

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

304 876

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLového
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 2001-3824
(22) Přihlášeno: 26.05.2000
(30) Právo přednosti: 28.05.1999 US 1999 322289
(40) Zveřejněno: 13.11.2002
(Věstník č. 11/2002)
(47) Uděleno: 12.11.2014
(24) Oznamení o udělení ve věstník: 29.12.2014
(Věstník č. 52/2014)
(86) PCT číslo: PCT/US2000/014810
(87) PCT číslo zveřejnění: WO 2000/072880

(56) Relevantní dokumenty:

WO 00/13673 A1.

(73) Majitel patentu:

Janssen Alzheimer Immunotherapy, County Cork,
IE

(72) Původce:

Dale B. Schenk, 94010 Burlingame, CA, US
Frederique Bard, 94404 Pacifica, CA, US
Nicki J. Vasquez, 94114 San Francisco, CA, US
Ted Yednock, 49933 Forest Knolls, CA, US

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS Praha a.s., Jivenská 1273/1,
140 21 Praha 4

(54) Název vynálezu:

**Fragment A β vázaný k nosičovému peptidu,
farmaceutický prostředek pro prevenci
nebo léčeni onemocnění spojeného s
amyloidními deposity A β v mozku pacienta
jej obsahující a jeho použití**

(57) Anotace:

Fragment A β vázaný k nosičovému peptidu pro použití
vyvolání imunitní odpovědi proti A β , a tím pro prevenci
nebo léčeni onemocnění spojeného s amyloidními
deposity A β v mozku pacienta, přičemž fragment A β
sestává z i) A β 1-7 majícího aminokyselinovou sekvenci
DAEFRHD, ii) A β 3-7 majícího aminokyselinovou
sekvenci EFRHD, nebo iii) multiméru i) nebo ii).
Farmaceutický prostředek obsahující tento fragment je
určen pro prevenci nebo léčeni onemocnění spojeného
s amyloidními deposity A β v mozku pacienta.

CZ 304876 B6

Fragment A β vázaný k nosičovému peptidu, farmaceutický prostředek pro prevenci nebo léčeni onemocnění spojeného s amyloidními deposity A β v mozku pacienta jej obsahující a jeho použití

5

Oblast techniky

Vynález se týká fragmentu A β vázaného k nosičovému peptidu, farmaceutického prostředku pro prevenci nebo léčeni onemocnění spojeného s amyloidními deposity A β v mozku pacienta. Vynález spadá do oblasti imunologie a medicíny.

10

Dosavadní stav techniky

Alzheimerova nemoc je progresivní onemocnění, které vede k senilní demenci (v obecném případě se popisuje v publikaci Selkoe, TINS 16, 403–409 (1993), Hardy et al., WO 02/13 069, Selkoe, J., Neuropathol. Exp. Neurol. 53, 438–447 (1994), Duff et al., Nature 373, 476–477 (1995), Games et al., Nature 373, 523 (1995)). Obecně řečeno toto onemocnění spadá do dvou kategorií: vznik onemocnění v pozdějším věku (nad 65 let) a časný vnik onemocnění, ke kterému dochází před obdobím senility, to znamená mezi 35 a 60 lety. U obou typů onemocnění je patologie stejná, ale abnormality mají tendenci být závažnější v případech začínajících v raném věku. Onemocnění se charakterizuje alespoň dvěma typy lézí v mozku, senilními plakami a neurofibrilárními uzly. Senilní plakky jsou oblasti desorganizovaných neurofilů, kdy jejich průměr dosahuje až 150 μ m, s extrabuněčnými amyloidními deposity v centru, které jsou viditelné mikroskopickou analýzou sekcí mozkové tkáně. Neurofibrilární uzly jsou vnitrobuněčné depozity mikrotubule spojené s proteinem tau, jenž obsahuje dvě vlákna, které omotávají každý druhý v páru.

20

25

Základní část plaků je peptid nazvaný A β nebo β -amyloidní peptid. Peptid A β je vnitřní fragment aminokyselin 39–43 prekurzorového proteinu nazvaného amyloidní prekurzorový protein (APP). Několik mutací APP koreluje s přítomností Alzheimerovy nemoci (popisuje se v publikaci Goate et al., Nature 349, 704) (1991) valin A β ⁷¹⁷ na izoleucin), Chartier Harlan et al., Nature 353, 844 (1991)) (valin⁷¹⁷ na glycin), Murrell et al., Science 254, 97 (1991) (valin⁷¹⁷ na fenylalanin), Mullan et al., Nature Genet. 1, 345 (1992) (dvojitá mutace měnící lysin⁵⁹⁵–methionin⁵⁹⁶ na asparagin – leucin⁵⁹⁶). Uvažuje se, že takové mutace způsobují Alzheimerovu nemoc zvýšeným nebo změněným zpracováním APP na A β , zvláště zpracování APP na zvýšené množství dlouhé formy A β (to znamená, A β 1–42 a A β 1–43). Ukazuje se, že mutace v jiných genech, jako jsou geny praznilinu PS1 a PS2 nepřímo ovlivňují APP za vzniku zvýšeného množství dlouhé formy A β (popisuje se v publikaci Hardy, TINS 20, 154 (1997)). Tato pozorování ukazují, že A β a zvláště jeho dlouhá forma je u Alzheimerovy nemoci kauzativní element.

35

40

M.C. Michael v dokumentu EP 526 511 popisuje aplikaci homeopatických dávek (které jsou rovné nebo nižší než hodnota 10⁻² mg/den) A β pacientům s AD. U typického člověka, který má přibližně 5 litrů plazmy, se očekává, že horní limit této dávky vytvoří koncentraci ne vyšší než 2 pg/ml. Normální koncentrace A β v lidské plazmě je v typickém případě v rozmezí 50 až 200 pg/ml (popisuje se v publikaci Seubert et al., Nature 359, 325–327 (1992)). Protože v dokumentu EP 526 511 se popisuje dávka, která těžko změní množství endogenního cirkulujícího A β a protože v dokumentu EP 526 511 se nedoporučuje použití adjuvans, jako imunostimulantu a zdá se nepravděpodobné, že dojde k jakémukoliv terapeutickému účinku.

45

Naopak vynález popisuje léčbu Alzheimerovy nemoci a jiného amyloidogenního onemocnění aplikací fragmentů A β nebo protilátky k jistým epitopům A β v pacientovi za podmínek, které vyvolávají u pacienta pozitivní imunitní odezvu. Vynález dále popisuje dlouhotrvající potřebu terapeutických režimů pro prevenci nebo zmírnění neuropatologie a u některých pacientů poruchy poznání spojené s Alzheimerovou nemocí.

50

Tento dokument se vztahuje k dokumentu WO 99/27 944, podaném 30. 11. 1998, US 60/067 740 podaném 2. 12. 1997, US 60/080 970, podaném 7. 4. 1998 a US 09/201 430 podaném 30. 11. 1998.

5

Podstata vynálezu

Vynález se týká fragmentu A β vázaného k nosičovému peptidu pro použití k vyvolání imunitní odpovědi proti A β , a tím pro prevenci nebo léčení onemocnění spojeného s amyloidními deposity A β v mozku pacienta, přičemž fragment A β sestává z

- i) A β 1–7 majícího aminokyselinovou sekvenci DAEFRHD,
- ii) A β 3–7 majícího aminokyselinovou sekvenci EFRHD, nebo
- iii) multiméru i) nebo ii).

15 Taková onemocnění zahrnují Alzheimerovu nemoc, Downův syndrom a poruchy poznávání. Později se mohou vyskytovat s nebo bez jiných charakteristik amyloidogenního onemocnění. Použití podle vynálezu tak zahrnuje aplikaci účinné dávky protilátky, která se specificky váže na komponent amyloidního depozitu u pacienta. Farmaceutické prostředky podle vynálezu jsou zvláště použitelné při prevenci nebo léčbě Alzheimerovi nemoci u lidských pacientů. Farmaceutické prostředky umožňují aplikaci účinné dávky protilátky, která se váže na A β . Pomocí farmaceutického prostředku se aplikuje účinná dávka protilátky, která se specificky váže na epitop v oblasti zbytků 1 až 10 A β . Někdy se protilátka specificky váže na epitop v oblasti zbytků 1 až 6 A β , někdy se protilátka specificky váže na epitop v oblasti zbytků 1 až 5 A β , někdy se protilátka specificky váže na epitop v oblasti zbytků 1 až 7 A β , někdy se protilátka specificky váže na epitop v oblasti zbytků 3 až 7 A β , někdy se protilátka specificky váže na epitop v oblasti zbytků 1 až 3 A β a někdy se protilátka specificky váže na epitop v oblasti zbytků 1 až 4 A β . Někdy se protilátka váže na epitop obsahující volný N-terminální zbytek A β . Někdy se protilátka váže na epitop v oblasti zbytků 1 až 10 A β , kde zbytek 1 a/nebo zbytek 7 A β je kyselina aspartová. Někdy se protilátka specificky váže na peptid A β , aniž se váže na amyloidní prekurzorový protein plné délky (APP). Někdy je izotyp protilátky lidský IgG1.

Někdy se protilátka váže u pacientů na amyloidní depozit a vyvolává jasnou odezvu proti amyloidnímu depozitu. Například taková zřejmá odezva může být ovlivněna fagocytózou zprostředkovanou receptorem Fc.

35

Farmaceutické prostředky mohou být použity u pacientů, kteří jsou bez symptomů i se symptomy onemocnění. Protilátka používaná v takových prostředcích může být lidská, humanizovaná, chimerická nebo nelidská protilátka a může být monoklonální nebo polyklonální. V prostředcích se protilátka připravuje z člověka imunizovaného peptidem A β , kdy člověkem může být pacient 40 léčený protilátkou.

Někdy je protilátka aplikovaná s farmaceutickým nosičem, jako farmaceutický prostředek. Někdy je protilátka aplikovaná v dávce 0,0001 až 100 mg/kg, upřednostňuje se alespoň 1 mg/kg protilátky na tělesnou hmotnost. U některých problémů se protilátka aplikuje více násobné dávce po dlouhou dobu, například alespoň 6 měsíců. U některých problémů se protilátka aplikuje jako prostředek s postupným uvolňováním. Protilátka se může aplikovat například intraperitoneálně, orálně, subkutánně, intrakraniálně, intramuskulárně, topicky, intranasálně nebo intravenózně.

V některých metodách se protilátka aplikovala aplikací polynukleotidu, který u pacienta kóduje alespoň jeden protilátkový řetězec. Polynukleotid se exprimuje, přičemž u pacienta vzniká protilátkový řetězec. Polynukleotid kóduje těžký a lehký řetězec protilátky. Polynukleotid se exprimuje, přičemž u pacienta vzniká těžký a lehký řetězec. V některých metodách se v krvi pacienta monitorovalo množství aplikované protilátky.

Vynález dále popisuje farmaceutické prostředky pro prevenci nebo léčbu onemocnění spojeného s amyloidními depozity A β v mozku pacienta. Farmaceutické prostředky se mohou použít například při léčbě Alzheimerovy nemoci nebo Downova syndromu nebo poruch poznávání. Takové farmaceutické prostředky zahrnují aplikaci A β nebo jeho analogů, které vyvolávají imunogenní odezvu proti jistým epitopům v A β . Některé metody zahrnují aplikaci pacientovi účinné dávky polypeptidu, který obsahuje N-terminální segment alespoň zbytků 1 až 5 A β . První zbytek A β je N-terminální zbytek polypeptidu, kde polypeptid je volný C-terminální segment A β . Některé metody zahrnují aplikaci pacientovi účinné dávky polypeptidu, který obsahuje N-terminální segment A β , segment, který začíná zbytkem 1 až 3 A β a končí zbytky 7 až 11 A β . Některé metody zahrnují aplikaci pacientovi účinné dávky činidla, která vyvolává imunogenní odezvu proti N-terminálnímu segmentu A β . Segment obsahuje zbytek 1 až 3 A β a končí zbytky 7 až 11 A β , aniž se vyvolává imunogenní odezva proti epitopu ve zbytcích 12 až 43 A β 43.

V některých shora popsaných metodách N-terminální segment A β je spojen svým C-koncem k heterolognímu peptidu. V některých shora uvedených metodách N-terminální segment A β je spojen s N-koncem heterologního polypeptidu. V některých shora uvedených metodách N-terminální segment A β je spojen svým N a C-koncem k prvnímu a druhému heterolognímu polypeptidu. V některých shora uvedených metodách N-terminální segment A β je spojen svým N-koncem s heterologním peptidem a svým C-koncem s alespoň jednou další kopií N-terminálního segmentu. V některých shora popsaných metodách heterologní polypeptid vyvolává odezvu B-buněk proti N-terminálnímu segmentu. V některých shora uvedených metodách polypeptid dále obsahuje alespoň jednu další kopii N-terminálního segmentu. V některých shora uvedených metodách polypeptid obsahuje z N-konce k N-konci N-terminální segment A β , velké množství dalších kopií N-terminálního segment A β a heterologní aminokyselinový segment. V některých shora uvedených metodách N-terminální segment obsahuje A β 1-7. V některých shora uvedených metodách N-terminální segment obsahuje A β 3-7.

V některých metodách fragment neobsahuje alespoň 5 aminokyselin C-konce v A β 43. V některých metodách fragment obsahuje až 10 kontinuálních aminokyselin z A β . Fragmenty se v typickém případě aplikují v množství vyšším než 10 mikrogramů v dávce pro jednoho pacienta.

V některých metodách se fragment aplikuje s adjuvans, které zvyšuje imunitní odezvu na peptid A β . Adjuvans a fragment se mohou aplikovat v jakémkoliv pořadí nebo společně jako vakcinační prostředek. Adjuvans může být například hydroxid hlinitý, fosforečnan hlinitý, MPL^(TM), QS-21 (Stimulation^(TM)) nebo nekompletní Freundovo adjuvans.

Vynález dále popisuje farmaceutické prostředky obsahující fragmenty A β nebo jejich činidla vyvolávající imunogenní odezvu na stejné epitopy A β , které se popisují shora v textu, a adjuvans. Vynález také popisuje farmaceutické prostředky obsahující libovolné protilátky popsané shora v textu a farmaceuticky přijatelný nosič.

Vynález dále popisuje způsoby testování aktivity protilátky při léčbě onemocnění spojené s depozity A β v mozku pacienta (například Alzheimerova nemoc). Takové metody zahrnují kontakt protilátky s polypeptidem, který obsahuje alespoň pět kontinuálních aminokyselin N-terminálního segmentu A β , který začíná zbytkem 1 až 3 A β , polypeptide neobsahuje C-terminální segment A β . Pak se stanoví, zda se protilátka specificky váže na polypeptid, přičemž specifické navázání indikuje, že protilátka je aktivní při léčbě onemocnění.

Vynález dále popisuje metody testování aktivity protilátky při čištění biologické entity spojené s antigenem. Takové metody zahrnují kombinování biologické entity spojené s antigenem a protilátky a fagocytových buněk nesoucích receptory Fc v kultivačním médiu. Monitoruje se množství biologické entity spojené s antigenem, které zůstává v médiu. Redukce množství biologické enti-

ty spojené s antigenem indikuje, že protilátka má neutralizační aktivitu proti biologické entitě spojené s antigenem. Antigen je možné poskytnout jako tkáňový vzorek nebo v izolované formě. Antigen je možné poskytnout jako tkáňový vzorek z mozku pacienta trpícího Alzheimerovou nemocí nebo savce, který vykazuje Alzheimerovou patologii. Jiné vzorky tkání, proti kterým může být testována neutralizační aktivita protilátky, zahrnují vzorky tkáně zhoubného bujení, nemaligní abnormální buněčný růst nebo tkáňové vzorky obsahující abnormální extrabuněčnou matici.

Vynález popisuje způsoby detekce amyloidního depozitu u pacienta. Takové metody zahrnují aplikaci protilátky pacientovi, přičemž tato protilátka se zvláště váže na epitop v aminokyselinách 1 až 10 A β a detekuje přítomnost protilátky v mozku pacienta. V některých metodách se protilátka váže na epitop ve zbytcích 4 až 10 A β . V některých metodách je protilátka značena paramagnetickou značkou a detekuje se nukleární magnetickou rezonanční tomografií.

Vynález dále popisuje diagnostické kity vhodné pro použití ve shora popsáných metodách. Takový kit obsahuje protilátku, která se specificky váže na epitop se zbytky 1 až 10 A β . Některé kity nesou značku popisující použití protilátky pro diagnostiku a monitorování Alzheimerovi nemocí *in vivo*.

20 Definice

Termín „podstatná shora“ znamená, že dvě peptidové sekvence, když jsou uspořádány optimálně, například použitím programů GAP nebo BESTFIT za použití standardní míry významnosti mezer, sdílí alespoň 65% shodu sekvencí. Upřednostňuje se alespoň 80 nebo 90 % shody sekvence, více se upřednostňuje alespoň 95 % shody sekvence nebo více (například 99% shora sekvence nebo vyšší). Upřednostňují se polohy zbytků, které nejsou shodné a liší se substitucemi aminokyselin.

Při porovnání sekvencí v typickém případě jedna sekvence působí jako referenční sekvence, se kterou se testovaná sekvence porovnává. Když se použije algoritmus porovnání sekvence, testovaná a referenční sekvence jsou vstupní data, jestli je to nutné, stanoví se subsekvenční koordináty a navrhnou se programové parametry sekvenčního algoritmu. Algoritmus porovnání sekvence pak vypočítá procento shody sekvence v případě testovaných sekvencí vztaheno k referenční sekvenci na základě označených programových parametrů.

Optimální uspořádání sekvencí za účelem porovnání může být doprovázeno například algoritmem lokální homologie (popisuje se v publikaci Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981)), algoritmem homologického uspořádání (popisuje se v publikaci Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970)), vyhledáváním v případě metody podobnosti (popisuje se v publikaci Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444 (1988)), počítačovou implementací těchto algoritmů (GAP, BESTFIT, FASTA a TFASTA v softwaru Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) nebo vizuálně (v obecném případě se popisuje v publikaci Ausubel et al.,). Jeden příklad algoritmu, který je vhodný pro stanovení procenta sekvenční shody a pro stanovení sekvenční podobnosti je vhodný algoritmus BLAST, který se popisuje v publikaci Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990). Software vhodný pro analýzu BLAST je veřejně dostupný u instituce National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). V typickém případě standardní parametry programu se mohou použít k porovnání sekvencí, ačkoli je možné také použít parametry klienta. V případě aminokyselinových sekvencí program BLAST používá jako standardní délku slova (W) rovnou třem, pravděpodobnost (E) je 10 a skórující matici BLOSUM62 (popisuje se v publikaci Henikoff and Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10915 (1989)).

Pro účely klasifikace substitucí aminokyselin na konzervativní a nekonzervativní se aminokyseliny rozdělují následovně: skupina I (hydrofóbní postranní řetězce): norleucin, Met, Ala, Val, Leu, Ile, Skupina II (neutrální hydrofilní postranní řetězce): Cys, Ser, Thr, skupina III (kyselé postran-

ni řetězce): Asp, Glu, skupina IV (zásadité postranní řetězce): Asn, Gln, His, Lys, Arg, skupina V (zbytky ovlivňující orientaci řetězce): Gly, Pro a skupina VI (aromatické postranní řetězce): Trp, Tyr, Phe. Konzervativní substituce zahrnují substituce mezi aminokyselinami ve stejné třídě. Nekonzervativní substituce obsahují změny členů jedné z těchto skupin za člena jiné skupiny.

5
Terapeutická činidla podle vynálezu v typickém případě v podstatě neobsahují nežádoucí nečistoty. To znamená, že činidlo je v typickém případě přibližně z 50 % (hmot./hmot.) čisté, stejně jako je v podstatě bez interferujících proteinů a nečistot. V některých případech jsou činidla alespoň
10 přibližně z 80 % (hmot./hmot.), více se upřednostňuje alespoň z 90 % nebo přibližně z 95 % (hmot./hmot.), čistá. Použitím běžného postupu čištění proteinu se mohou získat alespoň z 99 % (hmot./hmot.) homogenní peptidy.

Specifické navázání mezi dvěma entitami znamená afinitu alespoň 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 M^{-1} nebo 10^{10} M^{-1} . Preferují se afinity vyšší než 10^8 M^{-1} .

15
Termín „protilátka“ nebo „imunoglobulin“ zahrnuje neporušené protilátky a jejich vazebné fragmenty. V typickém případě fragmenty soutěží s neporušenou protilátkou, ze které se získaly pro specifické navázání na fragment antigenu zahrnující separované těžké řetězce, lehké řetězce Fab, Fab'F(ab')₂, Fabc a Fv. Fragmenty se produkují metodou rekombinace DNA nebo enzymatickou
20 nebo chemickou separací neporušených imunoglobulinů. Termín „protilátka“ také zahrnuje jeden nebo více imunoglobulinových řetězců, které jsou chemicky konjugovány nebo se exprimují jako fúzní proteiny s jinými proteiny. Termín „protilátka“ také zahrnuje bispecifickou protilátku. Bispecifická nebo bifunkční protilátka je umělou hybridní protilátkou, která má dva různé páry těžkého/lehkého řetězce a dvě různá vazebná místa. Bispecifické protilátky mohou vznikat použitím
25 různých metod, které zahrnují fúzi hybridomů nebo spojení fragmentů Fab' (popisuje se například v publikaci Songvilai and Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79: 315–321 (1990), Kostelny et al., J. Immunol. 148, 1547–1553 (1992)).

30
APP⁶⁹⁵, APP⁷⁵¹ a APP⁷⁷⁰ odpovídá dlouhým polypeptidům s 695, 751 a 770 aminokyselinovými zbytky kódovanými lidským genem APP (opisuje se v publikaci Kang et al., Nature 325, 773 (1987), Ponte et al., Nature 331, 525 (1988) a Kitaguchi et al., Nature 331, 530 (1988)). Aminokyseliny s lidským amyloidním prekurzorovým proteinem (APP) jsou označeny čísly podle sekvence izoformy APP770. Termíny, jako jsou Aβ₃₉, Aβ₄₀, Aβ₄₁, Aβ₄₂ a Aβ₄₃ znamenají peptid Aβ obsahující aminokyselinové zbytky 1 až 39, 1 až 40, 1 až 41, 1 až 42 a 1 až 43.

35
Termín „antigen“ znamená entitu, na kterou se protilátka váže specificky.

40
Termín „epitop“ nebo „antigenní determinanta“ znamená místo na antigenu, na které odpovídají buňky B a/nebo T. Epitopy buňky B se mohou tvořit z kontinuálních aminokyselin nebo nekontinuálních aminokyselin srovnaných vedle sebe terciálním balením proteinu. Epitopy tvořené z kontinuálních jsou v typickém případě vystaveny expozici denaturačním rozpouštědly, zatímco epitopy tvořené terciálním balením se v typickém případě ztratí ošetřením v denaturačních rozpouštědlech. Epitop v typickém případě zahrnuje alespoň 3 a obvykle více alespoň 5 nebo 8 až
45 10 aminokyselin v jedinečné prostorové konformaci. Metody stanovující prostorovou konformaci epitopů zahrnují například krystalografii pomocí paprsků X a dvou dimenzální jadernou magnetickou rezonanci (popisuje se například v publikaci Epitop Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 666, Glenn E. Morris, Ed. (1996)). Protilátky, které rozeznávají stejný epitop se mohou identifikovat jednoduchým imunotestem, který vykazuje schopnost jedné protilátky blokovat navázání jiné protilátky na cílový antigen. T-buňky rozeznávají kontinuální epitopy obsahující přibližně 9 aminokyselin pro buňky CD8 nebo přibližně 13 až 15 aminokyselin pro
50 buňky CD4. T buňky, které rozeznávají epitop, se mohou identifikovat testy *in vitro*, které měří proliferaci závislou na antigenu, jak se stanovilo začleněním ³H-thymidinem primárních T buněk při odezvě na epitop (popisuje se v publikaci Burke et al., J. Inf. Dis. 170, 1110–19 (1994)) odumíráním v závislosti na antigenu (test cytotoxicity u lymfocytů, popisuje se v publikaci Tigges et al., J. Immunol. 156, 3901–3910) nebo vylučováním cytokinů.

Termin „imunologická“ nebo „imunní“ odezva je založen na pozitivní humorální (to znamená zprostředkované protilátkami) a/nebo buněčné (zprostředkované T–buněkami specifické pro antigen nebo jejich produkty vylučování) odezvy řízené proti amyloidnímu peptidu u recipientního pacienta. Taková odezva může být aktivní odezva indukovaná aplikací imunogene nebo pasivní odezva vyvolaná aplikací protilátky nebo primární T buňkou. Buněčná imunitní odezva se vyvolala přítomností polypeptidových epitopů ve spojení s molekulami MHC třídy I nebo třídy II, aby se aktivovaly pomocné buňky T CD4⁺ specifické pro antigen a/nebo cytotoxické T buňky CD8⁺. Odezva může také vyvolat aktivaci monocytů, makrofágů, buněk NK, bazofilů, dendritických buněk, astrocytů, buněk mikroglia, eozinofilů nebo jiných komponentů přirozené imunity. Přítomnost imunologické odezvy zprostředkované buňkou se mohou stanovit proliferačními testy (buňky T CD4⁺) nebo testy CTL (cytotoxický lymfocyt T) (popisuje se v publikaci Burke et al., *J. Inf. Dis.* 170, 1110–19 (1994), Tigges et al., *J. Immunol.* 156, 3901–3910)). Relativní příspěvek humorální a buněčné odezvy při ochranném nebo terapeutickém účinku imunogenu se může odlišovat separátně izolací protilátek a T–buněk z imunizovaného syngenního zvířete a měřením ochranného nebo terapeutického syngenního zvířete a měřením ochranného nebo terapeutického účinku u druhého subjektu.

Termin „imunogenní činidlo“ nebo „imunogen“ je schopný vyvolat imunologickou odezvu proti jemu samému při aplikaci savci nebo při spojení s adjuvans.

Termin „samotný polynukleotid“ znamená polynukleotid, který tvoří komplexy s koloidními materiály. Samotné polynukleotidy se někdy klonují do plazmidového vektoru.

Termin „adjuvans“ znamená sloučeninu, která, když se aplikuje ve spojení s antigenem, vyvolává imunitní odezvu na antigen, ale když se aplikuje samotná, nevyvolává imunitní odezvu na antigen. Adjuvans může vyvolat imunitní odezvu několika mechanismy, které zahrnují aktivaci lymfocytů, stimulaci buněk B a/nebo T a stimulaci makrofágů.

Termin „pacient“ zahrnuje lidské nebo jiné savčí subjekty, které se ošetřily profylakticky nebo terapeuticky.

Termin „desagregované“ nebo monomerní A β znamená rozpustné, monomerní peptidové jednotky A β . Jedna metoda přípravy monomerních A β zahrnuje rozpuštění lyofilizovaného peptidu v neředěném DMSO a sonikaci. Výsledný roztok se centrifugoval, aby se odstranily nerozpustné částice. Agregované A β je směs oligomérů, ve které monomerní jednotky se uchovávají spolu s nekovalentními vazbami.

Soutěž mezi A β protilátkami se stanovila testem, ve kterém testovaný imunoglobulin inhibuje specifické navázání referenční protilátky na běžný antigen, jako je A β . Je známa řada typů kompetitivních vazebných testů, například: přímý nebo nepřímý radioimunologický test na pevné fázi (RIA), přímý nebo nepřímý enzymatický imunologický test na pevné fázi (EAI), sendvičový kompetitivní test (popisuje se v publikaci Stahli et al., *Methods in enzymology* 9: 242–253 (1983)), přímý biotin–avidinový EIA na pevné fázi (popisuje se v publikaci Kirkland et al., *J. Immunol.* 137: 3614–3619 (1986)), přímý značený test na pevné fázi, přímý značený sendvičový test na pevné fázi (popisuje se v publikaci Harlow and Lane, „Antibodies, A Laboratory Manual“, Cold Spring Harbor Press (1988)), přímý značený test RIA na pevné fázi, kdy se jako značka použije I–125 (popisuje se v publikaci Morel et al., *Molec. Immunol.* 25(1): 7–15 (1988)), přímý biotin–avidinový test EIA na pevné fázi (popisuje se v publikaci Cheung et al., *Virology* 176: 546–552 (1990)) a přímý značený test RIA (Moldenhauer et al., *Scand. J. Immunol.* 32: 77–82 (1990)). V typickém případě takový test zahrnuje použití čištěného antigenu vázaného na pevný povrch nebo na buňky nesoucí buď neznačený testovaný imunoglobulin a značený referenční imunoglobulin. Kompetitivní inhibice se měří stanovením množství značky vázané na pevný povrch nebo buněk v přítomnosti testovaného imunoglobulinu. Obvykle testovaný imunoglobulin je přítomen v nadbytku. Protilátky identifikované kompetitivním testem (kompetitivní protilátky) zahrnují protilátky vázající se na samotný epitop jako referenční protilátka a protilátky váza-

jící se na přilehlý epitop dostatečně blízký epitopu vázaném na referenční protilátku, aby se objevila prostorová překážka. Obvykle, když je přítomná kompetitivní protilátka v nadbytku, bude inhibovat specifické navázání referenční protilátky na běžný antigen alespoň z 50 nebo 75 %.

- 5 Kompetice nebo metody „obsahující“ jeden nebo více zmiňovaných elementů mohou zahrnovat jiné elementy, které nejsou specificky uvedeny. Například prostředek, který obsahuje peptid A β obsahuje izolovaný peptid A β a peptid A β , jako komponent větší polypeptidové sekvence.

I. Obecný popis

10

Několik amyloidogenních onemocnění a stavů se charakterizovalo přítomností depozitů peptidu A β , který tvoří agregáty s nerozpustnou hmotou v mozku pacienta. Taková onemocnění zahrnují Alzheimerovu nemoc, Downův syndrom a poruchy poznávání. Později se vyskytuje symptom Alzheimerovy nemoci a Downova syndromu, ale stav pacienta nemusí vykazovat žádnou z charakteristik žádného uvedeného onemocnění. Příkladem jsou slabé poruchy poznávání nebo ztráta paměti spojená s věkem pacientů, u kterých se ještě nevyvinula nebo nikdy se nevyvine Alzheimerova nemoc. Slabá porucha poznávání může být definována skóre v testu „Mini-Mental State Exam“ v souladu s dohodnutými zvyklostmi. Taková onemocnění jsou charakterizována agregáty A β , které mají strukturu skládaného β -listu a barví se barvivem červeň Congo. Základní přístup prevence nebo léčby Alzheimerovy nemoci nebo jiných amyloidogenních nemocí vytvořením imunogenní odezvy na komponent amyloidního depozitu u pacienta se popisuje v dokumentu WO 99/27 944 (uvedeno jako citace). Dokument opakuje a potvrzuje účinnost základního přístupu. Dokument se svým principem dotýká zdokonalených činidel, která se používají v metodách. Taková zdokonalení jsou předpokládána na základě lokalizovaných preferovaných epitopů v A β proti kterému je řízena imunogenní odezva. Identifikace preferovaných epitopů v A β vede ke vzniku činidel a metod, které mají zvýšenou účinnost, snížený potenciál pro vedlejší účinky a/nebo vedou ke zjednodušení výroby, tvorby a aplikace.

30

II. Terapeutická činidla

Imunogenní odezva může být aktivní, jako když se imunogen aplikuje za účelem vyvolání protilátek reaktivních s A β u pacienta, nebo může být pasivní, jako když se aplikuje protilátka, která se váže na A β u pacienta.

35

1. Činidla vyvolávající aktivní imunitní odezvu

Terapeutická činidla vyvolávají imunogenní odezvu specificky řízenou na jisté epitopy v peptidech A β . Mezi preferovaná činidla patří samotný peptid A β a jeho segmenty. Také se mohou použít varianty takových segmentů, analogů a napodobenin přirozeného peptidu A β , které vyvolávají protilátky a/nebo s nimi zkříženě reagují s protilátkami vytvořenými proti preferovaným epitopům peptidu A β .

45

Peptid A β také známý jako β -amyloidní peptid nebo peptid A4 (popisuje se v dokumentu US 4 666 829, Glanner and Wong, Biochem. Biophys. Res. Commun. 120, 1131 (1984)) je peptid obsahující 39 až 43 aminokyselin, který je základní komponent charakteristických plaků Alzheimerovy nemoci. Peptid A β se vytvořil zpracováním větších proteinů APP dvěma enzymy, které se nazývají sekretázy β a γ (popisuje se v publikaci Hardy, TINS 20, 154 (1997)). Známé mutace v APP spojené s Alzheimerovým onemocněním se objevují v blízkosti místa sekretázy β a γ nebo v A β . Poloha 717 je například blízko místa štěpení APP sekretázou γ při zpracování peptidu A β a polohy 670/671 jsou přibližně v místě štěpení sekretázy β . Věří se, že mutace způsobují AD interakci se štěpicími reakcemi, kterými se tvoří A β , tak že vznikne forma peptidu A β se zvýšeným množstvím aminokyselin 42/43.

50

A β má neobvyklé vlastnosti, které se mohou fixovat a aktivovat klasickou a alternativní kaskádou komplementu. Zvláště se váže na C1q a hlavně na C3bi. Toto spojení umožňuje navázání na makrofágy, které vede k aktivaci buněk B. Navíc se C3bi dále odbourává a pak se váže na CR2 na B buňkách způsobem závislým na T buňkách, který vede k 10 000 zvýšení aktivace těchto buněk. Tento mechanismus způsobuje, aby A β vytvořil imunitní odezvu z nadbytkem jiných antigenů.

A β vykazuje několik přirozeně se objevujících forem. Lidské formy A β se nazývají A β 39, A β 40, A β 41, A β 42 a A β 43. Sekvence těchto peptidů a jejich vztah k prekurzoru APP se ilustruje na obrázku č. 1 v publikaci Hardy et al., TINS 20, 155–158(1997). A β 42 má například sekvenci (SEQ ID NO: 42):

HZN–Asp–Ala–Glu–Phe–Arg–His–Asp–Ser–Gly–Tyr–Glu–Val–His–His–Gln–Lys–Leu–Val–Phe–Phe–Ala–Glu–Asp–Val–Gly–Ser–Asn–Lys–Gly–Ala–Ile–Ile–Gly–Leu–Met–Val–Gly–Gly–Val–Val–Ile–Ala–OH.

A β 41, A β 40 a A β 39 se liší od A β 42 vypuštěním Ala, Ala–Ile, a Ala–Ile–Val z C–konce. A β 43 se liší od A β 42 přítomností treoninového zbytku na C–konci.

Imunogenní fragmenty A β jsou v několika metodách vzhledem k nepoškození molekule výhodné z několika důvodů. První důvod je, že pouze jisté epitopy v peptidu A β vyvolávají použitelnou imunogenní odezvu při léčbě Alzheimerova onemocnění, stejná dávka fragmentu, který obsahuje takové epitopy poskytuje vyšší molární koncentraci použitelných imunogenních epitopů ve srovnání s dávkou nepoškozeného A β . Za druhé, jisté imunogenní fragmenty A β vytvoří imunogenní odezvu proti amyloidním depozitům, aniž dojde k podstatné imunogenní odezvě proti proteinu APP, ze kterého je A β odvozen. Výroba fragmentů peptidu A β je jednodušší ve srovnání s neporušeným A β , což způsobuje jejich menší velikost. Za čtvrté, fragmenty A β netvoří agregáty s neporušeným A, zjednodušují přípravu farmaceutických prostředků a jejich aplikaci.

Některé imunogenní fragmenty A β mají sekvenci alespoň 2, 3, 5, 6, 10 nebo 20 kontinuálních aminokyselin z přirozeného peptidu. Některé imunogenní fragmenty nemají více než 10, 9, 8, 7, 5 nebo 3 kontinuální zbytky z A β . Preferují se fragmenty z N–terminální poloviny A β . Preferované imunogenní fragmenty zahrnují A β 1–5, 1–6, 1–7, 1–10, 3–7, 1–3 a 1–4. Označení fragmentu A β 1–5 například indikuje fragment zahrnující zbytky 1 až 5 peptidu A β a nedostatek jiných zbytků A β . Zvláště výhodné jsou fragmenty začínající zbytky 1 až 3 peptidu A β a končící zbytky 7 až 11. Fragment A β 1–12 se může také použít, ale je méně výhodný. V některých metodách je fragmentem N–terminální fragment, který je jiný než A β 1–10. Jiné méně výhodné fragmenty zahrnují A β 13–28, 17–28, 1–28, 25–35, 35–49 a 35–42. U těchto fragmentů je nutné před použitím testovat aktivitu odstranění nebo prevence amyloidních depozitů, jak se popisuje v sekci Příklady provedení vynálezu. V některých metodách se použijí fragmenty, kterým chybí alespoň jeden a někdy alespoň pět nebo 10 C–terminálních aminokyselin přítomných v přirozeně se vyskytujících formách A β . Například fragment, kterému chybí 5 aminokyselin C–konce A β 43 zahrnuje prvních 38 aminokyselin z N–konce A β . Jiné komponenty amyloidních plaků, jako je například synuklein a jeho epitopické fragmenty se mohou také použít při vyvolání imunogenní odezvy.

Pokud není uvedeno jinak odkaz na A β zahrnuje přirozeně lidské aminokyselinové sekvence uvedené shora v textu stejně jako analogy zahrnující alely, druhy a indukované varianty. Analogy se v typickém případě liší od přirozeně se vyskytujících peptidů jednou, dvěma nebo několika polohami, často konzervativními substitucemi. Analogy v typickém případě vykazují alespoň 80 nebo 90 % shodu sekvence s přirozenými peptidy. Některé analogy také zahrnují nepřirozené aminokyseliny nebo modifikace N nebo C terminálních aminokyselin jedné, dvou nebo několika poloh. Například přirozený zbytek kyseliny aspartové v poloze 1 a/nebo 7 A β může být nahrazen

kyselinou izoaspartovou. Příklady nepřírozených aminokyselin jsou D-aminokyseliny, α,α -disubstituované aminokyseliny, N-alkylované aminokyseliny, kyselina mléčná, 4-hydroxyprolin, γ -karboxyglutamát, ϵ -N,N,N-trimethyllysin, ϵ -N-acetyllysin, O-fosfoserin, N-acetylserin, N-formylmethionin, 3-methylhistidin, 5-hydroxylysin, ω -N-methylarginin a isoaspartová kyselina. U fragmentů a analogů se může testovat profylaktická nebo terapeutická účinnost transgenního zvířecího modelu v porovnání s neléčenými kontrolami nebo s placebem, jak se popisuje dále v textu.

Peptid A β , jeho fragmenty a analogy se mohou syntetizovat syntézou peptidů na pevné fázi nebo rekombinantní expresí nebo se mohou získat z přírodních zdrojů. Automatické syntetizátory peptidů jsou běžně dostupné u řady výrobců, jako je Applied Biosystems, Foster City, California. Rekombinantní exprese může probíhat v bakteriích, jako je *E. coli*, v kvasinkách, v hmyzích nebo savčích buňkách. Postupy rekombinantní exprese se popisuje v publikaci Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (C. S. H. P. Press, NY 2d ed., 1989). Některé formy peptidu A β jsou také běžně dostupné (například u firem American Peptides Company, Inc., Sunnyvale, CA a California Peptide Research, Inc., Napa, CA).

Terapeutická činidla také zahrnují delší polypeptidy, které zahrnují například aktivní fragment peptidu A β spolu s jinými aminokyselinami. Preferovaná činidla například zahrnují fúzní proteiny obsahující segment peptidu A β fúzovaný s heterologní aminokyselinovou sekvencí, která vyvolává odezvu u pomocných T buněk proti heterologní aminokyselinové sekvenci a tím odezvu T buněk proti heterologní aminokyselinové sekvenci a tím odezvu B buněk proti segmentu A β . U takových polypeptidů se může testovat profylaktická a terapeutická účinnost u zvířecích modelů ve srovnání s neléčenými kontrolami nebo s placebem, jak se popisuje dále v textu. Peptid A β , analog, aktivní fragment nebo jiný polypeptid se může aplikovat ve spojení nebo v multimétní formě nebo v disociované formě. Terapeutická činidla také zahrnují multiméry monomérních imunogenních činidel.

V dalších variantách může být imunogenní peptid, jako je fragment A β , prezentován bakterií nebo virem, jako část imunogenního prostředí. Nukleová kyselina kódující imunogenní peptid je začleněna do genomu nebo episomu viru nebo bakterie. Nukleová kyselina je začleněna takovým způsobem, že imunogenní peptid se exprimuje jako vylučovaný protein nebo jako fúzní protein s vnějším povrchovým proteinem viru nebo s transmembránovým proteinem bakterie tak, že se vyjadřuje peptid. Viry nebo bakterie používané při takových metodách by měly být nepatogenní nebo utlumené. Vhodné viry zahrnují adenoviry, HSV, virus Venezuelské koňské encefalitidy a jiné viry alfa, virus vesikulární stomatitidy a jiné viry rhabdo, virus vakcínie a neštovic. Vhodné bakterie zahrnují *Salmonella* a *Shigella*. Zvláště vhodná je fúze imunogenního peptidu s HbsAg HBV. Terapeutická činidla také zahrnují peptidy a jiné sloučeniny, které nepotřebují mít podstatnou aminokyselinovou sekvenci podobnou peptidu A β , ale které neslouží jako napodobeniny A β a vyvolávají podobnou imunitní odezvu. U libovolných peptidů a proteinů tvořících skládané β -lísty se testuje jejich vhodnost. Mohou se použít anti-idiotypické protilátky proti monoklonálním protilátkám proti A β nebo jiným amyloidogenním peptidům. Takové anti-Id protilátky napodobují antigen a tvoří proti nim imunitní odezvu (popisuje se v publikaci *Essential Immunology* (Roit ed., Blackwell Scientific Publications, Palo Alto, 6th ed., p.181). Činidla jiná než peptidy by měly vyvolat imunogenní odezvu proti jednomu nebo více preferovaných segmentů peptidu A β uvedených shora v textu (například segmenty 1-10, 1-7, 1-3 a 3-7). Taková činidla výhodně vyvolávají imunogenní odezvu, která je určena jednomu ze segmentů, aniž je určena jiným segmentům peptidu A β .

U náhodných knihoven peptidů nebo jiných sloučenin se může také testovat jejich vhodnost. Kombinační knihovny je možné produkovat v případě řady typů sloučenin, které se mohou syntetizovat postupným způsobem. Takové sloučeniny zahrnují polypeptidy, beta-točivé napodobeniny, polysacharidy, fosfolipidy, hormony, prostaglandiny, steroidy, aromatické sloučeniny, heterocyklické sloučeniny, benzodiazepiny, oligomérní glycinu substituované na N-konci a oligokar-

bamáty. Velké kombinační knihovny sloučenin se mohou zkonstruovat způsobem kódovaných syntetických knihoven (ESL) popsanych v dokumentu WO 95/12 608 (Affymax), WO 93/06 121 (Affymax), WO 94/06 051 (Columbia University), WO 95/35 503 (Pharmacopoeia) a WO 95/30 642 (Scripps). Peptidové knihovny je možné vytvořit metodami vyjadřujícími fága (popisuje se v dokumentu WO 91/18 980 (Devlin)).

U kombinačních knihoven a jiných sloučenin se na začátku testuje jejich vhodnost tím, že se stanoví jejich kapacita vázat protilátky nebo jejich lymfocyty (B nebo T), o kterých se ví, že jsou specifické pro peptid A β nebo jiné amyloidogenní peptidy. Například počáteční testování se může provést libovolným polyklonálním sérem nebo monoklonální protilátkou proti peptidu A β nebo jeho fragmentu. U sloučenin se pak může testovat schopnost vázat se na specifický epitop v A β (například 1–10, 1–7, 1–3, 1–4, 1–5 a 3–7). Sloučeniny se mohou testovat stejnými postupy, které se popisují při mapování specifit protilátkových epitopů. U sloučenin určených takovým testováním se pak dále analyzuje kapacita vyvolat protilátky nebo reaktivní lymfocyty proti A β nebo jeho fragmenty. Vícenásobné ředění séra se například může testovat na mikrotitračních destičkách, které se předem potáhly peptidem A β nebo jeho fragmentem a provedl se standardní test ELISA za účelem testovat reaktivitu protilátek vůči A β nebo fragmentu. U sloučenin se pak testuje profylaktická a terapeutická účinnost u transgenních zvířat, které mají dispozici pro amyloidogenní onemocnění, jak se popisuje v sekci příkladů. Taková zvířata zahrnují například myši nesoucí mutaci APP v poloze 717, jak se popisuje v publikaci Games et al., *Nature* 373, 523 (1995), a myši nesoucí švédskou mutaci APP v místě 670/671 tak, jak se popisuje v dokumentu US 5 612 486 (McConlogue et al.) a v publikaci Hsio et al., *Science* 274, 99 (1996), Staufenbiel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13287–13292 (1997), Sturchler-Pierrat et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13287–13292 (1997), Borchelt et al., *Neuron* 19, 939–945 (1997)). Stejný testovací přístup se použil u jiných analogů potenciálních činidel A β a delších peptidů, které zahrnují fragmenty A β , jak se popisuje shora v textu.

2. Činidla vyvolávající pasivní imunitní odezvu

Terapeutická činidla podle vynálezu zahrnují protilátky, které se specificky váží na peptid A β nebo jiný komponent amyloidních plaků. Takové protilátky mohou být monoklonální nebo polyklonální. Některé takové protilátky se specificky váží na agregovanou formu A β , aniž se váží na disociovanou formu. Některé protilátky se specificky váží na disociovanou formu, aniž se váží na agregovanou formu. Některé protilátky se váží na agregovanou a disociovanou formu. Některé takové protilátky se váží na přirozeně se vyskytující krátkou formu peptidu A β (to je A β 39, 40 nebo 41), aniž se váží na přirozeně se vyskytující dlouhou formu A β (to je A β 42 a A β 43). Některé protilátky se váží na dlouhou formu, aniž se váží na krátkou formu. Některé protilátky se váží na A β , aniž se váží na amyloidní prekurzorový protein plné délky. Protilátky používané při terapeutických metodách mají obvykle neporušenou konstantní oblast nebo alespoň dostatečnou konstantní oblast k interakci s receptorem Fc. Preferuje se lidský izotyp IgG1, protože vykazuje nejvyšší afinitu lidských izotypů pro receptor FcR1 na fragocytární buňky. Mohou se také použít bispecifické fragmenty Fab, ve kterých jedno rameno protilátky má specifitu pro A β a druhé rameno je specifické pro Fc receptor. Některé protilátky se vážou na A β s vazebnou afinitou vyšší nebo rovnou přibližně hodnotě 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 nebo 10^{10} M $^{-1}$.

Polyklonální sérum v typickém případě obsahuje smíchané populace protilátek vázajících se na několik epitopů v A β . Polyklonální sérum však může být specifické pro určitý segment A β , jako je segment A β 1–10. Monoklonální protilátky se váží na specifický epitop v A β , který může být konformačním nebo nekonformačním epitopem. Profylaktická a terapeutická účinnost protilátek se může testovat použitím postupů pro transgenní zvířecí model popsany v sekci příkladů. Preferované monoklonální protilátky se váží na epitop ve zbytcích 1–10 A β (s prvním N-terminálním zbytkem přirozeného A β označeného 1). Některé preferované monoklonální protilátky se váží na epitop v aminokyselinách 1 až 5 a některé na epitop v aminokyselinách 5 až 10. Některé preferované protilátky se váží na epitopy v aminokyselinách 1 až 3, 1 až 4, 1 až 5, 1 až 6, 1 až 7 nebo 3

až 7. Některé preferované protilátky se váží na epitop, který začíná zbytky 1 až 3 a končí zbytky 7 až 11 peptidu A β . Méně výhodné protilátky zahrnují ty, které se váží na epitopy se zbytky 10 až 15, 15 až 20, 25 až 30, 10 až 20, 20, 30 nebo 10 až 25 peptidu A β . Doporučuje se, že u takových protilátek se testuje před použitím aktivita v myším modelu, což se popisuje dále v textu v sekci Příklady provedení vynálezu. Zjistilo se, například že jisté protilátky proti epitopům ve zbytcích 10 až 18, 16 až 24, 18 až 21 a 33 až 42 nevykazují aktivitu. U některých metod se používá více monoklonálních protilátek a vykazuje vazebnou specifitu vůči různým epitopům. Takové protilátky se mohou aplikovat postupně nebo současně. Mohou se také použít protilátky proti amyloidním komponentům, které jsou jiné než A β . Například protilátky mohou být řízeny amyloidním asociovaným proteinem synuklein.

Když se řekne, že protilátky se váží na epitop ve specifikovaných zbytcích, jako je například A β 1–5, znamená to, že se protilátka specificky váže na polypeptid obsahující specifikované zbytky (to je v tomto příkladu A β 1–5). Taková protilátka nepřichází nezbytně do kontaktu s každým zbytkem v A β 1–5. Vazebnou afinitu ani podstatně neovlivňuje žádná jediná substituce nebo delece aminokyseliny v A β 1–5. Specifita epitopu protilátky se může stanovit například vytvořením knihovny vyjadřující fága, ve které různí členové vyjadřují různé subsekvence A β . V knihovně vyjadřující fága se pak mohou vybrat členi, kteří se specificky váží na testovanou protilátku. Izolovala se rodina sekvencí. V typickém případě taková rodina obsahuje běžnou jadernou sekvenci a různé délky lemujících sekvencí u různých členů. Nejkratší jaderná sekvence vykazující specifické navázání na protilátku definuje epitop vázaný protilátkou. U protilátek se také testuje specifita epitopu v kompetičním testu s protilátkou, jejíž specifita epitopu se již stanovila. Například protilátky, které soutěží s protilátkou 3D6 o navázání na A β se váží na stejný nebo podobný epitop jako protilátka 3D6, to znamená na zbytky A β 1–5. Podobně, protilátky, které soutěží s protilátkou 10D5 se váží na stejný nebo podobný epitop, to je na epitop ve zbytcích A β 3–6. Testování protilátek na specifitu pro epitop je použitelný prediktor terapeutické účinnosti. Například je pravděpodobné, že protilátka, která se váže na epitop ve zbytcích 1 až 7 A β bude účinná při prevenci a léčbě Alzheimerovy nemoci.

Monoklonální nebo polyklonální protilátky, které se specificky váží na preferovaný segment A β , aniž se vážou na jiné oblasti A β mají řadu výhod vzhledem k monoklonálním protilátkám, které se váží na jiné oblasti nebo polyklonální séra vůči neporušenému peptidu A β . Zprv, v případě stejné hmotnostní dávky, dávky protilátek, které se specificky váží na výhodné segmenty, obsahují vyšší molární dávky protilátek účinných při odstranění amyloidních plaků. Za druhé, protilátky, které se specificky váží na výhodné segmenty, mohou vyvolat odstraňující odezvu proti amyloidním depozitům, aniž vyvolají odstraňující odezvu proti neporušenému polypeptidu APP, čímž se snižuje potencionální vedlejší účinek.

i. Obecné charakteristiky imunoglobulinů

Je známo, že základní strukturální jednotka protilátky obsahuje tetramér podjednotek. Každý tetramér se skládá ze dvou shodných párů polypeptidových řetězců, přičemž každý pár má jeden lehký (molekulová hmotnost je přibližně 25 000) a jeden těžký řetězec (molekulová hmotnost je přibližně 50 000 až 70 000). Aminoterminální část každého řetězce zahrnuje variabilní oblast, která obsahuje přibližně 100 až 110 nebo více aminokyselin, jenž jsou primárně odpovědné za rozeznání antigenu. Karboxy-terminální část každého řetězce definuje konstantní oblast, která je primárně odpovědná za funkci efektoru.

Lehké řetězce se klasifikují buď jako kappa, nebo lambda. Těžké řetězce se klasifikují jako gamma, alfa, delta nebo epsilon a definují protilátkový izotop, jako je IgG, IgM, IgA, IgD a IgE. V lehkém a těžkém řetězci je variabilní a konstantní oblast spojena oblastí „J“, která obsahuje 12 nebo více aminokyselin. V těžkém řetězci k tomuto účelu také slouží oblast „D“, která obsahuje přibližně o 10 aminokyselin více (popisuje se v publikaci *Fundamental Immunology*, Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y., 1989), Ch. 7).

Variabilní oblasti každého páru lehkého/těžkého řetězce tvoří vazebné místo protilátky. Tak neporušená protilátka má dvě vazebná místa. Mimo případu bifunkčních nebo bispecifických protilátek jsou tyto dvě vazebná místa stejná. Všechny řetězce vykazují stejnou obecnou strukturu relativně konzervativních rámcových oblastí (FR) spojených třemi hypervariabilními oblastmi, které se také nazývají oblastí stanovující komplementaritu nebo CDR. CDR ze dvou řetězců každého páru tvoří oblastí základní struktury (FR) spojené třemi hypervariabilními oblastmi, které se také nazývají oblastí stanovující komplementaritu nebo CDR. CDR ze dvou řetězců každého páru tvoří oblastí základní struktury, což umožňuje jeho navázání na specifický epitop. Z N-konce do C-konce oba lehký a těžký řetězec obsahuje oblasti FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 a FR4. Přřazení aminokyselin ke každé oblasti je v souladu s definicemi podle Kabata (popisuje se v publikaci Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991) nebo Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987), Chothia et al., Nature 342: 878-883 (1989)).

15 ii. Produkce protilátek, které nejsou lidské

Produkce monoklonálních protilátek, které nejsou lidské, například myší, protilátky morčat, králíků nebo krysí, se může uskutečnit například imunizací zvířete s A β . Také se mohou použít delší peptidy obsahující A β nebo imunogenní fragment A β nebo anti-idiotypické protilátky proti protilátce proti A β (popisuje se v publikaci Harlow and Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (CSHP NY, 1988)). Takový imunogen se může získat z přirozeného zdroje, syntézou peptidů nebo rekombinantní expresí. Imunogen se může aplikovat jako fúzovaný s nosičovým proteinem nebo s ním tvoří komplex, jak se popisuje dále v textu. Imunogen se dále může aplikovat spolu s adjuvans. Může se použít několik typů adjuvans, jak se popisuje dále v textu. V případě imunizace laboratorních zvířat se preferuje úplně Freundovo adjuvans a pak následuje neúplné adjuvans. Pro přípravu polyklonálních protilátek se v typickém případě použijí králíci nebo morčata. Při přípravě monoklonálních protilátek se v typickém případě používají myši. U protilátek se testuje specifické navázání na A β . U protilátek se dále testuje schopnost navázání na specifickou oblast A β . Pozdější testování se může provést stanovením navázání protilátky na sbírku delečních mutantů peptidu A β a stanovení, které A β z delečních mutantů se váže na protilátku. Navázání se může provést například Westernovým blotem nebo testem ELISA. Nejmenší fragmenty, které vykazují specifické navázání na protilátku, definují epitop protilátky. V jiném případě specifita epitopu se může stanovit kompetitivním testem, kde testované a referenční protilátky soutěží o navázání na A β . Jestliže testované a referenční protilátky soutěží, pak se váží na stejný epitop nebo epitopy dostatečně blízké, přičemž navázání jedné protilátky interferuje s navázáním druhé protilátky. Výhodným izotopem takových protilátek je myší izotyp IgG2 nebo ekvivalentní izotyp v jiném druhu. Myší izotyp IgG2 je ekvivalent lidského izotypu IgG1.

40 iii. Chimérové a humanizované protilátky

Chimérové a humanizované protilátky mají stejnou nebo podobnou vazebnou specifitu a afinitu jako myší nebo jiná nelidská protilátka, která poskytuje počáteční materiál pro konstrukci chimérové nebo humanizované protilátky. Chimérové protilátky jsou protilátky, jejichž geny lehkého a těžkého řetězce se mají zkonstruovat v typickém případě genovou manipulací ze segmentů genu imunoglobulinu, které patří k různým druhům. Například variabilní segmenty (V) genů z myší monoklonální protilátky se mohou spojit s lidskými konstantními segmenty (C), jako je IgG1 a IgG4. Preferuje se lidský izotyp IgG1. Typická chimérová protilátková je tak hybridní protein, který obsahuje oblast V nebo oblast vázající se na antigen z myší protilátky a oblast C nebo efektorovou oblast z lidské protilátky.

Humanizované protilátky mají zbytky základní struktury variabilní oblasti, které v podstatě pochází z lidské protilátky (nazývá se akceptorová protilátka) a oblastí stanovující komplementaritu pocházející v podstatě z myší protilátky (nazývá se donorový imunoglobulin) (popisuje se v publikaci Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029-10033 (1989) a v dokumentu

WO 90/07861, US 5 693 762, US 5 693 761, US 5 585 089, US 5 530 101 a US 5 225 539 (Winter). Konstantní oblast(i), jestli jsou přítomné, pocházejí také v podstatě nebo zcela z lidského imunoglobulinu. Lidské variabilní oblasti se obvykle vybraly z lidských protilátek, jejichž sekvence základní struktury vykazují vysoký stupeň sekvenci shody s oblastmi myších variabilních oblastí, ze kterých se získaly CDR. Zbytky základní struktury variabilní oblasti těžkého a lehkého řetězce se mohou získat ze stejných nebo různých sekvencí lidské protilátky. Sekvence lidské protilátky mohou být sekvence přirozeně se vyskytujícími lidských protilátek nebo mohou být konvenční sekvence několika lidských protilátek (popisuje se v dokumentu Carter et al., WO 92/22 653). Jisté aminokyseliny ze zbytků základní struktury lidské variabilní oblasti se vybralo pro substituci založené na jejím možném vlivu na konformaci CDR a/nebo na navázání na antigen. Zkoumání takových možných vlivů se provádí modelováním, testováním charakteristik aminokyselin v určitých polohách nebo empirickým pozorováním účinků substituce nebo mutagenese určitých aminokyselin.

Například když se zbytek základní struktury variabilní oblasti liší od zbytku základní struktury vybrané lidské variabilní oblasti, pak by se měla aminokyselina základní struktury obvykle substituuovat ekvivalentní aminokyselinou základní struktury z myší protilátky, když se očekává, že aminokyselina:

- (1) se nekovalentně váže přímo na antigen,
- (2) sousedí oblastí CDR,
- (3) interaguje jiným způsobem s oblastí CDR (například je přibližně v 6 N oblasti CDR) nebo
- (4) leží v meziprostoru v VL-VH

Jinými kandidáty substituce jsou akceptory lidských aminokyselin základní struktury, které jsou v případě lidského imunoglobulinu v této poloze neobvyklé. Tyto aminokyseliny se mohou substituuovat aminokyselinami z ekvivalentní polohy myší donorové protilátky nebo z ekvivalentních poloh více typických lidských imunoglobulinů. Jiní kandidáti substituce jsou akceptorové lidské aminokyseliny základní struktury, které jsou v případě lidského imunoglobulinu v této poloze neobvyklé. Základní struktury variabilní oblasti humanizovaných imunoglobulinů obvykle vykazují alespoň 85 % sekvenci shody se sekvencí základní struktury lidské variabilní oblasti nebo s konvenční sekvencí.

iv. Lidské protilátky

Lidské protilátky proti A β se připravují různými způsoby, které se popisují dále v textu. Takové lidské protilátky se vybraly pomocí kompetitivních vazebných experimentů nebo když mají stejnou specifitu k epitopu, jako určitá myší protilátka, tak jako jeden z myších monoklonálních popsaných v příkladu XI. Lidské protilátky se mohou také testovat za účelem zjištění určité epitopové specifity použitím pouze fragmentu A β , jako imunogenu a/nebo testováním protilátek proti souboru delečních mutantů A β . Lidské protilátky mají s výhodou izotypovou specifitu lidského IgG1.

(1) Způsob triomů

Základní přístup a příklad buněčného fúzního partnera SPAZ-4 vhodného pro použití v tomto přístupu se popisuje v publikaci Oestberg et al., Hybridoma 2: 361-367 (1983), (Oestberg) US 4 634 664 a (Engleman et al.,) US 4 634 666. Buněčné linie produkující protilátky získané touto metodou se nazývají triomy, protože potomky tří buněk: dvou lidských buněk a jedné myší. Na začátku se myší linie myelomu fúzuje s lidským B-lymfocytem, aby se získal xenogenní hybridní buňka, která neprodukuje protilátku, jako je buněčná linie SPAZ-4 popsaná v publikaci Oestberg et al., Hybridoma 2: 361-367 (1983). Xenogenní buňka se pak fúzuje s imunizovaným lidským B-lymfocytem, aby se získala buněčná linie produkující triomy. Zjistilo se, že triomy produkují protilátky, které jsou stabilnější ve srovnání s obyčejnými hybridomy připravenými z lidských buněk.

- Imunizované B-lymfocyty se získaly z krve, sleziny, lymfatických žláz nebo z kostní dřeně lidského donora. Jestliže jsou nutné protilátky proti specifickému antigenu nebo epitopu, preferuje se použít tento jejich epitop nebo antigen při imunizaci. Imunizace se může provést buď in vivo, nebo in vitro. V případě imunizace in vivo se B-buňky v typickém případě izolovaly z člověka
- 5 imunizovaného A β , jeho fragmentem, větším polypeptidem, který obsahuje A β nebo fragment nebo anti-idiotypickou protilátku vůči protilátce vůči A β . V některých metodách se buňky B izolovaly ze stejného pacienta, kterému se aplikovala protilátková terapie. V případě imunizace in vitro, se B-lymfocyty v typickém případě vystavily účinku antigenu po dobu 7 až 14 dní v kultivačním médiu, jako je RPMI-1640 (Engleman et al.) doplněném 10 % lidskou plazmou.
- 10 Imunizované B-lymfocyty se fúzovaly s xenogenní hybridní buňkou, jako je SPAZ-4. Buňky se například ošetřují 40 až 50% polyethylenglykolem s MW 1 000 až 4 000 při teplotě přibližně 37 °C po dobu 5 až 10 minut. Buňky se separovaly z fúzní směsi a pomnožily se v kultivačním médiu, které je selektivní pro požadované hybridy (například HAT nebo AH). Klony vylučující protilátky vykazující požadovanou vazebnou specifitu se identifikovaly testováním schopnosti kultivačního média triomů vázat se na A β nebo jeho fragment. Lidské protilátky produkující triomy vykazující požadovanou specifitu se subklonovaly způsobem limitovaného ředění a růstem in vitro v kultivačním médiu. U získaných buněčných linií triomů se pak testovala schopnost vázat se na A β nebo jeho fragment.
- 20 Ačkoli triomy jsou geneticky stabilní, neprodukují velké množství protilátek. Síla exprese se může zvýšit klonováním genů protilátek z triomů do jednoho nebo více expresivních vektorů a transformací vektoru do standardní savčí, bakteriální nebo kvasinkové buněčné linie.

(2) Transgenní savci, kteří nezahrnují člověka

- 25 Lidské protilátky proti A β mohou být také produkovány z transgenních savců, kteří obsahují transgeny kódující alespoň segment lidského imunoglobulinového lokusu. Obvykle endogenní imunoglobulinový lokus takových transgenních savců je funkčně deaktivován. Upřednostňuje se, aby segment lidského imunoglobulinového lokusu zahrnoval neuspořádané sekvence komponentů těžkého a lehkého řetězce. Deaktivace endogenních imunoglobulinových genů a zavedení exogenních imunoglobulinových genů se může dosáhnout cílenou homologní rekombinací nebo zavedením chromozomů YAC. Transgenní zvířata, která vznikají v tomto postupu, jsou schopny funkčně přestavět sekvence imunoglobulinového komponentu a exprimovat repertoár protilátek různých izotypů kódovaných lidskými imunoglobulinovými geny, aniž exprimují endogenní
- 30 imunoglobulinové geny. Publikace a vlastnosti savců, kteří vykazují tyto vlastnosti, se popisují detailněji například v dokumentu Lonberg et al., WO 93/12 227 (1993), US 5 877 397, US 5 874 299, US 5 814 318, US 5 789 650, US 5 770 429, US 5 661 016, US 5 633 425, US 5 625 126, US 5 569 825, US 5 545 806 a v publikaci Nature 148, 1547-1553 (1994), Nature Biotechnology 14, 826 (1996), Kucherlapati, WO 91/10 741 (1991). Zvláště vhodné jsou transgenní myši. Protilátky proti A β se získaly imunizací transgenního savce tak, jak se popisuje v dokumentu Lonberg nebo Kucherlapati uvedených shora v textu s A β nebo s jeho fragmentem. Monoklonální protilátky se připravily například fúzí B-buněk z takových savců s vhodnou buněčnou linií myelomu za použití běžné technologie podle Kohlera-Milsteina. Lidské polyklonální protilátky se mohou také připravit ve formě séra z lidí imunizovaných imunogenním činidlem.
- 40 Takové polyklonální protilátky se mohou koncentrovat afinitním čištěním použitím A β nebo jiného amyloidního peptidu, jako afinitního činidla.

(3) Metody vyjadřující fága

- 50 Dalším přístupem, jak získat lidské protilátky proti A β je testování knihovny DNA z lidských B buněk podle obecného protokolu, který se popisuje v publikaci Huse et al., Science 246: 1275-1281 (1989). Jak se popisuje v případě metodologie triomů takové B buňky je možné získat z lidí imunizovaných A β , fragmenty, delšími polypeptidy, které obsahují A β nebo fragmenty nebo anti-idiotypickými protilátkami. Takové B buňky se získaly z pacientů, kterým se aplikovala

protilátková léčba. Vybraly se protilátky vázající se na A β nebo jejich fragmenty. Sekvence kódující takové protilátky (nebo vazebné fragmenty) se pak klonují a amplifikují. Protokol popsany v publikaci Huse et al., Science 246: 1275–1281 (1989) je účinnější v kombinaci s technologií vyjadřující fága (popisuje se v dokumentu Dower et al., WO 91/17 271 a McCafferty et al., WO 92/01 047, US 5 877 218, US 5 871 907, US 5 858 657, US 5 837 242, US 5 733 743 a US 5 565 332. V těchto metodách se produkují fágové knihovny, ve kterých členové na svém povrchu vykazují různé protilátky. Protilátky se obvykle vykazují jako fragmenty Fv nebo Fab. Protilátky vykazující fága s požadovanou specifikou jsou vybrány afinitním obohacením peptidu A β nebo jeho fragmentu.

Různé metody vykazující fága produkují lidské protilátky, které mají vazebnou specifikou vybrané myši protilátky (Winter WO 92/20 791). V této metodě se jako počáteční materiál používá variabilní oblast buď těžkého, nebo lehkého řetězce vybrané myši protilátky. Jestliže se například jako počáteční materiál vybrala variabilní oblast lehkého řetězce, zkonstruovala se fágová knihovna, ve které členové vykazují stejnou variabilní oblast lehkého řetězce (to je myši počáteční materiál) a odlišnou variabilní oblast těžkého řetězce. Vybrané variabilní oblasti těžkého řetězce se získaly z knihovny znovu uspořádaných variabilních oblastí lidského těžkého řetězce. Fág vykazuje silné specifické navázání pro A β (například alespoň 10^8 a přednostně alespoň 10^9 M $^{-1}$). Variabilní oblast těžkého řetězce z tohoto fága pak slouží jako počáteční materiál při konstrukci další fágové knihovny. V této knihovně každý fág vykazuje stejnou variabilní oblast těžkého řetězce (to je oblast identifikovanou z první vyjadřující knihovny) a odlišnou variabilní oblast lehkého řetězce. Variabilní oblasti lehkého řetězce se získaly z knihovny znovu uspořádaných variabilních oblastí lidského lehkého řetězce. Opět se vybral fág, vykazující silné specifické navázání na A β . Tyto fágové vykazují variabilní oblasti zcela lidských protilátek proti A β . Tyto protilátky mají obvykle stejnou nebo podobnou specifikou k epitopu jako myši počáteční materiál.

v. Výběr konstantní oblasti

Variabilní oblasti těžkého a lehkého řetězce chimérových, humanizovaných nebo lidských protilátek se mohou vázat na alespoň část lidské konstantní oblasti. Volba konstantní oblasti závisí zčásti na skutečnosti, zda se požaduje komplement závislý na protilátce a/nebo toxicita zprostředkovaná buňkou. Například izotypy IgG1 a IgG3 mají aktivitu komplementu a izotypy IgG2 a IgG4 tuto aktivitu nevykazují. Volba izotypu může také způsobit vstup protilátky do mozku. Preferuje se lidský izotyp IgG1. Konstantní oblasti lehkého řetězce mohou být lambda nebo kappa. Protilátky se mohou exprimovat jako tetraméry, které obsahují dva lehké a dva těžké řetězce, jako separované těžké řetězce, lehké řetězce, jako fragment Fab, Fab'/F(ab') $_2$ a Fv nebo jako jednofetězcevé protilátky, ve kterých variabilní oblasti lehkého řetězce jsou spojeny mezerníkem.

vi. Expresie rekombinantních protilátek

Chimérové, humanizované a lidské protilátky v typickém případě vznikají rekombinantní expresí. Rekombinantní polynukleotidové konstrukce v typickém případě zahrnují expresi kontrolní sekvence operativně spojené s kódujícími sekvencemi protilátkových řetězců, které zahrnují přirozeně asociované nebo heterologní promotorové oblasti. Výhodné je, když expresivní kontrolní sekvence jsou eukaryontní promotorové systémy ve vektorech schopných transformovat nebo transfekovat eukaryontní hostitelské buňky. Když se vektor začlení do vhodného hostitele, hostitel se udržuje za podmínek vhodných pro silnou expresi nukleotidových sekvencí a pak dochází ke sběru a čištění zkříženě reagujících protilátek. Tyto expresivní vektory jsou v typickém případě replikovatelné v hostitelských organizmech buď jako epizomy, nebo jako integrální část hostitelské chromozomální DNA. Běžné expresivní vektory obsahují selekční markery, jako například rezistence na ampicilin nebo na hydromycin, aby se umožnila detekce těchto buněk transformovaných požadovanými sekvencemi DNA.

Bakterie *E. coli* je jeden prokaryontní hostitel, který je zvláště použitelný při klonování sekvencí DNA podle vynálezu. Za účelem exprese je možné použít mikroorganismy, jako jsou kvasinky. *Saccharomyces* je preferovaný kvasinkový hostitel s vhodnými vektory, které mají sekvence řídicí exprese, počátek replikace, terminační sekvence a podobně, podle nutnosti. Typické promotory zahrnují 3-fosfoglycerátovou kinázu a jiné glykolytické enzymy. Indukovatelné kvasinkové promotory zahrnují mezi jinými promotory pocházející z dehydrogenázy alkoholu, izocytochrom C a enzymy odpovědné za využití maltózy a galaktózy.

Savčí buňky jsou preferovaným hostitelem vhodným pro expresi nukleotidových segmentů, které kódují imunoglobuliny nebo jejich fragmenty (popisuje se v publikaci Winnacker, Genes and Clones, (VCH Publishers, NY, 1987)). V oboru se vyvinula řada buněčných linií vhodného hostitele, které jsou schopné vylučovat neporušené heterologní proteiny. Tyto linie zahrnují CHO, různé buněčné linie COS, buňky HeLa, buňky L a buněčné linie myelomu. Upřednostňují se buňky, které nejsou lidské. Expresivní vektory pro tyto buňky mohou zahrnovat expresivní kontrolní sekvence, jako počátek replikace, promotor, zesilovač (popisuje se v publikaci Queen et al., Immunol. Rev. 89: 49 (1986)) a nezbytná informační místa pro zpracování, jako jsou místa pro navázání ribozómu, místa sestřihu RNA, polyadenylační místa a terminační sekvence transkripce. Preferované sekvence řídicí exprese jsou promotory získané z endogenních genů, cytomegaloviru, SV40, adenoviru, bovinního papilomaviru a podobně (popisuje se v publikaci Co et al., J. Immunol. 148: 1149 (1992)).

V jiném případě sekvence kódující protilátky se mohou začlenit do transgenů, aby se mohly zavést do genomu transgenního zvířete a následně exprimovat v mléku transgenního zvířete (popisuje se například v publikaci US 5 741 957, US 5 304 489, US 5 849 992). Vhodné transgeny zahrnují kódující sekvence lehkého a/nebo těžkého řetězce v operativním spojení s promotorem a zesilovačem z genu, který je specifický pro prsní žlázu, jako je kasein nebo beta laktoglobulin.

Vektory obsahující segmenty DNA mohou být přeneseny do hostitelské buňky dobře známými metodami, které závisí na typu buněčného hostitele. V případě prokaryontních buněk se běžně využívá chlorid vápenatý, zatímco v případě jiných buněčných hostitelů se využije aplikace fosforečnanu vápenatého, elektroporace, lipofekce, biolistika nebo transfekce založená na virech. Jiné metody používané pro transformaci savčích buněk zahrnují použití polybrenu, protoplastové fúze, lipozomů, elektroporace a mikroinjekce (v obecném případě se popisuje v publikaci Sambrook et al.). Za účelem produkce transgenních zvířat, se mohou transgeny zavést injekcí do oplodněných oocytů nebo se mohou začlenit do genomu embryonálních kmenových buněk a jádra takových buněk se přenesou do oocytů bez jader.

Když se protilátka exprimuje, může se čistit podle standardního postupu, který zahrnuje čištění HPLC, kolonovou chromatografií, gelovou elektroforézou a podobně (v obecném případě se popisuje v publikaci Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, NY, 1982)).

3. Nosičové proteiny

Některá činidla vyvolávající imunitní odezvu zahrnují vhodný epitop pro vyvolání imunitní odezvy proti amyloidním depozitům, ale jsou příliš malé, aby byly imunogenní. V této situaci se peptidový nosič může vázat na vhodný nosič, přičemž vyvolá imunitní odezvu. Vhodné nosiče zahrnují sérové albuminy, hemocyanin pšilipkovitých plžů, molekuly imunoglobulinu, tyroglobulin, ovalbumin, toxoid tetanu nebo toxoid z jiné patogenní bakterie, jako je difterie, *E. coli*, cholera nebo *H. pylori* nebo utlumený derivát toxínu. Jiné nosiče zahrnují epitopy T buňky, které se váží na velké množství alel MHC, například alespoň 75 % všech lidských alel MHC. Takové nosiče jsou někdy známy v oboru, jako univerzální epitopy T-buňky. Příklady univerzálních epitopů T-buňky zahrnují:

hemaglutinin influenzy: HA₃₀₇₋₃₁₉ (SEQ ID NO: 43) PKYVKQNTLKLAT PADRE (běžné zbytky jsou tučným písmem) (SEQ ID NO: 44) AKXVAAWTLKAAA malárie CS: epitop T3 (SEQ ID NO: 45) EKKIAKMEKASSVFNV povrchový antigen hepatitidy B: HBsAg₁₉₋₂₈ (SEQ

ID NO: 46) FFLLRILTI protein teplotního šoku 65: hsp65₁₅₃₋₁₇₁ (SEQ ID NO: 47)
 DQSIGDLIAEAMDKVGNEG mikroorganismus Calmette-Guerin (SEQ ID NO: 48) QVHFQP-
 LPPAVVKL toxoid tetanu: TT₈₃₀₋₈₄₄ (SEQ ID NO: 49) QYIKANSKFIGITEL toxoid tetanu:
 TT₉₄₇₋₉₆₇ (SEQ ID NO: 50) FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE HIV gp120 T1: (SEQ ID NO: 51)
 KQIINMWQEVGKAMYA

Jiné nosiče vhodné pro stimulaci nebo zesílení imunitní odezvy zahrnují cytokiny, jako je IL-1, peptidy IL-1 α a β , IL-2, γ IFN, IL-10, GM-CSF a chemokiny, jako je MIP1 α a β a RANTES. Imunogenní činidla mohou být také spojeny s peptidy, které zvyšují transport skrz tkáň, jak se popisuje v dokumentu O'Mahony, WO 97/17 613 a WO 97/17 614.

Imunogenní činidla se mohou vázat na nosiče chemickou vazbou. Metody navázání imunogenu na nosič zahrnují tvorbu disulfidových vazeb použitím N-sukcinimidyl-3-(2-pyridylthio)-propionátu (SPDP) a sukcinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyklohexan-1-karboxylová kyselina (SMCC) (jestliže peptidu chybí sulfhydrylová skupina, může se toto provést adicí cysteinového zbytku). Tato činidla umožňují vznik disulfidové vazby mezi činidlem a peptidovými cysteinovými zbytky na jednom proteinu a amidové vazby prostřednictvím ϵ -aminoskupiny na lyzinu nebo jiné volné aminoskupiny v jiných aminokyselinách. Různá činidla tvořící disulfid/amid se popisují v publikaci Immun. Rev. 62, 185 (1982). Jiná bifunkční spojovací činidla tvoří thioether spíše než disulfidovou vazbu. Řada těchto činidel tvořících thioether jsou běžně dostupné a zahrnují reaktivní estery kyseliny 6-maleimidokapronové, 2-bromooctové kyseliny a 2-jodoctové kyseliny, 4-(N-maleimidomethyl)cyklohexan-1-karboxylové kyseliny. Karboxylové skupiny mohou být aktivovány jejich kombinováním se sukcinimidem nebo sodnou solí 1-hydroxyl-2-nitro-4-sulfonové kyseliny.

Imunogenní peptidy se mohou také exprimovat jako fúzní proteiny s nosiči (to je heterologní peptidy). Imunogenní peptid může být spojen s nosičem svým N-koncem, svým karboxylovým koncem nebo oběma konci. Ve fúzním proteinu může být nepřímo velké množství repetitivního imunogenního peptidu. Imunogenní peptid může být spojen s velkým množstvím kopií heterologního peptidu například na obou koncích. Některé nosičové peptidy slouží k vyvolání odezvy pomocných T-buněk proti nosičovému peptidu. Indukované pomocné buňky T naopak vyvolávají odezvu B-buňky proti imunogennímu peptidu spojenému s nosičovým peptidem.

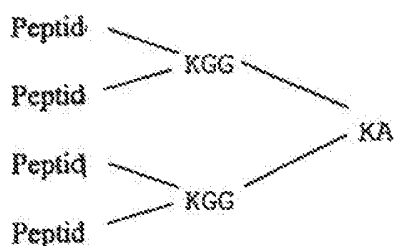
Některá činidla podle vynálezu obsahují fúzní protein, ve kterém N-terminální fragment A β je spojen svým C-koncem s nosičovým peptidem. U takových činidel N-terminální zbytek fragmentu A β stanovuje N-terminální zbytek fúzního proteinu. Takové fúzní proteiny jsou účinné při vyvolání protilátek, které se váží na epitop, který vyžaduje, aby N-terminální zbytek A β byl ve volné formě. Některá činidla podle vynálezu obsahují velké množství repetitivního N-terminálního segmentu A β spojeného svým C-koncem s jednou nebo více kopií nosičového peptidu. N-terminální fragment A β začleněný do takových fúzních proteinů někdy začíná A β 1-3 a končí A β 7-11. A β 1-7, A β 1-3, 1-4, 1-5 a 3-7 jsou preferované N-terminální fragmenty A β . Některé fúzní proteiny obsahují různé N-terminální segmenty A β v tandemu. Fúzní protein může například obsahovat A β 1-7, pak následuje A β 1-3 a pak následuje heterologní peptid.

V některých fúzních proteinech N-terminální segment A β se fúzuje svým N-koncem s heterologním nosičovým peptidem. Stejně druhy N-terminálních segmentů A β se mohou využít jako C-terminální fúze. Stejně fúzní proteiny obsahují heterologní peptid spojený s N-koncem N-terminálního segmentu A β který se naopak váže na jeden nebo více dalších N-terminálních segmentů A β v tandemu.

Některé příklady fúzních proteinů vhodných pro použití podle vynálezu jsou zobrazeny dále v textu. Některé tyto fúzní proteiny obsahují segmenty A β spojené s epitopy toxoidu tetanu, které se popisují v dokumentu US 5 196 512, EP 378 881 a EP 427 347. Některé fúzní proteiny obsahují segmenty A β spojené s nosičovými peptidy popsány v dokumentu US 5 736 142. Ně-

5 které heterologní peptidy jsou univerzální epitopy T buněk. V některých metodách činidlo pro aplikaci je jednoduše jediný fúzní protein se segmentem A β spojeným s heterologním segmentem v lineární konfiguraci. U některých metod je činidlo multimér fúzních proteinů reprezentovaný obecným vzorcem 2^x, ve kterém symbol x je celé číslo od 1 do 5. Symbol x je s výhodou 1, 2
 10 nebo 3, přičemž nejvýhodnější je, když symbol x je 2. V případě, že symbol x je 2, pak takový multimér má čtyři fúzní proteiny spojené s výhodou konfigurací, která se nazývá MAP4 (popisuje se v dokumentu US 5 229 490). Epitopy A β jsou podtrženy.

10 Konfigurace MAP4 je zobrazena dále v textu, kde se produkují rozvětvené struktury syntézou počátečního peptidu na N-konci a aminy postranních řetězců lyzinu. V závislosti na počtu násobků lyzinů je začleněno do sekvence a na možnosti rozvětven, výsledná struktura bude prezentovat více N-konců. V tomto příkladu se na rozvětveném lyzinu, který obsahuje jádro, vytvořily čtyři shodné N-konce. Taková mnohočetnost velmi zvyšuje odpovědi příbuzných B buněk.



15 AN90540 (A β 1–7/toxoid tetanu 830–844 v konfiguraci MAP4) (SEQ4 ID NO: 52):

DAEFRH**DQYIKANSKFIGITEL**

20 AN90550 (A β 1–7/toxoid tetanu 947–967 v konfiguraci MAP4) (SEQ ID NO: 53):

DAEFRHDFNNFTV**SFWLRVPKVSASHLE**

25 AN90542 (A β 1–7/toxoid tetanu 830–844 + 947–967 v lineární konfiguraci) (SEQ ID NO: 54):

DAEFRH**DQYIKANSKFIGITEL**FNNFTV**SFWLRVPKVSASHLE**

30 AN90576 (A β 3–9/toxoid tetanu 830–844 v konfiguraci MAP4) (SEQ ID NO: 55):

EFRHDSG**QYIKANSKFIGITEL**

Peptid se popisuje v dokumentu US 5 736 142 (všechny lineární konfigurace):

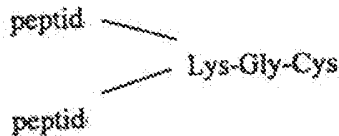
AN90562 (A β 1–7/peptid) (SEQ ID NO: 56): AKXVAAWTLKAAADAEFRHD

35 AN90543 (A β 1–7/) (SEQ ID NO: 57): DAEFRHDDAEFRHDDAEFRHDAKXVAAWTLK-
AAA

Jiné příklady fúzních proteinů (imunogenní epitop A β je znázorněn tučným písmem) zahrnují:

40 (SEQ ID NO: 58): **AKXVAAWTLKAAA-DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD**

- (SEQ ID NO: 59): **DAEFRHD-AKXVAAWTLKAAA**
 (SEQ ID NO: 60): **DAEFRHD-ISQAVHAAHAEINEAGR**
 (SEQ ID NO: 61): **FRHDSGY-ISQAVHAAHAEINEAGR**
 (SEQ ID NO: 62): **EFRHDSG-ISQAVHAAHAEINEAGR**
 (SEQ ID NO: 63): **PKYVKQNTLKLAT-DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD**
 (SEQ ID NO: 64): **DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT-DAEFRHD**
 (SEQ ID NO: 65): **DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT**
 (SEQ ID NO: 66): **DAEFRHD-DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT**
 (SEQ ID NO: 67): **DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT-EKKIAKMEKASSVFNV-**
 (SEQ ID NO: 68): **QYIKANSKFIGITEL-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-DAEFRHD**
DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL-
FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE
 (SEQ ID NO: 69): **DAEFRHD-QYIKANSKFIGITELCFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE**
 (SEQ ID NO: 70): **DAEFRHD-QYIKANSKFIGITELCFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-**
DAEFRHD
 (SEQ ID NO: 52): **DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL** na
 pryskyfici s dvěma větvemi



5

- (SEQ ID NO: 71) (synukleinový fúzní protein v konfiguraci MAP-4):
EQVTNVGGAISQAVHAAHAEINEAGR

10 Při vytvoření imunogenů, které se používají pro vytvoření protilátek proti A β , které jsou vhodné pro využití při pasivní imunizaci, se používají stejné nebo podobné nosičové proteiny a metody spojení. Například A β nebo fragment spojený s nosičem se může aplikovat laboratornímu zvířeti při produkci monoklonálních protilátek proti A β .

15 4. Nukleová kyselina kódující terapeutická činidla

15 Imunitní odezvy proti amyloidním depozitům se mohou také vyvolat aplikací nukleových kyselin, které kódují segmenty peptidu A β a jejich fragmentů, jiných peptidových imunogenů nebo protilátek a jejich řetězců komponentů užívaných pro pasivní imunizaci. Takové nukleové kyseliny mohou být DNA nebo RNA. Segment nukleové kyseliny kódující imunogen je v typickém
 20 případě spojen s regulačními elementy, jako je promotor a zesilovač, který umožňuje expresi segmentu DNA v požadovaných cílových buňkách pacienta. V případě exprese v krevních buňkách, jestli je to nutné pro vyvolání imunitní odezvy, elementy promotoru a zesilovače z genů lehkého nebo těžkého řetězce imunoglobulinu nebo hlavní intermediální časný promotor a zesilovač CMV jsou vhodné k přímé expresi. V případě aplikace dvouřetězcových protilátek se mohou dva řetězce klonovat do stejných nebo separovaných vektorů.
 25

Je dostupná řada virových vektorových systémů, které zahrnují retrovirové systémy (popisuje se například v publikaci Lawrie and Tumin, Cur. Opin. Genet. Develop. 3, 102-109 (1993)), adenovirové vektory (popisuje se na příklad v publikaci Bett et al., J. Virol. 67, 5911 (1993)), ade-

noasociované virové vektory (popisuje se například v publikaci Zhou et al., *J. Exp. Med.* 179, 1867 (1994)), virové vektory z rodiny neštovic, které zahrnují virus vakcinie a viry planých neštovic, virové vektory z rodu alfa virů, jako jsou ty získané ze Sindbiho a Semlikiho viru (popisuje se například v publikaci Dubensky et al., *J. Virol.* 70, 508–519 (1996)), venezuelský virus koňské encefalitidy (popisuje se v dokumentu US 5 643 576) a rhabdoviry, jako je virus vesikulární stomatitidy (popisuje se v dokumentu WO 96/34 625) a papilomaviry (popisuje se v publikaci Ohe et al., *Human Gene therapy* 6, 325–333 (1995). Woo et al., WO 94/12 629 a Xiao and Brandsma, *Nucleic Acids. Res.* 24, 2630–2622 (1996)).

DNA kódující imunogen nebo vektor obsahující DNA kódující imunogen mohou být baleny do lipozomů. Vhodné lipidy a příbuzné analogy se popisují v dokumentu US 5 208 036, 5 264 618, 5 279 833 a 2 283 185. Vektory a DNA kódující imunogen se mohou také adsorbovat nebo mohou být spojeny s určitými nosiči, které například zahrnují polymethylmethakrylátové polyméry a polyaktidy a poly(laktid-ko-glykolidy) (popisuje se v publikaci McGee et al., *J. Micro Encap.* (1996)).

Vektory pro genovou terapii nebo samotná DNA se mohou zavést in vivo aplikací jednotlivým pacientům v typickém případě systémovou aplikací (například intravenózně, intraperitoneálně, nasálně, do zažívacího traktu, intradermálně, intramuskulárně, subdermálně nebo intrakraniálně infúzí) nebo povrchovou aplikací (popisuje se například v dokumentu US 5 399 346). Takové vektory mohou dále zahrnovat činidla, jako je bupivacín (popisuje se v dokumentu US 5 593 970). DNA může být také aplikována za použití genové pušky (popisuje se v publikaci Xiao and Brandsma, *Nucleic Acids. Res.* 24, 2630–2622 (1996)) DNA kódující imunogen se sráží na povrchu mikroskopických kovových částic. Mikroprojektily se zrychlují šokovou vlnou nebo expanzí plynného hélia a pronikají tkání do hloubky několika buněčných vrstev (The Accel™ Gene delivery Device, vyrobeno Agacetus, Inc. Middleton, WI). V jiném případě samotná DNA prochází kůží do krevního řečiště jednoduše nanesením DNA na kůži s chemickým nebo mechanickým drážděním (popisuje se v dokumentu WO 95/05 853).

V jiném případě vektory kódující imunogeny se mohou zavést do buněk ex vivo, kterými jsou buňky explantované z jednotlivého pacienta (například lymfocyty, aspiráty kostní dřeně, biopsie tkáně) nebo univerzální donorové hematopoietické kmenové buňky, pak následuje reimplantace buněk do pacienta obvykle po výběru buněk, které mají začleněný vektor.

III. Testování protilátek za účelem zjištění odstraňující aktivity

Vynález popisuje metody testování aktivity protilátky pro odstranění amyloidního depozitu nebo libovolného jiného antigenu nebo asociované biologické entity, v případě které je požadovaná aktivita pro odstranění. Aby se testovala aktivita proti amyloidnímu depozitu, vzorek tkáně z mozku pacienta s Alzheimerovou nemocí nebo zvřecí model, který vykazuje charakteristickou patologii Alzheimerovy nemoci, je v kontaktu s fagocytárními buňkami, které nesou receptor Fc, jako jsou mikroglální buňky, a s testovanou protilátkou v kultivačním médiu in vitro. Fagocytární buňky mohou být primární kulturou nebo buněčnou linií, jako je BV-1, C8-B4 nebo THP-1. U některých metod se mohou komponenty kombinovat na mikroskopickém sklíčku, přičemž dochází k mikroskopickému monitorování. U některých metod se provede paralelně více reakcí v prohlubních mikrotitrační destičky. V takovém formátu separované miniaturní mikroskopické sklíčko se může přenést do oddělených prohlubní nebo na detekční formát, který se detekuje jinak než mikroskopicky, jako je detekce A β testem ELISA. Provedou se série měření množství amyloidního depozitu v reakční směsi in vitro, začíná se ze základní hodnoty, dříve než proběhne reakce a dále následuje jedna nebo více testovacích hodnot během reakce. Antigen je možné detekovat barvením, například fluorescenčně značenou protilátkou proti A β nebo jiného komponentu amyloidních plaků. Protilátka používaná jako počáteční materiál může nebo nemusí být stejná jako protilátka, u které se testuje její odstraňující aktivita. Redukce vztažená k základní hodnotě během reakce amyloidních depozitů indikuje, že testovaná protilátka má odstraňující aktivitu.

Takové protilátky mohou být pravděpodobně použitelné při prevenci nebo léčbě Alzheimerovy nebo jiné amyloidogenní nemoci.

Analogové metody se mohou použít k testování protilátek za účelem zjištění aktivity při odstranění jiných typů biologických entit. Tento test se může použít při detekci odstraňující aktivity proti libovolnému typu biologické entity. V typickém případě biologická entita má nějakou úlohu v lidském nebo zvířecím onemocnění. Biologická entita se může připravit jako vzorek tkáně nebo izolovaná forma. Jestliže se vyskytuje jako vzorek tkáně, tento vzorek se s výhodou nefixuje a umožňuje rychlý přístup vzorku tkáně a zabraňuje konformaci komponentů náchylných k zafixování. Příklady tkáňových vzorků, které se testovaly v tomto testu zahrnují tkáň zhoubného bujení, pre-karcinogenní tkáň, tkáň obsahující benigní růst, jako jsou bradavice a mateřská znaménka, tkáň infikovanou patogeními organizmy, tkáň infiltrovanou zánětlivými buňkami, tkáň nesoucí patologické matrice mezi buňkami (například fibrinózní perikarditida), tkáň nesoucí aberující antigeny a zjizvenou tkáň. Příklady izolovaných biologických entit, které se mohou použít, zahrnují A β , virové antigeny nebo viry, proteoglykany, antigeny jiných patogenních mikroorganismů, nádorové antigeny a adhezivní molekuly. Takové antigeny se mohou získat z přirozených zdrojů, rekombinantní expresí nebo chemickou syntézou. Vzorek tkáně nebo izolovaná biologická entita přijde do kontaktu s fagocytárními buňkami, které nesou receptory Fc, jako jsou monocyty nebo mikrogliaální buňky a protilátku, která se testuje v kultivačním médiu. Protilátka může být proti biologické entitě v testu nebo proti antigenu asociovaným s entitou. Později se u objektu testuje, zda biologická entita je zástupně fagocytována s antigenem. Obvykle, ačkoli to není nutné, protilátka a biologická entita dříve než se přidají fagocytické buňky (někdy spojená s antigenem) jsou vzájemně v kontaktu. Koncentrace biologické entity a/nebo asociovaný antigen, je-li přítomen, zůstává v kultivačním médiu a pak se monitoruje. Snížení množství nebo koncentrace antigenu nebo asociované biologické entity v kultivačním médiu ukazuje, že protilátka vykazující odstraňující odezvu na antigen a/nebo asociovanou biologickou entitu v konjugaci s fagocytárními buňkami (popisuje se například v příkladu 14).

IV. Pacienti podrobení léčbě

Pacienti, kteří se podrobili léčbě, zahrnují jednotlivce, jimž hrozí onemocnění, ale nevykazují symptomy, stejně jako pacienti, kteří již vykazují symptomy. V případě Alzheimerovy nemoci se vybral pacient, který je v nebezpečí, že trpí Alzheimerovou nemocí, pokud žije dostatečně dlouho. Proto se tyto metody mohou aplikovat profylakticky na obecnou populaci, aniž je potřeba zhodnotit nebezpečí pacienta. Současné metody jsou zvláště použitelné u jednotlivců, které vykazují genetické nebezpečí Alzheimerovy nemoci. Takoví jedinci zahrnují ty, kteří mají příbuzný, kteří trpí tímto onemocněním a ty, jejichž nebezpečí je stanoveno analýzou genetických nebo biochemických markerů. Genetické markery nebezpečí v případě Alzheimerovy nemoci zahrnují mutace v genu APP, zvláště mutace v poloze 717 a 670 a 671, které jsou známy jako mutace podle Hyrdyho a Swedishe (Hardy, TINS20, 154 (1997)). Jiné markery nebezpečí jsou mutace v genech presenilinu, PS1 a PS2 a ApoE4, historie v rodině týkající se AD, hypercholesterolemie nebo ateroskleróza. Jednotlivci trpící Alzheimerovou nemocí jsou rozeznávány na základě charakteristické demence, stejně jako přítomností nebezpečných faktorů popsaných shora v textu. Navíc pro identifikaci jednotlivců, kteří trpí AD, je dostupná řada diagnostických testů. Tyto testy zahrnují měření množství CSG tau a A β 42. Zvýšené množství tau a snížené množství A β 42 znamená onemocnění AD. Jednotlivci trpící Alzheimerovou nemocí se mohou také diagnostikovat použitím kritéria ADRDA, jak se diskutuje v příkladech.

U pacientů, kteří nevykazují symptomy, může léčba začít v libovolném stáří (například v deseti, ve dvaceti a ve třiceti letech). Obvykle však není začít léčbu dříve, než pacient dosáhne čtyřiceti, padesáti, šedesáti nebo sedmdesáti let. Léčba v typickém případě vyžaduje více dávek v určitém časovém úseku. Léčba může být monitorována testováním protilátek nebo odezvami T- buněk nebo B- buněk na terapeutické činidlo (například peptid A β). Jestliže odezva klesá, indikuje se posilovací dávka. V případě pacientů s Downovým syndromem, léčba může začít v prenatálním stádiu aplikací terapeutického činidla matce nebo krátce po narození.

V. Léčebné režimy

V případě profylaktických aplikací se farmaceutické prostředky nebo léčiva aplikují pacientovi, který je náchylný nebo je v nebezpečí Alzheimerovy nemoci v množství, které je dostatečné, aby eliminovalo nebo snížilo nebezpečí, omezilo vážnost onemocnění nebo oddálilo projevy onemocnění, které zahrnují biochemické, histologické symptomy a/nebo symptomy v chování, komplikace a zprostředkované patologické fenotypy, které se projevují během vývoje onemocnění. V případě terapeutických aplikací se prostředky nebo léčiva aplikují pacientovi, který trpí nebo se očekává, že bude trpět nemocí, v množství, které je dostatečné pro uzdravení nebo alespoň částečnému zastavení symptomů onemocnění (biochemické, histologické symptomy a symptomy chování), které zahrnují komplikace a zprostředkované patologické fenotypy při vývoji onemocnění. U některých metod aplikace činidla redukuje nebo eliminuje myokognitivní poruchy u pacientů, kteří ještě nemají vyvinutou charakteristickou patologii Alzheimerovy nemoci. Množství adekvátní pro provedení terapeutické nebo profylaktické léčby se definuje jako terapeuticky nebo profylakticky účinná dávka. V profylaktickém nebo terapeutickém režimu se činidla obvykle aplikují v několika dávkách, až se dostatečně aktivuje imunitní odezva. V typickém případě imunitní odezva se monitoruje, a jestliže imunitní odezva slábne, aplikuje se opakovaná dávka.

Účinné dávky prostředků podle vynálezu při léčbě shora popsaných stavů kolísají v závislosti na řadě různých faktorů, které zahrnují způsoby aplikace, cílové místo, fyziologický stav pacienta, zda pacient je člověk nebo zvíře, zda se aplikují jiné léky a zda léčba je profylaktická nebo terapeutická. Pacientem je obvykle člověk, ale mohou se také léčit zvířata, která zahrnují transgenní savce. Léčebné dávky je nutné titrovat, aby se optimalizovala bezpečnost a účinnost. Množství imunogenu závisí na skutečnosti, zda se také aplikuje adjuvans. Při nepřítomnosti adjuvans je nutné vyšší dávka. Množství aplikovaného imunogenu někdy kolísá v rozmezí 1 až 500 μg na jednoho pacienta a více obvyklé je rozmezí 1 až 500 μg na jednoho pacienta a více obvyklé je rozmezí 5 až 500 μg , což se aplikuje člověku injekcí. Je možné injekcí aplikovat i vyšší dávku, která se pohybuje v rozmezí 1 až 2 mg. V typickém případě se používá dávka 10, 20, 50 nebo 100 μg . Koncentrace imunogenu také závisí na hmotnostním poměru epitopu imunogenu v imunogenu ku hmotnosti imunogenu jako celku. V typickém případě na jeden mikrogram imunogenu se použije 10^{-3} až 10^{-5} mikromolů epitopu imunogenu. Časový režim injekcí může v podstatě kolísat jednou denně, jednou za rok a jednou za deset let. V daném dni, kdy se aplikuje dávka imunogenu, se pacientovi aplikuje dávka vyšší než 1 μg a obvykle je vyšší než 10 μg , jestliže se také aplikuje adjuvans a může být vyšší než 10 μg a obvykle je vyšší než 100 μg , když se adjuvans neaplikuje. Typický režim zahrnuje imunizaci, po které následují v časových intervalech zesilovací injekce. Intervaly mohou být například 6 týdnů. Jiný režim zahrnuje imunizaci následovanou zesilovacími injekcemi, které se provádí o 1, 2 a 12 měsíců později. Jiný režim zahrnuje aplikaci injekce každé dva měsíce po celý život. V jiném případě se posilující injekce aplikují nepravidelně na základě monitorování imunitní odezvy.

V případě pasivní imunizace protilátkou rozmezí dávky je od přibližně 0,0001 až 100 mg/kg a obvykleji 0,01 až 5 mg/kg tělesné hmotnosti hostitele. Dávky například mohou být 1 mg/kg tělesné hmotnosti nebo 10 mg/kg tělesné hmotnosti nebo v rozmezí 1 až 10 mg/kg. Příklad léčebného režimu zahrnuje aplikaci jednou ze každé dva týdny nebo jednou za měsíc nebo jednou za každé 3 až 6 měsíců. Při některých metodách se dvě nebo více monoklonálních protilátek s různými vazebnými specifitami aplikují současně, přičemž v tomto případě dávka každé aplikované protilátky spadá do označeného rozmezí. Protilátka se obvykle aplikuje ve více dávkách. Intervaly mezi jednotlivými dávkami mohou být týden, měsíc nebo rok. Intervaly mohou být také nepravidelné, podle měření množství protilátky v krvi pacienta proti A β . V některých metodách se dávka nastavila tak, aby se dosáhla koncentrace protilátky v plazmě 1 až 1 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a u některých metod je to 25 až 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$. V jiném případě se protilátka může aplikovat jako formulace s nepřetržitým uvolněním. Dávka a frekvence kolísá v závislosti na poločasu rozpadu protilátky. V obecném případě lidské protilátky vykazují nejdelší poločas rozpadu, pak následují humanizované protilátky, chimérové protilátky a protilátky, které nejsou lidské. Dávka a frekvence

aplikace může kolísat v závislosti na skutečnosti, zda léčba je profylaktická nebo terapeutická. Při profylaktické aplikaci se aplikuje relativně nízká dávka v relativně častých intervalech po dlouhý časový úsek. Některým pacientům se aplikuje léčba po zbytek jejich života. Při terapeutické aplikaci je někdy nutná relativně vysoká dávka v relativně krátkých intervalech až do okamžiku, kdy se redukuje nebo ukončí postup onemocnění a s výhodou dokud pacient vykazuje částečné nebo úplné odstranění symptomů onemocnění. Pak může pacient přejít na profylaktický režim.

Dávky nukleových kyselin kódujících imunogeny jsou v rozmezí od 10 ng do 1g, 100 ng do 100 mg, 1 µg do 10 mg nebo 30 až 300 µg DNA v případě jednoho pacienta. Dávky vhodné pro infekční virové vektory kolísají od 10 do 100 nebo více virionů v jedné dávce.

Činidla vyvolávající imunitní odezvu se mohou aplikovat parenterálním, topickým, intravenózním, orálním, subkutánním, intraarteriálním, intrakraniálním, intraperitoneálním, intranasálním nebo intramuskulárním způsobem vhodným pro profylaxi a/nebo terapii. Nejvíce typickým způsobem aplikace imunogenního činidla je subkutánní aplikace, ačkoli ostatní způsoby mohou být stejně účinné. Dalším běžným způsobem je intramuskulární injekce. Tento typ injekce se v typickém případě zavede do svalů na paži nebo noze. Při některých metodách se činidla zavedou injekcí přímo do určité tkáně, kde se akumuloval deponovat. Příkladem je intrakraniální injekce. Při aplikaci protilátky se preferuje intramuskulární injekce na intravenózní fúzi. Při některých metodách se určité terapeutické protilátky zavádějí injekcí přímo do lebky. Při některých metodách se protilátky aplikují jako nepřerušované uvolňovaný prostředek, jako je například Medipad™.

Činidla podle vynálezu se mohou aplikovat v kombinaci s jinými činidly, které jsou alespoň částečně účinné při léčbě amyloidního onemocnění. V případě Alzheimerova a Downova syndromu, kdy se amyloidogenní deponovat objevuje v mozku, činidla podle vynálezu se mohou také aplikovat ve spojení s jinými činidly, které zvyšují prostup činidel podle vynálezu přes bariéru krev-mozek.

Imunogenní činidla podle vynálezu, jako jsou peptidy, se někdy aplikují v kombinaci s adjuvans. V kombinaci s peptidem se mohou použít různá adjuvans, jako je Aβ, aby se vyvolala imunitní odezva. Výhodné adjuvans zvyšuje intrinsickou odezvu na imunogen, aniž způsobuje konformační změny v imunogenu, který ovlivňuje kvalitativní formu odezvy. Výhodná adjuvans zahrnují hydroxid hlinitý a fosforečnan hlinitý, 3-de-O-acylovaný monofosforyllipid A (MPL™) (popisuje se v dokumentu GB 2 220 211 (RIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton, Montana, nyní součást Corixa). Přípravek Stimulon™ QS-21 je triterpenglykozid nebo saponin izolovaný z kůry stromu Quillaja Saponaria Molina, která roste v Jižní Americe (popisuje se v publikaci Powell and Newmann, Plenum Press, NY, 1995, v dokumentu US 5 057 540 (Aquila BioPharmaceuticals, Framingham, MA). Jiná adjuvans jsou oleje ve vodních emulzích (jako je skvalen nebo arašidový olej) v kombinaci se stimulanty imunity, jako jsou monofosforyllipid A (popisuje se v publikaci Stoute et al., N. Engl. J. Med. 336, 86-91 (1997)). Jiné adjuvans je CpG (popisuje se v dokumentu WO 98/40 100). V jiném případě Aβ se může spojit s adjuvans. Takové spojení by však nemělo podstatně změnit konformaci Aβ stejně jako podstatu imunitní odezvy na Aβ. Adjuvans se může aplikovat jako komponent terapeutického prostředku s aktivním činidlem nebo se může aplikovat odděleně, jako konkurence terapeutickému činidlu nebo po jeho aplikaci.

Preferovaná třída adjuvans jsou sole hlíníku (alum), jako hydroxid hlinitý, fosforečnan hlinitý, síran hlinitý. Taková adjuvans se mohou použít a nebo bez jiných specifických imunostimulačních činidel, jako je MPL nebo 3-DMP, QS-21, polymerní nebo monomerní aminokyseliny, jako je polyglutamová kyselina nebo polylyzin. Jiná třída adjuvans je emulze oleje ve vodě. Taková adjuvans se mohou použít s nebo bez specifických imunostimulačních činidel, jako jsou muramylpeptidy (například N-acetylmuramyl-L-threonyl-D-isoglutamin (thr-MPD), N-acetylnoramuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin (nor-MDP), N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanin-2-(1'-2'dipalmitoyl-sn-glycero-3-hydroxyfosforyloxy)-ethylamin (MTP-PE), N-acetylgluksaminyl-A-acetylmuramyl-L-Al-D-isoglu-L-Ala-dipalmitoxypropylamid

(DTP–DPP)theramid™) nebo jiné komponenty buněčné stěny bakterií. Emulze olej ve vodě zahrnují a) MF59 (popisuje se v dokumentu WO 96/14 837) obsahuje 5 % skvalen, 0,5 % Tween 80 a 0,5% Span 85 (obsahuje různé množství MTP–PE), které tvoří submikrónové částice za použití mikrofluidizéru, jako je model 110Y (Microfluidics, Newton MA), b) SAF, který obsahuje 10 % skvalen, 0,4 % Tween 80, 5 % pluronický blokovaný polymér L121 a thr–MDP, buď mikrofluidizovaný do submikrónové emulze, nebo se míchal vortexem za vzniku emulze s velkými částicemi a c) adjuvanční systém Ribi™ (RAS) (Ribi ImmunoChem, Hamilton, MT), který obsahuje 2 % skvalen, 0,2 % Tween 80 a jeden nebo více komponentů buněčné stěny bakterií ze skupiny zahrnující monofosforyllipid A (MPL), dimykolát trehalosy (TDM) a skelet buněčné stěny (CWS), přičemž se upřednostňuje MPL + CWS (Detox™). Jiná třída preferovaných adjuvans je saponinové adjuvans, jako je Stimulon™ (QS–21, Aquila, Framingham, MA) nebo z nich vytvořené částice, jako je ISCOM (imunostimulační komplexy) a ISCOMATRIX. Jiná adjuvans zahrnují úplné Freundovo adjuvans (CFA) a neúplné Freundovo adjuvans (IFA). Jiná adjuvans zahrnují cytokiny, jako je interleukin (IL–1, IL–2 a IL–12), faktor stimulující makrofágové kolonie (M–CSF), faktor nekrózy nádoru (TNF).

Adjuvans se může aplikovat s imunogenem jako jediný kompozice nebo se může aplikovat před imunogenem, nebo jako konkurence a nebo pop aplikaci imunogenu. Imunogen a adjuvans se mohou dávkovat do stejné zkumavky nebo se mohou dávkovat do oddělených zkumavek a míchat se dohromady před použitím. Imunogen a adjuvans se v typickém případě balí se značkou, která indikuje terapeutickou aplikaci. Jestliže se imunogen a adjuvans balí odděleně, pak jednotlivá balení v typickém případě zahrnují instrukce pro smíchání před použitím. Volba adjuvans a/nebo nosiče záleží na stabilitě imunogenní formulace, která obsahuje adjuvans, způsobu aplikace, dávkového plánu, účinnosti adjuvans pro některé vakcinované druhy a u lidí farmaceuticky přijatelné adjuvans, je adjuvans vhodné pro aplikaci lidem. Úplné Freundovo adjuvans není vhodné pro aplikaci lidem. Výhodné je Alum, MPL a QS–21. Současně je možné použít dvě nebo více adjuvans. Preferované kombinace zahrnují alum s MPL, alum s QS–21, MPL a QS–21 a alum, QS–21 a MPL. Může se také použít neúplné Freundovo adjuvans (popisuje se v publikaci Chang et al., *Advanced Drug Delivery Reviews* 32, 173–186 (1998)) v kombinaci s alum, QS–21 a MPL a je možné použít všechny jejich kombinace.

Činidla podle vynálezu se mohou často aplikovat jako farmaceutické prostředky obsahující aktivní terapeutické činidlo a různé jiné farmaceuticky přijatelné komponenty (popisuje se v publikaci Remington's Pharmaceutical science (15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1980). Preferovaná forma závisí na módu aplikace a terapeutické aplikace. Prostředky mohou také zahrnovat v závislosti na požadované formulaci, farmaceuticky přijatelné netoxické nosiče nebo ředidla, která se definují jako nástroje běžně používaná k formulaci farmaceutických prostředků pro aplikaci zvířeti nebo člověku. Ředidlo se vybralo tak, že neovlivňuje biologickou aktivitu kombinace. Příklady takových ředidel jsou destilovaná voda, fyziologický roztok pufrovaný fosforečnanem, Ringerovy roztoky, roztok dextransy a Hankenův roztok. Navíc farmaceutický prostředek nebo formulace může také zahrnovat jiné nosiče, adjuvans nebo netoxické, neterapeutické, neimunogenní stabilizátory a podobně.

Farmaceutické prostředky mohou také zahrnovat velké pomalu metabolizované makromolekuly, jako jsou proteiny, polysacharidy, jako je chitosan, kyselina mléčná, polyglykolové kyseliny a kopolymery (jako je latexem funkcionalizovaná sefaróza™, agaróza, celulóza a podobně), polymérmí aminokyseliny, aminokyselinové kopolyméry a lipidové agregáty (jako je kapky oleje nebo lipozomy). Navíc tyto nosiče mohou fungovat jako imunostimulační činidla (to je jako adjuvans).

V případě parenterální aplikace se činidla mohou aplikovat jako dávky roztoku nebo suspenze látky ve fyziologicky přijatelném ředidle s farmaceutickým nosičem, kterým může být sterilní kapalina, jako je voda, oleje, fyziologický roztok, glycerol nebo etanol, ve vhodné formě pro zavedení injekcí. Prostředky mohou navíc obsahovat auxiliární látky, jako jsou smáčecí a emulzifikační činidla, povrchová činidla, látky vhodné pro úpravu pH a podobně. Jiné komponenty farmaceutických prostředků je minerální olej, zvířecího, rostlinného nebo syntetického původu. Je

to například arašidový olej, sójový olej a minerální olej. V obecném případě preferovaným kapalným nosičem jsou glykoly, jako je propylenglykol nebo polyethylenglykol, zvláště v případě roztoků vhodných pro zavedení injekcí. Protilátky se mohou aplikovat ve formě depotní injekce nebo implantovaného přípravku, který se může vytvořit takovým způsobem, který umožňuje nepřerušované uvolnění aktivní látky. Příklad prostředku obsahuje monoklonální protilátku v koncentraci 5 mg/ml, vytvořenou ve vodném pufru, který obsahuje 50 mM L-histidin, 150 mM NaCl, přičemž pH se upravilo HCl na hodnotu 6,0.

V typickém případě se prostředky připravují v injektovatelné formě, buď jako kapalně roztoky nebo suspenze, pevné formy vhodné pro roztok nebo suspenzi, před aplikací injekce se mohou také připravit kapalně nástroje. Přípravky mohou také být ve formě emulze a kapsulí lipozomů nebo jako mikročástice, jako jsou polylaktid, polyglykolid nebo kopolymer pro zesílení adjuvančního účinku, jak se diskutuje shora v textu (popisuje se v publikaci Langer, *Science* 249, 1527 (1990) a Hanes, *Advanced Drug Delivery Reviews* 28, 97–119 (1997)). Činidla podle vynálezu se mohou aplikovat ve formě depotní injekce nebo implantovaného přípravku, který může být připraven takovým způsobem, aby se umožnilo nepřerušované nebo pulzativní uvolnění aktivní složky.

Další prostředky vhodné pro jiné módy aplikace zahrnují orální, intranasální a pulmonární prostředky, čípky a transdermální aplikace.

Čípky, vazebná činidla a nosiči zahrnují například polyalkylenglykoly a triglyceridy. Takové čípky se mohou vytvořit ze směsi obsahující aktivní látku v rozmezí 0,5 až 10 %, přičemž se upřednostňuje 1 až 2 %. Orální formulace zahrnují plnidla, jako je manitol, laktózu, škrob, stearát hořčíku, sacharin sodíku, celulózu a uhličitan hořečnatý, které svou čistotou je vhodný pro farmaceutické použití. Tyto prostředky jsou ve formě roztoků, suspenzí, tablet, pilulí, kapsulí, nepřerušované se uvolňujících formulací nebo prášků a obsahují 10 až 95 % aktivní složky, upřednostňuje se 25 až 70 %.

Povrchová aplikace může vést k transdermálnímu nebo intradermálnímu zavedení. Povrchová aplikace se může provést společnou aplikací činidla s toxinem cholery nebo s detoxifikovanými deriváty nebo jejich podjednotkami nebo jinými podobnými bakteriálními toxiny (popisuje se v publikaci Glenn et al., *Nature* 391, 851 (1998)). Společné aplikace se může dosáhnout použitím komponentů, jako je směs molekul nebo vázané molekuly získané chemickým zesílením nebo expresí fúzního proteinu.

V jiném případě se transdermálního zavedení může dosáhnout prostupem kůži nebo použitím transferozómů (popisuje se v publikaci Paul et al., *Eur. J. Immunol.* 25, 3521–24 (1995), Cevc et al., *Biochem. Biophys. Acta* 1368, 201–15 (1998)).

VI. Diagnostické metody

Vynález popisuje metody detekce imunitní odezvy proti peptidu A β u pacienta trpícího Alzheimerovou nemocí. Metody jsou zvláště použitelné při monitorování průběhu aplikované léčby. Metody se mohou použít při monitorování terapeutické léčby u pacienta se symptomy a u pacienta, u kterého se symptomy neprojevují. Metody je možné použít při monitorování aktivní imunizace (například protilátka produkovaná při odezvě na aplikaci imunogenu) a pasivní imunizace (například měření množství aplikované protilátky).

I. Aktivní imunizace

Některé metody zahrnují stanovení základní hodnoty imunitní odezvy u pacienta před aplikací dávky činidla a porovnání této hodnoty s hodnotou imunitní odezvy po léčbě. Podstatné zvýšení (to je vyšší než je typická hranice experimentální chyby při opakovaném měření stejného vzorku, vyjádřené jako standardní odchylka od průměru takových měření) hodnoty signálů imunitní ode-

5 zvy výstupu pozitivní léčby (to znamená, že aplikací činidla se dosáhlo imunitní odezvy nebo se tato imunitní odezva zvýšila). Jestliže hodnota imunitní odezvy podstatně nemění nebo klesá, indikoval se negativní výstup léčby. V obecném případě se očekává, že pacienti, kteří se podrobili počátečnímu průběhu léčby imunogenním činidlem, vykazují zvýšenou imunitní odezvu po následujících dávkách, která dosáhne přímky. Aplikace činidla v obecném případě pokračuje, zatímco imunitní odezva roste. Dosažení stálé hodnoty je indikátorem skutečnosti, že aplikovaná léčba může být přerušena nebo se může redukovat dávka nebo frekvence zavedení.

10 V případě jiných metod kontrolní hodnota (to je průměrná a standardní odchylka) imunitní odezvy se stanoví v případě kontrolní populace. V typickém případě jednotlivci v kontrolní populaci nebyli dříve léčeni. Měřené hodnoty imunitní odezvy u pacienta po aplikaci terapeutického činidla se pak porovnávají s kontrolní hodnotou. Podstatné zvýšení vztaheno ke kontrolní hodnotě (například vyšší než jedna standardní odchylka od průměru) signálů pozitivního výstupu léčby. Nedostatek podstatného zvýšení nebo snížení signálů znamená negativní výstup léčby. Aplikace činidla v obecném případě pokračuje, zatímco imunitní odezva se zvyšuje ve vztahu ke kontrolní hodnotě. Jako před tím, dosažení stálé hodnoty ve vztahu ke kontrolním hodnotám je indikátorem, že aplikace léčby se může přerušit nebo se může redukovat dávka nebo frekvence aplikace.

20 V jiných metodách se z kontrolní populace jednotlivců, kteří se podrobili léčbě terapeutickým činidlem a jejichž imunitní odezvy na léčbu dosáhly stejné hodnoty, stanoví kontrolní hodnota imunitní odpovědi (například průměrná a standardní odchylka). Měřené hodnoty imunitní odpovědi u pacienta se porovnaly s kontrolní hodnotou. Jestliže se u pacienta naměřené množství podstatně neliší od kontrolní hodnoty (například více než o jednu standardní odchylku), je možné léčbu přerušit. Jestliže imunitní odezva pacienta je podstatně pod kontrolní hodnotou, zaručuje se pokračování aplikace činidla. Jestliže hodnota imunitní odezvy přetrvává u pacienta pod kontrolní hodnotou, pak se musí indikovat změna v režimu léčby, například použití odlišného adjuvans.

30 U jiných metod se u pacienta, kterému se neaplikuje léčba, ale dříve se podrobil léčbě, monitoruje imunitní odezva, aby se stanovilo, zda je nutné obnovit léčbu. Měřená hodnota imunitní odezvy u pacienta se může porovnat s hodnotou imunitní odezvy, které se dosáhlo u pacienta po předchozím průběhu léčby. Podstatné snížení vztahené k předchozímu měření (to je vyšší než typické hranice chyby u opakovaného měření stejného vzorku) indikuje, že léčba může být obnovena. V jiném případě hodnota naměřená u pacienta se může porovnat s kontrolní hodnotou (průměrná plus standardní odchylka) stanovenou v populaci pacientů po prodělání léčby. V jiném případě naměřená hodnota u pacienta se může porovnat s kontrolní hodnotou u populací profylakticky ošetřených pacientů, kteří zůstávají bez symptomů onemocnění, u populací terapeuticky ošetřených pacientů, kteří vykazují zmírnění charakteristik onemocnění. Ve všech těchto případech podstatné snížení vztaheno ke kontrolnímu množství (to je více než standardní odchylka) je indikátor, že léčba by měla být u pacienta obnovena.

40 V typickém případě vzorky tkáně pro analýzu jsou krev, plazma, sérum, hlenu nebo cerebrospinální kapalina pocházející z pacienta. Vzorek se analyzoval za účelem stanovení imunitní odezvy na libovolnou formu peptidu A β , v typickém případě A β 42. Imunitní odezva se může stanovit na základě přítomnosti například protilátek nebo T-buněk, které se specificky váží na peptid A β . Metody ELISA detekující reaktivní T-buňky se popisují shora v textu (v sekci definice). V některých metodách se imunitní odezva stanoví použitím testu odstranění depozitu, jak se popisuje v sekci III shora v textu. U takových metod se testovaný vzorek tkáně pocházející z pacienta nechá v kontaktu s amyloidním depozitem (například z myši PDAPP) a s fagocytárními buňkami, které nesou receptory Fc. Pak se monitoruje následné odstranění amyloidního depozitu. Existence a rozsah odstranění poskytuje indikaci existence a množství protilátek účinných při odstranění A β ve vzorku tkáně testovaného pacienta.

2. Pasivní imunizace

V obecném případě postupy vhodné pro monitorování pasivní imunizace jsou podobné těm pro monitorování aktivní imunizace popsané shora v textu. Protilátkový profil, který se vytvoří po pasivní imunizaci, v typickém případě ukazuje bezprostřední pík koncentrace protilátek, po němž následuje exponenciální pokles. Aniž se aplikuje další dávka, pokles množství protilátek dosaženého před léčbou v období od několika dní až měsíců závisí na poločasu rozpadu aplikované protilátky. Například poločas rozpadu některých lidských protilátek je kolem 20 dní.

U některých metod se před aplikací provede u pacienta základní měření množství protilátky proti A β a druhé měření se provede po aplikaci, aby se stanovil pík množství protilátek, a pak se provedou další měření v určitých intervalech, aby se monitoroval pokles množství protilátek. Když množství protilátky poklesne na základní hodnotu nebo na hodnotu, která je předem stanoveným procentem maximální hodnoty (například 50 %, 25 % nebo 10 %), aplikuje se další dávka protilátky. Při některých metodách se maximální hodnota a pak následně měřené množství porovnává s dříve stanoveným referenčním množstvím, aby se stanovila výhodný režim profylaktické a terapeutické léčby u jiných pacientů. Jestliže měřené množství protilátky je podstatně nižší než referenční hodnota (například nižší než průměr minus standardní odchylka referenční hodnoty u populace pacientů), pak se indikuje aplikace další dávky.

3. Diagnostické kity

Vynález dále popisuje diagnostické kity pro provedení diagnostických metod popsaných shora v textu. V typickém případě takové kity obsahují činidlo, které se specificky váže na protilátky proti A β . Kit také zahrnuje značení. V případě detekce protilátek proti A β značení je v typickém případě ve formě značených anti-idiotypických protilátek. V případě detekce protilátek je činidlo předem vázáno na pevné fázi, jako například v prohlubních titračních destiček. Kity v typickém případě také obsahují instrukce pro použití kitu. Příloha může také zahrnovat graf nebo jiný souhlasný režim odpovídající množství měřené značky s množstvím protilátek proti A β . Termín „příloha“ znamená libovolný psaný nebo zaznamenaný materiál, který je přiložen nebo jinak doprovází kit v libovolném čase během výroby, transportu, prodeje a použití. Například termín „příloha“ znamená reklamní leták a brožurku, příbalové materiály, instrukce, audio nebo video kazety, počítačové disky, stejně jako texty tištěné přímo na obalu.

Vynález také popisuje diagnostické kity pro provedení zobrazení *in vivo*. Takové kity v typickém případě obsahují protilátku vázanou na epitopu A β , s výhodou obsahují zbytky 1 až 10. Upřednostňuje se, aby protilátka byla značena nebo aby kit obsahoval sekundární značící činidlo. Je výhodné, aby byl kit označen instrukcemi pro provedení zobrazovacího testu *in vivo*.

40 VII. Zobrazení *in vivo*

Vynález popisuje metody zobrazení amyloidních depozitů *in vivo* u pacienta. Takové metody jsou použitelné při stanovení a potvrzení diagnózy Alzheimerova onemocnění nebo náchylnosti k tomuto onemocnění. Metodu je například možné použít u pacienta, který vykazuje symptomy demence. Jestliže pacient vykazuje abnormální amyloidní depozity, pak je pravděpodobné, že trpí Alzheimerovou nemocí. Přítomnost abnormálních depozitů amyloidu indikuje náchylnost k symptomatickému onemocnění. Metody je možné také použít pro monitorování postupu onemocnění a/nebo odezvy na léčbu pacientů, u kterých se dříve diagnostikovalo Alzheimerovo onemocnění.

50 Metody fungují na základě aplikace činidla, jako je protilátka, která se váže na A β u pacienta, a po navázání činidla dochází k detekci. Preferované protilátky se váží na deposity A β u pacienta, aniž se vážou na polypeptid APP plné délky. Zvláště se preferují protilátky vázající se na epitop A β s aminokyselinami 1 až 10. U některých metod se protilátka váže na epitop v amino-

kyselinách 7 až 10 A β . Takové protilátky se v typickém případě váží, aniž se vyvolá podstatná odezva odstranění. U jiných metod se protilátka váže na epitop v aminokyselinách 1 až 7 A β . Takové protilátky se v typickém případě váží a vyvolávají odezvu odstranění vůči A β . Odezvě odstranění se však dá předcházet použitím fragmentů protilátky, kterým chybí konstantní oblast plné délky, jako je fragment Fab. U některých metod některé protilátky mohou sloužit jako léčebné a diagnostické činidlo. V obecném případě protilátky vázající se na epitopy C-terminálního zbytku 10 A β nevykazují silný signál jako protilátky vázající se na epitopy se zbytky 1 až 10, pravděpodobně proto, že C-terminální epitopy jsou v amyloidním depozitu nepřístupné. Takové protilátky jsou méně výhodné.

Diagnostická činidla se mohou aplikovat intravenózní injekcí do těla pacienta nebo přímo do mozku intrakraniální injekcí nebo provrtáním díry lebkou. Dávka činidla by měla být ve stejném rozmezí jako v případě léčebných metod. V typickém případě se činidlo značí, ačkoli u některých metod se primární činidlo s afinitou pro A β není značeno a sekundární značící činidlo se používá k navázání na primární činidlo. Volba značky závisí na způsobu detekce. Fluorescenční značka je vhodná pro optickou detekci. Použití paramagnetických značek je vhodné pro tomografickou detekci, aniž je nutné chirurgická intervence. Radioaktivní značky se mohou také detekovat použitím PET nebo SPECT.

Diagnóza se provede porovnáním počtu, velikosti a/nebo intenzity značeného loku s odpovídajícími hodnotami základní linie. Hodnoty základní linie mohou reprezentovat průměrné hodnoty v populaci zdravých jednotlivců. Hodnoty základní linie mohou také reprezentovat dřívější hodnoty stanovené u stejného pacienta. Hodnoty základní linie se mohou stanovit u pacienta před začátkem léčby a měřené hodnoty se pak srovnávají s hodnotami základní linie. Snížení hodnot vztahených k signálům základní linie je pozitivní odezva na léčbu.

Přehled obrázků na výkresech

Na obrázku č. 1 je znázorněn titer protilátek proti injekci transgenní myši s A β 1–42.

Na obrázku č. 2 je znázorněn amyloidní uzel v hippocampusu. Procento oblastí hipokampální oblasti obsazené amyloidními plaky definovanými reaktivitou s monoklonální protilátkou 3D6 specifickou pro A β se stanovilo počítačovou kvantitativní zobrazující analýzou imunoreaktivních mozkových sekcí. Hodnoty u jednotlivých myši se rozdělily podle léčebných skupin. Horizontální čára každé skupiny indikuje střední hodnotu rozdělení.

Na obrázku č. 3 je zobrazena neuritická degenerace v hippocampusu. Procento oblastí hipokampální oblasti obsazené degenerovanými neurity definovanými jejich reaktivitou s lidskou monoklonální 8E5 specifickou pro APP, se definovalo kvantitativní počítačovou imunoreaktivních mozkových sekcí. Hodnoty u jednotlivých myši jsou zobrazeny u skupiny léčené AN1792 a kontrolní skupiny, které se aplikovalo PBS. Horizontální čára každé skupiny označuje střední hodnotu třídění.

Na obrázku č. 4 jsou zobrazeny astrocyty v retrosplenálním kortexu. Procento plochy kortikální oblasti obsazené gliálním vláknitým kyselým proteinem (GFAP)-pozitivní astrocyty se stanovilo kvantitativní počítačovou zobrazovací analýzou imunoreaktivních mozkových sekcí. Hodnoty u jednotlivých myši jsou rozděleny podle léčené skupiny a střední hodnoty skupin jsou označeny horizontální čarou.

Na obrázku č. 5 jsou zobrazeny geometrické průměry titerů protilátek proti A β 1–42 pro imunizaci v rozsahu osmi dávek AN1792, které obsahují 0,14, 0,4, 1,2, 3,7, 11, 33, 100 nebo 300 μ g.

Obrázek č. 6 znázorňuje kinetiku protilátkové odezvy na imunizaci AN1792. Titry se vyjádřil jako geometrické průměry hodnot pro 6 zvířat v každé skupině.

5 Obrázek č. 7 znázorňuje kvantitativní analýzu zobrazení kortikálního amyloidního uzlu myši ošetřených PBS a AN1792.

Obrázek č. 8 znázorňuje kvantitativní analýzu zobrazení neutrofilového plakového uzlu u myši ošetřených PBS a AN1792.

10 Obrázek č. 9 znázorňuje kvantitativní analýzu zobrazení procenta retrosplenálního kortexu obsazeného astrocytózou u myši ošetřených PBS a AN1792.

Obrázek č. 10 znázorňuje proliferační test lymfocytů na slezinné buňky, které se ošetřily AN1792 (horní soubor) nebo ošetřené PBS (spodní soubor).

15 Obrázek č. 11 znázorňuje celkové množství A β v kortexu. Graf rozptylu jednotlivých profilů u myši imunizovaných deriváty A β nebo APP kombinované s Freundovým adjuvans.

20 Obrázek č. 12 znázorňuje amyloidní uzel v kortexu identifikovaný kvantitativní analýzou obrazu imunoreaktivních mozkových sekcí v případě myši imunizovaných peptidovými konjugáty A β 1–5, A β 1–12 a A β –12–28, agregáty A β plné délky AN1792(A β 1–42) a AN1528(A β 1–40) a kontrolní skupiny ošetřené PBS.

25 Obrázek č. 13 znázorňuje geometrické průměry titrů protilátky specifické pro A β v případě skupiny myši imunizované deriváty A β nebo APP kombinované s Freundovým adjuvans.

Obrázek č. 14 znázorňuje geometrické průměry titrů protilátky specifické pro A β v případě skupin morčat imunizovaných AN1792 nebo jeho palmitoylovaným derivátem kombinovaným s adjuvans.

30 Obrázek č. 15 (A až E) znázorňuje množství A β v kortexu dvanáct měsíců starých myši PDAPP ošetřených AN1792 nebo AN1528 různými adjuvans.

35 Obrázek č. 16 znázorňuje střední hodnotu titrů u myši ošetřených polyklonální protilátkou proti A β .

Obrázek č. 17 znázorňuje střední hodnotu titru u myši ošetřených monoklonální protilátkou 10D5 proti A β .

40 Obrázek č. 18 znázorňuje střední hodnotu titru u myši ošetřených monoklonální protilátkou 2F12 proti A β .

45 Obrázek č. 19 znázorňuje mapu epitopu: omezenou N–terminální odezvu. Sérum opic cynomolgus odebrané v den 175 se testovalo testem ELIAS proti sérii 10–měrních přesahujících peptidů (SEQ ID NO: 1 až 41), které překrývají celou sekvenci AN1792. Zvíře č. F10920M zobrazuje reprezentativní N–terminální omezenou odezvu na peptid DAEFRHDSGY (SEQ ID NO: 9), který překrývá aminokyseliny 1 až 10 peptidu AN1792, který se použil jako imunizační činidlo.

50 Obrázek č. 20 znázorňuje mapu epitopu: neomezenou N–terminální odezvu. Sérum opic cynomolgus odebrané v den 175 se testovalo testem ELISA proti sérii 10–měrních přesahujících peptidů (SEQ ID NO: 1 až 41), které překrývají celou sekvenci AN1792. Zvíře č. F10975F zobrazuje reprezentativní N–terminální neomezenou odezvu. Reaktivita je proti dvěma peptidům N–terminálním a jednomu peptidu C–terminálnímu s peptidem DAEFRHDSGY (SEQ ID NO: 9), který překrývá aminokyseliny 1 až 10 peptidu AN1792.

Příklady provedení vynálezuPříklad 1: Profylaktická účinnost A β proti AD

5

Příklady popisují aplikaci peptidu A β 42 transgenní myši, která nadměrně exprimuje APP s mutací v poloze 717 (APP_{717V→F}), které vykazují predispozici k vývoji neuropatie podobné Alzheimerově nemoci. Produkce a charakteristiky těchto myši (myši PDAPP) se popisují v publikaci Games et al., Nature 373, 523 (1995). Tato zvířata v jejich heterozygotní formě začínají ukládat A β ve věku šesti měsíců. Ve věku patnácti měsíců zvířata vykazují množství depozitu A β ekvivalentní depozitu, který je možné pozorovat u Alzheimerovy nemoci. Myšim PDAPP se injekcí zavedl agregovaný A β ₄₂ nebo fyziologický roztok pufovaný fosforečnanem. Agregovaný A β ₄₂ se vybral na základě jeho schopnosti vyvolat profilátky proti více epitopům A β .

15 A. Metody

1. Zdroj myši

20 Třicet heterogenních samic myši PDAPP se náhodně rozdělilo do následujících skupin: deseti myšim se injekcí zavedl agregovaný A β ₄₂ (jedna myš zemřela při tranzitu), pěti myšim se injekcí zavedlo PBS/adjuvans nebo PBS a deset myši slouží jako kontroly, kterým se injekce neaplikovala. Pěti myšim se zavedla injekce s peptidy, které se získaly ze sekvence sérového amyloidního proteinu (SAP).

25 2. Příprava imunogenů

Příprava agregovaného A β 42: dva miligramy A β 42 (US Peptides Inc., kat. č. K-42-12) se rozpustily v 0,9 ml vody a doplnily se na objem 1 ml přidáním 0,1 ml 10x koncentrovaného PBS. Tato směs se míchala na vortexu a nechala se inkubovat přes noc při teplotě 37 °C, což jsou podmínky, při kterých dochází k agregaci peptidu. Nepoužitý A β se uchovával jako sušený lyofilizovaný prášek při teplotě -20 °C až do doby aplikace další injekce.

3. Příprava injekcí

35 V případě každé injekce se 100 μ g agregovaného A β 42 v PBS na jednu myš emulgovalo v poměru 1:1 s úplným Freundovým adjuvans (CFA) do konečného objemu 400 μ l emulze pro první imunizaci, po dvou týdnech následuje zesilovací dávka, která obsahuje stejné množství imunogenu v neúplném Freundově adjuvans (IFA). Dvě další dávky se podaly jako IFA v měsíčním intervalu. V měsíčním intervalu se uskutečnily následné imunizace s 500 mikrolitry PBS. Injekce se zavedly intraperitoneálně (i.p.).

Injekce PBS se aplikovaly podle stejného rozvrhu a myšim se injekcí zavedla směs PBS/adjuvans v poměru 1:1 v objemu 400 μ l pro každou myš nebo 500 μ l PBS v případě každé myši. Injekce SAP se zavádějí podle stejného plánu za použití dávky 100 μ l v jedné injekci.

45

4. Titrace myší krve, příprava tkáně a imunohistochemie

V názvu uvedené metody se popisují v sekci Obecné materiály a metody

50 B. Výsledky

Myšim PDAPP se injekcí zavedl agregovaný A β 42, peptidy SAP nebo fyziologický roztok pufovaný fosforečnanem. Skupina myši PDAPP se také nechala bez aplikace injekce jako pozitivní kontroly. Titry myší agregovaného A β 42 se monitorovaly každý měsíc od čtvrté posilovací in-

jekce až do věku myši jeden rok. Myši se usmrtily ve věku 13 měsíců. Ve všech testovaných časech osm z devíti myší, kterým se aplikoval agregovaný A β 42, se vyvinul vysoký titr protilátek, který zůstává stejný v průběhu série injekcí (titry vyšší než 1/10 000). Devátá myš měla nízký, ale měřitelný titr s přibližnou hodnotou 1/1 000 (obrázek č. 1, tabulka č. 1). Myši, kterým se 5 injekcí zavedl SAPP měly titry pro tento imunogen 1 : 1 000 až 1 : 30 000, přičemž pouze jedna myš překročila hodnotu titru 1 : 10 000.

Myši ošetřené PBS se titrovaly proti agregovanému A β 42 v šestém, desátém a dvanáctém měsíci. Myši ošetřené PBS v ředění 1/100, když se titrovaly proti agregovanému A β 42, překročily pouze 10 čtyřikrát hodnotu pozadí, jinak vykazovaly ve všech časových bodech hodnoty nižší než je čtyřnásobek hodnoty pozadí (tabulka č. 1). Odezva specifická na SAP byla zanedbatelná v těchto časových bodech v případě všech titrů nižších, než je hodnota 300.

Sedm z devíti myší ze skupiny ošetřené agregováním A β 42 nevykazují ve svém mozku detekovatelný amyloid. Naopak mozková tkáň z myší ve skupinách ošetřených SAP a PBS obsahovaly 15 velké množství amyloidních depozitů v hippocampusu, stejně jako v přední části mozku. Patern uložení byl stejný jako patern, který vykazují neošetřené kontroly, přičemž zahrnuje ohrožené oblasti, jako vnější molekulovou vrstvu hippocampálního gyrus dentatus. Jedna myš ze skupiny, které se zavedl injekcí A β 1-42, vykazovala velmi redukovaný amyloidní uzol, který se nachází 20 v hippocampusu. U myší ošetřených A β 1-42 se identifikovala izolovaná plaka.

Kvantitativní zobrazovací analýza amyloidního uzlu v hippocampu ověřila dramatickou redukcí dosaženou u zvířat ošetřených A β 42(AN1792) (obr. č. 2). Střední hodnoty amyloidního uzlu 25 v případě skupiny ošetřené PBS (2,22 %) a v případě kontrolní skupiny (2,65 %) byly podstatně vyšší než u myší imunizovaných AN1792 (0,00%, $p=0,0005$). Naopak střední hodnota v případě skupiny imunizované peptidy SAP (SAPP) byla 5, 74 %. Mozková tkáň z neošetřených kontrolních myší obsahovala řadu amyloidních depozitů A β , které se vizualizovaly monoklonální protilátkou specifickou pro A β 3D6 v hippocampusu, stejně jako v retrosplenálním kortexu. Podobný patern amyloidního depozitu je možné také vidět u myší imunizovaných pomocí SAPP nebo PBS 30 (obr. č. 2). Navíc pro tyto pozdější tři skupiny jsou charakteristické ohrožitelné podskupiny mozku, které je možné klasicky vidět v AD, jako je vnější molekulová vrstva hippocampálního gyrus dentus, ve všech těchto třech skupinách.

Mozky, které neobsahovaly depozity A β také neobsahovaly neuritické plaky, které jsou v typickém případě vizualizovány u myší PDAPP s lidským APP protilátkou 8E5. Všechny mozky ze 35 zbývajících skupin (kterým se injekcí zavedl SAP, PBS a kterým se neaplikovala žádná injekce) vykazovaly řadu neuritických plaků, které jsou typické pro neošetřené myši PDAPP. Malý počet neuritických plaků vyazuje jedna myš, která byla ošetřena AN1792 a jedno seskupení dystrofických neuritů se zjistilo u druhé myši ošetřené AN1792. Analýzy zobrazení hippocampusu zobrazené na obrázku č. 3 demonstrovaly odstranění dystrofických neuritů u myší ošetřených AN1792 40 (střední hodnota 0,00 %) ve srovnání s recipienty ošetřenými PBS (střední hodnota 0,28 %, $p=0,0005$).

Skupina, které se zavedlo injekcí A β 1-42, také v mozku nevykazuje plaky spojené se záměrem, 45 které jsou charakteristické pro astrocyty. Mozky z myší v jiných skupinách obsahovaly nadbytečné a klastrované astrocyty pozitivní na GFAP, které jsou typické pro A β plaky spojené s gliózou. Soubor sklíčec, které reagovaly s GFAP se obarvily Thioflavinem S, aby bylo možné lokalizovat depozity A β . Astrocyty pozitivní na GFAP jsou spojeny s plaky A β u myší ošetřených SAP, PBS a neošetřených kontrol. Žádné takové spojení se nezjistilo u myší ošetřených 50 A β 1-42, které nevykazují plaky, zatímco u jedné myši ošetřené AN1792 se identifikovala minimální glióza spojená s plaky.

Zobrazovací analýza, uvedená na obrázku č. 4, v případě retrosplenálního kortexu, ověřila, že redukce v počtu astrocytů je podstatná, když střední hodnota je 1,56 %, u myší ošetřených

ANI792 ve srovnání se střední hodnotou větší než 6 %, kterou vykazují skupiny imunizované peptidy SAP, PBS nebo neošetřené skupiny ($p=0,0017$).

5 Důkaz pocházející z myši ošetřených A β 1–42 a PBS indikuje, že imunoreaktivita MHC II spojená s plaky není přítomna u myši, kterým se injekcí zavedl A β 1–42, což je stejné jako nedostatek zánětlivé odezvy vztažené k A β .

10 Sekce myších mozků také reagovaly s monoklonálními protilátkami, které jsou specifické pro monoklonální protilátky specifickými pro MAC–1, což je buněčný povrchový protein. Protein MAC–1 (CD11b) člen rodiny integrinů a existuje jako heterodimer s CD18. Komplex CD11b/CD18 je přítomen na monocytech, makrofágách, neutrofilech a přirozených žirných buňkách (Mak a Simaď). Rezidentní buněčné typy reaktivní s MAC–1 v mozku jsou pravděpodobně makroglia založená na podobné fenotypické morfologii v sekcích, které imunologicky reagují s proteinem MAC–1. Značení MAC–1, které se spojuje s plaky, bylo nižší v mozku myši ošetřených ANI792 ve srovnání s kontrolní skupinou ošetřenou PBS, přičemž se zjistilo, že souvisí ze skutečnosti, že nedochází k zánětlivé odezvě vyvolané A β .

C. Závěr

20 Nedostatek plaků A β a reaktivní neuronální a gliotické změny v mozku myši, kterým se injekcí zavedlo A β 1–42, indikuje, že se v jejich mozku uložilo extrémně málo amyloidu nebo depozit neexistuje, také nedochází k výskytu patologických následků, jako je glióza a neuritická patologie. Myši PDAPP ošetřené A β 1–42 vykazují v podstatě stejný nedostatek patologických jevů jako kontrolní netransgeni myši. Proto injekce A β 1–42 jsou vysoce účinné při prevenci ukládání nebo odstranění lidského A β z mozkových tkání a při eliminaci následných neuronálních a zánětlivých degenerativních změn. Pak aplikace peptidu A β se může použít při prevenci a léčbě AD.

Příklad 2: Studie odezvy na dávku

30 Skupiny obsahující samice myši staré pět týdnů Swiss Webster (N=6) se imunizovaly 300, 100, 33, 11, 3,7, 1,2, 0,4 nebo 0,13 μ g A β , který se vytvořil intraperitoneální aplikací CFA/IFA. Tři dávky se aplikovaly v týdenních intervalech a o měsíc později se aplikovala čtvrtá dávka. První dávka se emulzifikovala s CFA a zbývající dávky se emulzifikovaly s IFA. Krev zvířat se odebrala 4. až 7. den po každé imunizaci, přičemž měření titerů protilátek se začalo po druhé dávce. Zvířatům v souboru tři skupin, která se imunizovala 11, 33 nebo 300 μ g antigenu, se dále odebírala krev v měsíčních intervalech po dobu čtyř měsíců po čtvrté imunizaci, přičemž se monitoroval pokles protilátkové odezvy v rozmezí dávek imunogenních formulací. Těmto zvířatům se aplikovala konečná pátá imunizace v sedmém měsíci po začátku studie. O týden později se zvířata usmrtila a měřily se protilátkové odezvy na ANI792 a provedly se toxikologické analýzy.

45 Pokles odezvy na dávku se pozoroval od 300 do 3,7 μ g, aniž dochází k odezvě na nejnižší dávky. Střední hodnoty titerů protilátek jsou po třetí dávce přibližně 1:1 000 a po 4. dávce, která obsahovala přibližně 11 až 300 μ g antigenu, přibližně 1:10 000 (popisuje se na obrázku č. 5).

50 Titry protilátek dramaticky rostou ve všech případech. Nízká protilátková odezva se detekovala u myši, kterým se aplikovala dávka 0,4 μ g antigenu. Skupiny myši, kterým se aplikovalo 1,2 a 3,7 μ g antigenu vykazovaly porovnatelné titry s GMT přibližné hodnoty 1 000 a nejvyšší čtyři dávky spojené s GMT přibližně 25 000 s výjimkou skupiny s dávkou 33 μ g s nižší hodnotou GMT 3 000. Po čtvrté imunizaci růst titru byl u většiny skupin mírnější. Ve skupinách s nižší dávkou antigenu od 0,14 do 11 μ g je možné vidět jasnou odezvu na dávku, která se pohybuje v rozsahu žádná detekovatelná protilátka v případě recipientů 0,14 μ g až GMT 36 000 v případě recipientů 11 μ g. Titry v případě čtyř skupin s nejvyšší dávkou 11 až 300 μ g jsou sdružovány dohromady. Po dvou imunizacích titer protilátek závisí na dávce antigenu po celém rozmezí od 0,4

do 300 µg. Třetí imunizací titry nejvyšších čtyř dávek byly všechny srovnatelné a po další imunizaci zůstaly na stálé hodnotě.

Měsíc po čtvrté imunizaci byly titry dvakrát až třikrát vyšší ve skupině, které se aplikovalo 300 µg ve srovnání s titry měřenými z krve odebrané pět dní po imunizaci (obrázek č. 6). Toto pozorování naznačuje, že maximum anamnestické protilátkové odezvy se objevilo později než pět dní po imunizaci. Nejmenší zvýšení (50 %) bylo možné zaznamenat ve skupině, které se aplikovalo 33 µg. Ve skupině s dávkou 300 µg ve dvou měsících po poslední dávce GMT hluboce pokleslo o přibližně 70 %. Po dalším měsíci byl pokles méně prudký přibližně 45 % (100 µg) a přibližně 14 % v případě dávky 33 a 11 µg. Pak rychlost poklesu titrů cirkulujících protilátek následující přerušení imunizace se jeví, že probíhá ve dvou fázích se strmým poklesem v prvním měsíci po maximální odezvě a pak následuje mírnější rychlost poklesu.

Titry protilátek a kinetiky odezvy u těchto myší Swiss Webster jsou podobné těm u mladých heterozygotních transgenních myší PDAPP imunizovaných paralelním způsobem. Dávky účinné pro indukci imunitní odezvy u lidí jsou v typickém případě podobné dávkám účinným u myší.

Příklad 3: Testování terapeutické účinnosti proti AD

Tento test se navrhl tak, aby se u imunogenních činidel mohla testovat aktivita přetrvávajících nebo vratných neuropatologických charakteristik AD u starých zvířat. Imunizace s Aβ o délce 42 aminokyselin (AN1792) začala v době, kdy jsou už v mozku myší PDAPP přítomny amyloidní plaky.

V průběhu této studie se u neošetřených myší PDAPP vyvinula řada neurodegenerativních změn, které se podobaly těm vyskytujícím se v případě AD (popisuje se v publikaci Games et al., *Nature* 373, 523 (1995) a Johnson-Wood et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 1550–1555 (1997)). Ukládání Aβ do amyloidních plaků je spojeno s degenerativní neuronální odezvou, která zahrnuje aberantní axonální a dendritické elementy, které se nazývají dystrofické neurity. Amyloidní depozity, které jsou obklopeny a také obsahují dystrofické neurity, se nazývají neuritické plaky. U myší AD a PDAPP mají dystrofické neurity odlišnou globulární strukturu, jsou imunoreaktivní se souborem protilátek, které rozeznávají APP a cytoskeletové komponenty a vykazují komplexní subbuněčné degenerativní změny na úrovni ultrastruktury. Tyto charakteristiky umožňují selektivní a reprodukovatelné a pro nemoc relevantní měření tvorby neuritických plaků v mozku PDAPP. Dystrofický neuronální komponent neuritických plaků PDAPP je snadno vizualizovatelný s protilátkou specifickou pro lidský APP (monoklonální protilátka 8E5) a je snadno měřitelná počítačovou analýzou zobrazení. Proto vedle měření účinků AN1792 na tvorbu amyloidních plaků se sledovaly účinky této léčby na vývoj neuritické dystrofie.

Astrocyty a mikroglia jsou jiné než neuronální buňky, které odpovídají a odrážejí stupeň poškození neuronů. Astrocyty pozitivní na GFAP a mikroglia pozitivní na MHC-II se v případě AD běžně vyskytují a jejich aktivace se zvyšuje spolu s vážností onemocnění. Proto jsme také monitorovaly vývoj reaktivní astrocytózy a mikrogliózy u myší ošetřených AN1792.

A. Materiál a metody

Z Charles River se získalo R48 heterozygotních samic myší PDAPP ve věku 11 až 11,5 měsíců a náhodně se rozdělily do dvou skupin: 24 myší se imunizovalo 100 µg AN1792 a 24 myší se imunizovalo PBS. AN1792 a PBS se kombinovalo s Freundovým adjuvans. Skupiny imunizované AN1792 a PBS se dále rozdělily, když dosáhly věku přibližně 15 měsíců. V 15 měsících věku přibližně polovina každé skupiny zvířat ošetřených AN1792 a PBS se usmrtila (n=10 a 9), zbytek pokračoval v imunizaci až do ukončení v přibližně 18 měsících (n=9 a 12). Během studie zemřelo celkem 8 zvířat (5 imunizovaných AN1792 a 3 imunizované PBS). Vedle imunizovaných zvířat

jsou pro porovnání v ELIAS testu zahrnuty neošetřené myši PDAPP ve věku jednoho roku (n=10), 15 měsíců (n=10) a 18 měsíců (n=10), aby se mohlo změřit množství A β a APP v mozku myši. V imunohistochemické analýze jsou zahrnuta také zvířata stará jeden rok.

- 5 Pokud není uvedeno jinak, metodologie byla jako v příkladu 1. Peptidy AN1792 z US Peptides lot 12 a California Peptides lot ME0339 se použily při přípravě antigenu pro šest imunizací, které se aplikovaly před dosažením 15 měsíců. Peptidy California Peptides lot ME0339 a ME0439 se použily pro tři další imunizace, které se aplikovaly mezi 15 a 18 měsíci.
- 10 V případě imunizace 100 μ g AN1792 ve 200 μ l PBS nebo v samotné PBS se emulgovalo v poměru 1:1 (vol:vol) s úplným Freundovým adjuvans (CFA) nebo s neúplným Freundovým adjuvans (IFA) nebo PBS v konečném objemu 400 μ l. První imunizace se zavedla s CFA, které se použilo jako adjuvans, další čtyři dávky se aplikovaly s IFA a konečné čtyři dávky se aplikovaly se samotným PBS, aniž se přidalo adjuvans. V průběhu sedmi měsíců se aplikovalo celkem
- 15 devět imunizací ve dvoutýdenních intervalech v případě prvních třech dávek a zbyvajících injekce se aplikovaly ve čtyřtýdenním intervalu. Skupiny, které se léčily pouze čtyři měsíce, se usmrtily ve věku 15 měsíců, se podrobily pouze prvním 6 imunizacím.

B. Výsledky

20

1. Účinky léčby AN1792 na amyloidní uzle

Výsledky léčby AN1792 na kortikální amyloidní uzel stanovené kvantitativní zobrazovací analýzou jsou uvedeny na obrázku č. 7. Střední hodnota v případě kortikálního amyloidního uzle byla 0,28 % ve skupině neošetřených myši PDAPP ve věku 12 měsíců. Uvedená hodnota reprezentuje vznik plaků u myši na začátku studie. Za 18 měsíců se amyloidní uzel zvětšil víc jak 17 krát na 4,8 % u myši ošetřených PBS, zatímco u myši ošetřených AN1792 se amyloidní uzel zmenšil pouze o 0,01 %, což je znatelně méně než u neošetřených myši ve věku 12 měsíců a ve skupině myši ošetřených PBS ve věku 15 a 18 měsíců. Amyloidní uzel se podstatně redukoval u recipientů AN1792 při stáří 15 měsíců (96% redukce, $p=0,003$) a 18 měsíců (více jak 99% redukce, $p=0,0002$).

V typickém případě kortikální amyloidní depozit u myši PDAPP začal v předním a retrosplenálním kortiku (RSC) a pokračoval ventrálním–laterálním směrem, aby zahrnoval temporální a entorhinální kortiky (EC). V EC u 12 měsíců starých myši se nezjistil žádný nebo pouze malé množství amyloidu, což odpovídá věku, při kterém se poprvé aplikoval AN1792. Po čtyřech měsících léčby s AN1792 se velice snížilo ukládání amyloidu v RSC a postupně zahrnutí EC bylo zcela eliminováno léčbou s AN1792. Pozdější pozorování vykazuje, že AN1792 zcela zastavil postup amyloidních depozitů, které v normálním případě pokračuje v temporálním a ventrálním kortiku, stejně jako trvalé nebo možné vratné ukládání v RSC.

Výrazné účinky léčby AN1792 na vývoj kortikálního amyloidního uzle u myši PDAPP jsou dále demonstrovány skupinou myši ve věku 18 měsíců, které se léčily po dobu sedmi měsíců. Skoro úplná absence kortikálního amyloidu se zjistila v případě myši ošetřené AN1792, přičemž úplně chybí difúzní plaky stejně, jako se redukovaly zhutněné plaky.

45

2. Léčba s AN1792 spojená s buněčnými a morfologickými změnami

V oblastech mozku, které v typickém případě obsahují amyloidní depozity, se našla populace buněk pozitivních na A β . Překvapivě v několika mozcích z recipientů AN1792 se našlo velmi málo nebo žádné extrabuněčné kortikální amyloidní plaky. Ukázalo se, že většina A β imunoreaktivita je obsažena v buňkách velkým lobulárním nebo nahromaděným soma. Fenotypicky tyto buňky tvoří aktivovaná mikroglia nebo monocyty. Tyto buňky imunologicky reagují s protilátkami, které rozeznávají ligandy exprimované aktivovanými monocyty a mikroglie (MHC II a CD11b) a jsou příležitostně spojeny se stěnou nebo s lumenem cév. Porovnání přilehlých sekcí

55

značených protilátkami, které jsou specifické pro A β a MHC-II ukázalo, že podobné patery těchto buněk rozeznávají obě třídy protilátek. Detailní testování mozků ošetřených AN1792 ukázalo, že buňky pozitivní na MHC II jsou omezeny na blízkost limitovaného amyloidu, který zbyvá v těchto zvířatech. Při používaných fixačních podmínkách buňky nejsou imunoreaktivní s protilátkami, které rozeznávají ligandy T buňky (CD3, CD3e) nebo B buňky (CD45RA, CD45RB) nebo antigen běžný pro leukocyty (CD45), ale reagovaly s protilátkou, která rozeznává leukosialin (CD43), který zkrříženě reaguje s monocyty. U žádné z myši ošetřených PBS se nenašly takové buňky.

10 Myši PDAPP pravidelně vyvíjejí těžký amyloidní depozit ve vnější molekulové vrstvě hippocampálního gyrusu dentate. Ukládání tvoří zřetelnou brázdou v suboblasti, která v klasickém případě obsahuje amyloidní plaky při AD. Charakteristické objevení těchto depozitů u myši ošetřených PBS se podobá objevení depozitů dříve charakterizované u neošetřených myši PDAPP. Ukládání amyloidu zahrnuje difúzní a zhuštěné plaky v nepřerušovaném pruhu. Naopak u řady 15 mozků z myši ošetřených AN1792 by se měl tento patern drasticky změnit. Ukládání amyloidu v hippocampusu dále neobsahuje difúzní amyloid a pruhový patern byl zcela porušen. Je přítomno řada neobvyklých zvýrazněných struktur, které reagují s protilátkami proti A β , několik z nich jsou buňky obsahující amyloid.

20 U zvířat ošetřených AN1792 se často pozorovaly buňky pozitivní na MHC-II v blízkosti extrabuněčného amyloidu. Patern buněk, které jsou A β pozitivní, byl velmi podobný u několika mozků z myši ošetřených AN1792. Distribuce těchto monocytických buněk se omezila do blízkosti uloženého amyloidu a byla zcela nepřítomna v jiných oblastech mozku, které neobsahují plaky A β . Konfokální mikroskopie sekcí značených MHCII a A β ukázala, že materiál plaků byl obsažen v mnoha monocytických buňkách.

Kvantitativní analýza zobrazení sekcí značených MHC II a MAC1 ukázala trend směrem ke zvýšené imunoreaktivitě v RSC a hippocampu myši ošetřených AN1792 ve srovnání se skupinou ošetřenou PBS, která dosáhla podstatnosti při měření reaktivity MAC 1 v hippocampusu.

30 Tyto výsledky indikují aktivní odstranění amyloidu v oblastech mozku nesoucí plaky zprostředkované buňkami.

3. Účinky AN1792 na množství A β : stanovením v testu ELISA

35 a) Kortikální množství

U neošetřených myši PDAPP střední hodnota množství celkového A β v kortexu ve 12 měsících byla 1 600 ng/g, v 15 měsících vzrostla na 8 700 ng/g (tabulka č. 2). V 18 měsících hodnota byla 40 22 000 ng/g. Během průběhu experimentu hodnota vzrostla víc jak desetkrát. Zvířata ošetřená PBS vykazují v 15 měsících celkové množství A β 8 600 ng/g. Toto množství vzrostlo na hodnotu 19 000 ng/g v 18 měsících. Naopak zvířata ošetřená AN1792 vykazují v 15 měsících o 81 % méně celkového množství A β (1 600 ng/g) ve srovnání se skupinou imunizovanou PBS. Podstatně nižší množství celkového A β ($p=0,0001$) (5 200 ng/g) se zjistilo v 18 měsících, kdy když se 45 porovnávaly skupiny ošetřené AN1792 a PBS (tabulka č. 2), což reprezentuje 72 % redukci množství A β , které by bylo jinak přítomno. Podobné výsledky se získaly, když se porovnály kortikální množství A β 42, jmenovitě skupiny, které se ošetřily AN1792, obsahuje daleko méně A β 42, ale v tomto případě rozdíly mezi skupinami ošetřenými AN1792 a PBS byly podstatné v 15 měsících ($p=0,04$) i v 18 měsících ($p=0,0001$, tabulka č. 2).

50

Tabulka č. 2: Průměrné množství A β (ng/g) v kortexu

věk	neošetřené			PBS			AN1792		
	celkem	A β 42	(n)	celkem	A β 42	(n)	celkem	A β 42	(n)
12	1 600	1 300	(10)						
15	8 700	8 300	(10)	8 600	7 200	(9)	1 600	1300*	(10)
18	22000	18500	(10)	19000	15900	(12)	5200**	4000**	(9)

*p=0,0412

**p=0,0001

5

b) Množství hippocampusu

U neošetřených myši PDAPP střední hodnota množství celkového A β v kortexu ve 12 měsících byla 15 000ng/g, v 15 měsících vzrostla na 51 000 ng/g. V 18 měsících hodnota byla 81 000 ng/g (tabulka č. 3). Podobně, zvířata ošetřená PBS vykazují v 15 měsících hodnoty 40 000 ng/g a v 18 měsících hodnotu 65 000 ng/g. Naopak zvířata ošetřená AN1792 v 18 měsících vykazují hodnotu podstatně nižší ve srovnání se skupinou imunizovanou PBS (p=0,0105, tabulka č. 3). Měření A β 42 dává stejný patern výsledků. Množství ve skupině ošetřené AN1792 bylo podstatně nižší než ve skupině ošetřené PB (39 000 ng/g verusus 57 000 ng/g, p=0,002) při 18 měsíčním vývoji (tabulka č. 3).

15

Tabulka č. 3: Průměrné množství A β (ng/g) v kortexu

věk	neošetřené			PBS			AN1792		
	celkem	A β 42	(n)	celkem	A β 42	(n)	celkem	A β 42	(n)
12	15500	11100	(10)						
15	51500	44400	(10)	40100	35,70	(9)	24,50	22100	(10)
18	80800	64200	(10)	65400	57,10	(12)	50,90	38900	(9)
							**		

*p=0,0105

**p=0,0022

20

(c) Množství v mozečku

U neošetřených myši PDAPP průměrná hodnota cerebelárního množství celkového A β ve 12 měsících byla 15 000 ng/g (tabulka č. 4). V 15 měsících průměrná hodnota vzrostla na 28 ng/g. V 18 měsících hodnota byla 35 ng/g (tabulka č. 3). Zvířata ošetřená PBS vykazují v 15 měsících hodnoty 21 ng/g a v 18 měsících hodnotu 43 ng/g. Naopak zvířata ošetřená AN1792 v 15 měsících vykazují hodnotu 22 ng/g celkového A β a podstatně nižší (p=0,002) v 18 měsících (25 ng/g) než odpovídající skupina PBS (tabulka č. 4).

30

Tabulka č. 4: Průměrné množství A β (ng/g) v mozečku

věk	neošetřené		PBS		AN1792	
	celkový A β	(n)	celkový A β	(n)	celkový A β	(n)
12	15,6	(10)				
15	27,7	(10)	20,8	(9)	21,7	(10)
18	35,0	(10)	43,1	(12)	24,8*	(9)

*p=0,0018

5 4. Účinky léčby AN1792 na množství APP

Molekula APP- α a APP celé délky obsahují celou sekvenci A β nebo její část a tak může být potencionálně působit vytvořením imunitní odezvy na AN1792. Ve studiích se zaznamenalo slabé zvýšení množství APP, jako zvýšení neuropatologické charakteristiky u myši PDAPP. V kortexu se léčbou množství buď APP- α /FL (plné délky), nebo APP- α se podstatně nezměnilo s výjimkou, že množství APP- α se zmenšilo o 19 % v 18 měsíci u skupiny ošetřené AN1792 ve srovnání se skupinou ošetřenou PBS. Hodnoty APP ve skupině ošetřené AN1792 v 18 měsících podstatně nevzrostla z hodnoty, kterou vykazuje neošetřená skupina v 12 a 15 měsících a skupina ošetřená PBS v 15 měsících. Ve všech případech hodnoty APP zůstaly v rozmezí, které se normálně zjistilo u myši PDAPP.

5. Účinky léčby AN1792 na neurodegenerativní a gliotickou patologii

Neuritický plakový uzal se v předním kortexu myši ošetřených AN1792 podstatně redukoval ve srovnání se skupinou ošetřenou PBS jak ve věku 15 měsíců (84 %, p=0,03) tak i ve věku 18 měsíců (55 %, p=0,01) (obr. č. 8). Průměrná hodnota neuritického plakových uzlů se zvýšila z 0,32 % na 0,49 % ve skupině ošetřené PBS mezi věkem 15ti a 18 měsíců věku. To je v kontrastu s vysoce redukováným vývojem neuritických plaků ve skupině ošetřené AN1792 s průměrnými hodnotami neuritických plakových uzlů 0,05 a 0,22 % ve skupinách ve věku 15 a 18 měsíců.

Zdá se, že imunizace s AN1792 je velmi dobře tolerována a reaktivní astrocyty se také podstatně redukovaly v RSC myši ošetřených AN1792 ve srovnání se skupinou ošetřenou PBS ve věku 15 (56 %, p=0,011) a 18 (39 %, p=0,028) měsíců věku (obrázek č. 9). Průměrné hodnoty procenta astrocytózy ve skupině ošetřené PBS se zvýšily mezi 15. a 18. měsícem z 4,25 na 5,21 %. Léčba AN1792 potlačila vývoj astrocytózy v obou časových bodech na 1,89 a 3,2 %. To naznačuje, že neuropil nebyl poškozen odstraňovacím postupem.

6. Protilátkové odezvy

Jak se popisuje shora v textu 12 měsíců starým heterozygotním myším PDAPP (N=24) se aplikovaly série 5 imunizací 100 μ g AN1792 emulzifikovaných s Freundovým adjuvans a aplikovaly se intraperitoneálně v týdnů 0, 2, 4, 8 a 12 a šestá imunizace se provedla v týden 16 samotným PBS (bez Freundova adjuvans). Jako negativní kontrola se použila paralelní sada 24 transgenních myši odpovídající věkem, které se imunizovaly PBS emulgovaným stejnými adjuvans a zavedly se podle stejného rozvrhu. Zvířatům se odebraly vzorky třetí a sedmý den po každé imunizaci, přičemž se začalo po druhé dávce. Testem ELISA se měřily protilátkové odezvy na AN1792. Geometrické průměry títů (GMT) v případě zvířat, která se imunizovala AN1792 byly po první,

druhé a třetí a poslední (šesté) dávce přibližně 1 900, 7 600 a 45 000. U kontrolních zvířat po šesté imunizaci se nenaměřily žádné protilátky specifické pro A β .

Přibližně polovina zvířat se ošetřovala po dobu dalších tří měsíců. Imunizace se aplikovala přibližně 20, 24 a 27 týdnů. Každá z těchto dávek se zavedla v samotném PBS bez Freundova adjuvans. Průměrný titer protilátek zůstal po tuto dobu nezměněn. Ve skutečnosti titry protilátek zůstávají stabilní od čtvrtého do osmého odběru krve, což odpovídá období překrývající patou až devátou injekcí.

Aby se stanovilo, zda protilátky specifické pro A β vyvolané imunizací, které se detekovaly v séru myši ošetřené AN1792, jsou také spojené s ukládáním amyloidu v mozku, tak se soubor sekcí z myši ošetřené AN1792 a PBS nechaly reagovat s protilátkou specifickou pro myši IgG. Na rozdíl od skupiny ošetřené PBS se plaky A β v mozku myši ošetřené AN1792 potáhly endogenním IgG. Tento rozdíl mezi dvěma skupinami je možné spatřit ve věku 15 i 18 měsíců. Zvláštní byl nedostatek značení ve skupině ošetřené PBS navzdory přítomnosti těžkého amyloidního uzlu u těchto myši. Tyto výsledky vykazují, že imunizace se syntetickým proteinem A β tvoří protilátky, které rozeznávají A β v amyloidních plakách nebo se něj váží.

7. Imunitní odezvy zprostředkované buňkou

Sedmý den po deváté imunizaci se z devíti myši PDAPP imunizovaných AN1792 a 12 myši imunizovaných PBS ve věku 18 měsíců odstranila slezina. Izolovaly se splenocyty a kultivovaly se po dobu 72 hodin v přítomnosti A β 40, A β 42 nebo A β 40-1 (obrácené pořadí proteinu). Jako pozitivní kontrola sloužil mitogen Con A. S proteinem s koncentrací vyšší než 1,7 μ M se dosáhlo optimální odezvy. Buňky pocházející ze všech devíti zvířat imunizovaných AN1792 proliferovaly jako odezva na protein A β 40 nebo A β 1-42, se stejným množstvím začlenění obou proteinů (obrázek č. 10, horní část). Neexistuje odezva na reverzní protein A β 40-1. Buňky kontrolních zvířat neodpovídají na žádný z proteinů A β (obrázek č. 10, spodní část).

D. Závěr

Výsledky této studie ukazují, že imunizace AN1792 myši PDAPP zpracovávající existující amyloidní depozity zpomaluje a předchází postupnému amyloidnímu ukládání a brzdí následné neuropatologické změny v mozku starých myši PDAPP. Imunizace s AN1792 podstatně zastavila ukládání amyloidu ve strukturách, které v normálním případě ustupují před amyloidózou. Pak aplikace peptidu A β má pozitivní účinek při léčbě AD.

Příklad 4: Testování fragmentů A β

100 myši PDAPP ve věku 9 až 11 měsíců se imunizovaly devíti různými oblastmi APP a A β , aby se stanovilo, zda epitopy umožňují účinnou odpověď. Devět různých imunogenů a jedna kontrola se zavádějí injekcí (i.p.), jak se popisuje shora v textu. Imunogeny zahrnují čtyři lidské peptidové konjugáty A β 1-12, 13-28, 32-42, 1-5, všechny jsou spojené s anti-myšimi protilátkami IgG prostřednictvím cysteinové vazby, jsou to aminokyseliny polypeptidu APP 592-695, agregovaný lidský A β 1-40, agregovaný lidský A β 1-40, agregovaný lidský A β 25-35 a agregovaný A β 42 hlodavců. Agregovaný A β 42 a PBS se použily jako pozitivní a negativní kontroly. V jedné léčebné skupině se použilo deset myši. Titry se monitorovaly, jak se uvádí shora v textu a myši se usmrtily na konci 4 měsíce injekcí. Po smrti krys se provedla histochemická a toxikologická analýza, stanovilo se množství A β .

A. Materiály a metody

1. Příprava imunogenů

Příprava spojených peptidů Aβ: čtyři lidské peptidové konjugáty Aβ (aminokyselinové zbytky 1–5, 1–12, 13–28 a 33–42, každý tvoří konjugát s ovčím anti-myším IgG) se připravily spojením s umělým cysteinem, který se přidal do peptidu Aβ za použití síťovadla sulfo-EMCS. Peptidové deriváty Aβ se syntetizovaly s následující konečnou aminokyselinovou sekvencí. V každém případě poloha začleněného cysteinového zbytku je označena podtrženým písmenem. Peptidový derivát Aβ 13–28 také obsahuje dva glycinové zbytky, které se přidaly dříve než karboxylový terminální cystein.

peptid Aβ1–12 NH₂-DAEFRHDSGYEVC-COOH (SEQ ID NO: 72)

10 peptid Aβ1–5 NH₂-DAEFRC-COOH (SEQ ID NO: 73)

peptid Aβ33–42 NH₂-C-aminoheptanová kyselina GLMVGGVVIA-COOH (SEQ ID NO: 74)

peptid Aβ13–28 Ac-NH-NHQKLVFFAEDVGSNKGGC-COOH (SEQ ID NO: 75)

15 Aby proběhla kuplovační reakce, deset miligramů ovčích anti-myšního IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories) se dialyzovalo přes noc proti 10 mM borátu sodnému, pH 8,5. Dialyzované protilátky se pak koncentrovaly na objem 2 ml za použití zkumavek Amicon Centriprep. Deset miligramů činidla sulfo-EMCS [N(ε-maleimidokuproyloxy)sukcinimid] (Molecular Sciences Co.) se rozpustil v jednom mililitru deionizované vody. 40 násobný molární nadbytek činidla sulfo-EMCS se přidal po kapkách za stálého míchání k ovčímu anti-myšnému IgG a pak se roztok míchal po dalších deset minut. Aktivovaný ovčí anti-myšný IgG se čistil a pufr se vyměnil pasáží přes gelovou filtrační kolonu o objemu 10 ml (Pierce Presto Column, získanou u firmy Pierce Chemicals), která se uvedla do rovnováhy 0,1 M NaPO₄, 5 mM EDTA, pH6,5. Frakce obsahující protilátky identifikované absorbcí při vlnové délce 280 nm se slily a ředily se na koncentraci 25 přibližně 1 mg/ml za použití 1,4 mg na jednotku OD, jako extinkční koeficient. 40 násobný molární nadbytek peptidu Aβ se rozpustil ve 20 ml 10 mM NaPO₄ pH8,0 s výjimkou peptidu Aβ33–42, kdy se nejdříve rozpustilo 10 mg peptidu v 0,5 ml DMSO a pak se ředilo ve 20 ml pufru 10 mM NaPO₄. Každý roztok peptidu se přidal do 10 ml aktivovaného ovčího anti-myšního IgG a směs se míchala kolébáním při teplotě místnosti po dobu 4 hodin. Výsledné konjugáty se zakoncentrovaly na konečný objem, který je menší než 10 ml za použití zkumavek Amicon Centriprep a pak se dialyzovaly proti PBS, aby pufr nahradil pufr a odstranil se volný peptid. Za účelem sterilizace se konjugáty pasážovaly přes filtry o velikosti pórů 0,22 mikrónů a pak se rozdělily na alikvoty do frakcí, které obsahují 1 mg a uchovávaly se zmrazené při teplotě –20 °C. Koncentrace konjugátů se stanovila za použití proteinových testů BCA (Pierce Chemicals) s koňským IgG 30 za účelem vytvoření standardní křivky. Konjugace se dokumentovala zvýšením molekulové hmotnosti konjugovaných peptidů ve vztahu vztaženo na aktivovaný ovčí anti-myšný IgG. Ovčí anti-myšný konjugát Aβ1–5 je výsledek spojení dvou konjugací, zbytek byl z jedné přípravy.

2. Příprava agregovaných peptidů Aβ

40 Lidské peptidy 1–40 (AN1528, California Peptides Inc., Lot ME0541), lidské 1–42 (AN1792, California Peptides Inc., Lots ME0339 a ME0439), lidský 25–35 a 1–42 hlodavce (California Peptides Inc., Lot ME0218) peptidy se rozpustily za účelem přípravy každé sady injekcí z lyofilizovaného prášku, které se udržovaly vysušené při teplotě –20 °C. Pro tyto účely se přidaly 45 dva miligramy peptidu do 0,9 ml deionizované vody a směs se míchala vortexem, aby se vytvořil relativně jednotný roztok nebo suspenze. Ze čtyř uvedených peptidů v tomto kroku jediným rozpustným peptidem byl AN1528. Pak se k AN1528 přidalo alikvot 10x koncentrovaného PBS o objemu 100 μl a v tento okamžik AN1528 se začal srážet. Suspenze se opět míchala vortexem a inkubovala se přes noc při teplotě 37 °C a použila se následující den.

50 Příprava proteinu pBx6: Zkonstruoval se expresivní plazmid kódující pBx6, což je fúzní protein obsahující N-terminální vedoucí sekvenci bakteriofágové polymerázy MS-2 obsahující 100 aminokyselin, po které následují aminokyseliny 592–695 APP (βAPP) se zkonstruovaly, jak se popi-

suje v publikaci Oltersdorf et al., J. Biol. Chem. 265, 4492–4497 (1990). Plazmid se přenesl do bakterie *E.coli* a protein se exprimoval po indukci promotoru. Bakterie se lyzovala v 8M močovině a pBx6 se částečně čistil preparativní SDS PAGE. Frakce obsahující pBx6 se identifikovaly westernovou analýzou za použití králíčích polyklonálních protilátek proti pBx6, slily se dohromady, použitím zkumavek Amicon Centriprep se zvýšila koncentrace a dialyzovaly se proti PBS. Čistota přípravku odhadovaná pomocí SDS PAGE obarvenou Coomassieovou modří byla přibližně 5 až 10 %.

B. Výsledky a diskuze

1. Návrh studie

Jedno sto samců a samic heterozygotních transgenních myši PDAPP devět až dvanáct měsíců starých se získalo z instituce Charles River Laboratory a Taconic Laboratory. Myši se rozdělily do deseti skupin, aby se imunizovaly různými oblastmi A β a APP kombinovanými s Freundovým adjuvans. Zvířata se rozdělila tak, aby si ve skupině odpovídala pohlaví, věkem, původem a zdrojem jak, jen to je možné. Imunogeny zahrnují čtyři peptidy A β získané z lidské sekvence 1–5, 1–12, 13–28 a 33–42, přičemž je každý konjugovaný s ovčím anti-myším IgG, čtyři agregované peptidy A β , lidský 1–40 (AN1528), lidský 1–42 (AN1792), lidský 25–35 a 1–42 z hlodavců a fúzní polypeptid označený jako pBx6, který obsahuje aminokyselinové zbytky APP 592–695. Desátá skupina, která sloužila jako kontrola, se imunizovala PBS kombinovaným s adjuvans.

V případě každé imunizace 100 μ g každého peptidu A β ve 200 μ l PBS nebo 200 μ g derivátu pBx6 APP ve stejném objemu PBS nebo samotné PBS se emulgovalo s úplným Freundovým adjuvans (CFA) v objemu 1:1 (objem : objem), přičemž v případě první imunizace konečný objem je 400 μ l, pak následovaly 4 zesilující dávky obsahující stejné množství imunogenu v neúplném Freundovým adjuvans (IFA) a konečná dávka obsahovala PBS. V případě prvních třech dávek se imunizace aplikovala intraperitoneálně ve dvoutýdenních intervalech a pak v intervalu jednoho měsíce. Po čtyřech až sedmi dnech po každé imunizaci se zvířatům odebrala krev, přičemž se začalo po druhé dávce, a v krvi se stanovil titer protilátek. Zvířata se usmrtila přibližně jeden týden po konečné dávce.

1. Množství A β a APP v mozku

Po přibližně čtyřech měsících imunizace různými peptidy A β nebo deriváty APP se získal mozek ze zvířat perfundovaných fyziologickým roztokem. Jedna hemisféra se připravila imunohistochemickou analýzou a druhá se použila pro kvantifikaci množství A β a APP. Aby se měřila koncentrace různých forem amyloidního peptidu beta a amyloidního prekurzorového proteinu, izolovala se hemisféra a připravil se homogenát hippocampální, kortikální a cerebelární oblasti v 5 M guanidinu. Homogenát se naředil a množství amyloidu a APP se kvantifikovalo porovnáním sérií ředění standardů peptidu A β nebo APP, jejichž koncentrace jsou známy, v testu ELISA.

Průměrná koncentrace celkového A β v případě kontrolní skupiny imunizované PBS byla 5,8 krát vyšší v hippocampusu než v kortexu (průměrná hodnota 24 318 ng/g hippocampální tkáň ve srovnání s 4 221 ng/g v tkáni kortexu). Průměrná hodnota v cerebellum kontrolní skupiny (23,4 ng/g tkáň) byla přibližně 1 000 krát nižší než v hippocampusu. Tato množství jsou podobná množství, které bylo dříve zaznamenáno v případě heterozygotních transgenních myši PDAPP uvedeného stáří (Johnson–Wood et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 1550–1555 (1997)).

V případě kortexu subsada léčených skupin vykazovaly průměrnou hodnotu celkového množství A β a A β 1–42, které se podstatně liší od hodnot, které vykazuje kontrolní skupina (p je menší než 0,5), těmto zvířatům se aplikoval AN1792, A β 1–42 hlodavců nebo peptidový konjugát A β 1–5, jak je zobrazeno na obrázku č. 11. Průměrná hodnota množství celkového A β se redukovala ve srovnání s kontrolou pro tuto léčenou skupinu o 75, 79 a respektive 61 %. Existují se rozeznatel-

né korelace mezi titry protilátek specifickými pro A β a množství A β v kortikální oblasti mozku v případě libovolné skupiny.

5 V hippocampusu průměrné snížení celkového A β spojeného s léčbou AN1792 (46 %, $p=0,0543$) nebyla větší, než se pozorovalo v kortexu (75 %, $p=0,0021$). Redukce však nebyla o tolik větší v hippocampusu než v kortexu. Redukce A β hippocampusu je 11 186 ng/g tkáně verus 3 171 ng/g tkáně v kortexu. V případě skupin zvířat, kterým se aplikoval A β 1–42 nebo A β 1–5
10 hlodavců, se průměrná hodnota množství celkového A β redukovala o 36 a 26 %. Dáno malou velikostí skupin a vysokou variabilitou množství amyloidního peptidu od zvířete k zvířeti v obou skupinách, tyto redukce nebyly podstatné. Když se měřilo A β 1–42 v hippocampusu, žádné redukce indukované léčbou nebyly podstatné. Vzhledem k malé velikosti uzlů A β v kortexu, změny v této oblasti jsou citlivějším indikátorem účinků léčby. Změny množství A β měřené testem ELISA v kortexu jsou podobné, nikoliv identické s výsledky imunohistochemické analýzy (popisuje se dále v textu).

15 Celkové množství A β se také měřilo v cerebellum, což je oblast, která je minimálně ovlivněna patologií AD. Žádná z průměrných koncentrací A β libovolných skupin imunizovaných různými peptidy A β nebo deriváty APP se liší od kontrolní skupiny v této oblasti mozku. Tento výsledek naznačuje, že nepatologické množství A β není ovlivněno léčbou.

20 Koncentrace APP v kortexu a v cerebelu léčených nebo kontrolních myši se také stanovila testem ELISA. Použily se dva různé testy APP. První test označený APP- α /FL rozeznává jak APP alfa (α , vylučovaná forma APP, která se štěpila v sekvenci A β) a formy APP v plné délce (FL), zatímco druhý test rozeznává pouze APP- α . Na rozdíl od úbytku A β spojeného s léčbou v sadě
25 léčených skupin, množství APP se nezměnilo u všech léčených myši ve srovnání s kontrolními zvířaty. Tyto výsledky ukazují, že imunizace s peptidy A β nesnižuje množství APP, spíše léčebný účinek je specifický pro A β .

30 Celkové množství A β a A β 1–42 se v kortexu podstatně redukovalo léčbou AN1792, A β 1–42 hlodavce nebo konjugátem A β 1–42. V hippocampusu se celkové množství A β podstatně redukovalo pouze léčbou AN1792. Žádné jiné změny v množství A β nebo APP v hippocampální, kortikální nebo cerebrální oblasti spojené s léčbou nebyly podstatné.

2. Histochemická analýza

35 Mozky z podsady šesti skupin se připravily za účelem imunohistochemické analýzy, přičemž tři skupiny se imunizovaly konjugáty peptidu A β A β 1–5, A β 1–12 a A β 13–28, dvě skupiny se imunizovaly agregáty A β plné délky AN1792 a AN1528 a kontrolní skupina se ošetřila PBS. Výsledky zobrazovací analýzy amyloidního uzle v mozkových sekcích z těchto skupin jsou zobrazeny na obrázku č. 12. Existují podstatné redukce amyloidního uzle v kortikálních oblastech tří
40 léčených skupin ve srovnání s kontrolními zvířaty. Největší redukce amyloidního uzle se pozorovala ve skupině, které se aplikovalo AN1792, kde průměrná hodnota se redukovala z 97 % ($p=0,001$). Podstatné redukce se také pozorovaly v případě těch zvířat ošetřených AN1528 (95 %, $p=0,005$) a peptidovým konjugátem A β 1–5 (67 %, $p=0,02$).

45 Výsledky získané kvantifikací celkového množství A β nebo A β 1–42 testem ELISA a zobrazením amyloidního uzle se v některém rozsahu liší. Léčba pomocí AN1528 měla podstatný vliv na množství kortikálního amyloidního uzlu, když se provedla kvantitativní zobrazovací analýza, ale neměla vliv na koncentraci celkového A β ve stejné oblasti, která se stanovila testem ELISA. Rozdíl mezi těmito dvěma výsledky je pravděpodobně způsoben specifitami testů. Zobrazovací
50 analýza měří pouze nerozpustný A β agregovaný do plaků. Naopak test ELISA měří všechny formy A β , což znamená rozpustné a nerozpustné, monomerní a agregované. Protože se uvažuje, že patologie onemocnění je spojena s formou A β spojenou s nerozpustnými plaky, metoda zobra-

zovací analýzy je citlivější pro zobrazení účinků léčby. Protože však test ELISA je rychlejší a jednodušší, hodně se používá pro účely testování velkého množství vzorku. Může se také ukázat, že redukce A β spojená s léčbou je větší v případech A β spojeného s plaky než celkového A β .

5 Aby se stanovilo, zda protilátky specifické pro A β vyvolané imunizací u léčených zvířat reagovaly s amyloidem uloženým v mozku, podsada sekcí z léčených zvířat a kontrolních myší se nechaly reagovat s protilátkou specifickou pro myši IgG. Na rozdíl od skupiny ošetřené PBS, plaky obsahující A β se potáhly endogenním IgG v případě zvířat imunizovaných konjugáty peptidu A β . Jsou to A β 1–5, A β 1–12 a A β 13–28 a agregáty A β plné délky, jako je AN1792 a AN1528. Mozky zvířat imunizovaných jinými peptidy A β nebo APP peptidem pBx6 se tímto testem neanalyzovaly.

3. Měření titrů protilátek

15 Čtyři až sedm dní po každé imunizaci se myším odebraly vzorky krve, přičemž se začalo po druhé imunizaci. Vzorky krve se odebraly celkem pětikrát. Titrů protilátek se měřily jako protilátky vázající se na A β -42 za použití sendvičového testu ELISA na plastových destičkách s velkým množstvím prohlubní, které se potáhly A β 1–42. Jak se zobrazilo na obrázku č. 13, maximální titry protilátek se vyvolaly po čtvrté dávce imunogenních prostředků, které vyvolaly nejvyšší titry protilátek specifických pro AN1792: AN1792 (maximum GMT: 94 647), AN1528 (maximum GMT 88 231), konjugát A β 1–12 (maximum GMT: 47 216) a A β 1–42 hlodavce (maximum GMT: 10 766). Titrů u těchto skupin klesají po následující páté a šesté dávce. V případě zbývajících pěti imunogenů maximálních titrů se dosáhlo po páté nebo šesté dávce a měly daleko nižší hodnotu, než jsou titry čtyř skupin s nejvyšší hodnotou titrů: konjugát A β 1–5 (maximum GMT: 2 356), pBx6 (maximum GMT: 1 986), konjugát A β 13–28 (maximum GMT: 1 183), konjugát A β 33–42 (maximum GMT: 658), A β 25–35 (maximum GMT: 125). Také se měřily titry protilátek proti homologním peptidům za použití stejného testu ELISA v sendvičovém formátu, tyto skupiny se imunizovaly A β 1–5, A β 13–28, A β 25–35, A β 33–42 nebo A β 1–42 hlodavce. Tyto titry byly přibližně stejné jako titry naměřené proti A β 1–42 s výjimkou imunogenu A β 1–42 hlodavce, kdy titry protilátek proti homolognímu imunogenu jsou přibližně dvakrát vyšší. Hodnota titru protilátek proti AN1792 u jednotlivých zvířat nebo průměrné hodnoty léčených skupin nekoreluje s účinností měřenou jako redukce A β v kortexu.

4. Lymfoproliferativní odezvy

35 Lymfoproliferace závislá na A β se měřila použitím buněk sleziny sebraných přibližně jeden týden po konečné šesté imunizaci. Čerstvě sklizené buňky v počtu 105 do jedné prohlubně se kultivovaly po dobu 5–tí dní v přítomnosti A β 1–40 v koncentraci 5 μ M za účelem stimulace. Buňky ze sady sedmi z desíti skupin se také kultivovaly s mitogenem T buňky PHA a jako negativní kontrola se buňky kultivovaly bez přidání peptidu.

Lymfocyty získané z většiny zvířat proliferovaly jako odezva na PHA. Nepozorovala se žádná podstatná odezva na reverzní peptid A β 1–40. Buňky ze zvířat imunizované většími agregovanými peptidy A β AN1792, A β 1–42 hlodavců a AN1528 silně proliferovaly, když se stimulovaly A β 1–40 s vyšším cpm u recipienta AN1792. Jedno zvíře v každé skupině imunizované konjugátem A β 1–12, A β 13–28 a A β 25–35 proliferovalo jako odezva na A β 1–40. Zbývajícím skupinám se aplikoval konjugát A β 1–5, konjugát A β 33–42 pBx6 nebo PBS se neaplikovalo žádnému zvířeti s odezvou stimulovanou A β . Tyto výsledky se shrnuly v tabulce č. 5 dále v textu.

Tabulka č. 5

Imunogen	Konjugát	aminokyseliny A β	jedinci s odezvou
A β 1-5	ano	5-mér	0/7
A β 1-12	ano	12-mér	1/8
A β 13-28	ano	16-mér	1/9
A β 25-35		11-mér	1/9
A β 33-42	ano	10-mér	0/10
A β 1-40		40-mér	5/8
A β 1-42		42-mér	9/9
r A β 1-42		42-mér	8/8
pBx6			0/8
PBS		0-mér	0/8

5

Tyto výsledky ukazují, že AN1792 a AN1528 stimuluje silné odezvy T buněk, které nejvíce odpovídají fenotypu CD4+. Nepřítomnost odezvy specifické pro A β u zvířat imunizovaných A β 1-5 není překvapující, protože peptidové epitopy rozeznávané T buňkami CD4+ obsahují obvykle přibližně 15 aminokyselin, ačkoli kratší peptidy mohou někdy fungovat s nižší účinností. Pak většina epitopů pomocných T buněk v případě čtyř konjugovaných peptidů jsou pravděpodobně zbytky v konjugacním partneru IgG, nikoliv v oblasti A β . Tuto hypotézu podporuje velmi nízký výskyt proliferativních odezev zvířat v každé z těchto skupin. Protože konjugát A β 1-5 byl účinný při podstatném omezení množství A β v mozku při zjevné nepřítomnosti T buněk specifických pro A β , pak klíčová efektorová imunitní odezva vyvolaná imunizací s tímto peptidem se jeví být protilátka.

15

Nedostatek T-buněk a nízká protilátková odezva na fúzní peptid pBx6, který obsahuje aminokyseliny APP 592 až 695 zahrnující všechny zbytky A β může způsobovat nízkou imunogenost tohoto určitého přípravku. Slabá imunogenost agregátu A β 25-35 je pravděpodobně způsobena peptidem, který je příliš malý, aby obsahoval správný epitop T buňky, aby pomohl vyvolat protilátkovou odezvu. Jestliže by se tento peptid konjugoval s nosičovým proteinem, bude pravděpodobně více imunogenní.

20

25 Příklad 5: Příprava polyklonálních protilátek pro pasivní ochranu

125 netrandgenních myši se imunizovalo 100 μ g A β 1-42 plus adjuvans CFA/IFA a usmrtily se ve věku 4 až 5 měsíce. Z imunizovaných zvířat se odebraly vzorky krve. IgG se separovaly od jiných komponentů krve. Protilátka specifická pro imunogen se může částečně čistit afinitní chromatografií. Z jedné myši se průměrně získalo přibližně 0,5 až 1 mg protilátky specifické pro imunogen, celkem se získalo 60 až 120 mg.

30

Příklad 6: Pasivní imunizace protilátkou proti A β

Skupinám myši PDAPP ve věku 7 až 9 měsíců se injekcí aplikovalo 0,5 mg polyklonální protilátky proti A β v PBS nebo specifických monoklonálních protilátek proti A β , jak se ukazuje dále v textu. Všechny protilátky se čistily, aby se dosáhlo nízkého množství endotoxinu. Monoklonální protilátky se mohou připravit proti fragmentu tím, že se do myši injekcí zavedl fragment nebo kratší forma A β , přičemž se připravily hybridoma a testovaly se za účelem zjištění protilátky, která se specificky váže na požadovaný fragment A β , aniž se váže na jiné přesahující fragmenty A β .

Tabulka č. 6

protilátka	epitop
2H3	A β 1-12
10D6	A β 1-12
266	A β 13-28
21F12	A β 33-42
myši polyklonální anti-lidské A β 42	anti-agregovaný A β 42

Myšim, je-li potřeba, se aplikovala injekce v období čtyř měsíců, aby se udržela koncentrace cirkulujících protilátek měřená testem ELISA vyšší než 1/1000 definované v testu ELISA A β 42 nebo jiným imunogenem. Titry se monitorovaly jak se popisuje shora v textu a myši se usmrtily na konci šesti měsíců injekcí. Množství A β a toxikologie se stanovily po usmrcení myši. V jedné skupině bylo deset myši. Další studie pasivní imunizace se popisuje v příkladech XI a XII dále v textu.

Příklad 7: Porovnání různých adjuvans

Tento příklad porovnává kapacitu stimulovat imunitní odezvu CFA, alum, emulzí olej ve vodě a MPL.

A. Materiál a metody

1. Návrh studie

100 samic morčat Hartley ve stáří šesti týdnů získaných z Elm Hill se rozdělilo do deseti skupin, aby se imunizovalo AN1792 nebo palmitoylovaným derivátem kombinovaným s různým adjuvans. Sedmi skupinám se aplikoval injekcí AN1792 (33 μ g pokud není uvedeno jinak) kombinovaný s a) PBS, b) Freundovým adjuvans, c) MPL, d) skvalenem, e) MPL/skvalenem, f) nízkou dávkou alum nebo g) vysokou dávkou alum (300 μ g AN1792). Dvěma skupinám se aplikovaly injekce palmitoylovaného derivátu AN1792 (33 μ g) kombinovaného s a) PBS nebo b) skvalenem. Nakonec desáté skupině se aplikovalo samotné PBS bez antigenu nebo dalšího adjuvans. V případě skupiny, které se aplikovalo adjuvans se první dávka emulgovala s CFA a zbývající čtyři dávky s IFA. V případě všech skupin s výjimkou skupiny, které se aplikovalo alum a jenž se aplikovalo 300 μ g AN1792, se antigen aplikoval v dávce 33 μ g. V případě CFA/IFA se injekce aplikovaly intraperitoneálně a intramuskulárně do čtyřhlavého svalu buď levě, nebo pravě zadní

končetiny. První tři dávky se aplikovaly ve dvoutýdenním intervalu a pak následují dvě dávky v měsíčním intervalu. Šest až sedm dní po každé imunizaci, začalo se po druhé dávce, se odebraly vzorky krve za účelem stanovení titrů protilátky.

5 2. Příprava imunogenů

Dva miligramy A β 42 (California Peptide, Lot ME0339) se přidaly do 0,9 ml deionizované vody a směs se míchala na vortexu za vzniku relativně jednotné suspenze. Přidal se alikvot 10 x koncentrovaného PBS (1x PBS, 0,15 M NaCl, 0,01 M fosforečnan sodný, pH7,5) o objemu 100 μ l. Suspenze se opět zamíchala na vortexu a inkubovala se přes noc při teplotě 37 °C a použila se další den. Nepoužitý A β 1–42 se uchovával s desikantem jako lyofilizovaný prášek při teplotě –20 °C.

Palmitoylovaný derivát AN1792 se připravil spojením s anhydridem kyseliny palmíkové rozpuštěným v dimethylformamidu a aminoterminálním zbytkem AN1792 před odstraněním nascentního peptidu z pryskyřice ošetřením kyselinou fluorovodíkovou. Aby se připravily dávky přípravku s úplným Freundovým adjuvans (CFA) (skupina 2) v případě první imunizace se 33 μ g AN1792 ve 200 μ l PBS emulgovala v poměru 1:1 (objem : objem) s CFA v konečném objemu 400 μ l. V případě další imunizace se antigen podobně emulgoval s neúplným Freundovým adjuvans (IFA).

Aby se připravily dávky prostředku s MPL v případě skupinu 5 a 8, lyofilizovaný prášek (Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MT) se přidaly do 0,2 % vodného triethylaminu, aby konečná koncentrace byla 1 mg/ml a míchaly se vortexem. Směs se zahřála na teplotu 65 až 70 °C po dobu 30 vteřin, aby vznikla slabě neprůsvitná jednotná suspenze micel. Pro každou sadu injekcí byl připraven čerstvý roztok. V případě každé injekce ve skupině 5 se bezprostředně před použitím v borokřemičité zkumavce smíchalo 33 μ g AN1792 v 16,5 μ l PBS, 50 μ g MPL (50 μ l) a 162 μ l PBS.

Aby se připravily dávky prostředků s emulzí olej ve vodě, AN1792 v PBS se přidalo do 5 % skvalenu, 0,5 % Tween 80, 0,5 % Span 85 v PBS, aby se dosáhlo konečné koncentrace 33 μ g AN1792 v 250 μ g (skupina 6). Směs se emulgovala 15 až 20 násobným průchodem přes dvou komorové ruční zařízení až průměr kapek emulze odpovídá 1,0 μ m, což je průměr standardní latexové částice, když se pozoruje pod mikroskopem. Výsledná suspenze byla opalescentní mléčně bílá. Pro každou sérii injekcí se připravily čerstvé emulze. V případě skupiny 8 se přidal ke skvalenu v koncentraci 50 μ g v jedné dávce MPL v 0,2 % triethylaminu a směs detergentu, aby došlo ke vzniku emulze. V případě palmitoylového derivátu (skupina 7) se přidalo 33 μ g palmitoyl–NH–A β 1–42 v jedné dávce ke skvalenu a vše se míchalo na vortexu. Směs se pak přidala do PBS, aby se dosáhlo konečných koncentrací 5 % skvalen, 0,5 % Tween 80, 0,5 % Span 85 a směs se emulgovala, jak se uvádí shora v textu.

Aby se připravily dávky prostředků s alum (skupiny 9 a 10), AN1792 v PBS se přidaly do Alhydrogelu (gel hydroxidu hlinitého, Accurate, Westbury, NY), aby se dosáhlo koncentrace 33 μ g (v případě nízké dávky, skupina 9) nebo 300 μ g (vysoká dávka, skupina 10) AN1792 v 5 mg alum v konečné dávce o objemu 250 μ l. Suspenze se slabě míchala po dobu 4 hodin při teplotě místnosti.

3. Měření titrů protilátky

Šest až sedm dní po imunizaci se odebraly morčatům vzorky krve. Začalo se po druhé imunizaci a odebraly se celkem čtyři vzorky krve. Titry protilátek proti A β 42 se měřily testem ELISA, jak se popisuje v sekci Obecný materiál a metody.

4. Příprava tkáně

Přibližně po 14 dnech se usmrtila všechna morčata aplikací CO₂. Sebrala se cerebrospinální tekutina a mozky se vyňaly a izolovaly se tři oblasti mozku (hippocampus, kůra mozková a mozeček) a použily se ke stanovení koncentrace celkového proteinu A β za použití testu ELISA.

B. Výsledky

1. Protilátkové odezvy

Existuje široké rozmezí potence různých adjuvans, v případě, že se měří jako protilátková odezva na imunizaci AN1792. Jak je zobrazeno na obrázku č. 14, když se AN1792 aplikuje v PBS, po dvou až třech imunizacích se nedetekovala žádná protilátka ani po čtvrté a páté dávce s geometrickým průměrem títřů (GMT) pouze okolo 45 se nedetekovala žádná odezva. Emulze vyvolala po třetí dávce střední titry (GMT 255), které se udržely i po čtvrté dávce (GMT 301) a snížily se po konečné dávce (GMT 54). V případě AN1792 vázaný na alum v dávce 300 μ g, která je více imunogenní v daném čase než dávka 33 μ g, existuje jasná odezva na antigen v závislosti na dávce. Při maximu protilátkové odezvy po čtvrté imunizaci je rozdíl mezi dvěma dávkami 43 % s hodnotou GMT přibližně 1 940 (v případě dávky 33 μ g) a 3 400 (v případě dávky 300 μ g). Protilátková odezva v případě dávky 33 μ g AN1792 plus MPL je velmi podobná protilátkové odezvě vytvořené na skoro desetkrát vyšší dávku antigenu (300 μ g) vázaného na alum. Přidání MPL k emulzi snižující potenciál prostředků ve srovnání s potenciálem MPL jako adjuvans je 75 %. Palmitoylovaný derivát AN1792 je zcela neimunogenní, když se aplikoval v PBS a poskytl slabé titry přítomné v emulzi s hodnotou GMT 340 a 105 v případě třetího a čtvrtého odběru krve. Nejvyšší titry protilátek se vytvořily s Freundovým adjuvans s maximální hodnotou GMT okolo 87 000, hodnota je skoro 30-ti násobně vyšší než hodnota GMT dalších dvou nejsilnějších prostředků, což je MPL a vysoká dávka AN1792/alum.

Nejslibnější adjuvans identifikované v této studii jsou MPL a alum. Z těchto dvou se více preferuje MPL, protože je nutná desetkrát nižší dávka, aby vznikla stejná protilátková odezva, jako se získala za použití alum. Odezva se může zvýšit zvýšením dávky antigenu a/nebo adjuvans a optimalizací imunizačního rozvrhu. V případě AN1792 je emulze velmi slabé adjuvans a přidání emulze k adjuvans MPL se snižuje intrinsická aktivita samotného MPL.

2. Množství A β v mozku

Čtrnáctidenní morčata se uspala, odebrala se cerebrospinální tekutina (CSF) a také se odebraly mozky zvířat ze skupiny, která se imunizovala Freundovým adjuvans (skupina 2), MPL (skupina 5), alum s vysokou dávkou (300 μ g) AN1792 (skupina 10) a z kontrolní skupiny imunizované PBS (skupina 3). Aby se stanovilo množství peptidu A β , izolovala se jedna hemisféra a připravily se homogenáty hippocampální, kortikální a cereberální oblasti v 5 M guanidinu. Homogenáty se naředily a kvantifikovaly porovnáním série ředění standardního proteinu A β se známou koncentrací v testu ELISA. Množství proteinu A β v hippocampusu, v kortexu a v mozečku bylo velmi podobné ve všech čtyřech skupinách navzdory širokému rozmezí protilátkové odezvy vůči A β vyvolané těmito prostředky. Průměrné množství A β přibližně 25 ng/g tkáně se měřilo v hippocampusu, 21 ng/g v kůře mozkové a 12 ng/g v mozečku. Přítomnost vysokého titru cirkulujících protilátek vůči A β po dobu tří měsíců u některých těchto zvířat nezměnila celkové množství A β v jejich mozku. Množství A β v CSF bylo také v jednotlivých skupinách docela podobné. Nedostatečně velký účinek imunizace AN1792 na androgenní A β indikuje, že imunitní odezva se zaměřuje na patologické formace A β .

Příklad 8: Imunitní odezva na různá adjuvans u myši

5 Pro studii se použily samice myši Swiss Webster ve věku šesti týdnů, přičemž jedna skupina obsahuje 10 až 13 zvířat. Imunizace se aplikovala v den 0, 14, 28, 60, 90 a 20 subkutánně a objem dávky je 200 μ l. PBS se použil jako pufr pro všechny aplikace. Sedm dní po každé imunizaci se zvířatům odebrala krev, přičemž po druhé dávce se začalo s analýzou titrů protilátek testem ELISA. Léčebný režim každé skupiny se shrnul v tabulce č. 7.

10 Tabulka č. 7: Návrh experimentu

skupina	N ^a	adjuvans ^b	dávka	antigen	dávka (μ g)
1	10	MPL	12,5 μ g	AN1792	33
2	10	MPL	25 μ g	AN1792	33
3	10	MPL	50 μ g	AN1792	33
4	13	MPL	125 μ g	AN1792	33
5	13	MPL	50 μ g	AN1792	150
6	13	MPL	50 μ g	AN1528	33
7	10	PBS		AN1792	33
8	10	PBS		žádný	33
9	10	emulgov. skvalen	5 %	AN1792	33
10	10	míchaný skvalen	5 %	AN1792	33
11	10	alum	2 mg	AN1792	33
12	13	MPL + alum	50 μ g/2 mg	AN1792	33
13	10	QS-21	5 μ g	AN1792	33
14	10	QS-21	10 μ g	AN1792	33
15	10	QS-21	25 AN1792	AN1792	33
16	13	QS-21	25 AN1792	AN1792	150
17	13	QS-21	25 AN1792	AN1528	33
18	13	QS-21 + MPL	25 μ g/50 μ g	AN1792	33
19	13	QS-21 + alum	25 μ g/2 mg	AN1792	33

Poznámka:

^a Počet myši v každé skupině na začátku experimentu

^b Uvedená adjuvans. Pufr v případě všech těchto formulací je PBS. V případě skupiny 8 se neaplikovalo adjuvans ani antigen.

Titry protilátek získané v testu ELISA proti A β 42 v každé skupině jsou zobrazeny v tabulce č. 8 dále v textu.

Tabulka č. 8: Geometrické průměry titrů protilátek

léčba skupina	týden odběru krve				
	2.9	5.0	8.7	12.9	16.7
1	248	1797	2577	6180	4177
2	598	3114	3984	5287	6878
3	1372	5000	7159	12333	12781
4	1278	20791	14368	20097	25631
5	3288	26242	13229	9315	23742
6	61	2536	2301	1442	4504
7	37	395	484	972	2149
8	25	25	25	25	25
9	25	183	744	952	1823
10	25	89	311	513	817
11	29	708	2618	2165	3666
12	198	1458	1079	612	797
13	38	433	566	1080	626
14	104	541	3247	1609	838
15	212	2630	2472	1224	1496
16	183	2616	6680	2085	1631
17	28	201	375	222	1540
18	31699	15544	23095	6412	9059
19	63	243	554	299	441

Tabulka ukazuje, že nejvyšší titry se získaly ve skupině 4, 5 a 18, ve kterých se jako adjuvans použilo 125 μ g MPL, 50 μ g MPL a QS-21-MPL.

Příklad 9: Terapeutická účinnost různých adjuvans

Studium terapeutické účinnosti se provedlo na transgenních myších PDAPP se sadou adjuvans vhodných pro použití u lidí, aby se stanovila jejich schopnost vyvolat imunitní odezvy na A β a vyvolat odstranění amyloidních depozitů v mozku zprostředkované imunitním systémem.

180 samic a samců heterozygotních transgenních myší PDAPP myší ve věku 7,5 až 8,5 měsíců se získalo z instituce Charles River Laboratories. Myši se rozdělily do devíti skupin, které obsahují 15 až 23 zvířat v jedné skupině, aby se imunizovaly s AN1792 nebo AN1528 v kombinaci s různými adjuvans. Zvířata se rozdělila tak, aby zvířata ve skupině sobě co možná nejvíce odpovídala věkem, pohlavím a původem. Adjuvans zahrnují alum, MPL a QS-21, každý je kombinovaný s oběma antigeny a Freundovo adjuvans (FA) se kombinovalo pouze s AN1792. Další sku-

pina se imunizovala s AN1792 vytvořeným v pufru PBS plus thimerosal, které sloužilo jako konzervační činidlo, a neaplikovalo se adjuvans. Devět skupin se imunizovalo samotným PBS a sloužilo jako negativní kontrola.

- 5 Příprava agregovaných peptidů A β : peptidy lidský A β 1–40 (AN1528, California Peptides Inc., Napa, CA, Lot ME0541) a lidský A β 1–42 (AN1792, California Peptides Inc., Lot ME0439) se čerstvě rozpustily za účelem přípravy každé sady injekcí z lyofilizovaných prášků, které se uchovávaly s desikačním činidlem při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pro tento účel se do 0,9 ml deionizované vody přidaly dva miligramy peptidu a směs se míchala vortexem, přičemž vznikl relativně jednotný
10 roztok nebo suspenze. AN1528 byl v tomto kroku rozpuštěný na rozdíl od AN1792. Pak se přidal alikvot o objemu 100 μl 10 krát koncentrovaného PBS (1x PBS: 0,15 M NaCl, 0,01 M fosforečnan sodný, pH 7,5) a ve stejný okamžik začal AN1528 precipitovat. Suspenze se opět zamíchaly vortexem a inkubovaly se přes noc při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a použily se následující den.
- 15 Aby se připravily dávky formulací s alum (skupina 1 a 5), peptid A β v PBS se přidaly jako alhydrogel (dvou procentní gel hydroxidu hlinitého, Sargeant, Inc., Clifton, NJ), aby se dosáhlo koncentrací 100 μg peptidu A β na 1 mg alum. Ke konečnému objemu dávky se přidal 10 x koncentrovaný PBS a konečný objem dávky byl 200 μl v 1x koncentrovaném PBS. Před injekcí se pak suspenze jemně míchala přibližně po dobu 4 hodiny při teplotě místnosti.
- 20 Aby se připravily dávky prostředku v případě MPL (skupina 2 a 6), lyofilizovaný prášek (Ribi ImmunoChem Research, Inc., Halmiton, MT, Lot 67039–E0896B) se přidal k 0,2% vodnému roztoku triethylaminu, aby konečná koncentrace byla 1 mg/ml a zamíchala se na vortexu. Směs se zahřála na teplotu $65\text{ až }70\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 30 vteřin, aby vznikla slabě opalescentní jednotná suspenze micel. Roztok se uchovával při teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. V případě každé sady injekcí se bezprostředně před použitím smíchalo v borokfemičité zkumavce pro jednu dávku 100 μg peptidu v 50 μl
25 PBS, 50 μg MPL (50 μl) a 100 μl PBS.
- Aby se připravily dávky prostředků s QS–21 (skupina 3 a 7) lyofilizovaný prášek (Aquila, Framingham, MA, Lot A7018R) se přidal do PBS, pH6,6 až 6,7, aby konečná koncentrace byla 1 mg/ml a vše se míchalo na vortexu. Roztok se uchovával při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. V případě každé sady injekcí se pro jednu dávku bezprostředně před použitím smíchalo 100 μg peptidu v 50 μl
30 PBS, 25 μg QS–21 v 25 μl PBS a 125 μl PBS.
- 35 Aby se připravily dávky prostředků s Freundovým adjuvans (skupina 4), 100 μg AN1792 ve 200 μl PBS se emulgovalo v objemu 1:1 (objem:objem) s úplným Freundovým adjuvans (CFA) v konečném objemu 400 μl v případě první imunizace. V případě následných imunizací se antigen podobně emulgoval s neúplným Freundovým adjuvans (IFA). V případě prostředků, které obsahují adjuvans alum, MPL nebo QS–21, 100 μg AN1792 nebo AN1528 v jedné dávce se
40 kombinovalo s alum (1 mg v jedné dávce) nebo MPL (50 μg v jedné dávce) nebo QS–21 (25 μg v jedné dávce) v konečném objemu 200 μl PBS a tyto dávky se zavedly subkutánní inokulací v oblasti zad mezi lopatky. V případě skupiny, které se aplikovalo FA, a v případě první imunizace se 100 μg AN1792 emulgovalo v objemu 1:1 (objem:objem) s úplným Freundovým adjuvans (CFA), aby konečný objem byl 400 μl a injekce se zavedla intraperitoneálně. Následujících pět zesilovacích dávek obsahuje stejné množství imunogenu v neúplném Freundově adjuvans (IFA). V případě skupiny, které se aplikuje AN1792 bez adjuvans, se 10 μg AN1792
45 kombinovalo s 5 μg thimerosalu v konečném objemu 50 μl PBS a zavedlo se subkutánně. Deváté kontrolní skupině se subkutánně aplikovalo pouze 200 μl PBS. Imunizace se provedla ve dvoutýdenních intervalech v případě prvních tří dávek, pak jednou měsíčně v den 0, 16, 28, 56, 85 a
50 112. Šestý a sedmý den po každé imunizaci se zvířatům odebraly vzorky krve, aby se mohly stanovit titry protilátek. S odběry se začalo po druhé dávce. Zvířata se usmrtila přibližně jeden týden po konečné dávce. Množství peptidu A β a APP v mozku se měřilo testem ELIAS a imunohisto-

chemickým hodnocením přítomnosti amyloidních plaků v sekcích mozku. Navíc titry protilátek specifické pro A β a také se stanovily proliferativní a cytokinové odezvy závislé na A β .

5 Tabulka č. 9 ukazuje, že nejvyšší titry protilátek proti A β 1–42 vyvolaly FA a AN1792, titry, které tvoří piky po čtvrté imunizaci (pík GMT: 75 386) a po konečné šesté imunizaci hodnota klesají na 59 %. Maximální průměrná hodnota titru vyvolaná MPL pomocí AN1792 byla o 62 % nižší než se vytvořila pomocí FA (maximální hodnota GMT je 28 867) a také se dosáhla na začátku imunizačního schématu po třech dávkách. Po šesté imunizaci následuje snížení maximálních
10 hodnot o 28 %. Maximální průměrná hodnota titru vytvořená QS-21 kombinovaná s AN1792 (GMT je 1 511) byla přibližně 5 krát nižší než se získala s MPL. Navíc kinetiky odezvy byly pomalejší, protože byla nutná další imunizace, aby se dosáhlo maximální odezvy. Titry vytvořené alum vázaných na AN1792 byly výrazně vyšší než titry, které se získaly pomocí QS-21 a kinetické odezvy byly rychlejší. V případě AN1792 zavedených v PBS s thimerosalem, frekvence a velikost titrů byla značně vyšší než titry v případě samotného PBS. Maximální titry vytvořené
15 s MPL a AN1528 (maximální GMT 3099) byly přibližně 9 krát nižší než titry vytvořené AN1792. Alum vázaný na AN1528 byl velmi málo imunogenní s nízkými titry vytvořenými pouze u některých zvířat. Maximální titry vytvořené s MPL a AN1528 (maximální hodnota GMT je 3099) byly přibližně 9 krát nižší než titry vytvořené AN1792. Alum vázaný na AN1528 byl velmi málo imunogenní a pouze u některých zvířat došlo k vytvoření nízkého titru. Žádné protilátkové
20 odezvy nebyly pozorovány u kontrolních zvířat imunizovaných samotným PBS.

Tabulka č. 9: Geometrický průměr hodnot titrů protilátek^a

týden odběru krve					
Léčba	3,3	5,0	9,0	13,0	17,0
Alum/	102	1,081	2,366	1,083	572
AN1792	(12/21) ^b	(17/20)	(21/21)	(19/21)	(18/21)
MPL/	6241	28,867	1,1242	5,665	8,204
AN1792	(21/21)	(21/21)	(21/21)	(20/20)	(20/20)
QS-21/	30	227	327	1,511	1,188
AN1792	(1/20)	(10/19)	(10/19)	(17/18)	(14/18)
CFA/	10,076	61,279	75,386	41,628	30,574
AN1792	(15/15)	(15/15)	(15/15)	(15/15)	(15/15)
Alum/	25	33	39	37	31
AN1528	(0/21)	(1/21)	(3/20)	(1/20)	(2/20)
MPL/	184	2,591	1,653	1,156	3,099
AN1528	(15/21)	(20/21)	(21/21)	(20/20)	(20/20)
QS-21/	29	221	51	820	2,994
AN1528	(1/22)	(13/22)	(4/22)	(20/22)	(21/22)
PBS plus	25	33	39	37	47
Thimerosal	(0/16)	(2/16)	(4/16)	(3/16)	(4/16)
PBS	25	25	25	25	25
	(0/16)	(0/16)	(0/15)	(0/12)	(0/16)

Poznámka:

^aGeometrický průměr titrů protilátek měřený proti A β 1–42

^bPočet zvířat ve skupině, kteří vykazují odezvu.

Výsledky léčby AN1792 nebo AN1528 s různými adjuvans nebo s thimerosalem u kortikálního amyloidního uzle u dvanácti měsíců starých myši se stanovené testem ELISA se zobrazily na obrázku č. 15. U kontrolních myši PDAPP ve věku 12 měsíců imunizovaných PBS se průměrná hodnota celkového A β v kortexu byla 1 817 ng/g. Znatelně redukované množství A β se pozorovalo u myši ošetřených AN1792 plus CFA/IFA, AN1792 plus alum, AN1792 plus MPL a QS-21 plus AN1792. S A β snížení dosáhlo statistické významnosti (p je menší než 0,05) pouze v případě AN1792 plus CFA/IFA. Jak je zobrazeno v příkladu I a II, účinky imunizace redukujícího množství A β je v podstatě vyšší u myši 15 a 18 měsíců starých. Očekává se, že kompozice AN1792 plus alum, AN17 A β 92 plus MPL a AN1792 plus QS-21 dosáhnou statistické význam-

ností při léčbě starších myší. Naopak AN1792 plus konzervační činidlo thimerosal vykazují průměrné množství peptidu A β stejné jako se vyskytuje u myší ošetřených PBS. Podobné výsledky se získaly, když se porovnávalo kortikální množství A β 42. Průměrné množství A β 42 u kontrolních zvířat imunizovaných PBS byla 1 624 ng/g. U myší ošetřených AN1792 plus CFA/IFA, AN1792 plus alum, AN1792 plus MPL a AN1792 plus QS-21 se pozorovala snížená průměrná hodnota množství 403, 1149, 620 a 714. Průměrné množství u myší ošetřených AN1792 a thimeroselem bylo 1 619 ng/g A β 42.

Další studie účinnosti terapie s adjuvans/immunogen se provedla u samic a samců heterozygotních transgenních myší PDAPP ve věku 9 až 10,5 měsíce. Trvání studie bylo 25 týdnů a provedla se s 29 až 40 zvířaty v jedné léčebné skupině. Zvířata nakonec dosáhla věku 15 až 16,5 měsíce. Léčené skupiny se identifikovaly v tabulce 10 dále v textu.

	adjuvans	imunogen	ředící pufr	aplikace
skupina 1	MPL-SE	AN1792-GCS (75 μ g)	PBS	SC (250 μ l)
skupina 2	ISA 51	AN1792-GCS (75 μ g)	PBS	IP (400 μ l)
skupina 3	QS21	AN1792-GCS (75 μ g)	PBS	SC (250 μ l)
skupina 4	QS21 zkrácený	AN1792-GCS (75 μ g)	PBS	SC (250 μ l)
skupina 5	PBS			SC (250 μ l)

Tabulka č. 10 zkratky: MAP – multiantigenní peptid, TT – epitop T-buňky toxoidu tetanu (830 až 840), SQ' – subkutánní, IP – intraperitoneální, PBS – fyziologický roztok pufovaný fosforečnanem, ISA-51 je běžně dostupné adjuvans podobné IFA, GCS je formulace glycin/citrát/sacharóza, MPL-SE je MPL ve stabilizované emulzi voda olej.

Rozvrh imunizace byl identický pro všechny léčebné skupiny s výjimkou skupiny 3. Myším se zavedla injekce v týdnu 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 a vzorky krve se odebraly v týdnu 3, 5, 9, 13, 17, 21 a 25. Skupinám 1,2 se aplikovalo osm injekcí a skupině 3 se aplikovaly 4 injekce během období 25 týdnů. Skupině 4 vykazující zkrácený rozvrh imunizace QS21/AN1792 se aplikovala injekce pouze v týdnu 0, 2, 4 a 8. Této skupině se neaplikovala injekce po zbytek studie, ačkoli se vzorky krve odebíraly podle stejného plánu jako ve zbytku studie, aby se sledoval pokles titrů. Skupina 3 a 5 charakterizovaná jako QS21/AN1792 a PBS slouží jako pozitivní a negativní kontroly této studie.

Titry se stanovily testem pro stanovení titru proti protilátkám A β .

Skupina 1 je skupina charakterizovaná jako MPL-SE/AN1792 s maximální hodnotou geometrického průměru titrů (GMT) 17 100 v devátém týdnu, která se snížila na hodnotu GMT 10 000 v 25. týdnu. Na počátku titry MPL-SE rostly vyšší rychlostí než u kontrolní skupiny charakterizované QS21/AN1792 (skupina 4).

Skupina 2 je skupina charakterizovaná jako ISA 51/AN1792, která během studie produkuje vysoké titry, kdy hodnota GMT je nad 100 000 po dobu alespoň posledních devíti týdnů studie.

Skupina 3 je charakterizovaná jako kontrolní skupina QS21/ANI792, která dosáhla maximálního titru v 17 týdnech s maximální hodnotou GMT 16 000. Titr pak v dalších 8 týdnech poklesl na hodnotu GMT 8 700. U jednoho zvířete v této skupině se titer vůbec nezvýšil v průběhu celého experimentu.

Skupina 4 charakterizovaná jako QS21/ANI792 se zkráceným programem imunizace dosáhla maximální hodnoty titru 7 300 ve 13. týdnu, což je pět týdnů po poslední injekci. Hodnota titru se pak snížila na hodnotu GMT 2 100 (25-týden). V kontrolní skupině se u jednoho zvířete nevytvořil detekovatelný titer protilátek, zatímco jiné zvíře ztratilo všechny titry na konci období poklesu periody.

Skupina 5 je skupina imunizovaná samotným PBS a nevykazovala žádné titry protilátek.

Aby bylo možné hodnotit množství kortikálního A β , měřilo se celkové množství A β a A β 1–42 testem ELISA. Vyňala se jedna mozková hemisféra za účelem získání kortikální, hippocampální a cereberální tkáně, pak následovala homogenizace v pufru guanidinu a v mozku se testovalo množství A β . Množství kortikálního celkového A β a A β 42 je podobné. Za účelem stanovení významnosti mezi skupinami s hodnotou $p=0,05$ indikující podstatnou změnu v množství A β se provedla statistická analýza podle Mann-Whitney.

Všechny léčené skupiny podstatně snížily celkové množství A β ve srovnání s kontrolní skupinou PBS (tabulka č. 11). Skupina MPL–SE/ANI792 ukázala největší změnu v množství A β a je podstatně lepší než v jiných léčených skupinách. Skupina se zkrácenou imunizací QS21/ANI792 byla podobná ve všech změnách A β v kontrolní skupině imunizované QS21, kterým se aplikovalo všech osm injekcí. Množství A β ve skupině ISA 51/ANI792 byly podobně sníženy ve srovnání se skupinou CFA/IFA:MAP (A β _{1–7}).

Tabulka 11: množství kortikálního A β

	PBS	MPL–SE	ISA	QS–21	QS–21 (4)
průměr (ng/g tkáně)	7 335	1 236	3 026	2 389	2 996
rozsah (ng/g tkáně)	550–18 358	70–3 977	23–9 777	210–11 167	24–16 834
hodnota p	–	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
N	38	29	36	34	40

Závěrem, adjuvans MPL–SE, ISA–51 a QS21 kombinovaná s AN1792 jsou účinná při vyvolání imunitní odezvy a podstatně oddalují ukládání A β v kortexu.

Příklad 10: Analýza toxicity

Shromáždily se tkáně za účelem histopatologického testu při ukončení studií popsaných v příkladech 2, 3 a 7. Navíc testy hematologie a klinické chemie se provedly v konečných vzorcích krve z příkladu 3 a 7. Hodnotila se většina hlavních orgánů, které zahrnují mozek, plíce, lymfatické

žlázy, gastrointestinální trakt, játra, ledviny, nadledvinky a pohlavní žlázy. Ačkoli se při studiu zvířat pozorovaly sporadické léze, neexistovaly zřejmé rozdíly ani v tkáni ani ve vážnosti lézí u zvířat ošetřených AN1792 a u zvířat, která nebyla ošetřena. U zvířat imunizovaných AN1528 se nezjistily žádné histopatologické léze ve srovnání se zvířaty ošetřenými PBS a neléčenými. Mezi skupinami, kterým se aplikovalo adjuvans a zvířaty ošetřenými PBS popsanými v příkladu 7 neexistují žádné rozdíly v profilu klinické chemie. Ačkoli existuje podstatné zvýšení několika hematologických parametrů u zvířat ošetřených AN1792 a Freundovým adjuvans, jak se popisuje v příkladu 7, ve srovnání se zvířaty ošetřenými PBS, tyto typy účinků se očekávaly od léčby Freundovým adjuvans a dále se u léčby AN1792 nezaznamenaly žádné jiné nežádoucí účinky. Ačkoli toto vyšetření nespadá do toxikologického hodnocení, patologie mozku myši PDAPP se testovaly jako část konečné účinnosti. V žádné jiné studii se nezaznamenal žádný nežádoucí účinek spojený s morfologií mozku. Tyto výsledky indikují, že léčba AN1792 je dobře tolerována a je v podstatě bez vedlejších účinků.

15

Příklad 11: Léčba protilátkami proti A β

Tyto příklady testují kapacitu různých monoklonálních a polyklonálních protilátek proti A β inhibovat akumulaci A β v mozku heterozygotních transgenních myší.

20

I. Návrh studie

Šedesát sameců a samic heterozygotních transgenních myší PDAPP ve věku 8,5 až 10,5 měsíců se získalo v instituci Charles River Laboratory. Myši se rozdělily do šesti skupin, aby se ošetřily protilátkami určenými proti A β . Zvířata se rozdělila do skupin tak, aby co nejvíce odpovídala pohlavím, věkem, původem a zdrojem. Jak je uvedeno v tabulce č. 10 protilátky zahrnovaly čtyři myši monoklonální protilátky specifické pro A β , 2H3 (určené proti zbytkům 1 až 12 A β), 10D5 (určené proti zbytkům 1 až 16 A β), 266 (určené proti zbytkům 13–28 A β a váží se na monomérní, ale ne agregovaný AN1792), 21F12 (určený proti zbytkům 33–42 A β). Pátá skupina se ošetřila frakcí polyklonálních protilátek specifických pro A β (které vznikly imunizací s agregovaným AN1792). Negativní kontrolní skupině se aplikovalo ředidlo, PBS bez protilátek.

Monoklonální protilátky se zavedly injekcí v dávce přibližně 10 mg/kg (předpokládá se, že myši vážily 50 g). Injekce se aplikovaly intraperitoneálně v průměru každých sedm dní, aby se udržovaly titry protilátek proti A β na hodnotě kolem 1 000. Ačkoli v případě monoklonální protilátky 266 se naměřily nižší titry, protože se neváže dobře na agregovaný AN1792, který se použil v testu jako značený antigen, v případě uvedené skupiny se udržoval stejný dávkovací režim. Skupině se v prvních třech týdnech přestala aplikovat monoklonální protilátka 2H3, protože se in vivo protilátka velmi rychle odstranila. Před každou dávkou určenou pro měření protilátek se zvířatům odebral vzorek krve. Léčba pokračovala po dobu šesti měsíců, celkem po dobu 196 dní. Zvířata se usmrtila jeden týden po konečné dávce.

40

Tabulka č. 12: návrh experimentu

léčená skupina	N ^a	použitá protilátka	specifita protilátek	isotyp protilátky
1	9	žádné (samotné PBS)	NA ^b	NA
2	10	polyklonální	Aβ1-42	smíšený
3	0	mAb ^c 2H3	Aβ1-12	IgG1
4	8	mAb 10D5	Aβ1-16	IgG1
5	6	mAb 266	Aβ13-28	IgG1
6	8	mAb 21F12	Aβ33-42	IgG2a

Poznámka:

- 5 a. Počet myši ve skupině na konci experimentu. Všechny skupiny na začátku experimentu zahrnovaly 10 zvířat.
- b. Zkratka NA znamená, že se protilátka neaplikovala.
- c. Zkratka mAb znamená monoklonální protilátka.

10 2. Materiál a metody

a. Příprava protilátek

15 Z krve ze dvou skupin zvířat se připravily polyklonální protilátky proti Aβ. První skupina zahrnuje 100 samic myši Swiss Webster, které jsou 6 až 8 týdnů staré. Imunizovaly se v den 0, 15 a 29 se 100 µg AN1792 kombinovaným s CFA/IFA. Čtyři injekce se aplikovaly v den 36 s poloviční dávkou AN1792. Zvířata se nechala vykrváčet v den 42, připravilo se sérum a séra se smíchala a získal se celkový objem 64 ml. Druhá skupina obsahovala 24 samic myši izogenních s myšíma PDAPP, které nejsou v případě lidského genu APP transgenní a jsou ve věku 6 až 9

20 týdnů. Myši se imunizovaly v den 0, 14, 28 a 56 100 µg AN1792 kombinovaným s CFA/IFA. Tyto zvířata se nechala také vykrváčet v den 63, připravily se séra a spojila se, přičemž celkový objem je 14 ml. Dvě sady sér se spojily. Protilátková frakce se čistila ve dvou krocích srážení s 50% saturovaným siranem amonným. Konečná sráženina se dialyzovala proti PBS a testovala se přítomností endotoxinu. Množství endotoxinu bylo nižší než 1 EU/mg.

25 Monoklonální protilátky proti Aβ se připravily z tekutiny ascitů. Z tekutiny se nejdříve odstranily lipidy tak, že se k ledem chlazené tekutině přidal koncentrovaný dextransulfát sodný, vše se promíchalo na ledu, až se dosáhlo konečné koncentrace 0,238 %. Pak se přidal za stálého míchání koncentrovaný CaCl₂ až se dosáhlo konečné koncentrace 64 mM. Tento roztok se centrifugoval při 10 000 x g a odstranil se pelet. Supernatant se míchal na ledu se stejným objemem saturovaného siranu amonného přidávaného po kapkách. Roztok se opět centrifugoval při 10 000 x g a odstranil se supernatant. Pelet se resuspendoval a dialyzoval se proti 20 mM Tris-HCl, 0,4 M NaCl, pH 7,5. Tato frakce se aplikovala na kolonu FPLC Sepharose Q od firmy Pharmacia a eluovala se reverzním gradientem 0,4 M až 0,275 M NaCl v 20 mM Tris-HCl, pH 7,5.

35 Maximum protilátek se identifikoval absorbcí při vlnové délce 280 nm a vhodné frakce se slily. Přípravek čištěných protilátek se charakterizoval měřením koncentrace proteinu za použití metody BCA a stanovením čistoty za použití SDS-PAGE. U protilátek se také testovala přítomnost endotoxinu. Množství endotoxinu bylo nižší než 1 EU/mg. Títry s hodnotou nižší než 100

40 byly označeny jako titer s hodnotou 25.

3. Množství A β a APP v mozku

Po přibližně šesti měsících léčby různými přípravky protilátek proti A β se izoloval mozek ze zvířat po perfúzi fyziologickým roztokem. Jedna hemisféra se připravila pro imunohistochemickou analýzu a druhé se použila pro kvantifikaci množství A β a APP. Za účelem měření koncentrací různých forem amyloidního peptidu beta a amyloidního prekurzorového proteinu (APP) se izolovala hemisféra a připravily se homogenáty hippocampální, kortikální a cerebelární oblasti v 5 M guanidínu. Tyto homogenáty se naředily a množství amyloidního peptidu nebo APP se kvantifikovalo porovnáním sérií ředění standardů peptidu A β nebo APP známých koncentrací ve formátu ELISA.

Celkové množství A β a A β 1–42 se stanovilo v homogenátech v kortexu a hippocampusu testem ELISA a množství celkového A β v mozečku je zobrazeno v tabulce č. 11, 12 a 13. Průměrná koncentrace celkového A β v případě kontrolní skupiny inokulované s PBS byla 3,6 násobně vyšší v hippocampusu než v mozkové kůře (průměr je 63 389 ng/g hippocampální tkáně ve srovnání s 17 818 ng/g v případě mozkové kůry). Průměrné množství v mozečku kontrolní skupiny (30,6 ng/g tkáně) bylo víc jak 2 000 krát nižší než v hippocampusu. Tato množství jsou podobná množství, které jsme dříve zmiňovaly v případě heterozygotních transgenních myši PDAPP tohoto věku (Johnson–Wood et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 1550–1555 (1997)).

V případě mozkové kůry jedna léčená skupina vykazovala průměrné množství A β , které se podstatně liší od množství kontrolní skupiny (hodnota P je menší než 0,005), těmto zvířatům se aplikovaly polyklonální protilátky proti A β , jak se uvádí v tabulce č. 13. Průměrné množství A β 1–42 se redukovalo na 65 % ve srovnání s kontrolou pro tuto léčenou skupinu. Průměrné množství A β 1–42 bylo také podstatně sníženo o 55 % ve srovnání s kontrolou v jedné další léčené skupině. Těmto zvířatům se aplikovala dávka s mAb 10D5 (hodnota p je rovna 0,0433).

Tabulka č. 13: mozková kůra

léčebná skupina	N°	střední hodnoty				přemězy			
		celkový Aβ		Aβ42		celkový Aβ		Aβ42	
		hodnota ELISA ^a	% změna	hodnota p ^b	hodnota ELISA ^a	% změna	hodnota p ^b	hodnota ELISA	hodnota ELISA
PBS	9	17 818	NÁ	NÁ	13 803	NÁ	NÁ	16150±7456 ^c	12621±5738
polyklonální protilátky proti Aβ42	10	6 160	-65	0,0055	4 892		0,0071	5912±4492	4454±3347
mAb 1055	8	7 915	-56	0,1019	6 214		0,0433	9695±6929	6943±3051
mAb 266	6	9 144	-49	0,1255	8 481		0,1255	9204±9293	7489±6921
mAb 21F12	8	15 158	-15	0,2898	13 578		0,7003	12481±7082	11005±6324

Poznámka:

- Počet zvířat ve skupině na konci experimentu
- ng/g tkáně
- analýza podle Mann Whitney
- zkratka NÁ znamená neaplikováno
- standardní odchylka

V hippocampusu průměr procentuálního snížení celkového množství A β spojeného s léčbou s monoklonálních protilátek proti A β (50 %, $p=0,0055$) nebylo tak velké, jako hodnota, která se naměřila v kortexu (65 %) (tabulka č. 14). Absolutní hodnota redukce však byla skoro 3 krát vyšší v hippocampusu než v kůře mozkové (31 683 ng/g v hippocampusu versus 11 658 ng/g tkáně v kůře mozkové). Když se měří množství jako více amyloidogenní forma A β , A β 1-42, spíše než jako celkové množství A β snížení dosažené polyklonální protilátkou bylo podstatné ($p=0,0025$). Střední hodnoty ve skupinách ošetřených mAb 10D5 a 266 se redukovaly na 33 a 21 %.

Tabulka č. 14: Hippocampus

řádková skupina	N°	střední hodnoty				poměry			
		celkový Aβ	hodnota ELISA ^a	% změna	hodnota p ^c	celkový Aβ	hodnota ELISA	% změna	hodnota ELISA
BSA	9	63 389	NA	NA	NA	5835133308 ^d	NA	52801114701	
polyklonální protilátky proti Aβ42	10	31 786	0,9055	-50	0,0025	30058±22454	-50	24853±18262	
rab 10DS	8	46 779	0,9675	-26	0,0543	44561±18632	-33	36465±17146	
rab 266	6	48 689	0,0990	-23	0,0990	36419±27304	-23	32919±25372	
rab 21F12	8	51 563	0,7728	-19	0,8099	57327±28327	-12	50309±23927	

Poznámka:

- Počet zvířat ve skupině na konci experimentu
- ng/g tkáně
- nalýza podle Mann Whitney
- zkratka NA znamená neaplikováno
- standardní odchylka

Celkové množství A β se také měřilo v mozečku (tabulka č. 15). Tyto skupiny se imunizovaly polyklonální protilátkou proti A β a protilátkou 266, která vykazuje podstatnou redukci celkového množství A β (43 a 46 %, hodnota p je 0,0033 respektive 0,0184) a dále, že skupina ošetřená protilátkou 10D5 vykazuje podstatnou redukci (29 %, hodnota p=0,0675).

5

Tabulka č.15: mozeček

léčená skupina	N ^a	střední hodnoty			průměry
		hodnota ELISA ^b	hodnota F ^c	% změna	hodnota ELISA
PBS	9	30,64	NA ^d	NA	40,00±131,89 ^e
polyklonální protilátky proti A β 42	10	17,61	0,0033	-43	18,15±4,36
mAb 10D5	8	21,68	0,0675	-29	27,29±19,43
mAb 266	6	18,59	0,0184	-46	19,59±6,59
mAb 21F12	8	29,80	>0,9999	-3	32,08±9,90

10 Poznámka:

a. Počet zvířat ve skupině na konci experimentu

b. ng/g tkáně

c. analýza podle Mann Whitney

d. zkratka NA znamená neaplikováno

15 e. standardní odchylka

Koncentrace APP v mozkové kůře a v mozečcích, které pocházejí z myši ošetřených protilátkou nebo PBS se také stanovila testem ELISA. Využily se dva různé testy APP. První test označený APP- α /FL rozeznává APP- α (α , vylučovaná forma APP, která se štěpila v sekvenci A β) a formy plně délky (FL) APP, zatímco druhý test rozeznává pouze APP- α . Na rozdíl od poklesu množství A β spojené s léčbou u subsady léčených skupin, množství APP se nezměnilo u všech ošetřených zvířat ve srovnání s kontrolními zvířaty. Tyto výsledky indikují, že imunizace s protilátkami proti A β snižují množství A β , aniž se snižuje množství APP.

20

Množství A β v mozkové tkáni, hippocampusu a v mozečku zvířat ošetřených polyklonální protilátkou vytvořenou proti AN1792 se podstatně redukovalo. Menší rozsah monoklonálních protilátek proti aminoterminální oblasti A β 1-42, specificky proti aminokyselinám 1 až 16 a 13 až 28 také vykazuje podstatné léčebné účinky.

25 4. Histochemické analýzy

30

Morfologie A β -imunoreaktivních plaků v podsadách mozků z myši, které jsou zahrnuty ve skupinách ošetřených PBS, polyklonální protilátkou A β 42, 21F12, 266 a 10D5 se kvalitativně porovnávalo s morfologií předchozích studií, ve kterých se používají standardní imunizační postupy s A β 42. Redukce amyloidní usazeniny, morfologie erodovaných plaků a imunoreaktivita A β spojená s buňkou úzce mění účinky způsobené postupem standardní imunizace. Tato pozorování podporují výsledky testů ELISA, kdy se aplikací protilátky A β 42 dosáhlo podstatné redukce jak v množství celkového A β tak A β 42.

35

V podobném kvalitativním hodnocení se ukázalo, že se snížil počet a výskyt amyloidních plaků ve skupině myši imunizovaných 10D5, přičemž existuje důkaz, že imunoreaktivita A β je spojená s buňkou. Vzhledem ke kontrolním léčeným zvířatům frakce polyklonálního Ig proti A β a jedna z monoklonálních protilátek (10D5) redukovala uzle plaků o 93 % respektive o 81 21F12 mají relativně malý účinek na plakové uzle. Mikrofágy mozku po léčbě pabA β_{1-42} vykazují difúzní usazeniny a nepřítomnost řady větších kompaktních plaků ve skupině myši ošetřených pabA β_{1-42} ve srovnání s kontrolními ošetřenými zvířaty.

5. Měření títů protilátek

Podsadě tři náhodně vybraných myši z každé skupiny se před každou intraperitoneální inokulací odebral vzorek krve. Celkem se získalo 30 vzorků krve. Títry protilátek se měřily jako protilátky vázající se na A β_{1-42} za použití sendvičového testu ELISA s plastovými destičkami s velkým množstvím prohlubní potaženými A β_{1-42} , jak se popisuje v sekci Obecné materiály a metody. Průměrné títry pro každý vzorek krve jsou zobrazeny na obrázku č. 16 až 18 v případě polyklonální protilátky a monoklonální protilátky 10D5 a 21F12. Průměrné hodnoty títů v tomto čase jsou přibližně 1 000 v případě polyklonálního protilátkového přípravku a byly slabě nižší než je tato hodnota v případě zvířat ošetřených 10D5 a 21F12.

6. Lymfoproliferativní odezvy

Lymfoproliferace závislá na A β se stanovila za použití buněk sleziny, které se shromáždily osm dní po konečné infúzi protilátek. Čerstvě shromážděné buňky v počtu 10^5 v prohlubni se kultivovaly po dobu 5 dní v přítomnosti A β_{1-40} v koncentraci 5 μ M za účelem stimulace. Jako pozitivní kontrola se další buňky kultivovaly s mitogenem T buňky PHA a jako negativní kontrola se buňky kultivovaly samotné bez přidání peptidu.

Splenyocyty z dospělých myši PDAPP imunizovaných různými protilátkami proti A β se stimulovaly *in vitro* AN1792 a stanovila se proliferativní a cytokinová odezva. Účelem těchto testů je stanovit, zda pasivní imunizace umožnila prezentaci antigenu a tak aktivaci odezvy T buňky specifické pro AN1792. U myši pasivně imunizovaných protilátkami proti A β se neprojevila žádná proliferativní nebo cytokinová odezva specifická pro AN1792.

Příklad 12: Další studie pasivní imunizace

Při druhé studii se opakovala léčba protilátkou 10D5 a testovaly se dvě další protilátky proti A β , a to monoklonální protilátka 3D6 (A β_{1-5}) a 16C11 (A β_{31-42}). Kontrolním skupinám se aplikovalo buď PBS, nebo protilátka TM2a. Myši byly starší ve srovnání s předchozí studií (11,5 až 12 měsíců staré heterozygotní myši), jinak experiment proběhl stejným způsobem. Po šesti měsících léčby plakové uzle redukované protilátkou 10D5 byly větší než 80 % ve srovnání s kontrolami, které se ošetřily PBS nebo protilátkou TM2a (hodnota p je 0,003). Jedna z dalších protilátek proti A β protilátka 3D6 byla stejně účinná, přičemž uzle redukovala z 86 % (hodnota $p=0,003$). Podobná zjištění se získala měřením testem ELISA s A β_{42} . Tyto výsledky demonstrují, že protilátková odezva proti peptidu A β v nepřítomnosti imunity T buňky je dostatečná pro snížení amyloidního depozitu u myši PDAPP, ale že ne všechny protilátky proti A β jsou účinné. Zvláště účinné jsou protilátky proti epitopům, které obsahují aminokyseliny 1 až 5 nebo 3 až 7 A β .

Ukázalo se, že pasivně aplikované protilátky proti A β redukovaly rozsah plaků v myším modelu Alzheimerovy nemoci. Když se udržuje v séru nízká koncentrace protilátek (25 až 70 μ g/ml), protilátky mají přístup k CNS v množství dostatečném pro dekoraci beta-amyloidních plaků. Vstup protilátky do CNS není způsoben abnormálním přestupem bariéry krev-mozek, protože nedošlo ke zvýšení vaskulární permeability, jak změřil Evans Blue u myši PDAPP. Navíc koncentrace protilátky v mozkovém parenchymu dospělých myši PDAPP byl stejný jako

v netransgenních myších, což reprezentuje 0,1 % koncentrací protilátek v séru (s ohledem na isotyp).

5 Příklad 13: Sledování navázání protilátek

Aby se stanovilo, zda protilátky proti A β by mohly působit přímo v CNS, se u mozků získaných z myší perfúzovaných fyziologickým roztokem popsané na konci příkladu XII, testovala přítomnost periferně aplikovaných protilátek. Nefixované kryostatické mozkové sekce se vystavily působení fluorescenčního činidla určenému proti myšimu imunoglobulinu (kozí anti-myší IgG-Cy3). Plaky v mozcích skupiny myší ošetřených protilátkou 10D5 a 3D6 byly silně překryté protilátkou, zatímco ve skupině myší ošetřených protilátkou 16C11 toto zabarvení neexistuje. Aby se ukázal plný rozsah uložení plaků, sériové sekce každého mozku byly nejdříve imunoreaktivní s protilátkou proti A β a pak se sekundárním činidlem. Protilátky 10D5 a 3D6, které vznikly po periferní aplikaci, se vyskytují v nadbytku ve většině plaků v CNS. V těchto léčených skupinách se uzle plaků velmi redukovaly v porovnání se skupinou 16C11. Tato data indikují, že periferně aplikované protilátky mohou vstupovat do CNS, kde může přímo docházet k vymizení amyloidu. Je pravděpodobné, že protilátka 16C11 má také přístup k plakům, ale není schopna se vázat.

20

Příklad 14: Testy ex vivo pro testování aktivity protilátky proti amyloidním depozitům

Aby se testoval účinek protilátek na zničení plaků, zavedl se test ex vivo, ve kterém se primární mikrogliální buňky kultivovaly s nefixovanými kryostatickými sekcemi mozku myší PDAPP nebo lidí trpících AD. Mikrogliální buňky se získaly z cerebrálních kortiků neonatálních myší DBA/2a (1 až 3 dny). Kortiky se mechanicky disociovaly v HBSS (Hanksův rovnovážný roztok soli, Sigma) s 50 μ g/ml DNázy I (Sigma). Disociované buňky se filtrovaly přes filtr, který zachytí buňky o průměru 100 μ m (Falcon) a centrifugovaly se při 1 000 ot./min po dobu 5 minut. Pelet se resuspendoval v růstovém médiu (DMEM s vysokým obsahem glukózy, 10 % FBS, 25 ng/ml rmGM-CSF) a buňky se nanasly s vysokou hustotou do plastové kultivační nádoby T-75. Po 7 až 9 dnech se nádoby nechaly rotovat na míchačce při 200 ot./min. po dobu 2 hodin při teplotě 37 °C. Suspenze buněk se centrifugovala při 1 000 ot./min. a resuspendovala v testovaném médiu.

35

Deseti mikrometrové sekce mozků myší PDAPP nebo člověka trpícího AD (posmrtný čas je menší než 3 hodiny) se nechaly roztát a nanasly se na kruhová skleněná mikroskopická sklička pokrytá polylyzinem a umístily se do prohlubni tkáňových kultivačních destiček s 24 prohlubněmi. Sklička se dvakrát omyla testovacím médiem, který obsahuje H-SFM (médiu, které neobsahuje sérum hybridomů, Gibco BRL) s 1% FBS, glutaminem, penicilinem/streptomycinem a 5 ng/ml rmGM-CSF (R&D). Kontrolní protilátky nebo protilátky proti A β se přidaly ve dvou násobné koncentraci (koněčná koncentrace je 5 μ g/ml) po dobu jedné hodiny. Mikrogliální buňky se pak nanasly v hustotě $0,8 \times 10^6$ buněk/ml testovaného média. Kultivace se prováděla v humidizovaném inkubátoru (37 °C, v atmosféře 5 % CO₂) po dobu 24 hodin nebo více. Na konci inkubace se kultury fixovaly s 4 % paraformaldehydem a jejich prostupnost se zvyšovala 0,1 % Tritonem-X100. Sekce se nechaly reagovat s protilátkou 3D6 značenou biotinem a pak následoval konjugát streptavidinu s Cy3 (Jackson ImmunoResearch). Exogenní mikrogliální buňky se zviditelnily jaderným barvením (DAPI). Kultury se pozorovaly v obráceném fluorescenčním mikroskopu (Nikon, TE300) a fotomikrografy se připravily za použití digitálního fotoaparátu SPOT a softwaru SPOT (Diagnostic Instruments). V případě westernovy analýzy se kultury extrahovaly v 8M močovinné ředěné 1:1 v redukčním tricinovém vzorkovém pufru a nanasly se na 16% tricinový gel (Novex). Po transferu na immobilon se bloty vystavily působení pabA β 42 v koncentraci 5 μ g/ml a pak anti-myším protilátkám konjugovaným s HRP a vyvinuly se s ECL (Amersham).

50

Když se provedl test se sekce mozku myši PDAPP v přítomnosti protilátky 16C11 (jedna z protilátek proti A β nebyla účinná *in vivo*), beta-amyloidní plaky zůstaly neporušeny a nepozorovala se žádná fagocytóza. Naopak když se kultivovaly přilehlé sekce v přítomnosti protilátky 10D5, amyloidní depozity ve velkém rozsahu vymizely a mikrogliaální buňky vykazují řadu fagocytových vesikul, které obsahují A β . Identické výsledky se získaly se sekce mozku člověka trpícího Alzheimerovou nemocí. Protilátka 10D5 vyvolala fagocytózu plaků AD, zatímco protilátka 16C11 nebyla účinná. Navíc test poskytuje porovnatelné výsledky, když se provede buď s myšmi, nebo lidskými mikrogliaálními buňkami a s myšmi, králičími protilátkami nebo s protilátkami primátů proti A β .

Tabulka č. 16 ukazuje, zda došlo k navázání a/nebo fagocytóze v případě vazebných specifit několika různých protilátek. Může být vidět, že protilátky vázající se na epitopy v aminokyselinách 1 až 7 se váží a odstraňují amyloidní depozity, zatímco protilátky vázající se na epitopy v aminokyselinách 4 až 10 odstraňují amyloidní depozity. Protilátky vázající se na zbytek 10 v C-termiálním epitopu se neváží ani neodstraňují amyloidní depozity.

Tabulka č. 16: Analýza epitopové specifity

	protilátka		barvení	fagocytóza
	epitop	isotyp		
N-term. mAb				
3D6	1-5	IgG2b	+	+
10D5	3-6	IgG1	+	+
22CB	3-7	IgG2a	+	+
6E10	5-10	IgG1	+	-
14A8	4-10	kryší IgG1	+	-
13-28				
18G11	10-18	kryší IgG1	-	-
266	16-24	IgG1	-	-
22D12	18-21	IgG2b	-	-

C-term.				
2G3	-40	IgG1	-	-
16C11	-40/-42	IgG1	-	-
21F12	-42	IgG2a	-	-
imunní sérum				
králíči (CFA)	1-6		+	+
myši (CFA)	3-7		+	+
myši (QS- 21)	3-7		+	+
opičí (QS- 21)	3-7		+	+
myši (MAP1- 7)	1-5		+	+

5 Tabulka č. 17 ukazuje výsledky získané s několika protilátkami proti A β , kdy se srovnává jejich schopnost vyvolat fagocytosu v testu *ex vivo* a redukovat plakové uzle *in vivo* ve stádiích pasivního transferu. Ačkoliv protilátka 16C11 a 21F12 se váže na agregovaný syntetický peptid A β s vysokou aviditou, tyto protilátky nereagují s beta-amyloidními plakami v nefixovaných sekcích mozku a nemohou způsobit fagocytózu v testu *ex vivo* a nejsou účinné ani *in vivo*. Protilátka 10D5, 3D6 a polyklonální protilátka proti A β byla aktivní ve všech třech měřeních. Protilátka 22C8 se váže silněji na analogovou formu přirozeného A β , ve kterém kyselina aspartová v polo-

10 ze 1 a 7 je nahrazena kyselinou iso-aspartovou. Tyto výsledky ukazují, že účinnost *in vivo* je způsobena odstraněním plaků způsobeným přímo protilátkou v CNS a test *ex vivo* předpovídá účinnost *in vivo*.

15 Stejný test se použil při testování odstranění protilátky proti fragmentu synucleinu, který se označuje jako NAC. Ukázalo se, že synuclein je protein spojený s amyloidními plakami. Protilátka proti NAC je v kontaktu se vzorkem mozkové tkáně, který obsahuje amyloidní plakami. Jako kontrola se použilo králíčí sérum. Následné monitorování vykazuje značnou redukci počtu a velikosti plaků udávající odstraňující aktivitu protilátky.

Tabulka č. 17: Test *ex vivo* jako prediktor účinnosti *in vivo*

protilátka	isotyp	avidita pro agregovaný A β (pM)	navázání na β -amyloidní plaky	účinnost <i>ex vivo</i>	účinnost <i>in vivo</i>
monoklonální					
3D6	IgG2b	470	+	+	+
10D5	IgG1	43	+	+	+
16C11	IgG1	90	-	-	-
21F11	IgG2a	500	-	-	-
TM2a	IgG1	-	-	-	-
polyklonální					
1-42	směs	600	+	+	+

- 5 Konfokální mikroskopie se použila k potvrzení, že A β se internalizovalo během průběhu testu *ex vivo*. V přítomnosti kontrolních protilátek exogenní mikrogliaální buňky se uchovaly v kofokální ploše nad tkání, kde existovaly nepatogenní vesikuly, které obsahují A β , a plaky v sekci zůstávají neporušené. V přítomnosti protilátky 10D5 skoro všechny materiál byl obsažen ve vesikulech
- 10 v exogenních mikrogliaálních buňkách. Aby se stanovilo, zda internalizovaný peptid byl odstraněn, kultury ošetřené 10D5 se extrahovaly v různé době 8 M močovinou a testovaly se westernovou analýzou. V bodě odpovídajícím jedné hodině, kdy se ještě neobjevila fagocytóza, reakce s polyklonální protilátkou proti A β ukázala silný pruh odpovídající molekulovou hmotností 4 kD (odpovídá peptidu A β). Fagocytóza zprostředkovaná protilátkou vede k její degradaci.
- 15 Aby se stanovilo, zda fagocytóza v testu *ex vivo* byla zprostředkována Fc, připravily se fragmenty F(ab')₂ protilátky 3D6 proti A β . Ačkoli fragmenty F(ab')₂ si ponechaly svou úplnou schopnost reagovat s plaky, nejsou schopny způsobit fagocytózu pomocí mikrogliaálních buněk. Navíc fagocytóza s celou protilátkou by mohla být blokována činidlem proti myším receptorům Fc (anti-CD16/32). Tato data indikují, že odstranění A β *in vivo* je zprostředkované fagocytózou zprostředkovanou receptorem Fc.
- 20

Příklad 15: Průchod protilátek skrz bariéru krev-mozek

- 25 Tento příklad stanovuje koncentraci protilátky zavedené do mozku, pak následuje intravenózní injekce do periferní tkáň normálních myší nebo myší PDAPP. Myší PDAPP nebo normální kontrolní myší se perfúzovaly s 0,9% NaCl. Získaly se oblasti mozku (hippocampus nebo kůra mozková) a rychle se zamrazily. Mozek se homogenizoval v 0,1% tritonu s inhibitory proteázy. Imunoglobulin se detekoval v extraktech testem ELISA. Fa'2 kozí anti-myšší IgG se potáhl na destičku RIA jako značící činidlo. Sérum nebo extrakty mozku se inkubovaly po dobu jedné hodiny. Isotypy se detekovaly s anti-myšší IgG1-HRP nebo IgG2a-HRP nebo IgG2b-HRP (Cal-
- 30 tag). Protilátky bez ohledu na isotyp byly přítomny v CNS v koncentraci, která je 1:1 000, když se zjišťuje v krvi. Když koncentrace IgG1 byla trojnásobek koncentrace IgG2a v krvi, byla také trojnásobek koncentrace IgG2a v mozku, obě protilátky tvoří 0,1 % jejich množství v krvi. Tento
- 35 výsledek se pozoroval u transgenních a netransgenních myší.

Příklad 16: Terapeutická účinnost peptidu A β v konfiguraci MAP

Studie účinnosti terapie adjuvans/imunogen se provedla za použití samic a samečů heterozygotních transgenních myši PDAPP ve věku 9 až 10,5 měsíce, přičemž se testovala účinnost fúzního proteinu, který obsahuje A β 1–7 v tetramérové konfiguraci MAP, jak se popisuje shora v textu. Trvání studie bylo 25 týdnů a do skupiny se zařadilo 29 až 40 zvířat. Zvířata na konci studie byla 15 měsíců stará. Metody používané při této studii jsou stejné jako při terapeutické studii s různými adjuvans v příkladu VIII shora v textu. Léčené skupiny se definují dále v textu v tabulce č. 18.

Tabulka č. 18:

	adjuvans	imunogen	ředící pufr	aplikace
skupina 1	CFA/IFA	MAP(A β 1–7:TT) (100 μ g)	PBS	IP (400 μ l)
skupina 2	QS21	AN1792–GCS (75 μ g)	PBS	SC (250 μ l)
skupina 3	PBS	–	–	SC (250 μ l)

Zkratky uvedené v tabulce: MAP znamená multiantigenní peptid, TT znamená epitop T buňky toxoidu tetanu (830–844), SC znamená subkutánní, IP znamená peritoneální, PBS znamená fyziologický roztok pufovaný fosforečnanem, GCS je formulace glycin/citrát/sacharóza.

Imunizační rozvrh byl pro všechny skupiny stejný. Myšim se zavedla injekce v týdnu 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, přičemž se vzorky krve odebraly v týdnu 3, 5, 9, 13, 17, 21 a 25. Skupinám 1, 2, 3, 4 a 6 se aplikovalo osm injekcí, skupina 2 a 3 QS21/AN1792 a PBS sloužily jako pozitivní a negativní kontroly.

Titry se stanovily testem pro stanovení titru protilátky proti A β .

Skupina 1 je skupina CFA/IFA:MAP(A β 1–7:TT) vyjadřující nízký titr. Maximální hodnota GMT byla pouze 1 200 v týdnu 13 a v týdnu 25 klesla na 600. 3 z 30 myší, nevykazují žádný titr, a dalších sedm myší nepřekročily na konci studie titr 400.

Skupina 2 je kontrolní skupina QS21/AN1792, která dosáhla maximální hodnoty titru v 17. týdnu, přičemž hodnota GMT je 16 000. Titr pak poklesl během dalších 8 týdnů na hodnotu GMT 8 700. Jedno zvíře v této skupině netvoří titr protilátek v průběhu celého experimentu.

Skupina 3 se imunizovala samotným PBS a nevykazuje žádný titr protilátek.

Obě léčené skupiny vykazují podstatné snížení množství kortikálního A β ve srovnání s kontrolní skupinou imunizovanou PBS (tabulka č. 19). Skupina CFA/IFA:MAP (A β 1–7) podstatně snížila množství A β ve srovnání s kontrolní skupinou PBS navzdory relativně nízkých titrů protilátek proti A β .

Tabulka č. 19: Množství kortikálního A β

	FBS	MAP	QS-21
průměr (ng/g tkáně)	7 335	3 692	2 389
rozmezí (ng/g tkáně)	550-18 358	240-10 782	210-11 167
hodnota p	-	0,0903	menší než 0,0001
N	38	30	34

Imunogen A β 1-7 MAP je účinný při vyvolání dostatečné imunitní odezvy s ohledem na ukládání A β v kortexu.

5

Příklad 17: Mapování epitopu imunogenní odezvy na A β u opic

Tento příklad analyzuje odezvu primáta na imunizaci s AN1792 (to je A β 1-42). 11 skupin opic (4/pohlaví/skupina) se imunizovaly AN1792 (dávka obsahuje 75 nebo 300 μ g) v kombinaci s adjuvans QS-21 (dávka obsahuje 50 nebo 100 μ g) nebo 5 % sterilní dextransy ve vodě (D5W, kontrolní skupina). Všem zvířatům se aplikovaly IM injekce podle jednoho ze tří rozvrhů, jak je zobrazeno v tabulce č. 20, přičemž se aplikovalo celkem 4, 5 nebo 8 dávek. 175. den studie se shromáždily vzorky séra (z 4 opic/pohlaví/skupina) a vzorky CSF (z 3 opic/pohlaví/skupina) získané 176. den studie a hodnotila se jejich schopnost vázat se na peptid A β 1-40 a APP.

15

Tabulka č. 20: Zařazení do skupin a obsah dávky

skupina č.	rozvrh ^a	#opic (M/F)	dávka AN1793 (μ g/dávka)	dávka QS-21 (μ g/dávka)	způsob aplikace
1 ^b	1	4/4	0	0	IM
2	1	4/4	prostředek ^c	50	IM
3	1	4/4	prostředek	100	IM
4	1	4/4	75	50	IM
5	1	4/4	300	50	IM
6	1	4/4	75	100	IM
7	1	4/4	300	100	IM
8	2	4/4	75	100	IM
9	2	4/4	300	100	IM
10	3	4/4	75	100	IM
11	3	4/4	300	100	IM

20 a. rozvrh 1: dávka v den 1, 15, 29, 57, 85, 113, 141, 169, rozvrh 2: dávka v den 1, 29, 57, 113, 169, rozvrh 3: dávka v den 1, 43, 85, 169.

b. kontrolní skupině se aplikovala injekcí D5W

c. prostředek obsahuje pufr glycin/citrát/sacharóza, který je excipientem pro AN1792.

Skutečné uspořádání lineárního peptidu rozeznávaného protilátkami ve vzorcích séra ze zvířat
 5 imunizovaných AN1792 se stanovil testem ELISA, který měří navázání těchto protilátek na pře-
 sahující se peptidy, které překrývají celou sekvenci A β 1–42. Peptidy značené biotinem s částeč-
 nou sekvencí AN1792 se získaly z instituce Chiron Technologies, jako peptidy obsahující 10
 aminokyselin s překryvem 9 zbytků (syntéza č. 5366, č. 5331 a č. 5814). Prvních 32 peptidů je na
 10 C-konci značeno biotinem linkerem GGK. Posledních 10 peptidů jsou značeny biotinem na N-
 konci s linkerem, který obsahuje EGEK (SEQ ID NO: 70). Lyofilizované peptidy značené bioti-
 nem se rozpustily v koncentraci 5 mM v DMSO. Tyto zásobní roztoky peptidů se ředily na kon-
 centraci 5 μ M v TTBS (0,05 % Tween 20, 25 mM Tris HCl, 137 mM NaCl, 5,1 mM KCl,
 pH=7,5). Alikvoty o objemu 100 μ l tohoto 5 μ M roztoku se přidaly ve dvou provedeních do des-
 15 tiček s 96 prohlubněmi, které jsou potaženy streptavidinem (Pierce). Destičky se inkubovaly po
 dobu jedné hodiny při teplotě místnosti, pak se promyly čtyřikrát TTBS. Vzorky séra se ředily
 ředidlem bez azidu, aby se normalizovaly titry a do každé prohlubně se přidalo 100 μ l. Tyto des-
 tičky se inkubovaly po dobu jedné hodiny při teplotě místnosti a pak se promyly čtyřikrát TTBS.
 Kozí anti-lidské protilátky konjugované s HRP (Jackson ImmunoResearch) se ředily 1: 10 000
 v ředidle bez azidu a do prohlubně se přidalo 100 μ l. Destičky se opět inkubovaly a promyly.
 20 Aby se vyvinula barevná reakce, do prohlubně se přidalo TMB (Pierce) o objemu 100 μ l a vše se
 inkubovalo po dobu 15 min a pak se přidalo 30 μ l 2M H₂SO₄, tím se zastavila reakce. Optická
 hustota se měřila při vlnové délce 400 nm na kolorimetrickém čtecím zařízení Vmax nebo
 Spectramax.

25 Imunizace s AN1792 vede k produkci protilátek u 100 % zvířat ve všech skupinách, kterým se
 aplikovala dávka v den 175. Průměrné hodnoty titrů ve skupinách jsou v rozmezí 14 596 až
 56 084. Objevuje se trend, že titry jsou vyšší, když se imunizuje s vyšší koncentrací antigenu
 a/nebo adjuvans, ale nedemonstrovaly se statisticky podstatné rozdíly, které jsou způsobené vari-
 abilitou odezvou u jednotlivých zvířat na imunizaci.

30 Séra, která jsou pozitivní na protilátky vůči AN1792 jsou také pozitivní v případě protilátek vůči
 A β 1–40. Průměrné titry ve skupině jsou v rozmezí 36 867 až 165 991 a jako v případě titrů proti
 antigenu AN1792 nevykazují statisticky podstatné rozdíly mezi skupinami v den 175. Navázání
 na AN1792 vykazuje vysoce pozitivní korelaci s navázáním na A β 1–40 (Spearman $r = 0,8671$).

35 Za 48 imunizovaných opic podle různého rozvrhu AN1792 se získalo 33 vzorků CSF s adekvát-
 ním objemem a kvalitou. 32 (97 %) z nich těchto opic vykazují pozitivní titry vůči AN1792.
 Hodnoty titrů jsou v rozmezí 2 až 246 se střední hodnotou 49,44 \pm 21,34. Množství protilátek proti
 AN1792 v CSF je 0,18 \pm 0,11 % hodnoty, která se naměřila v séru a vykazuje vysoce pozitivní
 40 korelaci (Spearman $r=0,7840$) s titry v séru. Žádné rozdíly v procentu protilátky nebylo možné
 vidět ve skupinách nebo mezi pohlavím v CSF. Množství protilátky v CSF je konzistentní
 s pasivním transferem periferně vytvořené protilátky přes bariéru krev–mozek do centrálního
 nervového systému.

45 Testování sady vzorků CSF pozitivních na protilátku proti AN1792 demonstrovalo, že jako proti-
 látka ve vzorcích séra tak protilátka v CSF zkříženě reaguje s A β 1–40. Titry protilátek proti
 A β 1–40 ukázaly vysokou korelaci (Spearman $r=0,9634$) s titry protilátky proti AN1792. Testování
 sady vzorků CSF s nejvyššími titry protilátky vůči AN1792 nevykazují žádné navázání na APP,
 jako v případě sérových protilátek.

50 Když se sérum ze dne 175 testovalo proti sériím překrývajících se desetiměrných peptidů, proti-
 látka ze všech opic vázaných na peptid, jejichž sekvence pokrývá aminokyseliny 1 až 10 peptidu
 AN1792 (aminokyseliny peptidu APP 653 až 672). U některých zvířat to byl pouze jediný peptid,
 u něhož se dalo měřit navázání (zobrazeno na obrázku č. 19).

U jiných zvířat se mohou měřit jiná reaktivita, ale ve všech případech převládá reaktivita s N-terminální peptidovou sekvencí. Další reaktivity spadají do dvou skupin. První a nejběžnější skupinou je navázání peptidů kolem N-konce 1–10 peptidu AN1792 (obrázek č. 20). Navázání tohoto typu bylo řízeno na peptid překrývající aminokyseliny 1 až 8, 1 až 9 a 2 až 11 peptidu AN1792. Tyto reaktivity kombinované s reaktivitou s peptidem 1 až 10 reprezentují naprostou většinu reaktivity u všech zvířat. Mapování epitopu jednotlivých zvířat v čase indikuje, že reaktivita protilátek s peptidem 1 až 10 postupuje k přilehlým peptidům. To demonstruje silnou aktivaci imunitní odezvy vůči N-konci peptidu AN1792 s jeho volným terminálním zbytkem kyseliny aspartové. Druhá minoritní detekovatelná aktivita u některých zvířat je navázání peptidů lokalizovaných aminokyseliny 7 až 16, 11 až 20 a 16 až 25 peptidu AN1792. Tyto reaktivity je možné spatřit u pouze 10 až 30 % opic.

Variabilita odezvy mezi různými zvířaty (například zda aminokyseliny 1 až 10 jsou exkluzivním nebo převládajícím reaktivním epitopem) nekoreluje a dávkou antigen/adjuvans, s rozvrhem aplikace dávky nebo s titrem protilátky a je pravděpodobně odrazem genetického uspořádání u každého jednotlivého zvířete.

Příklad 18: Prevence a léčba člověka

Aby se stanovila bezpečnost aplikace pro člověka, provedla se fáze I studie, která zahrnuje aplikaci jediné dávky. Terapeutické činidlo se aplikovalo ve vzrůstajících dávkách různým pacientům, přičemž se začalo přibližně u 0,01 množství předpokládané účinnosti a zvyšování dávky probíhalo s faktorem 3, až se množství přiblížilo desetinásobku účinné myší dávky.

Aby se stanovila terapeutická účinnost, provedla se fáze II studie. Vybrali se pacienti trpící časnou nebo střední fází Alzheimerovy nemoci, což se definovalo použitím kritérií uznávaných institucí Alzheimer's disease and Related Disorders Association (ADRD). Vhodní pacienti dosáhly skóre v testu „Mini-Mental State Exam“ (MMSE) v rozmezí 12 až 26. Jiná výběrová kritéria je skutečnost, že pacienti pravděpodobně přežijí trvání studie a nevyskytnou se komplikace, jako je užívání léků, které mohou interferovat. Základní hodnocení funkce pacienta se provádí použitím klasických psychometrických standardů, jako je MMSE ADS, které jsou jednotným měřítkem pro hodnocení pacientů trpících Alzheimerovou nemocí.

Tato psychometrická stupnice slouží jako míra postupu Alzheimerovy nemoci. Vhodné stupnice kvalitativního života se může také použít k monitorování léčby. Postup onemocnění může být dále sledováno MRI. Profily krve pacientů mohou také být monitorovány testy protilátky pro imunogen a odezvy T buněk.

Pacienti jsou náhodně rozděleni a léčeni buď terapeutickým činidlem, nebo placebem. Pacienti se sledují alespoň každých šest měsíců. Účinnost se stanovila podstatnou redukcí postupu léčene skupiny vztaheno ke skupině, kde se aplikovalo placebo.

Druhá fáze studie se provedla tak, že se hodnotila konverze pacientů s časnou ztrátou paměti, která není způsobena Alzheimerovou nemocí, která se nazývá ztráta paměti spojená s věkem (AAMI) nebo lehká oligofrenie (MCI) na možnou Alzheimerovu nemoc, jak se definuje kritérii ADRDA. Pacienti s vysokým nebezpečím konverze na Alzheimerovu nemoc, se vybraly neklínické populace testováním referenčních populací, kde se sledovaly známky ztráty paměti a jiné obtíže spojené se symptomy ztráty paměti stádia pre-Alzheimerovy nemoci, výskyt Alzheimerovy nemoci v rodině, faktory genetických předpokladů pro toto onemocnění, věk, pohlaví a jiné rysy, které znamenají velké nebezpečí vzniku Alzheimerovy nemoci. Vytvořilo se základní skóre získané ve vhodných testech zahrnující MMSE a ADAS spolu s jinými stupnicemi navrženými tak, že se hodnotí více normální populace. Tyto populace pacientů se sledují v intervalech přibližně šesti měsíců a konečný bod v případě každého pacienta je zda jeho onemocnění konvertuje na Alzheimerovu nemoc, jak ji definují kritéria ADRDA na konci pozorování.

Příklad 19: Obecné materiály a metody

1. Měření titrů protilátek

5 Myším se odebrala krev z ocasní žíly o objemu 200 μ l do mikrocentrifugové zkumavky. Morčatům se nejdříve vyholila oblast hlezna a pak se použila jehla 18 gauge a odebrala se krev z matatarsální žíly a krev se jímala do mikrocentrifugační zkumavky. Krev se nechala srážet po dobu jedné hodiny při teplotě místnosti (RT), míchala vortexem a centrifugovala se při 14 000 x g po
10 dobu deseti minut, aby se separovala ze séra sraženina. Sérum se pak přeneslo do čisté mikrocentrifugační zkumavky a uchovávalo se při teplotě 4 °C až do titrace.

Titry protilátek se stanovily testem ELISA. Mikrotitrační destičky s 96 prohlubněmi (destičky Costar EIA) se potáhly 100 μ l roztoku, který obsahuje buď 10 μ g/ml A β 42, nebo SAPP nebo jiné antigeny, jak se píše v každé zprávě v potahovacím pufru (0,1 M fosforečnan sodný, pH8,5,
15 0,1 % azid sodný) a uchovávaly se přes noc při teplotě místnosti. Prohlubně se vysály a do prohlubni se přidalo sérum s počátečním ředěním 1/100 v ředicím pufru (0,014 M fosforečnanu sodného pH7,4, 0,15 M NaCl, 0,6% albuminu v bovinním séru, 0,05 % thiomerosalu). Sedm sérií ředění vzorků se připravilo přímo na plotny ve třech krocích, aby se dosáhlo konečného ředění 1/218 700. Ředění se inkubovalo v potažených prohlubních destiček po dobu jedné hodiny při
20 teplotě místnosti. Destičky se pak promyly čtyřikrát PBS, které obsahuje 0,05 % Tween 20. Druhá protilátka kozi anti-myší Ig konjugované s křenovou peroxidázou (získané od firmy Boehringer mannheim) se přidalo do prohlubni jako 100 μ l ředění 1/3 000 v ředicím pufru a vše se inkubovalo po dobu jedné hodiny při teplotě místnosti. Destičky se promyly čtyřikrát v PBS, Tween 20. Aby se vyvinul chromogen, do každé prohlubně se přidal 100 μ l TMB (3,3',5,5'-
25 tetramethylbenzidín získaný od firmy Pierce Chemicals) vše se inkubovalo po dobu 15 minut při teplotě místnosti. Reakce se zastavila přidáním 25 μ l 2M H₂SO₄. Intenzita barvy se pak odečítala na molekulovém zařízení Vmax při vlnové délce 450 nm až 650 nm.

Titry se definovaly jako převrácená hodnota ředění séra dávající jednu polovinu maxima hodnoty
30 OD. Maximální hodnota OD se v obecném případě odečítala z počátečního ředění 1/100 s výjimkou případů s velmi vysokými titry, v případě, že vyšší počáteční ředění je nezbytné k ustanovení maximální hodnoty OD. Jestliže 50% bod spadá mezi dvě ředění, provedla se lineární extrapolace, aby se vypočítal konečný titer. Aby se vypočítal geometrický průměr titrů protilátek, titry nižší než 100 se automaticky označily jako titry s hodnotou 25.

35

2. Testy proliferace lymfocytů

myším se provedla anestezie isofluranem. Sleziny se odstranily a promyly se dvakrát 5 ml PBS, který obsahuje 10% fetální bovinní sérum deaktivované teplem (PBS-FBS) a pak se homogeni-
40 zovalo při teplotě 50 vyjádřeno v jednotce Centricon (Dako A/S, Norsko) v 1,5 ml PBS-FBS po dobu 10 vteřin při 100 ot./min v Medimachine (Dako), po níž následuje filtrace přes nylonové síto s velikostí pórů 100 mikronů. Splenocyty se promyly jednou 15 ml PBS-FBS, pak se vytvořil pelet centrifugací při 200 x g po dobu 15 minut. Červené krevní buňky se lyzovaly tím, že se resuspendováním peletu centrifugací při 200 x g po dobu 5 minut. Červené krevní buňky se lyzo-
45 valy tím, že se resuspendoval pelet v 5 ml pufru, který obsahuje 0,15 M NH₄Cl, 1 M KHCO₃, 0,1 M NaEDTA, pH7,4 po dobu pěti minut při teplotě místnosti. Leukocyty se pak promyly způsobem popsaným shora v textu. Čerstvě izolované buňky sleziny (10⁷ buněk v prohlubni) se kultivovalo ve třech provedeních na mikrotitračních destičkách pro tkáňové kultury s dnem ve tvaru U s 95 prohlubněmi. (Corning, Cambridge, MA) v kultivačním médiu RPMI 1640 (JRH Biosci-
50 ences, Lenexa, KS) doplněném 2,05mM L glutaminem, 1% směsí penicilinu/streptomycinu a 10% FBS deaktivovaným teplem po dobu 96 hodin při teplotě 37 °C. Takové se v různých dávkách, které jsou v rozmezí 5 až 0,18 mikromolů ve čtyřech krocích přidaly různé peptidy A β , jsou to například A β 1-16, A β 1-40, A β 1-42 nebo reverzní peptid A β 40-1. Buňky v kontrolních prohlubních se kultivovaly s Concanavalinem A (ConA) (Sigma, cat. # C-5275, v koncentraci 1

mikrogram/ml), aniž se přidal protein. K buňkám se přidal na posledních 24 hodin 3H-thymidin (do jedné prohlubně se přidal 1 μ Ci od firmy Amersham Corp., Arlington Heights IL). Buňky se pak sklídily na destičky UniFilter a počítaly se v zařízení Top Count Microplate Scintillation Counter (Packard Instruments, Downers Grove, IL). Výsledky se exprimovaly jako počet impulzů radioaktivity za jednu minutu (cpm) začleněných do nerozpustných makromolekul.

4. Příprava mozkové tkáně

Po usmrcení se mozek odstranil a jedna hemisféra se připravila pro imunohistochemickou analýzu, zatímco tři oblasti mozku (hippocampus, kortex a mozeček) se získaly z jiné hemisféry a použily se k měření koncentrace různých proteinů A β a forem APP za použití specifického testu ELISA (Johnson-Wood et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 1550-1555 (1997)).

Tkáně určené pro test ELISA se homogenizovaly v 10 objemech guanidinového pufru chlazeného ledem (5,0 M guanidin-HCl, 50 mM Tris-HCl, pH8,0). Homogenáty se zamíchaly mírným mícháním za použití Adams Nutatoru (Fisher) po dobu tří až čtyř hodin, pak se skladovaly při teplotě -20 °C, aby se kvantifikovalo množství A β a APP. Dřívější experimenty se ukazují, že analyty byly stabilní za těchto podmínek uchovávání a že syntetický protein A β (Bachem) by se mohl kvantitativně získat, když se přidá do homogenátů kontrolní mozkové tkáně z mládřat myši (Johnson-Wood et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 1550-1555 (1997)).

5. Měření množství A β

Homogenáty mozku se ředily v poměru 1:10 s kaseinovým ředidlem chlazeným ledem (0,25 % kasein, PBS, 0,05 % azid sodný, 20 μ g/ml aprotininu, 5 mM EDTA pH 8,0, 10 μ g/ml leupeptidinu) a pak se centrifugovaly při 16 000 x g po dobu 20 minut při teplotě 4 °C. Standardy syntetického proteinu A β (1 až 42 aminokyselin) a standardy APP se připravily tak, aby zahrnovaly 0,5 M guanidin. Sendvičový test ELISA pro „celkový“ A β využívá monoklonální protilátku 266, která je specifická pro aminokyseliny 13 až 28 proteinu A β (Seubert et al., Nature 359, 325-327 (1992)), jako značící protilátka, a monoklonální protilátku 3D6 značenou biotinem, která je specifická pro aminokyseliny 1 až 5 proteinu A β (Johnson-Wood et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 1550-1555 (1997)) jako reportní protilátka. Monoklonální protilátka 3D6 nerozpoznává vylučovaný APP nebo APP v celé délce, ale detekuje druhy A β s aminoterminální kyselinou asparovou. Tento test má nižší limit citlivosti přibližně 50 ng/ml (11 nM) a nevykazuje zkříženou reaktivitu s endogenním myším proteinem A β v koncentracích do 1 ng/ml (Johnson-Wood et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 1550-1555 (1997)).

Sendvičový test ELISA specifický pro A β 1-42 používá mA β 21F1, která je specifická pro aminokyseliny 33 až 42 peptidu A β (Johnson-Wood et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 1550-1555 (1997)) jako značené protilátky. V tomto testu se jako reportní protilátka používá mA β 3D6, která má nižší limit citlivosti okolo 125 μ g/ml (28 μ M, Johnson-Wood et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 1550-1555 (1997)). V případě testu ELISA pro protein A β se 100 μ l buď mA β 266 (v koncentraci 10 μ g/ml), nebo mA β 21F12 v koncentraci 5 μ g/ml potáhlo na dno prohlubní destiček s 96 prohlubněmi (Costar) inkubací přes noc při teplotě místnosti. Roztok se odstranil aspirací a prohlubně se blokovaly přidáním 200 μ l 0,25 % lidského sérového albuminu v pufru PBS po dobu alespoň jedné hodiny při teplotě místnosti. Blokační roztok se odstranil a destičky se uchovávaly vysušené při teplotě 4 °C až do použití. Destičky se znovu před použitím hydratovaly v promývacím pufru (fyziologický roztok pufrovaný Tris (0,15 M NaCl, 0,01 M Tris-HCl, pH 7,5) plus 0,05 % Tween 20). Vzorky a standardy se přidaly do prohlubní v trojnásobných alikvotech o objemu 100 μ l a pak se inkubovaly přes noc při teplotě 4 °C. Destičky se promyly alespoň třikrát v promývacím pufru mezi každým krokem testu. Protilátky mA β 3D6 značené biotinem se ředily na koncentraci 0,5 μ g/ml v kaseinovém testovacím pufru (0,25 % kaseinu, PBS, 0,05 % Tween 20 pH 7,4) a přidaly se do prohlubní a inkubovaly se po

dobu jedné hodiny při teplotě místnosti. Konjugát avidinu a křenové peroxidázy (avidin-HRP se získal od firmy Vector, Burlingame, CA) ředěný 1: 40 000 v kaseinovém testovacím pufru přidal se do prohlubní a kultivovaly se po dobu jedné hodiny při teplotě místnosti. Přidal se kolorimetrický substrát SLOW TMB-ELISA (Pierce) a nechal se reagovat po dobu 15 minut při teplotě místnosti, enzymatická reakce se zastavila přidáním 25 μ l 2M H_2SO_4 . Reakční produkt se kvantifikoval za použití molekulového zařízení Vmax a změnil se rozdíl v absorbanci při vlnové délce 450 a 650 nm.

6. Měření množství APP

Využily se dva různé testy pro měření APP. První označený APP- α /FL rozeznává obě formy APP APP-alfa (α) a APP plné délky (FL). Druhý test se specifikoval pro APP- α . Test APP- α /FL rozeznává vylučovaný APP zahrnující prvních 12 aminokyselin A β . Protože reportní protilátka (2H3) není specifická pro místo α -clip, které se vyskytuje mezi aminokyselinami 612 až 613 APP695 (Esch et al., Science 248, 1122-1124, (1990)), tento test také rozeznává APP plné délky (APP-FL). Předchozí experimenty používají imobilizované protilátky APP s cytoplazmatickým ocasem APP-FL, aby vyčerpaly mozkové homogenáty APP-FL, což naznačuje, že přibližně 30 až 40 % APP- α /FL APP je FL (data nejsou zobrazena). Reportní protilátka v případě obou testů APP- α /FL a APP- α je mAb 8E5, které se vytvořily proti aminokyselinové 444 až 592 formy APP695 (Games et al., Nature 373, 523 (1995)). Reportní mAb v případě testu APP- α /FL je mAb 2H3, která je specifická pro aminokyseliny 597-608 APP695 (Johnson-Wood et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 1550-1555 (1997)) a reportní protilátkou v testu pro APP- α je derivát mAb 16H9, který vznikl vůči aminokyselinám 605 až 611 peptidu APP. Nižší limit citlivosti testu APP- α /FL je přibližně 11 ng/ml (150 pM) (Johnson-Wood et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 1550-1555 (1997)) a limit citlivosti testu specifického pro APP- α je 22 ng/ml (0,3 nM). V případě obou testů APP se mAb 8E5 potáhly na prohlubně destiček ELISA s 96 prohlubněmi způsobem stejným, jako se popisuje shora v textu v případě mAb 266. Čištěný rekombinantní vylučovaný APP- α se použil jako referenční standard v případě testu APP- α a testu APP- α /FL (Esch et al., Science 248, 1122-1124, (1990)). Vzorky homogenátu mozku v 5 M guanidinu se ředily v poměru 1:10 v ředícím pufru vhodném pro test ELISA (0,014 M fosforečnanový pufr pH7,4, 0,6% bovinní sérový albumin, 0,005% thimerosal, 0,5 M NaCl, 0,1% NP40). Vzorky se pak ředily v poměru 1:4 ve vzorkovém pufru, které obsahuje 0,5 M guanidin. Ředěné homogenáty se pak centrifugovaly při 16 000 x g po dobu 15 vteřin při teplotě místnosti. Standardy APP a vzorky se pak přidaly na destičku ve dvounásobných alikvotech a inkubovaly se po dobu 1,5 hodiny při teplotě místnosti. Reportní protilátka 2H3 nebo 16H9 se inkubovala se vzorky po dobu jedné hodiny při teplotě místnosti. Konjugát streptavidin-alkalická fosfatáza (Boehringer Mannheim) se ředily v poměru 1:1 000 ve vzorkovém pufru a inkubovaly se v prohlubních po dobu jedné hodiny při teplotě místnosti. Přidal se fluorescenční substrát 4-methylumbeliferylfosforečnan a inkuboval se po dobu 30 minut při teplotě místnosti a destičky se odcítaly na fluorimetru Cytofluor™ 2350 (Millipore) při vlnové délce 365 nm (excitace) a 450nm (emise).

7. Imunohistochemie

Mozky se fixovaly po dobu tří dní při 40 °C ve 4% paraformaldehydu v PBS a pak se uchovávaly jeden až sedm dní při teplotě 4 °C v 1% paraformaldehydu v PBS až do přípravy sekci. Na zařízení vibratom se nařezaly koronární sekce o tloušťce 40 mikrónů při teplotě místnosti a uchovávaly se v ochranném činidle pro hluboké zmrazení (30 % glycerol, 30 % ethylenglykol v fosforečnanovém pufru) při teplotě -20 °C a pak se provedlo imunohistochemické zpracování. V případě každého mozku se připravilo šest sekci na úrovni dorzálního hippocampusu, každý se separoval intervaly 240 μ m, které se inkubovaly přes noc s jednou následující protilátkou: 1) protilátka proti A β (mAb, 3D6, specifické pro lidský A β) ředěné na koncentraci 2 μ g/ml v PBS a 1% horském séru nebo 2) mAb specifické pro lidské APP 8E5 značené biotinem ředěné na koncentraci 3 μ g/ml v PBS a 1% koňské sérum nebo 3) mAb specifické pro gliální fibrilární kyselý protein (GFAP, Sigma Chemical Co.) ředěný 1:5 s 0,25% Triton X-100 a 1% horským sérem ve

fyzilogickém roztoku pufovaném Tris pH 7,4 (TBS) nebo 4) mAb specifické pro CD11b, antigen MAC-1 (Chemicon International) ředěné 1:100 s 0,25% Triton X-100 a 1% králičím sérem v TBS nebo 5) mAb specifické pro antigen MHC II (Pharmingen) ředěné v poměru 1:100 s 0,25 % Triton X-100 a 1% králičím séru v TBS nebo 6) kryší mAb specifické pro CD43 (Pharmingen) ředěné 1:100 1% králičím sérem v PBS nebo 7) kryší mAb specifické pro CD 45RA (Pharmingen) ředěný 1:100 s 1 % králičím sérem v PBS nebo 8) kryší monoklonální A β specifické pro CD 45RB (Pharmingen) ředěné 1:100 s 1% králičím sérem v PBS nebo 9) kryší monoklonální protilátky proti A β specifické pro CD45 (Pharmingen) ředěné 1:100 1% králičím sérem v PBS nebo 10) polyklonální křeččí protilátky proti A β specifické pro CD3e (Pharmingen) ředěné 1:100 s 1% králičím sérem v PBS nebo 11) kryší monoklonální protilátky specifické pro CD4 (Serotec) ředěné v poměru 1:200 s 1% králičím sérem v PBS nebo s 12) roztok PBS, který neobsahuje primární protilátku obsahující 1 % normální koňské sérum.

Sekce, které reagovaly s roztoky protilátek popsány v paragrafech 1, 2 a 6 až 12 shora v textu se předem ošetřily 1 % Tritonem X-100, 0,4% peroxidem vodíku v PBS po dobu 20 minut při teplotě místnosti, aby se zablokovala endogenní peroxidáza. Dále se inkubovaly přes noc při teplotě 4 °C s primární protilátkou. Sekce, které reagovaly s monoklonálními protilátkami 3D6 nebo 8E5 nebo CD3e pak reagovaly po dobu jedné hodiny při teplotě místnosti s komplexem, který zahrnuje kfenovou peroxidázu-avidin-biotin, s komponenty kitu „A“ a „B“ ředěným v poměru 1 : 75 v PBS (Vector Elite Standard Kit, Vector Labs, Burlingame, CA). Sekce, které reagovaly s protilátkami specifickými pro CD 45RA, CD 45RB, CD45, CD3, a roztok PBS se inkubovaly po dobu jedné hodiny při teplotě místnosti s anti-kryším IgG značeným biotinem (Vector) ředěným 1:75 v PBS nebo s anti-myším IgG (Vector) značeným biotinem a ředěným 1:75 v PBS. Sekce pak reagovaly po dobu jedné hodiny při teplotě místnosti s komplexem kfenová peroxidáza-avidin-biotin s komponenty kitu „A“ a „B“ ředěnými v poměru 1:75 v PBS (Vector Elite Standard Kit, vector Labs, Burlingame, CA).

Sekce se vyvíjely v 0,01% peroxidu vodíku, 0,05 % 3,3'-diaminobenzidinu (DAB) při teplotě místnosti. Sekce určené pro inkubaci s protilátkami specifickými pro GFAP, MAC-1-AND MHC II se předem ošetřily s 0,6% peroxidem vodíku při teplotě místnosti, aby se blokovala endogenní peroxidáza, a pak se inkubovaly přes noc s primární protilátkou při teplotě 4 °C. Sekce, které reagovaly s protilátkou GFAP, se inkubovaly po dobu jedné hodiny při teplotě místnosti s anti-myší protilátkou připravenou imunizací koně ředěné v poměru 1:200 s TBS. Sekce dále reagovaly po dobu jedné hodiny s komplexem avidin-biotin-peroxidáza (Vector Laboratories, Vectastain Elite ABC kit) ředěným 1:1 000 s TBS. Sekce, které se inkubovaly s monoklonální protilátkou specifickou pro MAC-1 nebo MHCII jako s primární protilátkou následně reagovaly po dobu jedné hodiny při teplotě místnosti s anti-kryším IgG značeným biotinem připraveným v králíkovi ředěným v poměru 1:200 s TBS, pak následuje inkubace po dobu jedné hodiny s komplexem avidin-biotin-peroxidáza ředěným 1:1 000 s TBS. Sekce se inkubovaly s protilátkami specifickými pro GFAP, MAC-1 a MHC Iia pak se vizualizovaly léčbou při teplotě místnosti s 0,05% DAB, 0,01% peroxidem vodíku, 0,04% chloridem nikelnatým, TBS po dobu 4 a 11 minut.

Imunologicky značené sekce se nanasly na skleněná sklička (VWR, sklička Superfrost), vzduchem sušená přes noc, namočené v roztoku Propar (Anatech) a překrytá krycími skličky za použití média Permout (Fisher).

Za účelem stanovení počtu plaků A β obarvením podsada GFAP pozitivních sekcí se nanasla na sklička Superfrost a inkubovaly se ve vodném 1 % Thioflavinu S (Sigma) po dobu 7 minut a pak následovalo imunohistochemické zpracování. Sekce se pak dehydratovaly a čistily v roztoku Propar, pak se přidalo médium Permout a přikryly krycími skličky.

8. Zobrazovací analýza

Videometrický systém zobrazovací analýzy 150 (Oncor, Inc., Gaithersburg, MD) spojený s Nikon Microphot-FX přes CCD videokameru a monitor Sony Trinitron se použil pro kvantifikaci imunoreaktivních sklíček. Zobrazení sekce se uchovávalo v pufru vhodném pro video a stanovilo se prahové zabarvení a práh saturace, aby se vybral a vypočítal celková plocha pixelů pokrytých imunologicky značenou strukturou. V případě každé sekce se manuálně načrtl hippocampus a vypočítala se celková plocha obsazená pixely. Procentické zastoupení amyloidního uzle se měřilo jako (frakce hippocampální oblasti, která obsahuje usazeniny A β imunoreaktivní s monoklonální protilátkou 3D6) x 100. Podobně procentové zastoupení neuritického uzle se měřilo jako (frakce hippocampální oblasti, která obsahuje dystrofické neurity reaktivní s monoklonální protilátkou 8E5) x 100. Systém C-Imaging (Compix, Inc., Cranberry Township, PA) operující s programem Simple 32 Software Application je spojen s mikroskopem Nikon Microphot-FX prostřednictvím kamery Optronicsa použil se při kvantifikaci procenta retrosplenálního kortexu obsazeném GFAP-pozitivními astrocyty a MAC-1 a MHC II-pozitivními mikroglii. Zobrazení imunoreaktivní sekce se uchovávalo v pufru vhodném pro video a stanovil se práh založený na monochromu, aby se vybral a vypočítala plocha celkového počtu pixelů obsazených imunologicky značenými buňkami. V případě každé sekce se manuálně načrtl retrosplenální kortex (RSC) a vypočítala se celková plocha pixelů obsazená RSC. Procentické zastoupení astrocytů se definovalo jako: (frakce RSC obsazená GFAP-reaktivními astrocyty) x 100. Podobně microglióza vyjádřená v procentech se definovala jako: (frakce RSC obsazená MAC-1 nebo MHC II-reaktivními mikroglii) x 100. V případě analýzy zobrazení se v případě každého zvířete kvantitativně hodnotilo šest sekcí na úrovni dorzálního hippocampusu, kdy každá je oddělena intervalem 24 μ m. V každém případě osoba, která hodnotila sekce, neznala status léčby zvířat.

Z předchozích informací je zřejmé, že vynález popisuje řadu použití. Například vynález popisuje použití libovolných protilátek proti A β popsanych shora v textu při léčbě, profylaxi nebo diagnostice amyloidogenního onemocnění nebo při výrobě léku nebo diagnostického prostředku. Podobně vynález popisuje použití libovolných epitopických fragmentů A β popsanych shora v textu vhodných pro léčbu nebo profylaxi amyloidního onemocnění nebo při výrobě léku pro použití stejným způsobem.

PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Fragment A β vázaný k nosičovému peptidu pro použití k vyvolání imunitní odpovědi proti A β , a tím pro prevenci nebo léčení onemocnění spojeného s amyloidními deposity A β v mozku pacienta, přičemž fragment A β sestává z
- i) A β 1–7 majícího aminokyselinovou sekvenci DAEFRHD,
 ii) A β 3–7 majícího aminokyselinovou sekvenci EFRHD, nebo
 10 iii) multimeru i) nebo ii).
2. Fragment A β vázaný k nosičovému peptidu podle nároku 1, kde fragment A β sestává z A β 1–7 nebo A β 3–7.
- 15 3. Fragment A β vázaný k nosičovému peptidu podle nároku 1 nebo 2, kde k fragmentu A β je přidán cysteinový zbytek.
4. Fragment A β vázaný k nosičovému peptidu podle nároků 1 až 3, kde nosičový peptid je připojený k C–konci fragmentu A β .
- 20 5. Fragment A β vázaný k nosičovému peptidu podle některého z nároků 1 až 3, kde nosičový peptid je vázaný k N–konci fragmentu A β .
6. Fragment A β vázaný k nosičovému peptidu podle některého z nároků 1 až 5, kde nosičový peptid je peptid, který zvyšuje transport přes tkanivo.
- 25 7. Fragment A β vázaný k nosičovému peptidu podle některého z nároků 1 až 6, kde nosičový peptid zvyšuje imunitní odpověď proti A β 1–7 nebo A β 3–7.
- 30 8. Fragment A β vázaný k nosičovému peptidu podle nároku 7, kde nosičový peptid je:
 sérový albumin;
 hemocyanin přílipkových plžů;
 molekula imunoglobulinu;
 tyroglobulin;
 35 ovalbumin;
 toxoid z patogenní bakterie;
 univerzální epitop T–buňky;
 cytokin; nebo
 chemokin.
- 40 9. Fragment A β vázaný k nosičovému peptidu podle nároku 8, kde nosičový peptid je tetanový toxoid, toxoid dipterie, *E. coli* toxoid, cholerový nebo *H. pylori* toxoid nebo utlumený derivát toxoidu.
- 45 10. Fragment A β vázaný k nosičovému peptidu podle nároku 9, kde nosičový peptid zahrnuje univerzální epitop T–buňky, který je:
 hemaglutininu influenzae: HA_{307–319} (PKYVKQNTLKLAT);
 PADRE (AKXVAAWTLKAAA);
 malárie CS: epitop T3 (EKKIAKMEKASSVFNV);
 50 povrchový antigen hepatitidy B: HBsAg_{19–28} (FLLTRILTI);

protein tepelného šoku 65: hsp65₁₅₃₋₁₇₁ (DQSIGDLIAEAMDKVGNEG);

mikroorganismus Calmette–Guerin (QVHFQPLPPAVVVKL);

tetanový toxoid: TT₈₃₀₋₈₄₄ (QYIKANSKFIGITEL);

tetanový toxoid: TT₉₄₇₋₉₆₇ (FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE); nebo

5 HIV gp120 T1: (KQIINMWQEVGKAMAY).

11. Fragment A β vázaný k nosičovému peptidu podle některého z nároků 1 až 10, kde fragment A β je vázaný k nosičovému peptidu chemickou vazbou.

10 12. Fragment A β vázaný k nosičovému peptidu podle některého z nároků 1 až 10, kde fragment A β je exprimovaný jako fúzní protein s nosičovým peptidem.

13. Farmaceutický prostředek, **vyznačující se tím**, že obsahuje fragment A β vázaný k nosičovému peptidu podle některého z nároků 1 až 12 a jednu nebo více farmaceuticky přijatelných složek.

15 14. Farmaceutický prostředek podle nároku 13, **vyznačující se tím**, že obsahuje farmaceuticky přijatelný nosič.

20 15. Farmaceutický prostředek podle nároku 13 nebo 14, **vyznačující se tím**, že obsahuje farmaceuticky přijatelné adjuvans.

16. Farmaceutický prostředek podle nároku 15, **vyznačující se tím**, že adjuvans je pro podání současně s fragmentem A β vázaným k nosičovému peptidu.

25

17. Farmaceutický prostředek podle nároku 16, **vyznačující se tím**, že fragment A β vázaný k nosičovému peptidu je spojený s adjuvans.

18. Farmaceutický prostředek podle nároku 17, **vyznačující se tím**, že adjuvans je pro podání před nebo po fragmentu A β vázanému k nosičovému peptidu.

30

19. Farmaceutický prostředek podle některého z nároků 13 až 18, **vyznačující se tím**, že fragment A β vázaný k nosičovému peptidu je představovaný virem nebo bakterií.

35 20. Farmaceutický prostředek podle některého z nároků 13 až 19, **vyznačující se tím**, že je přizpůsobený pro poskytnutí dávky fragmentu A β vázaného k peptidovému nosiči v množství větším než 10 mikrogramů.

21. Použití fragmentu A β vázaného k nosičovému peptidu podle některého z nároků 1 až 12 pro výrobu léčiva pro vyvolání imunitní odpovědi proti A β a tím na prevenci nebo léčení onemocnění spojeného s amyloidními depozity A β v mozku pacienta.

40

22. Fragment A β vázaný k nosičovému peptidu podle některého z nároků 1 až 12 nebo použití podle nároku 21, kde onemocněním je Alzheimerova choroba.

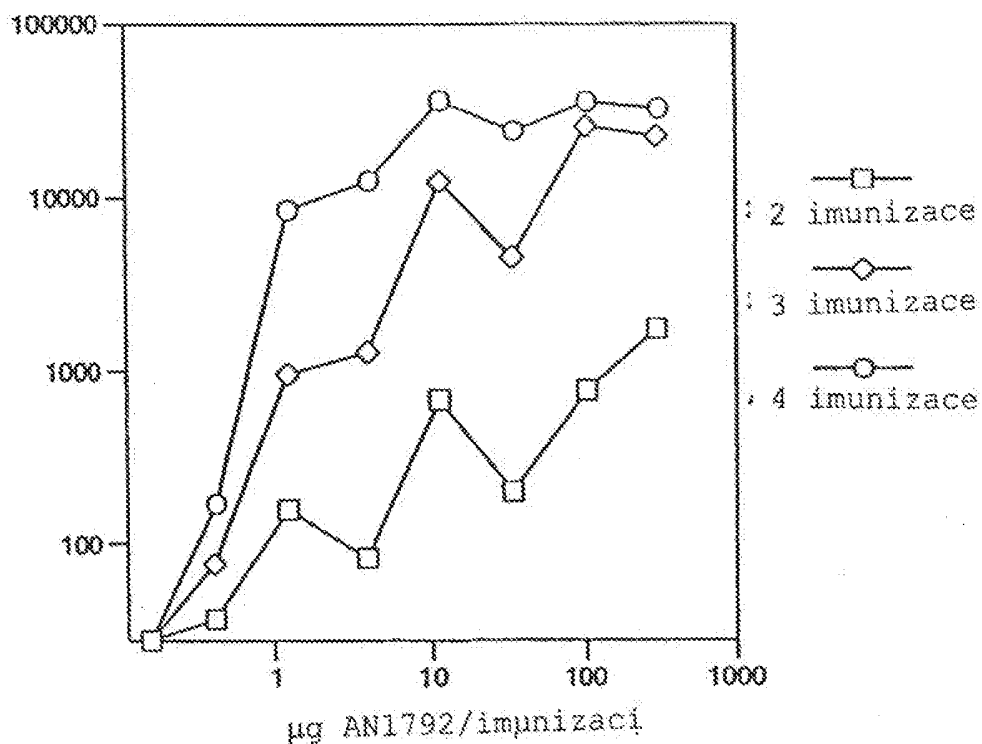
45

23. Fragment A β vázaný k nosičovému peptidu nebo použití podle nároku 22, kde pacient je: asymptomatický; a/nebo má vrozené rizikové faktory indukující náchylnost na Alzheimerovu chorobu; nebo nemá známé rizikové faktory pro Alzheimerovu chorobu.

50

hodnota geometrického průměru títřů

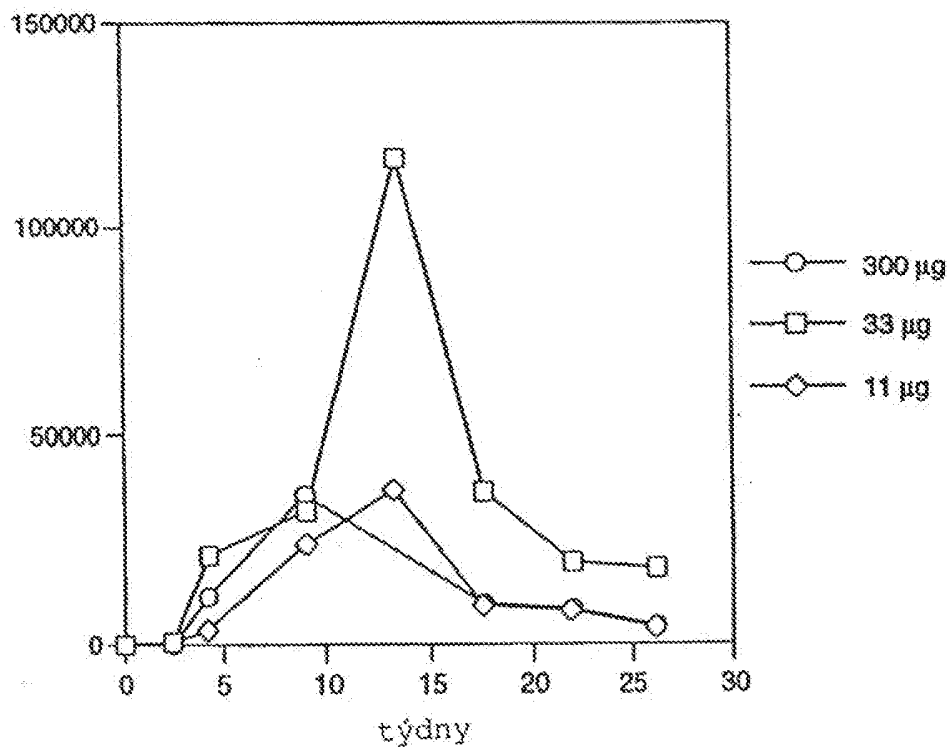
Titř protilátkové odezvy na různé dávky AN1792 po 2, 3 a 4 imunizacích



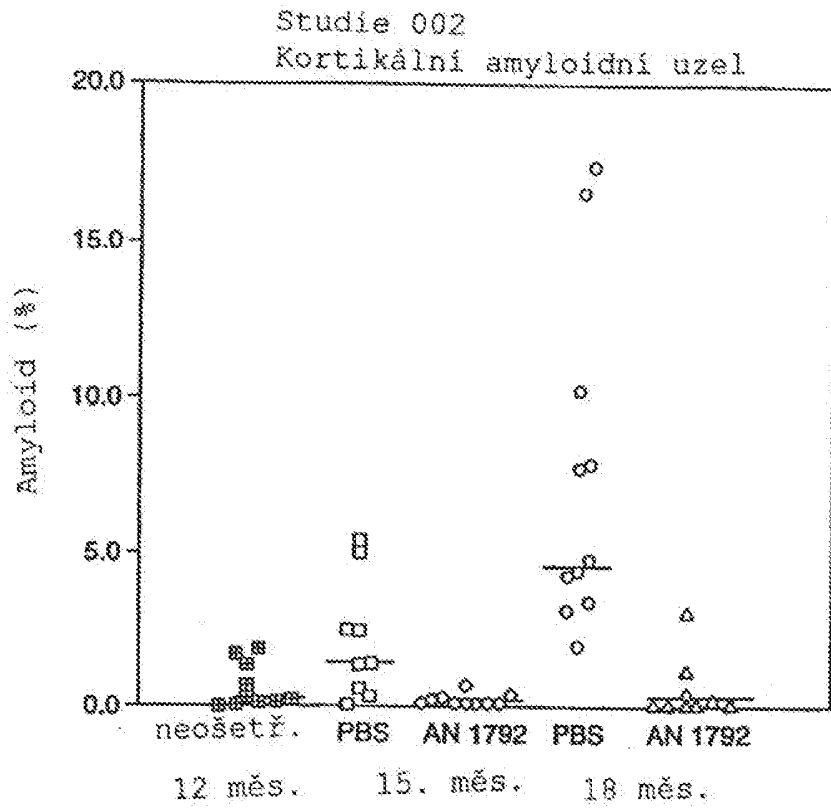
Obrázek č. 5

Kinetiky protilátkové odezvy na AN1792

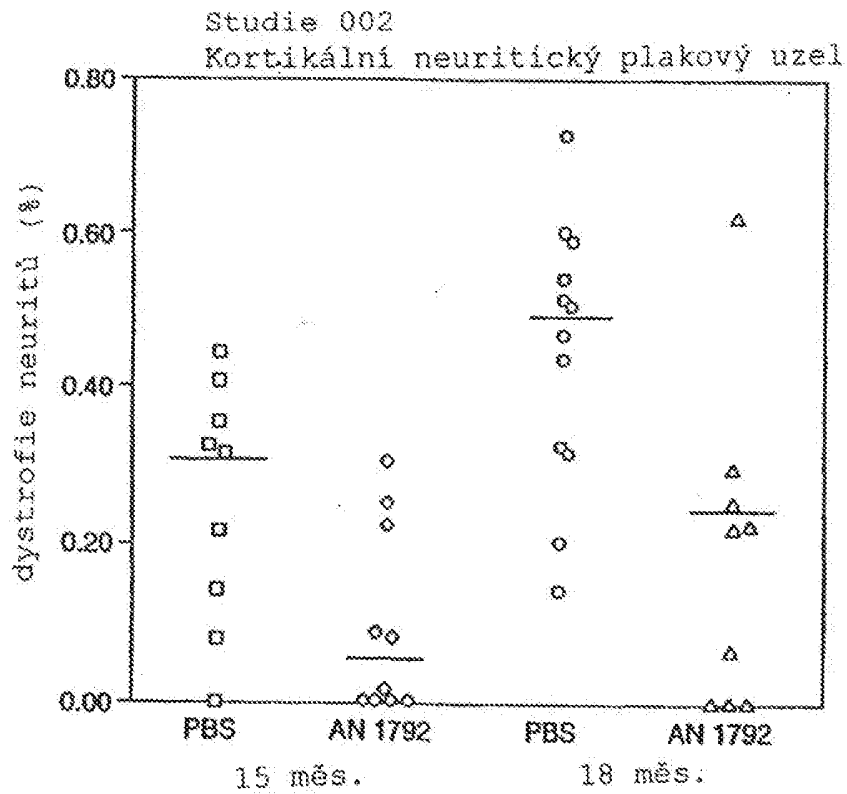
hodnoty geometrického průměru títřů



Obrázek č. 6

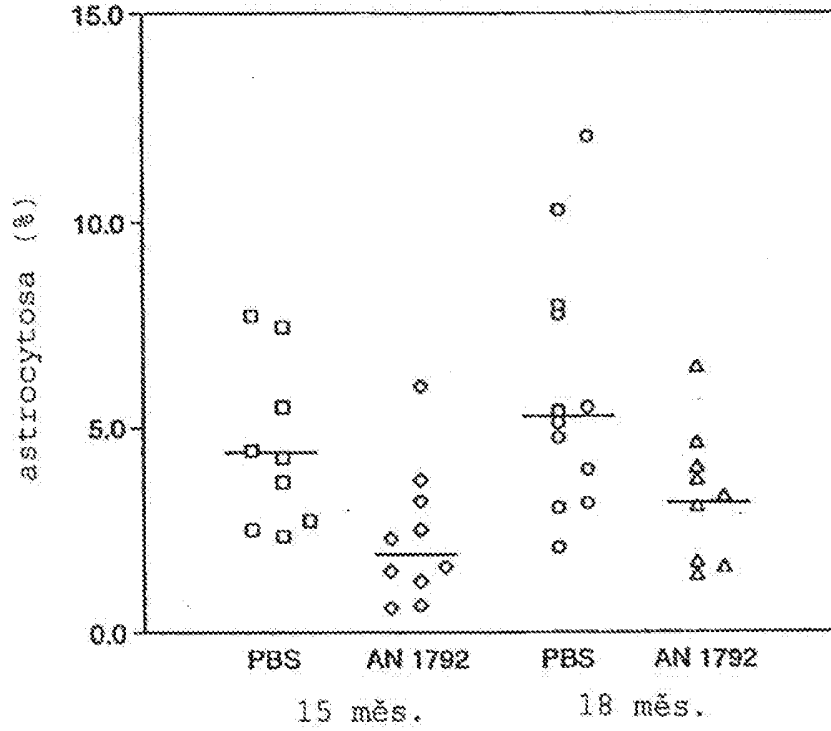


Obrázek č. 7



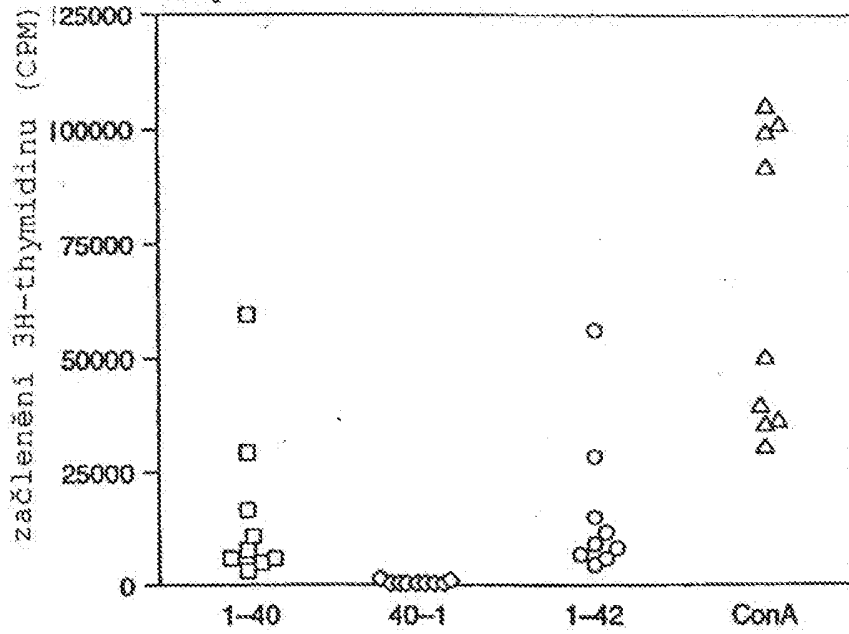
Obrázek č. 8

Studie 002
Retropeleniální kortikální astrocytosa

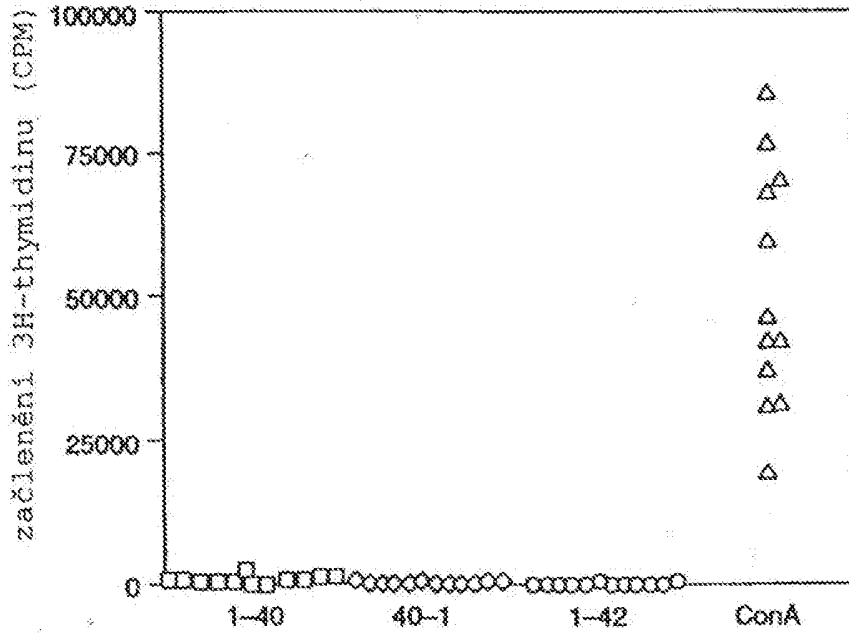


Obrázek č. 9

Studie 002
 Retrosplenální kortikální astrocytosa
 skupina ošetřená AN1792

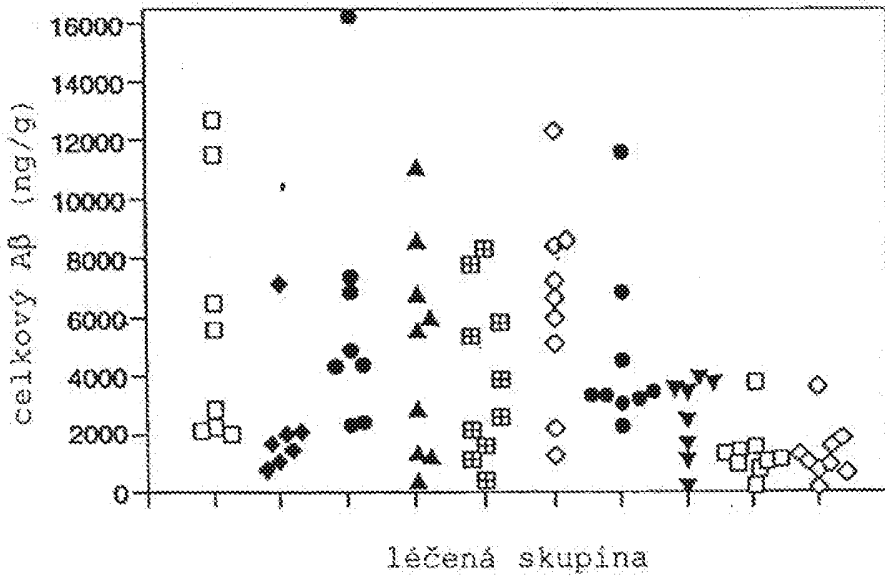


skupina ošetřená PBS



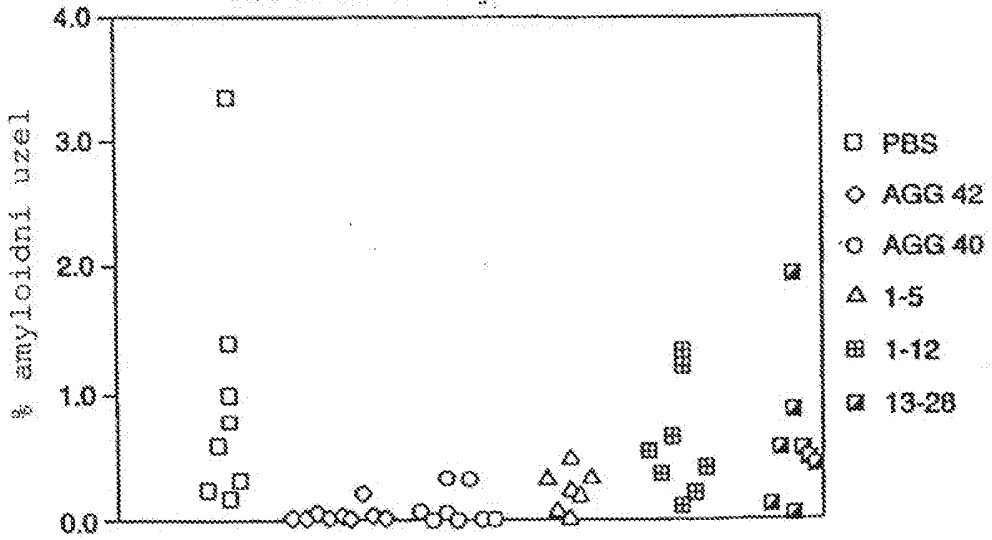
Obrázek č. 10

studie 006
 Terapeutická účinnost fragmentů Aβ
 léčená skupina



Obrázek č. 11

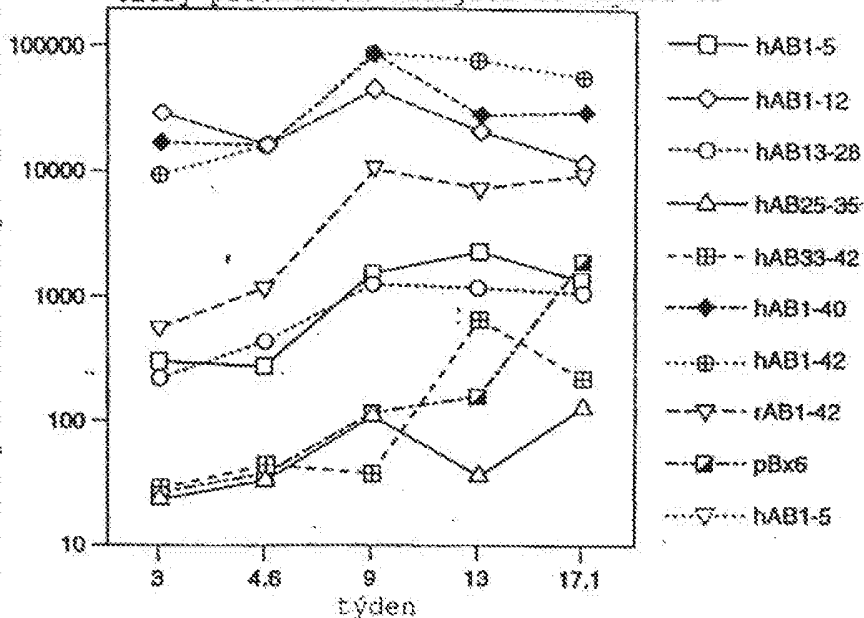
Studie 006
 Kortikální amyloidní uzel



Obrázek č. 12

hodnota geometrického průměru titru protilátek

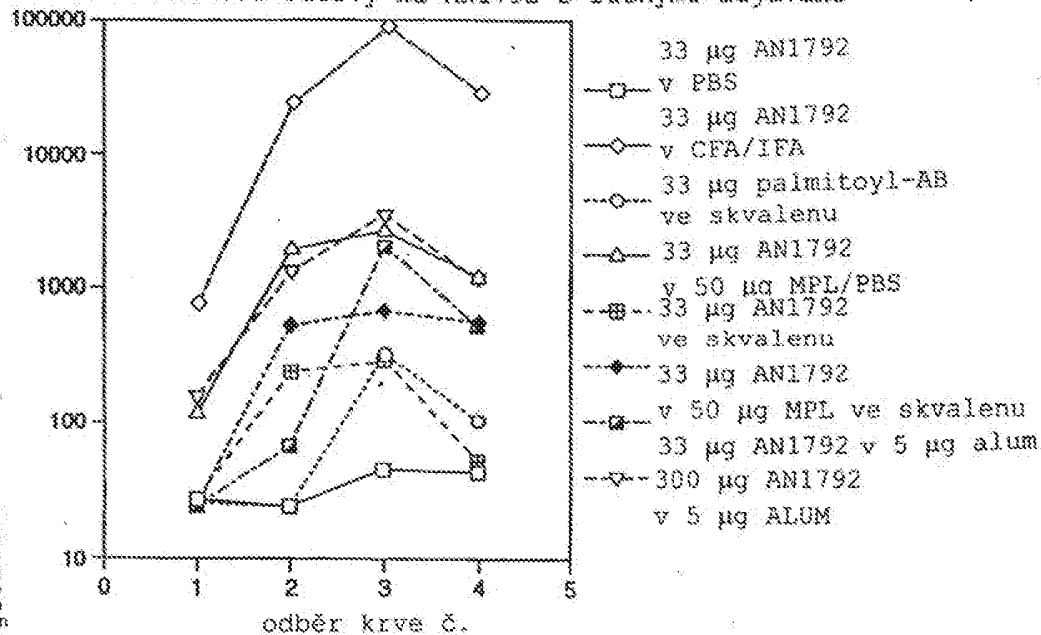
Studie 006
titry protilátek vázající se na AB1-42



Obrázek č. 13

hodnota geometrického průměru titru protilátek

Protilátkové odezvy na AN1792 s různými adjuvans



Obrázek č. 14

kortex

kontrola PBS		neošetřená kontrola	
624-165	272	764-181	3470
625-166	1802	785-182	171
626-167	62	766-183	91
633-168	4696	767-184	6692
634-169	3090	768-185	1353
671-170	2417	771-186	1153
672-171	2840	772-187	3800
629-172	3320	780-188	3740
830-173	1833	843-189	163
831-174	416	844-190	122
792-175	126	845-191	427
793-176	2559	846-192	2674
794-177	289	887-193	453
732-178	179	888-194	2996
733-179	1329	889-195	1075
734-180	5665		
průměr hodnota p (M-W)	1817	průměr hodnota p (M-W)	1153
průměr st. odchylka %CV hodnota p (T test)	1931 1718 89 n=16	průměr st. odchylka %CV hodnota p (T test)	1825 1769 97 n=15

Obrázek č. 15A

kortex

2 mg ALUM 100 µg AN1528		50 µg MPL 100 µg AN1528	
660-083	295	643-105	385
661-084	3180	644-106	2640
662-085	2480	645-107	2403
663-086	3014	654-108	1741
664-087	5870	655-109	3053
665-088	5978	656-110	5990
693-089	1620	678-111	3360
694-090	35	679-112	1230
695-091	3400	704-114	2680
697-092	2630	705-115	78
698-093	983	706-116	1290
699-094	5327	729-117	3180
701-095	1862	730-118	1833
702-096	1849	731-119	4590
703-097	2239	736-120	1112
739-098	806	737-121	1653
740-099	5303	757-122	992
741-100	459	758-123	4692
800-103	154	808-124	785
801-104	852	809-125	244
		810-126	32
průměr hodnota p (M-W)	2051	průměr hodnota p (M-W)	1741
průměr st.odchylka %CV hodnota p (T test)	2407 1913 79 n=20	průměr st.odchylka %CV hodnota p (T test)	2140 1659 78 n=21

Obrázek č. 15B

kortex

25 µg QS21 100 µg AN1528		CEA/FA 100 µg AN1792	
615-128	1257	539-068	693
616-129	361	640-069	508
617-130	1008	641-070	440
536-131	3290	642-071	467
637-132	2520	690-072	42
638-133	3880	691-073	2491
744-134	627	692-074	121
745-135	58	795-075	137
746-136	2610	796-076	822
747-137	1509	797-077	475
769-138	1788	748-087	600
770-139	988	749-079	78
773-140	1199	750-080	1267
774-141	339	751-081	1351
775-142	402	761-082	69
776-143	537		
840-144	1119		
841-145	194		
821-146	1259		
822-147	5413		
823-148	2233		
průměr	1199	průměr	475
hodnota p (M-W)		hodnota p (M-W)	0.0481
průměr	1552	průměr	637
st.odchylnka	1364	st.odchylnka	655
%CV	88	%CV	103
hodnota p (T test)	n=21	hodnota p (T test)	0.0106
			n=15

Obrázek č. 15C

kortex

5 µg THIMEROSAL/PBS 10 µg AN1792		2 µg ALUM 100 µg AN1792	
635-149	1337	610-001	432
669-150	4644	611-002	1012
670-151	6335	612-003	3607
673-152	3700	613-004	508
674-153	2750	620-005	465
676-154	1687	621-006	16
681-156	185	622-007	28
682-157	8031	623-008	217
683-158	3450	708-009	2738
754-159	157	709-010	927
755-160	6857	710-011	1609
756-161	482	716-012	1608
805-162	524	784-014	3890
806-163	397	785-015	1614
807-164	234	786-018	285
		787-017	3102
		788-018	1817
		789-019	1474
		815-020	424
		816-021	1375
		817-022	2323
průměr	1687	průměr	1375
hodnota p (M-W)		hodnota p (M-W)	0.5000
průměr	2718	průměr	1394
st.odchylka	2685	st.odchylka	1166
%CV	99	%CV	84
hodnota p (T test)	n=15	hodnota p (T test)	0.2650
			n=21

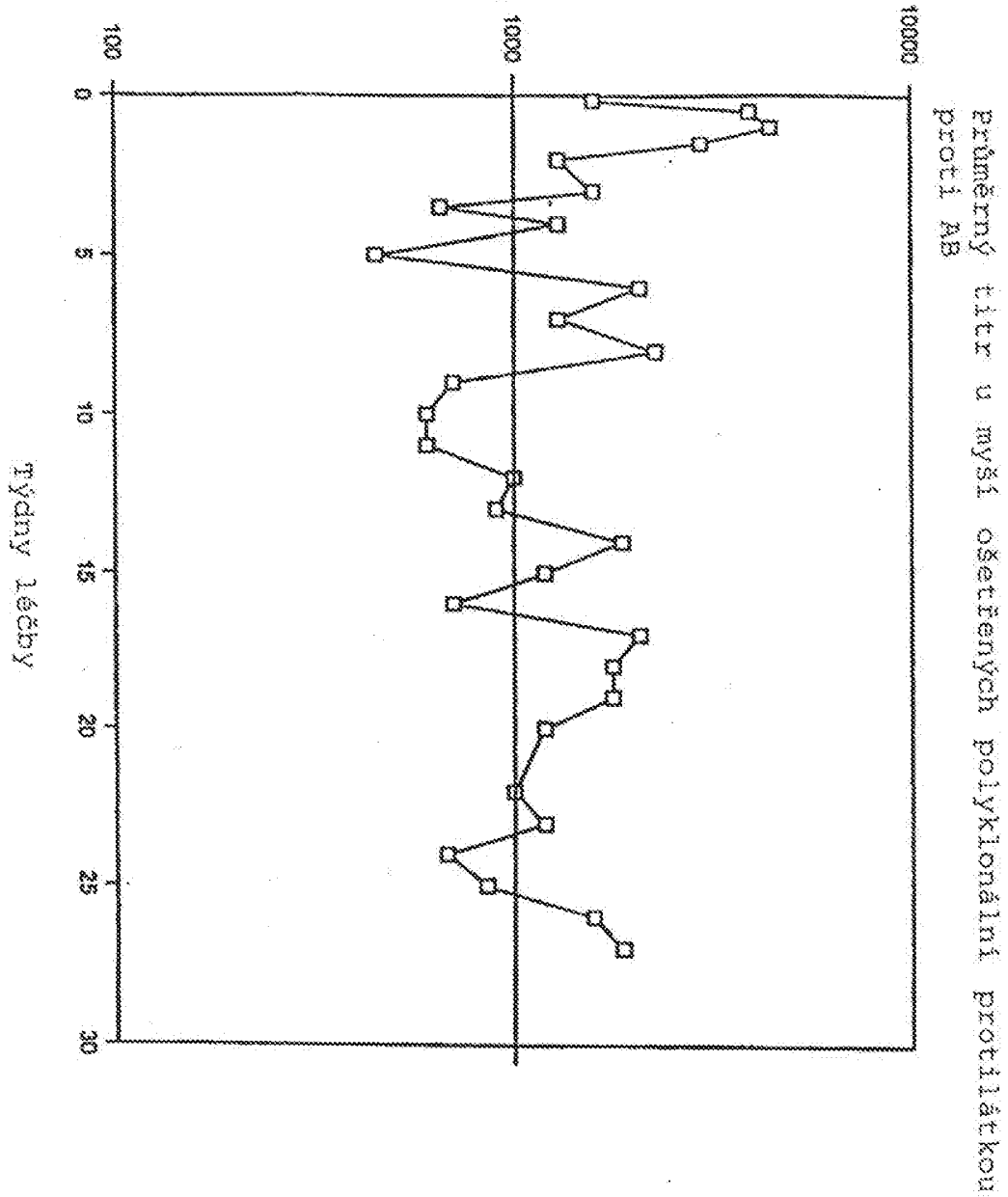
Obrázek č. 15D

kortex

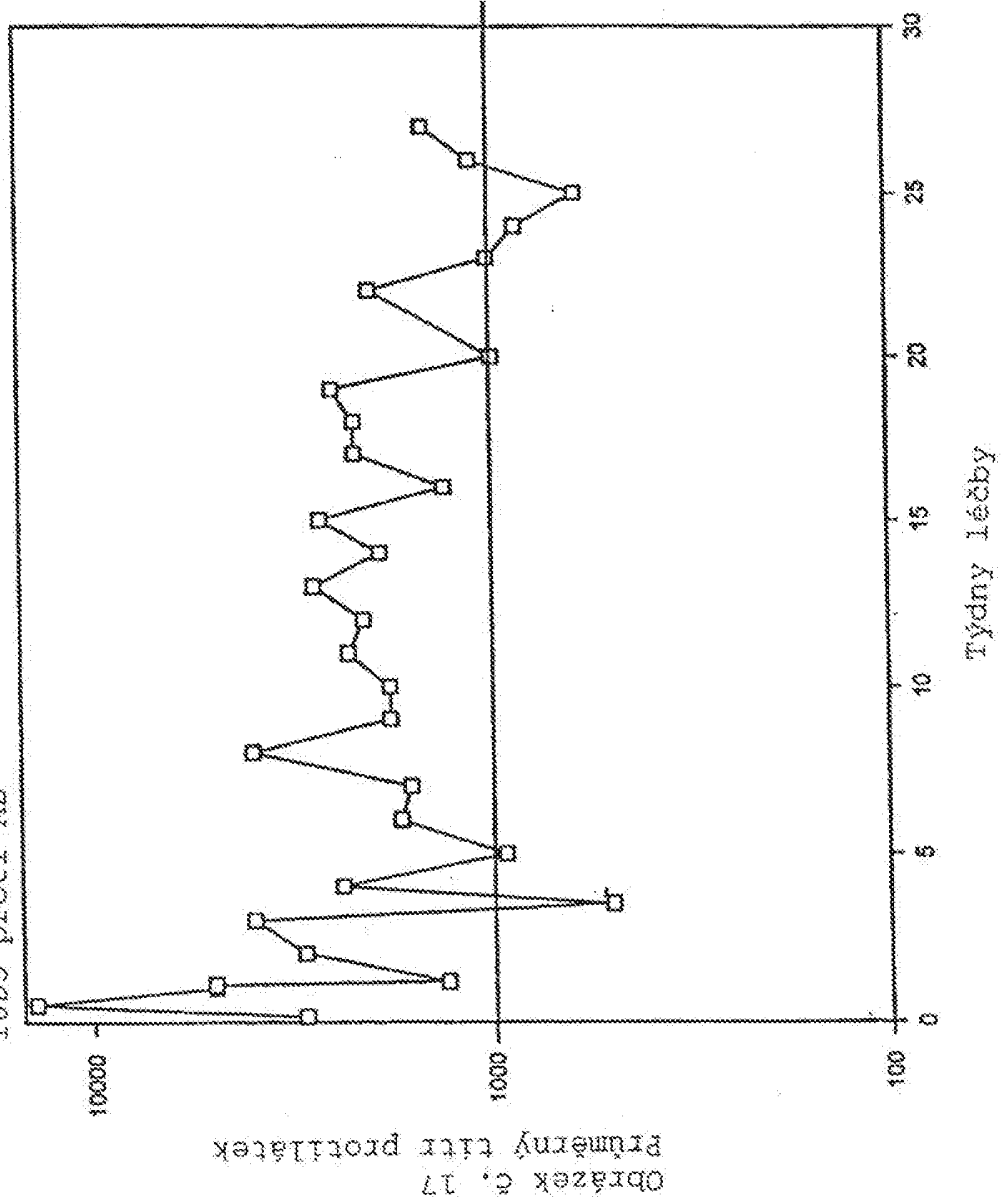
50 µg MPL 100 µg AN1792		25 µg QS21 100 µg AN1792	
646-023	2002	627-045	91
647-024	147	628-046	3397
648-025	1304	631-049	3702
649-026	34	632-050	1776
650-027	980	667-052	1832
724-028	1282	668-053	3023
726-030	1966	686-054	189
727-031	733	687-055	891
720-032	2563	688-056	240
721-033	5563	689-057	110
802-034	113	712-059	3311
803-035	671	825-061	1009
804-036	51	826-082	18165
811-037	613	827-063	73
812-038	332	828-064	78
813-039	1454	837-065	1051
814-040	2441	838-066	270
833-014	742	839-067	371
834-042	40		
836-044	807		
průměr	774	průměr	950
hodnota p (M-W)	0.1710	hodnota p (M-W)	0.4076
průměr	1192	průměr	2199
st.odchylka	1299	st.odchylka	4187
%CV	109	%CV	190
hodnota p (T test)	0.1506	hodnota p (T test)	0.8131
n=21		n=18	

Obrázek č. 15E

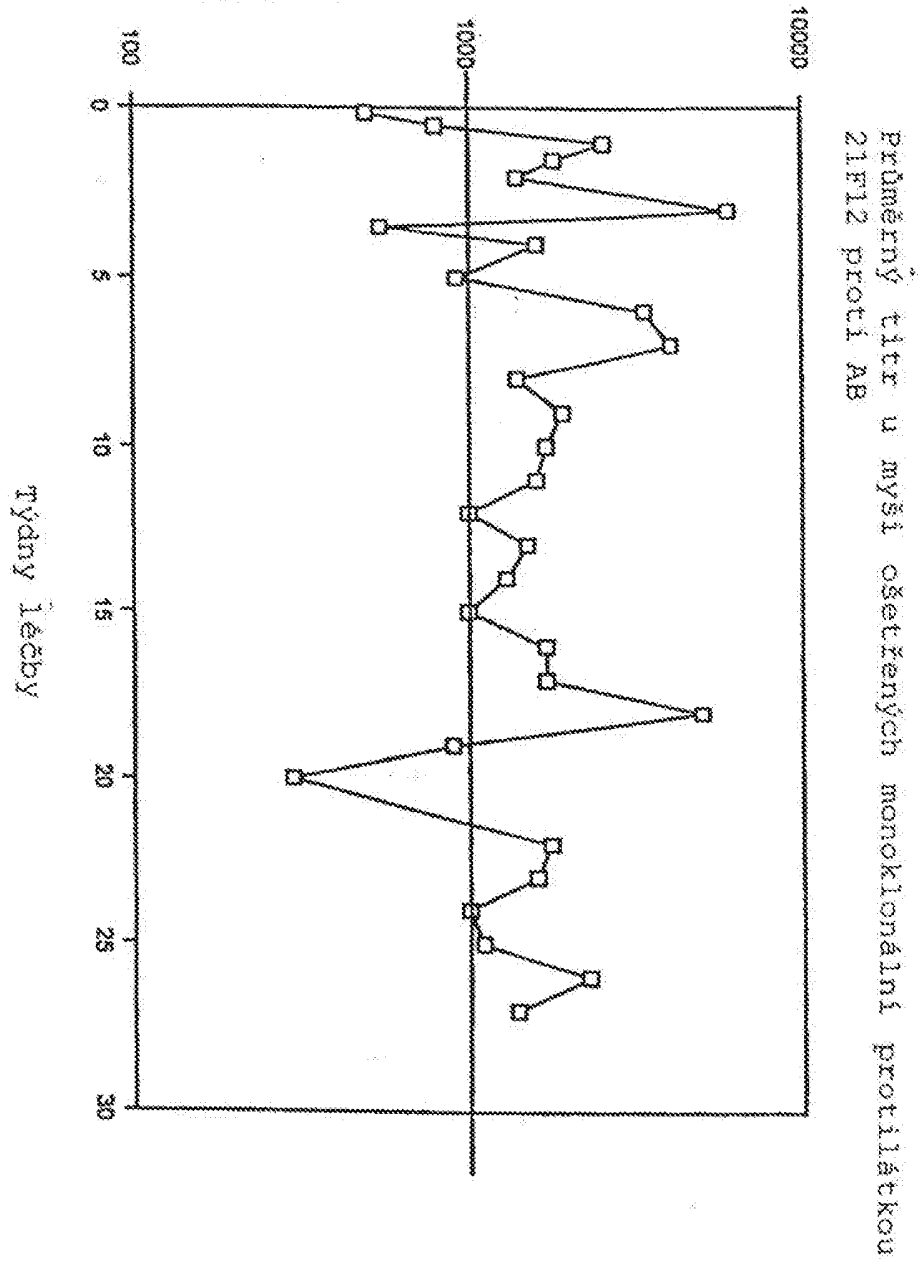
Obrázek č. 16
Průměrný titer protilátek



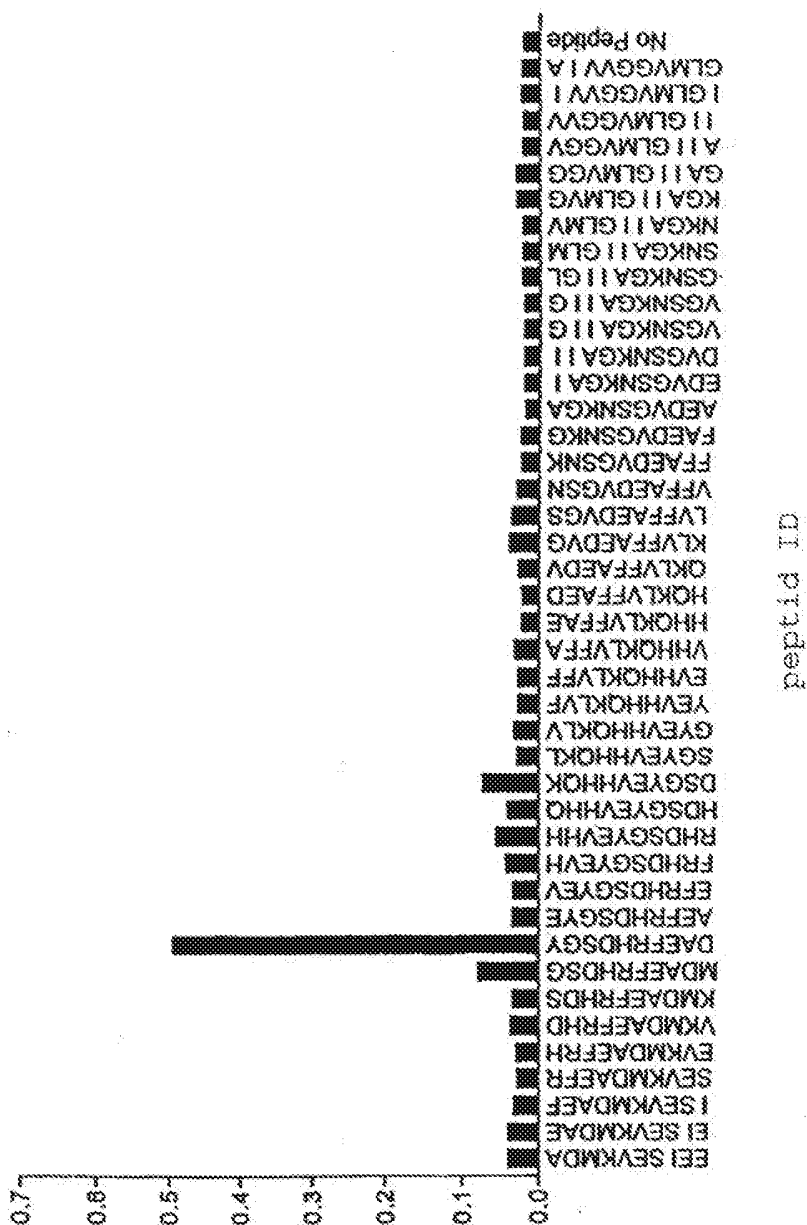
Průměrný titer u myši ošetřených monoklonální protilátkou 10D5 proti AB



Obrázek č. 18
Průměrný titr protilátek

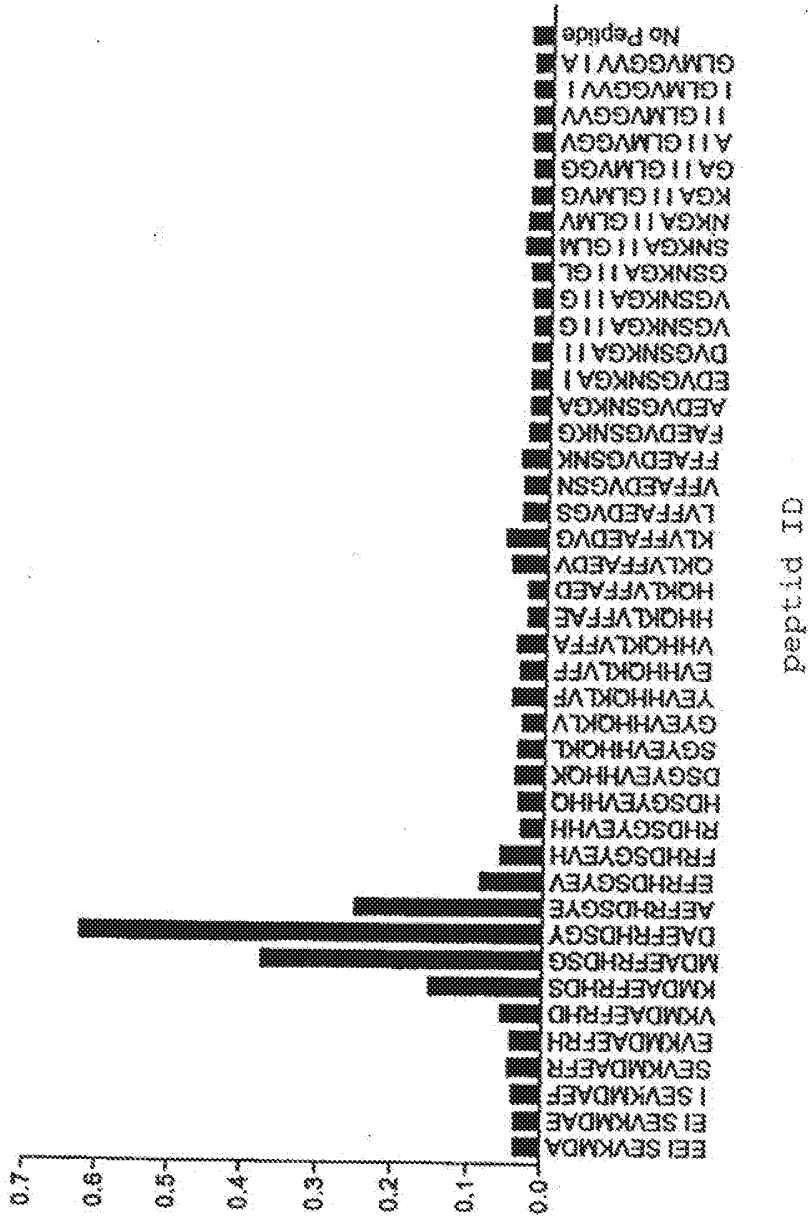


Obrázek č. 19:
 Skupina 9: F10920M, 300 µg AN1792 + 100 µg QS21
 Dávkovací režim 2 titry=84,44 (normalizováno na 8)



Obrázek č. 20:

Skupina 11: F10975M, 300 µg AN1792 + 100 µg QS21
 Dávkovací režim 3 titry=38,632 (normalizováno na 8)



Konec dokumentu