

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202490815 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.07.08

(51) Int. Cl. C07K 14/47 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 38/08 (2019.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.09.29

(54) СПОСОБ БЕЗОПАСНОГО ВВЕДЕНИЯ КОНЬЮГАТА ФОСФОПЕПТИДА Tau

(31) 63/261,793

(32) 2021.09.29

(33) US

(86) PCT/US2022/077279

(87) WO 2023/056369 2023.04.06

(71) Заявитель:
ЯНССЕН ФАРМАСЬЮТИКЛЗ, ИНК.
(US); АЦ ИММУНЕ СА (CH)

(72) Изобретатель:

Пфайфер Андреа (CH), Рамсбург
Элизабет Энн (US)

(74) Представитель:

Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)

(57) В заявке описаны способы индукции антител против фосфорилированного Тау без индукции серьезных нежелательных явлений у людей. Способы включают введение субъекту в эффективном количестве фосфопептида Тау, конъюгированного с иммуногенным носителем.

A1

202490815

202490815

A1

СПОСОБ БЕЗОПАСНОГО ВВЕДЕНИЯ КОНЬЮГАТА ФОСФОПЕПТИДА ТАУ

5 Перекрестная ссылка на родственную заявку

Настоящая заявка представляет собой международную заявку, которая претендует на приоритет предварительной заявки на патент США № 63/261793, поданной 29 сентября 2021 г., описание которой в полном объеме включено в настоящую заявку в качестве ссылки.

10 Ссылка на перечень последовательностей, прилагаемый в электронном виде

Содержание перечня последовательностей в электронном виде (065794_8WO1.xml; размер: 35700 байт; и дата создания: 29 августа 2022 г.) в полном объеме включено в настоящее описание в качестве ссылки.

Область техники, к которой относится изобретение

15 Настоящая заявка относится к области медицины. Заявка относится, в частности, к способам индукции иммунного ответа против белка Тау у субъекта, страдающего нейродегенеративным заболеванием, нарушением или состоянием, с помощью композиции, содержащей фосфорилированный пептид Тау (pTau), конъюгированный с иммуногенным носителем.

20 Предпосылки создания изобретения

Болезнь Альцгеймера (AD) представляет собой прогрессирующее изнурительное нейродегенеративное заболевание, которым, по оценкам, страдают 44 миллиона человек во всем мире (Alzheimers.net). Методы лечения AD, которые в настоящее время коммерциализированы, направлены на воздействие на клинические симптомы, но не нацелены на патогенные процессы, лежащие в основе заболевания (модифицирующее болезнь действие). К сожалению, существующие методы лечения лишь минимально эффективны, и поэтому существует настоятельная необходимость в разработке и апробации дополнительных профилактических и терапевтических мер.

30 Характерной патологией болезни Альцгеймера является накопление внеклеточных бляшек, содержащих в значительной степени агрегированный бета-амилоидный белок и внутриклеточные "клубки" или скопления гиперфосфорилированного белка Тау. Молекулярные процессы, приводящие к

накоплению этих белков, недостаточно охарактеризованы. Для амилоида предполагается, что аберрантное расщепление белка-предшественника амилоида приводит к накоплению склонного к агрегации фрагмента, содержащего 1-42 аминокислоты. Касательно Тау предполагается, что нарушение регуляции либо киназ, либо фосфатаз, либо их обеих приводит к аберрантному фосфорилированию Тау. Как только Тау становится гиперфосфорилированным, он теряет способность эффективно связывать и стабилизировать микротрубочки и вместо этого накапливается в цитоплазме пораженного нейрона. Несвязанный и гиперфосфорилированный Тау, вероятно, сначала образует олигомеры, а затем агрегаты более высокого порядка, присутствие которых предположительно отрицательно влияет на функцию нейрона, в котором они образуются, возможно, из-за нарушения нормального аксонального транспорта.

В развитых странах людей с диагнозом болезнь Альцгеймера или с другими обуславливающими слабоумие тауопатиями, как правило, лечат ингибиторами холинэстеразы (например, Aricept®) или мемантином (например, Namenda™). Эти лекарственные средства, хотя и достаточно хорошо переносятся, обладают очень невысокой эффективностью. Например, Aricept® откладывает ухудшение симптомов на 6-12 месяцев примерно у 50% подвергающихся лечению индивидуумов. Остальные варианты лечения являются немедикаментозными и направлены на то, чтобы сделать пациентов более способными справляться с повседневными задачами по мере снижения их когнитивных способностей.

В настоящее время разрабатываются методы иммунотерапии для профилактики и лечения AD. Активная иммунизация антигеном, связанным с AD, потенциально может стимулировать реакцию как в виде иммунитета на основе антител (гуморального иммунного ответа), так и клеточного иммунитета против AD. Однако испытание первой широко протестированной вакцины на основе антитела к бета-амилоиду человека была прекращена в 2002 г. Менингоэнцефалит, тип воспаления центральной нервной системы, который может приводить к летальному исходу, обнаружен в клинических исследованиях у пациентов с AD, которые получали активное иммунотерапевтическое средство AN-1792, таргетирующее A β (Ogogozo и др., 2003). Энцефалитные реакции, которые обнаружены у 6% пациентов, подвергавшихся лечению AN-1792, вероятно были вызваны нежелательной A β -специфической активацией Т-клеток.

К настоящему времени проведено лишь несколько исследований с использованием агентов, специфически нацеленных на связанные с Тау патологии. В настоящее время иммунотерапия связанных с Тау патологий находится на стадии клинических испытаний, но эта область все еще находится в зачаточном состоянии, и механистическое понимание эффективности и безопасности различных подходов еще недостаточно изучено (Sigurdsson, *Neurodegener Dis.*, 16(0), 2016, сс. 34–38). Известны также сведения об энцефалите, воспалении головного мозга, у мышей, иммунизированных против полноразмерного белка Тау. Однако у животных, иммунизированных 5
10
однократной инъекцией фосфорилированного пептида Тау, в провоспалительной среде ЦНС не обнаружено никаких побочных действий (Rosenmann H., *Curr. Alzheimer Res.*, 10, 2013, сс. 217-228).

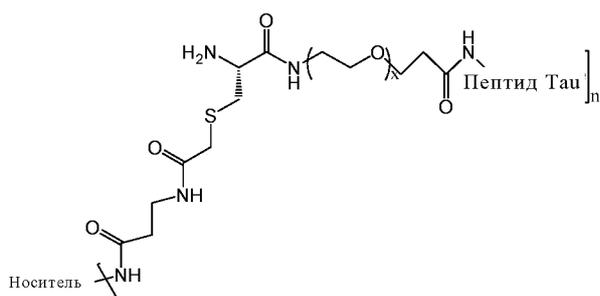
Опубликованы данные о долгосрочном профиле безопасности вакцины, основой которой является не-Тау-фосфопептид (AADvac1) для людей с 15
20
30
болезнью Альцгеймера со степенью тяжести от легкой до умеренной (Novak и др., *Alzheimer's Research & Therapy*, 10, 2018, с. 108). Вакцина содержит синтетический пептид, полученный из аминокислот 294-305 последовательности Тау, сшитый с гемоцианином лимфы улитки (KLH) через N-концевой цистеин. Вакцину вводил в дозе 40 мкг пептида (CKDNIKHVPGGGS, SEQ ID NO: 13), сшитого с KLH, в сочетании с применяемым в качестве адьюванта гидроксидом алюминия (содержащего 0,5 мг Al^{3+}) в фосфатном буфере в объеме 0,3 мл. Нежелательными явлениями, которые наблюдались у 26 пациентов, включенных в исследование, и были связаны с лечением AADvac1 в рамках исследования фазы 1 (исследование FUNDAMANT), оказались реакции в месте инъекции (эритема, отек, жар, зуд, боль, узелки). Одно или несколько из этих АЕ 25
обнаружено у 50% пациентов, которых обрабатывали AADvac1. Реакции в месте инъекции были обратимыми и преимущественно слабо выраженными. Обнаружено шесть серьезных нежелательных явлений (SAE) (сдавливающая грыжа брюшной полости, обезвоживание, острый психоз, поведенческие и психиатрические симптомы деменции, атриовентрикулярная блокада второй степени и синусовая брадикардия). По мнению исследователей, ни одно из указанных SAE не было связано с обработкой AADvac1. Не обнаружены 30
аллергические или анафилактические реакции. Лабораторные исследования

(анализы свертываемости, биохимии крови, гематологии и мочи), оценка жизненно важных показателей, неврологическое и физикальное обследование не выявили признаков опасности. При проведении МРТ не было обнаружено никаких признаков опасности. Отечных изменений не наблюдалось. Не обнаружено изменений в менингеальной оболочке и признаков менингоэнцефалита. Новые микрокровоизлияния обнаружены у одного гомозиготного по ApoE4 пациента, а поверхностный гемосидерин был обнаружен у одного гетерозиготного по ApoE4 пациента, оба явления клинически не проявлялись. Установлено, что это согласуется с общей частотой таких поражений в популяции пациентов с AD.

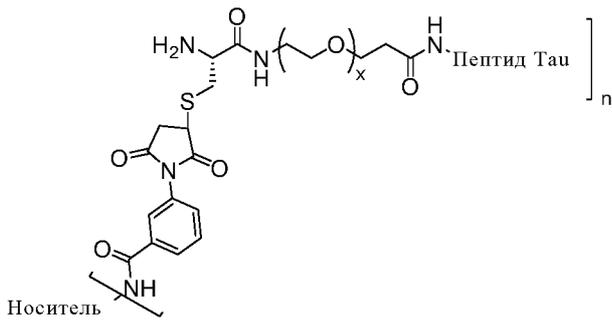
Однако данные о профиле безопасности конъюгата с Тау-фосфопептидом у людей отсутствуют. Таким образом, существует потребность в безопасном и эффективном лечении нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера.

Краткое изложение сущности изобретения

Одним из основных объектов настоящего изобретения является способ индукции антител против Тау, предпочтительно по меньшей мере одного из фосфорилированного Тау и обогащенных парных спиральных филаментов (ePHF), у человека, который нуждается в этом, способ включает введение человеку композиции, которая содержит от 5 мкг до 200 мкг на дозу конъюгата, имеющего структуру формулы (I):



или имеющего структуру формулы (II):



где

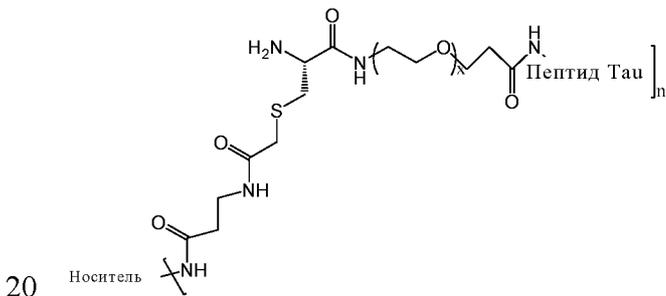
5 x обозначает целое число от 0 до 10, предпочтительно от 2 до 6, наиболее предпочтительно 3;

n обозначает целое число от 3 до 15, предпочтительно от 3 до 12;

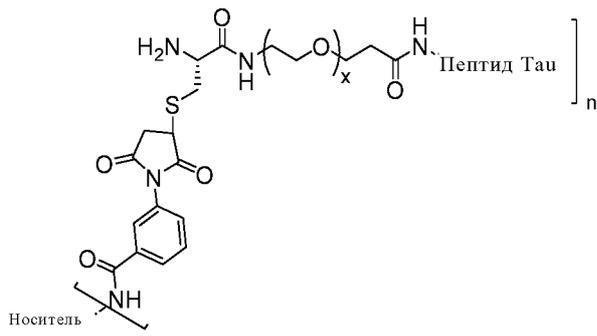
носитель обозначает иммуногенный носитель, выбранный из группы, которая состоит из гемоцианина лимфы улитки (KLH), столбнячного токсоида, CRM197 и смеси белков наружной мембраны из *N. meningitidis* или их производного; и

10 пептид Тау обозначает фосфопептид Тау, который имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 12.

15 Одним из основных объектов настоящего изобретения является композиция для индукции антител против Тау, предпочтительно по меньшей мере одного из фосфорилированного Тау и обогащенных парных спиральных филаментов (α RHF), у человека, который нуждается в этом, способ включает введение человеку композиции, которая содержит от 5 мкг до 200 мкг на дозу конъюгата, имеющего структуру формулы (I):



или имеющего структуру формулы (II):



где

х обозначает целое число от 0 до 10, предпочтительно от 2 до 6, наиболее предпочтительно 3;

п обозначает целое число от 3 до 15, предпочтительно от 3 до 12;

носитель обозначает иммуногенный носитель, выбранный из группы, которая состоит из группы, состоящей из гемоцианина лимфы улитки (KLH), столбнячного токсоида, CRM197 и смеси белков наружной мембраны из *N.*

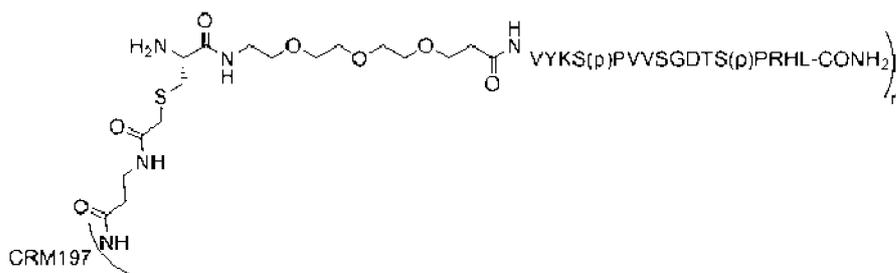
meningitidis или их производного; и

пептид Тау обозначает фосфопептид Тау, который имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 12.

В одном из вариантов осуществления изобретения композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

В одном из вариантов осуществления изобретения конъюгат содержит фосфопептид Тау, который имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 12, конъюгированую с CRM197 через линкер.

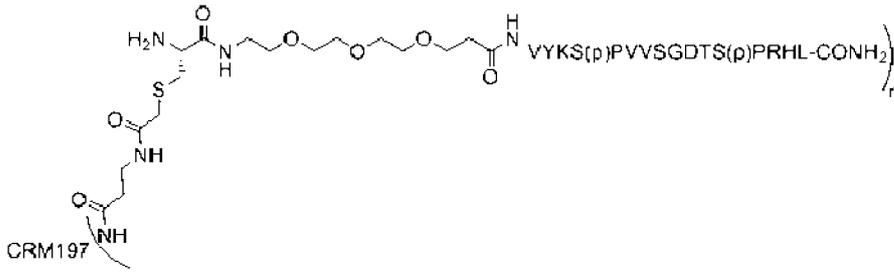
Предпочтительно пептид Тау представляет собой фосфопептид Тау, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. С одним белком-носителем может быть конъюгировано более одного фосфопептида Тау, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или большее количество фосфопептидов Тау. Более предпочтительно конъюгат имеет структуру:



где n обозначает целое число от 3 до 7 и VYKS(p)PVVSGDTS(p)PRHL-CONH₂ содержит пептид фосфо-Тау, имеющий SEQ ID NO:2.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения композиция
5 дополнительно содержит по меньшей мере один адъювант. Например, по
меньшей мере один адъювант может содержать агонист TLR9, такой как
олигонуклеотид CpG, который имеет нуклеотидную последовательность,
выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 14 - SEQ ID NO: 18. В
одном из вариантов осуществления изобретения композиция дополнительно
10 содержит олигонуклеотид CpG, имеющий нуклеотидную последовательность
SEQ ID NO: 14. В другом варианте осуществления изобретения композиция
дополнительно содержит гидроксид алюминия. В следующем варианте
осуществления изобретения композиция дополнительно содержит
олигонуклеотид CpG, который имеет нуклеотидную последовательность,
15 выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 14 - SEQ ID NO: 18, и
гидроксид алюминия.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения способ
индукции антител против Тау, предпочтительно по меньшей мере одного из
фосфорилированного Тау и обогащенных парных спиральных филаментов
20 (ePHF), у человека, который нуждается в этом, включает введение человеку
композиции, которая содержит фармацевтически приемлемый носитель,
гидроксид алюминия, олигонуклеотид CpG, который имеет нуклеотидную
последовательность SEQ ID NO: 14, и в дозе от 5 мкг до 200 мкг конъюгат,
который имеет следующую структуру:



где n обозначает целое число от 3 до 7 и VYKS(p)PVVSGDTS(p)PRHL-CONH₂ содержит пептид фосфо-Тау, имеющий SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах способ, предлагаемый в изобретении, включает введение человеку композиции, которая содержит конъюгат, указанный в настоящем описании, в количестве 5 мкг, 10 мкг, 15 мкг, 20 мкг, 25 мкг, 30 мкг, 35 мкг, 40 мкг, 45 мкг, 50 мкг, 60 мкг, 70 мкг, 80 мкг, 90 мкг, 100 мкг, 110 мкг, 120 мкг, 130 мкг, 140 мкг, 150 мкг, 160 мкг, 170 мкг, 180 мкг, 190 мкг, 200 мкг или в любом находящемся между указанными значениями количестве на дозу.

В некоторых вариантах осуществления изобретения композицию вводят внутримышечно. В других вариантах осуществления изобретения композицию вводят подкожно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела содержат антитела IgG-типа против фосфорилированного Тау (pТау), при этом предпочтительно титр анти-pТау IgG по меньшей мере в 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более раз выше, чем в контрольной группе, обработанной плацебо (плацебо-контроль).

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела содержат антитела IgG-типа против нефосфорилированного Тау, при этом предпочтительно титр анти-Тау IgG по меньшей мере в 50, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более раз выше, чем в плацебо-контроле.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела содержат антитела против обогащенных парных спиральных филаментов (ePHF), при этом предпочтительно титр анти-ePHF IgG по меньшей мере в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более раз выше, чем в плацебо-контроле.

В некоторых вариантах осуществления изобретения способ применения включает дополнительно введение субъекту второй дозы композиции, которая содержит фармацевтически приемлемый носитель и конъюгат в количестве от 5

мкг до 200 мкг, например, от 15 мкг до 60 мкг на дозу, через 4-12 недель, например, через 8 недель, после начального введения композиции.

5 В некоторых вариантах осуществления изобретения введение второй дозы композиции может усиливать гуморальный иммунный ответ, индуцированный композицией, такой как гуморальный иммунный ответ, включающий ответ в виде анти-pTau IgG и/или ответ в виде анти-ePHF IgG, при этом предпочтительно гуморальный иммунный ответ повышается по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более при измерении по меньшей мере через 2 недели после введения второй дозы композиции.

10 В некоторых вариантах осуществления изобретения способ, предлагаемый в изобретении, дополнительно включает введение субъекту третьей дозы композиции, которая содержит фармацевтически приемлемый носитель и конъюгат в количестве от 5 мкг до 200 мкг, например, от 15 мкг до 60 мкг, на дозу через 20-28 недель, например, через 24 недели, после начального введения композиции.

15 В некоторых вариантах осуществления изобретения введение третьей дозы композиции может усиливать гуморальный иммунный ответ, индуцированный композицией, такой как гуморальный иммунный ответ, включающий ответ в виде анти-pTau IgG и/или ответ в виде анти-ePHF IgG, при этом предпочтительно гуморальный иммунный ответ повышается по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более при измерении по меньшей мере через 2 недели после введения третьей дозы композиции.

20 В некоторых вариантах осуществления изобретения способ, предлагаемый в изобретении, дополнительно включает введение субъекту четвертой дозы композиции, которая содержит фармацевтически приемлемый носитель и конъюгат в количестве от 5 мкг до 200 мкг, например, от 15 мкг до 60 мкг, на дозу через 44-52 недели, например, через 48 недель, после начального введения композиции.

25 В некоторых вариантах осуществления изобретения введение четвертой дозы композиции может усиливать гуморальный иммунный ответ, индуцированный композицией, такой как гуморальный иммунный ответ, включающий ответ в виде анти-pTau IgG и/или ответ в виде анти-ePHF IgG, при этом предпочтительно гуморальный иммунный ответ повышается по меньшей

30

мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более при измерении по меньшей мере через 2 недели после введения четвертой дозы композиции.

Одним из основных объектов изобретения является способ индукции устойчивого иммунного ответа против фосфорилированного белка Тау (pTau) у человека, который нуждается в этом, включающий:

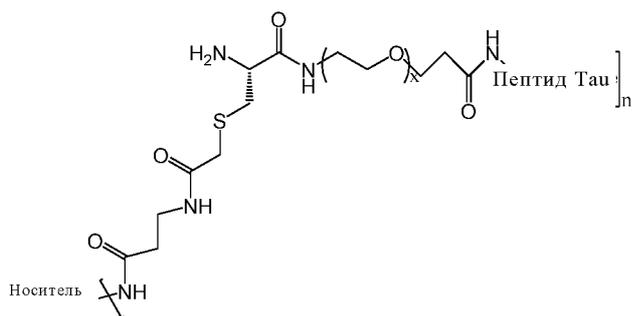
I. внутримышечное введение субъекту праймер-вакцины, содержащей в эффективном количестве конъюгат; и

II. внутримышечное введение субъекту первой бустерной вакцины, содержащей в эффективном количестве конъюгат, через 6-10 недель после введения праймер-вакцины,

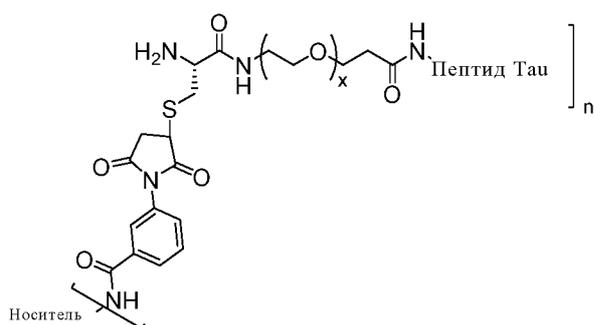
в котором:

устойчивый иммунный ответ сохраняется в течение по меньшей мере примерно 20 недель после введения праймер-вакцины;

конъюгат имеет структуру формулы (I):



или имеет структуру формулы (II):



где

x обозначает целое число от 0 до 10, предпочтительно от 2 до 6, наиболее предпочтительно 3;

n обозначает целое число от 3 до 15, предпочтительно от 3 до 12;

носитель обозначает иммуногенный носитель, выбранный из группы, которая состоит из группа, состоящей из гемоцианина лимфы улитки (KLH), столбнячного токсоида, CRM197 и смеси белков наружной мембраны из *N. meningitidis* или их производного; и

5 пептид Тау обозначает фосфопептид Тау, который имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 12;

эффективное количество конъюгата составляет 5 мкг - 200 мкг конъюгата на дозу.

10 В некоторых вариантах осуществления изобретения носитель представляет собой CRM197.

В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективное количество конъюгата составляет 15 мкг конъюгата на дозу.

15 В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективное количество конъюгата составляет 60 мкг конъюгата на дозу.

В некоторых вариантах осуществления изобретения способ, предлагаемый в изобретении, включает дополнительно внутримышечное введение субъекту композиции второй бустерной вакцины, которая содержит в эффективном количестве конъюгат, через 20-26 недель после введения праймер-вакцины, и устойчивый иммунный ответ сохраняется в течение по меньшей мере примерно 36 недель после введения праймер-вакцины.

25 В некоторых вариантах осуществления изобретения композицию второй бустерной вакцины вводят через 24 недели после введения праймер-вакцины, и устойчивый иммунный ответ сохраняется в течение по меньшей мере примерно 48 недель после введения праймер-вакцины.

30 В некоторых вариантах осуществления изобретения способ, предлагаемый в изобретении, дополнительно включает внутримышечное введение субъекту композиции третьей бустерной вакцины, которая содержит в эффективном количестве конъюгат, через 45-50 недель после введения праймер-вакцины, и устойчивый иммунный ответ сохраняется в течение по меньшей мере примерно 67 недель после введения праймер-вакцины.

В некоторых вариантах осуществления изобретения композицию третьей бустерной вакцины вводят через 48 недель после введения праймер-вакцины, и

устойчивый иммунный ответ сохраняется в течение по меньшей мере примерно 74 недель после введения праймер-вакцины.

В некоторых вариантах осуществления изобретения устойчивый иммунный ответ включает IgG-ответ против фосфорилированного Тау (pTau), при этом
5 предпочтительно титр анти-pTau IgG по меньшей мере в 50, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более раз выше, чем плацебо-контроле.

В некоторых вариантах осуществления изобретения устойчивый иммунный ответ включает IgG-ответ против нефосфорилированного Тау, при этом
10 предпочтительно титр анти-Тау IgG по меньшей мере в 50, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более раз выше, чем в плацебо-контроле.

В некоторых вариантах осуществления изобретения устойчивый иммунный ответ включает IgG-ответ против обогащенных парных спиральных филаментов (ePHF), при этом предпочтительно титр анти-ePHF IgG по меньшей мере в 2, 3,
15 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более раз выше, чем в плацебо-контроле.

В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект нуждается в очистке от агрегатов Тау.

В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект нуждается в лечении нейродегенеративного заболевания или нарушения, вызванного или
20 связанного с образованием нейрофибриллярных поражений. Предпочтительно человек нуждается в лечении болезни Альцгеймера, такой как ранняя стадия болезни Альцгеймера, легкое когнитивное нарушение (MCI), вызванное болезнью Альцгеймера, болезнь Альцгеймера легкой степени тяжести или болезнь Альцгеймера от легкой до умеренной степени тяжести. В некоторых
25 вариантах осуществления изобретения головной мозг субъекта является позитивным по амилоиду, но у него еще отсутствуют существенные когнитивные нарушения. В других вариантах осуществления изобретения субъект имеет аномальный уровень Абета-амилоида 42 (A β 42) в спинномозговой жидкости (CSF), что согласуется с AD-патологией. В другом варианте
30 осуществления изобретения субъект нуждается в лечении нейродегенеративного заболевания или нарушения, вызванного или связанного с образованием нейрофибриллярных поражений.

Дополнительные объекты, признаки и преимущества настоящего изобретения должны стать более очевидными после ознакомления с приведенными ниже подробным описанием изобретения и формулой изобретения.

5 Краткое описание чертежей

Приведенное выше краткое изложение сущности изобретения и приведенное ниже подробное описание изобретения должны стать более понятными после ознакомления ими в сочетании с прилагаемыми чертежами. Для иллюстрации изобретения на чертежах показаны варианты осуществления изобретения, которые в контексте настоящего описания являются предпочтительными. Однако, как должно быть очевидно, изобретение не ограничено точными вариантами осуществления, представленными на чертежах.

На чертежах показано:

на фиг. 1 - график, на котором представлен в виде геометрического среднего (\pm 95% доверительный интервал) ответ в виде анти-pTau IgG против фосфорилированного пептида Tau (pTau) в зависимости от времени у субкогорты 2.1 после обработки либо JACI-35.054 (15 мкг или 60 мкг), либо плацебо (набор для ИТТ-анализа);

на фиг. 2- график, на котором представлен в виде геометрического среднего (\pm 95% доверительный интервал) ответ в виде анти-Tau IgG против нефосфорилированного пептида Tau в зависимости от времени у субкогорты 2.1 после обработки либо JACI-35.054 (15 мкг или 60 мкг), либо плацебо (набор для ИТТ-анализа);

на фиг. 3- график, на котором представлены в виде геометрического среднего (\pm 95% доверительный интервал) титры анти-ePHF (обогащенные парные спиральные филаменты) IgG в зависимости от времени у субкогорты 2.1 после обработки либо JACI-35.054 (15 мкг или 60 мкг), либо плацебо (набор для ИТТ-анализа);

на фиг. 4 - график, на котором представлен профиль распознавания эпитопов антителами, индуцированными вакцинацией JACI-35.054 (15 мкг), у 8 пациентов с AD, который определяли путем эпитопного картирования методом ELISA на коротких 8-мерных перекрывающихся пептидах, охватывающих фосфопептиды T3.30 (SEQ ID NO: 19) и T3.85 (SEQ ID NO: 21) и

нефосфорилированные пептиды T3.56 (SEQ ID NO: 20) и T3.86 (SEQ ID NO: 22). На фиг. 4А показан профиль распознавания эпитопов антителами к фосфорилированному Тау в субкогорте 2.1. На фиг. 4Б показан профиль распознавания эпитопов антителами к Тау в субкогорте 2.1. О.П. - оптическая плотность.

Подробное описание изобретения

Различные публикации, статьи, патенты и заявки на патент процитированы или описаны в разделе «Предпосылки создания изобретения» и во всей спецификации; каждая из указанных ссылок в полном объеме включена в настоящий документ в качестве ссылки. Обсуждение документов, актов, материалов, устройств, изделий или т.п., которые включены в настоящую спецификацию, предназначено для обоснования настоящего изобретения. Такое обсуждение не является признанием того, что любой или все эти проблемы являются частью существующего уровня техники в отношении любых описанных или заявленных изобретений.

Если не указано иное, то все технические и научные понятия, применяемые в описании, имеют то значение, которое является хорошо известным обычному специалисту в области, к которой относится данное изобретение. В противном случае, некоторые понятия, применяемые в описании, имеют значения, указанные в спецификации.

Следует отметить, что в контексте настоящего описания и в прилагаемой формуле изобретения применение понятий в единственном числе подразумевает их применение во множественном числе, если из контекста четко не следует иное.

Если не указано иное, то любое численное значение, такое как концентрация или диапазон концентраций, указанное в настоящем описании, следует понимать как понятие, модифицированное во всех случаях включением понятия «примерно». Таким образом, численное значение обычно включает значение, отличающееся на $\pm 10\%$ от указанного значения. Например, концентрация 1 мг/мл включает концентрацию от 0,9 мг/мл до 1,1 мг/мл. Аналогично этому диапазон концентраций от 1% до 10% (мас./об.) включает концентрации от 0,9% (мас./об.) до 11% (мас./об.). В контексте настоящего описания применение численного диапазона четко включает все возможные

субдиапазоны, все отдельные численные значения в пределах этого диапазона, включая целые числа и доли чисел, в пределах таких диапазонов, если из контекста четко не следует иное.

5 Если не указано иное, то понятие «по меньшей мере», предшествующее ряду элементов, следует понимать как относящиеся к каждому из элементов в ряду. Специалистам в данной области должны быть очевидны или они могут установить с использованием не более чем обычных экспериментов, многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления изобретения, указанных в настоящем описании. Подразумевается, что указанные эквиваленты подпадают
10 под объем изобретения.

Подразумевается, что применяемые в настоящем описании понятия "содержит", "содержащий", "включает", "включающий", "имеет", "имеющий" "входит", "входящий" или любые другие их вариации, включают указанное
15 целое число или группу целых чисел, но не исключают любое другое целое число или группу целых чисел, и подразумевается, что они являются неисключительными или открытыми. Например, композиция, смесь, процесс, способ, изделие или устройство, которые содержат перечень элементов, не обязательно ограничены только этими элементами, но могут включать другие элементы, не перечисленные в явном виде или присущие такой композиции,
20 смеси, процессу, способу, изделию или устройству. Кроме того, если четко не указано иное, то "или" относится к случаю, включающему "или", а не к исключающему "или". Например, условие 1 или 2 удовлетворяется любым из следующих условий: 1 истинно (или присутствует) и 2 ложно (или отсутствует), 1 ложно (или отсутствует) и 2 истинно (или присутствует), и оба 1 и 2 истинны
25 (или присутствуют).

Следует также понимать, что понятия "примерно", "приблизительно", "в целом", "практически" и подобные понятия, используемые в настоящем описании при обозначении размера или характеристики компонента, предпочтительного в контексте изобретения, указывают на то, что описанный
30 размер/характеристика не является строгой границей или параметром и не исключает незначительные отличия от них, которые функционально одинаковы или сходны, что должно быть очевидно обычному специалисту в данной области. Как минимум, такие ссылки, включающие числовой параметр, должны

содержать отклонения, которые при использовании математических и промышленных принципов, принятых в данной области (например, округление, погрешности измерений или другие систематические ошибки, производственные допуски и т.д.), не изменяют младшую значащую цифру.

5 В изобретении предложен способ индукции антител против Тау, предпочтительно по меньшей мере одного из фосфорилированного Тау и обогащенных парных спиральных филаментов (ePHF), без индукции серьезного нежелательного явления, такого как энцефалит, у человека, который нуждается в этом. В конкретных вариантах осуществления изобретения способ включает
10 введение субъекту в эффективном количестве конъюгата, который содержит фосфопептид Тау, ковалентно связанный с иммуногенным носителем либо непосредственно, либо через линкер.

В контексте настоящего описания понятие "антитело к фосфорилированному Тау" относится к антителу, которое связывается с Тау,
15 который фосфорилирован на аминокислотном остатке в одном или нескольких положениях аминокислотной последовательности Тау. Фосфорилированные аминокислотные остатки могут представлять собой, например, серин (Ser), треонин (Thr) или тирозин (Tyr). Сайт фосфорилированного Тау, с которым связывается антитело к фосфорилированному Тау, предпочтительно
20 представляет собой сайт, который специфически фосфорилируется при нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезнь Альцгеймера. Примеры сайтов фосфорилированного Тау, с которым связывается антитело к фосфорилированному Тау, включают, например, Tyr18, Ser199, Ser202, Thr205, Thr212, Ser214, Ser396, Ser404, Ser409, Ser422, Thr427. В контексте настоящего
25 описания аминокислотные положения приведены в соответствии с последовательностью изоформы 2 ассоциированного с микротрубочками человека белка Тау, который имеет аминокислотную последовательность, представленную в GenBank под регистрационным номером NP_005901.2.

30 Способность индуцировать антитела к фосфорилированному Тау после введения можно определять путем тестирования биологического образца (например, крови, плазмы, сыворотки, PBMC, мочи, слюны, кала, интерстициальной жидкости (ISF), CSF или лимфатической жидкости) субъекта на присутствие антител, например, антител IgG- или IgM-типа, направленных

против иммуногенного(ых) пептида(ов) Тау, введенного(ых) в фармацевтической композиции (см., например, Harlow, Antibodies, Cold Spring Harbor Press, 1989). Например, титры антител, образовавшихся в ответ на введение композиции, включающей иммуноген, можно измерять с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), других анализов на основе ELISA (например, технологии MSD-Meso Scale Discovery), дот-блоттинга, электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГ), ELISPOT или анализа антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP).

10 В контексте настоящего описания понятие "нежелательное явление" (АЕ) относится к любому неблагоприятному медицинскому событию у пациента, получающего фармацевтический продукт, которое не обязательно имеет причинно-следственную связь с лечением. Согласно вариантам осуществления изобретения АЕ оценивают по 3-балльной шкале возрастающей тяжести с
15 использованием следующих определений: легкая (1-я степень), относящаяся к АЕ, которая легко переносится пациентом, вызывает минимальный дискомфорт и не мешает повседневной деятельности; умеренная (2-я степень), относящаяся к АЕ, которая доставляет дискомфорт, достаточно сильный, чтобы мешать нормальной повседневной деятельности, и при которой может потребоваться
20 вмешательство; тяжелая (3-я степень), относящаяся к АЕ, которая препятствует нормальной повседневной деятельности, и при которой, как правило, требуется лечение или другое вмешательство. Серьезное АЕ (SAE) может представлять собой любое АЕ, возникающее в любой дозе и приводящее к любому из следующих исходов: смерть, когда смерть является исходом, а не событием;
25 опасное для жизни событие, при котором пациент подвергается риску смерти во время события; это не относится к событию, которое гипотетически могло бы привести к смерти, если бы оно было более тяжелым; к госпитализации пациента, например, незапланированной госпитализации на ночь или продлению существующей госпитализации; к стойкой или значительной
30 нетрудоспособности или существенному нарушению способности выполнять нормальные жизненные функции; к врожденной аномалии/врожденному дефекту; важному медицинскому событию (по мнению исследователя), которое может подвергнуть опасности пациентов или потребовать медицинского или

хирургического вмешательства для предотвращения одного из других перечисленных выше исходов (например, интенсивное лечение в отделении неотложной помощи или на дому в связи с аллергическим бронхоспазмом, дискразиями крови или судорогами, которые не приводят к госпитализации).

5 Госпитализация предусматривает официальное направление в больницу. Госпитализация или продление срока госпитализации являются критериями того, что АЕ является серьезным, однако само по себе оно не рассматривается как SAE. При отсутствии АЕ принимающий участие в испытании исследователь не должен сообщать о госпитализации или продлении срока госпитализации в качестве SAE. Это может иметь место в следующих ситуациях: госпитализация
10 или продление срока госпитализации необходимы для проведения процедуры, предусмотренной протоколом; или госпитализация или продление срока госпитализации является частью рутинной процедуры, выполняемой центром (например, удаление стента после операции). Это должно быть занесено в
15 протокол исследования. Госпитализация для планового лечения ранее существовавшего заболевания, которое не ухудшилось во время исследования, не рассматривается в качестве АЕ.

Осложнения, возникающие во время госпитализации, рассматриваются как АЕ. Если осложнение продлевает срок госпитализации или соответствует
20 любому из других критериев SAE, то это событие относится к категории SAE.

В контексте настоящего описания понятие "энцефалит" относится к воспалению головного мозга, которое может быть вызвано инфекционными и неинфекционными причинами. В контексте настоящего описания понятие "менингоэнцефалит" относится к состоянию, характеризующемуся инфекцией
25 или воспалением мозговых оболочек и головного мозга в целом. Диагноз энцефалита или менингоэнцефалита может быть установлен методами, известными специалистам в данной области, с учетом настоящего изобретения, например, путем клинических, неврологических и психиатрических
30 обследований, взятия биологических образцов, включая образцы крови и CSF, с помощью МРТ-сканирования и электроэнцефалографии (ЭЭГ).

В контексте настоящего описания понятие "Тau" или "белок Тау", известный также как белок Тау, ассоциированный с микротрубочками, MAPT, белок нейрофибриллярных клубков, парный спиральный филамент-Тау, PHF-

Тau, MAPTL, MTBT1, относится к белкам центральной и периферической нервной системы, имеющим множество изоформ. В центральной нервной системе (ЦНС) человека в результате альтернативного сплайсинга присутствует шесть основных изоформ белка Тау длиной от 352 до 441 аминокислоты (Hanger и др., Trends Mol Med., 15, 2009, сс. 112-119). Примеры Тау включают (но не ограничиваясь только ими) изоформы Тау в ЦНС, такие как наиболее длинная состоящая из 441 аминокислоты изоформа Тау (4R2N), которую называют также изоформой 2 ассоциированного с микротрубочками белка Тау, которая имеет четыре повтора и две вставки, например, изоформа 2 человеческого Тау, которая имеет аминокислотную последовательность, представленную в GenBank под регистрационным номером NP_005901.2.

Другие примеры Тау включают состоящую из 352 аминокислот самую короткую (эмбриональную) изоформу (3R0N), которую называют также изоформой 4 ассоциированного с микротрубочками белка Тау, которая имеет три повтора и не имеет вставок, например, изоформа 4 человеческого Тау, которая имеет аминокислотную последовательность, представленную в GenBank под регистрационным номером NP_058525.1. Примеры Тау включают также изоформу "большой Тау", которая экспрессируется в периферических нервах, содержит 300 дополнительных остатков (экзон 4а) (Friedhoff и др., Biochimica et Biophysica Acta, 1502, 2000, сс. 122-132). Примеры Тау включают человеческий большой Тау, который представляет собой состоящий из 758 аминокислот белок, кодируемый транскриптом мРНК, состоящим из 6762 нуклеотидов (NM_016835.4) или его изоформами. Аминокислотная последовательность представленного в качестве примера человеческого большого Тау представлена в GenBank под регистрационным номером NP_058519.3. В контексте настоящего описания понятие "Тау" включает гомологи Тау из видов, отличных от человека, таких как *Macaca fascicularis* (обезьяна циномогус, яванский макак-крабоед), макак резус или *Pan troglodytes* (шимпанзе). В контексте настоящего описания понятие "Тау" включает белки, содержащие мутации, например, точечные мутации, фрагменты, инсерции, делеции и сплайсинговые варианты полноразмерного Тау дикого типа. Под понятие "Тау" подпадают также пост-трансляционные модификации аминокислотной последовательности Тау. Пост-

трансляционные модификации включают (но не ограничиваясь только им) фосфорилирование.

В контексте настоящего описания понятие "пептид" или "полипептид" относится к полимеру, состоящему из аминокислотных остатков, родственному встречающимся в естественных условиях структурным вариантам и их синтетическим, не встречающимся в естественных условиях аналогам, соединенным пептидными связями. Понятие относится к пептиду любого размера, структуры или функции. Как правило, пептид состоит по меньшей мере из трех аминокислот. Пептид может представлять собой встречающийся в естественных условиях, рекомбинантный или синтетический пептид или любую их комбинацию. Синтетические пептиды можно синтезировать, например, с помощью автоматического синтезатора полипептидов. Примеры пептидов Тау включают любой пептид белка Тау, имеющий длину от примерно 5 до примерно 30 аминокислот, предпочтительно длину от примерно 10 до примерно 25 аминокислот, более предпочтительно длину от примерно 16 до примерно 21 аминокислоты. В настоящем описании пептиды представлены в направлении от N- к C-концу с использованием стандартной однобуквенной или трехбуквенной аббревиатуры аминокислот, в которой фосфорилированные остатки обозначены буквой "p". Примеры пептидов Тау, ценные для изобретения, включают (но не ограничиваясь только ими) пептиды Тау, содержащие аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 1-12, или пептиды Тау, которые имеют аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90% или 95% аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 1-12.

Авидность антитела можно измерять с помощью индекса авидности с использованием методов, известных в данной области, с учетом настоящего описания. Титры антител против конкретного антигена измеряют при двух различных концентрациях наносимого антигена: одна из них представляет собой концентрацию насыщения, при которой все антитела могут связываться с антигеном, а другая представляет собой низкую концентрацию, при которой только антитела с наибольшей связывающей способностью могут связываться с антигеном. В контексте настоящего описания понятие "индекс авидности" относится к соотношению уровней титров антител, измеренных при низкой и

высокой плотности наносимого антигена. Например, avidность антител к антигену, такому как ePHF или pTau, можно измерять в разные моменты времени после иммунизации или после различных иммунизаций, для того, чтобы оценить, увеличивается ли avidность (измеряемая с помощью индекса авидности) с течением времени. В контексте настоящего описания понятие антитела с "повышенной авидностью" или "повышенной авидностью связывания" с антигеном относится к антителам с возрастающим индексом авидности к антигену с течением времени в ходе лечения или иммунизации. Повышенная авидность предполагает потенциальное созревание аффинности антител.

В контексте настоящего описания понятие "фосфопептид" или "фосфо-эпитоп" относится к пептиду, фосфорилированному на одном или нескольких аминокислотных остатках. Примеры фосфопептидов Tau включают любой пептид Tau, который содержит один или несколько фосфорилированных аминокислотных остатков. Согласно настоящему описанию любые приемлемые фосфопептиды Tau, известные специалистам в данной области, можно применять в конъюгате. Согласно конкретным вариантам осуществления изобретения один или несколько фосфопептидов Tau содержит(ат) аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 1-3 или 5-12, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 1-3 или 5-12, в которой один или несколько идентичных аминокислотных остатков представляют собой фосфорилированные остатки. Предпочтительно фосфопептид Tau содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 1-3. Аномально фосфорилированный Tau легко агрегирует с образованием нерастворимых олигомеров, которые являются нейротоксичными и способствуют нейродегенерации (Goedert и др., 1991). Олигомеры превращаются в клубки так называемых парных спиральных филаментов (PHF) (Alonso и др., 2001). Убедительно доказано, что степень патологии нейрофибриллярных клубков коррелирует со степенью деменции у субъектов с AD (Bierer и др., 1995; Braak и Braak, 1991; Delacourte, 2001).

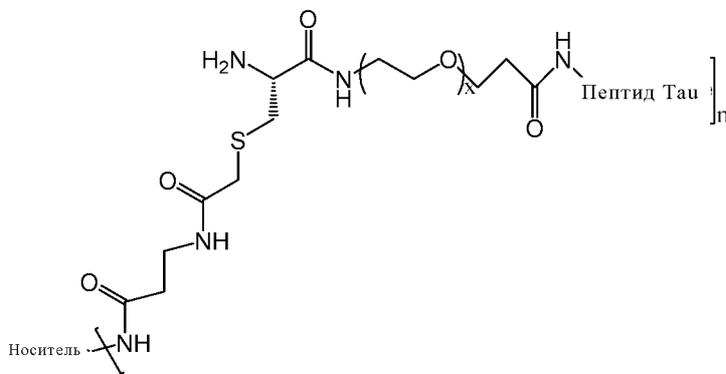
Пептиды Тау, которые можно применять согласно настоящему изобретению, можно синтезировать путем твердофазного пептидного синтеза или с помощью рекомбинантных систем экспрессии. Автоматические синтезаторы пептидов поступают в продажу от многих поставщиков, таких как фирма Applied Biosystems (Фостер-Сити, шт. Калифорния). Рекомбинантные системы экспрессии могут включать бактерий, таких как *E. coli*, дрожжей, клетки насекомых или клетки млекопитающих. Процедуры рекомбинантной экспрессии описаны у Sambrook и др., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (изд-во C.S.H.P. Press, NY, 2-е изд. 1989).

10 Конъюгат

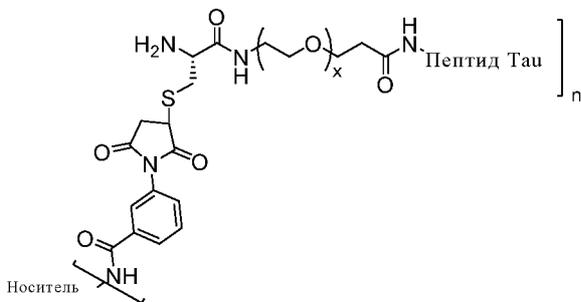
Примеры конъюгатов, которые можно применять согласно настоящему изобретению, включают (но не ограничиваясь только ими) конъюгат фосфорилированного Тау, описанный в публикации патента США 2019/0119341, описание которого в полном объеме включено в настоящее описание в качестве ссылки.

15

Согласно конкретным объектам изобретения конъюгат имеет следующую структуру:



или структуру формулы (II):



20

где

x обозначает целое число от 0 до 10;

n обозначает целое число от 2 до 15, предпочтительно от 3 до 11;
носитель обозначает иммуногенный носитель; и
пептид Тау обозначает фосфопептид Тау.

В контексте настоящего описания понятие "иммуногенный носитель"
5 относится к иммуногенной субстанции, которую можно сшивать с пептидом Тау.
Иммуногенный фрагмент, сшитый с пептидом Тау, может индуцировать
иммунный ответ и вызывать производство антител, которые специфически
связываются с пептидом Тау. Иммуногенные фрагменты представляют собой
функциональные фрагменты, которые включают белки, полипептиды,
10 гликопротеины, сложные полисахариды, частицы, нуклеиновые кислоты,
полинуклеотиды и т.п., которые распознаются как чужеродные и в результате
вызывают иммунологический ответ со стороны хозяина. В изобретении можно
использовать любой приемлемый иммуногенный носитель, известный
специалистам в данной области, с учетом настоящего описания. Согласно
15 конкретным вариантам осуществления изобретения иммуногенный носитель
представляет собой гемоцианин лимфы улитки (KLH), столбнячный токсин,
CRM197 (нетоксичная форма дифтерийного токсина), смесь белков наружной
мембраны из *N. meningitidis* (OMP) или их производное. Согласно конкретным
вариантам осуществления изобретения иммуногенный носитель представляет
20 собой CRM197.

Согласно конкретным вариантам осуществления изобретения пептид Тау
конъюгируют с иммуногенным носителем через линкер. В контексте настоящего
описания понятие "линкер" относится к химическому фрагменту, который
соединяет иммуногенный носитель с пептидом Тау. В изобретении можно
25 применять любой приемлемый линкер, известный специалистам в данной
области, с учетом настоящего описания. Линкеры могут представлять собой,
например, одинарную ковалентную связь, замещенный или незамещенный
алкил, замещенный или незамещенный гетероалкильный фрагмент, линкер на
основе полиэтиленгликоля (ПЭГ), пептидный линкер, линкер на основе сахара
30 или расщепляемый линкер, такой как дисульфидная связь или сайт расщепления
протеазой, или аминокислоту, или любую их комбинацию. Примеры линкеров
могут включать один или несколько линкеров, выбранных из полиэтиленгликоля
(ПЭГ), сукцинимидил-3-(бромацетамидо)пропионата (SBAP), сложного эфира *m*-

малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимид (MBS), или одной или нескольких аминокислот, таких как Cys, Lys или иногда Ser или Thr, или их комбинации.

В конкретных вариантах осуществления изобретения x обозначает целое число от 1 до 10, от 2 до 9, от 2 до 8, от 2 до 7, от 2 до 6, от 2 до 5, от 2 до 4 или от 2 до 3. Согласно конкретным вариантам осуществления изобретения x обозначает 3.

В конкретных вариантах осуществления изобретения несколько фосфопептидов Тау можно конъюгировать с одним иммуногенным носителем. В некоторых вариантах осуществления изобретения n обозначает число от 2 до 15, от 3 до 11, от 3 до 9, от 3 до 8 или от 3 до 7.

В конкретных вариантах осуществления изобретения конъюгат содержит один или несколько пептидов Тау. В конкретных вариантах осуществления изобретения пептиды Тау конъюгата могут быть одинаковыми или различными.

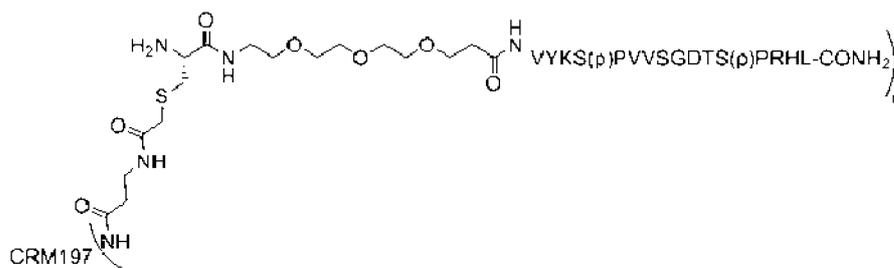
В конкретных вариантах осуществления изобретения фосфопептид Тау состоит из аминокислотной последовательности, представленной в одной из SEQ ID NO: 1-3.

В конкретных вариантах осуществления изобретения линкер содержит $(C_2H_4O)_x$ -цистеинацетамидопропионамид или *m*-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидный эфир – цистеин – $(C_2H_4O)_x$, где x обозначает целое число от 0 до 10, такое как 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

В конкретных вариантах осуществления изобретения носитель ковалентно связан с N-концом фосфопептида Тау через линкер.

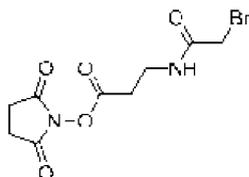
В конкретных вариантах осуществления изобретения носитель ковалентно связан с C-концом фосфопептида Тау через линкер.

В конкретных вариантах осуществления изобретения конъюгат имеет структуру:



где n обозначает целое число от 2 до 15, предпочтительно 3-11, более предпочтительно 3-7, и VYKS(p)PVVSGDTS(p)PRHL-CONH₂ содержит пептид фосфо-Тау, имеющий SEQ ID NO: 2.

5 Конъюгаты, предлагаемые в изобретении, можно получать методами, известными в данной области, с учетом настоящего описания. Например, вышеуказанный конъюгат можно создавать путем взаимодействия сукцинимидил-3-(бромацетиламино)пропионата (SBAP):



10 с аминогруппой CRM197 с получением амидной связи. Указанный предшественник CRM197 затем может взаимодействовать с пептидом Тау (например, фосфопептидом Тау, имеющим SEQ ID NO: 2), конъюгированным на его N-конце или на его C-конце с линкером ПЭГ-цистеин со свободной нуклеофильной тиольной группой, с образованием конъюгата фосфопептида Тау.

15 Фармацевтические композиции

Фармацевтические композиции, содержащие в эффективном количестве конъюгат, который можно применять согласно изобретению, в сочетании с фармацевтически приемлемым эксципиентом и/или носителем, можно 20 приготавливать с помощью методов, известных в данной области, с учетом настоящего описания. Оптимальные соотношения каждого компонента в композициях можно определять с помощью методов, хорошо известных специалистам в данной области, с учетом настоящего описания.

Фармацевтически приемлемые эксципиенты и/или носители хорошо известны в данной области (см. Remington's Pharmaceutical Science (15-ое изд.), 25 изд-во Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1980). Предпочтительный состав фармацевтической композиции зависит от предполагаемого пути введения и терапевтического применения. Композиции могут включать фармацевтически приемлемые, нетоксичные носители или разбавители, которые относятся к носителям, обычно применяемым для приготовления фармацевтических 30 композиций для введения животным или человеку. Разбавитель выбирают так, чтобы он не влиял на биологическую активность комбинации. Примерами таких

разбавителей являются дистиллированная вода, забуференный фосфатом физиологический раствор, растворы Рингера, раствор декстрозы и раствор Хэнка. Кроме того, фармацевтическая композиция или препарат может включать также другие носители, адъюванты или нетоксичные, не обладающие терапевтическим действием неиммуногенные стабилизаторы и т.п. Должно быть очевидно, что характеристики носителя, эксципиента или разбавителя должны зависеть от пути введения при конкретном применении.

Фармацевтическая композиция может содержать смесь конъюгатов с одним и тем же иммуногенным пептидом Тау. В альтернативном варианте фармацевтическая композиция может содержать смесь конъюгатов с различными иммуногенными пептидами Тау, предлагаемыми в настоящем изобретении.

Согласно конкретному варианту осуществления изобретения конъюгат можно вводить в комбинации с приемлемым адъювантом для достижения требуемого иммунного ответа у субъекта. Приемлемые адъюванты можно вводить до, после или одновременно с конъюгатом, предлагаемым в настоящем изобретении. Предпочтительные адъюванты усиливают характерный ответ на иммуноген, не вызывая конформационных изменений в иммуногене, которые влияют на качественную форму ответа.

В одном из вариантов осуществления изобретения адъювантами, которые можно использовать в способе, предлагаемом в изобретении, являются соли алюминия (квасцы), такие как гидроксид алюминия, фосфат алюминия и сульфат алюминия.

В другом варианте осуществления изобретения адъювантами, которые можно использовать в способе применения, являются агонисты TLR, такие как олигонуклеотиды CpG. В контексте настоящего описания понятие "олигонуклеотид CpG", "олигодезоксинуклеотид CpG" или "ODN CpG" относится к олигонуклеотиду, который содержит по меньшей мере один мотив CpG. В контексте настоящего описания понятие "олигонуклеотид", "олигодезоксинуклеотид" или "ODN" относится к полинуклеотиду, образованному из множества связанных нуклеотидных звеньев. Такие олигонуклеотиды можно получать из существующих источников нуклеиновых кислот или можно получать методами синтеза. В контексте настоящего описания

понятие "мотив CpG" относится к нуклеотидной последовательности, которая содержит неметилированные динуклеотиды цитозин-фосфат-гуанин (CpG) (т.е. цитозин (C), за которым следует гуанин (G)), соединенные фосфатной связью или фосфодиэфирным каркасом, или другими межнуклеотидными связями, такими как фосфоротиоат (ps), фосфородитиоат (ps₂), метилфосфонат (mp) или метилфосфоротиоат (gp). Фосфоротиоат, фосфородитиоат, метилфосфонат и метилфосфоротиоат представляют собой стабилизирующие межнуклеотидные связи, в то время как фосфодиэфир представляет собой встречающуюся в естественных условиях межнуклеотидную связь.

Олигонуклеотидфосфоротиоаты, как правило, синтезируют в виде случайной рацемической смеси фосфоротиоатных связей Rp и Sp. В изобретении можно применять любой приемлемый олигонуклеотид CpG, известный специалистам в данной области, с учетом настоящего описания. Примеры таких олигонуклеотидов CpG включают (но не ограничиваясь только ими) CpG2006 (известный также как CpG 7909), CpG 1018, CpG2395, CpG2216 или CpG2336.

Согласно конкретным вариантам осуществления изобретения олигонуклеотид CpG является липидизированным, то есть конъюгированным (ковалентно связанным) с липидным фрагментом. В контексте настоящего описания понятие "липидный фрагмент" относится к фрагменту, содержащему липофильную структуру. Липидные фрагменты, такие как алкильная группа, жирная кислота, триглицерид, диглицерид, стероид, сфинголипид, гликолипид или фосфолипид, в частности стерин, такой как холестерин, или жирные кислоты, при присоединении к высокогидрофильным молекулам, таким, как нуклеиновые кислоты, могут существенно усиливать связывание с белками плазмы и, следовательно, удлинять время полужизни гидрофильных молекул в кровотоке. Кроме того, установлено, что связывание с определенными белками плазмы, такими как липопротеины, увеличивает поглощение в определенных тканях, экспрессирующих соответствующие рецепторы липопротеинов (например, LDL-рецептор, HDL-рецептор или рецептор-ловушка SR-B1). В частности, липидный фрагмент, конъюгированный с фосфопептидами и/или олигонуклеотидом CpG, позволяет прикреплять указанные пептиды и/или олигонуклеотиды к мембране липосомы посредством гидрофобного фрагмента.

Такие адъюванты можно применять как в сочетании с другими иммунностимулирующими агентами, такими как соединения из класса MPLA (3-де-О-ацилированный монофосфориллипид А (MPLTM), 3-деацил-монофосфорил-3-гексациллипид А (синтетический) (3D-(6-ацил) PHAD®), липид А PHAD™, PHAD®-504, 3D-PHAD®)), полимерные или мономерные аминокислоты, такие как полиглутаминовая кислота или полилизин, так и без них. Такие адъюванты можно использовать как с другими специфическими иммунностимулирующими агентами, такими как мурамилпептиды (например, N-ацетилмурамил-L-треонил-D-изоглутамин (thr-MDP), N-ацетил-нормурамил-L-аланил-D-изоглутамин (nog-MDP), N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутаминил-L-аланин-2-(1'-2' дипальмитоил-sn-глицеро-3-гидроксифосфорилокси)-этиламин (MTP-PE), N-ацетилглюксаминил-N-ацетилмурамил-L-Al-D-изоглу-L-Ala-дипальмитоксипропиламид (DTP-DPP) Theramide™) или другие компоненты клеточной стенки бактерий, так и без них.

Эмульсии типа масло-в-воде включают MF59 (см. WO 90/14837), содержащую 5% сквалена, 0,5% Твин 80 и 0,5% Span 85 (необязательно содержащий различные количества MTP-PE), приготовленные в виде субмикронных частиц с использованием микрофлюидизатора; SAF, содержащую 10% сквалена, 0,4% Твин 80, 5% полимера L121, блокированного плуроником, и thr-MDP, которую либо микрофлюидизируют с приготовлением субмикронной эмульсии, либо перемешивают путем вращения с получением эмульсии с большим размером частиц; и адъювантную систему Ribit™ (RAS) (фирма Ribit ImmunoChem, Гамильтон, шт. Монтана), содержащую 0,2% Твин 80, и один или несколько компонентов клеточной стенки бактерий, выбранных из группы, состоящей из монофосфориллипида А (MPLTM), димиколата трегалозы (TDM) и каркаса клеточной стенки (CWS), предпочтительно MPLTM.+CWS (Detox™). Другие адъюванты включают полный адъювант Фрейнда (CFA) и цитокины, такие как интерлейкины (IL-1, IL-2 и IL-12), колониестимулирующий фактор макрофагов (M-CSF) и фактор некроза опухоли (TNF).

В конкретных вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция, которую можно использовать в способе применения, дополнительно содержит один или несколько пригодных адъювантов, представленных в настоящем описании, таких как соль алюминия, например,

гидроксид алюминия, фосфат алюминия и/или сульфат алюминия, и/или CpG, например, CpG2006 (также известный как CpG 7909), CpG 1018, CpG2395, CpG2216 или CpG2336. В одном из вариантов осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель, гидроксид алюминия, CpG 7909 и конъюгат фосфопептида Тау, ковалентно связанного с CRM197 посредством линкера.

В других вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит представленный в настоящем описании конъюгат, один или несколько адъювантов и буфер, содержащий одну или несколько аминокислот, таких как гистидин или глицин, один или несколько углеводов, таких как глюкоза или сахароза, и/или поверхностно-активное вещество, такое как полисорбат 80, полисорбат 20 и т.д.

Способы применения

Основным объектом изобретения является способ безопасной индукции иммунного ответа против белка Тау у человека, страдающего нейродегенеративным заболеванием, нарушением или состоянием, который включает введение субъекту в эффективном количестве конъюгата фосфорилированного Тау. Согласно конкретным объектам изобретения иммунный ответ индуцируют против белка Тау, предпочтительно фосфорилированного белка Тау, более предпочтительно ePHF.

В контексте настоящего описания понятие "эффективное количество" относится к количеству действующего вещества или компонента, которое вызывает требуемый биологический или медицинский ответ у субъекта. Выбор конкретной эффективной дозы могут осуществлять (например, с помощью клинических испытаний) специалисты в данной области с учетом нескольких факторов, включая заболевание, подлежащее лечению или профилактике, сопутствующие симптомы, вес тела пациента, иммунный статус пациента и другие факторы, известные специалисту в данной области. Точная доза, применяемая в препарате, должна зависеть также от метода введения, пути введения, места назначения, физиологического состояния пациента, других назначаемых лекарственных средств и тяжести заболевания и должна определяться в соответствии с мнением практикующего врача и индивидуальными особенностями каждого пациента. Например, эффективное

количество фосфопептида Тау, конъюгированного с иммуногенным белком-носителем, зависит также от того, вводят ли также адъювант, при этом в отсутствии адъюванта требуются более высокие дозы. Эффективные дозы можно экстраполировать на основе кривых зависимости доза-ответ, полученных с помощью тест-систем *in vitro* или созданных на животных моделях.

Поскольку один или несколько фосфопептидов Тау можно конъюгировать с иммуногенным носителем, эффективное количество конъюгата включает общую массу иммуногенного белка-носителя, одного или нескольких фосфопептидов Тау, конъюгированных с ним, и одного или нескольких линкеров (если они используются) в конъюгате. Согласно вариантам применения эффективное количество конъюгата составляет от примерно 5 мкг до примерно 200 мкг на дозу, предпочтительно от примерно 15 мкг до примерно 150 мкг иммуногенного носителя на дозу, например, 5 мкг, 10 мкг, 15 мкг, 20 мкг, 25 мкг, 30 мкг, 35 мкг, 40 мкг, 45 мкг, 50 мкг, 60 мкг, 70 мкг, 80 мкг, 90 мкг, 100 мкг, 110 мкг, 120 мкг, 130 мкг, 140 мкг, 150 мкг, 175 мкг, 200 мкг или любое находящееся между указанными значениями количество на дозу. Предпочтительно эффективные дозы составляют 15 мкг, вплоть до 60 мкг, например, 45 мкг, 50 мкг, 55 мкг, 60 мкг, или любое находящееся между указанными значениями количество на дозу, или вплоть до 150 мкг, например, 120 мкг, 125 мкг, 130 мкг, 135 мкг, 140 мкг, 145 мкг, 150 мкг, или любое находящееся между указанными значениями количество на дозу.

В контексте настоящего описания понятия "индуцирует" и "стимулирует" и их вариации относятся к любой поддающемуся измерению увеличению клеточной активности. Индукция иммунного ответа может включать, например, активацию, пролиферацию или созревание популяции иммунных клеток, увеличение производства цитокина и/или другого показателя повышенной иммунной функции. В некоторых вариантах осуществления изобретения индукция иммунного ответа может включать усиление пролиферации В-клеток, производство антигенспецифических антител, усиление пролиферации антигенспецифических Т-клеток, улучшение презентации антигена дендритными клетками и/или повышение экспрессии определенных цитокинов, хемокинов и костимулирующих маркеров.

Способность индуцировать или стимулировать анти-Тau иммунный ответ после введения в организм животного или человека можно оценивать либо *in vitro*, либо *in vivo* с помощью разнообразных анализов, которые являются стандартными в данной области. Общее описание методов, доступных для

5 оценки инициации и активации иммунного ответа, приведено, например, у Coligan и др., *Current Protocols in Immunology*; изд-во J Wiley & Sons Inc, National Institute of Health, 1992 г. и 1994 г. Количественную оценку клеточного

10 иммунитета можно осуществлять методами, хорошо известными в данной области, например, путем измерения профилей цитокинов, секретируемых активированными эффекторными клетками, включая клетки, полученные из

15 CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток (например, количественное определение продуцирующих IL-4 или IFN-гамма клеток с помощью ELISPOT), путем определения статуса активации иммунных эффекторных клеток (например, с помощью анализа пролиферации Т-клеток с использованием классического метода оценки

20 поглощения [³H]-тимидина), путем анализа антигенспецифических Т-лимфоцитов у сенсibilизированного субъекта (например, пептидспецифического лизиса с помощью анализа цитотоксичности и т.д.).

Способность стимулировать клеточный и/или гуморальный ответ можно определять путем тестирования биологического образца (например, кровь,

20 плазма, сыворотка, РВМС, моча, слюна, кал, CSF или лимфатическая жидкость) из организма субъекта на наличие антител против иммуногенного(ых) пептида(ов) Tau, введенного(ых) в фармацевтической композиции (см., например, Harlow, *Antibodies*, изд-во Cold Spring Harbor Press, 1989). Например, титры антител, образовавшихся в ответ на введение композиции, содержащей

25 иммуноген, можно измерять с твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), дот-блоттинга, ДСН-ПААГ-электрофореза, ELISPOT или анализа антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP).

Композицию конъюгата можно вводиться парентерально, местно, внутривенно, орально, подкожно, внутриартериально, внутрь черепа,

30 внутрибрюшинно, внутрикожно, интраназально или внутримышечно для профилактического и/или терапевтического лечения. Наиболее распространенным путем введения иммуногенного средства является подкожная

или внутримышечная инъекция. Последний тип инъекции чаще всего осуществляют в мышцы рук или ног.

5 Как должно быть очевидно специалистам в данной области, режим праймерного и бустерного введения можно корректировать на основе измеренных иммунных ответов после введения. Например, бустерные композиции, как правило, вводят через недели или месяцы после введения праймерной композиции, например, примерно через 1 неделю или 2 недели, или 3 недели, или 4 недели, или 8 недель, или 16 недель, или 20 недель, или 24 недели, или 28 недель, или 32 недели, или 36 недель, или 40 недель, или 44 10 недели, или 48 недель, или 52 недели, или 56 недель, или 60 недель, или 64 недели, или 68 недель, или 72 недели, или 76 недель, или через 1-2 года после введения праймерной композиции.

Согласно конкретным объектам изобретения можно осуществлять одну или большее количество бустерных иммунизаций. Антигены в соответствующих 15 праймерных и бустерных композициях, независимо от того, сколько бустерных композиций используют, не обязательно должны быть идентичными, но должны иметь общие антигенные детерминанты или быть практически сходными друг с другом.

Как известно специалистам в данной области, иммуногенность, 20 способность усиливать действие и устойчивость являются важными факторами эффективности вакцины. Согласно настоящему изобретению введение в эффективном количестве конъюгата, указанного в настоящем описании, может индуцировать сильный гуморальный иммунный ответ против рТау у пациента, нуждающегося в этом, такого как пациент, нуждающийся в лечении болезни 25 Альцгеймера (например, болезни Альцгеймера от легкой до умеренной степени тяжести или ранней стадии болезни Альцгеймера) или легких когнитивных нарушений (МСИ), вызванных болезнью Альцгеймера. Гуморальный иммунный ответ является устойчивыми, например, сохраняется в течение по меньшей мере 6 недель. Гуморальный иммунный ответ усиливают также с помощью одного 30 или нескольких последующих бустерных введений. В настоящем описании понятие "бустерный (стимулирующий, усиливающий)" в контексте гуморального иммунного ответа относится к гуморальному иммунному ответу, который сохраняется или усиливается после последующего введения, измеренному по

меньшей мере через две недели после более позднего введения. Например, гуморальный иммунный ответ "усиливается" путем последующего введения, если обнаружено увеличение титра антител при измерении через 2 недели после более позднего введения по сравнению с титром антител до более позднего введения.

Согласно конкретным вариантам осуществления изобретения человек нуждается в лечении нейродегенеративного заболевания, нарушения или состояния.

В контексте настоящего описания "нейродегенеративное заболевание, нарушение или состояние" включает любое нейродегенеративное заболевание, нарушение или состояние, известное специалистам в данной области, с учетом настоящего описания. Примеры нейродегенеративных заболеваний, нарушений или состояний включают нейродегенеративные заболевания или нарушения, вызванные или связанные с образованием нейрофибриллярных поражений, таких как ассоциированные с Тау заболевания, нарушения или состояния, называемые тауопатиями. Согласно конкретным вариантам осуществления изобретения нейродегенеративное заболевание, нарушение или состояние включает любое из заболеваний или нарушений, для которых установлено совместное присутствие Тау - и амилоидных патологий, включая (но не ограничиваясь ими) болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Крейтцфельда-Якоба, боксерскую деменцию, синдром Дауна, болезнь Герстмана-Штраусслера-Шейнкера, миозит с включением телец, прионовую белковую церебральную амилоидную ангиопатию, черепно-мозговую травму, боковой амиотрофический склероз, гуамский комплекс паркинсонизма и деменции, негуамское заболевание двигательных нейронов с нейрофибриллярными клубками, аргирофильную зернистую деменцию, кортикобазальную дегенерацию, деменцию, боковой амиотрофический склероз Леви, диффузные нейрофибриллярные клубки с кальцификацией, лобно-височную деменцию, предпочтительно лобно-височную деменцию с паркинсонизмом, связанным с хромосомой 17 (FTDP-17), лобно-височную долевою деменцию, болезнь Халлервордена-Шпатца, множественную системную атрофию, болезнь Ниманна-Пика типа С, болезнь Пика, прогрессирующий подкорковый глиоз, прогрессирующий надъядерный паралич, подострый склерозирующий панэнцефалит, деменцию с стоянием спутанности,

постэнцефалитический паркинсонизм, миотоническую дистрофию, хроническую травматическую энцефалопатию (СТЕ), первичную возрастную тауопатию (PART), церебральную ангиопатию или деменцию с тельцами Леви (LBD).

Согласно конкретным вариантам осуществления изобретения

5 нейродегенеративное заболевание, нарушение или состояние представляет собой болезнь Альцгеймера или другую тауопатию. Согласно предпочтительным вариантам осуществления изобретения нейродегенеративное заболевание, нарушение или состояние представляет собой болезнь Альцгеймера.

Клиническое течение болезни Альцгеймера можно подразделять на стадии
10 с прогрессирующими когнитивными и функциональными нарушениями. Стадии можно определять с использованием известных в данной области шкал оценки, включая, например, исследовательскую систему NIA-AA (см., например, Dubois и др., *Alzheimer's & Dementia*, 12, 2016, сс. 292-323, Dubois и др., *Lancet Neurol*, 13, 2014, сс. 614-629, Jack и др., *Alzheimer's & Dementia*, 14, 2018, сс. 535-562) и
15 клиническую рейтинговую шкалу деменций (CDR) (см., например, Berg L. *Clinical Dementia Rating (CDR)*. *Psychopharmacol Bull.*, 24(4), 1988, сс. 637-639.), содержание каждой публикации в полном объеме включено в настоящее описание в качестве ссылки.

Например, исследовательская программа Национального института по
20 проблемам старения и Ассоциации по борьбе с болезнью Альцгеймера (NIA-AA) определяет AD биологически, с помощью нейропатологических изменений или биомаркеров, и рассматривает когнитивные нарушения как симптом/признак заболевания, а не как определение заболевания (см., например, Clifford R.J., *NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease*.
25 *Alzheimer's & Dementia*, 14, 2018, сс. 535-562, содержание публикации включено в настоящее описание в качестве ссылки). Согласно определению NIA-AA, индивидууму с биомаркером, свидетельствующим только об отложении A β (аномальный амилоид при ПЭТ-сканировании или низкий уровень A β 42 или соотношение A β 42/A β 40 в CSF) при нормальном биомаркере патологического
30 Тау, будет присвоена маркировка "патологическое изменение Альцгеймера", а понятие "болезнь Альцгеймера" можно использовать, если присутствуют оба биомаркера A β , и патологического Тау. В NIA-AA разработана также система

определения степени тяжести AD. В частности, в соответствии с определением NIA-AA (воспроизведено из текстовой вставки 2 в Clifford R.J. 2018, выше):

Определения:

5 А: биомаркеры A β определяют, находится ли человек в континууме болезни Альцгеймера или нет.

Т: биомаркеры патологического Тау определяют, есть ли у человека, находящегося в континууме болезни Альцгеймера, болезнь Альцгеймера.

Стадия степени тяжести:

10 (N): биомаркеры нейродегенеративного/нейронного повреждения.

(C): симптомы когнитивного нарушения.

А и Т свидетельствуют о специфических нейропатологических изменениях, которые определяют болезнь Альцгеймера, тогда как (N) и (C) не являются специфическими для болезни Альцгеймера и поэтому заключены в круглые скобки.

15 Согласно предпочтительным вариантам осуществления изобретения нейродегенеративное заболевание, нарушение или состояние представляет собой раннюю стадию болезни Альцгеймера, легкое когнитивное нарушение (MCI), вызванные болезнью Альцгеймера, или болезнь Альцгеймера легкой степени тяжести.

20 В некоторых вариантах осуществления изобретения нейродегенеративное заболевание, нарушение или состояние представляет собой болезнь Альцгеймера от легкой до умеренной степени тяжести.

В некоторых вариантах осуществления изобретения у субъекта, нуждающегося в лечении, головной мозг является позитивным по амилоиду, но у него еще отсутствуют существенные когнитивные нарушения. Отложение амилоида в головном мозге можно выявлять с помощью известных в данной области методов, таких как ПЭТ-сканирование, иммунопреципитация, масс-спектрометрия или другие методы (например, используя биомаркеры CSF) (Clifford R.J., NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 14, 2018, сс. 535-562).

30 В других вариантах осуществления изобретения у человека, нуждающегося в лечении, в CSF обнаружен аномальный уровень А-beta-амилоида 42 (A β 42), что согласуется с патологией AD. Например, у пациента может быть низкий уровень

A β 42 в CSF или низкое соотношение A β 42/A β 40, что согласуется с патологией AD (см., например, Clifford R.J., 2018, выше и приведенные в этой публикации ссылки, содержание каждой из которых в полном объеме включено в настоящее описание в качестве ссылки).

5 Согласно конкретным объектам изобретения можно применять один или несколько дополнительных вариантов лечения в комбинации с конъюгатом фосфопептида Тау. Дополнительное лечение может включать введение антигена Тау до, после или одновременно с введением конъюгата. Антигены в
10 дополнительной композиции не обязательно должны быть идентичными, но должны иметь общие антигенные детерминанты или быть практически аналогичными фосфопептиду Тау конъюгата.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения способ применения включает дополнительно введение субъекту липосомы, которая содержит фосфопептид Тау, присутствующий на поверхности липосомы.

15 Примеры содержащих Тау липосом, которые можно применять согласно настоящему изобретению, включают (но не ограничиваясь только ими) содержащие Тау липосомы, описанные в патентах США №№ 8647631 и 9687447, и в публикации патента США US 2019/0119341, содержание каждого из которых в полном объеме включено в настоящее описание в качестве ссылки. Например,
20 липосома, которую можно применять, может содержать: фосфопептид Тау; вспомогательный Т-клеточный эпитоп; липидизированный олигонуклеотид CpG; и адъювант, содержащий лиганд Толл-подобного рецептора 4; при этом фосфопептид Тау присутствует на поверхности липосомы.

В некоторых вариантах осуществления изобретения введение в
25 эффективном количестве предлагаемого в изобретении конъюгата субъекту приводит к ответу в виде анти-pTau IgG или анти-Tau IgG (антитела к нефосфорилированному пептиду Тау) по меньшей мере через 20 недель, например, по меньшей мере через 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 недель. В других вариантах осуществления изобретения введение в эффективном
30 количестве предлагаемого в изобретении конъюгата субъекту приводит к IgG-ответу, распознающему патологические ePHF Тау, полученные из головного мозга человека с AD, при этом ответ сохраняется по меньшей мере в течение 20

недель, например, по меньшей мере 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 недель.

В настоящем описании понятие "в комбинации" в контексте введения субъекту двух или большего количества терапевтических средств относится к
5 применению более чем одной терапии. Использование понятия "в комбинации" не ограничивает порядок, в котором субъекту назначается терапия.

Композиция может при необходимости находиться в составе набора, упаковки или дозатора, которые могут содержать одну или большее количество
10 стандартных лекарственных форм, содержащих действующее вещество. Набор, например, может содержать металлическую или пластиковую пленку, такую как блистерная упаковка. К набору, упаковке или дозатору могут прилагаться инструкции по применению.

Согласно конкретным вариантам осуществления изобретения набор содержит по меньшей мере одну фармацевтическую композицию, содержащую
15 липосому, указанную в варианте осуществления изобретения, и фармацевтическую композицию, содержащую конъюгат, указанный в варианте осуществления изобретения.

Примеры

Пример 1. Получение конъюгатной вакцины

Пептиды и адъюванты

Фосфопептиды Тау (SEQ ID NO: 2), применяемые в этом исследовании, получали путем синтеза (фирма Perscan, Нидерланды), добавляя в процессе
20 синтеза остатки фосфорной кислоты. Конъюгат, который содержит фосфопептид Тау, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, ковалентно связанную с носителем CRM через линкер, обозначен в настоящем описании как JACI-35.054.

Пептиды вакцины конъюгировали с белком-носителем CRM197 через полиэтиленгликоль(ПЭГ)-цистеин-ацетамидопропионамидный линкер.
30 Фосфопептид Тау, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, получали путем синтеза (фирма Polypeptide Laboratories SAS), добавляя в процессе синтеза остатки фосфорной кислоты и спейсер ПЭГ3. JACI-35.054 создавали путем конъюгации белка-носителя CRM197 через сукцинимидил-3-(бромацетамид)пропионатный (SBAP) линкер с цистеином на N-конце пептида.

SBAP лигировали с первичными аминами белка CRM197 (-NH₂) путем химического взаимодействия в присутствии сложного NHS-эфира. Избыток линкера SBAP удаляли, используя ультрафильтрацию и диафильтрацию (UF/DF). Промежуточный продукт CRM197-SBAP конъюгировали с фосфопептидом Тау и

5 после завершения реакции прекращали реакцию конъюгации путем добавления избыточного количества L-цистеина для прекращения реакции. Неочищенный конъюгированный продукт, содержащий CRM197-пептид, очищали с использованием хроматографической колонки Capto Q ImpRes (фирма GE Healthcare) и элюировали с помощью изократического метода с использованием

10 соли. Затем очищенный продукт CRM197-пептид приготавливали в буфере, содержащем Трис и сахарозу, например, 20мМ Трис, 250мМ сахарозу, pH 8,1, используя UF/DF. Маточный раствор лекарственной субстанции (DS), содержащей CRM197-Тау-пептид, получали путем добавления маточного

15 буферного раствора полисорбата 80 (PS80), такого как 10%-ный маточный буферный раствор PS80, до достижения конечной концентрации PS80 0,01%. Раствор интенсивно перемешивали перед фильтрацией. Перед инъекцией маточный раствор разводили с помощью ЗФР и СрG/квасцов, например, до

20 получения первой концентрации CRM197-Тау-пептида 0,8 мг/мл, и затем дополнительно разводили с помощью ЗФР и СрG/квасцов до конечной концентрации CRM197-Тау-пептида 30 мкг/мл, которую применяли для

инъекции. В альтернативном варианте маточный раствор CRM197-Тау-пептида выдерживали в концентрации 3,1 мг/мл в 10мМ ЗФР (pH 7,3), а затем дополнительно разводили ЗФР до достижения требуемой рабочей концентрации. Затем добавляли олигонуклеотид СрG, квасцы и ЗФР до достижения конечной

25 концентрации 30 мкг/мл в пересчете на CRM197-Тау-пептид и полученный в итоге препарат интенсивно перемешивали перед инъекцией.

Одна из проблем, связанных с воздействием активной вакцины на антиген ЦНС, заключается в том, что неспецифическое или нецелевое воспаление может вызвать нежелательные нейропатологические изменения. Для исследования

30 этого изымали цельный головной мозг мышей, иммунизированных конъюгированной композицией, и окрашивали для визуализации периваскулярных или других клеточных инфильтратов. Ни у одного из иммунизированных животных не обнаружено каких-либо признаков

нейровоспаления, клеточной инфильтрации или других нежелательных
нейропатологических изменений (данные не приведены). Это позволило
предположить, что индуцированные вакциной антитела и врожденный
иммунный ответ на вакцинацию не вызвали нейропатологических изменений у
мышей.

Пример 2. Шестимесячное исследование токсичности при внутримышечном
введении JACI-35.054 макакам-резус

Цель исследования

Целью всего исследования которое проводили в течение приблизительно 6
месяцев на наивных самцах и самках макак-резус, было определение
токсичности JACI-35.054 (JACI-35.054) после 7 внутримышечных (i.m.)
инъекций, и оценка обратимости любых изменений после 4-недельного периода
восстановления.

Тестируемые субстанции и применяемые для сравнения субстанции
(референс-субстанции) вводили путем i.m.-инъекции. Контрольных животных
дозировали по той же схеме, что и группы, получающие соединения, используя
конечную рецептуру, лишённую активных компонентов.

План исследования

Применяемый протокол опыта представлен ниже (таблица 1).

Таблица 1: Протокол опыта по оценке токсичности при внутримышечном
введении JACI-35.054 макакам-резус

Группа обработки	Уровень дозы (мкг) ^A	Объем дозы (мл)	Количество животных
1. Контроль ^B	0	700	5♂ + 5♀
2. JACI-35.054, низкая доза ^B	15	430	3♂ + 3♀
3. JACI-35.054, средняя доза ^B	50	500	3♂ + 3♀
4. JACI-35.054, высокая доза ^B	150	700	5♂ + 5♀

^A Дозы соответствуют содержанию CRM197-pTau.

^B Включает Трис-буфер, 500 мкг CpG7909 и 562,5 мкг суспензии гидроксида алюминия/дозу.

^B Включает CRM197-pTau, 500 мкг CpG7909 и 562,5 мкг суспензии гидроксида алюминия/дозу.

Тестируемую субстанцию, представляющую собой композицию JACI-
35.054 (содержит 15, 50 и 150 мкг JACI-35.054, что соответствует низкому,
среднему и высокому уровню доз соответственно; и 500 мкг CpG7909 и 562,5

мкг суспензии гидроксида алюминия), и референс-субстанцию вводили путем внутримышечной инъекции в дни 1, 29, 57, 85, 113, 141 и 169. В контрольной группе вводили референс-субстанцию, представляющую собой комбинацию Трис-буфера (вместо активного фрагмента) и CpG7909 и суспензии гидроксида алюминия.

Вес тела определяли еженедельно, начиная с периода акклиматизации и вплоть до окончания опыта. Офтальмоскопию проводили один раз во время предварительного тестирования и через пять дней после четвертого и последнего введений. Электрокардиограмму (в конечностях и усиленных отведениях) регистрировали у каждого животного один раз во время предварительного тестирования и после четвертого и последнего введений. Образцы крови и мочи собирали для определения клинической патологии (гематология, коагуляция, клиническая химия и анализ мочи) у всех животных однократно в период до обработки, в день 90, день 174 (основной и восстановительный период) и у всех выживших животных в день 207 (восстановительный период). Образцы крови для определения в сыворотке антител к рTau, к CRM197 с помощью ELISA собирали в дни -14, 8, 22, 36, 50, 64, 78, 92, 99, 106, 120, 134, 148, 162, 176, 183 (основной и восстановительный период) и дни 190, 204 и 211 (восстановительный период). CSF собирали однократно перед введением дозы и перед аутопсией. Кровь для иммунофенотипирования собирали перед введением дозы, в день 169 и день 211 (конец периода восстановления). PMBC собирали (ELISpot для оценки Т-клеточного ответа) в дни -14 и 183 (основной и восстановительный период) и день 211 (восстановительный период). Потенциальную связывающую активность антител, индуцированных JACI-35.054 (сыворотка животных, обработанных дозой 150 мкг, взятая во время предварительного тестирования и в день 183) с панелью из 42 замороженных человеческих тканей, полученных из организма трех неродственных индивидуумов, оценивали с использованием иммуногистохимии (ИНС). После окончания 6-месячного периода дозирования и 4-недельного периода восстановления, животных, прошедших основной период и период восстановления, подвергали эвтаназии и аутопсии, взвешивали органы и подвергали макроскопическим обследованиям. Для гистопатологического обследования использовали головной мозг, области инъекции и лимфатические

узлы у всех подопытных животных, прошедших основной и восстановительный период.

Конструкция JACI-35.054 индуцировала титры анти-pTau IgG у всех обработанных обезьян при обработке всеми протестированным дозами (15, 50 и 150 мкг/мл).

Результаты

Результаты проекта проверенного отчета свидетельствуют о том, что после семи i.m.- инъекций в дни 1, 29, 57, 85, 113, 141 и 169 все уровни доз JACI-35.054 хорошо переносились макаками-резус без неожиданной смертности и без клинических признаков, связанных с JACI-35.054, или влияния на вес тела, офтальмологию, электрокардиографию, иммунофенотипирование, клиническую патологию или параметры спинномозговой жидкости, вес органов или результаты макроскопических/микроскопических исследований.

Для всех протестированных панелей антител не выявлено заметных различий в численности популяции иммунных клеток между исследуемыми группами. Концентрации представляющих интерес различных популяций клеток, измеренные в группах, которые получали тестируемую субстанцию (группы 2-4), оказались сопоставимыми с контролем, а различия в численности популяции иммунных клеток находились в пределах биологических различий для большинства популяций.

Симптомы, наблюдавшиеся у некоторых животных, обработанных препаратом JACI-35.054, были ограничены очень легкой или умеренной чувствительностью кожи (эритема и отек); однако временный характер результатов и отсутствие постоянства или зависимости от дозы не указывают на тенденцию к явной чувствительности кожи к JACI-35.054. Все макроскопические/микроскопические изменения рассматривали как связанные с адьювантом, обусловленные экспериментальными процедурами, и не связанные с присутствием JACI-35.054 в инъекционной дозе. Несколько меньшая частота микроскопических изменений и их тенденция ограничиваться мышечным слоем на стадии восстановления могут свидетельствовать о некотором разрешении воспалительных и дегенеративных/некротических процессов после 4-недельного периода восстановления.

Иммуногистохимическое исследование, проведенное на 42 замороженных человеческих тканях, взятых из организма трех неродственных индивидуумов, показало, что антитела, индуцированные у обезьян JACI-35.054, исследованные в разведениях 1/300 и 1/100, не приводили к нецелевому окрашиванию ни в одной из протестированных тканей.

Заключение

В целом, из-за отсутствия видимых изменений, связанных с тестируемой субстанцией, после семи внутримышечных инъекций в дни 1, 29, 57, 85, 113, 141 и 169, наивысший уровень дозы JACI-35,054 (150 мкг) рассматривается в качестве максимального недействующего уровня вещества (уровня, не вызывающего видимого эффекта) (NOEL) для данного исследования.

Пример 3. Трехмесячное исследование токсичности при повторных подкожных введениях мышам

Цель исследования

Целью настоящего исследования была оценка токсичности композиции JACI-35.054, адъювантной вакцины, приготовленной на основе тестируемой субстанции CRM197-pTau, а также CpG-7909 и гидроксида алюминия в качестве адъювантов, после 7 подкожных (SC) инъекций мышам линии CD1 в течение 3 месяцев. После завершения периода обработки указанных животных умерщвляли через 2 недели после последней инъекции (ранняя эвтаназия) или после дополнительного 2-недельного периода без обработки (поздняя эвтаназия) для оценки обратимости любых результатов или потенциальных отсроченных явлений.

План исследования

Применяемый протокол исследования представлен ниже (таблица 2).

Таблица 2: Протокол исследования по оценке токсичности при подкожном введении мышам

Группа обработки	Уровень дозы (мкг) ^A	Объем дозы (мкл)	Количество животных
1. Контроль ^B	0	168,3	18♂ + 18♀
2. JACI-35.054, низкая доза ^B	1,7	141,7	12♂ + 12♀
3. JACI-35.054, средняя доза ^B	5	148,3	12♂ + 12♀

Группа обработки	Уровень дозы (мкг) ^A	Объем дозы (мкл)	Количество животных
4. JACI-35.054, высокая доза ^B	15	168,3	18♂ + 18♀

^A Дозы соответствуют содержанию CRM197-рТau.

^B Включает Трис-буфер, 50 мкг СрG7909 и 425 мкг суспензии гидроксида алюминия/дозу.

^B Включает CRM197-рТau, 50 мкг СрG7909 и 425 мкг суспензии гидроксида алюминия/дозу.

5 План эксперимента включал применение швейцарских мышей линии CD1 (60 самцов и 60 самок), разделенных на 4 группы, которым вводили SC в межлопаточную область (дни 1, 15, 29, 43, 57, 71 и 85) JACI-35.054 (1,7, 5 и 15 мкг/дозу; в пересчете на дозу CRM197-рТau [группы 2, 3 и 4]) или плацебо/контрольную субстанцию (Трис-буфер и СрG7909 и гидроксид алюминия в качестве адъювантов [группа 1]). В конце периода обработки через 2 недели после последнего введения умерщвляли первых пригодных 12 животных/пол/группу (ранняя эвтаназия), в то время остальных 6 животных/пол в группах 1 и 4 (поздняя эвтаназия) умерщвляли после 2-недельного периода без обработки (т.е. через 4 недели после последней инъекции тестируемой субстанции или контроля). Оцениваемые параметры токсичности и конечные точки включали заболеваемость/смертность, клинические обследования, местные реакции на инъекции, вес тела, потребление пищи, офтальмологию, гематологию, биохимию крови и оценку анатомической патологии (включая вес органов). Осуществляли полную аутопсию всех животных, у которых зарегистрированы макроскопические отклонения во всех тканях, и осуществляли микроскопическое исследование (включая потенциальные органы-мишени у животных из групп 1, 2, 3 и 4, которых умерщвляли в конце периода обработки, и у животных из групп, которых умерщвляли в конце периода без обработки). У всех животных собирали образцы крови до обработки, во время обработки и во время периода без обработки для оценки иммуногенности, измеряемой по производству анти-CRM197 IgG и анти-рТau IgG.

Результаты

Тестируемая субстанция JACI-35.054 (1,7, 5 и 15 мкг/дозу) и плацебо в целом хорошо переносились в процессе исследования и у большинства животных после обработки не обнаружено никаких заслуживающих внимания клинических признаков или влияния на вес тела, потребление пищи, офтальмологию, гематологию или вес органов после SC-введений. Во время

исследования два животных погибли (одна самка в группе 1 [контроль] в день 78 [неделя 12] и один самец в группе 3 [5 мкг] в день 43 [неделя 7]). Эти случаи смерти расценены как случайные и не связанные с введением JACI-35.054, поскольку одно животное принадлежало к контрольной группе, и не выявлено никаких уникальных клинических особенностей, результатов прижизненных или микроскопических исследований, ассоциированных с ним или обнаруженных у умершего самца из группы 3. Кроме того, во время исследования ни одно другое животное в группе, обработанной JACI-35.054, не погибло или не было умерщвлено по гуманным соображениям.

10 После введения JACI-35.054 титр анти-pTau IgG возрастал, как правило, в зависимости от дозы, что подтверждало ожидаемую иммуногенность, связанную с вакциной, индуцировались также титры анти-CRM197 IgG. Дополнительные связанные с CRM197-pTau изменения в конце периода обработки включали увеличение частоты гранулематозного воспаления средней степени тяжести (3
15 степень) у самцов и самок, получавших 5 мкг/дозу или выше, и незначительное повышение общей концентрации белка (от +3,6% до +8,1%) и умеренное снижение соотношения альбумина и глобулина (A/G; от -7,9% до -21,2%), что рассматривалось как отражение индуцированного CRM197-pTau увеличения концентрации глобулина вследствие антигенной стимуляции.

20 Другие заслуживающие внимания результаты, связанные с общей процедурой SC-инъекции или совместным применением адъювантов (в частности, суспензии гидроксида алюминия) во всех группах, обработанных JACI-35.054, и в контрольной группе включали: 1) клинические признаки эритемы, утолщения и/или припухлости по меньшей мере один раз в процессе
25 исследования (как правило, обнаруженные с более высокой частотой и/или тяжестью, с тенденцией зависимости от дозы у животных, обработанных JACI-35.054, по сравнению с контрольными животными), 2) при аутопсии у большинства животных обнаружены утолщения и образования белого цвета, которые часто коррелировали с микроскопическими данными о гранулематозном
30 воспалении, характеризующемся гранулемами с некротическими/казеозными очагами и/или воспалительными псевдокистами в местах инъекций, и 3) лимфоидную гиперплазию и инфильтраты пенистых макрофагов в подмышечных лимфатических узлах.

После периода восстановления клинические признаки утолщения и припухлости ($\geq 1,7$ мкг/животное) и гранулематозного воспаления (≥ 5 мкг/животное) оказались полностью обратимыми. Пониженное соотношение A/G по-прежнему обнаружено у самок, и ни в одной группе не обнаружено восстановления в местах инъекций. В мышечных лимфатических узлах обнаружено частичное восстановление связанных с адьювантом признаков (снижение частоты/тяжести поражения или количества пенистых макрофагов).

Заключение

Таким образом, 7 SC-введений JACI-35.054 (1,7, 5 и 15 мкг/дозу), приготовленного в виде адьювантной вакцины CRM197-pTau в сочетании с CpG7909 и гидроксидом алюминия, которые осуществляли каждые 2 недели, хорошо переносились CD1-мышами. В соответствии с ожидаемой иммуногенностью связанные с JACI-35.054 титры анти-pTau IgG и анти-CRM197 IgG индуцировались, как правило, в зависимости от дозы. Другие показатели, связанные с CRM197-pTau, были ограничены гранулематозным воспалением при применении дозы ≥ 5 мкг/животное/введение, которое было полностью обратимым, и незначительным повышением концентрации общего белка и умеренным снижением соотношения альбумина и глобулина, которые были частично обратимыми. Поскольку все показатели можно рассматривать как неопасные, то в рамках данного исследования наивысший уровень дозы JACI-35,054 (15 мкг) рассматривается в качестве максимального недействующего уровня вещества (NOEL).

Пример 4. Исследование безопасности и эффективности JACI-35.054 на людях

Проводили многоцентровое проспективное плацебо-контролируемое двойное слепое и рандомизированное исследование для оценки лечения вакцинами против Тау в сравнении с плацебо в течение 50 недель (т.е. 12 месяцев) у пациентов с ранней стадией болезни Альцгеймера. Исследуемая популяция состояла из мужчин и женщин 50-75-летнего возраста с диагнозом AD легкой степени тяжести или MCI, обусловленной AD, в соответствии с критериями Национального института по проблемам старения и Ассоциации по борьбе с болезнью Альцгеймера (NIA-AA). Иммунизации проводили в следующие месяцы: 0 (неделя 0), 2 (неделя 8), 6 (неделя 24) и 12 (неделя 48). На

основании результатов оценки безопасности и иммуногенности в протокол могли быть внесены поправки для тестирования дополнительных схем лечения.

Цели исследования

5 Основные цели: оценка безопасности и переносимости исследуемых вакцин; а также оценка иммуногенности исследуемых вакцин (определение титров IgG против рТau в сыворотке).

10 Вторичные цели при иммунизации: дальнейшая оценка иммуногенности исследуемых вакцин (индукция титров IgG против Тау и титров IgM против рТau и Тау в сыворотке); и оценка avidности антител, образовавшихся в результате иммунизации.

15 Исследовательские цели: изучение влияния исследуемых вакцин на биомаркеры прогрессирования AD, которые могут присутствовать, т.е. на концентрацию общих белков Тау и рТau в крови и/или CSF; изучение влияния исследуемых вакцин на активацию Т-клеток в крови; изучение активности исследуемых вакцин на воспалительные цитокины в крови (например, на IL-1B, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ и TNF- α); дальнейшее изучение влияния исследуемых вакцин на иммунный ответ (например, антитела к компонентам вакцины, функциональная способность индуцированных вакциной антител); а также изучение влияния исследуемых вакцин на поведение, когнитивные и

20 функциональные показатели.

Обработка

На 3 субкогортах должно быть протестировано до 3 уровней доз JACI-35.054, вводимых внутримышечно. В настоящее время исследование продолжается и тестирование проведено на субкогorte 2.1.

25 Субкогорта 2.1 (8 пациентов): JACI-35.054 (15 мкг/дозу) вводили 6 пациентам, а плацебо вводили 2 пациентам. Данные о безопасности и переносимости, полученные после введения всем пациентам в субкогorte 2.1 второй инъекции, позволяют увеличить дозу после рассмотрения Советом по мониторингу данных и безопасности (DSMB).

30 Субкогорта 2.2 (8 пациентов) (необязательная): JACI-35.054 в дозе 60 мкг/кг вводят 6 пациентам, а плацебо вводят 2 пациентам. В настоящее время проводится исследование в этой субкогorte, основанное на данных о хорошей безопасности и переносимости, выявленных в субкогorte 2.1, и на том факте,

что гуморальный иммунный ответ, полученный на указанной предыдущей субкогорте, как ожидается, будет оптимизирован и предусматривать введение дозы 60 мкг.

5 Субкогорта 2.3 (8 пациентов) (необязательная): JACI-35.054 в дозе вплоть до 150 мкг/дозу можно вводить 6 пациентам, а плацебо можно вводить 2
пациентам. Эта субкогорта может оказаться необязательной и исследование на ней может быть проведено на основании данных о хорошей безопасности и переносимости, полученных в субкогорте 2.2, и в случае, если ожидается, что
10 гуморальный иммунный ответ, полученный в указанной предыдущей субкогорте, будет оптимизирован и предусматривать введение более высокой дозы.

15 Расширение субкогорты: Необязательно можно рассматривать расширение субкогорты до 16 дополнительных пациентов (12 для активного лечения и 4 для обработки плацебо) в данной субкогорте каждой когорты. Цель будет заключаться в сборе дополнительных данных о дозе, которая, как ожидается, обеспечит наиболее благоприятный профиль с точки зрения иммуногенности, безопасности и переносимости. Решение о расширении данной субкогорты должно быть основано на накопленных данных о безопасности/переносимости и иммуногенности, полученных в соответствующей когорте.

20 Вакцину или плацебо вводят 4 раза соответственно в недели 0, 8, 24 и 48, например, с интервалами в 8, 16 и 24 недели между каждыми дозами. Предполагается, что период обработки должен составлять 50 недель (12 месяцев) с последующим периодом наблюдения за безопасностью в течение 24 недель (6 месяцев). Общая продолжительность участия каждого пациента
25 должна составлять вплоть до примерно 80 недель, начиная с первой скрининговой оценки и заканчивая последним визитом в период наблюдения за безопасностью.

Наблюдение за безопасностью

30 Все пациенты должны находиться под клиническим наблюдением в течение 24 ч после первого введения исследуемой вакцины и в течение 4 ч после последующих введений исследуемой вакцины. Последующую оценку безопасности также следует проводить для всех принимающих участие в исследовании пациентов через 48-72 ч после каждой иммунизации на основе

сообщений по телефону. В каждой субкогорте первым 4 пациентам первую дозу вакцины следует вводить после оценки безопасности у предыдущего пациента через 48-72 ч. Лабораторные образцы для оценки безопасности следует отбирать на исходном уровне, перед каждой инъекцией и через 2-4 недели после каждой инъекции. После окончания периода обработки все пациенты должны проходить период наблюдения за безопасностью в течение 24 недель (6 месяцев). В течение этого периода пациентам должно быть предложено осуществлять первый визит периода наблюдения через 19 недель после последнего введения и последний визит в конце периода наблюдения (через 26 недель после последнего введения).

Мониторинг безопасности участников проводят на протяжении всего исследования на основе регулярного анализа данных о безопасности Советом по мониторингу данных и безопасности (DSMB).

Промежуточные анализы (IA)

Промежуточные анализы данных о безопасности, переносимости и иммуногенности можно проводить в каждой субкогорте в следующих случаях:

- все пациенты в субкогорте завершили 4-й визит (неделя 10), т.е. через 2-4 недели после второй инъекции,
- все пациенты в субкогорте завершили 6-й визит (неделя 26), т.е. через 2-4 недели после третьей инъекции,
- все пациенты в субкогорте завершили 9-й визит (неделя 50), т.е. через 2-4 недели после последней инъекции на неделе 48,
- все пациенты в субкогорте завершили 11-й визит (неделя 74), т.е. после окончания периода наблюдения за безопасностью.

Период наблюдения

Доступные данные о биомаркерах можно анализировать также при проведении любого из этих IA. Описанные выше IA можно осуществлять также для любой расширенной субкогорты.

Дополнительные IA для проверки стабильности данных об иммунном ответе можно проводить в период между 26 и 50 неделями и между 50 и 74 неделями.

Исследуемая популяция

Исследуемая популяция включает мужчин и женщин в возрасте 50-75 лет с диагнозом AD легкой степени тяжести или MCI, обусловленной AD, в

соответствии с критериями Национального института по проблемам старения - Ассоциации по борьбе с болезнью Альцгеймера (NIA-AA) и общим баллом по шкале оценки клинической деменции (CDR), равным 0,5 или 1.

Критериями включения являлись следующие критерии:

- 5 1. Мужчины или женщины в возрасте от 50 до 75 лет включительно.
2. Легкое когнитивное нарушение (MCI), обусловленное AD, или легкая степень тяжести AD в соответствии с критериями NIA-AA и общим баллом по шкале оценки клинической деменции (CDR), равным 0,5 или 1 соответственно.
3. Балл оценки при мини-обследовании психического состояния (MMSE),
10 составляющий 22 или выше.
4. Аномальный уровень Аβета-амилоида 42 (Aβ42) в CSF, соответствующий патологии AD при скрининге.
 - В пограничных случаях для определения уровня Aβ42 в CSF можно использовать другие результаты, которые, как предполагается, способствуют
15 определению позитивности по амилоиду, например, соотношение Aβ42/Aβ40, и, в каждом конкретном случае, наличие в анамнезе положительного результата ПЭТ-сканирования на амилоид или положительного уровня Aβ42 в CSF.
 - Результаты анализа образцов CSF, взятых в течение 6 месяцев до скрининга, являются пригодными в каждом конкретном случае при условии, что
20 они согласуются с наличием амилоидной патологии и что соответствующий образец CSF можно использовать в исследовании для тестирования.
5. Пациенты, которые либо не принимали какое-либо поступающее в продажу средство для лечения AD, либо получали стабильную дозу ингибитора ацетилхолинэстеразы и/или мемантина в течение по меньшей мере 3 месяцев до
25 включения в исследование.
6. Пациенты, за которыми ухаживает надежный информатор или лицо, осуществляющее уход, которые обеспечивают соблюдение требований, помогают в проведении клинических обследований и сообщают о проблемах безопасности.
- 30 7. Женщины должны находиться в постменопаузальном периоде не менее одного года и/или быть стерилизованы хирургическим путем. Женщины, способные к деторождению или не находящиеся в постменопаузальном периоде, должны пройти скрининг с отрицательным результатом анализа крови на

беременность (анализ крови на беременность должен быть проведен между днями -14 и -3 до включения в исследование и быть готовыми использовать высокоэффективные методы контрацепции с момента скринингового визита и до окончания срока их участия. В течение всего периода обработки необходимо проводить анализ мочи на беременность для определения того, может ли пациентка продолжать получать исследуемую вакцину. Мужчины, участвующие в исследовании с потенциальными партнершами, должны использовать барьерные методы контрацепции (презервативы со спермицидом) в дополнение к средствам контрацепции, используемым партнершами в течение всего периода исследования.

8. Пациенты, которые, по мнению исследователя, способны понимать и предоставлять письменное информированное согласие.

9. Как испытуемый, так и информатор или лицо, осуществляющее уход, должны свободно владеть одним из языков исследования и уметь выполнять все процедуры исследования, включая люмбальные пункции.

Критериями исключения являлись следующие критерии:

1. Участие в предыдущих клинических испытаниях по лечению АД и/или неврологических нарушений с использованием активной иммунизации, за исключением случаев, когда имеются документально подтвержденные доказательства того, что пациент получал только плацебо, и ожидается, что плацебо-вакцина не вызывает какого-либо специфического иммунного ответа.

2. Участие в предыдущих клинических испытаниях по лечению АД и/или неврологических нарушений с использованием любой пассивной иммунизации в течение последних 12 месяцев до скрининга, за исключением случаев, когда имеются документально подтвержденные доказательства того, что пациент получал только плацебо, и ожидается, что плацебо-вакцина не вызывает какого-либо специфического иммунного ответа.

3. Участие в предыдущих клинических испытаниях по лечению АД и/или неврологических нарушений с использованием любого низкомолекулярного лекарственного средства, включая ингибиторы ВАСЕ-1, в течение последних 3 месяцев до скрининга.

4. Одновременное участие в любом другом клиническом испытании с использованием экспериментальных или одобренных лекарственных средств или методов лечения.

5. Наличие положительных титров антиядерных антител (ANA) в разведении не менее 1:160 у пациентов без клинических симптомов аутоиммунных заболеваний.

6. Наличие аутоиммунных заболеваний в текущем или прошлом анамнезе или клинических симптомов, свидетельствующих о наличии аутоиммунных заболеваний.

10. 7. Подавление иммунитета, включая (но не ограничиваясь только ими) прием иммунодепрессивных лекарственных средств или системных стероидов, если только они не были назначены временно, более чем за 3 месяца до скрининга.

15. 8. Наличие в анамнезе тяжелой аллергической реакции (например, анафилаксии), включая (но не ограничиваясь только ими) тяжелую аллергическую реакцию на предыдущие вакцины и/или лекарственные средства.

9. Наличие в анамнезе клинически значимых эпизодов гипогликемии.

20. 10. Злоупотребление наркотиками или алкоголем или зависимость в настоящее время или в течение последних пяти лет в соответствии с критериям Диагностического и статистического руководства по психическим расстройствам-V (DSM-V).

11. Любое клинически значимое медицинское состояние, которое может влиять на оценку безопасности и переносимости исследуемого лечения и/или соблюдение полного графика посещений в процессе исследования.

25. 12. Любое клинически значимое заболевание, которое может влиять на иммунную систему (например, любое приобретенное или врожденное нарушение иммунной системы в анамнезе).

13. Прием гидралазина, прокаинамида, хинидина, изониазида, ингибиторов TNF, миноциклина в течение последних 12 месяцев до скрининга.

30. 14. Применение дилтиазема в стабильных дозах в течение по меньшей мере 3 месяцев до скрининга.

15. Значительный риск самоубийства, определенный с использованием Колумбийской шкалы оценки тяжести суицида, если пациент отвечал "да" на

вопросы 4 или 5 о суицидальных мыслях или "да" на суицидальное поведение в течение последних 12 месяцев.

16. Сопутствующие психические или неврологические нарушения, не связанные с AD (например, черепно-мозговая травма с потерей сознания, симптоматический инсульт, болезнь Паркинсона, тяжелая окклюзия сонных артерий, транзиторные ишемические атаки (ТИА)).

17. Известные из анамнеза неконтролируемые судороги или их наличие в настоящее время. Если в анамнезе были судороги, они должны хорошо контролироваться и не повторяться в течение 2 лет до скрининга. Применение противосудорожных лекарственных средств разрешается при условии их стабильной дозы в течение как минимум 3 месяцев до скрининга.

18. Наличие в анамнезе менингоэнцефалита за последние 10 лет до скрининга.

19. Пациенты, имеющие в анамнезе геморрагический и/или негеморрагический инсульт.

20. Наличие или известные из анамнеза периферические невропатии.

21. Наличие в анамнезе воспалительных неврологических нарушений с потенциальным поражением ЦНС.

22. Скрининговое МРТ-сканирование, показывающее структурные признаки альтернативной патологии, не соответствующей AD, которая может вызывать симптомы у пациента. Признаки обширных поражений, отличных от доброкачественной менингиомы диаметром менее 1 см, более двух лакунарных инфарктов или одного одиночного инфаркта диаметром более 1 см, или любого отдельного участка поверхностного сидероза, или признаков предшествующего обширного кровоизлияния ≥ 10 мм. Количество микрокровоотечений при T2* МРТ допускается не более 10, независимо от локализации.

23. МРТ-исследование не может быть проведено по любой причине, включая (но не ограничиваясь только ими) металлические имплантаты, противопоказанные для проведения МРТ-исследований, и/или сильную клаустрофобию.

24. Значительные нарушения слуха или зрения или другие проблемы, которые, по мнению исследователя, имеют отношение к делу, препятствуют соблюдению протокола и выполнению мероприятий по достижению результатов.

25. Клинически значимые инфекции или серьезная хирургическая операция в течение 3 месяцев до скрининга. Планируемая операция, которая, как ожидается, будет проведена во время участия в исследовании, должна быть рассмотрена и одобрена медицинским наблюдателем при скрининге.

5 26. Любая вакцина, полученная в течение последних 2 недель до скрининга, включая вакцину против гриппа.

27. Клинически значимые аритмии или другие клинически значимые отклонения на ЭКГ при скрининге.

10 28. Инфаркт миокарда в течение одного года до включения в исследование, нестабильная стенокардия или серьезное заболевание коронарных артерий.

29. Наличие в анамнезе рака за последние 5 лет, за исключением плоскоклеточного рака, базально-клеточной карциномы и меланомы *in situ*, или рака предстательной железы *in situ*, или рака молочной железы *in situ*, которые были полностью удалены и считаются излеченными.

15 30. Клинически значимые отклонения от нормальных значений гематологических показателей, функциональных тестов печени и других биохимических показателей, которые, по мнению исследователя, считаются клинически значимыми.

20 31. Беременность, подтвержденная анализом крови при скрининге, или женщина, планирующая беременность или кормление грудью.

32. Прием любых антикоагулянтных или антитромбоцитарных лекарственных средств, кроме аспирина, в дозах 100 мг в день или ниже (во избежание риска кровотечения во время плановой или внеплановой люмбальной пункции).

25 33. Прием любых антипсихотических лекарственных средств, за исключением стабильно низких доз, для лечения бессонницы.

34. Сдача крови или препаратов крови в течение 30 дней до скрининга или планы сдавать кровь во время участия в исследовании.

30 35. Положительный лабораторный анализ на венерические заболевания (VDRL), подтверждающий наличие активного сифилиса при скрининге.

36. Положительный тест на ВИЧ при скрининге.

37. Лабораторные или клинические признаки активного гепатита В и/или С при скрининге.

38. Уровень креатинина в сыворотке более чем в 1,5 раза превышает верхнюю границу нормы, при нарушениях функции щитовидной железы или клинически значимом снижении уровня витамина В12 или фолиевой кислоты в сыворотке (примечание: все оральные дозы тиреотропных препаратов, витамина В12 или фолата должны оставаться стабильными в течение как минимум 3 месяцев до скрининга).

Конечные точки исследования

Оценивают следующие основные конечные точки безопасности и переносимости: нежелательные явления, немедленная и отсроченная реактогенность (например, анафилаксия, местная и системная реактогенность, включая иммунокомплексные заболевания); суицидальные мысли (C-SSRS); поведение (NPI) (нарциссический опросник личности); когнитивные и функциональные исследования (RBANS (Воспроизводимая батарея для оценки нейропсихологического статуса), CDR-SB) для оценки безопасности; показатели жизнедеятельности; МРТ-визуализация; электрокардиограмма; рутинное гематологическое и биохимическое исследование крови и мочи; определение аутоиммунных антител, включая антитела к dsДНК в крови; маркеры воспаления в крови и CSF.

Оценивают также следующие первичные конечные точки касательно иммунного ответа (т.е. иммуногенности): титры в сыворотке анти-pTau IgG (среднее геометрическое значение, отклонение от исходного уровня, частота ответов, пик и площадь под кривой).

Оценивают следующие вторичные конечные точки касательно иммунного ответа (т.е. иммуногенности): титры в сыворотке анти-Tau IgG, анти-pTau, анти-ePHF IgG и анти-Tau IgM (среднее геометрическое значение, отклонение от исходного уровня, частота ответов, пик и площадь под кривой), определение профиля IgG-ответа с помощью теста на авидность.

Оцениваются следующие исследовательские конечные точки: изменение титров возможных биомаркеров AD в крови и/или CSF по сравнению с исходным уровнем (например, общий Tau, pTau), изменение по сравнению с исходным уровнем уровней активации Т-клеток, измеренных в крови, изменение по сравнению с исходным уровнем титров воспалительных цитокинов в крови, изменение по сравнению с исходным уровнем титров антител в крови,

изменение по сравнению с исходным уровнем показателей поведения (NPI), когнитивных и функциональных способностей (RBANS, CDR-SB).

Результаты/заключения

Оценивают/оценивали следующие первичные конечные точки:

- 5 • Безопасность и переносимость – нежелательные явления, немедленная и отсроченная реактогенность (например, анафилаксия, местная и системная реактогенность, включая боль, покраснение, иммунокомплексные заболевания, отеки, лихорадку); общая оценка переносимости); суицидальные мысли (C-SSRS); поведение (NPI); когнитивные и функциональные исследования (RBANS, CDR-SB) для оценки безопасности; показатели жизнедеятельности; MPT-
10 визуализация; электрокардиограмма; рутинное гематологическое и биохимическое исследование крови и мочи; определение аутоиммунных антител, включая антитела к ДНК в крови; маркеры воспаления в крови и CSF.
- 15 • Иммунный ответ – титры в сыворотке анти-pTau IgG (среднее геометрическое значение, отклонение от исходного уровня, частота ответов, пик и площадь под кривой).

Оценивают/оценивали следующие вторичные конечные точки:

- 20 • Иммунный ответ: титры в сыворотке анти-Tau IgG, анти-pTau, анти-ePHF IgG и анти -Tau IgM (среднее геометрическое значение, отклонение от исходного уровня, частота ответов, пик и площадь под кривой).

Оценивают/оценивали следующие исследовательские конечные точки:

- 25 • Изменение по сравнению с исходным уровнем титров биомаркеров в крови и/или CSF (например, общие белки Tau и белки pTau), изменение по сравнению с исходным уровнем уровней активации Т-клеток, измеренных в крови, изменение по сравнению с исходным уровнем титров воспалительных цитокинов (например, IL-1B, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ и TNF- α) в крови, изменение по сравнению с исходным уровнем суицидальных мыслей (C-SSRS), показателей поведения (NPI), когнитивных и функциональных способностей (RBANS, CDR-SB).

- 30 Исследование продолжается. К настоящему времени одна субкогорта получила JACI-35.054 в дозировке 15 мкг конъюгата ("доза 15 мкг") и плацебо (забуференный фосфатом физиологический раствор (ЗФР)), как показано в

таблице 3. Принимавшим участие в исследовании пациентам из субкогорты 2.2 вводили JACI-35.054 в дозе 60 мкг конъюгата ("доза 60 мкг").

Таблица 3: План клинического исследования

Группа	Субкогорта	Исследуемая обработка	Уровень дозы ^A (мкг)	Количество пациентов с ранней стадией AD #	Путь введения
2	2.1	JACI-35.054 ^B	15 мкг	6	Внутримышечный
		Плацебо (ЗФР)	0 мкг	2	
	2.2	JACI-35.054 ^B	60 мкг	6	Внутримышечный
		Плацебо (ЗФР)	0 мкг	2	

• ^A Дозы соответствуют содержанию CRM197-pTau.

5 • ^B Включает CRM197-pTau, 500 мкг CpG7909 и 562,5 мкг суспензии гидроксида алюминия/дозу.

• Дозу вводили 4 раза в следующие моменты времени: недели 0, 8, 24 и 48.

10 • Образцы крови для определения антитела собирали в следующие моменты времени: скрининг, недели 0 (до введения дозы), 2, 8, 10, 15*, 20*, 24, 26, 31*, 36, 42*, 48, 50, 67 и 74. (*): добавляли дополнительные моменты времени; (#) Включает пациентов с MCI из-за AD, а также пациентов с AD легкой степени

15 • Респондеров определяют как количество пациентов, у которых гуморальный иммунный ответ превышает порог позитивности. Значение после исходного уровня рассматривают как положительное, если оно \geq аналитического порога \times величину исходного титра антител. Аналитический порог определяют на основе образцов, взятых у доноров (полученных в ходе валидации каждого анализа).

20 • Исходная величина титра антител представляет собой среднюю величину титров, измеренных при скрининге и при визите 1 (включая внеплановые посещения), при условии, что они были проведены до первой инъекции исследуемой вакцины.

Промежуточные результаты, полученные вплоть до недели 74 (2 недели после четвертной инъекции) для дозы 15 мкг и вплоть до недели 26 (2 недели после третьей инъекции) для дозы 60 мкг, продемонстрировали, что вакцина JACI-35.054 оказалась безопасной и хорошо переносилась без каких-либо

25 клинически значимых опасений касательно безопасности, связанных с исследуемой вакциной. Повышенные титры анти-pTau-специфических IgG относительно исходного уровня обнаружены в сыворотке пациентов, подвергавшихся обработке изучаемым активным средством, которые все давали

30 ответ на лечение после второго введения JACI-35.054 в дозе 15 мкг на неделе 10, а также позднее на неделях 24, 26, 36, 48, 50, 67 и 74. Повышенные титры анти-pTau-специфических IgG относительно исходного уровня обнаружены в сыворотке пациентов, подвергавшихся обработке изучаемым активным средством, которые все давали ответ на лечение после второго введения JACI-35.054 в дозе 60 мкг на неделе 10, а также позднее на неделях 15, 20, 24 и 26.

Повышенные титры анти-Тau-специфических IgG (ответ на нефосфорилированный пептид Тау, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4), обнаружены также у всех включенных в исследование пациентов, подвергавшихся обработке изучаемым активным средством, которые все давали ответ на лечение на неделях 10, 24, 26, 36, 48, 50, 67 и 74 при использовании дозы 15 мкг, и которые все отвечали на лечение на неделях 10, 15, 20, 24 и 26 при оценке в дозе 60 мкг. Повышенные титры анти-ePHF IgG против патологического pTau обнаружены у пациентов с ранней стадией AD, подвергавшихся обработке изучаемым активным средством, у 83,3% из них обнаружен ответ на неделях 26, 36 и 50 при обработке дозой 15 мкг, и у 83,3% и 100% из них обнаружен ответ на неделях 10 и 26 соответственно при обработке дозой 60 мкг. Никакого гуморального иммунного ответа не обнаружено у пациентов, которые получали плацебо.

Ответ в виде анти-pTau IgG на JACI-35.054 у людей

Специфические ответы в виде антител IgG-типа против фосфорилированного пептида Тау (pTau), индуцированные вакциной JACI-35.054, у субкогорты, указанной в таблице 3, измеряли с помощью технологии MSD. На фиг. 1 показаны титры анти-pTau IgG после иммунизации либо JACI-35.054 в дозе 15 мкг и 60 мкг, либо плацебо. Из результатов, представленных на фиг. 1, следует, что иммунизация JACI-35.054 в дозе либо 15 мкг, либо 60 мкг индуцировала сильный ответ в виде анти-pTau IgG против биотинилированного фосфорилированного пептида Тау, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, которая содержит биотин, связанный с N-концом фосфорилированного пептида Тау, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

Иммунизации на неделях 8, 24 и 48 с использованием дозы 15 мкг приводили к усилению ответа в виде анти-pTau IgG при измерении через 2 недели, на неделе 10, неделе 26 и неделе 50 соответственно. Аналогично этому, иммунизация на неделях 8 и 24 с использованием дозы 60 мкг приводила к усилению ответа в виде анти-pTau IgG при измерении через 2 недели, на неделях 10 и 26 соответственно.

В таблице 4 представлены данные о частоте ответов в виде анти-pTau IgG e (ИТТ-популяция) после иммунизации JACI-35.054 в дозе 15 мкг или 60 мкг, или плацебо.

Таблица 4: Частота ответов в виде анти-pTau IgG (ИТТ-популяция) после иммунизации JACI-35.054 в дозе 15 мкг или 60 мкг, или плацебо

	Неделя											
	2	8	10	15	20	24	26	36	48	50	67	74
JACI-35.054, 15 мкг	50%	66,7%	100%	NA	NA	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
JACI-35.054, 60 мкг	66,7%	83,3%	100%	100%	100%	100%	100%	NA	NA	NA	NA	NA
Плацебо	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

NA = недоступно

Из представленных в таблице 4 результатов следует, что у 50% пациентов, которые обрабатывали JACI-35.054 в дозе 15 мкг, обнаружен ответ на неделе 2, и у 66,7% обнаружен ответ на неделе 8. У всех пациентов, которых обрабатывали JACI-35.054 в дозе 15 мкг, обнаружен ответ, начиная с недели 10 вплоть до недели 74. Из представленных в таблице 4 результатов следует, что у 66,7% пациентов, которые обрабатывали JACI-35.054 в дозе 60 мкг, обнаружен ответ на неделе 2, и 83,3% обнаружен ответ на неделе 8. У всех пациентов, обработанных JACI-35.054 в дозе 60 мкг, обнаружен ответ, начиная с недели 10 и по меньшей мере вплоть до недели 26. Ни у одного из пациентов, обработанных плацебо, не обнаружен ответ в виде анти-pTau IgG.

Ответ в виде анти-Tau IgG на JACI-35.054 у людей

Специфические ответы в виде антител IgG-типа против нефосфорилированного пептида Tau, индуцированные вакциной JACI-35.054, у субкогорты, указанной в таблице 3, измеряли с помощью технологии MSD. На фиг. 2 показаны титры анти-Tau IgG после иммунизации либо JACI-35.054 в дозе 15 мкг или 60 мкг, либо плацебо. Из результатов, представленных на фиг. 2, следует, что иммунизация JACI-35.054 в дозе либо 15 мкг, либо 60 мкг индуцировала ответ в виде антител IgG-типа против биотинилированного пептида не-pTau, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, которая содержит биотин, связанный с N-концом нефосфорилированного пептида Tau, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4. Таким образом, иммунизация JACI-35.054 в дозе 15 мкг или 60 мкг

индуцировали гуморальный иммунный ответ в виде IgG, которые распознают пептид не-pTau, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, помимо пептида pTau, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

5 Иммунизации на неделях 8, 24 и 48 с использованием дозы 15 мкг приводили к усилению ответа в виде анти-Tau IgG при измерении через 2 недели, на неделях 10, 26 и 50 соответственно. Иммунизации на неделях 8 и 24 с использованием дозы 60 мкг приводили к усилению ответа в виде анти-Tau IgG при измерении через 2 недели, на 10 и 26 неделях соответственно.

10 В таблице 5 представлены данные о частоте ответов в виде анти-pTau IgG (ИТТ-популяция) после иммунизации JACI-35.054 в дозе 15 мкг или 60 мкг, или плацебо. Из представленных в таблице 5 результатов следует, что у 66,7% пациентов, которых обрабатывали JACI-35.054 в дозе 15 мкг, обнаружен ответ на неделе 2, и у 83,3% обнаружен ответ на неделе 8. У всех пациентов, которых
15 обрабатывали JACI-35.054 в дозе 15 мкг, обнаружен ответ, начиная с недели 10 вплоть до недели 74 включительно. У 66,7% пациентов, которые обрабатывали JACI-35.054 в дозе 60 мкг, обнаружен ответ на неделе 2 и неделе 8. У всех пациентов, обработанных JACI-35.054 в дозе 60 мкг, обнаружен ответ, начиная с
20 недели 10 и по меньшей мере вплоть до недели 26. Ни у одного из пациентов, обработанных плацебо, не обнаружен ответ в виде анти-Tau IgG.

Таблица 5: Частота ответов в виде анти-Tau IgG (ИТТ-популяция) после иммунизации JACI-35.054 в дозе 15 мкг или 60 мкг, или плацебо

	Неделя											
	2	8	10	15	20	24	26	36	48	50	67	74
JACI-35.054, 15 мкг	66,7%	83,3%	100%	NA	NA	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
JACI-35.054, 60 мкг	66,7%	66,7%	100%	100%	100%	100%	100%	NA	NA	NA	NA	NA
Плацебо	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

25 Распознавание патологических pTau (обогащенных парных спиральных филаментов – ePHF), полученных из головного мозга человека с AD

Способность поликлональных антител IgG-типа, индуцированных иммунизацией JACI-35.054 в субкогорте, представленной в таблице 3, связываться с ePHF из головного мозга человека с AD, измеряли в зависимости

от времени с помощью технологии MSD. На фиг. 3 показаны титры анти-ePHF IgG (ИТТ-популяция) после иммунизации либо JACI-35.054 в дозе 15 мкг или 60 мкг, либо плацебо. Из результатов, представленных в таблице 3, следует, что иммунизация JACI-35.054 в дозе 15 мкг или 60 мкг индуцировала гуморальный иммунный ответ в виде IgG, которые распознают патологический ePHF Тау из головного мозга человека с AD.

Иммунизации на неделях 8, 24 и 48 с использованием дозы 15 мкг приводили к усилению ответа в виде анти-ePHF IgG при измерении через 2 недели, на неделях 10, 26 и 50 соответственно. Аналогично этому, иммунизации на неделях 8 и 24 с использованием дозы 60 мкг приводили к усилению ответа в виде анти-ePHF IgG при измерении через 2 недели, на неделях 10 и 26 соответственно.

В таблице 6 представлены данные о частоте ответов в виде анти-ePHF IgG (ИТТ-популяция) после иммунизации JACI-35.054 в дозе 15 мкг или 60 мкг, или плацебо.

Частота ответа в виде анти-ePHF IgG у 6 пациентов, обработанных JACI-35.054 в дозе 15 мкг, возрастала с 0% на неделе 2 (т.е. через 2 недели после первой инъекции) до 83,3% на неделе 26 (т.е. через 2 недели после 3-ей инъекции), и затем частота ответов составляла от 66,7% (недели 48, 67 и 74) и до 83,3% (недели 36 и 50). Частота ответов в виде анти-ePHF IgG у 6 пациентов, обработанных JACI-35.054 в дозе 60 мкг, возрастала с 16,7% на неделе 2 (т.е. через 2 недели после первой инъекции) до 100% на неделе 26 (т.е. через 2 недели после 3-ей инъекции).

Таблица 6: Частота ответов в виде анти-ePHF IgG (ИТТ-популяция) после иммунизации JACI-35.054 в дозе 15 мкг или 60 мкг, или плацебо

	Неделя											
	2	8	10	15	20	24	26	36	48	50	67	74
JACI-35.054, 15 мкг	0%	0%	66,7%	NA	NA	50%	83,3%	83,3%	66,7%	83,3%	66,7%	66,7%
JACI-35.054, 60 мкг	16,7%	16,7%	83,3%	50%	50%	50%	100%	NA	NA	NA	NA	NA
Плацебо	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

Должно быть очевидно, что примеры и варианты осуществления изобретения, представленные в настоящем описании, приведены исключительно в иллюстративных целях и что в варианты осуществления изобретения,

описанных выше, могут быть внесены изменения без отклонения от заявляемой концепции в широком смысле. Таким образом, должно быть очевидно, что настоящее изобретение не ограничено описанными конкретными вариантами осуществления изобретения, но оно предназначено для охвата модификаций в рамках объема и сущности прилагаемой формулы изобретения.

Пример 5. Вакцинация JACI-35.054 индуцирует антитела с высокой гетерогенностью в отношении распознавания эпитопов

Для дальнейшего определения широты и избирательности профиля гуморального иммунного ответа на патологический pTau проводили картирование эпитопов в сыворотке людей с использованием аминокислотных последовательностей короткого pTau и не-pTau. Исследование проводили для определения профиля распознавания эпитопов антителами, индуцированными JACI-35.054, у людей. Восемь пациентов с AD иммунизировали внутримышечно в недели 0, 8, 24 и 48, используя 15 мкг на дозу JACI-35.054 или плацебо.

Профиль распознавания эпитопов антителами определяли с помощью эпитопного картирования с использованием ELISA до первой иммунизации (V1, неделя 0) и после третьей иммунизации (V6, неделя 26), применяя библиотеку биотинилированных на N-конце 8-мерных пептидов, смещенных на одну аминокислоту и охватывающих всю последовательность пептида фосфо-Tau T3.30 (SEQ ID NO: 19), а также последовательность пептида Tau T3.56 (SEQ ID NO: 20). Кроме того, определяли связывание антител с полноразмерным пептидом фосфо-Tau T3.30 (SEQ ID NO: 19) и пептидом Tau T3.56 (SEQ ID NO: 20), а также пептидом фосфо-Tau T3.85 (SEQ ID NO: 21) и пептидом Tau T3.86 (SEQ ID NO: 22) (с дополнительной C-концевой аминокислотой).

Данные выражены в виде значений оптической плотности (ОП) с вычтенными значениями до обработки (значения ОП, полученные до начальной иммунизации (V1, неделя 0), вычитали из значений ОП, полученных после третьей иммунизации (V6, неделя 26)), для каждого пептида и каждого пациента. Отрицательные значения после вычитания принимали за 0,000.

В таблицах 7 и 8 и на фиг. 4 представлен профиль распознавания эпитопов антителами, индуцированными вакцинацией JACI-35.054, который определяли путем картирования эпитопов с помощью ELISA с использованием коротких 8-

мерных перекрывающихся пептидов, охватывающих фосфо-пептид Т3.30 (SEQ ID NO: 19 и не-фосфо-пептид Т3.56 (SEQ ID NO: 20).

Таблица 7

Пептид фосфо-Тau	Пациент							
	№1	№2	№3	№4	№5	№6	№7	№8
pTau393-400	0,000	0,000	2,694	2,162	0,119	0,815	3,402	0,622
pTau394-401	0,000	0,000	2,327	1,481	0,040	0,543	3,036	0,279
pTau395-402	0,000	0,000	0,569	1,212	0,030	0,420	2,553	0,041
pTau396-403	0,000	0,000	0,342	0,145	0,028	0,147	0,327	0,025
pTau397-404	0,000	0,000	0,169	0,080	0,023	0,014	0,098	0,030
pTau398-405	0,000	0,000	0,310	0,033	0,005	0,010	0,080	0,022
pTau399-406	0,000	0,000	0,545	1,269	0,138	0,146	1,591	0,109
pTau400-407	0,000	0,000	2,064	3,515	0,969	0,810	3,616	1,230
pTau401-408	0,000	0,000	2,952	3,620	3,459	3,510	3,670	3,444
pTau393-408	0,003	0,000	2,531	3,584	3,405	3,162	3,624	3,395
pTau393-409	0,000	0,006	2,961	3,127	0,324	0,954	3,560	2,504

5 В таблице 7 и на фиг. 4А продемонстрировано, что у двух пациентов AD не продуцировались какие-либо антитела IgG-типа против последовательности пептидов фосфо-Тau Т3.30 (SEQ ID NO: 19) и Т3.85 (SEQ ID NO: 21) (пациенты № 1 и №2). У шести пациентов с AD образовывались антитела IgG-типа против последовательности пептидов фосфо-Тau Т3.30 (SEQ ID NO: 19) и Т3.85 (SEQ ID NO: 21), которые обладали в целом более низкой способностью связываться с последовательностью пептида фосфо-Тau Т3.85 (SEQ ID NO: 21) по меньшей мере у 4 пациентов с AD. Значения ОП, полученные при использовании 8-мерных пептидов, свидетельствуют о том, что антитела IgG-типа, которые индуцировались после трех иммунизаций, связывались с С-концевой областью последовательности пептида фосфо-Тau Т3.30 (SEQ ID NO: 19) у всех шести пациентов с AD. Кроме того, у 4 пациентов с AD обнаружено некоторое связывание с N-концевой областью последовательности пептида фосфо-Тau Т3.30 (SEQ ID NO: 19).

Таблица 8

Пептид фосфо-Тau	Пациент							
	№1	№2	№3	№4	№5	№6	№7	№8
Tau393-400	0,013	0,000	0,927	2,026	0,337	0,228	2,271	0,287
Tau394-401	0,005	0,000	0,239	0,250	0,047	0,024	0,342	0,000
Tau395-402	0,000	0,000	0,220	0,197	0,024	0,009	0,044	0,000
Tau396-403	0,000	0,000	0,745	0,871	0,017	0,042	2,151	0,004
Tau397-404	0,000	0,000	0,274	0,092	0,012	0,016	0,318	0,000
Tau398-405	0,000	0,000	0,210	0,012	0,083	0,016	0,061	0,009
Tau399-406	0,000	0,000	0,234	0,010	0,006	0,017	0,042	0,002
Tau400-407	0,001	0,000	0,516	0,502	0,029	0,102	1,715	0,297
Tau401-408	0,000	0,000	2,724	3,586	3,361	2,965	3,560	3,352
Tau393-408	0,000	0,000	2,890	3,053	3,326	3,141	3,535	3,387
Tau393-409	0,008	0,000	0,188	1,014	0,020	0,022	1,391	1,738

В таблице 8 и на фиг. 4Б проиллюстрировано, что у двух пациентов с AD не продуцировались какие-либо антитела IgG-типа против последовательности пептидов Tau T3.56 (SEQ ID NO: 20) и T3.86 (SEQ ID NO: 22) (пациенты № 1 и №2). У шести пациентов с AD образовывались антитела IgG-типа против последовательности пептидов Tau T3.56 (SEQ ID NO: 20) и T3.86 (SEQ ID NO: 22), которые обладали в целом более низкой способностью связываться с последовательность пептида Tau T3.86 (SEQ ID NO: 22). Значения ОП, полученные при использовании 8-мерных пептидов, свидетельствуют о том, что антитела IgG-типа, которые индуцировались после трех иммунизаций, связывались с С-концевой областью последовательности пептида Tau T3.56 (SEQ ID NO: 20) у всех шести пациентов с AD. Кроме того, связывание с пептидами Tau Tau393-400 и Tau396-403 обнаружено у 3 пациентов с AD.

Результаты свидетельствуют о том, что у субъектов, вакцинированных JACI-35.054, обнаружен гуморальный иммунный ответ с четким распознаванием С-концевой области последовательности антигена Tau и аналогичное связывание антител с фосфорилированными пептидами Tau и нефосфорилированными пептидами Tau.

Ссылки

- Asuni A.A. и др., J Neurosci., 27(34), 22 августа 2007 г., сс. 9115-9129.
- Bentebibel и др., Sci Transl Med., 5(176), 2013, 176ra32.
- Crotty, Annual Reviews of Immunology, т. 29, 2011, сс. 621-663.
- 5 Friedhoff и др., Biochimica et Biophysica Acta, 1502, 2000, сс. 122-132.
- Greenberg и Davies, Proc Natl Acad Sci U S A, 87(15), 1991, сс. 5827-5831.
- Hanger и др., Trends Mol Med., 15, 2009, сс. 112-119.
- Hickman и др., J. Biol. Chem., т. 286, №. 16, 22 апреля 2011 г., сс. 13966–
13976.
- 10 Kontsekova E. др., Alzheimers Res Ther., 6(4), 1 августа 2014 г., с. 44.
- Novak P. и др., Lancet Neurology, 16, 2017, сс. 123-134.
- Peeraer и др., Neurobiol Dis., 73, 2015, сс. 83-95.
- Ries и др., Org. Biomol. Chem., 13, 2015, с. 9673.
- Spensieri и др., Proc Natl Acad Sci U S A., 110(35), 2013, сс. 14330-14335.
- 15 Theunis C. и др., PLoS One., 8(8), 2013, e72301.
- US 7741297.
- US 8647631.
- US 9687447.
- WO 90/14837.
- 20 WO 2010/115843.

Перечень последовательностей

- SEQ ID NO: 1 - пептид фосфо-Tau (7.1)
GDRSGYS[pS]PG[pS]PG[pT]PGSRSRT
- 25
- SEQ ID NO: 2 - пептид фосфо-Tau (T3.5)
VYK[pS]PVVSGDT[pS]PRHL
- SEQ ID NO: 3 - пептид фосфо-Tau (22.1)
- 30 SSTGSIDMVD[pS]PQLA[pT]LA
- SEQ ID NO: 4 - пептид Tau
VYKSPVVSVDTSRHL

SEQ ID NO: 5 - пептид фосфо-Тau

RENAKAKTDHGAIEIVYK[pS]PVVSGDT[pS]PRHL

5 SEQ ID NO: 6 - пептид фосфо-Тau

RQEFEVMEHDHAGT[pY]GL

SEQ ID NO: 7 - пептид фосфо-Тau

PGSRSR[pT]P[pS]LPTPPTTR

10

SEQ ID NO: 8 - пептид фосфо-Тau

GYSSPG[pS]PG[pT]PGSRSR

SEQ ID NO: 9 - пептид фосфо-Тau

15

GDT[pS]PRHL[pS]NVSSTGSID

SEQ ID NO: 10 - пептид фосфо-Тau

PG[pS]PG[pT]PGSRSR[pT]P[pS]LP

20

SEQ ID NO: 11 - пептид фосфо-Тau

HL[pS]NVSSTGSID

SEQ ID NO: 12 - пептид фосфо-Тau

VSGDT[pS]PRHL

25

SEQ ID NO: 13 – пептид Тау

CKDNIKHVPGGGS

SEQ ID NO: 14 - CpG 2006 (обозначенный также как CpG 7909)

30

5'-tcgtcgttttgcgttttgcgtt-3',

где строчные буквы означают фосфоротиоатные (ps) межнуклеотидные

связи

SEQ ID NO: 15 - CpG 1018

5'-tgactgtgaacgttcgagatga-3',

где строчные буквы означают фосфоротиоатные межнуклеотидные связи

SEQ ID NO: 16– CpG2395

5 - 5'-tcgtcgttttcggcgcgccg-3',

где строчные буквы означают фосфоротиоатные межнуклеотидные связи

SEQ ID NO: 17 – CpG2216

5'-ggGGGACGATCGTCggggggg-3',

где строчные буквы означают фосфоротиоатные межнуклеотидные связи, и

10 заглавные буквы означают фосфодиэфирные (po) связи

SEQ ID NO:18– CpG2336

5'- gggGACGACGTCGTGggggggg -3',

где строчные буквы означают фосфоротиоатные межнуклеотидные связи, и

15 заглавные буквы означают фосфодиэфирные связи

SEQ ID NO: 19 - биотинилированный фосфорилированный пептид Tau

(T3.30)

биотин-LC-линкер (Ahx)-GVYK[pS]PVVSGDT[pS]PRHL-NH₂

20

SEQ ID NO: 20 - биотинилированный нефосфорилированный пептид Tau

(T3.56)

биотин-LC-линкер (Ahx)-GVYKSPVVSGDTSPRHL-NH₂

25 SEQ ID NO: 21 - биотинилированный фосфорилированный пептид Tau

(T3.85)

биотин-LC-линкер (Ahx)-VYK[pS]PVVSGDT[pS]PRHLS-NH₂

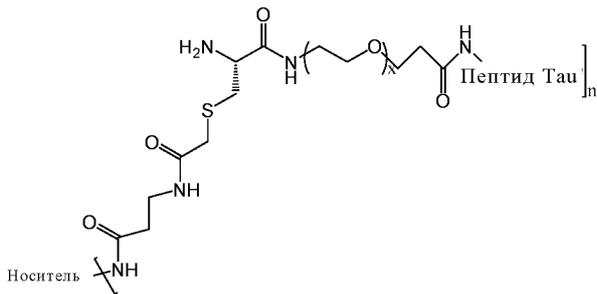
SEQ ID NO: 22 - биотинилированный нефосфорилированный пептид Tau

30 **(T3.86)**

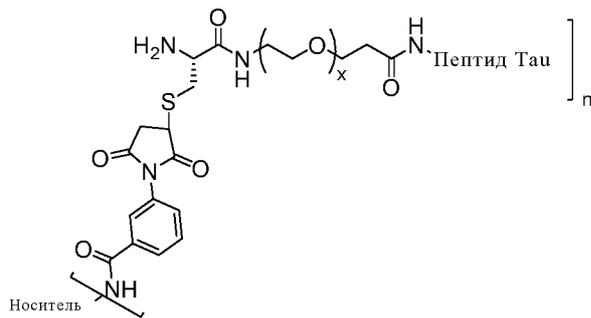
биотин-LC-линкер (Ahx)-VYKSPVVSGDTSPRHLS-NH₂

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ индукции антител против Тау, предпочтительно по меньшей мере одного из фосфорилированного Тау и обогащенных парных спиральных
5 филаментов (ePHF), у субъекта человека, который нуждается в этом, способ включает введение человеку композиции, которая содержит фармацевтически приемлемый носитель и от 5 мкг до 200 мкг на дозу конъюгата, имеющего структуру формулы (I):



10 или имеющего структуру формулы (II):



где

x обозначает целое число от 0 до 10, предпочтительно от 2 до 6, наиболее предпочтительно 3;

15 n обозначает целое число от 3 до 15, предпочтительно от 3 до 12;

носитель обозначает иммуногенный носитель, выбранный из группы, которая состоит из гемоцианина лимфы улитки (KLH), столбнячного токсоида, CRM197 и смеси белков наружной мембраны из *N. meningitidis* (OMP) или их производного; и

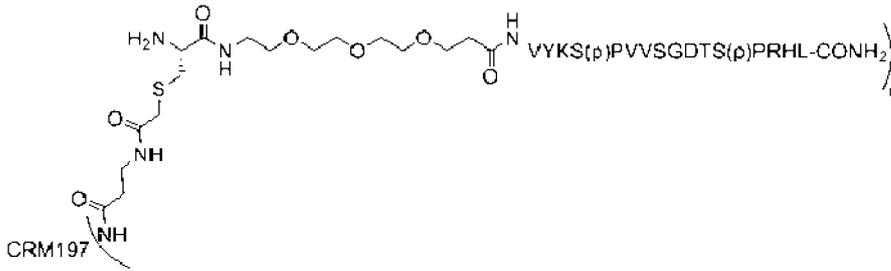
20 пептид Тау обозначает фосфопептид Тау, который имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 12.

2. Способ по п. 1, в котором носитель представляет собой CRM197.

3. Способ по п. 2, в котором фосфопептид Тау имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

5

4. Способ по п. 3, в котором конъюгат имеет структуру:



где n обозначает целое число от 3 до 7 и VYKS(p)PVVSGDTS(p)PRHL-CONH₂ содержит пептид фосфо-Тау, имеющий SEQ ID NO:2.

10

5. Способ по одному из п.п. 1 to 4, в котором композиция содержит дополнительно по меньшей мере один адъювант.

15

6. Способ по п. 5, в котором по меньшей мере один адъювант содержит агонист TLR9.

20

7. Способ по п. 6, в котором агонист TLR9 представляет собой олигонуклеотид CpG, имеющий нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 14 - SEQ ID NO: 18.

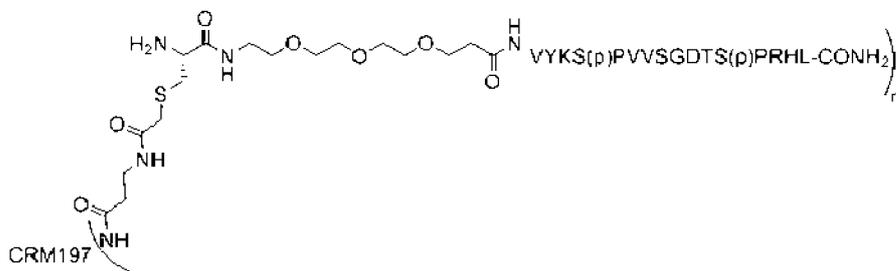
8. Способ по п. 7, в котором олигонуклеотид CpG имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 14.

25

9. Способ по одному из п.п. 5-8, в котором по меньшей мере один адъювант содержит гидроксид алюминия.

10. Способ индукции антител против по меньшей мере одного из фосфорилированного Тау и обогащенных парных спиральных филаментов (ePHF), у субъекта человека, который нуждается в этом, способ включает

введение субъекту композиции, которая содержит фармацевтически приемлемый носитель, олигонуклеотид CpG, имеющий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 14, и от 5 мкг до 200 мкг на дозу конъюгата, имеющего структуру:



5 где n обозначает целое число от 3 до 7 и VYKS(p)PVVSGDTS(p)PRHL-CONH₂ содержит пептид фосфо-Тау, имеющий SEQ ID NO:2.

11. Способ по п. 10, в котором композиция содержит дополнительно гидроксид алюминия.

10

12. Способ по одному из п.п. 1-11, включающий введение субъекту человеку композиции, которая содержит конъюгат в количестве 5 мкг, 10 мкг, 15 мкг, 20 мкг, 25 мкг, 30 мкг, 35 мкг, 40 мкг, 45 мкг, 50 мкг, 60 мкг, 70 мкг, 80 мкг, 90 мкг, 100 мкг, 110 мкг, 120 мкг, 130 мкг, 140 мкг, 150 мкг, 160 мкг, 170 мкг, 15 180 мкг, 190 мкг, или в любом находящемся между указанными значениями количестве на дозу.

13. Способ по п. 12, включающий введение субъекту человеку композиции, которая содержит конъюгат в количестве 15 мкг на дозу.

20

14. Способ по п. 12, включающий введение субъекту человеку композиции, которая содержит конъюгат в количестве 45-60 мкг, например, 45 мкг, 50 мкг, 55 мкг, 60 мкг, или в любом находящемся между указанными значениями количестве на дозу.

25

15. Способ по п. 12, включающий введение субъекту человеку композиции, которая содержит конъюгат в количестве 120-150мкг, например, 120 мкг, 125 мкг, 130 мкг, 135 мкг, 140 мкг, 145 мкг, 150 мкг, или в любом находящемся между указанными значениями количестве на дозу.

16. Способ по одному из п.п. 1-15, в котором композицию вводят внутримышечно.

5 17. Способ по одному из п.п. 1-15, в котором композицию вводят подкожно.

18. Способ по одному из п.п. 1-17, в котором антитела содержат антитела IgG-типа против фосфорилированного Тау (pTau), предпочтительно титр анти-pTau IgG по меньшей мере в 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более раз выше по сравнению с плацебо-контролем.

19. Способ по одному из п.п. 1-18, в котором антитела содержат антитела IgG-типа против нефосфорилированного Тау, предпочтительно титр анти-Тау IgG по меньшей мере в 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более раз выше по сравнению с плацебо-контролем.

20. Способ по одному из п.п. 1-19, в котором антитела содержат антитела IgG-типа против обогащенных парных спиральных филаментов (ePHF), предпочтительно титр анти-(ePHF) IgG по меньшей мере в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более раз выше по сравнению с плацебо-контролем.

21. Способ по одному из п.п. 1-20, включающий дополнительно введение субъекту второй дозы композиции, которая содержит фармацевтически приемлемый носитель и конъюгат в количестве от 5 мкг до 200 мкг, например, 15 мкг или 60 мкг, на дозу через 4-12 недель, например, 8 недель, после первого введения композиции.

22. Способ по п. 21, в котором введение второй дозы композиции может усиливать гуморальный иммунный ответ, индуцированный композицией, такой как гуморальный иммунный ответ, включающий ответ в виде анти-pTau IgG и/или ответ в виде анти-ePHF IgG, предпочтительно, гуморальный иммунный

ответ повышается по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более, при измерении по меньшей мере через 2 недели после введения второй дозы композиции.

5 23. Способ по п. 21 или п. 22, включающий дополнительно введение субъекту третьей дозы композиции, которая содержит фармацевтически приемлемый носитель и конъюгат в количестве от 5 мкг до 200 мкг, например, 15 мкг или 60 мкг, на дозу, через 20-28 недель, например, 24 недели, после начального введения композиции.

10 24. Способ по п. 23, в котором введение третьей дозы композиции может усиливать гуморальный иммунный ответ, индуцированный композицией, такой как гуморальный иммунный ответ, включающий ответ в виде анти-pTau IgG и/или ответ в виде анти-ePHF IgG, предпочтительно, гуморальный иммунный
15 ответ повышается по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более, при измерении по меньшей мере через 2 недели после введения третьей дозы композиции.

20 25. Способ по п. 23 или п. 24, включающий дополнительно введение субъекту четвертой дозы композиции, которая содержит фармацевтически приемлемый носитель и конъюгат в количестве от 5 мкг до 200 мкг, например, 15 мкг или 60 мкг, на дозу, через 44-52 недели, например, 48 недель, после начального введения композиции.

25 26. Способ по п. 25, в котором введение четвертой дозы композиции может усиливать гуморальный иммунный ответ, индуцированный композицией, такой как гуморальный иммунный ответ, включающий ответ в виде анти-pTau IgG и/или ответ в виде анти-ePHF IgG, предпочтительно, гуморальный иммунный
30 ответ повышается по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более, при измерении по меньшей мере через 2 недели после введения четвертой дозы композиции.

27. Способ индукции устойчивого иммунного ответа против фосфорилированного белка Тау (pTau) у человека, который нуждается в этом, включающий:

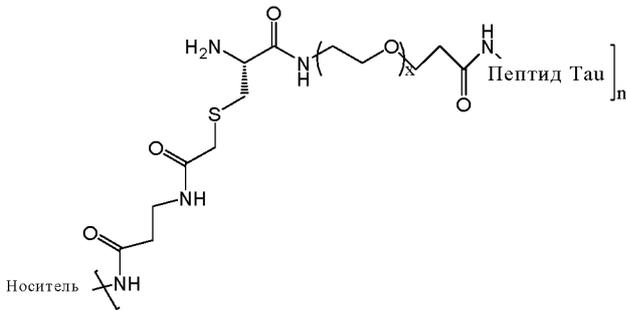
5 I. внутримышечное введение субъекту праймер-вакцины, содержащей в эффективном количестве конъюгат; и

II. внутримышечное введение субъекту первой бустерной вакцины, содержащей в эффективном количестве конъюгат, через 6-10 недель после введения праймер-вакцины,

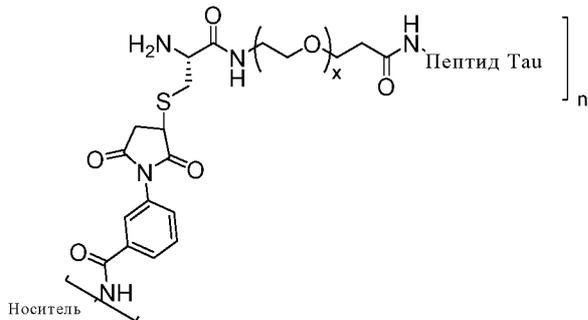
в котором:

10 устойчивый иммунный ответ сохраняется в течение по меньшей мере примерно 20 недель после введения праймер-вакцины;

конъюгат имеет структуру формулы (I):



или имеет структуру формулы (II):



15 где
x обозначает целое число от 0 до 10, предпочтительно от 2 до 6, наиболее предпочтительно 3;

n обозначает целое число от 3 до 15, предпочтительно от 3 до 12;

20 носитель обозначает иммуногенный носитель, выбранный из группы, которая состоит из группы, состоящей из гемоцианина лимфы улитки (KLH), столбнячного токсоида, CRM197 и смеси белков наружной мембраны из *N. meningitidis* (OMP) или их производного; и

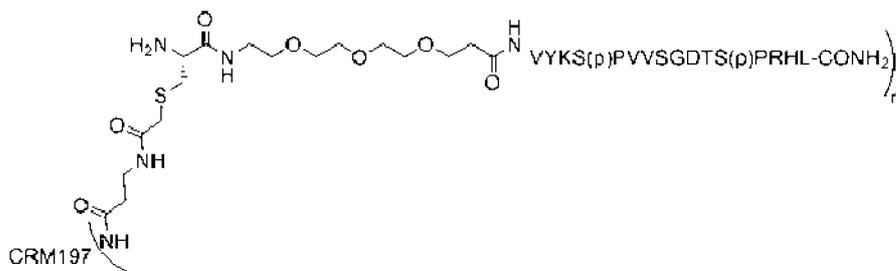
пептид Тау обозначает фосфопептид Тау, который имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 12;

5 эффективное количество конъюгата составляет 5 мкг - 200 мкг конъюгата на дозу.

28. Способ по п. 27, в котором носитель представляет собой CRM197.

10 29. Способ по п. 27 или п. 28, в котором фосфопептид Тау имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

30. Способ по п. 29, в котором конъюгат имеет структуру:



15 где n обозначает целое число от 3 до 7 и VYKS(p)PVVSGDTS(p)PRHL-CONH₂ содержит пептид фосфо-Тау, имеющий SEQ ID NO:2.

31. Способ по одному из п.п. 27-30, в котором композиция содержит дополнительно по меньшей мере один адъювант.

20 32. Способ по п. 31, в котором по меньшей мере один адъювант содержит агонист TLR9.

25 33. Способ по п. 32, в котором агонист TLR9 представляет собой олигонуклеотид CpG, имеющий нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 14 - SEQ ID NO: 18.

34. Способ по п. 33, в котором олигонуклеотид CpG имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 14.

35. Способ по одному из п.п. 31-34, в котором по меньшей мере один адъювант содержит гидроксид алюминия.

5 36. Способ по одному из п.п. 27-35, в котором эффективное количество конъюгата составляет 15 мкг конъюгата на дозу.

37. Способ по одному из п.п. 27-35, в котором эффективное количество конъюгата составляет 60 мкг конъюгата на дозу.

10 38. Способ по одному из п.п. 27-37, включающий дополнительно внутримышечное введение субъекту композиции второй бустерной вакцины, которая содержит в эффективном количестве конъюгат, через 20-26 недель после введения праймер-вакцины, и устойчивый иммунный ответ сохраняется в течение по меньшей мере примерно 36 недель после введения праймер-вакцины.

15 39. Способ по п. 38, в котором композицию второй бустерной вакцины вводят через 24 недели после введения праймер-вакцины, и устойчивый иммунный ответ сохраняется в течение по меньшей мере примерно 48 недель после введения праймер-вакцины.

20 40. Способ по п. 38 или п. 39, включающий дополнительно внутримышечное введение субъекту композиции третьей бустерной вакцины, которая содержит в эффективном количестве конъюгат, через 45-50 недель после введения праймер-вакцины, и устойчивый иммунный ответ сохраняется в течение по меньшей мере примерно 67 недель после введения праймер-вакцины.

25 41. Способ по п. 40, в котором композицию третьей бустерной вакцины вводят через 48 недель после введения праймер-вакцины, и устойчивый иммунный ответ сохраняется в течение по меньшей мере примерно 74 недель после введения праймер-вакцины.

30 42. Способ по одному из п.п. 27-41, в котором устойчивый иммунный ответ включает ответ в виде IgG против фосфорилированного Тау (pTau),

предпочтительно включает титр анти-pTau IgG, по меньшей мере в 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более раз более высокий по сравнению в плацебо-контролем.

5 43. Способ по одному из п.п. 27-42, в котором устойчивый иммунный ответ включает ответ в виде IgG против нефосфорилированного Тау, предпочтительно включает титр анти-Тау IgG, по меньшей мере в 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более раз более высокий по сравнению в плацебо-контролем.

10 44. Способ по одному из п.п. 27-43, в котором устойчивый иммунный ответ включает ответ в виде IgG против обогащенных парных спиральных филаментов (ePHF), предпочтительно включает титр анти-(ePHF) IgG по меньшей мере в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более раз более высокий по сравнению в плацебо-контролем.

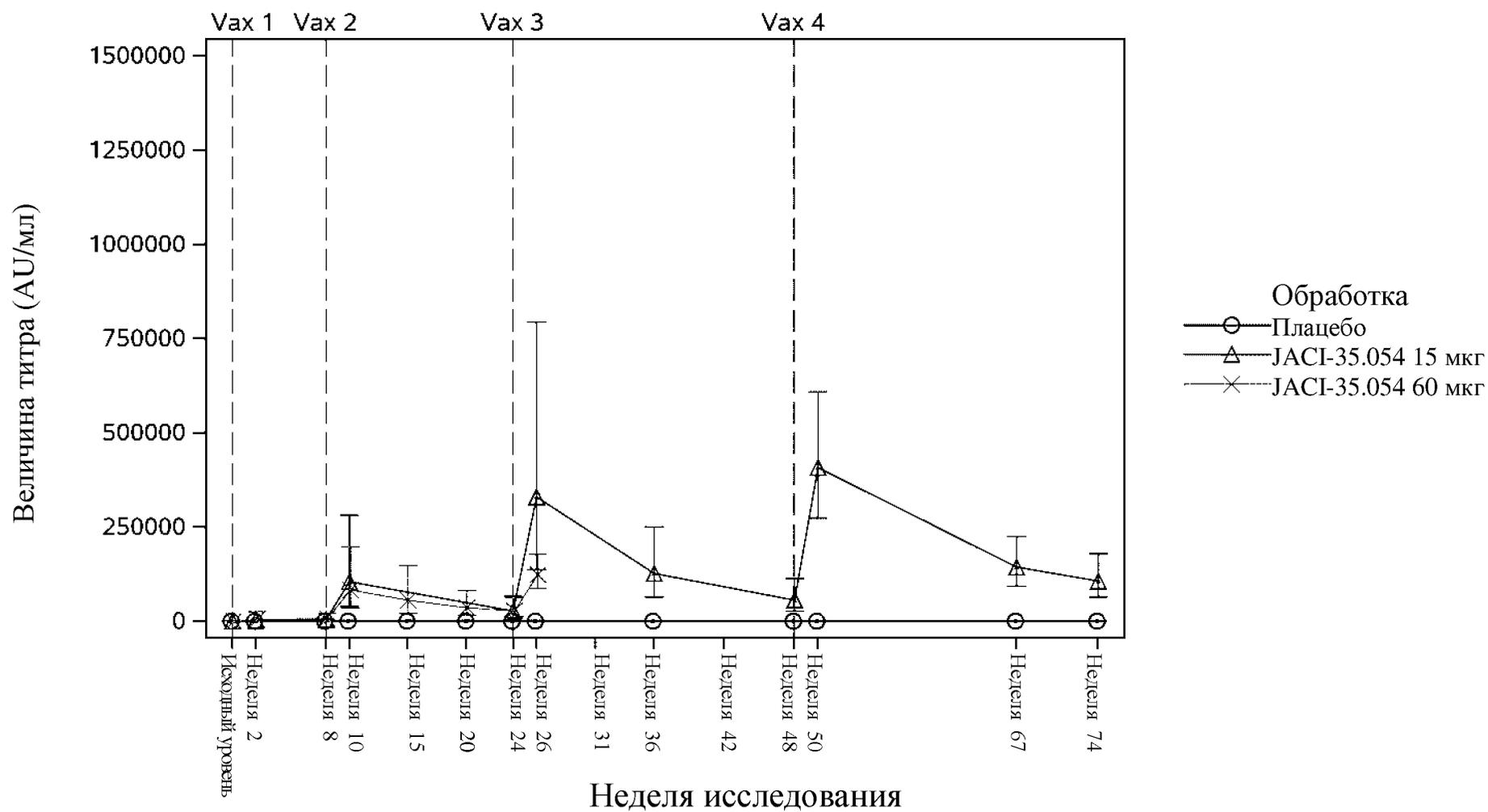
15 45. Способ по одному и п.п. 1-44, в котором субъект нуждается в очистке от агрегатов Тау.

20 46. Способ по одному из п.п. 1-45, в котором субъект нуждается в лечении нейродегенеративного заболевания или нарушения, вызванного или связанного с образованием нейрофибриллярных повреждений.

47. Способ по п. 46, в котором субъект нуждается в лечении болезни Альцгеймера.

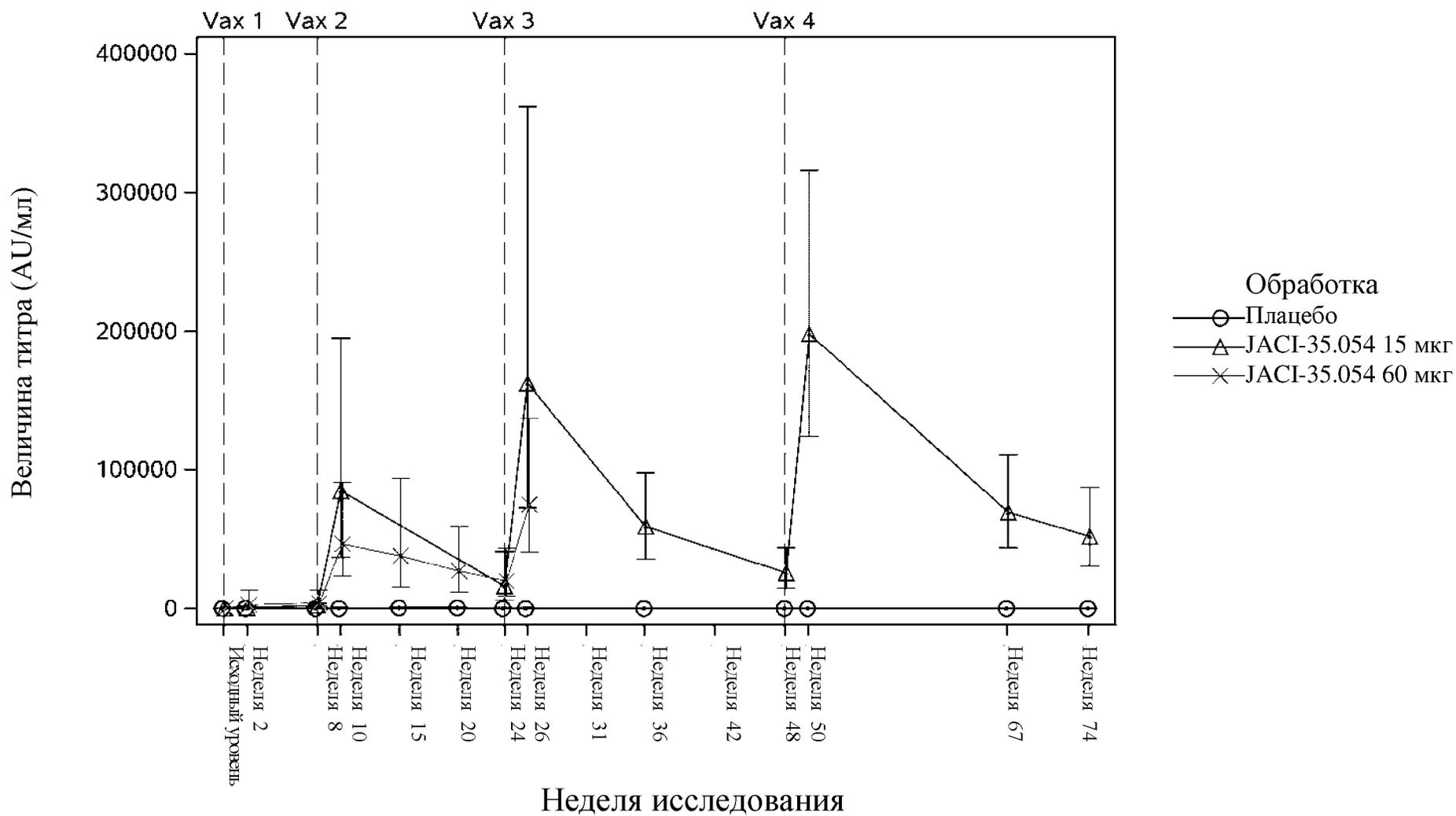
25 48. Способ по п. 47, в котором субъект нуждается в лечении ранней стадии болезни Альцгеймера или легкого когнитивного нарушения (МСИ), вызванного болезнью Альцгеймера.

Анти-pTau IgG

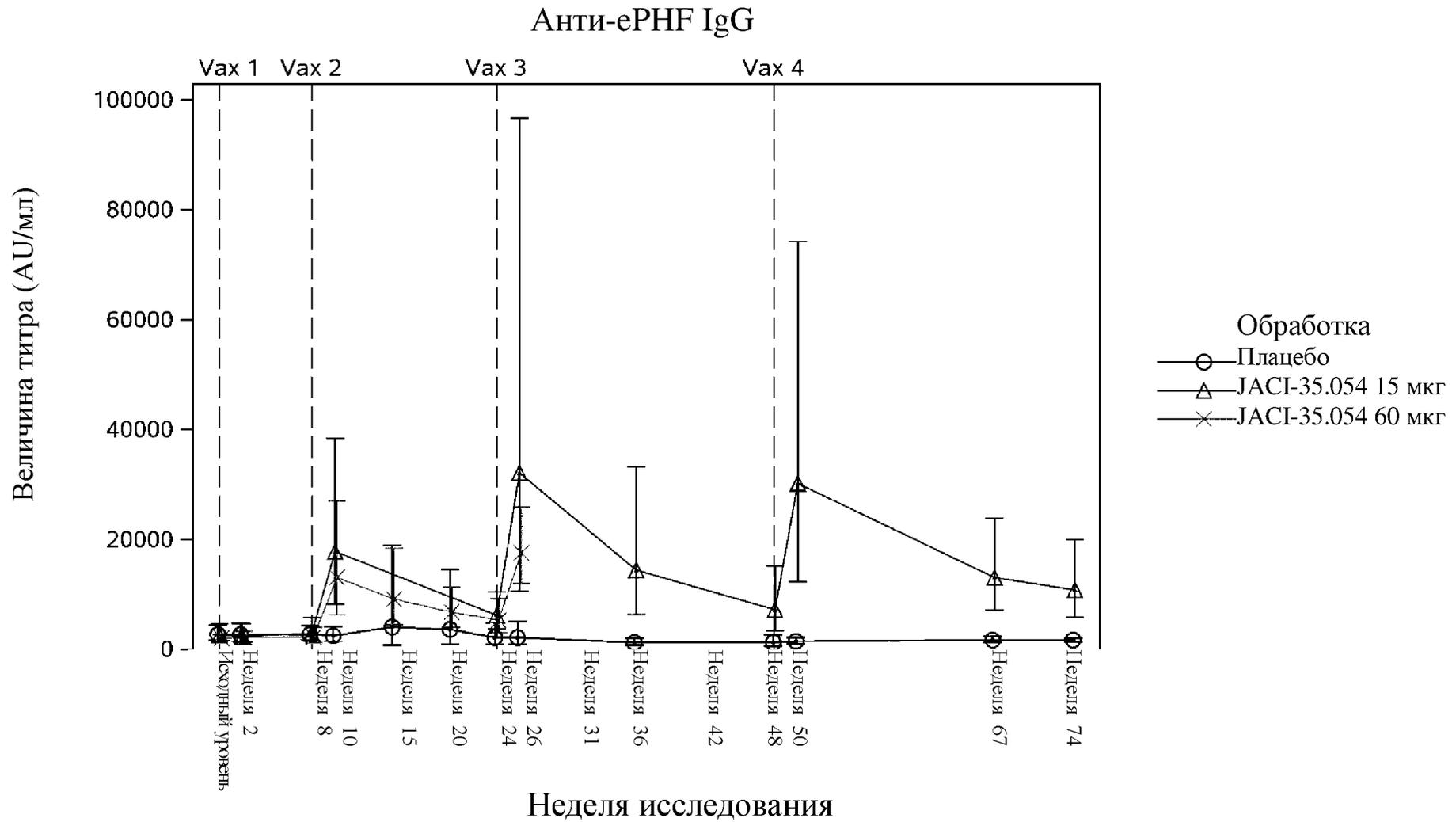


Фиг. 1

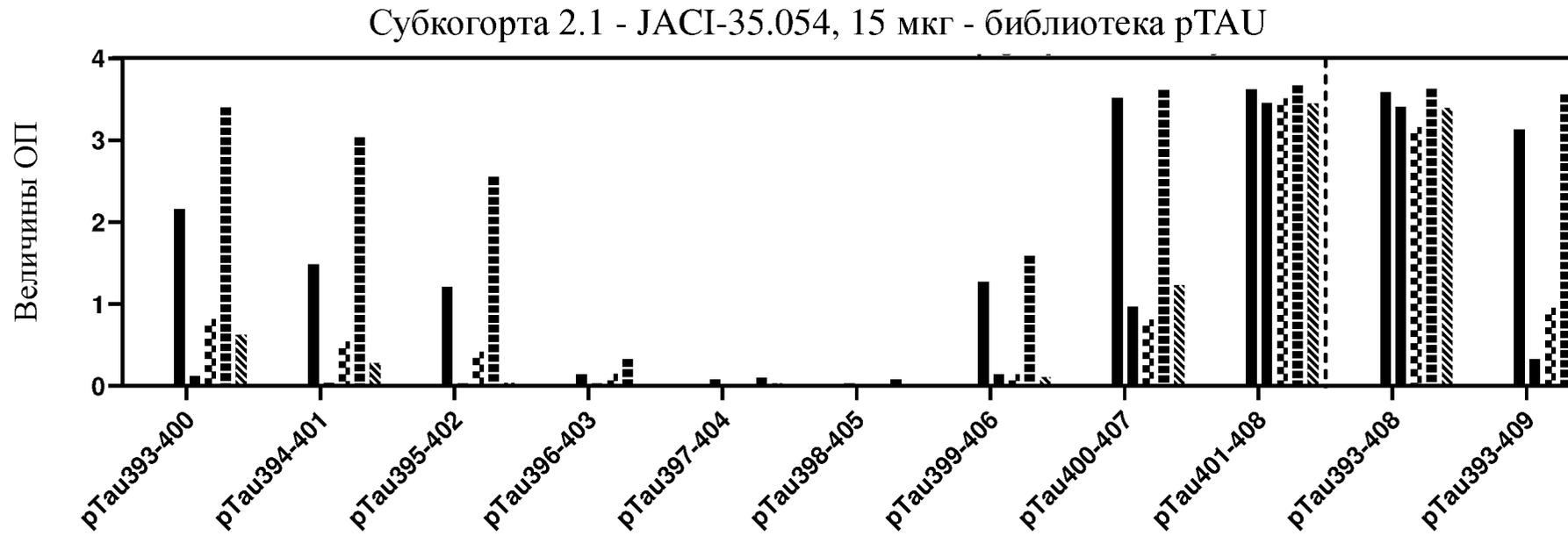
Анти-Tau IgG



Фиг. 2

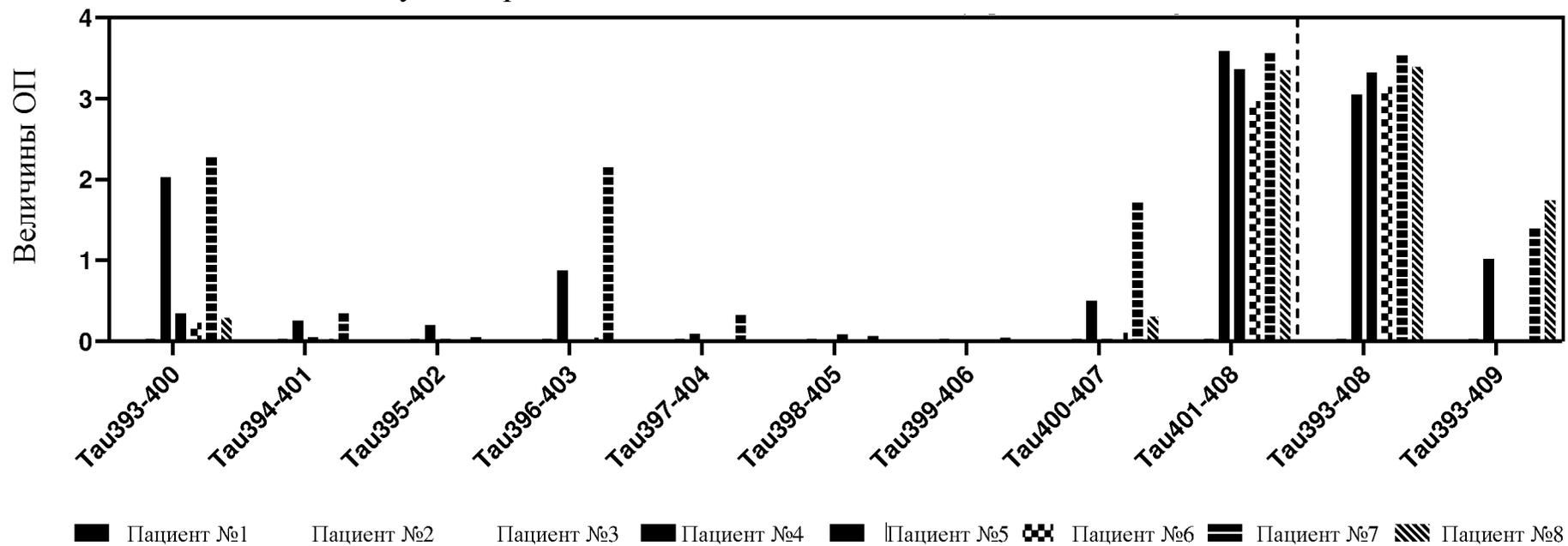


Фиг. 3



Фиг. 4А

Субкогорта 2.1 - JACI-35.054, 15 мкг - библиотека ТАУ



Фиг. 4Б