



УКРАЇНА

(19) UA (11) 85815 (13) C2

(51) МПК (2009)

A61K 38/17

A61K 39/00

C07K 14/435

C07K 19/00

A61P 25/28 (2008.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ЗАСТОСУВАННЯ ІМУНОГЕНУ ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ АБО ЛІКУВАННЯ ХВОРОБИ АЛЬЦГЕЙМЕРА АБО ІНШИХ ЗАХВОРЮВАНЬ, ПОВ'ЯЗАНИХ З ВІДКЛАДЕННЯМ АМІЛОЇДУ

1

2

(21) 2004032038

(22) 20.08.2002

(24) 10.03.2009

(86) PCT/DK02/00547, 20.08.2002

(31) 60/337,543

(32) 22.10.2001

(33) US

(31) 60/373,027

(32) 16.04.2002

(33) US

(31) PA 2001 01231

(32) 20.08.2001

(33) DK

(31) PA 2002 00558

(32) 16.04.2002

(33) DK

(46) 10.03.2009, Бюл.№ 5, 2009 р.

(72) РАСМУССЕН ПЕТЕР БІРК, ЕНСЕН МАРТИН
РОЛАНД, НІЛЬСЕН КЛАУС ГРЕГОРІУС, КОФОД
ПЕТЕР, ДЕГАН ФЛОРАНС ДАЛЬ

(73) Х. ЛУНДБЕКК А/С

(56) WO A2 00/72880, 07.12.2000.

WO A2 01/42306, 14.06.2001.

WO A1 99/27944, 10.06.1999.

WO A2 01/62284, 30.08.2001.

Lees A. et al.: "Enhanced immunogenicity of protein-dextran conjugates: I. Rapid stimulation of enhanced antibody responses to poorly immunogenic molecules". Vaccine. 1994 Oct; 12(13):1160-6. (ABSTRACT).

(57) 1. Застосування імуногену, який

а) являє собою поліамінокислоту, яка містить в одній і тій же молекулі істотну частину В-клітинних епітопів APP і/або Аβ, так, що поліамінокислота у тій же мірі, що і APP або Аβ, реагує з поліклональною сироваткою, одержаною проти APP або Аβ, і щонайменше один чужорідний Т-хелперний епітоп (Т_h-епітоп), і яка містить щонайменше один чужорідний Т_h-епітоп і розбиту на частини послідовність APP або Аβ, так, що поліамінокислота не включає в себе жодної підпослідовності SEQ ID NO:2, яка продуктивно зв'язується з молекулами

МНС класу II, викликаючи Т-клітинну відповідь; або

б) являє собою кон'югат, що включає в себе полігидроксиполімерний кістяк, з яким роздільно зв'язана поліамінокислота, як визначено в (а); або

с) являє собою кон'югат, що включає в себе полігидроксиполімерний кістяк, з яким роздільно зв'язані (1) щонайменше один чужорідний Т_h-епітоп і (2) розбита на частини послідовність APP або Аβ, як визначено в (а); або

д) являє собою нуклеїнову кислоту, яка кодує поліамінокислоту, як визначено в (а); або

е) являє собою непатогенний мікроорганізм або вірус, який несе фрагмент нуклеїнової кислоти, який кодує і експресує поліамінокислоту, як визначено в (а), при виготовленні фармацевтичної композиції, що містить вказаний імуноген, для лікування, профілактики або поліпшення у тварини хвороби Альцгеймера або інших захворювань і станів, які характеризуються відкладеннями амیلіду.

2. Застосування за п. 1, при якому поліамінокислота або кон'югат містить у собі

- щонайменше одну першу групу, яка здійснює націлювання поліамінокислоти аналога на антигенпрезентуючу клітину (АПК) або В-лімфоцит, і/або
- щонайменше одну другу групу, яка стимулює імунну систему, і/або

- щонайменше одну третю групу, яка оптимізує презентацію поліамінокислоти імунній системі.

3. Застосування за п. 2, де перша і/або друга, і/або третя група приєднується(ються) як бічні групи за допомогою ковалентного або нековалентного зв'язування до відповідних хімічних груп у послідовності APP або Аβ.

4. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де поліамінокислота включає в себе гібридний білок.

5. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де поліамінокислота або кон'югат включає в себе дуплікацію щонайменше одного В-клітинного епітопу APP або Аβ і/або введення гаптену.

(13) C2

(11) 85815

(19) UA

6. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де чужорідний Т-клітинний епітоп є імунодомінантним уданої тварини.

7. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де чужорідний Т-клітинний епітоп є змішаним, таким як чужорідний Т-клітинний епітоп, який вибраний з природного змішаного Т-клітинного епітопу і штучної пептидної послідовності, що зв'язує МНС-II.

8. Застосування за п.7, де природний Т-клітинний епітоп вибраний з епітопу анатоксину правця, такого як Р2 або Р30, епітопу дифтерійного анатоксину, епітопу гемаглютиніну вірусу грипу та епітопу CS P. falciparum.

9. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де поліамінокислота або кон'югат включає в себе В-клітинні епітопи, що не експонуються в екстрацелюлярну фазу, коли представлені у зв'язаній з клітиною формі поліпептиду-попередника Аβ.

10. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де в поліамінокислоті або кон'югаті відсутній щонайменше один В-клітинний епітоп, який експонований в екстрацелюлярну фазу, коли представлений у зв'язаній з клітиною формі поліпептиду-попередника Аβ.

11. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де поліамінокислота або кон'югат включає в себе не більше 9 послідовних амінокислот послідовності SEQ ID NO:2, наприклад, не більше 8, не більше 7, не більше 6, не більше 5, не більше 4 і не більше 3 послідовних амінокислот.

12. Застосування за п. 11, де поліамінокислота або кон'югат включає в себе щонайменше одну підпослідовність SEQ ID NO:2, так, що кожна така щонайменше одна підпослідовність SEQ NO:2 незалежно складається з амінокислотних відрізків, вибраних з групи, що складається з 9 послідовних амінокислот SEQ ID NO:2, 8 послідовних амінокислот SEQ ID NO:2, 7 послідовних амінокислот SEQ ID NO:2, 6 послідовних амінокислот SEQ ID NO:2, 5 послідовних амінокислот SEQ ID NO:2, 4 послідовних амінокислот SEQ ID NO:2 і 3 послідовних амінокислот SEQ ID NO:2.

13. Застосування за пп.11 або 12, де послідовні амінокислоти починаються з амінокислотного залишку, вибраного з групи, що складається із залишків 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713 і 714.

14. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де щонайменше дві копії поліамінокислоти або кон'югату ковалентно або нековалентно зв'язані з молекулою-носієм, здатною до ефективної презентації множинних копій антигенних детермінант.

15. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів варіантів b) або c), де поліамінокислота і T_H-епітоп зв'язані з полігідроксиполімером за допомогою амідного зв'язку.

16. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів варіантів b) або c), де полігідроксиполімер являє собою полісахарид.

17. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де поліамінокислота або кон'югат об'єднані з

ад'ювантом, що полегшує порушення ауто толерантності до аутоантигенів.

18. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де лікування, профілактика або покращення викликаються введенням тварині ефективної кількості поліамінокислоти або кон'югату за допомогою шляху, вибраного з парентерального шляху, такого як внутрішньовенний, підшкірний і внутрішньом'язовий шляхи; перитонеального шляху; перорального шляху; букального шляху; сублінгвального шляху; епідурального шляху; спінального шляху; анального шляху та інтракраніального шляху.

19. Застосування за п. 18, де ефективна кількість складає від 0,5 мкг до 2000 мкг поліамінокислоти або кон'югату.

20. Застосування за будь-яким з пп. 1-13, варіанта d), де лікування, профілактика або покращення викликаються введенням у клітини тварини поліамінокислоти або кон'югату, і таким чином одержують експресію in vivo клітинами введеної нуклеїнової кислоти (нуклеїнових кислот).

21. Застосування за п. 20, де введена(і) нуклеїнова(і) кислота(и) вибрана(і) з "оголеної" ДНК; ДНК, об'єднаної із зарядженими або незарядженими ліпідами, ДНК, поміщеної у ліпосоми; ДНК, включеної у вірусний вектор; ДНК, об'єднаної з білком або поліпептидом, що полегшує трансфекцію; ДНК, об'єднаної з націлюючим білком або поліпептидом; ДНК, об'єднаної із засобом, що осаджує кальцій; ДНК, зв'язаної з інертною молекулою-носієм; ДНК, інкапсульованої у хітин або хітозан, і ДНК, об'єднаної з ад'ювантом.

22. Застосування за будь-яким з пп. 18-21, де лікування, профілактика або покращення викликаються щонайменше одним призначенням/введенням на рік, наприклад щонайменше 2, щонайменше 3, щонайменше 4, щонайменше 6 і щонайменше 12 призначеннями/введеннями.

23. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де лікування, профілактика або покращення викликаються тим, що APP або Аβ піддаються понижуючій регуляції до такої міри, що загальна кількість амілоїду зменшується або що швидкість формування амілоїду зменшується з клінічною значимістю.

24. Поліамінокислота або кон'югат, одержаний з APP або Аβ тварини, де введена модифікація, яка приводить до того, що імунізація тварини поліамінокислотою або кон'югатом викликає продукцію антитіл проти аутологічних APP або Аβ тварини, і де поліамінокислота або кон'югат є такими, як визначено за будь-яким з пп. 1-16.

25. Імуногенна композиція, що включає в себе імуногенно ефективну кількість аналога за п. 24, де композиція додатково включає в себе фармацевтично та імунологічно допустимий носій і/або наповнювач і, необов'язково, ад'ювант.

26. Фрагмент нуклеїнової кислоти, що кодує поліамінокислоту або кон'югат за п. 24.

27. Вектор, що несе фрагмент нуклеїнової кислоти за п. 26, наприклад, вектор, який здатний до автономної реплікації.

28. Вектор за п. 27, вибраний з групи, що складається з плазмід, фагу, космід, мініхромосом та вірусу.

29. Вектор за пп. 27 або 28, що містить у напрямку 5'→3' та у функціональному з'єднанні промотор для керування експресією фрагмента нуклеїнової кислоти за п. 26, необов'язково послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує лідерний пептид, що робить можливою секрецію поліпептидного фрагмента або його інтеграцію у мембрану, фрагмент нуклеїнової кислоти за п. 26 і, необов'язково, термінатор.

30. Вектор за будь-яким з пп. 27-29, який при введенні у клітину-хазяїна здатний або нездатний до інтеграції у геном клітини-хазяїна.

31. Вектор за будь-яким з пп. 29 або 30, де промотор керує експресією в еукаріотичній клітині і/або у прокаріотичній клітині.

32. Трансформована клітина, що несе вектор за будь-яким з пп. 27-31, така як трансформована клітина, здатна до реплікації фрагмента нуклеїнової кислоти за п. 26.

33. Трансформована клітина за п. 32, що є мікроорганізмом, вибраним з групи бактерій, дріжджів, найпростіших або клітини, одержаної з багатоклітинного організму, вибраного з гриба, клітини ко-

махи, такої як клітина S₂ або SF, клітини рослини або клітини ссавця.

34. Трансформована клітина за пп. 32 або 33, що експресує фрагмент нуклеїнової кислоти за п. 27, така як трансформована клітина, яка секретує або несе на своїй поверхні поліамінокислоту або кон'югат за п. 24.

35. Застосування за будь-яким з пп. 1-13, варіанта е), де лікування, профілактика або покращення викликаються введенням непатогенного мікроорганізму або вірусу, що несе фрагмент нуклеїнової кислоти, який кодує і експресує поліамінокислоти або кон'югат.

36. Композиція для індукування продукції антитіл проти амілоїду, де композиція включає в себе - фрагмент нуклеїнової кислоти за п. 26 або вектор за будь-яким з пп. 27-31 і

- фармацевтично та імунологічно прийнятний носій і/або наповнювач, і/або ад'ювант.

37. Стабільна клітинна лінія, що несе вектор за будь-яким з пп. 7-31, що при цьому експресує фрагмент нуклеїнової кислоти за п. 26 і необов'язково секретує або несе на своїй поверхні поліамінокислоту або кон'югат за п. 24.

Даний винахід відноситься до вдосконалень у лікуванні і профілактиці хвороби Альцгеймера (AD) та інших захворювань, що характеризуються накопиченням амілоїду, наприклад, характеризуються накопиченням амілоїду у центральній нервовій системі (ЦНС). Більш конкретно, у даному винаході наданий спосіб для знижувальної регуляції (небажаного) накопичення амілоїду за допомогою включення продукції антитіл проти відповідного білка (APP або A β) або їх компонентів у суб'єктів, які страждають від захворювань з патологією, що включає в себе відкладення амілоїду, або ризикують постраждати від даних захворювань. Винахід також відноситься до способів одержання поліпептидів, які можна використати у вказаному способі, а також до модифікованих пептидів як таких. Також у даний винахід включені фрагменти нуклеїнових кислот, які кодують модифіковані поліпептиди, а також вектори, що включають в себе вказані фрагменти нуклеїнових кислот, і клітини-хазяїни і клітинні лінії, трансформовані ними. Нарешті, у даному винаході наданий новий тип імуногена на основі кон'югованих пептидів.

Амілоїдоз являє собою позаклітинне накопичення нерозчинних пептидних фібрил, що приводить до пошкодження тканин і захворювання [Perys, 1996; Tan et al., 1995; Kelly, 1996]. Фібрили формуються, коли розчинні у нормі білки і пептиди мимовільно асоціюються аномальним чином [Kelly, 1997].

Амілоїд асоційований з серйозними захворюваннями, включаючи системний амілоїдоз, AD, діабет дорослих, хворобу Паркінсона, хворобу Гентінгтона, фронтолобально-парціальну деменцію і пов'язані з пріонами губчасті енцефалопатії, що передаються (куру і хвороба Крейцфельда-Якоба у людини та скреїпі і BSE у овець і великої рогатої

худоби, відповідно), і формування амілоїдних бляшок, наприклад, при хворобі Альцгеймера, очевидно, тісно пов'язане з прогресуванням захворювання у людини. На тваринних моделях показано, що надмірна експресія або експресія модифікованих форм білків, виявлених у відкладеннях, таких як білок β -амілоїд, викликають різні симптоми захворювання, наприклад, подібні до симптомів при хворобі Альцгеймера. Специфічного лікування накопичення амілоїду не існує, і такі захворювання, як правило, приводять до летального кінця.

Субодиниці фібрил амілоїду можуть являти собою білки дикого типу, змінені або укорочені білки, і подібні фібрили можна формувати *in vitro* з олігопептидів і денатурованих білків [Bradbury et al., 1960; Filshie et al., 1964; Burke & Rougvie, 1972]. Характер амілоїдозу визначає природа поліпептидного компонента фібрил. Незважаючи на великі відмінності у розмірі, нативній структурі і функції амілоїдних білків, всі амілоїдні фібрили являють собою фібрили невизначеної довжини, нерозгалужені, мають у діаметрі від 70 до 120 Å і характерно забарвлюються конго червоним [Perys, 1996]. Вони являють собою характерну складчасту β -структуру, в якій поліпептидний ланцюг укладений у β -шари. Хоча амілоїдні білки володіють надзвичайно різноманітними структурами попередників, всі вони можуть зазнавати структурної конверсії, можливо, по схожому шляху, у неправильно укладену форму, яка являє собою будівельний блок протофіламенту спіралі β -шару.

Дана характерна фібрилярна форма приводила до амілоїдоз, що називаються β -фібрильозами [Glenner, 1980a, b], а фібрилярний білок AD, до того як дізналися його вторинну структуру, нази-

вали β -білком [Glenner & Wong, 1984]. Характерна дифракційна картина перехресних β -структур, разом з появою фібрил і властивостями при забарвленні у наш час являють собою загальноприйняті діагностичні ознаки амілоїду і означають, що фібрили, хоча і сформовані з абсолютно різних білкових попередників, володіють певною структурною подібністю і складають структурне надсімейство, безвідносно до природи їх білків-попередників [Sunde M., Serpell L.C., Bartlam M., Fraser P.E., Pepys M.B., Blake CCFJ Mol. Biol. 1997 Oct. 31; 273 (3): 729-739].

Одне з найбільш широко поширених і добре відомих захворювань являє собою AD, де, як припускають, центральною роллю у розвитку захворювання є відкладення амілоїду у центральній нервовій системі.

AD

Хвороба Альцгеймера (AD) являє собою безповоротний, прогресуючий розлад головного мозку, який відбувається поступово і приводить до втрати пам'яті, змін у поведінці та особистості і зниження розумових здібностей. Такі втрати пов'язані із загибеллю клітин головного мозку і руйнуванням зв'язків між ними. Перебіг захворювання, як і ступінь деградації варіюють від людини до людини. У середньому пацієнти з AD після встановлення діагнозу живуть від 8 до 10 років, хоча хвороба може тривати і до 20 років.

AD прогресує по стадіях, від ранньої, помірної безпам'ятності до тяжкої втрати розумової діяльності. Така втрата відома як деменція. У більшості людей з AD перші симптоми з'являються після 60 років, але не є рідкими більш ранні віки початку. Найбільш ранні симптоми часто включають в себе втрату короткочасної пам'яті, помилкове судження та особистісні зміни. Часто люди на початкових стадіях AD мислять менш ясно і забувають імена близьких родичів і назви звичайних речей. Пізніше, при розвитку хвороби, вони можуть забувати як виконувати навіть прості задачі. У результаті, люди з AD повністю втрачають здатність до мислення і стають залежними від інших людей через необхідність щоденного догляду за ними. Зрештою, хвороба так послаблює сили, що пацієнти стають прикутими до ліжка, і зростає ймовірність розвитку інших захворювань та інфекції. Як правило, люди, які страждають AD, вмирають від пневмонії.

Незважаючи на те, що ризик розвитку AD збільшується з віком, симптоми AD і деменції не є частиною нормального старіння. AD та інші захворювання, що приводять до недомуги, викликаються захворюваннями, які впливають на мозок. При нормальному старінні нервові клітини головного мозку у великій кількості не руйнуються. На відміну від цього, при AD руйнується три ключових процеси: зв'язок, метаболізм і відновлення нервових клітин. Таке руйнування, зрештою, викликає зупинку функціонування багатьох нервових клітин, втрату зв'язків з іншими нервовими клітинами і смерть.

Спочатку AD руйнує нейрони у частинах головного мозку, які контролюють пам'ять, головним чином у гіпокампі і пов'язаних структурах. В міру того як клітини у гіпокампі по суті припиняють функціонування, слабшає короткочасна пам'ять, і час-

то здатність суб'єкта виконувати прості і звичні задачі починає знижуватися. AD також впливає на кору головного мозку, особливо у ділянках, що відповідають за мову і мислення. Зрештою, залучаються й інші ділянки головного мозку, всі ці ділянки головного мозку атрофуються (скорочуються), і пацієнти з AD стають прикутими до ліжка, нездатними до самоконтролю, повністю безпорадними і нестримними до навколишнього світу [джерело: National Institute on Aging Progress Report on Alzheimer's Disease, 1999].

Вплив AD

AD являє собою найбільш загальну причину деменції у людини у віці 65 років і старше. Вона являє собою велику проблему для здоров'я внаслідок її величезного впливу на індивідів, сім'ї, систему охорони здоров'я і суспільство загалом. Вчені підраховали, що у наш час понад 4 мільйони людей страждають від даного захворювання, і частота захворювання у тих індивідів, кому більше 65 років, подвоюється кожні 5 років. Також припускають, що кожного року виникне приблизно 360000 нових випадків (інцидент), хоча ця цифра буде збільшуватися в міру старіння населення [Brookmeyer et al., 1998].

AD накладає тяжкий економічний тягар на суспільство. В останньому дослідженні у Сполучених Штатах розраховували, що щорічна вартість лікування одного пацієнта з AD складає \$18408 для пацієнта зі слабкою AD, \$30096 - для пацієнта з помірною AD і \$36132 - для пацієнта з тяжкою AD. Підраховано, що щорічні державні витрати у США на лікування пацієнтів з AD складають трохи більше \$50 мільярдів [Leon et al., 1998].

Приблизно 4 мільйони американців знаходяться у віці 85 років або більше і в найбільш індустріалізованих країнах ця вікова група являє собою одну з найбільш швидко зростаючих частин населення. Розраховано, що дана група до 2030 року у США складатиме приблизно 8,5 мільйонів; деякі експерти, які вивчають зміни населення припускають, що дане число може навіть бути більшим. Оскільки все більше і більше людей живе довше, число людей, уражених захворюваннями, пов'язаними з віком, включаючи AD, буде продовжувати збільшуватися. Наприклад, деякі дослідження показують, що приблизно половина з усіх людей у віці 85 років і старше має яку-небудь форму недомуги [National Institute on Aging Progress Report on Alzheimer's Disease, 1999].

Основні характеристики AD

Ознаками AD є дві аномальні структури у головному мозку: амілоїдні бляшки і нейрофібрилярні клубки (NFT). Бляшки являють собою щільні, майже абсолютно нерозчинні накопичення білка і клітинної речовини поза і навколо нейронів головного мозку. Клубки являють собою нерозчинні переплетені волокна, що накопичуються всередині нейронів.

Існує дві форми AD: сімейна AD (FAD), яка підпорядковується певному типу успадковування, і спорадична AD, для якої не спостерігається очевидного типу успадковування. Внаслідок відмінностей на початку захворювання AD додатково описують як захворювання з раннім початком (що виникає у людини молодше 65 років) і з пізнім по-

чатком (що виникає у людини 65 років і старше). AD з раннім початком трапляється рідко (приблизно 10 процентів випадків) і, як правило, уражує людей у віці від 30 до 60 років. Деякі форми AD з раннім початком є спадковими і уражують членів сімей. AD з раннім початком також часто прогресує швидше, ніж більш часта форма з пізнім початком.

Всі FAD, відомі до цього часу, характеризуються раннім початком, а у наш час відомо, що до 50 процентів випадків FAD викликані дефектами у трьох генах, розташованих на трьох різних хромосомах. Вони являють собою мутації у гені APP на хромосомі 21; мутації у гені, що називається пресенілін-1, на хромосомі 14 і мутації у гені, що називається пресенілін-2, на хромосомі 1. Однак досі немає доказів того, що яка-небудь з цих мутацій грає основну роль у більш частій, спорадичній або несімейній формі AD з пізнім початком [National Institute on Aging Progress Report on Alzheimer's Disease, 1999].

Амілоїдні бляшки

При AD амілоїдні бляшки спочатку розвиваються у ділянках головного мозку, пов'язаних з пам'яттю та іншими когнітивними функціями. Вони складаються з майже абсолютно нерозчинних накопичень бета-амілоїду (який надалі позначається A β), що являє собою білкові фрагменти більшого білка, який називається білком-попередником амілоїду (APP, амінокислотна послідовність якого приведена далі у SEQ ID NO:2), змішаного з частинами нейронів і клітин, що не є нейронами, таких як мікроглія і астроцити. Невідомо, чи є амілоїдні бляшки як такі основною причиною AD або вони являють собою побічний продукт процесу AD. Безумовно, як показано для успадкованої форми AD, що викликається мутаціями у гені APP, зміни білка APP можуть викликати AD, а формування бляшок A β являється тісно асоційованим з прогресією захворювання у людини [Lippa C. F. et al. 1998].

APP

APP являє собою один з багатьох білків, зв'язаних з клітинними мембранами. Після його утворення APP вбудовується у мембрану нервової клітини, розташовуючись частково всередині і частково ззовні клітини. Останні дослідження з використанням трансгенних мишей показали, що, очевидно, APP грає важливу роль у рості і виживанні нейронів. Наприклад, визначені форми і кількості APP можуть захистити нейрони і від короточасного, і від тривалого пошкодження, а також можуть приводити пошкоджені нейрони у стан з кращою здатністю до самовідновлення і допомагають частиним нейронам рости після травми головного мозку.

Доки APP вбудований у клітинну мембрану, на особливі ділянки APP діють протеази, розщеплюючи його на білкові фрагменти. Одна протеаза допомагає розщепити APP, з утворенням A β , а інша протеаза розщеплює APP посередині амілоїдного фрагмента, так, що A β не може сформуватися. Фрагмент A β сформований з двох різних частин, більш короткого A β довжиною 40 (або 41) амінокислот, який є відносно розчинним і повільно агрегує, і небагато більш довгого "липкого" A β ,

довжиною 42 амінокислоти, який швидко утворює нерозчинні агрегати. Доки A β формується, ще точно невідомо, як він рухається через нервові клітини або навколо них. На фінальній стадії процесу "липкий" A β агрегує у довгі філаменти ззовні клітини і разом з фрагментами відмерлих або відмираючих нейронів і мікроглією з астроцитами формує бляшки, що характеризують AD у тканині головного мозку.

Існують деякі докази, що мутації в APP стають більш вірогідними, коли від попередника APP відріжеться A β , таким чином викликаючи утворення або великих кількостей загального A β , або відносно великих кількостей «липкої» форми. Також виявили, що мутації у генах пресеніліну можуть здійснювати внесок у дегенерацію нейронів щонайменше двома шляхами: за допомогою модифікації продукції A β або за допомогою запуску клітинної смерті більш безпосередньо. Інші дослідження наводять на думку, що мутовані пресеніліни 1 і 2 можуть бути залучені до зростаючої швидкості апоптозу.

Вважають, що A β токсичний для нейронів. У дослідженнях на культурі тканини дослідники виявили збільшення смерті нейрональних клітин гіпокампу, сконструйованих для підвищеної експресії мутантних форм APP людини у порівнянні з нейронами з підвищеною експресією нормальної APP людини [Luo et al., 1999].

Крім того, підвищена експресія або експресія модифікованих форм білка A β , як показано на тваринних моделях, викликає симптоми, подібні до симптомів при хворобі Альцгеймера [Hsiao K. et al., 1998].

На основі даних про те, що збільшене утворення A β , його агрегація у бляшки і результуюча нейротоксичність можуть вести до AD, дослідження станів, в яких агрегацію A β у бляшки можна знизити або навіть блокувати, представляє інтерес для лікування.

Пресеніліни

Мутації у пресеніліні-1 (S-180) відповідають майже за 50% всіх випадків сімейної AD з раннім початком (FAD). Ідентифіковано близько 30 мутацій, що приводять до AD. Початок AD варіює, в залежності від мутацій. Мутації у пресеніліні-2 відповідають за набагато меншу частину випадків FAD, але проте являють собою значимий фактор. Чи залучені пресеніліни до спорадичної несімейної AD, невідомо. Функція пресенілінів невідома, але вони виявляються залученими до процесингу APP з одержанням A β -42 (більш довга липка форма пептиду, SEQ ID NO:2, залишки 673-714), оскільки пацієнти з AD з мутаціями у пресеніліні мають підвищені рівні даного пептиду. Чи вирають також пресеніліни роль при індукції утворення NTF, незрозуміло. Деякі дані дозволяють припустити, що пресеніліни також можуть мати більш безпосередню роль у дегенерації і смерті нейронів. Пресенілін-1 розташований на хромосомі 14, у той час як пресенілін-2 зчеплений з хромосомою 1. Якщо суб'єкт несе мутовану версію хоча б одного з даних генів, у нього або у неї майже достовірно розвинеться AD з раннім початком.

Дещо незрозуміло, чи є пресенілін-1 ідентичним гіпотетичний γ -секретазі, залучений до процесингу APP [Naruse et al., 1998].

Аполіпопротеїн Е

Аполіпопротеїн Е звичайно асоційований з холестерином, але його також знаходять у бляшках і клубках у головному мозку при AD. Незважаючи на те, що алелі 1-3 вважаються не залученими до AD, існує значима кореляція між присутністю алеля APOE- $\epsilon 4$ і розвитком AD з пізнім початком [Strittmatter et al., 1993]. Однак це являє собою фактор ризику, а не пряму причину як у випадку мутацій пресеніліну і APP, і це не обмежено сімейною AD.

Шляхи, при яких у зв'язку з білком APOE $\epsilon 4$ збільшується ймовірність розвитку AD, достовірно не відомі, але одна можлива теорія полягає у тому, що він полегшує накопичення A β , і це сприяє зменшенню віку початку AD, або присутність або відсутність конкретних алелів APOE може впливати на спосіб, яким нейрони відповідають на пошкодження [Buttini et al., 1999].

Показано, що Apo A1 також є амілоїдогенним. Інтактний Apo A1 *in vitro* самостійно може формувати фібрили, подібні до амілоїду, які забарвлюються конго червоним [Am J. Pathol. 147 (2): 238-244 (Aug. 1995), Wisniewski T., Golabek A.A., Kida E., Wisniewski K.E., Frangione B.].

Очевидно, існують суперечливі результати, які вказують на те, що мають місце позитивні ефекти алеля APOE- $\epsilon 4$ відносно зменшення симптомів ментальної втрати у порівнянні з іншими алелями [Stern, Brandt, 1997, *Annals of Neurology* 41].

Нейрофібрилярні клубки

Дана друга ознака AD полягає в аномальному накопиченні перекручених ниток, що виявляються всередині нервових клітин. Головний компонент клубків являє собою одну з форм білка, що називається тау (τ). У центральній нервовій системі тау-білки найбільш відомі своєю здатністю зв'язуватися з мікротрубочками, що являють собою одну зі складових внутрішньої підтримуючої структури клітини, або цитоскелет, і допомагати їм стабілізуватися. Однак при AD тау-білки змінені хімічно, і такі змінені тау-білки більше не здатні стабілізувати мікротрубочки, будучи причиною їх дезінтеграції. Таке руйнування транспортної системи може спочатку привести до порушення зв'язків між нервовими клітинами, а пізніше може привести до смерті нейронів.

При AD хімічно змінені тау-білки переплітаються у парні спіральні філаменти, що являють собою дві нитки тау-білків, накручених одна навколо іншої. Ці філаменти являють собою основну речовину, що виявляється у нейрофібрилярних клубках. В одному нещодавньому дослідженні були виявлені нейрофібрилярні зміни менш ніж у 6 процентах нейронів у визначеній частині гіпокампу у головному мозку здорових, більш ніж у 43 процентах цих нейронів у людей, які померли від помірної AD, і у 71 проценті цих нейронів у людей, які померли від тяжкої AD. Коли вивчали загибель нейронів, виявили подібну прогресію. Докази такого типу підтримують ідею про те, що формування клубків і загибель нейронів прогресують разом у

процесі AD [National Institute on Aging Progress Report on Alzheimer's Disease, 1999].

Таупатії і клубки

Тяжкі нейродегенеративні захворювання, відмінні від AD, характеризуються агрегацією тау-білків у нерозчинні філаменти у нейронах і глії, що приводять до дисфункції та смерті. Зовсім нещодавно декілька груп дослідників, які вивчали сім'ї з різними видами успадкованого недоумства, що відрізняється від AD, виявили першу мутацію у гені тау-білка на хромосомі 17 [Clark et al., 1998; Hutton et al., 1998; Poorkaj et al., 1998; Spillantini et al., 1998]. У цих сім'ях мутації в гені тау-білка викликають смерть нейронів і недоумство. Такі розлади, що розділяють деякі з характеристик з AD, але відрізняються у деяких важливих аспектах, узагальнено називають «фронтотемпоральне недоумство і паркінсонізм, зчеплені з хромосомою 17» (FTDP-17). Вони являють собою захворювання, такі як хвороба Паркінсона, деякі форми аміотрофічного бічного склерозу (ALS), кортикобазальна дегенерація, прогресуючі супрануклеарний параліч і хвороба Піка, всі з яких характеризуються аномальним накопиченням тау-білка.

Інші неврологічні захворювання, подібні до AD

Існують важливі паралелі між AD та іншими неврологічними захворюваннями, включаючи пріонні захворювання (такі як куру, хвороба Крейтцфельдта-Якоба і бичачий губчатий енцефаліт), хворобу Паркінсона, хворобу Гентінгтона і фронтотемпоральну деменцію. Всі вони пов'язані з накопиченням у головному мозку аномальних білків. І AD, і пріонні захворювання викликають недоумство і смерть, і асоційовані з формуванням нерозчинних фібрил амілоїду, але з мембранних білків, які відрізняються один від одного.

Вчені, що вивчають хворобу Паркінсона, другий найбільш частий розлад після AD, виявили перший ген, зчеплений з даним захворюванням. Даний ген кодує білок, що називається синуклеїн, який, що цікаво, також виявлений в амілоїдних бляшках головного мозку пацієнтів з AD [Lavedan C, 1998, *Genome Res.* 8 (9): 871-80]. Дослідники також виявили, що генетичні дефекти при хворобі Гентінгтона, в іншому прогресуючому нейродегенеративному захворюванні, яке викликає недоумство, служать причиною того, що білок Гентінгтона утворює нерозчинні фібрили, дуже подібні до фібрил A β при AD і білкових фібрил при пріонному захворюванні [Scherzinger E, et al, 1999, *PNAS U.S.A.* 96 (8): 4604-9].

Вчені також виявили новий ген, який у мутантній формі відповідає за сімейне недоумство англіїців (FBD), рідке спадкове захворювання, що викликає тяжкі рухові порушення і прогресуюче недоумство, подібне до того, що спостерігається при AD. При біохімічному аналізі фібрил амілоїду, виявлених у бляшках при FBD, знайдений новий пептид, що називається Abri [Mdal et al., 1999]. Мутація в особливій точці у даному гені приводить до продукції більш довгого, ніж звичайний, білка Bri. Пептид Abri, який відрізняється від мутантного кінця білка Bri, відкладається у вигляді фібрил амілоїду. Вважають, що такі бляшки ведуть до нейрональної дисфункції та недоумства, що характеризує FBD.

Імунізація Аβ

Імунна система звичайно бере участь в очищенні від чужорідних білків і білкових частинок в організмі, але накопичення, асоційовані з вказаними вище захворюваннями, головним чином складаються з власних білків, отже, інтерпретація ролі імунної системи у контролі даних захворювань менш очевидна. Крім того, накопичення розташовані у відділах (ЦНС), звичайно відділених від імунної системи, обидва цих факти дозволяють припустити, що будь-яка вакцина або імунотерапевтичний підхід виявляться безуспішними.

Проте, вчені нещодавно спробували імунізувати мишей вакциною, що складається з гетерологічного людського Аβ і речовини, відомої як стимулятор імунної системи [Schenk et al., 1999 і WO 99/27944]. Вакцину тестували у конкретній моделі AD у трансгенних мишей з мутантним геном APP людини, вставленим у ДНК миші. У мишей в міру їх старіння продукувався модифікований білок APP і розвивалися амілоїдні бляшки. Дану мишачу модель використовували для тестування можливого ефекту вакцинації проти модифікованого трансгенного APP людини на формування бляшок. У першому експерименті одній групі трансгенних мишей щомісяця вводили ін'єкції вакцини, починаючи з віку у 6 тижнів і закінчуючи у віці 11 тижнів. Друга група мишей не одержувала ін'єкцій і служила контрольною групою. До віку 13 місяців у мишей в контрольній групі були наявні бляшки, що охоплюють від 2 до 6 процентів їх головного мозку. Навпаки, у імунізованих мишей практично не було бляшок.

У другому експерименті вчені починали проводити ін'єкції на 11 місяці, коли деякі бляшки вже розвинулися. Через 7 місяців контрольні трансгенні миші мали у 17 разів більшу кількість бляшок у головному мозку, тоді як у мишей, що одержували вакцину, відбувалося 99%-е зменшення кількості бляшок у порівнянні з 18-місячними контрольними трансгенними мишами. Було виявлено, що у деяких мишей деякі з попередніх відкладень бляшок видалялися внаслідок лікування. Також виявили, що інші пошкодження, асоційовані з бляшками, такі як запалення і аномальні процеси у нервових клітинах, в результаті імунізації зменшувалися.

Таким чином, вказане вище являє собою попереднє дослідження на мишах, і, наприклад, вченим необхідно з'ясувати, чи залишаються вакциновані миші здоровими в інших аспектах і чи нормально зберігається пам'ять у вакцинованих мишей. Більш того оскільки мишача модель не повністю відображає AD (у тварин не розвиваються нейрофібрилярні клубки, і при цьому велика кількість з їх нейронів не гине), необхідні додаткові дослідження для визначення того, чи володіє людина подібною до мишачої реакцією або реакцією, відмінною від мишачої. Інша проблема для розгляду полягає у тому, що спосіб, можливо, може «лікувати» накопичення амілоїду, але не зупиняти розвиток недомогства.

Технічні проблеми також являють собою великі складності. Наприклад, малоймовірно, якщо взагалі можливо, застосування даного способу для створення вакцини, що дає можливість підвищити

у людини рівень антитіл проти її власних білків. Таким чином, перед тим як можна буде розглядати які-небудь випробування на людині, необхідно вирішити численні проблеми безпеки і ефективности.

Таким чином, робота Schenk et al. показує, що якщо можна викликати сильну імунну відповідь до власних білків у білкових відкладеннях у центральній нервовій системі, таких як бляшки, що формуються при AD, можна і запобігти формуванню накопичень, і можна також усунути вже сформовані бляшки.

Останнім часом клінічні спроби із застосуванням вакцин Аβ, що обговорюються вище, обмежувалися внаслідок несприятливих ефектів: у ряду вакцинованих суб'єктів розвивався хронічний енцефаліт, який міг виникати внаслідок некерованого аутоімунітету проти Аβ у ЦНС.

Метою даного винаходу є надання нових способів лікування станів, таких як AD, що характеризуються накопиченням амілоїду. Додаткова мета являє собою розробку аутовакцини проти амілоїду для розробки нового способу лікування AD та інших патологічних розладів, асоційованих з відкладенням амілоїду.

Суть винаходу

Тут описане застосування способу аутовакцинації для вироблення сильних імунних відповідей проти інакше неімуногенних APP і Аβ. Також описане одержання таких вакцин для профілактики, можливого лікування або ослаблення симптомів захворювань, асоційованих з відкладеннями амілоїду.

Таким чином, у своєму широкому і найбільш повному обсязі, даний винахід відноситься до способу знижувальної регуляції білка-попередника амілоїду (APP) або бета-амілоїду (Аβ) *in vivo* у тварин, включаючи людину, де спосіб включає в себе ефективну презентацію імунній системі тварини імуногенно ефективної кількості щонайменше одного аналога APP або Аβ, який містить в одній молекулі щонайменше один В-клітинний епітоп APP і/або Аβ і щонайменше один чужорідний Т-хелперний епітоп (Т_h-епітоп), так що імунізація тварини даним аналогом викликає продукцію антитіл проти аналогів APP або Аβ тварини, де аналог

а) являє собою поліамінокислоту, що складається щонайменше з однієї копії підпоследовності залишків 672-714 в SEQ ID NO:2, де чужорідний Т_h-епітоп вводять за допомогою додавання і/або вставки, і/або делеції, і/або заміни амінокислот, де підпоследовність вибрана з групи, що складається із залишків 1-42, залишків 1-40, залишків 1-39, залишків 1-35, залишків 1-34, залишків 1-28, залишків 1-12, залишків 1-5, залишків 13-28, залишків 13-35, залишків 17-28, залишків 25-35, залишків 35-40, залишків 36-42 і залишків 35-42 амінокислотної последовності, що складається з амінокислотних залишків 673-714 SEQ ID NO:2; і/або

б) являє собою поліамінокислоту, що містить чужорідний Т_h-епітоп і розірвану последовність APP або Аβ, так, що аналог не містить жодної підпоследовності SEQ ID NO:2, яка продуктивно зв'я-

зується з молекулами МНС класу II, ініціюючи Т-клітинну відповідь; і/або

с) являє собою поліамінокислоту, що включає в себе чужорідний Т_H-епітоп і одержані з APP або Aβ амінокислоти, і включає в себе 1 єдиний залишок метіоніну, розташований на С-кінці аналога, причому інші залишки метіоніну в APP або Aβ і в чужорідному Т_H-епітопі заміщені або видалені і переважно заміщені лейцином або ізолейцином; і/або

д) являє собою кон'югат, що включає в себе полігідроксиполімерний кістяк, до якого окремо приєднана поліамінокислота, як визначено в а), і/або поліамінокислота, як визначено у b), і/або поліамінокислота, як визначено у c); і/або

е) являє собою кон'югат, що включає в себе полігідроксиполімерний кістяк, до якого окремо приєднані 1) чужорідний Т_H-епітоп і 2) поліамінокислота, вибрана з групи, що складається з підпоследовностей, як визначено в а), розірваної послідовності APP або Aβ, як визначено в b), і одержану з APP або Aβ амінокислотну послідовність, що включає в себе 1 єдиний залишок метіоніну, розташований на С-кінці, причому інші залишки метіоніну в APP або Aβ і в чужорідному Т_H-епітопі заміщені або видалені і переважно заміщені лейцином або ізолейцином.

Правонаступником даного винаходу раніше була подана міжнародна патентна заявка, що відноситься до безпечних стратегій вакцинації проти амілоїдогенних пептидів, таких як APP або Aβ, пор. [WO 01/62284]. Дана заявка не була опублікована на момент дати подачі даної заявки і, крім того, не містить деталей, що відносяться до вказаних вище придатних аналогів APP і Aβ.

Винахід також відноситься до аналогів APP і Aβ, також як до фрагментів нуклеїнових кислот, що кодують їх підмножину. Також винахід відноситься до імуногенних композицій, що включають в себе аналоги або фрагменти нуклеїнових кислот.

Фігура 1: Схематичне зображення варіантів Autovac, що дістали з білка-попередника амілоїду з метою виклику відповідей за допомогою антитіл проти білка Aβ Aβ-43 (або C-100). APP схематично показаний вгорі фігури, а схематичні конструкції, що залишилися, показують, що модельні епітопи P2 і P30 заміщають різні укорочені продукти APP або вставлені в них. На Фігурі чорний блок означає сигнальну послідовність APP, коса штриховка у двох напрямках означає екстрацелюлярну ділянку APP, темна вертикальна штриховка відповідає трансмембранному домену APP, світла вертикальна штриховка відповідає внутрішньоклітинному домену APP, жирна коса штриховка означає епітоп P30 і тонка коса штриховка означає епітоп P2. Рамка з суцільних ліній означає Aβ-42/43, а рамка з суцільних ліній разом з рамкою з пунктирних ліній означають C-100. «Aβeta» означає Aβ.

Фігура 2: Схематичне зображення здійснення синтезу імуногенних кон'югатів, що застосовуються у більшості випадків. Синтезують і змішують пептид А (будь-яка антигенна послідовність, наприклад, послідовність Aβ, описана тут) і пептид В (амінокислотна послідовність, що включає в себе Т-хелперний епітоп). Після того, як вони приходять

у контакт з відповідним активованим полігідроксиполімером, пептиди А і В приєднуються за допомогою активної групи у співвідношенні, що відповідає вихідному співвідношенню між даними двома речовинами у суміші пептидів. Для подробиць див. приклад 4.

Визначення

Далі буде визначений і детально пояснений ряд термінів, що застосовуються у даному описі і формують винаходу, для пояснення меж винаходу.

Терміни "амілоїд" і "амілоїдний білок", що застосовуються тут, є взаємозамінними і означають клас білкових нерозгалужених фібрил невизначеної довжини. Фібрили амілоїду виявляють здатність до забарвлення конго червоним і мають складчасту β-структуру, в якій поліпептидні ланцюги організовані у β-шари. Амілоїд, як правило, походить з амілоїдогенних білків, які володіють структурами попередників, що сильно відрізняються, але всі з яких можуть зазнавати структурної конверсії в аномально укладену форму, що являє собою будівельний блок протофіламенту спіралі β-шару. Звичайно діаметр фібрил амілоїду змінюється приблизно від 70 до 120Å.

Термін «амілоїдогенний білок» призначений для позначення поліпептиду, який залучений до утворення відкладень амілоїду, або, по суті, є частиною відкладень або є частиною біосинтетичного шляху, що приводить до утворення відкладень. Отже, прикладами амілоїдогенних білків є APP і Aβ, але амілоїдогенними білками також можуть вважатися і білки, залучені до їх метаболізму.

«Амілоїдний поліпептид» тут призначений для позначення поліпептидів, що включають в себе амінокислотну послідовність амілоїдогенних білків, які обговорюються вище, що походять від людини або інших ссавців (або їх укорочені варіанти, що розділяють з інтактним амілоїдогенним білком істотну кількість В-клітинних епітопів), отже, амілоїдогенний поліпептид може, наприклад, включати в себе істотну ділянку попередника амілоїдогенного поліпептиду (у випадку Aβ один з можливих амілоїдних поліпептидів може походити з APP). Також даний термін включає в себе неглікозильовані форми амілоїдогенних поліпептидів, що одержують у прокаріотичних системах, а також форми з різними профілями глікозилювання через застосування, наприклад, дріжджів або інших еукаріотичних систем, що експресують, які не належать до ссавців. Однак необхідно зазначити, що, коли застосовують термін "амілоїдогенний поліпептид", це означає, що поліпептид, який розглядається, при презентації тваринам, що піддаються впливу, звичайно є неімуногенним. Іншими словами, амілоїдогенний поліпептид являє собою власний білок або аналог такого власного білка, який звичайно не дає початку імунній відповіді проти амілоїдогенного білка тварини, що розглядається.

«Аналог» являє собою молекулу, одержану з APP або Aβ, що містить одну або декілька змін у своїй молекулярній структурі. Таку зміну, наприклад, можна здійснити при злитті поліамінокислот APP або Aβ з відповідним для злиття партнером (тобто зміна у первинній структурі, яка виключно включає в себе С-і/або N-кінцеві додавання амінокислотних залишків) і/або можна здійснювати у

вигляді вставок і/або делецій і/або заміни амінокислотної послідовності поліпептиду. Також у термін включені дериватизовані молекули, одержані з APP або Аβ, пор. обговорення модифікацій APP або Аβ нижче. У деяких випадках аналог можна сконструювати з тим, щоб зменшити або навіть виключити здатність спричиняти появу антитіл проти нормального білка(ів)-попередника(ів) амілоїду, таким чином уникаючи небажаної взаємодії з (фізіологічно нормальною) неагрегованою формою поліпептиду, що є попередником амілоїдного білка.

Необхідно зазначити, що, як припускається, застосування як вакцини для людини чужорідного аналога (наприклад, собачого або свинячого аналога) APP або Аβ людини створить бажаний імунітет проти APP або Аβ. Таке застосування чужорідного аналога також розглядається як частина винаходу.

Термін «поліпептид» у даному контексті призначений для позначення і коротких пептидів від 2 до 10 амінокислотних залишків, і олігопептидів від 11 до 100 амінокислотних залишків, і поліпептидів з більш ніж 100 амінокислотних залишків. Більш того, також припускається, що даний термін охоплює білки, тобто функціональні біологічні молекули, які включають в себе щонайменше один поліпептид; коли такі біологічні молекули містять щонайменше два поліпептиди, останні можуть формувати комплекси, бути ковалентно зв'язаними або можуть бути зв'язаними нековалентно. Поліпептид(и) у білку можуть бути глікозильованими і/або ліпоїльованими, і/або включати в себе простетичні групи. Термін «поліамінокислота» також еквівалентний терміну «поліпептид».

Терміни «Т-лімфоцит» і «Т-клітина» застосовують поперемінно для лімфоцитів, що походять з тимуса, які відповідають за різні види імунної відповіді, опосередкованої клітинами, а також за хелперну активність у гуморальній імунній відповіді. Подібним чином терміни «В-лімфоцит» і «В-клітина» застосовують поперемінно для лімфоцитів, які продукують антитіла.

Термін «підпослідовність» означає будь-який безперервний відрізок щонайменше з 3 амінокислот або, коли доречно щонайменше з 3 нуклеотидів, безпосередньо одержаної з природних амінокислотної послідовності або послідовності нуклеїнових кислот амілоїду, відповідно.

Термін «тварина» у даному контексті, як правило, призначений для позначення виду тварини (переважно ссавця), такої як *Homo sapiens*, *Canis domesticus* і т.п., а не тільки однієї-єдиної тварини. Однак цей термін також означає популяцію такого виду тварин, оскільки важливо, щоб всі індивіди, імунізовані способом відповідно до даного винаходу, володіли по суті однаковими APP або Аβ, якщо брати до уваги імунізацію тварин одним і тим же імуногенним(и) засобом(ами). Фахівцям зрозуміло, що тварина у даному контексті являє собою живу істоту з імунною системою. Переважно, щоб тварина була хребетною, такою як ссавець.

Під терміном «знижувальна регуляція APP або Аβ in vivo» тут мають на увазі зменшення у живому організмі загальної кількості накопиченого амілоїдного білка (або амілоїду як такого) відповідного

типу. Знижувальну регуляцію можна одержати за допомогою декількох механізмів, з яких проста взаємодія з амілоїдом за допомогою зв'язування антитіл, так, щоб запобігти аномальній агрегації, являє собою найбільш простий. Однак в об'єм даного винаходу також входить те, що зв'язування антитіл приводить до видалення амілоїду поглинаючими клітинами (такими як макрофаги та інші клітини, що фагоцитують), і що антитіла взаємодіють з іншими амілоїдогенними поліпептидами, які приводять до утворення амілоїду. Додатковою можливістю є те, що антитіла зв'язують Аβ поза ЦНС, таким чином видаляючи Аβ з ЦНС за допомогою простого принципу дії мас.

Вираз «ефективна презентація ... імунній системі» призначений для позначення того, що імунна система тварин у контрольованому режимі зазнає імуногенної провокації імунної відповіді. Як стане зрозуміло з опису нижче, таку провокацію відповіді імунної системи можна провести рядом способів, найбільш важливі з яких являють собою вакцинацію поліпептидом, що містить «фармацини» (тобто вакцину, яку вводять для лікування поточної хвороби або поліпшення стану при цій хворобі) або вакцинацію нуклеїновою кислотою, що містить «фармацини». Важливим результатом для досягнення є те, щоб імунокомпетентні клітини тварини протистояли антигену імунологічно ефективним способом, тоді як точний спосіб досягнення такого результату є менш важливим для ідеї відповідно до винаходу, що лежить в основі даного винаходу.

Термін «імуногенно ефективна кількість» має значення, звичайно прийняте у даній області, тобто він означає кількість імуногена, якої досить для індукції імунної відповіді, що значимо охоплює патогенні речовини, які розділяють загальні імунологічні властивості з імуногеном.

Коли кажуть, що APP або Аβ «модифіковані», тут це означає, що проводили хімічну модифікацію поліпептиду APP або Аβ. Така модифікація може являти собою одержання похідних (наприклад, алкілювання) визначених амінокислотних залишків у послідовності, але як можна буде зрозуміти з опису нижче, переважні модифікації включають в себе зміни первинної структури амінокислотної послідовності.

Коли обговорюють «ауто толерантність до APP або Аβ», зрозуміло, що оскільки поліпептид являє собою власний білок популяції, що підлягає вакцинації, у звичайних індивідів у популяції не виникає імунної відповіді проти поліпептиду; однак це не можна виключити, оскільки індивіди, що рідко зустрічаються у популяції тварин, можуть бути здатні продукувати антитіла до нативного поліпептиду, наприклад, як частина аутоімунного розладу. Принаймні, тварина звичайно ауто толерантна тільки до свого власного APP або Аβ, однак не можна виключати, що дана тварина також буде толерантною до аналогів, одержаних від іншого виду тварин або з популяції з іншим фенотипом.

«Чужорідний Т-клітинний епітоп» (або: «Чужорідний Т-лімфоцитарний епітоп») являє собою пептид, що здатний зв'язуватися з молекулою МНС і стимулює Т-клітини у виді тварин. Переважні чужорідні Т-клітинні епітопи являють собою «змішані» епітопи, тобто епітопи, що зв'язуються

основною частиною молекул МНС конкретного класу у виду тварин або популяції. Відома тільки дуже обмежена кількість таких змішаних Т-клітинних епітопів, і вони детально обговорюються нижче. Змішані Т-клітинні епітопи також позначають як "універсальні" Т-клітинні епітопи. Необхідно зазначити, що для імуногенів, які застосовуються відповідно до даного винаходу, щоб бути ефективними якомога в більшій частині популяції тварин, можуть бути необхідні 1) вставка декількох чужорідних Т-клітинних епітопів в один і той же аналог або 2) одержання декількох аналогів, де кожний з аналогів володіє різним вставленим змішаним епітопом. Необхідно також зазначити, що ідея про чужорідні Т-клітинні епітопи також включає в себе застосування прихованих Т-клітинних епітопів, тобто епітопів, що одержані з власних білків і викликають імунологічну реакцію тільки тоді, коли вони існують в ізольованій формі, не будучи частиною власного білка, що розглядається.

«Чужорідний Т-хелперний лімфоцитарний епітоп» (чужорідний Т_h-епітоп) являє собою чужорідний Т-клітинний епітоп, який зв'язується з молекулою МНС класу II і який може бути представлений на поверхні клітини (АРС), що презентує епітоп, у зв'язаному з молекулою МНС класу II виді.

«Функціональна ділянка» (біологічної) молекули у даному контексті означає ділянку молекули, яка відповідає щонайменше за один з біохімічних або фізіологічних ефектів, що викликаються молекулою. У даній області добре відомо, що багато ферментів та інших ефекторних молекул володіють активною ділянкою, що відповідає за ефекти, які викликаються молекулою, що розглядається. Інші ділянки молекули можуть служити для цілей стабілізації або поліпшення розчинності, і тому їх можна видалити, якщо дані цілі не мають значення у контексті визначеного здійснення даного винаходу. Наприклад, в АРР або Аβ можливим є застосування визначених цитокінів як груп, що модифікують (пор. докладну дискусію нижче), і в такому випадку проблема стабільності може бути несуттєвою, оскільки зв'язування з АРР або Аβ може забезпечувати необхідну стабільність.

Термін «ад'ювант» має те ж значення, яке є загальноприйнятим в області технології вакцин, тобто речовина або композиція речовин, яка 1) не здатна самостійно викликати специфічну імунну відповідь проти імуногена вакцини, але яка, 2) проте, здатна посилити імунну відповідь проти імуногена. Або, іншими словами, вакцинація одним ад'ювантом не забезпечує імунну відповідь проти імуногена, вакцинація імуногеном може або не може дати початок імунній відповіді проти імуногена, але комбінована вакцинація імуногеном і ад'ювантом викликає імунну відповідь на імуноген, яка є більш сильною, ніж викликана одним імуногеном.

«Позиціонування або націлювання» молекули у даному контексті призначене для позначення ситуації, коли молекула при введенні тварині переважно з'являється у визначеній(их) тканині(ях) або переважно асоційована з визначеними клітинами або клітинними типами. Ефекту можна досягти рядом способів, включаючи формування молекули у композицію, що полегшує позиціонування,

або введення у молекулу груп, які полегшують позиціонування. Дані проблеми детально обговорюються нижче.

"Стимуляція імунної системи" означає, що речовина або композиція речовин виявляє спільний, неспецифічний імуностимулювальний ефект. Ряд ад'ювантів і передбачувані ад'юванти (такі як визначені цитокіни) володіють здатністю стимулювати імунну систему. Результат застосування імуностимулювальних засобів являє собою підвищену «готовність» імунної системи, що означає, що спільна або подальша імунізація імуногеном викликає значно більш ефективну імунну відповідь у порівнянні з окремим застосуванням імуногена.

«Продуктивне зв'язування» означає зв'язування пептиду з молекулою МНС (класу I або II), щоб було можливо стимулювати Т-клітини, які зв'язуються з клітинами, які презентують пептид, зв'язаний з молекулою МНС. Наприклад, пептид, зв'язаний з молекулою МНС класу II на поверхні АРС, є продуктивно зв'язаним, якщо дана АРС стимулює Т_h-клітини, що зв'язуються з комплексом презентованій пептид-МНС класу II.

Переважні здійснення знижувальної регуляції амілоїду Переважно, щоб аналог, який застосовується як імуноген у способі відповідно до винаходу, являв собою модифіковану молекулу АРР або Аβ, де присутня щонайменше одна зміна в амінокислотній послідовності АРР або Аβ, оскільки у цьому випадку шанси одержання дуже значного порушення ауто толерантності сильно полегшені, що очевидно, наприклад, з результатів, представлених тут у прикладі 2, де імунізацію диким типом Аβ порівнюють з імунізацією варіантного молекулою Аβ. Показано [y Dalum I et al., 1996, J. Immunol. 157: 4796-4804], що потенційно аутоімунні В-лімфоцити, які розпізнають власні білки, фізіологічно присутні у нормальних індивідів. Однак для індукції цих В-лімфоцитів для фактичної продукції антитіл, що реагують з відповідними власними білками, необхідне сприяння Т-хелперних лімфоцитів (Т_h-клітини, або Т_h-лімфоцити), що продукують цитокіни. Звичайно така допомога не забезпечується, оскільки Т-лімфоцити, як правило, не розпізнають Т-клітинні епітопи, одержані з власних білків, коли вони представлені клітинами (АРС), що презентують антиген. Однак якщо забезпечити елемент "чужорідності" у власному білку (тобто ввести імунологічно значиму модифікацію), Т-клітини, які розпізнають чужорідний елемент, активуються при розпізнаванні чужорідного епітопу на АРС (передусім, такий, як моноклеарна клітина). Поліклональні В-лімфоцити (що також є АРС), здатні до розпізнавання власних епітопів на модифікованих власних білках, також інтерналізують антиген і згодом представляють чужорідний(і) Т-епітоп(и) з нього, а активовані Т-лімфоцити таким аутоімунним поліклональним В-лімфоцитам згодом забезпечують допомогу цитокінами. Оскільки антитіла, що продукуються даними поліклональними В-лімфоцитами, реагують з різними епітопами на модифікованому поліпептиді, включаючи ті, які також представлені на нативному поліпептиді, індукується антитіло, що перхресно реагує з немодифікованим власним білком. На закінчення, Т-лімфоцити можуть бути приведе-

ні в дію так, як якби популяція поліклональних В-лімфоцитів розпізнавала б повністю чужорідний антиген, тоді як фактично тільки вбудований(і) епітоп(и) є чужорідним(и) для хазяїна. Таким чином, індукуються антитіла, здатні до перехресної реакції з немодифікованими власними антигенами.

У даній області відомо декілька шляхів модифікації власного антигену пептиду для досягнення порушення ауто толерантності. Але все-таки переважно, щоб аналог відповідно до даного винаходу включав в себе

- щонайменше одну першу введену групу, яка націлює модифіковану молекулу на клітину (APC), що презентує антиген, і/або

- щонайменше одну другу введену групу, яка стимулює імунну систему, і/або

- щонайменше одну третю введену групу, яка оптимізує представлення аналога імунній системі.

Однак всі ці модифікації потрібно проводити поки в APP або Aβ зберігається істотна частина вихідних В-клітинних епітопів, оскільки розпізнавання В-лімфоцитами нативної молекули таким чином посилюється.

В одному з переважних здійснень ковалентно або нековалентно введені бічні групи (у вигляді чужорідних Т-клітинних епітопів або вказаних вище першої, другої і третьої груп). Це означає, що відгалуження з амінокислотних залишків, одержані з APP або Aβ, дериватизовані без зміни первинної амінокислотної послідовності або щонайменше без внесення змін у пептидних зв'язках між індивідуальними амінокислотами у ланцюгу.

В альтернативному і переважному здійсненні застосовують амінокислотну заміну і/або делецію, і/або вставку, і/або додавання (які можна провести за допомогою рекомбінантних способів або за допомогою пептидного синтезу; модифікації, що включають в себе більш довгі ділянки з амінокислот, можуть приводити до утворення гібридних поліпептидів). Одну з особливо переважних версій даного здійснення являє собою технологія, описана у [WO 95/05849], де описаний спосіб знижувальної регуляції власних білків шляхом імунізації аналогами власних білків, де ділянка амінокислотної послідовності (ряд послідовностей) замінена відповідною ділянкою амінокислотної послідовності(ей), кожна з яких містить чужорідний імунодомінантний Т-клітинний епітоп, тоді як одночасно в аналогу зберігається повна третинна структура власного білка. Однак для цілей даного винаходу істотно, якщо модифікація (чи то вона є вставкою, додаванням, делецією або заміною) приводить до утворення чужорідного Т-клітинного епітопу і одночасно зберігає значну кількість В-клітинних епітопів в APP або Aβ. Однак для одержання максимальної ефективності в індукції імунної відповіді переважно, щоб у модифікованій молекулі зберігалася повна третинна структура APP або Aβ.

У деяких випадках переважно, щоб APP або Aβ, або їх фрагменти були мутантними. Особливо переважними є варіанти заміни, де метіонін у положенні 35 в Aβ-43 заміщений, переважно лізином або ізолейцином або просто делетований. Особливо переважні аналоги містять один-єдиний метіонін, розташований на С-кінці, або тому, що він зустрічається в амілоїдогенному поліпептиді або

чужорідному Т_H-епітопі від природи, або тому, що його туди вставили або додали. Отже, також переважно, щоб ділянка аналога, яка включає Т_H-епітоп, також не містила метіоніну, виключаючи можливе С-кінцеве розташування метіоніну.

Основна причина для видалення всіх метіонінів, крім одного, полягає у тому, що стає можливим рекомбінантно одержувати полімерні аналоги, які можна послідовно відщеплювати бромціаном з виходом окремого аналога. Перевага полягає у тому, що рекомбінантна продукція полегшує даний шлях.

Фактично, як правило, переважно, щоб всі аналоги APP або Aβ, які застосовуються відповідно до даного винаходу, володіли характерною рисою простого включення в себе одного-єдиного метіоніну, розташованого в аналогу як С-кінцева амінокислота, і щоб всі інші метіоніни або в амілоїдогенному поліпептиді, або у чужорідному Т_H-епітопі були видалені або заміщені іншою амінокислотою.

Додаткова цікава мутація являє собою делецію або заміщення фенілаланіну у положенні 19 Aβ-43, а особливо переважно, щоб мутація являла собою заміну фенілаланінового залишку на пролін.

Інші цікаві поліамінокислоти для застосування в аналогах являють собою укорочені частини білка Aβ-43. Їх можна застосовувати в імуногенних аналогах відповідно до даного винаходу. Особливо переважними є укорочені частини Aβ (1-42), Aβ (1-40), Aβ (1-39), Aβ (1-35), Aβ (1-34), Aβ (1-28), Aβ (1-12), A (1-5), Aβ (13-28), Aβ (13-35), Aβ (17-28), Aβ (25-35), Aβ (35-40), Aβ (36-42) і Aβ (35-42) (де числа у дужках означають відрізки амінокислот Aβ - 43, які складають відповідний фрагмент: наприклад, Aβ (35-40) ідентичний амінокислотам 706-711 в SEQ ID NO:2). Всі ці варіанти з укороченими частинами Aβ-43 можна одержати з описаними тут фрагментами Aβ, конкретно з варіантами 9, 10, 11, 12, і 13, вказаними у прикладі 1.

Наступна формула описує молекулярні конструкції, що відносяться до винаходу:

$$(\text{MOD}_1)_{s1}(\text{амілоїд}_{e1})_{n1}(\text{MOD}_2)_{s2}(\text{амілоїд}_{e2})_{n2} \dots (\text{MOD}_x)_{sx}(\text{амілоїд}_{ex})_{nx} \quad (I)$$

де амілоїд_{e1} - амілоїд_{ex} являють собою х В-клітинний епітоп, що містить підпослідовності APP або Aβ, які незалежно є ідентичними або неідентичними, і які можуть містити чужорідні бічні групи, х являє собою число ≥ 3 , n1-nx являють собою х чисел ≥ 0 (щонайменше, одне ≥ 1), MOD₁-MOD_x являють собою х модифікацій, внесених між представленими В-клітинними епітопами, і s1-sx являють собою х чисел ≥ 0 (щонайменше одне ≥ 1 , якщо у послідовності амілоїд_{ex} не внесена жодна бічна група). Таким чином, враховуючи загальні функціональні обмеження на імуногенність конструкції, винахід допускає всі види перестановок оригінальної послідовності APP або Aβ і всі види модифікацій у ній. Таким чином, у винахід включені модифікований APP або Aβ, одержані за допомогою пропускання частин послідовності, які, наприклад, виявляють in vivo несприятливі ефекти, або пропускання частин, які звичайно є внутрішньоклітин-

ними і, таким чином, можуть дати початок небажаним імунологічним реакціям.

Одна переважна версія конструкцій, окреслених вище, коли застосовна, являє собою конструкції, де підпослідовність, що містить В-клітинний епітоп амілоїдного білка, не експонована екстрацелюлярно у попередньому поліпептиді, з якого одержаний амілоїд. Такий вибір епітопів служить гарантією того, що не утворюються антитіла, які могли б реагувати з клітинами, що продукують попередник, і отже, імунна відповідь, що виробляється, стає обмеженою направленою імунною відповіддю проти небажаних накопичень амілоїду. Наприклад, у цьому випадку можна індукувати імунітет проти епітопів APP або A β , експонованих в екстрацелюлярну фазу, тільки коли вони вільні від будь-якого зв'язку з клітинами, що їх продукують.

Збереження істотної частини В-клітинних епітопів або навіть всієї третинної структури білка, що піддається модифікації, як тут бажано, можна досягти декількома шляхами. Один з них являє собою просте одержання поліклональної антисироватки, направленої проти поліпептиду, що розглядається (наприклад, антисироватка, одержана від кролика), і застосування даної антисироватки згодом як тестового реагенту (наприклад, конкурентної ELISA) проти одержаних модифікованих білків. Модифіковані версії (аналоги), які реагують з антисироваткою у тому ж об'ємі, що і APP або A β необхідно розглядати як такі, що володіють повністю однаковою третинною структурою, що і APP або A β , тоді як аналоги, які виявляють обмежену (але все ще значну і специфічну) реактивність з такою антисироваткою розглядають як такі, що зберегли істотну частину вихідних В-клітинних епітопів.

Альтернативно, можна провести відбір моноклональних антитіл, що реагують з різними епітопами на APP або A β , і використати їх як тестову панель. Даний підхід має перевагу, що дозволяє 1) картування епітопів APP або A β і 2) картування епітопів, збережених в одержаних аналогах.

Звичайно, у третьому наближенні слід би визначити 3-вимірну структуру APP або A β , або їх біологічно активного укороченого продукту (пор. вище) і порівняти їх з визначеною тривимірною структурою одержаних аналогів. Тривимірну структуру можна розрізнити за допомогою вивчення дифракції рентгенівських променів і ЯМР-спектроскопії. Додаткову інформацію відносно третинної структури до деякої міри можна одержати при вивченні циркулярного дихроїзму, який має ту перевагу, що єдино необхідним для одержання корисної інформації про третинну структуру даної молекули є очищений поліпептид (тоді як при дифракції рентгенівських променів необхідно забезпечити кристалізований поліпептид, а для ЯМР необхідно забезпечити ізотопні варіанти поліпептиду). Однак зрештою дифракція рентгенівських променів і ЯМР необхідні для одержання переконливих даних, оскільки циркулярний дихроїзм може надати тільки непрямі докази коректності 3-вимірної структури за допомогою інформації про елементи вторинної структури.

В одному з переважних здійснень винаходу застосовують множинні представлення В-

лімфоцитарних епітопів APP або A β (наприклад, формула I, де щонайменше один В-клітинний епітоп представлений у двох положеннях). Даного ефекту можна досягти різними шляхами, наприклад, шляхом простого одержання гібридних поліпептидів, що містять структуру (одержаний з APP або A β поліпептид)_m, де m являє собою число ≥ 2 , і потім ввести модифікації, які обговорюються тут, щонайменше в одну з послідовностей APP або A β . Переважно, щоб модифікації, які вводяться, включали в себе щонайменше одну дуплікацію епітопу В-лімфоциту і/або введення гаптену. Дані здійснення, включаючи множинні представлення вибраних епітопів, особливо переважні у ситуаціях, де як компоненти засобів для вакцин придатні просто невеликі частини APP або A β .

Як вказано вище, введення чужорідного Т-клітинного епітопу можна досягти щонайменше вставкою, додаванням, делецією або заміною однієї амінокислоти. Зрозуміло, у звичайній ситуації відбувається введення більш ніж однієї зміни в амінокислотну послідовність (наприклад, вставка або заміна цілого Т-клітинного епітопу), але важливою метою для досягнення є те, що аналог при процесуванні клітиною (APC), яка представляє антиген, дасть початок такому чужорідному імунодомінантному Т-клітинному епітопу, представленому у зв'язку з молекулою МНС класу II на поверхні APC. Таким чином, якщо амінокислотна послідовність APP або A β у відповідних положеннях містить ряд амінокислотних залишків, які можна виявити у чужорідному Т_H-епітопі, тоді введення чужорідного Т_H-епітопу може бути досягнуте шляхом забезпечення амінокислот, що залишилися, чужорідного епітопу за допомогою вставки, додавання, делеції або заміни амінокислот. Іншими словами, введення повного Т_H-епітопу за допомогою вставки або заміни для задоволення цілей даного винаходу не є необхідним.

Переважно, щоб число вставок, делецій, замін або додавань амінокислот являло собою щонайменше 2, наприклад, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, і 25 вставок, замін, додавань або делецій. Крім того, переважно, щоб число вставок, замін, додавань або делецій амінокислот не перевищувало 150, наприклад, не більше 100, не більше 90, не більше 80 і не більше 70. Особливо переважно, щоб число замін, вставок, делецій або додавань не перевищувало 60, і зокрема, дане число не повинно перевищувати 50 або навіть 40. Найбільш переважно число не перевершує 30. По відношенню до додавань амінокислот необхідно відмітити, що коли одержувана конструкція знаходиться у формі гібридного поліпептиду, їх часто значно більше ніж 150.

Переважні здійснення даного винаходу включають в себе модифікацію за допомогою введення щонайменше одного чужорідного імунодомінантного Т-клітинного епітопу. Необхідно зрозуміти, що питання про імунодомінантність Т-клітинного епітопу залежить від виду тварини, що розглядається. Тут термін "імунодомінування" буквально відноситься до епітопів, які у вакцинованих індивідів/популяції дають початок значній імунній відповіді, але добре відомим фактом є те, що Т-клітинний епітоп, який є імунодомінантним у одно-

го індивіда/популяції, не обов'язково є імунодомінантним у іншого індивіда того ж виду, навіть незважаючи на те, що він здатний до зв'язування з молекулами МНС-II у останнього індивіда. Звідси для цілей даного винаходу імунодомінантний Т-клітинний епітоп являє собою Т-клітинний епітоп, який, коли представлений в антигені, ефективно забезпечить допомогу Т-клітин. Звичайно імунодомінантні Т-клітинні епітопи володіють такою природною здатністю, що вони по суті завжди представлені зв'язаними з молекулами МНС класу II, незалежно від поліпептиду, в якому вони знаходяться.

Іншим важливим питанням є проблема рестрикції МНС Т-клітинних епітопів. Як правило, природні Т-клітинні епітопи рестриційовані по МНС, тобто визначені пептиди, що складають Т-клітинний епітоп, будуть ефективно зв'язуватися тільки з підмножиною молекул МНС класу II. Це, у свою чергу, має той ефект, що у більшості випадків застосування одного специфічного Т-клітинного епітопу приведе до компонента вакцини, ефективного тільки для частини популяції, і, в залежності від розміру цієї частини, може виявитися необхідним включати більше Т-клітинних епітопів в одну і ту ж молекулу або, альтернативно, готувати багатоконпонентну вакцину, де компоненти являють собою варіанти APP або Aβ, відмінні один від одного природою введеного Т-клітинного епітопу.

Якщо МНС-рестрикція Т-клітин, що застосовуються, невідома (наприклад, у ситуації, коли тварина, що вакцинується, володіє погано визначеним складом МНС), частину популяції, що охоплюється конкретною композицією вакцини, можна апроксимувати за допомогою наступної формули:

$$f_{\text{попул.}} = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - p_i) \quad (\text{II})$$

де p_i являє собою частоту реагуючих у популяції на i -ий чужорідний Т-клітинний епітоп, представлений у композиції вакцини, а n являє собою загальне число чужорідних Т-клітинних епітетів. Таким чином, композиція вакцини, що містить 3 чужорідних Т-клітинних епітопи, які володіють частотами відповіді у популяції у розмірі 0,8, 0,7 і 0,6, відповідно, повинна дати

$$1 - 0,2 \times 0,3 \times 0,4 = 0,976,$$

тобто у 97,6 процентів популяції статистично буде підвищуватися опосередкована МНС-II відповідь на вакцину.

Формулу вище не застосовують у ситуаціях, де більш або менш точно відомий профіль МНС-рестрикції пептидів, що застосовуються. Якщо, наприклад, визначений пептид зв'язується тільки з молекулами МНС-II людини, що кодуються алелями DR1, DR3, DR5 і DR7 HLA-DR, тоді застосування даного пептиду разом з іншим пептидом, що зв'язується з молекулами МНС-II, що залишилися, які кодуються алелями HLA-DR, завершить 100% охоплення у популяції, що розглядається. Подібним чином, якщо другий пептид зв'язується тільки з DR3 і DR5, додавання даного пептиду абсолютно не збільшить охоплення. Якщо базувати розраху-

нок відповіді популяції тільки на МНС-рестрикції Т-клітинних епітопів у вакцині, мінімальну частину популяції, що охоплюється конкретною композицією вакцини, можна визначити за допомогою наступної формули:

$$f_{\text{попул.}} = 1 - \prod_{j=1}^3 (1 - \varphi_j)^2 \quad (\text{III})$$

де φ_j являє собою суму частот алельних гаплотипів, що кодуються молекулами МНС, які зв'язують будь-який з Т-клітинних епітопів у вакцині і належать j -ому з 3 відомих локусів HLA (DP, DR і DQ) у популяції; на практиці спочатку визначають, які молекули МНС розпізнають кожний Т-клітинний епітоп у вакцині, а потім їх сортують за типом (DP, DR і DQ); далі для кожного типу підсумовують індивідуальні частоти різних відсортованих алельних гаплотипів, таким чином, одержуючи (φ_1 , φ_2 і φ_3).

Може трапитися, що значення p_i у формулі II перевищить відповідне теоретичному значенню π_i

$$\pi_i = 1 - \prod_{j=1}^3 (1 - v_j)^2 \quad (\text{IV})$$

де v_j являє собою суму частот алельного гаплотипу, що кодується молекулами МНС, які зв'язують i -ий Т-клітинний епітоп у вакцині і належать j -ому з 3 відомих локусів HLA (DP, DR і DQ) у популяції. Це означає, що в $1 - \pi_i$ популяції частота відповідаючих складає $f_{\text{залишкова}_i} = (p_i - \pi_i) / (1 - \pi_i)$. Таким чином, формулу III можна перетворити так, щоб одержати формулу V:

$$f_{\text{попул.}} = 1 - \prod_{j=1}^3 (1 - \varphi_j)^2 + \left(1 - \prod_{j=1}^3 (1 - f_{\text{залишкова}_i}) \right) \quad (\text{V})$$

де член $f_{\text{залишкова}_i}$ встановлюють в нуль, якщо він є негативним. Необхідно зазначити, що формула V вимагає, щоб все епітопи були картованими за ідентичними наборами гаплотипів.

Отже, при виборі Т-клітинних епітопів для введення в аналог важливо враховувати всю доступну інформацію про епітопи: 1) частоту відповідаючих у популяції на кожний епітоп, 2) дані про МНС-рестрикції і 3) частоту відповідних гаплотипів у популяції.

Існує ряд природних "змішаних" Т-клітинних епітопів, активних у великій частині індивідів виду тварин або популяції тварин, і їх переважно вводять у вакцину, таким чином зменшуючи необхідність великого числа різних аналогів в одній вакцині.

Змішаний епітоп відповідно до винаходу може являти собою природний Т-клітинний епітоп людини, такий як епітопи з анатоксину правця (наприклад, епітопи P2 і P30), анатоксину дифтерії, гемоглітиніну вірусу грипу (HA) і CS-антигену *P. falciparum*.

Протягом декількох років ідентифікували ряд інших змішаних Т-клітинних епітопів. Головним чином ідентифікували пептиди, здатні до зв'язування з великою частиною молекул HLA-DR, що кодуються різними алелями HLA-DR, і вони всі є Т-клітинними епітопами, допустимими для введення в аналог, що застосовуються відповідно до даного винаходу. Пор. також епітопи, що розглядаються у наступних посиланнях, які, таким чином, всі включені сюди за допомогою посилання: [WO 98/23635 (Frazer I.H. et al., переданий The University of Queensland); Southwood S. et al., 1998, J. Immunol. 160: 3363-3373; Sinigaglia F. et al., 1988, Nature 336: 778-780; Chicz R.M. et al., 1993, J. Exp. Med. 178: 27-47; Hammer J. et al., 1993, Cell 74: 197-203; and Falk K. et al., 1994, Immunogenetics 39: 230-242]. Останнє посилання також стосується лігандів HLA-DQ і DP. Всі епітопи, перераховані у даних 5 посиланнях, є придатними як природні епітопи-кандидати для застосування відповідно до даного винаходу як епітопів, що розділяють спільні з ними мотиви.

Альтернативно, епітоп може являти собою будь-який штучний Т-клітинний епітоп, здатний зв'язуватися з великою частиною молекул MHC класу II. У даному контексті пептиди, що являють собою спільні епітопи для всіх DR ("PADRE"), описані у [WO 95/07707 та у відповідній статті Alexander J. et al., 1994, Immunity 1: 751-761 (обидва описи включені сюди за допомогою посилання)], являють собою цікаві кандидати для епітопів для застосування відповідно до даного винаходу. Необхідно зазначити, що найбільш ефективні пептиди PADRE, описані у даних документах, несуть D-амінокислоти на C- і N-кінцях для збільшення стабільності при введенні. Однак у даному винаході головним чином прагнуть до введення відповідних епітопів як частини аналога, який згодом ферментативно руйнується всередині лізосомного компартмента APC, щоб дозволити подальшу презентацію у зв'язку з молекулою MHC-II, і отже, введення D-амінокислот в епітопи, що застосовуються відповідно до винаходу, є недоцільним.

Один з особливо переважних пептидів PADRE являє собою пептид, що має амінокислотну послідовність AKFVAAWTLKAAA (SEQ ID NO:17) або її імунологічно ефективну підпослідовність Даний та інші епітопи, що володіють такою ж відсутністю MHC-рестрикції, являють собою переважні Т-клітинні епітопи, які повинні бути присутніми в аналогах, що застосовуються у способі відповідно до винаходу. Такий понадзмішаний епітоп є припустимим для більшості простих здійснень винаходу, де вакцинованій імунній системі тварини представлений тільки один-єдиний аналог.

Як вказано вище, модифікація APP або A_p може також включати в себе введення першої групи, що націлює модифікований амілоїдогенний поліпептид на APC або В-лімфоцит. Наприклад, перша група може являти собою партнер, що специфічно зв'язується, для специфічного антигену поверхні В-лімфоциту або для специфічного антигену поверхні APC. У даній області відомо багато таких поверхнево-специфічних антигенів. Наприклад, група може являти собою вуглевод, для якого існує рецептор на В-лімфоциті або APC (напри-

клад, манан або маноза). Альтернативно, друга група може являти собою гаптен. Також як першу групу можна застосовувати фрагмент антитіла, що специфічно розпізнає поверхневу молекулу на APC або лімфоцитах (наприклад, поверхнева молекула може являти собою рецептор Fc γ RI макрофагів або моноцитів, такий як Fc γ RI, або, альтернативно, будь-який інший поверхнево-специфічний маркер, такий як CD40 або CTLA-4). Необхідно зазначити, що всі ці приведені для прикладу молекули також можна застосовувати як частину ад'юванта, порівняння нижче.

Як альтернативу або додатково для націлювання аналога на визначений тип клітин для досягнення посиленої імунної відповіді можна збільшити рівень реактивності імунної системи за допомогою включення вказаної вище другої групи, яка стимулює імунну систему. Типові приклади таких других груп являють собою цитокіни і білки теплового шоку або молекули шаперонів, а також їх ефективні частини.

Придатні для застосування відповідно до даного винаходу цитокіни являють собою цитокіни, які будуть також нормально функціонувати у композиції вакцини як ад'юванти, тобто наприклад, інтерферон γ (IFN- γ), інтерлейкін 1 (IL-1), інтерлейкін 2 (IL-2), інтерлейкін 4 (IL-4), інтерлейкін 6 (IL-6), інтерлейкін 12 (IL-12), інтерлейкін 13 (IL-13), інтерлейкін 15 (IL-15) і гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор (GM-CSF); альтернативно, як другої групи може вистачити функціональної частини молекули цитокіну. Що стосується застосування таких цитокінів як засобів для ад'ювантів, порівняйте обговорення нижче.

Придатні відповідно до даного винаходу білки теплового шоку або молекулярні шаперони, що застосовуються як друга група, можуть являти собою HSP70, HSP90, HSC70, GRP94 [також відомий як gp96, пор. Wearsch PA et al. 1998, Biochemistry 37: 5709-19] і CRT (калретикулін).

Альтернативно, друга група може являти собою токсин, такий як лістеріолізін (LLO), ліпід A і термолабільний ентеротоксин. Цікаві можливості також пов'язані з мікобактеріальними похідними, такими як MOP (мурамідпептид), CFA (повний ад'ювант Фрейнду) і складні ефіри трегалози TDM і TDE.

Важливе здійснення даного винаходу являє собою також можливість введення третьої групи, що посилює презентацію аналога імунній системі. У даній області показано декілька прикладів даного принципу. Наприклад, відомо, що якір ліпоїлювання пальмітиновою кислотою у білку OspA у *Borrelia burgdorferi* можна застосовувати так, що надаються поліпептиди, які самі по собі є ад'ювантами [пор., наприклад, WO 96/40718] - здається, що ліпоїльовані білки формують структури, подібні міцелам, з ядром, що складається з частин якірів ліпоїлювання поліпептидів, а частини молекули, що залишилися, які виступають звідти, приводять до множинної презентації антигенних детермінант. Отже, застосування таких подібних підходів, пов'язаних із застосуванням різних якірів ліпоїлювання (наприклад, міристилової групи, фарнезилової групи, гераніл-геранілової групи, GPI-якоря і N-

ацилдигліцеридної групи), являє собою переважні здійснення даного винаходу, оскільки, як правило, забезпечення таких якорів ліпоїлювання в одержаному рекомбінантним способом білку є досить простим і лише потребує у випадку аналога застосування, наприклад, природної сигнальної послідовності як партнера злиття. Інша можливість являє собою застосування фрагмента C3d фактора C3 комплексу або самого фактора C3 [пор. Dempsey et al., 1996, Science 271, 348-350 and Lou & Kohler, 1998, Nature Biotechnology 16, 458-462].

Альтернативне здійснення винаходу, яке також приводить до переважної презентації імунній системі множинних (наприклад, щонайменше 2) копій важливих ділянок APP або A β з епітопами, являє собою ковалентне зв'язування аналога з визначеними молекулами, тобто варіанти d і є, вказані вище. Наприклад, можна застосовувати полімери, наприклад, вуглеводи, такі як декстрин, [пор., наприклад, Lees A et al., 1994, Vaccine 12: 1160-1166; Lees A et al., 1990, J Immunol. 145: 3594-3600], але маноза і манан також являють собою придатні альтернативи. Інтегральні мембранні білки, наприклад, з *E. coli* та інших бактерій, також є придатними для кон'югації партнерами. Традиційні молекули-носії, такі як гемоціанін морського блювця (KLH), анатоксин правця, дифтерійний анатоксин і бичачий сироватковий альбумін (BSA) також є переважними і придатними для кон'югації партнерів.

Переважні здійснення ковалентного зв'язування речовини, одержаної з APP або A β , з полігідроксиполімерами, такими як вуглеводи, включають в себе застосування щонайменше одного пептиду, одержаного з APP або A β , і щонайменше одного чужорідного Т-хелперного епітопу, які роздільно зв'язуються з полігідроксиполімером (тобто чужорідний Т-хелперний епітоп і одержана з APP або A β амінокислотна послідовність не зливаються один з одним, але значною мірою зв'язуються з полігідроксиполімером, який служить як несучий каркас). З іншого боку, найбільш переважним є таке здійснення, коли відповідні ділянки одержаних з APP або A β пептидів, що несуть В-клітинний епітоп, складені за допомогою коротких відрізків пептидів, тому що даний підхід являє собою дуже зручний шлях для досягнення множинної презентації вибраних епітопів у кінцевому імуногені. Однак можна також просто зв'язувати аналоги, вже описані тут, з полігідроксиполімерним кістяком, тобто щоб речовина, одержана з APP або A β , не з'єднувалася з кістяком окремо від чужорідних Т_H-епітопів.

Особливо переважно, щоб зв'язування чужорідного Т-хелперного епітопу і одержаного з APP або A β (полі)пептиду відбувалося за допомогою амідного зв'язку, який можна розщепити пептидазою. Дана стратегія має той ефект, що APC зможуть захоплювати кон'югат і згодом здійснювати презентацію чужорідного Т-клітинного епітопу у зв'язку з МНС класу II.

Одним із шляхів досягнення зв'язування пептидів (і одержаних з APP або A β пептидів, що представляють інтерес, також як і чужорідного епітопу) є активація відповідного полігідроксиполі-

меру трезильними (трифторетилсульфонільними) групами або іншими відповідними активуючими групами, такими як малеїмід, паранітрофенілхлороформ (для активації ОН-груп і формування пептидного зв'язку між пептидом і полігідроксиполімером) і тозил (паратолуолсульфоніл). Наприклад, можна одержати активовані полісахариди, як описано у [WO 00/05316 і US 5874469 (обидва включені сюди за допомогою посилання)] і зв'язати їх з пептидами або поліамінокислотами, одержаними з APP або A β , а також з Т-клітинними епітопами, одержаними за допомогою стандартних способів пептидного синтезу у рідкій або твердій фазі. Одержаний продукт складається з полігідроксиполімерного кістяка (наприклад, декстранового кістяка), який своїми N-кінцями або іншими азотними групами зв'язаний з поліамінокислотами, одержаними з APP або A β і з чужорідних Т-клітинних епітопів. Якщо бажано, можна синтезувати пептиди APP або A β так, щоб захистити всі доступні аміногрупи, крім однієї на N-кінці, згодом зв'язуючи одержані захищені пептиди з трезильованими групами декстрану і, на закінчення, знімаючи захист з одержаного кон'югата. Конкретний приклад такого підходу описаний у прикладах нижче.

Замість застосування водорозчинних молекул полісахариду, як викладено у [WO 00/05316 і US 5874469], в рівній мірі можна застосовувати молекули перехреснозв'язаних полісахаридів, одержуючи, таким чином, корпускулярні кон'югати між поліпептидами і полісахаридами, що, як вважають, веде до поліпшеної презентації поліпептидів імунній системі, оскільки досягаються дві мети, а саме: одержання ефекту локального накопичення при ін'єкції кон'югата і одержання частинок, що є більш привабливими мішенями для APC. Даний підхід з використанням таких систем також детально розглядається у прикладах.

Міркування, що лежать в основі вибору ділянок для введення модифікацій в APP або A β , мають на увазі а) збереження відомих і передбачених В-клітинних епітопів, б) збереження третинної структури, с) уникнення презентації В-клітинних епітопів на "клітинах-продуцентах" і т.п. Принаймні, як обговорювалося вище, скринінг набору аналогів, всі з яких були піддані внесенню Т-клітинного епітопу у різні положення, є досить простим.

Оскільки найбільш переважні здійснення даного винаходу включають в себе знижувальну регуляцію A β людини, отже, переважно, щоб поліпептид APP або A β , що обговорюється вище, являв собою поліпептид A β людини. У даному здійсненні особливо переважно, щоб поліпептиди APP або A β були модифікованими шляхом заміни щонайменше однієї амінокислотної послідовності в SEQ ID NO:2, однією амінокислотною послідовністю з еквівалентною або відмінною довжиною, що містить чужорідний Т_H-епітоп. Переважні приклади модифікованих амілоїдогенних APP і A β схематично показані на Фігурі 1, із застосуванням як прикладів епітопів P2 і P30. Логічне обґрунтування таких конструкцій детально обговорюється у прикладах.

Більш конкретно, амінокислотну послідовність, що містить Т_H, яку вносять в SEQ ID NO:2, можна вносити з будь-якої амінокислоти в SEQ ID NO:2. Тобто внесення можливе після будь-якої з амінокислот у положеннях 1-770, але переважно після будь-якої з амінокислот у положеннях 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713 і 714 в SEQ ID NO:2. Це можна комбінувати з делецією будь-якої або всіх з амінокислот у положеннях 1-671 або будь-якою або всіх з амінокислот у положеннях 715-770. Крім того, при застосуванні способу заміни будь-яку з амінокислот у положеннях 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713 і 714 у SEQ ID NO:2 можна видалити разом з даним внесенням.

Інше здійснення даного винаходу пов'язане з представленням аналогів, що не містять жодної з підпослідовностей SEQ ID NO:2, які продуктивно зв'язуються з молекулами МНС класу II, ініціюючи Т-клітинну відповідь.

Логічне обґрунтування такої стратегії для конструювання імуногена, що залучає імунну систему до індукції, наприклад, імунної відповіді проти Аβ, полягає у наступному: зазначено, що при імунізації численними аутологічними білками, такими як Аβ, складеними з ад'ювантом, які досить сильні для порушення толерантності організму до аутологічних білків, існує небезпека, що у тих же вакцинованих індивідів індуквана імунна відповідь не зможе припинитися просто внаслідок припинення імунізації. Це відбувається тому, що індуквана імунна відповідь у таких індивідів найбільш ймовірно приводить у рух нативний Т_H-епітоп аутологічного білка, а це має той несприятливий ефект, що власний білок вакцинованого індивіда буде здатний функціонувати як імуноген: таким чином, встановиться аутоімунний стан.

У переважних способах, включаючи застосування чужорідних Т_H-епітопів, що є кращими за відомостями авторів даного винаходу, ніколи не спостерігали одержання даного ефекту, оскільки імунна відповідь проти «свого» направляється чужорідним Т_H-епітопом, а автори даного винаходу неодноразово показували, що індуквана імунна відповідь, викликана шляхом застосування переважної технології, дійсно зменшувалася після припинення імунізації. Однак в теорії у небагатьох індивідів може статися так, що імунна відповідь також буде направлятися аутологічним Т_H-епітопом відповідного власного білка, проти якого імунізували, що особливо значимо, коли розглядають власні білки, які є відносно численними, такими як Аβ, тоді як інші терапевтично значимі власні білки присутні в організмі тільки локально або у таких малих кількостях, що "ефект самоімунізації" неможливий. Одним з дуже простих шляхів уникнути цього є, отже, цілкова відмова від включення в імуноген пептидних послідовностей, які можуть служити як Т_H-епітопи (і оскільки пептиди коротше приблизно 9 амінокислот не можуть

служити Т_H-епітопами, використання більш коротких фрагментів є одним з простих і прийнятних підходів). Отже, дане здійснення винаходу також служить для того, щоб переконатися, що імуноген не включає в себе пептидні послідовності цільових APP або Аβ, які можуть служити як "самостимулювальні Т_H-епітопи", включаючи послідовності, які просто містять консервативні заміни у послідовності цільового білка, який інакше може функціонувати як Т_H-епітоп.

Переважні здійснення презентації імунній системі аналогів APP або Аβ включають в себе застосування химерного пептиду, який містить щонайменше один одержаний з APP або Аβ пептид, що продуктивно не зв'язується з молекулами МНС класу II, і щонайменше один чужорідний Т-хелперний епітоп. Більш того переважно, щоб одержаний з APP або Аβ пептид ніс В-клітинний епітоп. Особливо переважно, якщо імуногенний аналог являє собою аналог, де амінокислотні послідовності включають в себе один або декілька В-клітинних епітопів, представлених або як безперервна послідовність, або як послідовність, що містить вставки, де вставки включають в себе чужорідні Т-хелперні епітопи.

З іншого боку, найбільш переважним є таке здійснення, коли відповідні ділянки, одержані з пептидів APP або Аβ, які несуть В-клітинний епітоп, складені за допомогою коротких пептидних відрізків, які ніяк не здатні продуктивно зв'язатися з молекулою МНС класу II. Вибраний В-клітинний епітоп або епітопи амілоїдогенного поліпептиду повинні, отже, включати в себе не більше 9 послідовних амінокислот SEQ ID NO:2. Переважними є більш короткі пептиди, такі як один або декілька не більше 8, 7, 6, 5, 4 або 3 послідовних амінокислот амінокислотної послідовності амілоїдогенного поліпептиду.

Переважно, щоб аналог включав в себе щонайменше одну підпослідовність SEQ ID NO:2, так, щоб кожна з таких щонайменше однієї підпослідовностей незалежно складалася з амінокислотних відрізків APP або Аβ, вибраних з групи, яка складається з 9 послідовних амінокислот, 8 послідовних амінокислот, 7 послідовних амінокислот, 6 послідовних амінокислот, 5 послідовних амінокислот, 4 послідовних амінокислот і 3 послідовних амінокислот.

Особливо переважно, щоб послідовні амінокислоти починалися з амінокислотного залишку, вибраного з групи, що складається із залишків 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713 і 714 SEQ ID NO:2.

Вакцинація білком/пептидом; препарати і введення аналогів

Коли здійснюють презентацію аналога імунній системі тварини за допомогою його введення тварині, препарати поліпептиду відповідають вимогам, загальноприйнятим у даній області.

Одержання вакцин, що містять як активні інгредієнти послідовності пептидів, у загальних рисах добре розроблені у даній області, як проілюстровано [патентами США 4608251, 4601903, 4599231,

4599230, 4596792 і 4578770, які всі включені сюди за допомогою посилання]. Звичайно такі вакцини одержують як препарати для ін'єкцій або як рідкі розчини або суспензії; також можна одержати тверді форми, придатні для розчинення або суспендування у рідині перед ін'єкцією. Препарати також можна емульгувати. Активний імуногенний інгредієнт часто змішують з наповнювачами, що є фармацевтично допустимими і сумісними з активним інгредієнтом. Відповідні наповнювачі являють собою, наприклад, воду, фізіологічний розчин, декстрозу, гліцерин, етанол і т.п., та їх комбінації. Крім того, якщо бажано, вакцина може містити незначні кількості допоміжних речовин, таких як зволожувачі або емульгатори, буферні засоби для стабілізації рН або ад'юванти, що збільшують ефективність вакцин; пор. докладне обговорення ад'ювантів нижче.

Звичайно вакцини вводять парентерально, за допомогою ін'єкції, наприклад, або підшкірно, або внутрішньовенно, або внутрішньом'язово. Додаткові препарати, які є придатними для інших способів введення, включають в себе супозиторії і, в деяких випадках, оральні, букальні, сублінгвальні, інтраперитонеальні, інтравагінальні, анальні, епідуральні, спінальні та інтракраніальні препарати. Для супозиторіїв стандартні в'язучі засоби і носії можуть включати в себе, наприклад, поліалкіленгліколи або тригліцериди; такі супозиторії можна формувати з сумішей, що містять активний інгредієнт у діапазоні від 0,5% до 10%, переважно - 1-2%. Оральні препарати включають в себе такі звичайно застосовувані наповнювачі як, наприклад, маніт, лактозу, крохмаль, стеарат магнію, сахаринат натрію, целюлозу, карбонат магнію фармацевтичних ступенів очищення і т.п. Дані композиції приймають форми розчинів, суспензій, таблеток, пілюль, капсул, препаратів з уповільненим вивільненням або порошоків і містять 10-95% активного інгредієнта, переважно - 20-70%. Для оральних препаратів відповідним компонентом для складання композиції (і також можливим компонентом для кон'югації) є холерний токсин.

Поліпептиди можна формувати у вакцини у вигляді нейтральних форм або у вигляді солей. Фармацевтично допустимі солі включають в себе кислі адитивні солі (що утворюються з вільними аміногрупами пептиду) і ті солі, які утворюються з неорганічними кислотами, такими, наприклад, як соляна або фосфорна кислоти, або з такими органічними солями як оцтова, щавлева, винна, мигдалева і т.п. Солі, що утворюються з вільними карбоксильними групами, також можна одержати за допомогою неорганічних основ, наприклад, таких як гідроксиди натрію, калію, амонію, кальцію або заліза, і таких органічних основ як ізопропіламін, триметиламін, 2-етиламіноетанол, гістидин, прокаїн і т.п.

Вакцини вводять способом, сумісним з дозуванням препарату, і в такій кількості, яка терапевтично ефективна та імуногенна. Кількість для введення залежить від суб'єкта, який підлягає лікуванню, включаючи, наприклад, здатність імунної системи індивіда встановлювати імунну відповідь і ступінь необхідного захисту. Відповідні діапазони дозування знаходяться у межах приблизно

декількох сотень мікрограмів активного інгредієнта на вакцинацію, з переважним діапазоном приблизно від 0,1мкг до 2000мкг (хоча розглядають і великі кількості у діапазоні 1-10мг), наприклад у діапазоні приблизно від 0,5мкг до 1000мкг, переважно у діапазоні від 1мкг до 500мкг і, особливо у діапазоні приблизно від 10мкг до 100мкг. Відповідні режими для початкового введення і підтримуючих доз також варіюють, але визначаються початковим введенням з подальшим щепленням або іншими видами введення.

Спосіб застосування може широко варіювати. Застосовним є будь-який з традиційних способів введення вакцини. Вони включають в себе оральне застосування на твердій фізіологічно прийнятній основі або у фізіологічно прийнятній дисперсії, парентерально, за допомогою ін'єкції і т.п. Дозування вакцини буде залежати від способу введення і буде варіювати в залежності від віку суб'єкта, що піддається вакцинації, і складу антигену.

Деякі з поліпептидів вакцини досить імуногенні у вакцині, але для деяких інших імунна відповідь посилюється, якщо вакцина буде додатково містити активуючу речовину.

Для вакцин відомі різні способи досягнення активуючого ефекту. Основні принципи і способи добре розроблені в ["The Theory and Practical Application of Adjuvants", 1995, Duncan E.S. Stewart-Tull (ed.), John Wiley & Sons Ltd, ISBN 0-471-95170-6, а також у "Vaccines: New Generation Immunological Adjuvants", 1995, Gregoriadis G et al. (eds.), Plenum Press, New York, ISBN 0-306-45283-9, включених сюди за допомогою посилання].

Особливо переважно застосовувати ад'ювант, який, як може бути показано, сприяє порушенню аутоотолерантності до аутоантигенів; фактично це істотно у випадках, коли як активний інгредієнт в аутовакцині застосовують немодифікований амлідогенний поліпептид. Як необмежувальні приклади відповідні ад'юванти вибирають з групи, яка складається з ад'юванта, що націлює імунітет; імуномодулюючого ад'юванта, такого як токсин, цитокін і похідні мікобактерій; масляного складу; полімеру; ад'юванта, що формує міцели; сапоніну; імуностимулювального комплексного матриксу (матрикс ISCOM); частинки; DDA; ад'ювантів на основі алюмінію; ад'ювантів на основі ДНК; γ-інуліну та інкапсулюючого ад'юванта. У загальних рисах необхідно зазначити, що описи вище, які відносилися до сполук і засобів, придатних як перша, друга і третя групи в аналогах, з відповідними змінами також відносяться до їх використання в ад'юванті вакцини відповідно до винаходу.

Можливе використання ад'ювантів включає в себе застосування таких засобів як гідроксид або фосфат алюмінію (галуни), що звичайно застосовується як 0,05-0,1-процентний розчин у забуференому сольовому розчині, домішка з синтетичними полімерами цукрів (наприклад, Carborol®), що застосовується як 0,25 процентний розчин, агрегацію білків у вакцині за допомогою впливу тепла з температурним діапазоном від 70 до 101°C протягом періоду від 30 секунд до 2 хвилин, відповідно, а також агрегацію за допомогою речовин, що структурують. Також можна застосовувати агрегацію альбуміну за допомогою реактивації оброблених

пепсином антитіл (Fab-фрагментів), суміш з бактеріальними клітинами, такими як *C parvum*, або ендотоксинами, або компонентами ліпополісахаридів грамнегативних бактерій, емульсію у фізіологічно допустимих масляних носіях, таких як манідімоноолеат (Aracel A) або емульсію з 20 процентним розчином перфторвуглецю (Fluosol-DA), що застосовується як замісник, що блокує. Суміш з маслами, такими як сквален та IFA, також переважна.

Відповідно до даного винаходу, DDA (бромід диметилдіоктадециламонію) є цікавлячим кандидатом для ад'юванта, як і ДНК, і γ -інулін, але повний і неповний ад'юванти Фрейнда, а також сапоніни кілайї, такі як QuilA і QS21, також цікаві, як і RIBI. Додатковими можливостями є монофосфоліпід A (MPL), вказані вище C3 і C3d, і мураміддипептид (MDP).

Відомо, що препарати ліпосом дають ефекти ад'ювантів, і отже, ад'юванти у вигляді ліпосом переважні відповідно до винаходу.

Переважними альтернативами відповідно до винаходу також є ад'юванти у вигляді імуностимулювального комплексного матриксу (матрикс ISCOM®), особливо тому, що показано, що даний тип ад'ювантів здатний до підвищувальної регуляції експресії МНС класу II APC. Матрикс ISCOM® складається з (необов'язково фракціонованих) сапонінів (тритерпеноїди) з *Quillaja saponaria*, холестерину і фосфоліпиду. Коли це змішують з імуногенним білком, одержуваний препарат з частинок являє собою те, що відомо як частинка ISCOM, де сапонін складає 60-70% мас./мас., холестерин і фосфоліпід складають 10-15% мас./мас., і білок складає 10-15% мас./мас. Подробиці, що відносяться до композиції і застосування імуностимулювальних комплексів, можна знайти, наприклад, у вказаних вище підручниках, присвячених ад'ювантам, але у [Morein B et al., 1995, Clin. Immunother. 3: 461-475, також як і у Barr IG and Mitchell GF, 1996, Immunol. and Cell Biol. 74: 8-25 (включених сюди за допомогою посилання)] також надані придатні інструкції для одержання повних імуностимулювальних комплексів.

Інша дуже цікава (а значить, переважна) можливість досягнення ефекту ад'юванта пов'язана із застосуванням способу, описаного у [Gosselin et al., 1992 (що, таким чином, включено сюди за допомогою посилання)]. Коротко, презентацію відповідного антигену, такого як антиген відповідно до даного винаходу можна посилити за допомогою кон'югації антигену з антитілами (або антигензв'язувальними фрагментами антитіл) проти рецепторів Fc γ на моноцитах/макрофагах. Показано, що імуногенність для цілей вакцинації особливо посилюють кон'югати між антигеном і анти-Fc γ RI.

Інші можливості включають у себе застосування речовин, що націлюють та імуномодулюють (наприклад, цитокінів), вказаних вище як кандидати для першої і другої груп у модифікованих версіях амілоїдогенних поліпептидів. У зв'язку з цим можливостями також є синтетичні індуктори цитокінів, такі як полі І:C.

Придатні похідні мікобактерій вибрані з групи, що складається з мураміддипептиду, повного ад'юванта Фрейнда, RIBI і складних дієфірів трегалози, таких як TDM або TDE.

Придатні ад'юванти, що націлюють імунітет, вибирають з групи, яка складається з ліганду CD40 та антитіл до CD40 або їх фрагментів, що специфічно зв'язуються, (пор. обговорення вище), мано-зи, Fab-фрагмента і CTLA-4.

Придатні полімерні ад'юванти вибирають з групи, що складається з вуглеводів, таких як декстран, PEG, крохмаль, манан і маноза; пластичних полімерів і латексу, такого як латексні гранули.

Ще один цікавий шлях модуляції імунної відповіді являє собою включення імуногена (необов'язково разом з ад'ювантами і фармацевтично допустимими носіями) у "віртуальний лімфатичний вузол" (VLN) (патентований медичний пристрій розроблений в ImmunoTherapy, Inc., 360 Lexington Avenue, New York, NY 10017-6501). VLN (тонкий трубчастий пристрій) імітує структуру і функцію лімфатичного вузла. Внесення VLN під шкіру створює ділянку стерильного запалення з підвищенням рівня цитокінів і хемокінів. Т- і В-клітини, також як і APC, швидко відповідають на сигнали про пошкодження, направляються до ділянки запалення і нагромаджуються всередині пористого матриксу VLN. Показано, що необхідна доза антигену, якої потрібно для встановлення імунної відповіді на антиген при застосуванні VLN, зменшена і, що імунопротекція, викликана імунізацією із застосуванням VLN, перевищує стандартну імунізацію із застосуванням як ад'юванта RIBI. Технологія коротко описана у [Gelber C et al., 1998, "Elicitation of Robust Cellular and Humoral Immune Responses to Small Amounts of Immunogens Using a Novel Medical Device Designated the Virtual Lymph Node", in: "From the Laboratory to the Clinic, Book of Abstracts, October 12th-15th 1998, Seascape Resort, Aptos, California"].

Показано, що препарати вакцин у вигляді мікрочастинок у багатьох випадках збільшують імуногенність білкових антигенів, а отже, являють собою інше переважне здійснення винаходу. Мікрочастинки виготовляють або як композиції разом з полімером, ліпідом, вуглеводом або іншими молекулами, придатними для виготовлення частинок, або мікрочастинки можуть являти собою гомогенні частинки, що складаються тільки з самого антигену.

Приклади мікрочастинок, що базуються на полімерах, являють собою частинки, які базуються на PLGA і PVP [Gupta, R. K. et. al. 1998], де полімер і антиген конденсують у тверду частинку. Частинки на основі ліпідів можна виготовити як міцели з ліпиду (так звані ліпосоми), захоплюючи антиген у міцелу [Pietrobon, P. J. 1995]. Частинки на основі вуглеводу, звичайно виготовляють з відповідного вуглеводу, що розпадається, такого як крохмаль або хітозан. Вуглевод і антиген змішують і конденсують у частинки у процесі, подібному до того, що застосовують для полімерних частинок [Kas, H. S. et al. 1997].

Частинки, що складаються тільки з антигену, можна виготовляти різними способами розпилення або сушіння виморожуванням. Для цілей даного винаходу особливо підходить спосіб надритичної рідини, який застосовують для виготовлення дуже однорідних частинок контрольованого розміру [York, P. 1999 & Shekunov, B. et al. 1999].

Очікується, що вакцину потрібно вводити 1-6 разів на рік, тобто 1, 2, 3, 4, 5 або 6 разів на рік, індивіду, який потребує цього. Раніше показано, що імунологічна пам'ять, індукована застосуванням переважних аутовакцин відповідно до даного винаходу, не є постійною, і отже, імунна система потребує періодичної провокації імунної відповіді амілоїдогенним поліпептидом або модифікованими амілоїдогенними поліпептидами.

Внаслідок генетичної різноманітності різні індивіди можуть реагувати на один і той же поліпептид імунною відповіддю різної сили. Отже, вакцина відповідно до винаходу може містити декілька різних поліпептидів для збільшення імунної відповіді, пор. також обговорення вище, що стосується вибору введення чужорідного Т-клітинного епітопу. Вакцина може включати в себе два або декілька поліпептидів, де всі поліпептиди являють собою такі, як визначено вище.

Отже, вакцина може включати в себе 3-20 різних модифікованих або немодифікованих поліпептидів, наприклад, 3-10 різних пептидів.

Вакцинація нуклеїновою кислотою

Як альтернатива класичному введенню вакцини на основі білка технологія вакцинації нуклеїновою кислотою (також відома як "імунізація нуклеїновою кислотою", "генетична імунізація" і "генна імунізація") пропонує ряд привабливих особливостей.

Передусім, на противагу традиційному підходу до вакцинації, вакцинація нуклеїновою кислотою не потребує ресурсів, що вимагають широкомасштабного виробництва імуногена (наприклад, у промисловому масштабі ферментації мікроорганізмів, які продукують амілоїдогенні поліпептиди). Більш того немає необхідності у пристроях по очищенню і схемах рефолдингу імуногена. І, нарешті, оскільки при вакцинації нуклеїновою кислотою для продукту експресії внесеної нуклеїнової кислоти покладаються на біохімічний апарат індивіда, що вакцинується, очікується, що відбудеться оптимальний посттрансляційний процесинг продукту, що експресується; це особливо важливо у випадку аутовакцинації, оскільки, як вказано вище, у модифікованій молекулі необхідно зберегти значну частину вихідних В-клітинних епітопів і оскільки В-клітинні епітопи в принципі можна скласти з частин будь-якої (біологічної) молекули (наприклад, вуглеводу, ліпиду, білка і т.п.). Отже, природні профілі глікозилювання і ліпоїлювання імуногена можуть бути дуже важливими для загальної імуногенності, а це краще всього забезпечити, якщо як продуцент імуногена використати хазяїна.

Отже, переважне здійснення варіантів а-с відповідно до винаходу включає в себе ефективну презентацію аналога імунній системі за допомогою внесення нуклеїнових(ої) кислот(и), що кодують(є) аналог, у клітини тварини і таким чином одержання експресії введених(ої) нуклеїнових(ої) кислот(и) клітинами *in vivo*.

У даному здійсненні, введена нуклеїнова кислота переважно являє собою ДНК, яка може знаходитися у формі чистої ДНК, ДНК, об'єднаної із зарядженими або незарядженими ліпідами, ДНК, поміщеної у ліпосоми, ДНК, включеної у вірусний вектор, ДНК, об'єднаної з білком або поліпепти-

дом, що полегшує трансфекцію, ДНК, об'єднаної з білком або поліпептидом, що націлює, ДНК, об'єднаної з агентами, що осаджують кальцій, ДНК, зв'язаної з інертною молекулою-носієм, ДНК, інкапсульованої у полімер, наприклад, у PLGA [порівняйте спосіб мікроінкапсуляції, описаний у WO 98/31398], або хітин, або хітозан і ДНК, об'єднаної з ад'ювантом. У даному контексті потрібно зазначити, що практично всі розглянуті варіанти, які стосуються застосування ад'ювантів у препаратах традиційних вакцин, застосовуються і у препаратах вакцин з ДНК. Отже, всі описи, які тут відносяться до застосування ад'ювантів, у контексті вакцин на основі поліпептидів, з необхідними змінами застосовують для використання у способі вакцинації нуклеїновими кислотами.

Шляхи введення і схеми введення вакцин на основі поліпептидів, деталізовані вище, також застосовні для вакцин на основі нуклеїнових кислот відповідно до винаходу, і всі обговорення вище, що стосуються шляхів і схем введення поліпептидів, з відповідними змінами застосовують до нуклеїнових кислот. До цього необхідно додати, що вакцини на основі нуклеїнових кислот можна відповідиним чином вводити внутрішньовенно і внутрішньоартеріально. Більш того у даній області добре відомо, що вакцини на основі нуклеїнових кислот можна вводити за допомогою застосування так званої генної гармати, і отже, даний і еквівалентні способи введення розглядають як частина даного винаходу. Нарешті, як повідомлялося, застосування для введення нуклеїнових кислот VLN також дає хороші результати, і отже, даний конкретний спосіб введення є особливо переважним.

Крім того, нуклеїнова(і) кислота(и), що застосовуються як засоби для імунізації, можуть містити ділянки, що кодують 1-у, 2-у і/або 3-ю групи, наприклад, у вигляді імуномодуючих речовин, описаних вище, таких як цитокіни, розглянуті як придатні ад'юванти. Переважна версія даного здійснення пов'язана з кодувальною ділянкою для аналога і кодувальною ділянкою для імуномодулятора у різних рамках зчитування або щонайменше під контролем різних промоторів. Таким чином, уникають того, щоб аналог або епітоп продукувалися як партнери злиття з імуномодулятором. Альтернативно, можна використати два окремих нуклеотидних фрагменти, але це є менш переважним у зв'язку з перевагою, що забезпечується спільною експресією, коли обидві кодувальні ділянки включені в одну молекулу.

Таким чином, винахід також відноситься до композиції для індукування продукції антитіл проти APP або Aβ, де композиція включає в себе

- фрагмент нуклеїнової кислоти або вектор відповідно до винаходу (пор. обговорення векторів нижче) і

- фармацевтично та імунологічно допустимий носій і/або ад'ювант, як обговорювалося вище.

У нормальних умовах нуклеїнову кислоту, що кодує варіант, вносять у вигляді вектора, де експресія знаходиться під контролем вірусного промотору. Більш детальне обговорення векторів відповідно до винаходу див. обговорення нижче. Також докладні описи, що відносяться до формування і застосування вакцин на основі нуклеїнових

кислот [див. Donnelly JJ. et al., 1997, Annu. Rev. Immunol. 15: 617-648 і Donnelly JJ. et al., 1997, Life Sciences 60: 163-172. Обидва даних посилання включені сюди за допомогою посилання].

Живі вакцини

Третя альтернатива для ефективної презентації аналогів імунній системі, як визначено у варіантах а-с, являє собою застосування способу живих вакцин. У вакцинації живими вакцинами презентацію імунній системі здійснюють за допомогою введення тварині непатогенних мікроорганізмів, які можна трансформувати фрагментом нуклеїнової кислоти, що кодує аналог, або вектором, що включає в себе такий фрагмент нуклеїнової кислоти. Непатогенний мікроорганізм може являти собою будь-який відповідний атенуований бактеріальний штам (атенуований за допомогою пасажів або шляхом видалення патогенних продуктів, що експресуються, за допомогою технології рекомбінантних ДНК), наприклад, BCG. *Mycobacterium bovis*, непатогенні *Streptococcus* spp., *E. coli*, *Salmonella* spp., *Vibrio cholerae*, *Shigella* і т.п. Огляди, присвячені одержанню реальних живих вакцин, можна, наприклад, знайти у [Saliou P, 1995, Rev. Prat. 45: 1492-1496 і Walker PD, 1992, Vaccine 10: 977-990, обидва з яких включені сюди за допомогою посилання].

Для подробиць про фрагменти нуклеїнової кислоти і вектори, що застосовуються в таких живих вакцинах, порівняйте обговорення нижче.

У вигляді альтернативи бактеріальним живим вакцинам, фрагмент нуклеїнової кислоти відповідно до винаходу, що обговорюється нижче, можна ввести у невірулентний вектор вірусної вакцини, такий як штам коров'ячої віспи або будь-який інший відповідний вірус віспи.

Звичайно непатогенний мікроорганізм або вірус тварині вводять тільки один раз, але у деяких випадках може бути необхідним введення мікроорганізму більше одного разу протягом життя для збереження захисного імунітету. Навіть припускають, що деталізовані вище схеми імунізації для вакцинації поліпептидами будуть придатні для застосування живих або вірусних вакцин.

Альтернативно, вакцинацію живими вакцинами або вірусами комбінують з попередньою або подальшою вакцинацією поліпептидами і/або нуклеїновими кислотами. Наприклад, можна здійснити первинну імунізацію живою або вірусною вакциною з подальшою підтримуючою імунізацією із застосуванням підходу на основі поліпептиду або нуклеїнової кислоти.

Мікроорганізм або вірус можна трансформувати нуклеїновою(ими) кислотою(ами), що містять ділянки, які кодують 1-у, 2-у і/або 3-ю групи, наприклад, у вигляді імуномодуючих речовин, описаних вище, таких як цитокіни, розглянуті як придатні ад'юванти. Переважна версія даного здійснення пов'язана з кодувальною ділянкою для аналога і кодувальною ділянкою для імуномодулятора у різних рамках зчитування або щонайменше під контролем різних промоторів. Таким чином, унікають того, щоб аналог або епітоп продукувався як партнер злиття з імуномодулятором. Альтернативно, як засоби, що трансформують, можна використовувати два окремих нуклеотидних фрагменти.

Звичайно, наявність 1-ї і/або 2-ї, і/або 3-ї груп в одній і тій же рамці зчитування може забезпечити аналог відповідно до винаходу як продукт експресії, і таке здійснення особливо переважне у даному винаході.

Застосування способу відповідно до винаходу для лікування захворювання

Як можна зрозуміти з обговорення вище, надання способу відповідно до винаходу дозволяє контролювати захворювання, що характеризуються накопиченнями амілоїду. У даному контексті AD являє собою ключову ціль способу відповідно до винаходу, але інші захворювання, які характеризуються відкладеннями амілоїду, що містить A β , також є досяжними цілями. Отже, важливе здійснення способу відповідно до винаходу для знижувальної регуляції амілоїдної активності включає в себе лікування і/або профілактику і/або поліпшення стану AD або інших захворювань, що характеризуються накопиченням амілоїду, спосіб включає в себе знижувальну регуляцію APP або A β способом відповідно до винаходу, до такої міри, щоб значно зменшувалася кількість амілоїду.

Особливо переважно, щоб зменшення амілоїду приводило до зміни балансу між формуванням і деградацією/видаленням амілоїду, тобто швидкість деградації/видалення амілоїду доведена до міри, коли вона перевищує швидкість формування амілоїду. За допомогою ретельного контролю кількості та імунологічного впливу імунізацій індивіда, який потребує цього, можна згодом досягти балансу, що приводить до зменшення нетто накопичення амілоїду без надмірних несприятливих ефектів.

Альтернативно, якщо спосіб відповідно до винаходу не ефективний у видаленні або зменшенні існуючих відкладень амілоїду у індивіда, його можна застосовувати для одержання клінічно значимого зменшення формування нового амілоїду, таким чином значно подовжуючи період, до якого стан хвороби не погіршиться. Потрібно мати можливість контролювати швидкість накопичення амілоїду або шляхом вимірювання сироваткової концентрації амілоїду (яка, як вважають, знаходиться у рівновазі з речовиною у накопиченнях), або за допомогою позитронно-емісійного томографічного (PET) сканування, [пор. Small G.W., et al., 1996, Ann N.Y. Acad Sci 802: 70-78].

Інші захворювання і стани, де можна застосовувати дані засоби і способи для лікування або полегшення стану аналогічним способом згадані вище у "передумовах винаходу" або перераховані нижче у розділі, який називається "інші амілоїдні захворювання і білки, асоційовані з ними".

Пептиди, поліпептиди і композиції відповідно до винаходу

Як видно з вказаного вище, даний винахід базується на концепції імунізації індивідів проти антигену APP або A β для одержання зменшеної кількості зв'язаних з патологією накопичень амілоїду. Переважний шлях досягнення такої імунізації являє собою застосування описаних тут аналогів, з наданням, таким чином, молекул, раніше не описаних у даній області.

Вважають, що аналоги, які обговорюються тут, є об'єктом винаходу самі по собі, і отже, важлива

частина винаходу відноситься до описаних вище аналогів. Отже, будь-який представлений тут опис, що відноситься до модифікованого APP або Aβ, є релевантним для цілей опису амілоїдогенних аналогів відповідно до винаходу, також як і будь-які такі описи, навпаки, застосовні до опису вказаних аналогів.

Необхідно зазначити, що переважні модифіковані молекули APP або Aβ включають в себе модифікації, які приводять до утворення поліпептиду, що володіє ступенем ідентичності послідовності з APP або Aβ, що складає щонайменше 70%, або з їх підпослідовністю довжиною щонайменше у 10 амінокислот. Більш високий ступінь ідентичності послідовності, наприклад, щонайменше 75% або навіть щонайменше 80, 85, 90 або 95% є переважним. Ідентичність послідовності для білків і нуклеїнових кислот можна обчислити як $(N_{ref} - N_{dif}) \cdot 100 / N_{ref}$, де N_{dif} являє собою загальне число неідентичних залишків у двох послідовностях при вирівнюванні і де N_{ref} являє собою число всіх залишків в одній з послідовностей. Так, послідовність ДНК AGTCAGTC має ступінь ідентичності з послідовністю AATCAATC, що складає 75% ($N_{dif}=2$ і $N_{ref}=8$).

Винахід також відноситься до композицій, які можна використовувати при реалізації способу відповідно до винаходу. Отже, винахід також відноситься до імуногенної композиції, яка включає в себе імуногенно ефективну кількість описаного вище аналога, причому вказана композиція додатково включає в себе фармацевтично та імунологічно прийнятний розріджувач і/або носій, і/або наповнювач і, необов'язково, ад'ювант. Іншими словами, ця частина винаходу відноситься до композицій аналогів, в основному як описано вище. Таким чином, коли вибір ад'ювантів і носіїв відноситься до композиції модифікованого або немодифікованого амілоїдогенного поліпептиду для застосування у способі відповідно до винаходу для знижувальної регуляції APP або Aβ, він знаходиться відповідно до того, що обговорювалося вище.

Поліпептиди одержують відповідно до способів, добре відомих у даній області. Більш протяжні поліпептиди звичайно одержують за допомогою технології рекомбінантних генів, яка включає в себе введення послідовності амінокислот, що кодує аналог, у відповідний вектор, трансформацію даним вектором відповідної клітини-хазяїна, експресію даною клітиною-хазяїном послідовності нуклеїнових кислот, діставання продукту експресії з клітин-хазяїнів або їх супернатанту і подальше очищення, і, необов'язково, додаткову модифікацію, наприклад, рефолдинг або дериватизацію.

Більш короткі пептиди переважно одержують за допомогою добре відомих способів твердофазового або рідкофазового пептидного синтезу. Однак нещодавні досягнення у даній технології створили можливість одержання за допомогою даних способів повнорозмірних поліпептидів і білків, і отже, одержання довгих конструкцій за допомогою синтетичних способів також не виходить за межі даного винаходу.

Фрагменти нуклеїнової кислоти і вектори відповідно до винаходу

З попереднього опису зрозуміло, що аналоги поліамінокислот можна одержати за допомогою технології рекомбінантних генів, а також за допомогою хімічного синтезу або напівсинтезу; останні дві альтернативи особливо значимі, коли модифікація полягає у зв'язуванні з білковими носіями (такими як KLH, дифтерійний анатоксин, анатоксин правця і BSA) і небілковими молекулами, такими як вуглеводні полімери, а також, звичайно, коли модифікація включає в себе додавання бічних ланцюгів або бічних груп до пептидного ланцюга, одержаного з APP або Aβ.

Для цілі технології рекомбінантних генів, а також, звичайно, для цілі імунізації нуклеїновою кислотою фрагменти нуклеїнової кислоти, що кодують аналоги, являють собою важливі хімічні продукти. Отже, важлива частина винаходу відноситься до фрагментів нуклеїнової кислоти, що кодують аналог відповідно до винаходу, тобто поліпептид, одержаний з APP або Aβ, що включає в себе або природну послідовність, до якої додають або в яку вставляють партнер злиття, або, переважно, одержаний з APP або Aβ поліпептид, в який за допомогою вставки і/або додавання, переважно за допомогою заміни і/або делеції, ввели чужорідний Т-клітинний епітоп. Фрагменти нуклеїнової кислоти відповідно до винаходу являють собою фрагменти ДНК або РНК.

Фрагменти нуклеїнової кислоти відповідно до винаходу звичайно вставляють у відповідні вектори для утворення векторів, які клонують або експресують, що несуть фрагменти нуклеїнової кислоти відповідно до винаходу; такі нові вектори також являють собою частину винаходу. Подробиці, що відносяться до конструювання таких векторів відповідно до винаходу, будуть обговорюватися нижче у зв'язку з трансформованими клітинами і мікроорганізмами. Вектори, в залежності від мети і типу застосування, можуть існувати у вигляді плазмід, фагів, космід, мініхромосом або вірусу, але «оголена» ДНК, яка транзитно експресується тільки у визначених клітинах, також є важливим вектором. Переважні вектори, що клонують і експресують, відповідно до винаходу здатні до автономної реплікації, таким чином створюючи можливість одержання великого числа копій для цілей високорівневої експресії або високорівневої реплікації для подальшого клонування.

Основна схема вектора відповідно до винаходу включає в себе наступні елементи у напрямку 5'→3' та у функціональному з'єднанні: промотор для керування експресією фрагмента нуклеїнової кислоти відповідно до винаходу, необов'язково послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує лідерний пептид, що робить можливою секрецію (в екстрацелюлярну фазу або, коли застосовно, у периплазму) поліпептидного фрагмента або його інтеграцію у мембрану, фрагмент нуклеїнової кислоти відповідно до винаходу і, необов'язково, послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує термінатор. При оперуванні векторами, що експресують, у штаммах-продуцентах або клітинних лініях з метою генетичної стабільності трансформованої клітини переважно, щоб вектор при введенні в клітину-хазяїна інтегрувався у геном клітини-хазяїна. Навпаки, при роботі з векторами, що

застосовуються для здійснення експресії у тварини *in vivo* (наприклад, при застосуванні вектора у вакцинації ДНК), з міркувань безпеки переважно, щоб вектор був нездатний до інтеграції у геном клітини-хазяїна; звичайно застосовують «оголену» ДНК або вектори, що не інтегруються, вибір яких добре відомий фахівцям уданій області.

Вектори відповідно до винаходу застосовують для трансформації клітин-хазяїнів для одержання аналога відповідно до винаходу. Такі трансформовані клітини можуть являти собою клітини, що культивуються або клітинні лінії, які застосовуються для розмноження фрагментів нуклеїнової кислоти і векторів відповідно до винаходу або застосовуються для рекомбінантного одержання аналогів відповідно до винаходу. Альтернативно, трансформовані клітини можуть являти собою штами живих вакцин, де фрагмент нуклеїнової кислоти (одна єдиница або декілька копій) вставлений так, що здійснює секрецію або інтеграцію аналога у бактеріальну мембрану або клітинну стінку.

Переважають трансформовані клітини відповідно до винаходу являють собою мікроорганізми, такі як бактерії (такі як види *Escherichia* [наприклад, *E. coli*], *Bacillus* [наприклад, *Bacillus subtilis*], *Salmonella* або *Mycobacterium* [переважно непатогенні, наприклад, BCG *M. bovis*]), дріжджі (наприклад, *Saccharomyces cerevisiae*) і найпростіші тварини. Альтернативно, трансформовані клітини одержують з багатоклітинного організму, наприклад, гриба, клітини комахи, клітини рослини або клітини ссавця. Найбільш переважними є клітини, одержані від людини, порівняйте обговорення клітинних ліній і векторів нижче. Останні результати у лабораторії авторів свідчать про перспективи застосування для рекомбінантного одержання поліпептидів комерційно доступної лінії *Drosophila melanogaster* (клітинна лінія і векторна система Schneider 2 (*S₂*), доступна в Invitrogen), і отже, дана система, що експресує, особливо переважна.

Для цілей клонування і/або оптимізованої експресії переважно, щоб трансформовані клітини були здатні реплікувати фрагмент нуклеїнової кислоти відповідно до винаходу. Клітини, що експресують фрагмент нуклеїнової кислоти, є переважно корисними здійсненнями даного винаходу; їх можна використовувати для обмеженого або широко-масштабного одержання аналога відповідно до винаходу або, у випадку непатогенних бактерій, як вакцинних складових у живій вакцині.

При одержанні аналогів відповідно до винаходу за допомогою трансформованих клітин, зручно, хоча це і віддаляє від суті, щоб продукти експресії або експортувалися назовні у середовище культивування, або знаходилися на поверхні трансформованої клітини.

Коли ефективні клітини-продуценти ідентифіковані, на їх основі переважно створити стабільну клітинну лінію, яка несе вектор відповідно до винаходу і експресує фрагмент нуклеїнової кислоти, що кодує модифікований амілоїдогенний поліпептид. Переважно, щоб дана стабільна клітинна лінія секретувала або несла аналог відповідно до винаходу, таким чином полегшуючи його очищення.

Як правило, плазмідні вектори, що містять реплікон і контрольні послідовності, одержані з видів,

сумісних з клітиною-хазяїном, застосовують у зв'язку з хазяїнами. Вектор звичайно несе сайт реплікації, а також маркерні послідовності, здатні забезпечити селекцію трансформованих клітин за фенотипом. Наприклад, *E. coli* звичайно трансформують із застосуванням pBR322, плазмиди, одержаної з виду *E. coli* [наприклад, див. Bolívar et al., 1977]. Плазміда pBR.322 містить гени стійкості до ампіциліну і тетрацикліну і таким чином забезпечує прості засоби для ідентифікації трансформованих клітин. Плазміда pBR або інша плазміда мікроорганізмів або фаг повинна також містити - або ж її необхідно модифікувати так, щоб вона містила - промотори, які прокаріотичний мікроорганізм може використати для експресії.

Такі промотори, що частіше за все застосовуються для конструювання рекомбінантної ДНК, включають в себе системи В-лактамазного і лактозного промоторів [Chang et al., 1978; Itakura et al., 1977; Goeddel et al., 1979] і систему триптофанового (*trp*) промотору [Goeddel et al., 1979; EP-A-0036116]. Хоча вони і є найчастіше застосовуваними, виявлені та застосовуються також й інші промотори мікроорганізмів, і опубліковані деталі, що відносяться до їх нуклеотидних послідовностей, дозволяючи фахівцям функціонально лігувати їх з плазмідними векторами [Siebwenlist et al., 1980]. Визначені гени прокаріот можуть ефективно експресуватися в *E. coli* з її власної промоторної послідовності, запобігаючи необхідності додавання іншого промотору штучними способами.

Крім прокаріотичних, можна застосовувати і еукаріотичні мікроорганізми, такі як дріжджові культури, і тут промотор повинен бути здатний направляти експресію. *Saccharomyces cerevisiae*, або звичайні пекарські дріжджі, з еукаріотичних мікроорганізмів застосовують найчастіше, хоча також доступний і ряд інших штамів. Для експресії в *Saccharomyces* звичайно застосовують, наприклад, плазмиду YRp7 [Stinchcomb et al., 1979; Kingsman et al., 1979; Tschemper et al., 1980]. Дана плазміда вже містить ген *trp1*, що є селективним маркером для мутантного штаму дріжджів, позбавлених здатності рости на триптофані, наприклад, ATCC №44076 або PER4-1 [Jones, 1977]. Наявність пошкодження *trp1* як характеристики геному дріжджової клітини-хазяїна, надає ефективну умову для виявлення трансформації за допомогою росту за відсутності триптофану.

Відповідні промоторні послідовності у дріжджових векторів включають в себе промотори для 3-фосфогліцераткінази [Hitzman et al., 1980] або інших гліколітичних ферментів [Hess et al., 1968; Holland et al., 1978] таких як енолаза, гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа, гексокіназа, піруватдекарбоксилаза, фосфофруктокіназа, глюкозо-6-фосфатізомераза, 3-фосфогліцератмутаза, піруваткіназа, триозофосфатізомераза, фосфоглюкозоізомераза і гліюкіназа. Для забезпечення поліаденілювання мРНК і термінації бажано, щоб при конструюванні відповідних плазмід, що експресують, експресувалися послідовності, що термінують, асоційовані з даними генами, також ліговані у 3'-кінець послідовності вектора, що експресує.

Інші промотори, що володіють додатковою перевагою транскрипції, контрольованої умовами

росту, являють собою промоторні ділянки алкогольдегідрогенази 2, ізоцитохрому C, кислої фосфатази, ферментів деградації, асоційованих з метаболізмом азоту і вказаної вище гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази, і ферментів, що відповідають за утилізацію мальтози і галактози. Відповідним є будь-який плазмідний вектор, що містить промотор, придатний для дріжджів, ділянку початку реплікації і послідовності термінатора.

Крім мікроорганізмів, як хазяїни можна застосовувати культури клітин, одержаних з багатоклітинних організмів. В принципі будь-яка така клітинна культура є можливою, чи то є культура з хребетних або безхребетних. Однак найбільший інтерес представляють клітини хребетних, а розмноження клітин хребетних у культурі (тканинна культура) в останні роки стало звичайним способом [Tissue Culture, 1973]. Прикладами таких придатних ліній клітин-хазяїнів є клітини VERO і HeLa, лінії клітин яєчника китайського хом'ячка (CHO) і W138, BHK, COS-7 293, клітини *Spodoptera frugiperda* (SF) (комерційно доступні як завершені системи, що експресують, крім іншого, у Protein Sciences, 1000 Research Parkway, Meriden, CT 06450, U.S.A. та в Invitrogen) і клітинні лінії MDCK. Найбільш переважна клітинна лінія відповідно до даного винаходу являє собою лінію S2, доступну в Invitrogen, PO Box 2312, 9704 CH Groningen, The Netherlands.

Вектори, що експресують, для таких клітин звичайно включають в себе (якщо необхідно) ділянку початку реплікації, промотор, розташований перед геном для експресії, разом з будь-якими необхідними ділянками зв'язування рибосом, ділянками сплайсингу РНК, ділянкою поліаденілювання і послідовності термінатора транскрипції.

Для застосування у клітинах ссавців, функції керування на векторах, що експресують, часто забезпечуються матеріалом вірусу. Наприклад, звичайно застосовувані промотори одержують з вірусу полііоми, аденовірусу 2 і, найчастіше, мавпячого вірусу 40 (SV40). Ранні та пізні промотори вірусу SV40 особливо корисні у зв'язку з тим, що їх легко одержати з вірусу як фрагмент, що також містить ділянку початку реплікації вірусу SV40 [Fiers et al., 1978]. Також можна використати менший і більший фрагменти SV40, за умови, що туди включена послідовність довжиною приблизно 250 п.н., що продовжується від ділянки розпізнавання HindIII до ділянки розпізнавання BglII, розташована у вірусній ділянці початку реплікації. Крім того, також можливо і часто бажано використовувати промотор або контрольні послідовності, звичайно асоційовані з бажаною генною послідовністю, за умови, що дані контрольні послідовності сумісні з системами клітин-хазяїнів.

Ділянку початку реплікації можна забезпечити або за допомогою конструювання такого вектора, щоб він включав в себе екзогенну ділянку початку реплікації, наприклад, яку можна одержати з SV40 або інших вірусів (наприклад, вірусу полііоми, аденовірусів, VSV, BPV), або за допомогою механізму хромосомної реплікації клітини-хазяїна. Якщо вектор інтегрований у хромосому клітини-хазяїна, її часто достатньо.

Ідентифікація придатних аналогів

Фахівцям зрозуміло, що не всі можливі варіанти або модифікації природних APP або Aβ володіють здатністю викликати у тварини утворення антитіл, які є перехресно-реагуючими з природною формою. Однак неважко зробити ефективний стандартний скринінг модифікованих амілоїдогенних молекул, що задовольняють мінімальним вимогам імунологічної реактивності, які обговорюються тут. Отже, можна застосовувати спосіб для ідентифікації модифікованих амілоїдогенних поліпептидів, здатних індукувати утворення антитіл проти немодифікованого амілоїдогенного поліпептиду у видів тварин, де немодифікований амілоїдогенний поліпептид являє собою (неімуногенний) власний білок, причому цей спосіб включає в себе

- одержання за допомогою пептидного синтезу або способів генної інженерії набору взаємно простих аналогів відповідно до винаходу, де в амінокислотну послідовність APP або Aβ виду тварин додані, в неї вставлені, з неї видалені або в ній заміщені амінокислоти, таким чином приводячи до амінокислотних послідовностей у наборі, які включають в себе Т-клітинні епітопи, чужорідні для виду тварин, або одержання набору фрагментів нуклеїнової кислоти, що кодують набір взаємно простих аналогів,

- тестування елементів набору аналогів або фрагментів нуклеїнової кислоти на їх здатність викликати продукцію антитіл у виду тварин проти немодифікованого APP або Aβ,

- та ідентифікацію і, необов'язково, виділення елемента(ів) набору аналогів, який(і) значимо індукує у виду продукцію антитіл проти немодифікованих APP і Aβ або ідентифікацію або, необов'язково, виділення продуктів, що експресують поліпептид, які кодуються елементами набору фрагментів нуклеїнової кислоти, що значимо індукують у виду тварин продукцію антитіл проти немодифікованих APP і Aβ.

У даному контексті, "набір взаємнопростих модифікованих амілоїдогенних поліпептидів" являє собою колекцію неідентичних аналогів, вибраних на базі критеріїв, що обговорюються вище (наприклад, у комбінації з дослідженням циркулярного дихроїзму, спектрів ЯМР і/або профілів дифракції рентгенівських променів). Набір може складатися тільки з малої кількості елементів, але вважають, що набір може містити і декілька сотень елементів.

Тестування елементів набору, зрештою, можна провести *in vivo*, але можна застосовувати ряд тестів *in vitro*, які зменшують кількість модифікованих молекул, що служать метою даного винаходу.

Оскільки мета внесення чужорідних Т-клітинних епітопів являє собою підтримку В-клітинної відповіді за допомогою Т-клітин, необхідна умова полягає у тому, щоб аналог індукував проліферацію Т-клітин. Проліферацію Т-клітин можна тестувати за допомогою стандартизованих аналізів проліферації *in vitro*. Коротко, від суб'єкта одержують зразок, збагачений Т-клітинами, і згодом підтримують у культурі. Т-клітини, що культивуються, приводять у контакт з APC суб'єкта, що раніше захопили модифіковану молекулу і перетворили її для презентації Т-клітинним епітопам. Спостерігають за проліферацією Т-клітин і порів-

нують з відповідним контролем (наприклад, Т-клітини у культурі, що контактували з APC, які перетворювали інтактний нативний амілоїдогенний поліпептид). Альтернативно проліферацію можна виміряти за допомогою вимірювання концентрації вивільнення відповідних цитокінів Т-клітинами у відповідь на розпізнавання ними чужорідних Т-клітин.

Уявляється вельми вірогідним, що, оскільки щонайменше один аналог кожного типу набору здатний викликати продукцію антитіл проти APP або Аβ, можна одержати імуногенну композицію, яка включає в себе щонайменше один аналог, здатний індукувати утворення антитіл проти немодифікованих APP або Аβ у виду тварин, де немодифіковані APP або Аβ являють собою власні білки, способом, що включає в себе змішування елемента(ів) набору, який(і) значимо індукує продукцію антитіл у виду тварин, що реагують з APP або Аβ з фармацевтично та імунологічно прийнятними носіями і/або розчинниками, і/або розріджувачами, і/або наповнювачами, необов'язково у комбінації щонайменше з одним фармацевтично та імунологічно прийнятним ад'ювантом.

Обговорювані вище тести наборів поліпептидів легко виконати за допомогою початкового одержання ряду взаємно простих послідовностей нуклеїнової кислоти або векторів відповідно до винаходу, вставлянням їх у відповідні вектори, що експресують, трансформацією векторами відповідних клітин-хазяїнів (або тварин-хазяїнів) і здійсненням експресії послідовностей нуклеїнової кислоти відповідно до винаходу. Після цих стадій може йти виділення продуктів експресії. Переважно, щоб послідовності нуклеїнової кислоти і/або вектори одержували способами, які включають в себе застосування способів молекулярної ампліфікації, такими як ПЛР або за допомогою синтезу нуклеїнової кислоти.

Специфічні амілоїдогенні мішені

Крім найчастіше асоційованих з хворобою Альцгеймера білків APP, ApoE4 і Tau, існує довгий список інших білків, так або інакше пов'язаних з AD або внаслідок їх безпосередньої присутності у бляшках і клубках у головному мозку при AD або внаслідок їх вираженої генетичної асоціації із збільшеним ризиком розвитку AD. Більшість з даних антигенів, якщо не всі, разом з обговорюваними вище Аβ, APP, пресеніліном і ApoE4, у визначених здійсненнях даного винаходу являють собою можливі білки-мішені. Ці можливі мішені вже всебічно обговорювалися у [WO 01/62284]. Отже, ці можливі мішені тут будуть тільки коротко згадані, тоді як більш докладне ґрунтовне обговорення можна знайти у [WO 01/62282], включеної сюди за допомогою посилання:

альфа1-антихімотрипсин (ACT); альфа2-макроглобулін; AβAD (алкогольдегідрогеназа, що зв'язує Аβ-пептид); APLP1 і -2 (білок, подібний до білка-попередника амілоїду 1 і 2); AMY117; Вах; Bcl-2; гідролаза блеоміцину; BRI/ABRI; хромогранін А; кластерин/ароJ; білок, що зв'язує CRF (фактор вивільнення кортикотропіну); EDTF (токсичний фактор, що походить з ендотелію); гепарансульфатпротеоглікани; білок-медіатор відповіді на колапсин людини 2; гентінгтин (білок хвороби Гентін-

гтона); ICAM-I; IL-6; антиген CD68, асоційований з лізосомами; P21 gas; PLC-дельта 1 (ізофермент дельта 1 фосфоліпази С); компонент сироваткового амілоїду Р (SAP); синаптофізин; синуклеїн (альфа-синуклеїн або NACP) і TGF-β1 (фактор росту β1, що трансформує).

Описані у цьому документі засоби і способи знижувальної регуляції APP або Аβ можна комбінувати з лікуванням, наприклад, активною специфічною імунотерапією проти будь-якого з даних інших амілоїдогенних поліпептидів.

Крім хвороби Альцгеймера, церебральна амілоїдна ангіопатія також являє собою хворобу, яка може бути відповідною мішенню для наданого у даному документі способу.

Припускають, що більшість способів імунізації проти APP або Аβ потрібно обмежити імунізацією, що приводить до утворення антитіл, які перехресно реагують з нативними APP або Аβ. Проте, у деяких випадках представляє інтерес індукувати клітинний імунітет у формі CTL-відповіді проти клітин, які презентують епітопи MHC класу I з амілоїдогенних поліпептидів - це може бути доцільним у тих випадках, коли зниження кількості клітин, що продукують APP або Аβ не приносить серйозного несприятливого ефекту. У тих випадках, коли бажана CTL-відповідь, переважно використовувати рекомендації авторів публікації [WO 00/20027]. Описи вказаних двох документів, таким чином, включені сюди за допомогою посилання.

Імуногенні носії

Можна одержати молекули, які включають в себе Т-хелперний епітоп і пептиди APP або Аβ, що являють собою або включають В-клітинні епітопи, ковалентно зв'язані з неімуногенною полімерною молекулою, що діє як носій, наприклад, полівалентний активований полігідроксиполімер, які будуть, як вказано вище, функціонувати як молекули вакцини, що містять тільки імунологічно значимі частини, і вони являють собою здійснення, що цікавлять, у варіантах d і e, які обговорюються вище. Можна застосовувати змішані або так звані універсальні Т-хелперні епітопи, наприклад, якщо мішень для вакцини являє собою власний білок APP або Аβ. Крім того, елементи, що посилюють імунологічну відповідь, можна також зв'язати разом з носієм і таким чином вони будуть діяти як ад'ювант. Такі елементи можуть являти собою манозу, тафтсин, мураміддипептид, мотиви CpG і т.п. В цьому випадку подальша ад'ювантна композиція вакцинного продукту може не бути необхідною, і продукт можна вводити у чистій воді або фізіологічному розчині.

Шляхом зв'язування епітопів цитотоксичних Т-клітин (CTL) з Т-хелперними епітопами можна генерувати CTL, специфічні у відношенні антигену, з якого одержаний CTL-епітоп. Елементи, що полегшують захоплення продукту у цитозоль APC, наприклад, макрофагів, такі як маноза, також можна зв'язувати з носієм, разом з CTL- і Т-хелперними епітопами, і посилити відповідь CTL.

Співвідношення В-клітинних і Т-хелперних епітопів (P2 і P30) у кінцевому продукті можна варіювати шляхом зміни концентрації даних пептидів на стадії синтезу. Як вказано вище, імуногенну моле-

кулу можна помітити, наприклад, манозою, тафтином, СрG-мотивами або іншими імуностимулювальними речовинами (описаними тут) шляхом їх додавання, якщо необхідно, за допомогою, наприклад, амінованих похідних цих речовин, до карбонатного буфера на стадії синтезу.

Якщо для комбінування пептидів, які містять В-клітинні і Т-хелперні епітопи APP або Aβ, застосовують нерозчинний активований полігідроксиполімер, то це можна, як вказано вище, провести у вигляді твердофазового синтезу, а кінцеві продукти можна зібрати і очистити шляхом промивання і фільтрації. Елементи для зв'язування з активованим трезилом полігідроксиполімером (пептиди, мітки і т.п.) можна додавати до полігідроксиполімеру при низьких рН, наприклад, при рН 4-5, і дозволяючи їм рівномірно перерозподілитися у "гелі" за допомогою пасивної дифузії. Далі, рН можна підняти до рН 9-10 для запуску реакції основних аміногруп на пептидах і міток з трезильними групами на полігідроксиполімері. Після зв'язування пептидів і, наприклад, імуностимулювальних елементів гель подрібнюють з формуванням частинок відповідного для імунізації розміру. Такий імуноген, таким чином, включає в себе:

а) щонайменше одну першу амінокислотну послідовність, одержану з APP або Aβ, де щонайменше одна перша амінокислотна послідовність містить у собі щонайменше один В-клітинний і/або щонайменше один CTL-епітоп, і

б) щонайменше одну другу амінокислотну послідовність, що включає в себе чужорідний епітоп Т-хелперних клітин,

де кожна з щонайменше першої і щонайменше другої амінокислотних послідовностей зв'язані з фармацевтично прийнятним активованим гідроксиполімерним носієм.

Для зв'язування амінокислотних послідовностей з полігідроксиполімером звичайно необхідно "активувати" полігідроксиполімер, відповідною реакційною групою, яка може формувати необхідний зв'язок з амінокислотними послідовностями.

Мається на увазі, що термін "полігідроксиполімер" має те ж значення, що і у [WO 00/05316], тобто полігідроксиполімер може мати точно такі ж характеристики, які конкретно вказані у даній заявці. Отже, полігідроксиполімер може бути водорозчинним або водонерозчинним (таким чином, потребуючи різних стадій синтезу у процесі одержання імуногена). Полігідроксиполімер можна вибрати з природних полігідроксиполімерів і синтетичних полігідроксиполімерів.

Конкретні і переважні полігідроксиполімери являють собою полісахариди, вибрані з ацетану, амілопектину, камеді агар-агару, агарози, альгінатів, гуміарабіку, карагенану, целюлози, циклодекстринів, декстрану, фуцеларану, галактоманану, желатину, ghatti, глюкану, глікогену, гуару, kaaya, konjac/A, смоли плодів річкового дерева, манану, пектину, psyllium, pullulan, крохмалю, tamarine, трагаканту, ксантану, ксилану і ксилоглюкану. Особливо переважним є декстран.

Однак полігідроксиполімер можна також вибрати з сильно розгалуженого полі(етиленіміну) (PEI), тетратісеніленвінілену, кевлару (довгі ланцюги поліпарафенілтерефталаміду), полі(уретанів),

полі(силоксанів), полідиметил-силоксану, силікону, полі(метилметакрилату) (PMMA), полівінілового спирту), полі(вінілпіролідону), полі(2-гідроксидиметилметакрилату), полі(N-вінілпіролідону), полівінілового спирту), полі(акрилової кислоти), політетрафторетилену (PTFE), поліакриламід, полі(етиленковинілацетату), полі(етиленгліколю) і похідних, полі(метакрилової кислоти), полілактидів (PLA), полігліколідів (PGA), полі(лактидогліколідів) (PLGA), поліангідридів і складних поліортоефірів.

Середня молекулярна маса полігідроксиполімеру, що розглядається (наприклад, перед активацією), звичайно складає щонайменше 1000, наприклад, щонайменше 2000, переважно - у діапазоні 2500-2000000, більш переважно - у діапазоні 3000-1000000, особливо - 5000-500000. У прикладах показано, що полігідроксиполімери із середньою масою у діапазоні 10000-200000 є особливо вигідними.

Полігідроксиполімер переважно є розчинним у воді у концентрації щонайменше 10мг/мл, переважно, щонайменше 25мг/мл, наприклад, щонайменше 50мг/мл, особливо щонайменше 100мг/мл, наприклад, щонайменше 150мг/мл при кімнатній температурі. Відомо, що декстран, навіть коли активований, як тут описано, задовольняє вимогам розчинності у воді.

Для деяких з найбільш цікавих полігідроксиполімерів співвідношення між групами С (атоми вуглецю) та ОН (гідроксильні групи) неактивованих полігідроксиполімерів (тобто нативні полігідроксиполімери до активації) знаходяться у діапазоні від 1,3 до 2,5, наприклад, 1,5-2,3, переважно - 1,6-2,1, особливо - 1,85-2,05. Поза зв'язком з якою-небудь конкретною теорією вважають, що таке співвідношення С/ОН неактивованого полігідроксиполімеру являє собою найбільш вигідний рівень гідрофільності. Полівініловий спирт і полісахариди являють собою приклади полігідроксиполімерів, що задовольняють даній вимозі. Вважають, що вказане вище співвідношення повинно залишатися приблизно таким же для активованого полігідроксиполімеру, тоді як співвідношення активації повинно бути істотно більш низьким.

Термін "полігідроксиполімерний носій" призначений для позначення ділянки імуногена, яка несе амінокислотні послідовності. Як загальне правило, полігідроксиполімерний носій має свої зовнішні межі, де амінокислотні послідовності можуть розщеплюватися пептидазами, наприклад, у клітині, що представляє антиген, яка процесує імуноген. Отже, полігідроксиполімерний носій може являти собою полігідроксиполімер з активаційною групою, де зв'язок між активаційною групою і амінокислотною послідовністю розщеплюється пептидазами в APC або гідроксиполімерний носій може являти собою гідроксиполімер з активаційною групою і, наприклад, містком, таким як одиночна L-амінокислота або ряд D-амінокислот, де остання частина містка може зв'язувати амінокислотні послідовності і розщеплюватися пептидазами в APC.

Як вказано вище, полігідроксиполімери несуть функціональні групи (активаційні групи), що полегшують закріплення пептидів на носії. У даній області відома величезна кількість застосовних фун-

кціональних груп, наприклад, трезилова (трифторетилсульфонілова), малеїмідна, паранітрофенілхлороформна, бромціанова, тозиллова (пара-толуолсульфонілова), трифлілова (трифторметан-сульфонілова), пентафторбензолсульфонілова і вінілсульфонова групи. Переважні приклади функціональних груп відповідно до даного винаходу являють собою трезилові, малеїмідні, тозиллові, трифлілові, пентафторбензолсульфонільні, пара-нітрофенілхлороформні та вінілсульфонові групи, серед яких трезилові, малеїмідні і тозиллові групи є особливо значимими.

Активовані трезилом полігідроксиполімери можна одержувати із застосуванням трезилхлориду, як описано для активації декстрану у прикладі 1 і [WO 00/05316 або як описано у Gregorius et al., J. Immunol. Meth. 181 (1995) 65-73].

Активовані малеїмідом полігідроксиполімери можна одержувати із застосуванням парамалеїмідифенілоціанату, як описано для активації декстрану у [прикладі 3 в WO 00/05316]. Альтернативно, малеїмідні групи можна ввести у полігідроксиполімер, наприклад, декстран, за допомогою дериватизації активованого трезилом полігідроксиполімеру (наприклад, активованого трезилом декстрану (TAD)) надлишком діамінової сполуки (як правило, $H_2N-C_nH_{2n}-NH_2$, де n складає 1-20, переважно 1-8), наприклад, 1,3-діамінопропану, і, згодом, реакцією введених у TAD аміногруп з реагентами, такими як сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), сульфосукцинімідил-4-(N-малеїмідометил)циклогексан-1-карбоксилат (сульфоSMCC), сукцинімідил-4-(парамалеїмідифеніл)бутират (SMPB), сульфосукцинімідил-4-(пара-малеїмідифеніл)бутират (сульфоSMPB), N-γ-малеїмідобутирилоксисукцинімідні складні ефіри (GMBS) або N-γ-малеїмідобутирилоксисульфосукцинімідні складні ефіри. Незважаючи на те, що різні реагенти і шляхи активації формально приводять до продуктів, які дещо відрізняються, активованих малеїмідом відносно зв'язку між функціональністю малеїмиду і залишковою вихідною гідроксильною групою, на якій проводили активацію, всі їх разом і окремо можна розглядати як "активовані малеїмідом полігідроксиполімери".

Активовані тозиллом полігідроксиполімери можна одержувати із застосуванням тозилхлориду, як описано для активації декстрану у [прикладі 2 у WO 00/05316]. Полігідроксиполімери, активовані трифлілом і пентафторбензолсульфонілом, одержують як аналоги, активовані тозиллом або трезилом, наприклад, із застосуванням відповідних кислот хлоридів.

Активовані бромціаном полігідроксиполімери можна одержувати шляхом реакції полігідроксиполімеру з бромціаном із застосуванням традиційних способів. Одержувані функціональні групи звичайно являють собою складні ефіри ціанової кислоти з двома гідроксильними групами полігідроксиполімеру.

Ступінь активації можна виразити як співвідношення між вільними гідроксильними групами і активаційними групами (тобто гідроксильними групами, що стали функціональними). Вважають, що

співвідношення між вільними гідроксильними групами полігідроксиполімеру і активаційними групами для одержання вигідного балансу між гідрофільністю і реактивністю полігідроксиполімеру повинно складати від 250:1 до 4:1. Переважно співвідношення складає від 100:1 до 6:1, більш переважно - від 60:1 до 8:1, особливо - від 40:1 до 10:1.

Особливо цікаві активовані полігідроксиполімери для застосування у способі для одержання застосовного у більшості випадків імунотена відповідно до винаходу являють собою активовані трезилом, тозиллом і малеїмідом полісахариди, особливо активований трезилом декстран (TAD), активований тозиллом декстран (TosAD) і активований малеїмідом декстран (MAD).

Переважно, щоб зв'язок між полігідроксиполімерним носієм і зв'язаними з ним амінокислотними послідовностями розщеплювався пептидазами, наприклад, такими як пептидази, активні при процесингу антигенів в APC. Отже, переважно, щоб щонайменше перша і щонайменше друга амінокислотні послідовності зв'язувалися з активованим полігідроксиполімерним носієм за допомогою амідного або пептидного зв'язку. Особливо переважно, щоб кожна з щонайменше першої і щонайменше другої амінокислотних послідовностей надавала азотну групу для амідного зв'язку, що відповідає їй.

Полігідроксиполімерний носій може не містити амінокислотних залишків, якщо потрібно, щоб активаційна група надавала частину зв'язку, що розщеплюється пептидазою, але, як вказано вище, носій може просто включати в себе спейсер, включаючи в себе щонайменше одну L-амінокислоту. Проте щонайменше перша і щонайменше друга амінокислотні послідовності звичайно зв'язуються з активованим варіантом полігідроксиполімеру за допомогою азоту на N-кінці амінокислотної послідовності.

Описаний вище імунотен, який застосовується у більшості випадків, відповідно до даного винаходу можна застосовувати у способах імунізації, по суті, як тут описано, для поліпептидних вакцин. Тобто всі описи, які обговорюються тут, що відносяться до доз, способів введення і складу поліпептидних вакцин для знижувальної регуляції амліодогенних поліпептидів з відповідними змінами використовують для звичайно застосовуваних імунотенів.

Звичайно застосовуваний безпечний спосіб вакцинації

Як обговорювалося вище, одне з переважних здійснень даного винаходу спричиняє застосування варіантів амліодогенних пептидів, нездатних надати власні T_H-епітопи, здатні керувати імунною відповіддю проти амліодогенного поліпептиду.

Однак автори даного винаходу вважають, що ця стратегія для розробки аутовакцин і для виклику аутоімунітету являє собою застосовну у більшості випадків технологію, яка є об'єктом винаходу сама по собі. Потрібно вважати особливо зручним випадки, коли шуканий для знижувальної регуляції аутоантиген знаходиться в організмі в істотному надлишку, так що можливо, що може відбутися аутостимуляція імунної відповіді. Отже, всі наведе-

дені вище описи даного здійснення, оскільки це відноситься до забезпечення аутоімунної відповіді проти APP або Аβ, з відповідними змінами, застосовні до імунізації проти власних поліпептидів, особливо тих, які представлені в істотних кількостях, щоб підтримувати імунну відповідь у формі неконтрольованого аутоімунного стану внаслідок того, що Т_H-епітопи відповідних власних білків направляють імунну відповідь.

Приклад 1

Підхід аутовакцинації для імунізації проти AD

Той факт, що миші, які характеризуються наявністю гена білка Аβ, не виявляють ніяких відхилень або несприятливих побічних ефектів, вказує на те, що усунення або зменшення кількостей Аβ є безпечним, [Zheng H. (1996)].

Опубліковані експериментальні дані, де трансгенних тварин імунізували проти трансгенного білка Аβ людини, вказують на те, що якщо можливо порушити ауто толерантність, то знижувальну регуляцію Аβ можна одержати за допомогою аутореактивних антитіл. Дані експерименти, крім того, вказують на те, що така знижувальна регуляція Аβ потенційно могла б як запобігати формуванню бляшок, так і очищати головний мозок від Аβ-бляшок, що вже сформувалися, [пор. Schenk et al. (1999)]. Однак звичайно неможливо одержати антитіла проти власних білків.

Таким чином, опубліковані дані не надають способів порушення істинної ауто толерантності по відношенню до істинних власних білків. Дані не дають також інформації про те, як можна переконатися у випадку необхідності, що імунна реакція направлена виключно або переважно проти відкладень Аβ, а не проти зв'язаного з клітинною мембраною білка-попередника Аβ (APP). Імунна відповідь, яку одержують за допомогою існуючої технології, буде переважно викликати імунну відповідь по відношенню до власних білків нерегульованим чином, так що можна одержати небажану або надмірну аутореактивність по відношенню до ділянок білка Аβ. Отже, із застосуванням існуючих стратегій імунізації, швидше всього, неможливо одержати сильні імунні відповіді по відношенню до власних білків; більш того це небезпечно через

потенційну сильну перехресну реактивність по відношенню до зв'язаного з клітинною мембраною APP, який присутній у великій кількості клітин ЦНС.

У даному винаході надані способи ефективного вироблення сильної імунної відповіді по відношенню до істинних власних білків, які потенційно можуть формувати бляшки і викликати серйозне захворювання ЦНС або інших частин організму. Із застосуванням даної технології буде розроблена безпечна і ефективна терапевтична вакцина на основі білка Аβ для лікування AD.

У світлі цього, можна очікувати, що AD, захворювання, яке за прогнозами могло завдати шкоди системі охорони здоров'я у наступному сторіччі, можна вилікувати; або такі описані вакцини можуть щонайменше створювати ефективний терапевтичний підхід до лікування симптомів і прогресії даного захворювання. Даний спосіб являє собою абсолютно новий імунологічний підхід до блокування накопичення амілоїду при AD, а також при інших неврологічних захворюваннях.

У таблиці нижче вказано 35 конструкцій, що розглядаються. Всі позиції подані у таблиці відносно стартового метіоніну APP (перша амінокислота у SEQ ID NO:2) і включають як стартову, так і кінцеву амінокислоту, наприклад, фрагмент 672-714 включає як амінокислоту 672, так і 714. Стартові і кінцеві положення для P2 і P30 показують, що епітоп заміщає частину фрагмента APP у вказаних положеннях (обидва положення включені у заміну), у більшості конструкцій введені епітопи заміщають фрагмент, що дорівнює по довжині епітопу. Зірочки у таблиці означають наступне:

*) Тільки одне положення для P2 і P30 вказує на те, що у даному положенні епітоп вставляли у похідне APP (епітоп починається з амінокислоти, що примикає до вказаного положення з боку С-кінця).

**) Конструкція 34 містить три ідентичних фрагменти APP, розділених за допомогою P30 і P2, відповідно.

***) Конструкція 35 містить дев'ять ідентичних фрагментів APP, розділених за допомогою епітопів P30 і P2, що чергуються.

Конструкції APP Auto Vac

| № варіанта | Початок фрагмента APP відносно 1 ак APP | Кінець фрагмента APP відносно 1 ак APP | Положення епітопу P2 відносно 1 ак APP | Положення епітопу P30 відносно 1 ак APP | Довжина молекули |
|------------|---|--|--|---|------------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 1 | 630 | 770 | 656-670 | 635-655 | 141 |
| 2 | 630 | 714 | 656-670 | 635-655 | 85 |
| 3 | 672 | 770 | 735-749 | 714-728 | 99 |
| 4 | 672 | 770 | | 714-728 | 99 |
| 5 | 672 | 770 | 714-728 | | 99 |
| 6 | 672 | 770 | 723* | 723* | 135 |
| 7 | 672 | 770 | | 723* | 120 |
| 8 | 672 | 770 | 723* | | 114 |
| 9 | 672 | 714 | | 672* | 64 |
| 10 | 672 | 714 | | 714* | 64 |
| 11 | 672 | 714 | 672* | | 58 |

Конструкції APP Auto Vac

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|----|-----|-----|-------------------|-------------------|-----|
| 12 | 672 | 714 | 714* | | 58 |
| 13 | 672 | 714 | 714* | 672* | 79 |
| 14 | 672 | 714 | 680-694 | | 43 |
| 14 | 672 | 714 | 685-799 | | 43 |
| 16 | 672 | 714 | 690-704 | | 43 |
| 17 | 672 | 714 | 695-709 | | 43 |
| 18 | 672 | 714 | | 675-695 | 43 |
| 19 | 672 | 714 | | 680-700 | 43 |
| 20 | 672 | 714 | | 685-705 | 43 |
| 21 | 672 | 714 | | 690-710 | 43 |
| 22 | 672 | 714 | 680* | 680* | 79 |
| 23 | 672 | 714 | 690* | 690* | 79 |
| 24 | 672 | 714 | 700* | 700* | 79 |
| 25 | 672 | 714 | 710* | 710* | 79 |
| 26 | 672 | 714 | | 680* | 64 |
| 27 | 672 | 714 | | 690* | 64 |
| 28 | 672 | 714 | | 700* | 64 |
| 29 | 672 | 714 | | 710* | 64 |
| 30 | 672 | 714 | 680* | | 58 |
| 31 | 672 | 714 | 690* | | 58 |
| 32 | 672 | 714 | 700* | | 58 |
| 33 | 672 | 714 | 710* | | 58 |
| 34 | 672 | 714 | Після повтору 1** | Після повтору 2** | 165 |
| 35 | 672 | 714 | 34*×3* | 34×3*** | 165 |

Ділянка APP, проти якої найбільш цікаво одержати відповідь, складає 43 амінокислоти коров'ячого пептиду Aβ (Aβ-43, що відповідає SEQ ID NO:2, залишки 672-714), який є основною складовою амілоїдних бляшок у головному мозку при AD. Даний фрагмент APP є частиною всіх перерахованих вище конструкцій.

Варіанти 1 і 2 містять ділянку APP проти ходу транскрипції від Aβ-43, де помістили модельні епітопи P2 і P30. Всі варіанти 1 і 3-8 містять фрагмент C-100, що є, як показано, нейротоксичним - фрагмент C-100 відповідає амінокислотним залишкам 714-770 з SEQ ID NO:2. У варіантах 3-5 епітопи заміщають частину фрагмента C-100, у той час як у варіантах 6-8 епітопи вставляли у C-100.

Варіанти 9-35 містять тільки коров'ячий білок Aβ-43. У варіантах 9-13 P2 і P30 злиті з тим або іншим кінцем Aβ-43; у 14-21 P2 і P30 заміщають частину Aβ-43; у 22-33 P2 і P30 вставляли в Aβ-43; 34 містить три ідентичних фрагменти Aβ-43, розділених P30 і P2, відповідно; 35 містить 9 повторів Aβ-43, розділених епітопами P2 і P30, що чергуються.

Відповідно до даного винаходу, в імуногенних аналогах можна також застосовувати укорочені частини білка Aβ-43, що обговорюється вище. Особливо переважними є укорочені частини Aβ(1-42), Aβ(1-40), Aβ(1-39), Aβ(1-35), Aβ(1-34), Aβ(1-28), Aβ(1-12), Aβ(1-5), Aβ(13-28), Aβ(13-35), Aβ(17-28), Aβ(25-35), Aβ(35-40), Aβ(36-42), і Aβ(35-42) (де номери у дужках вказують амінокислотні ділянки Aβ-43, які складають відповідний фрагмент, наприклад, Aβ(35-40) ідентичний амінокислотам 706-711 у SEQ ID NO:2). Всі дані варіанти з укороченими частинами Aβ-43 можна одержати з фрагме-

нтами Aβ, описаними тут, особливо з варіантами 9, 10, 11, 12, і 13.

У деяких випадках переважно, щоб Aβ-43 або його фрагменти були мутантними. Особливо переважними є варіанти заміни, в яких метіонін у положенні 35 Aβ-43 заміщений переважно на лейцин або ізолейцин або просто видалений. Особливо переважні аналоги містять одиночний метіонін, розташований на С-кінці, або у зв'язку з тим, що він є природним в амілоїдогенному поліпептиді або чужорідному епітопі T_H, або у зв'язку з тим, що його вставили або додали. Отже, також переважно, щоб та ділянка аналога, яка включає в себе чужорідний епітоп T_H, була вільною від метіоніну, за винятком можливого С-кінцевого розташування метіоніну.

Фактично, як правило, переважно, щоб всі аналоги APP або Aβ, які застосовують відповідно до даного винаходу, володіли загальною характеристикою простого включення одного-єдиного метіоніну, розташованого в аналогу як С-кінцева амінокислота, а всі інші метіоніни як в амілоїдогенному поліпептиді, так і в чужорідному епітопі T_H, були видалені або заміщені іншою амінокислотою.

Цікавою додатковою мутацією є делеція або заміщення фенілаланіну у положенні 19 в Aβ-43, і особливо переважно, щоб дана мутація являла собою заміну цього залишку фенілаланіну на пролін.

Наступна таблиця визначає групу особливо переважних конструкцій, що функціонують з укороченими формами або мутаціями Aβ-43:

| № варіанта | Сегмент Аβ, що застосовується у молекулі, відносно 1 ак Аβ (1-42/43) | Положення сегмента Аβ відносно 1 ак молекули | Положення епітопу Р2 відносно 1 ак молекули | Положення епітопу Р30 відносно 1 ак молекули | Загальна довжина молекули (ак) |
|------------|--|--|---|--|--------------------------------|
| 36 | 1-28 | 22-49 | 50-64 | 1-21 | 64 |
| 37 | 1-12 (а)+13-28 (b) | 1-12 (а)+49-64 (b) | 34-48 | 13-33 | 64 |
| 38 | 1-12 (x3) | 1-12, 34-45, 61-72 | 46-60 | 13-33 | 72 |
| 39 | 13-28 (x3) | 1-16, 38-53, 69-84 | 54-68 | 17-37 | 84 |
| 40 | 1-12 (а)+13-35 (b)+36-42 (c) | 1-12 (а)+34-56 (b)+72-78 (c) | 57-71 | 13-33 | 78 |
| 41 | 1-28 (x 3) | 1-28, 50-77, 93-120 | 78-92 | 29-49 | 120 |
| 42 | 1-43 (F19P/M35K) | 1-43 | 65-79 | 44-64 | 79 |

У даній таблиці сегмент Аβ, що використовується у молекулі, вказаний за допомогою номерів амінокислот відносно 1 ак молекули Аβ (1-42/43), тобто 1-28 означає, що у молекулі використали фрагмент Аβ (1-42/43) 1-28. Якщо використали два або більше різних фрагментів, у таблиці вказані обидва, тобто 1-12 (а)+13-28 (b) означає, що у молекулі використаний як фрагмент Аβ (1-42/43) 1-12, так і фрагмент 13-28.

Також якщо один і той же сегмент присутній у конструкції більш ніж в одній копії, це вказано у таблиці, тобто 1-12 (x3) вказує на те, що фрагмент Аβ (1-42/43) 1-12 присутній у конструкції у трьох копіях.

Далі, положення сегмента Аβ у молекулі вказане за допомогою позицій амінокислот відносно першої амінокислоти у молекулі, тобто 22-49 вказує на те, що фрагмент Аβ, який розглядається, розташований у молекулі від 22 амінокислоти до 49 амінокислоти, включаючи обидва положення. Положення епітопів Р2 і Р30 позначені таким же чином. Якщо у молекулі використали два або більше різних фрагментів Аβ, всі їх положення вказані, тобто 1-12 (а)+49-64 (b) означає, що фрагмент (а) розташовується у молекулі від ак 1 до ак 12, і фрагмент (b) - від ак 49 до 64.

Більш того якщо у молекулі присутня більш ніж одна копія одного і того ж фрагмента, вказані положення всіх копій, тобто 1-12, 34-45, 61-72 показує, що три копії фрагмента Аβ розміщуються у молекулі у положеннях 1-12, 34-45 і 61-72, відповідно.

Нарешті, зазначення сумарної довжини кожної молекули включає і фрагмент(и) Аβ, і епітопи Р2 і Р30.

Варіант 42 містить дві амінокислотні заміни у положеннях 19 (phe на pro) і 35 (met на lys), як це вказано у стовпці, що представляє фрагменти Аβ.

Див. Фігуру 1 і таблиці вище відносно деталей конкретних точок введення чужорідних Т-клітинних епітопів.

Один з додаткових типів конструкцій є особливо переважним. Оскільки однією із задач даного винаходу є уникнення руйнування клітин, що продукують АРР, в той час як усунення Аβ є бажаним, вважається придатним одержати конструкції аутовакцин, що включають в себе тільки ті частини Аβ, які, коли присутні в АРР, не експонуються у позаклітинній фазі. Таким чином, подібні конструкції повинні містити щонайменше один В-клітинний епітоп, одержаний з амінокислотного фрагмента, що визначається амінокислотами 700-714 в SEQ ID NO:2. Оскільки передбачено, що такий короткий

поліпептидний фрагмент буде тільки слабо імуногенним, переважно, щоб така конструкція аутовакцини складалася з декількох копій В-клітинного епітопу, наприклад, у вигляді конструкції, що має структуру, показану у формулі 1 в докладному описі даного винаходу, пор. вище. У даній версії формули 1 терміни амілоїд_{e1}-амілоїд_{ex} являють собою х В-клітинний епітоп, що містить послідовність амінокислот, одержану з амінокислот 700-714 SEQ ID NO:2. Переважна альтернатива являє собою детально описану вище можливість зв'язування амілоїдогенного (полі)пептиду з вибраним Т-хелперним епітопом за допомогою амідного зв'язку з полісахаридною молекулою-носієм, таким способом стають можливими множинні презентації "слабкого" епітопу, сконструйованого амінокислотами 700-714 SEQ ID NO:2, а також стає можливим вибір оптимального співвідношення між В-клітинними і Т-клітинними епітопами.

Приклад 2

Імунізація трансгенних мишей Аβ і модифікованими білками відповідно до винаходу.

Конструювання ДНК, що кодує hAB43+-34. Ген hAB43+-34 конструювали у декілька стадій. Спочатку одержували фрагмент ПЛР з праймерами MEN#801 (SEQ ID NO:10) і MEN#802 (SEQ ID NO:11), застосовуючи як матрицю праймер MEN#800 (SEQ ID NO:9). MEN#800 кодує фрагмент abeta-43 людини з оптимізованими для E. coli кодонами. MEN#801 і 802 додають до фрагмента відповідні ділянки рестрикції.

Фрагмент ПЛР очищали, розщеплювали NcoI і HindIII, знову очищали і клонували у розщепленому NcoI-HindIII і очищеному векторі для експресії в E. coli pET28b+. Одержану плазмиду, що кодує Аβ-43 дикого типу людини, назвали pAB1.

На наступній стадії до С-кінця молекули додавали Т-хелперний епітоп Р2. Праймер MEN#806 (SEQ ID NO:12) містить послідовність, що кодує епітоп Р2, таким чином, продукт злиття Р2 і abeta-43 одержують за допомогою реакції ПЛР.

Клонування проводили за допомогою одержання фрагмента ПЛР з праймерами MEN#178 (SEQ ID NO:8) і MEN#806, застосовуючи як матрицю pAB1. Фрагмент очищали, розщеплювали NcoI і HindIII, знову очищали і клонували у розщепленому NcoI-HindIII і очищеному векторі pET28b+. Одержану плазмиду назвали pAB2.

Аналогічним способом одержували іншу плазмиду, яка несе кодувальну послідовність Аβ-43 з іншим Т-хелперним епітопом, Р30, доданим до N-кінця. Це виконували за допомогою одержання фрагмента ПЛР з праймерами MEN#105 (SEQ ID

NO:7) і MEN807 (SEQ ID NO:13), застосовуючи як матрицю pAB1.

Фрагмент очищали, розщеплювали NcoI і HindIII, знову очищали і клонували у розщепленому NcoI-HindIII і очищеному векторі pET28b+. Одержану плазмиду назвали pAB3.

На третій стадії другий повтор Аβ-43 з С-кінця додавали до епітопу P2 плазмиди pAB2 за допомогою праймера MEN809 (SEQ ID NO:14). У той же час MEN809 створює сайт BamHI безпосередньо після повтору Аβ-43. Фрагмент ПЛР одержували за праймерами MEN178 і MEN809, застосовуючи як матрицю pAB2. Фрагмент розщеплювали NcoI і HindIII, очищали і клонували у розщепленому NcoI-HindIII і очищеному векторі pET28b+. Дану плазмиду назвали pAB4.

Нарешті, послідовність епітопу P30 - повтор Аβ-43 з pAB3 клонували у плазмиду pAB4. Це виконували за допомогою одержання фрагмента ПЛР з праймерами MEN811 (SEQ ID NO:16) і MEN105, застосовуючи як матрицю pAB3. Фрагмент очищали і використовували як праймер у подальшій ПЛР з MEN810 (SEQ ID NO:15), застосовуючи як матрицю pAB3. Одержаний фрагмент очищали, розщеплювали BamHI і HindIII і клонували у розщеплену BamHI-HindIII і очищену плазмиду pAB4. Одержана плазида, pAB5, кодує молекулу hAB43+-34.

Всі способи ПЛР і клонування по суті виконували, як описано в [Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989 "Molecular cloning: a laboratory manual". 2nd. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.].

Для всіх способів клонування застосовували клітини E. coli K-12, штам Top-10 F' (Stratagene, USA). Вектор pET28b+ одержували в Novagen, USA. Всі праймери синтезували у DNA Technology, Denmark.

Експресія і очищення hAB43+-34. Білок hAB43+-34, що кодується pAB5, експресували у клітинах E. coli BL21-Gold (Novagen) як описано виробниками системи pET28b+ (Novagen).

Експресований білок hAB43+-34 очищали до більш ніж 85% чистоти за допомогою промивання тілець включення з подальшою катіонообмінною хроматографією у присутності 6М сечовини із застосуванням автоматизованого робочого місця для очищення BioCad (PerSeptive Biosystems, USA). Потім сечовину видаляли за допомогою ступінчатого діалізу проти розчину, що містить кількості сечовини, які зменшуються. Кінцевий буфер являв собою 10mM Tris, pH 8,5.

Дослідження імунізації. Для дослідження використовували мишей, трансгенних по APP (білок-попередник хвороби Алідгеймера) людини. Дані миші, які називаються TgRND8+, експресують мутантну форму APP, що приводить до високих концентрацій Аβ-40 і Аβ-42 у головному мозку мишей [Janus, C. et al.].

Мишей (8-10 мишей у групі) імунізували або Abeta-42 (SEQ ID NO:2, залишки 673-714, синтезованим за допомогою стандартного способу з Fmoc), або варіантом hAB43+-34 (конструкція 34 у таблиці в прикладі 1, одержана рекомбінантним способом) чотири рази з двотижневими інтервалами. Дози складали 100мг для Аβ або 50мг для hAB43+-34. У мишей брали кров на 43 добу (після трьох ін'єкцій) і після 52 дб (після чотирьох ін'єкцій), і для визначення рівня специфічних титрів антитіл проти Аβ-42 із застосуванням прямого ELISA Аβ-42 використовували сироватку.

Наступна таблиця показує середні відносні титри антитіл проти Abeta-42.

| Імуноген | 43 доби (після 3 імунізацій) | 52 доби (після 4 імунізацій) |
|-----------|------------------------------|------------------------------|
| Аβ-42 | 4000 | 3000 |
| hAB43+-34 | 16000 | 23000 |

Як стає зрозуміло, титри антитіл, одержані при імунізації варіантом Аβ hAB43+-34, вище приблизно у 4 рази і в 7,5 разів після 3 і 4 імунізацій, відповідно, ніж титри, одержані із застосуванням як імуногена незміненого Аβ-42 дикого типу. Даний факт у перспективі можна оцінити додатково, якщо брати до уваги той факт, що кількість варіанта, який застосовується для імунізації, складає тільки 50% від кількості послідовності дикого типу, що застосовується для імунізації.

Приклад 3

Синтез Аβ співполімерної пептидної вакцини із застосуванням активованого полігідроксиполімеру як агента, що структурує.

Вступ. Традиційна кон'югована вакцина складається з (полі)пептиду, ковалентно зв'язаного з білком-носієм. Пептид містить В-клітинний(і) епітоп(и), а білок-носіє надає Т-хелперні епітопи. Однак більшість білків-носіїв у нормі є непридатними як джерела Т-хелперних епітопів, оскільки тільки незначна частина всієї послідовності містить придатні Т-хелперні епітопи. Такі епітопи можна ви-

значити і синтезувати як пептиди, наприклад, по 12-15 амінокислот. Якщо дані пептиди ковалентно зв'язані з пептидами, які містять В-клітинні епітопи, наприклад, за допомогою полівалентного активованого полігідроксиполімеру, можна одержати молекулу вакцини, яка містить тільки значимі ділянки. Надалі можна одержати вакцинний кон'югат, який містить оптимізоване співвідношення між В-клітинними і Т-клітинними епітопами.

Синтез активованого полігідроксиполімеру. Полігідроксиполімери, такі як декстран, крохмаль, агароза і т.д. можна активувати 2,2,2-трифторетансульфоніл-хлоридом (трезилхлоридом) або за допомогою гомогенного синтезу (декстран), розчиненням у N-метилпіролідоні (NMP) або способом гетерогенного синтезу (крохмаль, агароза, структурований декстран), наприклад, в ацетоні.

У сухих умовах в 500мл круглодонну колбу, обладнану магнітом для перемішування, до висушеного виморожування, водорозчинного декстрану (4,5г, 83моль, очищений до ступеня, прида-

тного для клінічного застосування, Mw (середини) 78000) додавали 225мл сухого N-метилпіролідону (NMP). Колбу поміщали у масляну баню з температурою 60°C з магнітним перемішуванням. Температуру підіймали до 92°C на період більше 20хв. При розчиненні декстрану колбу зразу ж видаляли з масляної бані, і температуру у бані знижували до 40°C. Колбу знову поміщали у масляну баню, все ще з магнітним перемішуванням, і по краплях додавали трезилхлорид (2,764мл, 25моль). Через 15хв. по краплях додавали сухий піридин (безводний, 2,020мл, 25моль). Колбу видаляли з масляної бані і проводили перемішування протягом 1 години при кімнатній температурі. Продукт (декстран, активований трезилом, TAD) осаджували в 1200мл холодного етанолу (99,9%). Супернатант зливали і осад збирали в 50мл поліпропіленові пробірки у центрифугі при 2000об./хв. Осад розчиняли в 50мл 0,5% оцтової кислоти, 2 рази діалізували проти 5000мл 0,5% оцтової кислоти і сушили виморожуванням. TAD можна зберігати при -20°C у вигляді висушеного виморожуванням порошку.

Нерозчинний полігідроксиполімер, такий як агароза або структурований декстран, можна активувати трезилом за допомогою приготування суспензії полігідроксиполімеру, наприклад, в ацетоні, і проведення синтезу у вигляді твердофазового синтезу. Активований полігідроксиполімер можна зібрати за допомогою фільтрації. Відповідні способи опубліковані, наприклад, у [Nilsson K and Mosbach K (1987), *Methods in Enzymology* 135, p.67, і в Hemansson GT et al. (1992), in "Immobilized Affinity Ligand Techniques", Academic Press, Inc., p.87].

Синтез співполімерних пептидних вакцин A Beta. TAD (10мг) розчиняли в 100мкл H₂O і 1000мкл карбонатного буфера, рН 9,6, що містить 5мг Aβ-42 (SEQ ID NO:2, залишки 673-714), 2,5мг P2 (SEQ ID NO:4) і додавали 2,5мг P30 (SEQ ID NO:6). Всі пептиди, Aβ-42, P2 і P30, містили захищені лізинові групи: вони знаходилися у формі лізинових груп, захищених 1-(4,4-диметил-2,6-діоксоциклогекс-1-іліден)етилом (Dde). Пептиди одержували стандартним способом з Fmoc, де стандартний Fmoc-Lys(Boc)-OH заміщали на Fmoc-Lys(Dde)-OH [одержано в Novabiochem, кат. №04-12-1121], тобто ε-аміногрупу лізину захищали Dde замість Boc.

Вимірювали величину рН і доводили до 9,6 за допомогою 1М HCl. Через 2,5 години при кімнатній температурі додавали гідрозин з 80% розчину до кінцевої концентрації гідрозину 8%, інкубували розчин ще 30хв. при кімнатній температурі, і зразу ж після цього сушили виморожуванням. Висушений виморожуванням продукт розчиняли в H₂O і діалізували значною мірою проти H₂O перед кінцевим сушінням виморожуванням.

Співвідношення між В-клітинними епітопами (Aβ) і Т-хелперними епітопами (P2 і P30) у кінцевому продукті можна варіювати, застосовуючи різні концентрації цих пептидів на стадії синтезу. Більш того у кінцевий продукт можна ввести мітку, наприклад, манозу (як мішень для кон'югації з APC) за допомогою додавання амінованої манози до карбонатного буфера на стадії синтезу.

Якщо застосовують нерозчинний активований полігідроксиполімер, щоб зв'язувати пептиди, які містять В-клітинний епітоп і Т-хелперні епітопи, зв'язування з полімером можна проводити як твердофазовий синтез, а кінцевий продукт збирають і очищають шляхом промивання і фільтрації.

Як вказано в основному описі, описаний у даному документі підхід для одержання вакцини на основі пептидів можна застосовувати для будь-якого іншого поліпептидного антигену, де буде зручно одержувати чисту синтетичну пептидну вакцину, і де поліпептидний антиген, що розглядається, забезпечує достатню імуногенність в одному окремому пептиді.

Приклад 4

Синтетичні співполімерні пептидні вакцини

TAD (10мг) розчиняли в 100мкл H₂O і 1000мкл карбонатного буфера, рН 9,6, що містить 1-5мг пептиду А (будь-якого імуногенного пептиду, що представляє інтерес!), додавали 1-5мг P2 (епітопу P2 дифтерійного анатоксину) і 1-5мг P30 (епітопу P30 дифтерійного анатоксину). Вимірювали величину рН і доводили до 9,6, використовуючи 0,1М HCl.

Після 2,5 годин при кімнатній температурі розчин потім зразу ж висушували виморожуванням. Висушений виморожуванням продукт розчиняли в H₂O, і перед кінцевим сушінням виморожуванням значною мірою діалізували проти H₂O або видаляли солі гель-фільтрацією на колонці. У випадку наявності лізину у послідовності пептидів, ε-амін у бічному ланцюгу лізину потрібно захистити за допомогою Dde із застосуванням у синтезі похідного Fmoc-Lys(Dde)-OH (запропонований Gregorius and Theisen 2001). Після зв'язування додавали гідрозин з 80% розчину до кінцевої концентрації гідрозину у межах 1-20%, та інкубували розчин ще 30хв. при кімнатній температурі, після цього зразу ж проводили сушіння виморожуванням, і перед кінцевим сушінням виморожуванням значною мірою діалізували проти H₂O або видаляли солі шляхом гель-фільтрації на колонці. Принцип у схематичній формі викладений на Фігурі 2.

Як "пептид А" автори даного винаходу використовували такі імуногени як імуногени з коротким С-кінцевим фрагментом білка OspC з *Borrelia burgdorferi*, а як "пептид В" - з епітопом дифтерійного анатоксину (P2 або P30). Результати досліджень імунізації цим антигеном виявили, що тільки імуноген відповідно до винаходу, який включає в себе фрагмент OspC і чужорідний дифтерійний епітоп, що відповідає гаплотипу МНС вакцинованих мишей, був здатний індукувати у цих мишей антитіла, які реагують з OspC. Навпаки, молекула, що містить тільки пептид OspC, була нездатна індукувати продукцію антитіл, і те ж саме було справедливим для суміші 2 імуногенів, де один містив OspC, а інший - епітоп. Тому зроблений висновок, що включення в один і той же полігідроксиполімерний носій є кращим, якщо не невід'ємним, для індукції продукції антитіл проти короткого пептидного гаптену, подібного до OspC.

Список посилань

1. Brookmeyer, R.; Gray, S.; Kawas, C. (1998). Projections of Alzheimer's Disease in the United States and the Public Health Impact of Delaying

Disease Onset. *American Journal of Public Health*, 88(9), 1337-1342.

2. Buttini, M.L.; Orth, M.; Bellosta, S.; Akeefe, H.; Pitas, R.E.; Wyss-Coray, T.; Mucke, L.; Mahley, R.W. (1999). Expression of Human Apolipoprotein E3 or E4 in the Brains of Apoe^{-/-} Mice: Isoform-Specific Effects on Neurodegeneration. *Journal of Neuroscience*, 19, 4867-4880.

3. Clark, L.N.; Poorkaj, P.; Wszoiek, Z.; Geschwind, D.H.; Nasreddine, Z.S.; Miller, B.; Li, D.; Payami, H.; Awert, F.; Markopoulou, K.; Andreadis, A.; D'Souza, I.; Lee, V.M.; Reed, L.; Trojanowski, J.Q.; Zhukareva, V.; Bird, T.; Schellenberg, G.; Wilhelmsen, K.C. (1998). Pathogenic Implications of Mutations in the Tau Gene in Pallido-Ponto-Nigral Degeneration and Related Neurodegenerative Disorders Linked to Chromosome 17. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 95(22), 13103-13107.

4. Gupta, R. K. et al. (1998), *Dev Biol Stand.* 92: 63-78.

5. Hsiao K. et al. (1998) «Transgenic mice expressing Alzheimer amyloid precursor proteins», *Exp. Gerontol.* 33(7-8), 883-889.

6. Hutton, M.; Lendon, C.L.; Rizzu, P.; Baker, M.; Froelich, S.; Houlden, H.; Pickering-Brown, S.; Chakraborty, S.; Isaacs, A.; Grover, A.; Hackett, J.; Adamson, J.; Lincoln, S.; Dickson, D.; Davies, P.; Petersen, R.C.; Stevens, M.; de Graaff, E.; Wauters, E.; van Baren, J.; Hillebrand, M.; Joosse, M.; Kwon, J.M.; Nowotny, P.; Che, L.K.; Norton, J.; Morris, J.C.; Reed, L.E.; Trojanowski, J.; Basun, H.; Lannfelt, L.; Neystat, M.; Fahn, S.; Dark, F.; Tannenberg, T.; Dodd, P.; Hayward, N.; Kwok, J.B.J.; Schofield, P.R.; Andreadis, A.; Snowden, J.; Craufurd, D.; Neary, D.; Owen, F.; Oostra, B.A.; Hardy, J.; Goate, A.; van Swieten, J.; Mann, D.; Lynch, T.; Heutink, P. (1998). Association of Missense and 5'-Splice-Site Mutations in Tau with the Inherited Dementia FTDP-17. *Nature*, 393, 702-705.

7. Janus, C et al. (2000), *Nature* 408: 979-982.

8. Kas, H.S. (1997) *J Microencapsul* 14: 689-711.

9. Leon, J.; Cheng, C.K.; Neumann, P.J. (1998). Alzheimer's Disease Care: Costs and Potential Savings. *Health Affairs*, 17(6), 206-216.

10. Lippa C. F. et al. (1998) Ab-42 deposition precedes other changes in PS-1 Alzheimer's disease. *Lancet* 352, 1117-1118.

11. Luo, J.-J.; Wallace, W.; Riccioni, T.; Ingram, O.K.; Roth, G.S.; Kusiak, J.W. (1999). Death of PC 12 Cells and Hippocampal Neurons Induced by Adeno-viral-

Mediated FAD Human Amyloid Precursor Protein Gene Expression. *Journal of Neuroscience Research*, 55(5), 629-642.

12. Naruse, S.; Thinakaran, G.; Luo, J.-J.; Kusiak, J.W.; Tomita, T.; Iwatsubo, T.; Qian, X.; Ginty, D.D.; Price, D.L.; Borchelt, D.R.; Wong, P.C.; Sisodia, S.S. (1998). Effects of PS1 Deficiency on Membrane Protein Trafficking in Neurons. *Neuron*, 21(5), 1213-1231.

13. National Institute on Aging Progress Report on Alzheimer's Disease, 1999, NIH Publication № 99-4664.

14. Pietrobon, P.J. (1995), *Pharm Biotechnol.* 6: 347-61

Poorkaj, P.; Bird, T.D.; Wijsman, E.; Nemens, E.; Garruto, R.M.; Anderson, L.; Andreadis, A.; Wiederhold, W.C.; Raskind, M.; Schellenberg, G.D. (1998). Tau Is a Candidate Gene for Chromosome 17 Frontotemporal Dementia. *Annals of Neurology*, 43, 815-825.

15. Schenk, D.; Barbour, R.; Dunn, W.; Gordon, G.; Grajeda, H.; Guido, T.; Hu, K.; Huang, J.; Johnson-Wood, K.; Khan, K.; Kholodenko, D.; Lee, M.; Liao, Z.; Lieberburg, I.; Motter, R.; Mutter, L.; Soriano, F.; Shopp, G.; Vasquez, N.; Vandever, C.; Walker, S.; Wogulis, M.; Yednock, T.; Games, D.; Seubert, P. (1999). Immunization with A-beta Attenuates Alzheimer's Disease-Like Pathology in the PDAPP Mouse. *Nature*, 400 (6740), 173-177.

16. Shekunov, B. et al. (1999), *J. Crystal Growth* 198/199: 1345-1351.

17. Spillantini, M.G.; Murrell, J.R.; Goedert, M.; Farlow, M.R.; Klug, A.; Ghetti, B. (1998). Mutation in the Tau Gene in Familial Multiple System Tauopathy with Presenile Dementia. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 95(13), 7737-7741.

18. Strittmatter, W.J.; Saunders, A.M.; Schmechel, D.; Pericak-Vance, M.; Enghild, J.; Salvesen, G.S.; Roses, A.D. (1993). Apolipoprotein E: High-Avidity Binding to Ap and Increased Frequency of Type 4 Allele in Late-Onset Familial Alzheimer Disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 90, 1977-1981.

19. Vidal, R.; Frangione, B.; Rostagno, A.; Mead, S.; Revesz, T.; Plant, G.; Ghiso, J. (1999). A Stop-Codon Mutation in the BRI Gene Associated with Familial British Dementia. *Nature*, 399: 776-781.

20. Zheng H. (1996). Mice deficient for the amyloid precursor protein gene. *Ann. NY Acad. Sci.*, 777, 421-426.

21. York, P. (1999), *PSTT* 11: 430-440.

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Pharmexa A/S

<120> Новий спосіб знижувальної регуляції амілоїду

<130> P1014PC1

<140>

<141>

<160> 16

<170> PatentIn Ver. 3.1

<210> 1

<211> 2313

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2313)

<220>

<221> різні властивості

<222> (2098)..(2169)

<223> нуклеотиди, що кодують трансмембранну ділянку

<220>

<221> різні властивості

<222> (2014)..(2313)

<223> нуклеотиди, що кодують C-100

<220>

<221> різні властивості

<222> (2016)..(2144)

<223> Abeta 42/43

<220>

<221> різні властивості

<222> (2014)..(2142)

<223> Abeta 42/43

<400> 1

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| atg | ctg | ccc | ggt | tig | gca | ctg | ctc | ctg | ctg | gcc | gcc | tgg | acg | gct | cgg | 48 |
| Met | Leu | Pro | Gly | Leu | Ala | Leu | Leu | Leu | Leu | Ala | Ala | Trp | Thr | Ala | Arg | |
| 1 | | | | 5 | | | | 10 | | | | | 15 | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| gcg | ctg | gag | gta | ccc | act | gat | ggt | aat | gct | ggc | ctg | ctg | gct | gaa | ccc | 96 |
| Ala | Leu | Glu | Val | Pro | Thr | Asp | Gly | Asn | Ala | Gly | Leu | Leu | Ala | Glu | Pro | |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| cag | att | gcc | atg | ttc | tgt | ggc | aga | ctg | aac | atg | cac | atg | aat | gtc | cag | 144 |
| Gln | Ile | Ala | Met | Phe | Cys | Gly | Arg | Leu | Asn | Met | His | Met | Asn | Val | Gln | |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | |

| 67 | 85815 | 68 | |
|---|-------|-----|-----|
| aat ggg aag tgg gat tca gat cca tca ggg acc aaa acc tgc att gat | | | 192 |
| Asn Gly Lys Trp Asp Ser Asp Pro Ser Gly Thr Lys Thr Cys Ile Asp | | | |
| 50 | 55 | 60 | |
| acc aag gaa ggc atc ctg cag tat tgc caa gaa gtc tac cct gaa ctg | | | 240 |
| Thr Lys Glu Gly Ile Leu Gln Tyr Cys Gln Glu Val Tyr Pro Glu Leu | | | |
| 65 | 70 | 75 | 80 |
| cag atc acc aat gtg gta gaa gcc aac caa cca gtg acc atc cag aac | | | 288 |
| Gln Ile Thr Asn Val Val Glu Ala Asn Gln Pro Val Thr Ile Gln Asn | | | |
| | 85 | 90 | 95 |
| tgg tgc aag cgg ggc cgc aag cag tgc aag acc cat ccc cac ttt gtg | | | 336 |
| Trp Cys Lys Arg Gly Arg Lys Gln Cys Lys Thr His Pro His Phe Val | | | |
| | 100 | 105 | 110 |
| att ccc tac cgc tgc tta gtt ggt gag ttt gta agt gat gcc ctt ctc | | | 384 |
| Ile Pro Tyr Arg Cys Leu Val Gly Glu Phe Val Ser Asp Ala Leu Leu | | | |
| | 115 | 120 | 125 |
| gtt cct gac aag tgc aaa ttc tta cac cag gag agg atg gat gtt tgc | | | 432 |
| Val Pro Asp Lys Cys Lys Phe Leu His Gln Glu Arg Met Asp Val Cys | | | |
| | 130 | 135 | 140 |
| gaa act cat ctt cac tgg cac acc gtc gcc aaa gag aca tgc agt gag | | | 480 |
| Glu Thr His Leu His Trp His Thr Val Ala Lys Glu Thr Cys Ser Glu | | | |
| | 145 | 150 | 155 |
| aag agt acc aac ttg cat gac tac ggc atg ttg ctg ccc tgc gga att | | | 528 |
| Lys Ser Thr Asn Leu His Asp Tyr Gly Met Leu Leu Pro Cys Gly Ile | | | |
| | 165 | 170 | 175 |
| gac aag ttc cga ggg gta gag ttt gtg tgt tgc cca ctg gct gaa gaa | | | 576 |
| Asp Lys Phe Arg Gly Val Glu Phe Val Cys Cys Pro Leu Ala Glu Glu | | | |
| | 180 | 185 | 190 |
| agt gac aat gtg gat tct gct gat ggc gag gag gat gac tgg gat gtc | | | 624 |
| Ser Asp Asn Val Asp Ser Ala Asp Ala Glu Glu Asp Asp Ser Asp Val | | | |
| | 195 | 200 | 205 |
| tgg tgg ggc gga gca gac aca gac tat gca gat ggg agt gaa gac aaa | | | 672 |
| Trp Trp Gly Gly Ala Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Asp Lys | | | |
| | 210 | 215 | 220 |
| gta gta gaa gta gca gag gag gaa gaa gtg gct gag gtg gaa gaa gaa | | | 720 |
| Val Val Glu Val Ala Glu Glu Glu Glu Val Ala Glu Val Glu Glu Glu | | | |
| | 225 | 230 | 235 |
| gaa gcc gat gat gac gag gac gat gag gat ggt gat gag gta gag gaa | | | 768 |
| Glu Ala Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu Asp Gly Asp Glu Val Glu Glu | | | |
| | 245 | 250 | 255 |
| gag gct gag gaa ccc tac gaa gaa gcc aca gag aga acc acc agc att | | | 816 |
| Glu Ala Glu Glu Pro Tyr Glu Glu Ala Thr Glu Arg Thr Thr Ser Ile | | | |
| | 260 | 265 | 270 |
| gcc acc acc acc acc acc acc aca gag tct gtg gaa gag gtg gtt cga | | | 864 |
| Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Ser Val Glu Glu Val Val Arg | | | |
| | 275 | 280 | 285 |

| 69 | 85815 | 70 | |
|---|-------|-----|------|
| gag gtg tgc tct gaa caa gcc gag acg ggg ccg tgc cga gca atg atc | | | 912 |
| Glu Val Cys Ser Glu Gln Ala Glu Thr Gly Pro Cys Arg Ala Met Ile | | | |
| 290 | 295 | 300 | |
| tcc cgc tgg tac ttt gat gtg act gaa ggg aag tgt gcc cca ttc ttt | | | 960 |
| Ser Arg Trp Tyr Phe Asp Val Thr Glu Gly Lys Cys Ala Pro Phe Phe | | | |
| 305 | 310 | 315 | 320 |
| tac ggc gga tgt ggc ggc aac cgg aac aac ttt gac aca gaa gag tac | | | 1008 |
| Tyr Gly Gly Cys Gly Asn Arg Asn Asn Phe Asp Thr Glu Glu Tyr | | | |
| | 325 | 330 | 335 |
| tgc atg gcc gtg tgt ggc agc gcc atg tcc caa agt tta ctc aag act | | | 1056 |
| Cys Met Ala Val Cys Gly Ser Ala Met Ser Gln Ser Leu Leu Lys Thr | | | |
| | 340 | 345 | 350 |
| acc cag gaa cct ctt gcc cga gat cct gtt aaa ctt cct aca aca gca | | | 1104 |
| Thr Gln Glu Pro Leu Ala Arg Asp Pro Val Lys Leu Pro Thr Thr Ala | | | |
| | 355 | 360 | 365 |
| gcc agt acc cct gat gcc gtt gac aag tat ctc gag aca cct ggg gat | | | 1152 |
| Ala Ser Thr Pro Asp Ala Val Asp Lys Tyr Leu Glu Thr Pro Gly Asp | | | |
| | 370 | 375 | 380 |
| gag aat gaa cat gcc cat ttc cag aaa gcc aaa gag agg ctt gag gcc | | | 1200 |
| Glu Asn Glu His Ala His Phe Gln Lys Ala Lys Glu Arg Leu Glu Ala | | | |
| | 385 | 390 | 400 |
| aag cac cga gag aga atg tcc cag gtc atg aga gaa tgg gaa gag gca | | | 1248 |
| Lys His Arg Glu Arg Met Ser Gln Val Met Arg Glu Trp Glu Glu Ala | | | |
| | 405 | 410 | 415 |
| gaa cgt caa gca aag aac ttg cct aaa gct gat aag aag gca gtt atc | | | 1296 |
| Glu Arg Gln Ala Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp Lys Lys Ala Val Ile | | | |
| | 420 | 425 | 430 |
| cag cat ttc cag gag aaa gtg gaa tct ttg gaa cag gaa gca gcc aac | | | 1344 |
| Gln His Phe Gln Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu Gln Glu Ala Ala Asn | | | |
| | 435 | 440 | 445 |
| gag aga cag cag ctg gtg gag aca cac atg gcc aga gtg gaa gcc atg | | | 1392 |
| Glu Arg Gln Gln Leu Val Glu Thr His Met Ala Arg Val Glu Ala Met | | | |
| | 450 | 455 | 460 |
| ctc aat gac cgc cgc cgc ctg gcc ctg gag aac tac atc acc gct ctg | | | 1440 |
| Leu Asn Asp Arg Arg Arg Leu Ala Leu Glu Asn Tyr Ile Thr Ala Leu | | | |
| | 465 | 470 | 475 |
| cag gct gtt cct cct cgg cct cgt cac gtg ttc aat atg cta aag aag | | | 1488 |
| Gln Ala Val Pro Pro Arg Pro Arg His Val Phe Asn Met Leu Lys Lys | | | |
| | 485 | 490 | 495 |
| tat gtc cgc gca gaa cag aag gac aga cag cac acc cta aag cat ttc | | | 1536 |
| Tyr Val Arg Ala Glu Gln Lys Asp Arg Gln His Thr Leu Lys His Phe | | | |
| | 500 | 505 | 510 |

| 71 | 85815 | 72 | |
|---|-------|----|------|
| gag cat gtg cgc atg gtg gat ccc aag aaa gcc gct cag atc cgg tcc Glu His Val Arg Met Val Asp Pro Lys Lys Ala Ala Gln Ile Arg Ser 515 520 525 | | | 1584 |
| cag gtt atg aca cac ctc cgt gtg att tat gag cgc atg aat cag tct Gln Val Met Thr His Leu Arg Val Ile Tyr Glu Arg Met Asn Gln Ser 530 535 540 | | | 1632 |
| ctc tcc ctg ctc tac aac gtg cct gca gtg gcc gag gag att cag gat Leu Ser Leu Leu Tyr Asn Val Pro Ala Val Ala Glu Glu Ile Gln Asp 545 550 555 560 | | | 1680 |
| gaa gtt gat gag ctg ctt cag aaa gag caa aac tat tca gat gac gtc Glu Val Asp Glu Leu Leu Gln Lys Glu Gln Asn Tyr Ser Asp Asp Val 565 570 575 | | | 1728 |
| ttg gcc aac atg att agt gaa cca agg atc agt tac gga aac gat gct Leu Ala Asn Met Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser Tyr Gly Asn Asp Ala 580 585 590 | | | 1776 |
| ctc atg cca tct ttg acc gaa acg aaa acc acc gtg gag ctc ctt ccc Leu Met Pro Ser Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr Val Glu Leu Leu Pro 595 600 605 | | | 1824 |
| gtg aat gga gag ttc agc ctg gac gat ctc cag ccg tgg cat tct ttt Val Asn Gly Glu Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gln Pro Trp His Ser Phe 610 615 620 | | | 1872 |
| ggg gct gac tct gtg cca gcc aac aca gaa aac gaa gtt gag cct gtt Gly Ala Asp Ser Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn Glu Val Glu Pro Val 625 630 635 640 | | | 1920 |
| gat gcc cgc cct gct gcc gac cga gga ctg acc act cga cca ggt tct Asp Ala Arg Pro Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr Thr Arg Pro Gly Ser 645 650 655 | | | 1968 |
| ggg ttg aca aat atc aag acg gag gag atc tct gaa gtg aag atg gat Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Lys Met Asp 660 665 670 | | | 2016 |
| gca gaa ttc cga cat gac tca gga tat gaa gtt cat cat caa aaa ttg Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu 675 680 685 | | | 2064 |
| gtg ttc ttt gca gaa gat gtg ggt tca aac aaa ggt gca atc att gga Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly 690 695 700 | | | 2112 |
| ctc atg gtg ggc ggt gtt gtc ata gcg aca gtg atc gtc atc acc ttg Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile Thr Leu 705 710 715 720 | | | 2160 |
| gtg atg ctg aag aag aaa cag tac aca tcc att cat cat ggt gtg gtg Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Val Val 725 730 735 | | | 2208 |
| gag gtt gac gcc gct gtc acc cca gag gag cgc cac ctg tcc aag atg Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys Met 740 745 750 | | | 2256 |

| | | | |
|---|-------|-----|------|
| 73 | 85815 | 74 | |
| cag cag aac ggc tac gaa aat cca acc tac aag ttc ttt gag cag atg | | | 2304 |
| Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu Gln Met | | | |
| 755 | 760 | 765 | |

| | |
|-------------|------|
| cag aac tag | 2313 |
| Gln Asn | |
| 770 | |

<210> 2
 <211> 770
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

| | |
|---|-----|
| <400> 2 | |
| Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg | |
| 1 | 15 |
| Ala Leu Glu Val Pro Thr Asp Gly Asn Ala Gly Leu Leu Ala Glu Pro | |
| 20 | 30 |
| Gln Ile Ala Met Phe Cys Gly Arg Leu Asn Met His Met Asn Val Gln | |
| 35 | 45 |
| Asn Gly Lys Trp Asp Ser Asp Pro Ser Gly Thr Lys Thr Cys Ile Asp | |
| 50 | 60 |
| Thr Lys Glu Gly Ile Leu Gln Tyr Cys Gln Glu Val Tyr Pro Glu Leu | |
| 65 | 75 |
| Gln Ile Thr Asn Val Val Glu Ala Asn Gln Pro Val Thr Ile Gln Asn | |
| 85 | 90 |
| Trp Cys Lys Arg Gly Arg Lys Gln Cys Lys Thr His Pro His Phe Val | |
| 100 | 110 |
| Ile Pro Tyr Arg Cys Leu Val Gly Glu Phe Val Ser Asp Ala Leu Leu | |
| 115 | 125 |
| Val Pro Asp Lys Cys Lys Phe Leu His Gln Glu Arg Met Asp Val Cys | |
| 130 | 140 |
| Glu Thr His Leu His Trp His Thr Val Ala Lys Glu Thr Cys Ser Glu | |
| 145 | 155 |
| Lys Ser Thr Asn Leu His Asp Tyr Gly Met Leu Leu Pro Cys Gly Ile | |
| 165 | 175 |
| Asp Lys Phe Arg Gly Val Glu Phe Val Cys Cys Pro Leu Ala Glu Glu | |
| 180 | 185 |
| Ser Asp Asn Val Asp Ser Ala Asp Ala Glu Glu Asp Asp Ser Asp Val | |
| 195 | 200 |
| Trp Trp Gly Gly Ala Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Asp Lys | |
| 210 | 215 |
| | 220 |

| 75 | | | | | 85815 | | | | | 76 | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Val | Glu | Val | Ala | Glu | Glu | Glu | Glu | Val | Ala | Glu | Val | Glu | Glu | Glu |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 |
| Glu | Ala | Asp | Asp | Asp | Glu | Asp | Asp | Glu | Asp | Gly | Asp | Glu | Val | Glu | Glu |
| | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | |
| Glu | Ala | Glu | Glu | Pro | Tyr | Glu | Glu | Ala | Thr | Glu | Arg | Thr | Thr | Ser | Ile |
| | | | | 260 | | | | 265 | | | | | | 270 | |
| Ala | Thr | Thr | Thr | Thr | Thr | Thr | Thr | Glu | Ser | Val | Glu | Glu | Val | Val | Arg |
| | | | | 275 | | | | 280 | | | | | 285 | | |
| Glu | Val | Cys | Ser | Glu | Gln | Ala | Glu | Thr | Gly | Pro | Cys | Arg | Ala | Met | Ile |
| | 290 | | | | | 295 | | | | | 300 | | | | |
| Ser | Arg | Trp | Tyr | Phe | Asp | Val | Thr | Glu | Gly | Lys | Cys | Ala | Pro | Phe | Phe |
| 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | | 320 |
| Tyr | Gly | Gly | Cys | Gly | Gly | Asn | Arg | Asn | Asn | Phe | Asp | Thr | Glu | Glu | Tyr |
| | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | 335 | |
| Cys | Met | Ala | Val | Cys | Gly | Ser | Ala | Met | Ser | Gln | Ser | Leu | Leu | Lys | Thr |
| | | | 340 | | | | | 345 | | | | | 350 | | |
| Thr | Gln | Glu | Pro | Leu | Ala | Arg | Asp | Pro | Val | Lys | Leu | Pro | Thr | Thr | Ala |
| | | 355 | | | | | 360 | | | | | 365 | | | |
| Ala | Ser | Thr | Pro | Asp | Ala | Val | Asp | Lys | Tyr | Leu | Glu | Thr | Pro | Gly | Asp |
| | | | | | | 375 | | | | | 380 | | | | |
| Glu | Asn | Glu | His | Ala | His | Phe | Gln | Lys | Ala | Lys | Glu | Arg | Leu | Glu | Ala |
| 385 | | | | | 390 | | | | | 395 | | | | | 400 |
| Lys | His | Arg | Glu | Arg | Met | Ser | Gln | Val | Met | Arg | Glu | Trp | Glu | Glu | Ala |
| | | | | 405 | | | | | 410 | | | | | 415 | |
| Glu | Arg | Gln | Ala | Lys | Asn | Leu | Pro | Lys | Ala | Asp | Lys | Lys | Ala | Val | Ile |
| | | | 420 | | | | | 425 | | | | | 430 | | |
| Gln | His | Phe | Gln | Glu | Lys | Val | Glu | Ser | Leu | Glu | Gln | Glu | Ala | Ala | Asn |
| | | 435 | | | | | 440 | | | | | 445 | | | |
| Glu | Arg | Gln | Gln | Leu | Val | Glu | Thr | His | Met | Ala | Arg | Val | Glu | Ala | Met |
| | | | | | | 455 | | | | | 460 | | | | |
| Leu | Asn | Asp | Arg | Arg | Arg | Leu | Ala | Leu | Glu | Asn | Tyr | Ile | Thr | Ala | Leu |
| 465 | | | | | 470 | | | | | 475 | | | | | 480 |
| Gln | Ala | Val | Pro | Pro | Arg | Pro | Arg | His | Val | Phe | Asn | Met | Leu | Lys | Lys |
| | | | | 485 | | | | | 490 | | | | | 495 | |
| Tyr | Val | Arg | Ala | Glu | Gln | Lys | Asp | Arg | Gln | His | Thr | Leu | Lys | His | Phe |
| | | | 500 | | | | | 505 | | | | | 510 | | |
| Glu | His | Val | Arg | Met | Val | Asp | Pro | Lys | Lys | Ala | Ala | Gln | Ile | Arg | Ser |
| | | 515 | | | | | 520 | | | | | 525 | | | |
| Gln | Val | Met | Thr | His | Leu | Arg | Val | Ile | Tyr | Glu | Arg | Met | Asn | Gln | Ser |
| | | 530 | | | | 535 | | | | | 540 | | | | |

79 85815 80

<400> 3
cag tac atc aaa gct aac tcc aaa ttc atc ggt atc acc gag ctg 45
Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu
1 5 10 15

<210> 4
<211> 15
<212> PRT
<213> Clostridium tetani

<400> 4
Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu
1 5 10 15

<210> 5
<211> 63
<212> ДНК
<213> Clostridium tetani

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(63)
<223> ДНК, що кодує епітоп P2

<400> 5
ttc aac aac ttc acc gta agc ttc tgg ctg cgt gtt ccg aaa gtt agc 48
Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
1 5 10 15

gct agc cac ctg gaa 63
Ala Ser His Leu Glu
20

<210> 6
<211> 21
<212> PRT
<213> Clostridium tetani

<400> 6
Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
1 5 10 15

Ala Ser His Leu Glu
20

<210> 7
<211> 21
<212> ДНК
<213> Синтетична
<223> Синтетичний праймер для ПЛР

<400> 7
caactcagct tcctttcggg c

<210> 8

| 81 | 85815 | 82 |
|--|-------|-----|
| <211> 21 | | |
| <212> ДНК | | |
| <213> Синтетична | | |
| <223> Синтетичний праймер для ПЛР | | |
| <400> 8 | | |
| agatctcgat cccgcgaat t | | 21 |
| <210> 9 | | |
| <211> 135 | | |
| <212> ДНК | | |
| <213> Синтетична | | |
| <223> Синтетичний праймер для ПЛР | | |
| <400> 9 | | |
| atggatgcag aattccgtca cgactccggt tacgaagttc accaccagaa actgggttttc | | 60 |
| ttcgcagaag atgttggttc caacaaggt gcaatcatcg gtctgatggt tggcgggtgtt | | 120 |
| gttatcgcca cctag | | 135 |
| <210> 10 | | |
| <211> 31 | | |
| <212> ДНК | | |
| <213> Синтетична | | |
| <223> Синтетичний праймер для ПЛР | | |
| <400> 10 | | |
| gccggccatg gatgcagaat tccgtcacga c | | 31 |
| <210> 11 | | |
| <211> 39 | | |
| <212> ДНК | | |
| <213> Синтетична | | |
| <223> Синтетичний праймер для ПЛР | | |
| <400> 11 | | |
| gccggaagct tctaggctcg gataacaaca ccgcccaacc | | 39 |
| <210> 12 | | |
| <211> 84 | | |
| <212> ДНК | | |
| <213> Синтетична | | |
| <223> Синтетичний праймер для ПЛР | | |
| <400> 12 | | |
| ccggcaagct tctacagctc ggtgataccg atgaatttgg agttagcttt gatgtactgg | | 60 |
| gtcgcgataa caacaccgcc aacc | | 84 |
| <210> 13 | | |
| <211> 101 | | |
| <212> ДНК | | |
| <213> Синтетична | | |
| <223> Синтетичний праймер для ПЛР | | |
| <400> 13 | | |
| gccggccatg gggttcaaca acttcaccgt tagcttctgg ctgcgtgttc cgaagttag | | 60 |
| cgcgagccac ctggaagatg cagaattccg tcacgactcc g | | 101 |
| <210> 14 | | |

83 85815 84

<211> 172
 <212> ДНК
 <213> Синтетична
 <223> Синтетичний праймер для ПЛР

<400> 14
 gggccaagct tggatccggt cgcgataaca acaccgcca ccatcagacc gatgattgca 60
 cctttgttgg aaccaacatc ttctgcgaag aaaaccagtt tctggtggtg aacttcgtaa 120
 ccggagtcgt gaccggaactc tgcattccagc toggtgatac cgatgaattt gg 172

<210> 15
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Синтетична
 <223> Синтетичний праймер для ПЛР

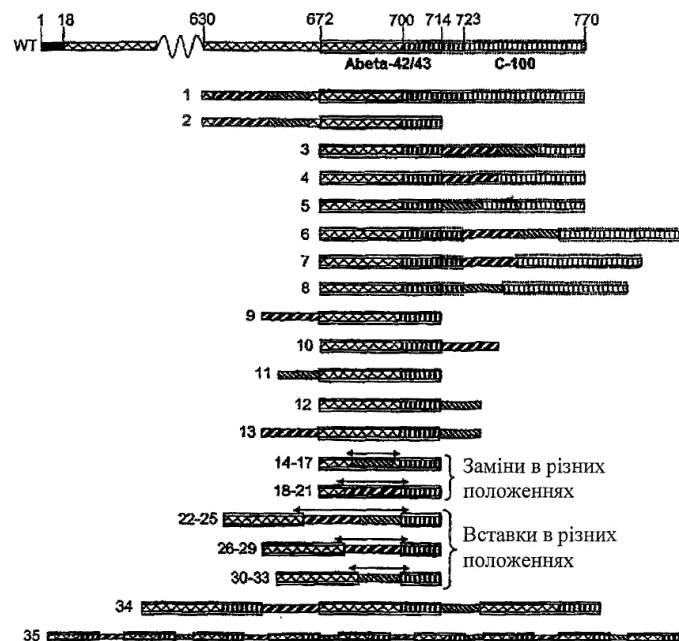
<400> 15
 ctggaagatg cagagttccg tcaagactcc 30

<210> 16
 <211> 35
 <212> ДНК
 <213> Синтетична
 <223> Синтетичний праймер для ПЛР

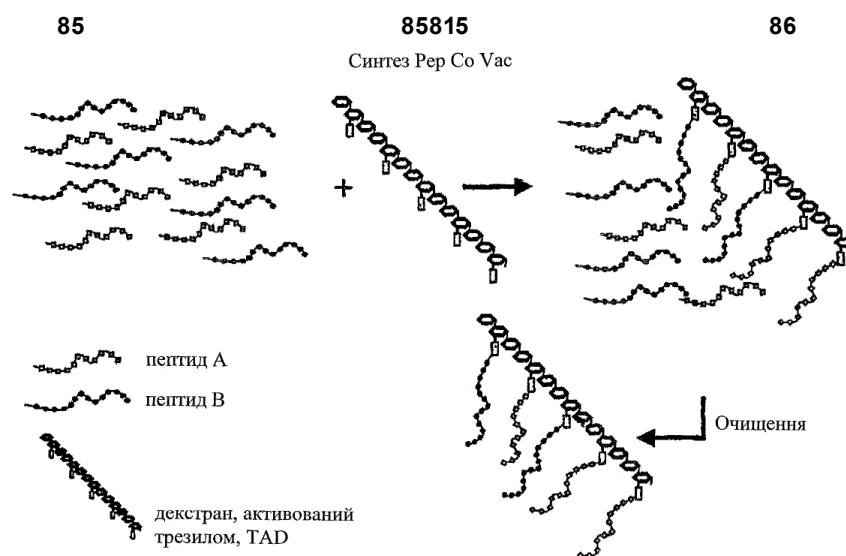
<400> 16
 gcgcgggata cttcaacaac ttcaccgtta gcttc 35

<210> 17
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Синтетична
 <223> Синтетична послідовність, що зв'язує HLA DR

<400> 17
 Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala
 1 5 10



Фіг. 1



Фіг. 2