содержат, состоят по существу из или состоят из аминокислотной по-

следовательности, выбранной из SEQ ID NO: 5 (SAT6), SEQ ID NO: 6 (SAT13), SEQ ID NO: 7 (SAT15), SEQ ID NO: 8 (SAT17). Композиция этих пептидов поясняется более подробно ниже со ссылкой на табл. 1. Комбинации этих пептидов, при необходимости укороченных до 10-20 аминокислот в длину, также могут быть включены в вакцинные композиции согласно настоящему изобретению. Комбинированные пептиды предпочтительно соединены одним или несколькими линкерами, как определено в настоящем документе.

Аβ-производный пептидный антиген представлен на поверхности липосомы. Как правило, это осуществляется путем вставки во внешнюю поверхность липосомы. Вставка во внешнюю поверхность липосомы может быть облегчена путем присоединения Аβ-производного пептидного антигена к фрагменту, который вставляется во внешнюю поверхность липосомы. Липосомой может быть любая липосома, которая подходит для представления Аβ-производного пептидного антигена на поверхности, а также инкапсулирует пептид, содержащий универсальный Т-клеточный эпитоп. Как правило, этот фрагмент содержит гидрофобный фрагмент для обеспечения вставки в липидный бислой липосомы. Фрагментом может быть любой подходящий фрагмент, но предпочтительно жирная кислота. Жирная кислота может содержать пальмитоильный остаток. Предпочтительная конструкция, как в АС1-24, содержит Аβ-производный пептидный антиген (Аβ(1-15) в АС1-24), присоединенный к двум пальмитоильным остаткам в N- и C-концевых областях пептида. Таким образом, пептидный антиген является тетрапальмитоилированным. Этому может способствовать включение двух остатков лизина в N- и C-концевые области Аβ-производного пептидного антигена. Остатки лизина пальмитоилированы.

Согласно некоторым вариантам осуществления липосома имеет отрицательный поверхностный заряд, липосома является анионной. Предпочтительно липосома содержит фосфолипиды и, еще более предпочтительно, фосфолипиды содержат димирситоил-фосфатидилхолин (DMPC) и димирситоил-фосфатидилглицерин (DMPG). Липосома может дополнительно содержать холестерин. Молярные соотношения этих трех компонентов могут составлять 9:1:7 согласно некоторым вариантам осуществления.

Поэтому наиболее предпочтительная конструкция содержит Аβ-производный пептидный антиген, восстановленный в липосоме. Соответственно, эти композиции согласно настоящему изобретению в общем можно обозначить в настоящем документе как "липосомальная вакцинная композиция согласно настоящему изобретению".

Аβ-производный пептидный антиген вызывает у субъекта В-клеточный ответ. Он представляет собой "В-клеточный антиген". Как уже пояснено, Аβ бляшки образованы пептидом Аβ длиной от 39 до 43 аминокислот, который в своей природной непатологической форме находится в конформации случайной спирали. При переходе в патологическое состояние он трансформируется в основном во вторичную структуру β-листа, спонтанно агрегируя в нерастворимые бляшки. Таким образом, Аβ-производный пептидный антиген определен в настоящем документе как пептидный антиген, полученный из (максимум) 43 аминокислот бета-амилоида, но который не является полноразмерным Аβ. Более конкретно, Аβ-производный пептидный антиген включает иммунодоминантный В-клеточный эпитоп из Аβ(1-42), но не содержит Т-клеточный эпитоп, обнаруживаемый в Аβ(1-42). Поэтому согласно некоторым вариантам осуществления Аβ-производный пептидный антиген содержит, состоит по существу из или состоит из 13-15 смежных аминокислот из 17 N-концевых аминокислот Аβ. Следует отметить, что Аβ-производный пептидный антиген может быть предоставлен в контексте более крупной пептидной молекулы, остальная часть которой не происходит из аминокислотной последовательности Аβ. Например, пептид может включать дополнительные остатки, такие как остатки лизина, для облегчения пальмитоилирования. Эти остатки обычно находятся на N- и C-концах пептида. В этом контексте термин "состоит по существу из" означает, что Аβ-производный пептидный антиген включает от 13 до 15 смежных аминокислот из 17 N-концевых аминокислот Аβ, но может включать ограниченное число дополнительных остатков, например, четыре остатка лизина, для облегчения пальмитоилирования. Предпочтительный Аβ-производный пептидный антиген содержит, состоит по существу из или состоит из аминокислот 1-15 бета-амилоида, что можно обозначать как "Аβ(1-15)" (WO 2007/068411, АС1-24).

Аβ-производный пептидный антиген, включенный в композиции согласно настоящему изобретению, принимает вторичную структуру, которая воспроизводит патологическую форму Аβ. Предпочтительно Аβ-производный пептидный антиген принимает вторичную структуру, имеющую конформацию β-листа. Еще более предпочтительно Аβ-производный пептидный антиген принимает преимущественно конформацию β-листа, когда представлен на поверхности липосомы.

Композиции согласно настоящему изобретению, как правило, содержат по меньшей мере один адъювант. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения композиции согласно настоящему изобретению содержат два адъюванта. Целью адъюванта (адъювантов) является усиление или стимуляция иммунного ответа у субъекта. Предпочтительно по меньшей мере один адъювант является частью носителя (в отличие от инкапсуляции в носителе). Таким образом, по меньшей мере один адъювант может составлять часть липосомы, он может составлять часть липидного бислоя. Поэтому адъювантом может быть адъювант на основе липида. Адъювант может быть по меньшей мере частично

представлен на поверхности липосомы, что может быть следствием того, что адъювант является частью липидного бислоя. Согласно другому варианту осуществления один или несколько адъювантов, образующих часть липосомы, могут быть комбинированы с инкапсулируемым адъювантом. Согласно другим вариантам осуществления один или несколько адъювантов, образующих часть липосомы, могут быть смешаны с дополнительным адъювантом (таким как Alum или CpG) при формировании липосом. Носитель (липосома) может функционировать как адъювант при добавлении в липосому монофосфориллипида А (MPLA), причем этот термин охватывает производные MPLA, такие как монофосфорилгексаацил-липид А, 3-деацил (синтетический) (3D-(6-ацил) PHAD®), PHAD® (фосфорилированный гексаацилдисахарид), MPL. Таким образом, согласно конкретным вариантам осуществления композиции дополнительно содержат MPLA. MPLA, как правило, добавляют в ходе образования липосом (как описано ниже). Таким образом, предпочтительные липосомы содержат димирситоил-фосфатидилхолин (DMPC), димирситоил-фосфатидилглицерин (DMPG), холестерин и MPLA. Согласно некоторым вариантам осуществления молярные соотношения этих четырех компонентов могут составлять 9:1:7:0,05.

Другие адъюванты, которые можно использовать согласно настоящему изобретению, среди прочего включают гидроксид алюминия (Alum) и/или CpG.

Вакцинные композиции согласно настоящему изобретению вводят субъектам для лечения, профилактики, индукции защитного иммунного ответа против или облегчения симптомов, связанных с заболеванием или состоянием, связанными с бета-амилоидом, или состоянием, характеризующимся потерей когнитивной способности памяти или связанным с ней. Таким образом, вакцинные композиции могут иметь как профилактическое, так и терапевтическое применение. Субъектом является млекопитающее и, как правило, человек.

Связанным с бета-амилоидом заболеванием или состоянием может быть неврологическое нарушение, такое как болезнь Альцгеймера (AD). Другие примеры заболеваний или состояний, связанных с бета-амилоидом, согласно настоящему изобретению включают легкое когнитивное нарушение (MCI), синдром Дауна, кардиальный амилоидоз, церебральную амилоидную ангиопатию (CAA), рассеянный склероз, болезнь Паркинсона, деменцию с тельцами Леви, ALS (боковой амиотрофический склероз), диабет у взрослых, миозит с включенными тельцами (IBM), амилоидоз глаза, глаукому, дегенерацию желтого пятна, решетчатую дистрофию и неврит зрительного нерва. Многие из этих состояний характеризуются потерей когнитивной способности памяти или связаны с ней. Таким образом, состояния, характеризующиеся потерей когнитивной способности памяти или связанные с ней, в соответствии с настоящим изобретением включают AD, легкое когнитивное нарушение (MCI), синдром Дауна, кардиальный амилоидоз, церебральную амилоидную ангиопатию (CAA), рассеянный склероз, болезнь Паркинсона, деменцию с тельцами Леви, ALS (боковой амиотрофический склероз) и миозит с включенными тельцами (IBM).

Соответственно, настоящее изобретение относится к способу лечения, профилактики, индукции защитного иммунного ответа против или облегчения симптомов, связанных с заболеванием или состоянием, связанными с бета-амилоидом, или состоянием, характеризующимся потерей когнитивной способности памяти или связанным с ней, причем способ включает введение субъекту вакцинной композиции согласно настоящему изобретению.

Такие способы также могут быть выполнены в форме медицинского применения вакцинных композиций согласно настоящему изобретению. Соответственно, настоящее изобретение также относится к вакцинной композиции согласно настоящему изобретению для применения для лечения, профилактики, индукции защитного иммунного ответа против или облегчения симптомов, связанных с заболеванием или состоянием, связанным с бета-амилоидом, или состоянием, характеризующимся потерей когнитивной способности памяти или связанным с ней, у субъекта.

Подобным образом, настоящее изобретение относится к применению вакцинных композиций согласно настоящему изобретению для получения лекарственного средства для применения для лечения, профилактики, индукции защитного иммунного ответа против или облегчения симптомов, связанных с заболеванием или состоянием, связанным с бета-амилоидом, или состоянием, характеризующимся потерей когнитивной способности памяти или связанным с ней, у субъекта.

Все варианты осуществления в данном документе относятся к таким способам или медицинским применениям, независимо от их способа выполнения. Введение вакцинной композиции согласно настоящему изобретению субъекту приводит к продукции, как правило поликлональных, антител IgG, которые связываются с патологическими формами A $\beta$ . Как уже пояснено, эти патологические формы A $\beta$  содержат мультимеры  $\beta$ -листа. Поэтому продуцированные антитела можно назвать "A $\beta$ -специфическими" антителами.

Способность антитела связывать антиген-мишень в основном регулируется двумя параметрами, аффинностью и авидностью. Аффинность антитела является мерой силы моновалентного взаимодействия между антителом и его антигеном. Авидность антител включает усиление связывания посредством более чем одной точки взаимодействия между антигеном и антителом. Связывающая способность поликлональных сывороток, индуцированная вакцинацией, зависит от обоих вышеупомянутых параметров (Siegrist, 2013). В общем это называют авидностью поликлонального ответа, поскольку очень трудно

оценить аффинность и avidность независимо друг от друга. Как более подробно пояснено в настоящем документе, см. пример 4 (пункт 4.2), авторы настоящего изобретения разработали анализ ELISA, в котором общее связывание сывороток, содержащих поликлональные антитела, с более низкой и более высокой концентрацией антигена оценивают параллельно (Martineau, 2010). Соотношение между низким и высоким сигналом покрытия (сигнал представляет собой концентрацию связанного антитела) выражен как индекс avidности. Более высокое значение индекса (ближе к 1) указывает на улучшенную общую силу связывания по сравнению с более низким значением индекса (ближе к 0). Увеличение индекса avidности с течением времени указывает на общее созревание avidности индуцированных вакциной антител. В настоящем документе показано (см. пример 4 и фиг. 4), что иммунизация с использованием вакцинных композиций согласно настоящему изобретению, которые содержат инкапсулированный пептид, содержащий универсальный Т-клеточный эпитоп, дает улучшенный эффект созревания по сравнению с иммунизацией с использованием АСИ-24 (без инкапсулированного пептида, содержащего универсальный Т-клеточный эпитоп).

Вакцинные композиции согласно настоящему изобретению можно вводить субъекту любым подходящим способом введения. Как известно специалисту, вакцинные композиции можно вводить местным, пероральным, ректальным, назальным или парентеральным (например, внутривенным, внутрикожным, подкожным или внутримышечным) путями. Кроме того, вакцинные композиции могут быть включены в матрицы с замедленным высвобождением, такие как биоразлагаемые полимеры, причем полимеры имплантируют поблизости от или в непосредственной близости от места, где желательна доставка. Однако согласно предпочтительным вариантам осуществления вакцинную композицию вводят внутримышечно или подкожно.

Вакцинные композиции согласно настоящему изобретению можно вводить субъекту один раз с получением защитного иммунного ответа. Однако согласно некоторым вариантам осуществления вакцинные композиции согласно настоящему изобретению вводят несколько раз одному и тому же субъекту. Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением можно использовать так называемые режимы "прайм-буст". Введение вакцины обычно разделяют промежуточным периодом времени продолжительностью по меньшей мере 1 неделя и часто приблизительно 1-12 месяцев. Не желая связывать себя какой-либо конкретной гипотезой полагают, что вполне вероятно, что добавление универсального Т-клеточного эпитопа к АСИ-24 усиливает иммунный ответ против Аβ посредством обеспечения второго сигнала от активированных Т-клеток, специфичных для когнатного Т-клеточного эпитопа. Вакцинные композиции согласно настоящему изобретению представляют собой новый мощный терапевтический подход для профилактики и лечения связанного с бета-амилоидом заболевания или состояния, такого как AD. Согласно некоторым вариантам осуществления каждый раз вводят одну и ту же вакцинную композицию, что представляет собой гомологичную схему вакцинации. Гомологичная вакцинация относится к режиму иммунизации с использованием одной и той же вакцины как для первичной (первая иммунизация), так и для бустерной (второй или любой последующей иммунизации).

С другой стороны, гетерологичная иммунизация "прайм-буст" требует, чтобы при первичной и по меньшей мере в некоторых последующих иммунизациях использовались разные вакцины. Согласно некоторым вариантам осуществления вакцинные композиции согласно настоящему изобретению вводят несколько раз одному и тому же субъекту в гетерологичной комбинации "прайм-буст" с другими вакцинами "анти-Аβ", несущими пептидные антигены, полученные из любой части белка Аβ, которые могут включать пептидные антигены, полученные за пределами Аβ(1-15) области. Согласно некоторым вариантам осуществления вакцинные композиции согласно настоящему изобретению вводят несколько раз одному и тому же субъекту в гетерологичной комбинации "прайм-буст" с другими вакцинами "анти-Аβ", несущими те же пептидные антигены, которые включены в липосомальные вакцинные композиции согласно настоящему изобретению, которые могут содержать Аβ(1-15) пептидные антигены. Согласно некоторым вариантам осуществления вакцинные композиции согласно настоящему изобретению, предпочтительно содержащие Аβ (1-15) пептидные антигены, вводят несколько раз одному и тому же субъекту в гетерологичной комбинации "прайм-буст" с другими "анти-Аβ" вакцинами, несущими соответствующие Аβ-производные пептидные антигены, предпочтительно Аβ(1-15) пептидные антигены. Примеры "анти-Аβ" вакцин, которые можно вводить при гетерологичной вакцинации "прайм-буст" вместе с вакцинными композициями согласно настоящему изобретению, содержащими Аβ-производные антигены, включают без ограничения вакцину Аβ(1-15)-PADRE (Agadjanyan et al., 2005; Ghochikyan et al., 2006), вакцину Аβ(1-15)-дифтерийный токсин (DT) или вакцину CRM (WO 2010016912), вакцину на основе tandemного повтора лизин-связанного Аβ(1-15) (Maier et al., 2006), вакцину на основе дендримерного Аβ(1-15) (Seabrook et al., 2006), вакцину на основе Аβ(1-15)-DT конъюгата (Liu et al. 2013), вакцину на основе Аβ(1-6), связанного с бактериофагом QP, покрытым белком (Windblad et al. 2012), вакцину Аβ(1-7)-CRM (Arai et al. 2015), вакцину Nterm Аβ-KLH (Schneeberger et al. 2010).

Кроме того, настоящее изобретение относится к наборам, содержащим вакцинные композиции согласно настоящему изобретению. Соответственно, настоящее изобретение относится к набору для лечения, профилактики, индукции защитного иммунного ответа против или облегчения симптомов, связан-

ных с заболеванием или состоянием, связанными с бета-амилоидом, или состоянием, характеризующимся потерей когнитивной способности памяти или связанным с ней, содержащему (липосомальную) вакцинную композицию согласно настоящему изобретению, как описано в настоящем документе. Такие наборы могут быть снабжены подходящими инструкциями по применению. Инструкции по применению могут пояснять график введения композиций. Следовательно, наборы могут включать несколько (отдельных) доз вакцинных композиций согласно настоящему изобретению. Инструкции по применению могут дополнительно пояснять условия хранения композиций, особенно в течение периода времени между введением доз вакцинных композиций. Эти наборы могут применяться для всех релевантных способов согласно настоящему изобретению, как раскрыто в настоящем документе.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу получения липосомальных вакцинных композиций согласно настоящему изобретению. Такие способы могут предусматривать следующие стадии:

- a) получение липидной пленки;
- b) регидратация липидной пленки в буфере, содержащем пептид, содержащий универсальный Т-клеточный эпитоп;
- c) получение липосом из регидратированной липидной пленки, которая инкапсулирует пептид, содержащий универсальный Т-клеточный эпитоп, с образованием раствора, содержащего липосомы, которые содержат инкапсулированный универсальный Т-клеточный эпитоп;
- d) добавление  $\beta$ -амилоид (А $\beta$ )-производного пептидного антигена в раствор и поддержание раствора в условиях, приводящих к вставке  $\beta$ -амилоид (А $\beta$ )-производного пептидного антигена в липидный бислой липосом.

В настоящем документе приведены примеры таких способов, признаки которых могут быть применены к этим аспектам настоящего изобретения. В общем, способы могут предусматривать образование тонкой липидной пленки с последующей гомогенизацией и экструзией. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления липидную пленку получают путем растворения липида в этаноле и последующего выпаривания этанола в вакууме. Предпочтительные липидные компоненты пояснены в отношении липосомальных вакцинных композиций согласно настоящему изобретению и включают DMPC, DMPG, холестерин и MPLA (в качестве адьюванта). Молярные соотношения этих компонентов могут составлять 9:1:7:0,05. Такие молярные соотношения также применимы к липосомальным вакцинным композициям согласно настоящему изобретению. Возможно потребуется солиubilизация липидных компонентов при повышенной температуре. Повышенная температура может составлять от 40 до 80°C, как например приблизительно 60°C.

На стадии b буфер, используемый для регидратации, может зависеть от используемого пептида, содержащего универсальный Т-клеточный эпитоп. В общем можно использовать любой подходящий буфер. Согласно некоторым вариантам осуществления буфер включает ацетат натрия или PBS. Если SAT42 должен быть инкапсулирован, то буфером может быть ацетат натрия. Если необходимо инкапсулировать один или несколько из SAT43, SAT44 или SAT47, буфером может быть PBS. Во всех случаях к буферу можно добавить DMSO, как например 5% DMSO. Регидратацию можно проводить при перемешивании образца.

На стадии c липосомы могут быть получены путем встряхивания в присутствии шариков. Можно использовать любые подходящие шарики. Например, шарики могут быть стеклянными. На этой стадии могут образовываться многослойные везикулы, которые впоследствии превращаются в липосомы, содержащие липидный бислой. Это превращение может происходить в течение нескольких, как например 5-15, предпочтительно 10 циклов замораживания-оттаивания. За циклами замораживания-оттаивания может следовать гомогенизация. За этим может последовать экструзия по размеру. Согласно некоторым вариантам осуществления липосомы выдавливаю через поры с диаметром (или максимальным размером) приблизительно 0,08-0,1 мкм. Это может быть осуществлено посредством мембраны, такой как поликарбонатная мембрана. Экструдированные липосомы можно концентрировать, например, используя форму фильтрации, такую как ультрафильтрация.

Стадия d приводит к вставке  $\beta$ -амилоид (А $\beta$ )-производного пептидного антигена в липидный бислой липосом. Необходимые условия могут включать перемешивание в течение 10-60 мин, как например приблизительно 30 мин, при температуре 25-35°C, как например приблизительно 30°C. Предпочтительным  $\beta$ -амилоид (А $\beta$ )-производным пептидным антигеном является тетрапальмитоилированный пептид, содержащий А $\beta$ 1-15. Этот пептид включает по два остатка лизина на каждом конце с образованием тетрапальмитоилированного пептида. Пептид можно предварительно растворить в гидрофосфате динатрия перед впрыском в липосомальный раствор.

Способ может дополнительно предусматривать фильтрацию вакцинной композиции в качестве заключительной стадии. Она может быть проведена в стерильных условиях. Фильтрация может быть проведена через мембрану с размером пор 0,2 мкм. Подходящие мембраны включают мембраны из простого полиэфирсульфона (PES), которые могут быть выполнены в форме шприцевого фильтра. Затем полученную вакцинную композицию можно хранить в подходящих условиях до использования, например, в хо-

лодильнике (например, при температуре около 5°C).

Альтернативные способы получения липосомальных вакцинных композиций согласно настоящему изобретению могут основываться на впрыске поперечного потока, как проиллюстрировано в настоящем документе. Соответственно, настоящее изобретение также относится к способам получения липосомальных вакцинных композиций согласно настоящему изобретению путем впрыска поперечного потока. Эти способы могут быть особенно применимы к композициям, инкапсулирующим SAT44 или SAT47. Такие способы могут предусматривать следующие стадии:

- a) растворение липидов (и адьюванта, если он основан на липиде), образующих липосомы, в растворе;
- b) растворение пептида, содержащего универсальный Т-клеточный эпитоп, в растворе;
- c) смешивание растворов со стадий a и b, с использованием модуля впрыска поперечного потока, с образованием промежуточных липосом, которые инкапсулируют пептид, содержащий универсальный Т-клеточный эпитоп;
- d) экструзию промежуточных липосом через мембрану для уменьшения их размера и полидисперсности;
- e) смешивание раствора, содержащего  $\beta$ -амилоид (А $\beta$ )-производный пептидный антиген, с раствором, полученным на стадии d, с использованием модуля впрыска поперечного потока, что приводит к вставке  $\beta$ -амилоида (А $\beta$ )-производного пептидного антигена в липидный бислой липосом.

В данном документе приведены примеры таких способов, признаки которых могут быть применены к этим аспектам настоящего изобретения. В общих чертах, в способах используют впрыск поперечного потока для инкапсуляции пептида, содержащего универсальный Т-клеточный эпитоп, и для вставки  $\beta$ -амилоид (А $\beta$ )-производного пептидного антигена в липидный бислой липосом.

На стадии a липиды (которые могут содержать адьювант, такой как адьювант MPLA, как описано в настоящем документе) обычно растворяют в этаноле. Этанолом может быть 90-100% этанол, например, 96% этанол. Растворение можно ускорить при нагревании, например, до температуры от 40 до 80°C, как например приблизительно 60°C. Предпочтительные липидные компоненты пояснены в отношении липосомальных вакцинных композиций согласно настоящему изобретению и включают DMPC, DMPG, холестерин и MPLA (в качестве адьюванта). Молярные соотношения этих компонентов могут составлять 9:1:7:0,05. Такие молярные соотношения также применимы к липосомальным вакцинным композициям согласно настоящему изобретению.

На стадии b пептид, содержащий универсальный Т-клеточный эпитоп, растворяют. Пептид можно растворить в подходящем буфере (таком как His-сахарозный буфер) с помощью агитации, такой как обработка ультразвуком, согласно некоторым вариантам осуществления.

На стадии c растворы со стадий a и b смешивают с использованием модуля для впрыска поперечного потока с образованием промежуточных липосом, которые инкапсулируют пептид, содержащий универсальный Т-клеточный эпитоп. Перед этой стадией растворы со стадий a и b могут быть подвергнуты фильтрации. Подходящий размер пор для фильтра может составлять около 0,2 мкм. Растворы можно использовать в любой подходящей концентрации. После фильтрации растворы можно нагреть до температуры от 30 до 60°C, как, например, приблизительно 40°C. Липосомы образуются путем впрыска двух растворов (со стадий a и b) через модуль поперечного потока (где встречаются 2 раствора). Обычно это проводят при определенной скорости потока и температуре, как легко понять специалисту (подходящие температуры указаны выше). Согласно некоторым вариантам осуществления после образования липосом может быть добавлен буфер, обычно для снижения концентрации этанола. Можно использовать любой подходящий буфер, такой как His-сахарозный буфер.

На стадии d промежуточные липосомы экструзируют через мембрану для уменьшения их размера и полидисперсности. Образованные липосомы в растворе инкапсулируют пептид, составляющий универсальный Т-клеточный эпитоп. Можно использовать любую подходящую мембрану. Подходящий размер пор может составлять около 100 нм. Подходящим типом мембраны является поликарбонатная мембрана. Эту стадию можно проводить при любой подходящей температуре, предпочтительно при комнатной температуре (например, приблизительно 25°C). После этой стадии может быть проведена стадия фильтрации, такая как ультра/диафильтрация, для удаления этанола. Для этой стадии можно использовать любую подходящую мембрану, такую как полуволоконная мембрана с отсекаемой молекулярной массой приблизительно 500 кДа. Стадию замены буфера можно выполнять в дисперсном буфере. Предпочтительным дисперсным буфером является PBS. PBS может иметь подходящее значение pH, такое как от 6 до 8, в частности, около 6,9. Для этого может потребоваться от 5 до 15, например, приблизительно 10 обменов объема. Перед стадией e липосомы можно разбавить в дисперсном буфере до желаемой концентрации. Желаемая концентрация может находиться в диапазоне 0,1-10 мг/мл, например, приблизительно 1 мг/мл. Перед стадией e содержащий липосомы раствор можно нагреть до подходящей температуры, например, от 30 до 60°C, предпочтительно приблизительно 35°C.

Стадия e предусматривает смешивание раствора, содержащего  $\beta$ -амилоид (А $\beta$ )-производный пептидный антиген, с раствором со стадии d с использованием модуля впрыска поперечного потока. Как

раскрывается в настоящем документе,  $\beta$ -амилоид (A $\beta$ )-производный пептидный антиген предпочтительно является липидированным (например, тетрапальмитоилированным), что применяется с соответствующими изменениями. Перед смешиванием  $\beta$ -амилоид (A $\beta$ )-производный пептидный антиген обычно растворяют в подходящем буферном растворе, таком как 10% об./мас. раствор Beta-OG в буфере 10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 11,4. Раствор обычно нагревают до подходящей температуры, например, до температуры от 30 до 80°C, такой как приблизительно 60°C. При необходимости раствор можно дополнительно разбавить для обеспечения подходящей концентрации  $\beta$ -амилоид (A $\beta$ )-производного пептидного антигена. Подходящая концентрация может находиться в диапазоне 0,1-10 мг/мл, например, приблизительно 1 мг/мл. Значение pH обычно поддерживают в диапазоне 11-12, например, приблизительно 11, предпочтительно 11,4. Смешивание раствора, содержащего  $\beta$ -амилоид (A $\beta$ )-производный пептидный антиген, с раствором со стадии d с использованием модуля впрыска поперечного потока приводит к вставке  $\beta$ -амилоид (A $\beta$ )-производного пептидного антигена во внешний липидный бислой липосом. Смесь можно инкубировать в течение фиксированного периода времени при подходящей температуре, чтобы облегчить вставку  $\beta$ -амилоид (A $\beta$ )-производного пептидного антигена в липидный бислой липосом. Подходящий период времени может находиться в диапазоне 20-120 мин, например, приблизительно 30 мин. Подходящая температура может составлять от 30 до 60°C, предпочтительно приблизительно 35°C. Инкубацию можно проводить при агитации, например, при перемешивании.

После стадии e продукт может быть извлечен для включения в композиции согласно настоящему изобретению. Таким образом, продукт может быть составлен в виде липосомальной вакцинной композиции согласно настоящему изобретению. Это может включать стадию ультра/диафильтрации для удаления бета-OG из буферного раствора. Для этой стадии можно использовать любую подходящую мембрану, такую как полуволоконная мембрана с отсекаемой молекулярной массой около 500 кДа. Ультра/диафильтрация может предусматривать стадию замены буфера на конечный буфер. Предпочтительным конечным буфером является His-сахарозный буфер, который может содержать 10 мМ гистидин, 250 мМ сахарозу. Для этого может потребоваться от 5 до 15, например, приблизительно 10 обменных объема. Для достижения предпочтительного конечного объема может быть проведена стадия концентрирования. Также может быть проведена стадия заключительной (стерильной) фильтрации. На этой стадии можно использовать картриджный фильтр. Стадию фильтрации можно проводить через фильтр с любым подходящим размером пор, например, приблизительно 0,2 мкм. Фильтрацию можно производить в стерильных условиях. Затем полученную вакцинную композицию можно хранить в подходящих условиях до использования, например, в холодильнике (например, при температуре около 5°C).

#### Краткое описание чертежей

Фиг 1. (А) Анализ A $\beta$ 1-42-специфических IgG антител посредством ELISA в плазме мышей C57BL/6 на день 21 (ACI-24.046) или день 7 (ACI-24, ACI-24.043, ACI-24.044) до (забор крови до иммунизации) и на дни 7, 21 и 35 после 1<sup>ой</sup> иммунизации указанными вакцинами (стрелки указывают моменты времени иммунизации). Результаты выражены в виде геометрического среднего значения с доверительным интервалом +/- 95% (CI) в нг/мл для n=5 мышей на группу. Ось X показывает дни обработок/забора крови, а ось Y показывает титры антител, выраженные в нг/мл. (В) Анализ A $\beta$ 1-42-специфических IgG антител посредством ELISA в плазме мышей C57BL/6 на день 21 (ACI-24.046) или день 7 (ACI-24, ACI-24.043, ACI-24.044) до (забор крови до иммунизации) и день 21 после 1<sup>ой</sup> иммунизации указанными вакцинами. Результаты выражены в виде геометрического среднего значения с доверительным интервалом +/- 95% CI в нг/мл для n=5 мышей на группу. Статистический критерий среди разных групп на 21 день: критерий Крускала-Уоллиса с множественными сравнениями Данна. \* p<0,05; \*\* p<0,01. Ось X показывает индивидуальную плазму из групп, иммунизированных указанными вакцинами, тогда как ось Y показывает титры антител, выраженные в нг/мл.

Фиг 2. (А) Анализ ингибирования самоассоциации A $\beta$ 1-42 посредством анализа ELISA антител IgG в плазме мышей C57BL/6 на день 21 или день 7 до (пунктирные линии) и день 21 после 1<sup>ой</sup> иммунизации (жирные линии) указанными вакцинами. Результаты выражены в виде среднего значения +/- стандартное отклонение для 5 мышей на группу в отношении процента ингибирования самоассоциации A $\beta$ 1-42. Ось X показывает серийные разведения плазмы, тогда как ось Y показывает процент ингибирования самоассоциации A $\beta$ 1-42. (В) Ингибирование самоассоциации A $\beta$ 1-42, показанное как процент (%) ингибирования на день 21 минус % ингибирования на день -21 или день -7 (базовое значение - забор крови до иммунизации) при разведении плазмы 1/25. Ось X показывает группы, обработанные указанными вакцинами, тогда как ось Y показывает процент ингибирования самоассоциации A $\beta$ 1-42 после вычитания базового значения.

Фиг 3. Анализ специфических для олигомера A $\beta$ 1-42 антител IgG посредством ELISA в плазме мышей C57BL/6 на день 21 (ACI-24.046) или день 7 (ACI-24, ACI-24.043, ACI-24.044) до и день 21 после 1<sup>ой</sup> иммунизации указанными вакцинами. Результаты выражены в виде геометрического среднего значения с доверительным интервалом +/- 95% CI в нг/мл для 5 мышей на группу. Статистический критерий среди разных групп на день 21: критерий Крускала-Уоллиса с множественными сравнениями Данна. \* p<0,05; \*\* p<0,01. Ось X показывает группы, иммунизированные указанными вакцинами, тогда как ось

Y показывает титры антител, выраженные в нг/мл.

Фиг 4. Анализ A $\beta$ 1-42 - avidности антител IgG посредством ELISA в плазме мышей C57BL/6 на дни 7 и 21 после 1<sup>ой</sup> иммунизации указанными вакцинами. Результаты выражены в виде геометрического среднего значения с доверительным интервалом +/- 95% CI для индекса avidности для 5 мышей на группу. Статистический критерий среди разных групп на день 21: критерий Крускала-Уоллиса с множественными сравнениями Данна. \* p<0,05; \*\* p<0,01. Ось X показывает группы, иммунизированные указанными вакцинами, тогда как ось Y показывает индекс avidности.

Фиг 5. Анализ специфических для олигомера A $\beta$  антител посредством MSD в сыворотке яванских макаков до первой иммунизацией (день 1) и через 1 неделю после третьей иммунизации (день 64) у макаков, иммунизированных ACI-24.046 (SAT44, n=8), ACI-24.045 (SAT43, n=4) или ACI-24.043 (SAT47, n=4). Результаты выражены в виде геометрического среднего значения с доверительным интервалом +/- 95% CI в AU/мл. Ось X показывает индивидуальную плазму из групп, иммунизированных указанными вакцинами, тогда как ось Y показывает титры антител, выраженные в AU/мл.

Фиг 6. Анализ A $\beta$ 1-42-специфических IgG антител посредством ELISA в плазме мышей C57BL/6 через 7 дней после 3<sup>ей</sup> иммунизации (день 36) вакцинами ACI-24 и ACI-24.046 (SAT44) (A) или вакцинами ACI-24 и ACI-24.043 (SAT47) (B). Результаты выражены в виде геометрического среднего значения с доверительным интервалом +/- 95% CI в нг/мл для n=10 мышей на группу. Ось X показывает вакцины, использованные для иммунизации каждой конкретной группы, а ось Y показывает титры антител, выраженные в нг/мл. статистический критерий: критерий Манна-Уитни между ACI-24 и указанной вакциной. \*p<0,05; \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.

Таблица аббревиатур

ABTS	2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоная кислота)
A $\beta$	бета-амилоид (abeta)
Ac2O	уксусный ангидрид
AD	болезнь Альцгеймера
AP	щелочная фосфатаза
APC	антигенпрезентирующие клетки
BSA	бычий сывороточный альбумин
AU/мл	произвольные единицы/мл
CI	доверительный интервал
DMF	диметилформамид
DMPC	1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин
DMPG	1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфорилглицерин

DMSO	диметилсульфоксид
ELISA	ферментный иммуносорбентный анализ
HLA	антиген лейкоцитов человека
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
HRP	пероксидаза хрена
Ig	иммуноглобулин
KLH	гемоцианин лимфы улитки
MPLA	монофосфорил-липид А
МС	масс-спектрометрия
MSD	среднемасштабное выявление (Meso Scale Discovery)
Pal1-15	тетрапальмитоилированный A $\beta$ 1-15
PBS	фосфатно-буферный солевой раствор
PES	простой полиэфирсульфон
pNPP	п-нитрофенилфосфат
s.c.	подкожно
TMB	тетраметилбензидин
TFA	трифторуксусная кислота
TIS	триизопропилсилан
TLR4	Toll-подобный рецептор 4
Beta-OG	н-октил- $\beta$ -D-глюкопиранозид

Настоящее изобретение станет более понятно посредством следующих неограничивающих примеров.

#### Пример 1. Конструирование новых Т-клеточных эпитопов.

Способность Т-клеточного эпитопа активировать Т-клетки (индекс иммуногенности) является результатом двух взаимодополняющих свойств: i) аффинности с HLA, а также ii) его способности связывать различные гаплотипы HLA неизбирательным образом. Оценку *in silico* (EpiVax) нескольких Т-клеточных эпитопов различного происхождения выполняли с целью выбора пептидов с наивысшим индексом иммуногенности. На предварительной стадии оценивали 10 различных пептидов разного происхождения (гемоцианин лимфы улитки-KLH, дифтерийный токсин, вирус гриппа, вирус Эпштейна-Барр и вирус герпеса). Пептиды с наилучшим индексом иммуногенности (выше 10) были отобраны на основе их возможной высокой иммуногенности у людей, исходя из их предсказанной аффинности с HLA и охвата гаплотипов HLA (выбранные пептидные последовательности показаны в табл. 1).

Таблица 1

Название	Последовательность	Происхождение пептида
SAT6	STLEYFLYDPIFFLHHSNTDRLWAIWQAL QKYRGKPYNTANCAIVRHDTY (SEQ ID NO: 5)	KLH
SAT13	VHHNTEEEIVAQSIALLSLMV (SEQ ID NO: 6)	Дифтерийный токсин
SAT15	IDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSL (SEQ ID NO: 7)	Гемагглютинин вируса гриппа
SAT17	VYGGSKTSLYNLRRGTALAI (SEQ ID NO: 8)	Вирус Эпштейна-Барр

Согласно результатам скрининга отдельных пептидов конструировали комбинированные смешанные пептиды, состоящие из 2 или 3 иммуногенных Т-клеточных эпитопов разного происхождения (названные SAT42, SAT43 и SAT44), и смешанные пептиды, состоящие из укороченных пептидов (например, SAT47 и SAT43) (табл. 2). Укороченные пептиды конструировали путем выбора в последовательности каждого отдельного Т-клеточного эпитопа наиболее иммуногенной 15-мерной пептидной последовательности на основе предсказанных *in silico* горячих точек Т-клеточного эпитопа. Задача состояла в увеличении индекса иммуногенности без увеличения размера конечного смешанного пептида из-за ограничений пептидного синтеза и способа инкапсуляции вакцины. Вкратце, выход пептидного синтеза и вероятность успеха снижаются с увеличением длины пептидов, особенно до длины более 30 аминокислот, и, кроме того, пептиды состоят в основном из гидрофобных остатков, как раскрыто в настоящем документе для пептидов Т-клеточных эпитопов. Кроме того, коэффициент инкапсуляции пептида снижается с увеличением длины пептида, поскольку шансы разместить его в просвете липосом уменьшаются по мере увеличения длины пептида. Индекс иммуногенности *in silico* этих 4 смешанных Т-клеточных эпитопов был очень высоким и, что важно, выше, чем у однокомпонентных пептидов, что подтверждает, что объединение пептидов различного происхождения может улучшить аффинность с HLA и охват гаплотипов HLA (последовательности смешанных Т-клеточных эпитопов приведены в табл. 2).

Таблица 2

Название	Последовательность	Модель пептида	Происхождение пептида
SAT42	VHHNTEEIVAQSIALLSSLMVPMG APQYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO: 1)	SAT13+PMGAP+ Столбнячный токсин	Дифтерийный токсин+Столбняч- ный токсин
SAT43	VYGGSKTSLYNLRRGTALAIVV RQYIKANSKFIGITELVVRPIFFLH HSNTDRLWAI (SEQ ID NO: 2)	SAT17+VVR+ Столбнячный токсин+ VVR+ SAT6	Вирус Эпштейна- Барр+ Столбнячный токсин+ KLH
SAT44	VYGGSKTSLYNLRRGTALAIVV RQYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO: 3)	SAT17+VVR+ Столбнячный токсин	Вирус Эпштейна- Барр+ Столбнячный токсин
SAT47	SMGVYQILAIYSTVVRIVAQSIALL SSVRYIKANSKFIGVVRLYNLR RGTAL (SEQ ID NO: 4)	SAT15+VVR+SA T13+VVR+Столб нячный токсин+ VVR+ SAT17	Гемагглютинин вируса гриппа+ Дифтерийный токсин+Столбняч- ный токсин+ Вирус Эпштейна- Барр

Пример 2. Синтез и составление вакцины.

Общий способ синтеза и очистки пептида универсального Т-клеточного эпитопа.

Т-клеточные пептиды получали линейным твердофазным пептидным синтезом (SPPS) на 2-хлортритиловой смоле с использованием стандартной химической методики Fmoc. Стандартную методику связывания выполняли с использованием 3,0 эквивалентов аминокислоты и связывающего реагента в присутствии 3,0 эквивалентов основания в DMF в течение 1 ч при комнатной температуре. Для сложных для связывания последовательностей применяли двойное связывание с увеличенным временем реакции. После завершения аминокислотного связывания проводили стадию кэппирования - ацетилирования с использованием 5,0 эквивалентов Ac<sub>2</sub>O в пиридине для прекращения нежелательного удлинения пептидной цепи. Смолу промывали DMF, и группу Fmoc удаляли, используя 20% пиперидин в DMF в течение 5 мин. После завершения SPPS выполняли общее удаление защитной группы и отщепляли пептид от смолы с использованием стандартного раствора для отщепления продукта (TFA/TIS/вода) в течение 2 ч при комнатной температуре. Смолу фильтровали и промывали TFA. Затем неочищенный продукт осаждали 10-кратным избыточным объемом холодного простого изопропилового эфира/гексана, и твердое вещество отфильтровывали с использованием стеклянной фритты и сушили в вакууме. Неочищенный пептид очищали на колонке с обращенной фазой C18, используя градиент растворителя А (вода, 0,1% TFA) и растворителя В (ацетонитрил, 0,1% TFA) в системе препаративной ВЭЖХ. Фракции ВЭЖХ, содержащие желаемый пептид с чистотой выше 90%, объединяли, разбавляли водой и подвергали ионному обмену. Желаемые ионообменные фракции лиофилизировали. Идентичность и чистоту конечного пептида определяли и подтверждали посредством анализа ВЭЖХ-МС.

Получение вакцин ACI-24.043/ACI-24.044/ACI-24.045/ACI-24.046/ (тонкая липидная пленка).

Вакцины, содержащие инкапсулированный пептид Т-клеточных эпитопов, получали методом тонких липидных пленок с последующей гомогенизацией и экструзией. Прежде всего посредством солюбилизации DMPC, DMPG (Lipoid, Germany), холестерина и монофосфорилгексаацил-липид А, 3-деацилсинтетического или 3D-(6-ацил) PHAD™ (Avanti Polar Lipids, США) при молярных соотношениях 9:1:7:0,05 в этаноле при 60°C, соответственно. Этанол выпаривали на вакуумном роторном испарителе с получением тонкой липидной пленки.

Липидную пленку регидратировали одним из следующих буферов (в зависимости от пептида Т-

клеточного эпитопа, который необходимо инкапсулировать):

20 мМ ацетат натрия, рН 4 (Fluka), 5% DMSO (Sigma Aldrich) в воде MilliQ, содержащий 0,8 мг/мл пептида Т-клеточного эпитопа SAT42, или

0,1 × PBS, рН 7,4, 5% DMSO (все Sigma-Aldrich) в воде MilliQ, содержащий 0,3-0,4 мг/мл пептида Т-клеточного эпитопа SAT43, SAT44 или SAT47.

Раствор осторожно перемешивали в течение 15 мин. Затем образец интенсивно встряхивали в присутствии стеклянных шариков. Полученные многослойные везикулы подвергали 10 циклам замораживания-оттаивания (жидкий N<sub>2</sub> и водяная баня при 37°C) и подвергали гомогенизации с последующей последовательной экструзией через поликарбонатные мембраны (Whatman, UK) с размером пор 0,1/0,08 мкм. Обе стадии гомогенизации и экструзии были выполнены с использованием EmulsiFlex-C5 (Avestin, Canada). Экструдированные липосомы концентрировали ультрафильтрацией, и буфер заменяли на PBS, рН 7,4, посредством диафильтрации (10-кратный обмен). Полученные липосомы разбавляли в PBS, рН 7,4 и нагревали до 30°C перед добавлением Pal1-15.

Тетрапальмитоилированный пептид человека Pal1-15 (Bachem AG, USA) растворяли в 10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, рН 11,4, в воде MilliQ с 1% β-OG (Sigma-Aldrich, США), впрыскивали в липосомальный раствор при 30°C и перемешивали в течение 30 мин с последующими стадиями концентрирования посредством ультрафильтрации и разбавления в PBS, рН 7,4, посредством диафильтрации. Затем полученные липосомы стерильно фильтровали, пропуская через шприцевые фильтры с мембраной из простого полиэфирсульфона (PES) 0,2 мкм, и хранили при 5°C.

Получение вакцины ACI-24.043 (впрыск поперечного потока).

Липиды (DMPG, DMPC, холестерин и 3D-(6-ацил) PHAD™ (Avanti Polar Lipids, USA)) растворяли в 96% EtOH в нагревательном шкафу при 60°C. После полного растворения липидов раствор фильтровали через фильтр с размером пор 0,2 мкм в систему впрыска, которую нагревали до 60°C. Подробно, соответствующее количество ACI-24.043 (SAT47) диспергировали в EtOH при комнатной температуре с помощью обработки ультразвуком (концентрация EtOH, как правило, составляет 2% об./об. от конечного раствора SAT47). После завершения диспергирования пептида добавляли His-сахарозный буфер (10 мМ гистидин, 250 мМ сахароза) с достижением массового соотношения лекарственного средства и липида 1/50. Раствор SAT47 фильтровали через фильтр с размером пор 0,2 мкм (фильтр Sartoscale) в сосуд для впрыска буфера, который затем нагревали до 40°C. Липосомы образовывались в месте впрыска, когда раствор липид/EtOH и впрыскиваемый буфер смешивались. Сразу после образования липосом проводили оперативную стадию разбавления с применением 10 мМ гистидина, 250 мМ сахарозы, для уменьшения концентрации EtOH. Промежуточные липосомы экструдировали через поликарбонатные мембраны с размером пор 100 нм (1 проход) при комнатной температуре. Ультра-/диафильтрацию (UDF) с применением полволоконной мембраны (MWCO: 500 кДа) проводили для удаления EtOH, и буфер обменивали на PBS, рН 6,9 (10 обменов объема). Липосомы SAT47 затем разбавляли с применением дисперсного буфера (PBS, рН 6,9) до общей концентрации липидов, равной 1 мг/мл, и нагревали до 35°C. Pal1-15 растворяли в 10% мас./об. растворе бета-OG в буфере 10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, рН 11,4, при 60°C, и затем растворяли тем же буфером до конечной концентрации 1 мг/мл. Значение рН доводили до 11,4. После смешивания этих двух растворов с применением модуля впрыска поперечного потока, липосомальную суспензию затем инкубировали при 35°C в течение 30 мин при перемешивании с обеспечением полной вставки Pal1-15. Вторую стадию UDF с применением полволоконной мембраны (MWCO: 500 кДа) проводили для удаления бета-OG и обмена буфера на 10 мМ гистидин, 250 мМ сахарозу (10 обменов объема). Продукт концентрировали до его конечного объема и фильтровали через шприцевые фильтры 0,2 мкм Ascodisc mPES.

Получение вакцины ACI-24.046 (впрыск поперечного потока).

Липиды (DMPG, DMPC, холестерин и 3D-(6-ацил) PHAD™ (Avanti Polar Lipids, USA)) растворяли в 96% EtOH в нагревательном шкафу при 60°C. После полного растворения липидов раствор фильтровали через фильтр с размером пор 0,2 мкм в систему впрыска, которую нагревали до 60°C. Одновременно ACI-24.046 (SAT44) растворяли в буфере для впрыска (10 мМ гистидина, 250 мМ сахарозы) при 40°C. После завершения растворения SAT44, раствор фильтровали через фильтр с размером пор 0,2 мкм (Sartoscale) в сосуд для впрыска буфера, который нагревали до 40°C. Липосомы образовывались в месте впрыска, когда раствор липид/EtOH и впрыскиваемый буфер смешивались. Сразу после образования липосом проводили оперативную стадию разбавления с применением 10 мМ гистидина, 250 мМ сахарозы, для уменьшения концентрации EtOH. Промежуточные липосомы экструдировали через поликарбонатные мембраны с размером пор 100 нм (1 проход) при комнатной температуре. Ультра-/диафильтрацию (UDF) с применением полволоконной мембраны (MWCO: 500 кДа) проводили для удаления EtOH, и буфер обменивали на PBS, рН 6,9 (10 обменов объема). Липосомы SAT44 затем разбавляли с применением дисперсного буфера (PBS, рН 6,9) до общей концентрации липидов, равной 1 мг/мл, и нагревали до 35°C. Pal1-15 растворяли в 10% мас./об. растворе бета-OG в буфере 10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, рН 11,4, при 60°C, и затем растворяли тем же буфером до конечной концентрации 1 мг/мл. Значение рН проверяли и аккуратно доводили до 11,4. После смешивания этих двух растворов с применением модуля для впрыска, липосо-

мальную суспензию затем инкубировали при 35°C в течение 30 мин при перемешивании с обеспечением полной вставки Pall-15. Вторую стадию UDF с применением полуволоконной мембраны (MWCO: 500 кДа) проводили для удаления бета-ОГ и обмена буфера на 10 мМ гистидин, 250 мМ сахарозу (10 обменных объема). Продукт концентрировали до его конечного объема и фильтровали через шприцевые фильтры 0,2 мкм Acrodisc mPES.

Пример 3. Концептуальные (PoC) *in vivo* исследования иммуногенности вакцин с инкапсулированными Т-клеточными эпитопами.

После успешной инкапсуляции различных Т-клеточных эпитопов иммуногенность вакцин, содержащих инкапсулированные Т-клеточные эпитопы с высоким индексом иммуногенности SAT42, SAT44 и SAT47 (вакцины ACI-24.044, ACI-24.046 и ACI-24.043 соответственно), исследовали *in vivo* по сравнению с вакциной ACI-24. Мышам C57BL/6 дикого типа вводили в общей сложности три подкожных (s.c.) иммунизации на дни 0, 14 и 28 вакцин ACI-24, ACI-24.044 (с инкапсулированным SAT42), ACI-24.046 (с инкапсулированным SAT44) и ACI-24.043 (с инкапсулированным SAT47). Образцы крови брали на день -21 (ACI-24.046) или день -7 (ACI-24, ACI-24.043, ACI-24.044) (забор крови до иммунизации), и дни 7, 21 и 35 для измерения титров Аβ1-42-специфических IgG посредством ELISA.

Планшеты покрывали 10 мкг/мл пептидной пленки человеческого Аβ1-42 (Bachem, Switzerland) на всю ночь при 4°C. После промывания 0,05% Tween 20/PBS и блокирования с помощью 1% BSA/0,05% Tween/PBS на планшеты добавляли серийные разведения плазмы и инкубировали при 37°C в течение 2 ч. После промывки планшеты инкубировали с конъюгированными с щелочной фосфатазой (AP) антителами против мышинового IgG (Jackson ImmunoResearch, PA, USA) в течение 2 ч при 37°C. После окончательной промывки планшеты инкубировали в течение 2,5 ч с субстратом AP (pNPP) и считывали при 405 нм с использованием планшетного ридера для ELISA. Результаты выражены со ссылкой на серийные разведения коммерчески доступного антитела (6E10, Biolegend, UK, кат. № 803002). На фиг. 1А показаны титры Аβ1-42-специфического IgG, индуцированные вакциной ACI-24 с инкапсулированным Т-клеточным эпитопом или без него, в зависимости от времени. Несмотря на то, что вакцина ACI-24 показала самые высокие титры Аβ1-42-специфического IgG на день 7 после 1<sup>ой</sup> иммунизации, увеличение титров антител наблюдалось после 2-й и 3-й иммунизации, когда Т-клеточный эпитоп был инкапсулирован в вакцине ACI-24.

Результаты, приведенные на фиг. 1В, показывают, что иммунизация вакцинами ACI-24, содержащими инкапсулированные Т-клеточные эпитопы, вызвала увеличение титров Аβ-специфических антител по сравнению с ACI-24, что достигло статистической значимости для группы, иммунизированной вакциной ACI-24.043 (с инкапсулированными SAT47).

Вакцины с инкапсулированными SAT42, SAT43, SAT44 или SAT47 были протестированы в исследовании на яванских макаках. Четыре макаки на группу получали подкожно три раза в месяц иммунизацию (день 1, 29 и 57) вакциной ACI-24.044 (инкапсулированный SAT 42 - две группы с 8 макаками в общем), вакциной ACI-24.046 (инкапсулированный SAT 44-2 две группы с 8 макаками в общем), вакциной ACI-24.045 (инкапсулированный SAT 43-4 макаки) или вакциной ACI-24.043 (инкапсулированный SAT 47-4 макаки). Кровь брали перед первой иммунизацией (день 1) и через 1 и 3 недели после каждой иммунизации (дни 8, 22, 36, 50, 64 и 78) для измерения титров Аβ1-42-специфического IgG с помощью ELISA.

Планшеты покрывали с 10 мкг/мл пептидной пленки человеческого Аβ1-42 (Bachem, Switzerland) на всю ночь при 4°C. После промывания 0,05% Tween 20/PBS и блокирования с помощью 1% BSA/0,05% Tween 20/PBS на планшеты добавляли 8 двукратных серийных разведений сыворотки и инкубировали при 37°C в течение 2 ч. После промывания планшеты инкубировали с конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP) антителом против IgG обезьяны (KPL, кат. № 07411021) в течение 2 ч при 37°C. После промывания планшеты инкубировали с 50 мкл АВТS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота) (субстрат HRP) и считывали при 405 нм через один час с использованием ридера планшетов для ELISA. Результаты приведены со ссылкой на серийные разведения положительного пула макак, используемого в качестве стандарта.

Иммуногенность вакцин с различными Т-клеточными эпитопами сравнивали с вакциной ACI-24. В табл. 3 показано кратное увеличение титра Аβ-специфических антител по сравнению с вакциной ACI-24 через 1 неделю после третьей иммунизации. Все протестированные вакцин: ACI-24.046 (SAT44), ACI-24.043 (SAT47) ACI-24.045 (SAT43) и ACI-24.044 (SAT42) вызывали увеличение титров антител по меньшей мере в 7 раз (ACI-24.044 с инкапсулированным SAT42), по сравнению с титрами, индуцированными вакциной ACI-24. Вакцина ACI-24.043 (с инкапсулированным SAT47) и ACI-24.046 (с инкапсулированным SAT44) индуцировали значительно более высокие титры Аβ-

специфических антител по сравнению с ACI-24 через 1 неделю после третьей иммунизации (табл. 3). Каждая из вакцин ACI-24.043 (с инкапсулированным SAT47) и ACI-24.046 (с инкапсулированным SAT44) имеет высокие показатели по E<sub>р</sub>ivax (142,89 и 57,2 соответственно).

Таблица 3

Кратность увеличения титра Аβ-специфического антитела по сравнению с АСІ-24  
(1 неделя после третьей иммунизации, день 64)

Вакцина	АСІ-24.046 (инкапсулиро- ванный SAT44)	АСІ-24.043 (инкапсулиро- ванный SAT47)	АСІ-24.045 (инкапсулиро- ванный SAT43)	АСІ-24.044 (инкапсулиро- ванный SAT42)
кратное увеличение титра Аβ- специфичес- кого IgG по сравнению с АСІ-24	40 p=0,0027 (**)	144 p=0,0003 (***)	17 p=0,1408 (ns)	7 p=0,6003 (ns)

Статистический критерий: критерий Крускала-Уоллиса с множественными сравнениями Данна.  
\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; ns: статистически незначимый.

Согласно результатам, полученным *in vivo* (фин. 1) с вакцинами АСІ-24.046 (инкапсулированный SAT44) и АСІ-24.043 (инкапсулированный SAT47), полученными согласно методике тонкой липидной пленки, протестировали иммуногенность *in vivo* тех же вакцин, полученных согласно методу впрыска поперечного потока. Мышам С57BL/6 дикого типа вводили в общем три подкожные (s.c.) иммунизации на дни 0, 14 и 28 вакцин АСІ-24, АСІ-24.046 (с инкапсулированным SAT44) или АСІ-24.043 (с инкапсулированным SAT47). Образцы крови брали на день -7, 7, 21 и 35 для измерения титров Аβ1-42-специфического IgG посредством ELISA.

Результаты на фиг. 6 показывают, что иммунизация вакцинами АСІ-24, содержащими инкапсулированные Т-клеточные эпитопы, вызвала значительное увеличение титров Аβ-специфических антител по сравнению с АСІ-24.

Пример 4. Качество индуцированных Аβ-специфических антител.

4.1. *In vitro* ингибирование самоассоциации человеческого Аβ1-42.

Качество индуцированных Аβ-специфических антител тестировали *in vitro* путем измерения ингибирования самоассоциации/агрегации Аβ1-42. Этот анализ основан на способности плазмы мышей до и после иммунизации нарушать естественную предрасположенность человеческого Аβ1-42 к самоассоциации.

Стандартные планшеты для ELISA покрывали 1 мкг/мл Аβ1-42 на всю ночь при 4°C. Планшеты промывали 4 раза с 300 мкл 0,05% Tween 20/PBS. Насыщение достигали добавлением 0,5% BSA/PBS и инкубацией в течение 1 часа при 37°C. После промывки на планшеты добавляли четыре 2-кратных серийных разведения плазмы на 20 мин при комнатной температуре при встряхивании. Биотинилированный Аβ1-42 добавляли в каждую лунку до конечной концентрации 0,1 мкг/мл и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч при перемешивании. Биотинилированный Аβ1-42 без плазмы использовали в качестве положительного контроля самоассоциации Аβ1-42 (рассматривают как 100% самоассоциации, 0% ингибирования). После стадии промывки планшеты инкубировали с пероксидазой хрена (HRP), конъюгированной со стрептавидином (R&D Systems, Канада, Ref. 890803), при разведении 1/200 в 0,5% BSA/0,05% Tween 20/PBS в течение 1 ч при комнатной температуре при встряхивании. После промывания планшеты инкубировали с субстратом Sure Blue Reserve TMB (Seracare, кат.№ 5120-0081) в течение 10 мин. Реакцию останавливали стоп-раствором Bethyl (Bethyl Laboratories, Inc, кат.№ E115), и планшеты считывали при 450 нм с использованием планшетного ридера для ELISA. Процент ингибирования самоассоциации рассчитывали с использованием в качестве эталона биотинилированного Аβ1-42 без плазмы в качестве положительного контроля (0% ингибирования).

Результаты показали, что Аβ-специфические антитела, полученные после 2 иммунизации всеми вакцинами, содержащими Т-клеточный эпитоп, нарушали самоассоциацию Аβ1-42 более эффективно, чем антитела, индуцированные АСІ-24 (фиг. 2А). Поскольку плазма перед иммунизацией вызывает базовое ингибирование самоассоциации, процент на 21 день нормализовывали путем вычитания базового значения для плазмы перед иммунизацией. Специфические антитела к Аβ1-42, полученные иммунизацией всеми вакцинами АСІ-24, содержащими Т-клеточный эпитоп, показали более высокое ингибирование самоассоциации Аβ1-42 по сравнению с АСІ-24, это ингибирование достигло статистической значимости в группе, иммунизированной АСІ-24.046 (с инкапсулированным SAT44) (фиг. 2В).

4.2 Образование антител, распознающих Аβ-олигомеры.

Для того чтобы оценить специфичность индуцированных антител у мышей C57BL/6 к связыванию патологического Аβ, ответы IgG, специфического для Аβ1-42-олигомеров, определяли с помощью ELISA. Планшеты покрывали 10 мкг/мл олигомеров, полученных, как описано ранее (Adolfsson, 2012), на всю ночь при 4°C. После промывания с 0,05% Tween 20/PBS и блокирования с 1% BSA/0,05% Tween 20/PBS на планшеты добавляли серийные разведения плазмы и инкубировали при 37°C в течение 2 ч. После промывки планшеты инкубировали с конъюгированным с щелочной фосфатазой (AP) антителом против мышинового IgG (Jackson ImmunoResearch, Cat: 115-055-164, PA, USA) в течение 2 часов при 37°C. После окончательной промывки планшеты инкубировали в течение 2,5 ч с субстратом AP (pNPP) и считывали при 405 нм, используя планшетный ридер для ELISA. Результаты выражены относительно серийных разведений коммерчески доступного антитела.

Каждый образец тестировали в восьми или четырех двукратных серийных разведениях, начиная с разведения 1/100, 1/400, 1/800 или 1/1600, на основании титров антитела к Аβ1-42. Результаты на фиг. 3 показывают, что иммунизация всеми вакцинами АС1-24, содержащими Т-клеточный эпитоп, вызывала увеличение титров антител, специфических для олигомера Аβ1-42, по сравнению с АС1-24, что достигло статистической значимости для группы, иммунизированной вакциной АС1-24.043 (с инкапсулированным SAT47).

Индекс avidности индуцированных антител у мышей C57BL/6 через 7 и 21 день после иммунизации определяли с помощью анализа ELISA. Одну половину стандартного планшета для ELISA покрывали 10 мкг/мл пептидной пленки Аβ1-42, а другую половину покрывали 1 мкг/мл пептидной пленки Аβ1-42 на всю ночь при 4°C. После промывания с 0,05% Tween 20/PBS и блокирования с 1% BSA/0,05% Tween 20/PBS к обоим покрытиям добавляли восемь 2-кратных серийных разведений плазмы и инкубировали при 37°C в течение двух часов. После стадии промывки планшеты инкубировали с конъюгированным с щелочной фосфатазой (AP) антителом против мышинового IgG (Jackson ImmunoResearch, Cat: 115-055-164, PA, USA) в течение 2 ч при 37°C. После окончательной промывки планшеты инкубировали в течение 2,5 ч с субстратом AP (pNPP) и считывали при 405 нм, используя планшетный ридер для ELISA. Результаты выражены относительно серийных разведений коммерчески доступного антитела (6E10, Biolegend, UK, Cat. 803002).

Для определения индекса avidности рассчитывали AU/мл для каждого образца на обоих покрытиях, используя стандартную кривую, полученную для 10 мкг/мл пептида Аβ1-42. Значения оптической плотности от 0,6 до 2,8 использовали для обратного расчета концентрации. Индекс avidности рассчитывали как соотношение между концентрацией антител более низкой покрывающей концентрации (1 мкг/мл пептида Аβ1-42) и насыщенного покрытия (10 мкг/мл пептида Аβ1-42).

Результаты, приведенные на фиг. 4, показывают, что иммунизация всеми вакцинами АС1-24, содержащими Т-клеточный эпитоп, вызывала созревание avidности Аβ1-42-специфического антитела между 1<sup>ой</sup> и 2<sup>ой</sup> иммунизацией (день 7 и день 21, соответственно), что достигло статистической значимости в группах, иммунизированных АС1-24.044 (с инкапсулированным SAT42) и АС1-24.043 (с инкапсулированным SAT47).

Для того чтобы оценить специфичность индуцированных антител у яванских макак к связыванию патологического Аβ, титры Аβ1-42 олигомер-специфического IgG измеряли с помощью технологии Mid Scale Discovery (MSD) на день 64 (1 неделя после третьей иммунизации) в сыворотке яванских макак, иммунизированных вакциной АС1-24.046 (с инкапсулированным SAT44 - 2 группы, всего 8 макак), вакциной АС1-24.045 (инкапсулированный SAT 43-4 макаки) или вакциной АС1-24.043 (инкапсулированный SAT 47-4 макаки). Планшеты MSD со стрептавидином насыщали в течение ночи с 5% блокатора А (MSD, Ref. R93BA-4) при 4°C. На следующий день планшеты промывали 4 раза 0,05% Tween 20/PBS и покрывали 25 мкл захватывающего антитела биотинилированного 6E10 (Biolegend, Ref. 803008) в PBS при концентрации 0,5 мкг/мл в течение 1 часа при 37°C на шейкере. После промывки планшеты инкубировали с 25 мкл олигомеров Аβ1-42 (Adolfsson, 2012) при 10 мкг/мл в PBS в течение 1 ч при 37°C на шейкере. Планшеты промывали и инкубировали с восемью 2-кратными разведениями сыворотки макак (начальное разведение 1/50 в 1% обезжиренном молоке/0,05% Tween/PBS). Образцы инкубировали 2 часа при 37°C на шейкере. Планшеты промывали 4 раза и добавляли антитело против человеческого IgG, меченное SULFO-TAG (Jackson, Ref. 109-005-098), разведенное 1% обезжиренным молоком/0,05% Tween 20/PBS, в течение 1 ч при 37°C на шейкере. После 4 промывок добавляли буфер для считывания MSD T 2X (MSD, Ref. R92TC-2), и планшеты считывали в течение 5 мин. Результаты выражены относительно серийных разведений пула макак, используемого в качестве стандарта.

Результаты показали, что все протестированные вакцины АС1-24.046 (инкапсулированный SAT44), АС1-24.043 (инкапсулированный SAT47) и АС1-24.045 (инкапсулированный SAT43) вызывали увеличение антител, способных распознавать олигомеры Аβ, на день 64 (1 неделя после иммунизации) по сравнению с днем 1 (перед первой иммунизацией), см. фиг 5.

**Ссылочные источники**

Adolfsson O., Pihlgren M., Toni N., Varisco Y., Buccarello A.L., Antonello K., Lohmann S., Piorkowska K., Gafner V., Atwal J.K., Maloney J., Chen M., Gogineni A., Weimer R.M., Mortensen D.L., Friesenhahn M., Ho C., Paul R., Pfeifer A., Muhs A., Watts R.J., An effector-reduced anti- $\beta$ -amyloid (A $\beta$ ) antibody with unique a $\beta$  binding properties promotes neuroprotection and glial engulfment of A $\beta$ . *J Neurosci.* Jul 11;32(28):9677-89 (2012).

Agadjanyan M.G., Ghochikyan A., Petrushina I., Vasilevko V., Movsesyan N., Mkrtychyan M., Saing T. and Cribbs D.H., Prototype Alzheimer's Disease Vaccine Using the Immunodominant B Cell Epitope from  $\beta$ -Amyloid and Promiscuous T Cell Epitope Pan HLA DR-Binding Peptide. *J Immunol* 174 (3) 1580-1586 (2005).

Arai H, Suzuki H, Yoshiyama T. Vanutide cridificar and the QS-21 adjuvant in Japanese subjects with mild to moderate Alzheimer's disease: results from two phase 2 studies. *Curr Alzheimer Res.* 12(3):242-54 (2015).

Ghochikyan A., Mkrtychyan M., Petrushina I., Movsesyan N., Karapetyan A., Cribbs D.H., Agadjanyan M.G., Prototype Alzheimer's disease epitope vaccine induced strong Th2-type anti-Abeta antibody response with Alum to Quil A adjuvant switch. *Vaccine.* 20,24(13):2275-82 (2006).

Gilman S., Koller M., Black R.S., Jenkins L., Griffith S.G., Fox N.C., Eisner L., Kirby L., Boada Rovira M., Forette F., Orgogozo J.M., Clinical effect of A $\beta$  immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology* 64, 1553-1562 (2005).

Liu B., Frost J.L., Sun J., Fu H., Grimes S., Blackburn P., Lemere C.A., MER5101, a novel A $\beta$ 1-15:DT conjugate vaccine, generates a robust anti-A $\beta$  antibody response and attenuates A $\beta$  pathology and cognitive deficits in APP<sup>swe</sup>/PS1 $\Delta$ E9 transgenic mice.

*J Neurosci.* 33(16):7027-37 (2013).

Lutzner N., Kalbacher H., Quantifying Cathepsin S Activity in Antigen Presenting Cells Using a Novel Specific Substrate. *J. Biol. Chem.* Vol. 283 No. 52 p. 36185 (2008).

Maier M., Seabrook T.J., Lazo N.D., Jiang L., Das P., Janus C., Lemere C.A., Short amyloid-beta (Abeta) immunogens reduce cerebral Abeta load and learning deficits in an Alzheimer's disease mouse model in the absence of an Abeta-specific cellular immune response. *J Neurosci.* 3;26(18):4717-28 (2006).

Martineau P, chapter 41: Affinity Measurements by Competition ELISA, Pages 657-665, from book: *Antibody engineering*, Vol.1; R. Kontermann and S. Dübel (2010)

Monsonogo A., Weiner H.L., Immunotherapeutic approaches to Alzheimer's disease. *Science.* 31;302(5646):834-8 (2003).

Muhs A., Hickman D.T., Pihlgren M., Chuard N., Giriens V., Meerschman C., van der Auwera I., van Leuven F., Sugawara M., Weingartner M.-C., Bechinger B., Greferath R., Kolonko N., Nagel-Steger L., Riesner D., Brady R.O., Pfeifer A., Nicolau C., Liposomal vaccines with conformation-specific amyloid peptide antigens define immune response and efficacy in APP transgenic mice. *PNAS*, 104 23:9810-9815 (2007).

Orgogozo J.M., Gilman S., Dartigues J.F., Laurent B., Puel M., Kirby L.C., Jouanny P., Dubois B., Eisner L., Flitman S., Michel B.F., Boada M., Frank A., Hock C., Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. *Neurology* 61: 46-54 (2003).

Pihlgren M., Silva A.B., Madani R., Giriens V., Waeckerle-Men Y., Fettelschoss A., Hickman D.T., López-Deber M.P., Ndao D.M., Vukicevic M., Buccarello A.L., Gafner V., Chuard N., Reis P., Piorkowska K., Pfeifer A., Kündig T.M., Muhs A., Johansen P., TLR4- and TRIF-dependent stimulation of B lymphocytes by peptide liposomes enables T cell-independent isotype switch in mice. *Blood*. Jan 3;121(1):85-94 (2013).

Sallusto F., Lanzavecchia A., Araki K., Ahmed R., From vaccines to memory and back. *Immunity*. Oct 29;33(4):451-63 (2010).

Schneeberger A., Mandler M., Mattner F., Schmidt W., AFFITOME® technology in neurodegenerative diseases: the doubling advantage. *Hum Vaccin*. 11:948-52 (2010)

Seabrook T.J., Thomas K., Jiang L., Bloom J., Spooner E., Maier M., Bitan G., Lemere C.A., Dendrimeric Abeta1-15 is an effective immunogen in wildtype and APP-tg mice. *Neurobiol Aging*. 28(6):813-23 (2006).

Siegrist CA, Chapter 2: Vaccine Immunology, Pages 14-32 from book: *Vaccine* (6th Edition, 2013),n, Walter A. Orenstein and Paul)

Soto C., Plaque busters: strategies to inhibit amyloid formation in Alzheimer's disease. *Molecular Medicine Today* (vol 5), August 1999.

Winblad B., Graf A., Riviere M.E., Andreasen N., Ryan J.M., Active immunotherapy options for Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*. 2014 Jan 30;6(1):7.

Winblad B., Andreasen N., Minthon L., Floesser A., Imbert G., Dumortier T., Maguire R.P., Blennow K., Lundmark J., Staufenbiel M., Orgogozo J.M., Graf A., Safety, tolerability, and antibody response of active Aβ immunotherapy with CAD106 in patients with Alzheimer's disease: randomised, double-blind, placebo-controlled, first-in-human study. *Lancet Neurol*. 11(7):597-604 (2012).

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют те же значения, которые обычно понимаются специалистом в области техники настоящего изобретения. Все публикации и патенты, специально

упомянутые в настоящем документе, полностью включены посредством ссылки для всех целей, связанных с изобретением.

Объем настоящего изобретения не ограничен конкретными вариантами осуществления, описанными в настоящем документе. На самом деле, различные модификации настоящего изобретения в дополнение к описанным в настоящем документе станут очевидными для специалистов в данной области техники из предшествующего описания и приложенных чертежей. Предполагается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения. Более того, все аспекты и варианты осуществления изобретения, описанные в настоящем документе, считаются широко применимыми и совместимыми с любыми и всеми другими согласованными вариантами осуществления, включая те, которые взяты из других аспектов изобретения (в том числе по отдельности), подходящим образом.

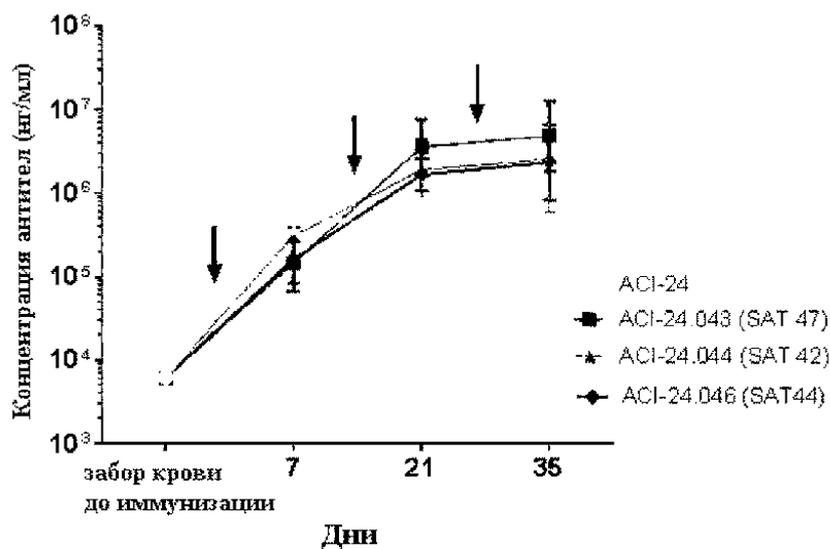
## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Липосомальная вакцинная композиция, содержащая:
  - а)  $\beta$ -амилоид (А $\beta$ )-производный пептидный антиген, представленный на поверхности липосомы;
  - б) пептид, содержащий универсальный Т-клеточный эпитоп, инкапсулированный внутри липосомы, который способен стимулировать ответ хелперных Т-клеток, что усиливает продукцию антител В-клетками;
  - с) адъювант.
2. Липосомальная вакцинная композиция по п.1, где пептид, содержащий универсальный Т-клеточный эпитоп, содержит по меньшей мере 30% гидрофобных аминокислот.
3. Липосомальная вакцинная композиция по п.1 или 2, причем вакцинная композиция содержит по меньшей мере два разных универсальных Т-клеточных эпитопа, которые инкапсулированы внутри липосомы.
4. Липосомальная вакцинная композиция по любому из пп.1-3, где каждый универсальный Т-клеточный эпитоп имеет длину не более 30 аминокислот, не более 20 аминокислот или не более 10-20 аминокислот.
5. Липосомальная вакцинная композиция по любому из пп.1-4, причем вакцинная композиция содержит два, три или четыре разных универсальных Т-клеточных эпитопа, которые инкапсулированы внутри липосомы.
6. Липосомальная вакцинная композиция по любому из пп.1-5, где пептид, содержащий универсальный Т-клеточный эпитоп, содержит по меньшей мере два разных универсальных Т-клеточных эпитопа.
7. Липосомальная вакцинная композиция по любому из пп.1-6, где пептид, содержащий универсальный Т-клеточный эпитоп, содержит два, три или четыре универсальных Т-клеточных эпитопа.
8. Липосомальная вакцинная композиция по любому из пп.3-7, где по меньшей мере два универсальных Т-клеточных эпитопа соединены линкером.
9. Липосомальная вакцинная композиция по п.8, где линкер содержит по меньшей мере две аминокислоты, где линкер необязательно содержит, состоит по существу из или состоит из аминокислот VVR или PMGAP.
10. Липосомальная вакцинная композиция по любому из пп.1-9, где универсальные Т-клеточные эпитопы выбраны из:
  - а) комбинации универсального Т-клеточного эпитопа дифтерийного токсина и столбнячного токсина;
  - б) комбинации универсального Т-клеточного эпитопа вируса Эпштейна-Барр и столбнячного токсина;
  - с) комбинации универсального Т-клеточного эпитопа вируса Эпштейна-Барр, столбнячного токсина и гемоцианина лимфы улитки; или
  - д) комбинации универсального Т-клеточного эпитопа гемагглютинина вируса гриппа, дифтерийного токсина, столбнячного токсина и вируса Эпштейна-Барр.
11. Липосомальная вакцинная композиция по любому из пп.1-10, где пептид, содержащий универсальный Т-клеточный эпитоп, содержит, состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1 (SAT42), SEQ ID NO: 2 (SAT43), SEQ ID NO: 3 (SAT44), SEQ ID NO: 4 (SAT47).
12. Липосомальная вакцинная композиция по любому из пп.1-10, где универсальный Т-клеточный эпитоп содержит, состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 5 (SAT6), SEQ ID NO: 6 (SAT13), SEQ ID NO: 7 (SAT15), SEQ ID NO: 8 (SAT17).
13. Липосомальная вакцинная композиция, содержащая:
  - а) тетрапальмитоилированный  $\beta$ -амилоид (А $\beta$ )-производный пептидный антиген, представленный на поверхности липосомы, который содержит, состоит по существу из или состоит из аминокислот 1-15 бета-амилоида;
  - б) пептид, содержащий универсальный Т-клеточный эпитоп, инкапсулированный внутри липосомы, где пептид, содержащий универсальный Т-клеточный эпитоп, содержит, состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 3 (SAT44) и SEQ ID NO: 4 (SAT47).
  - с) адъювант.
14. Липосомальная вакцинная композиция по любому из пп.1-13, где адъювант образует часть липосомы.
15. Липосомальная вакцинная композиция по любому из пп.1-14, где адъювант представлен по меньшей мере частично на поверхности липосомы.
16. Липосомальная вакцинная композиция по любому из пп.1-15, где адъювант содержит монофосфорил-липид А (MPLA).

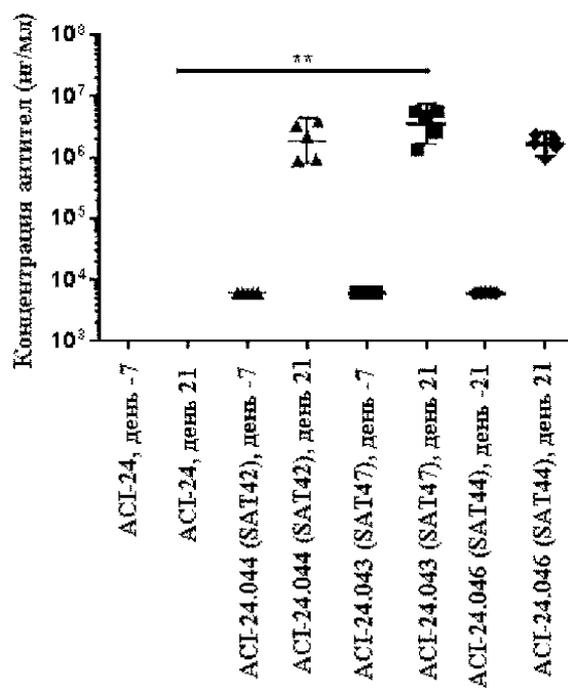
17. Липосомальная вакцинная композиция по любому из пп.1-16, где пептид, содержащий универсальный Т-клеточный эпитоп, имеет длину от 30 до 60 аминокислот.

18. Применение вакцинной композиции по любому из пп.1-17 для лечения, профилактики, индукции защитного иммунного ответа против или облегчения симптомов, связанных с заболеванием или состоянием, связанными с бета-амилоидом, у субъекта.

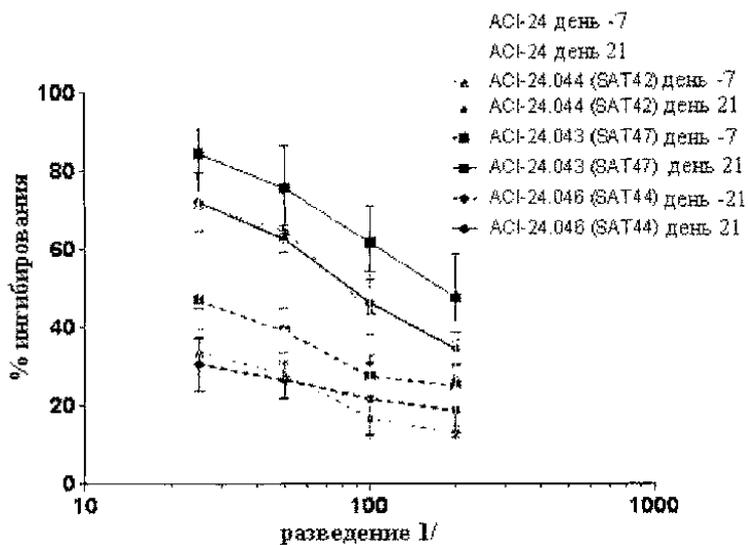
19. Набор для лечения, профилактики, индукции защитного иммунного ответа против или облегчения симптомов, связанных с заболеванием или состоянием, связанными с бета-амилоидом, у субъекта, содержащий липосомальную вакцинную композицию по любому из пп.1-17.



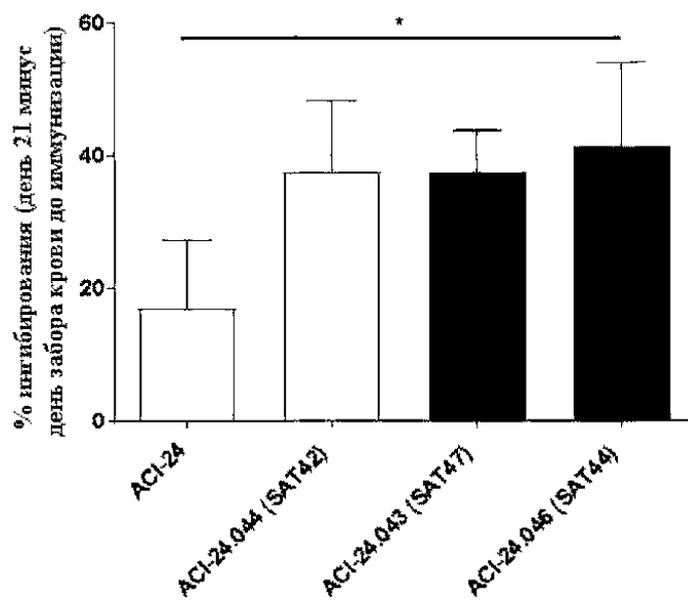
Фиг. 1А



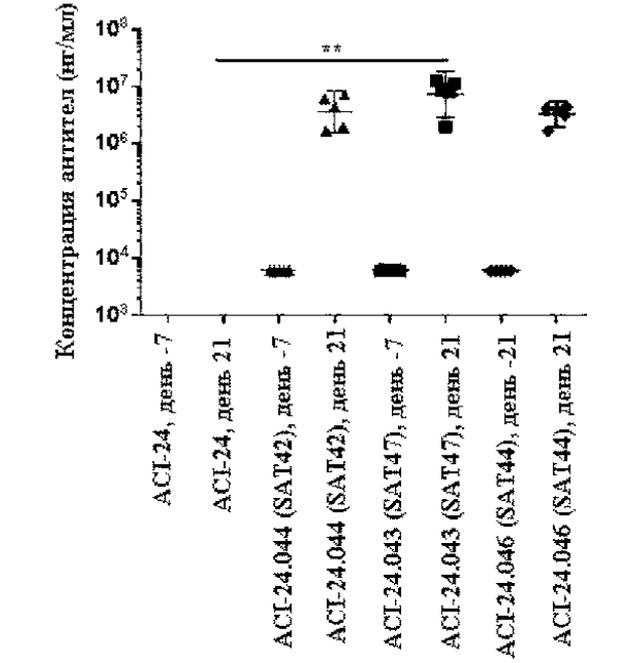
Фиг. 1В



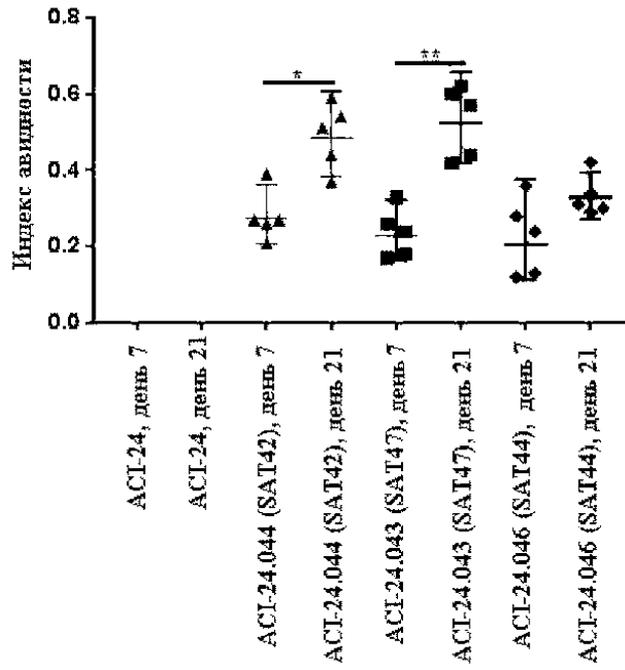
Фиг. 2А



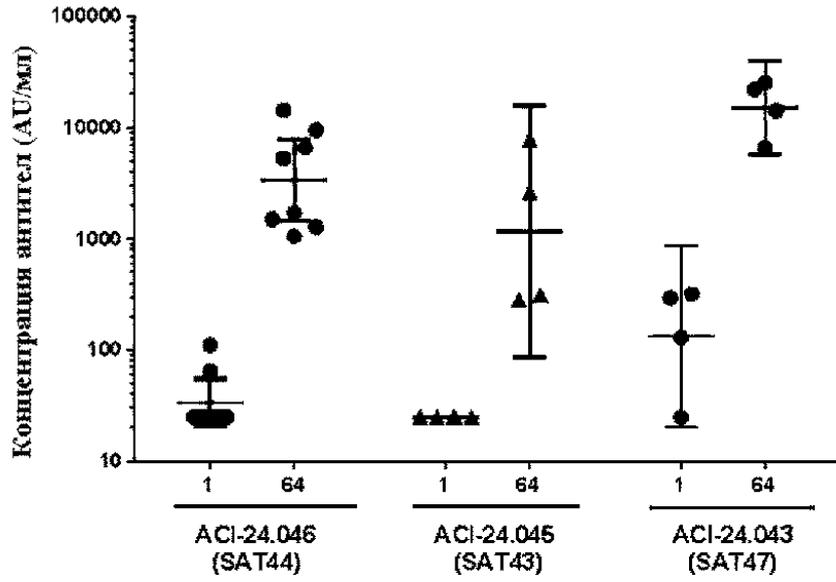
Фиг. 2В



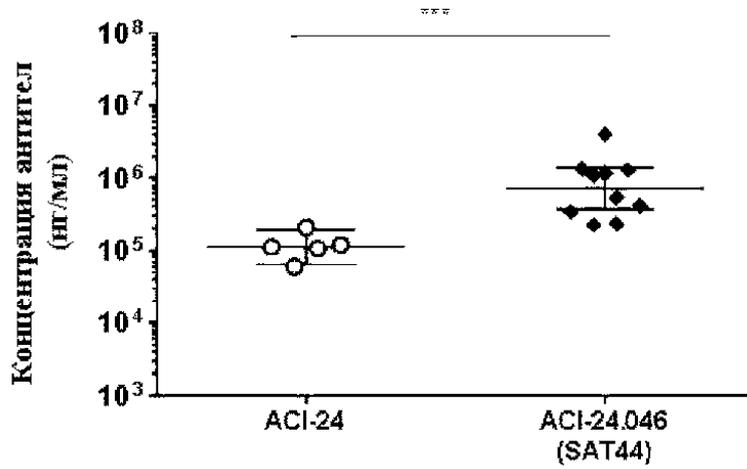
Фиг. 3



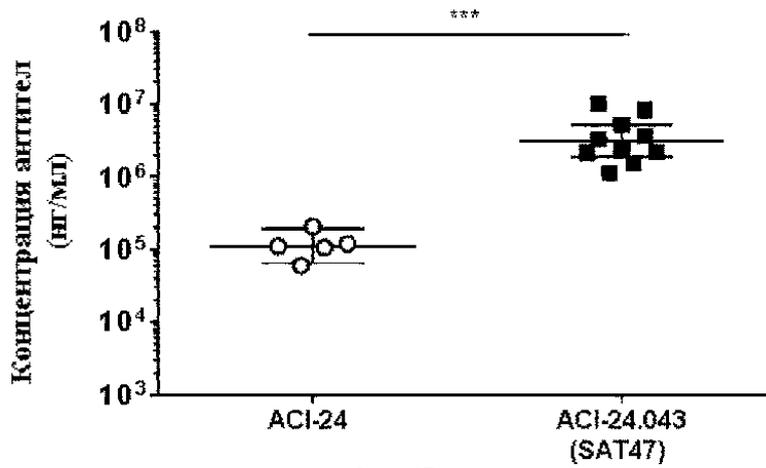
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6А



Фиг. 6В

