



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 16 467 T2** 2006.11.02

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 294 390 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 16 467.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US01/02118**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 906 632.3**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2001/093893**

(86) PCT-Anmeldetag: **22.01.2001**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **13.12.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **26.03.2003**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **04.01.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **02.11.2006**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **A61K 38/17 (2006.01)**

**A61P 25/16 (2006.01)**

**A61P 25/28 (2006.01)**

(30) Unionspriorität:

**209799 P 07.06.2000 US**

**620216 20.07.2000 US**

(73) Patentinhaber:

**Yeda Research and Development Co., Ltd.,  
Rehovot, IL**

(74) Vertreter:

**Vossius & Partner, 81675 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(72) Erfinder:

**EISENBACH-SCHWARTZ, Michal, 76353 Rehovot,  
IL; YOLES, Eti, 76880 D.N. Nahal Sorek, IL; KIPNIS,  
Jonathan, 71700 Modiin, IL**

(54) Bezeichnung: **Verwendung des Copolymer-1 Peptids sowie von damit verwandten Peptiden und Polypeptiden und von damit behandelten T-Zellen zur Neuroprotektion gegen die Toxizität von Glutamat**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

## BEREICH DER ERFINDUNG

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft Zusammensetzungen und Verwendungen zur Förderung der Nervenregeneration oder zur Prävention oder Hemmung von neuronaler Degeneration, um die Wirkungen von Verletzungen oder Krankheiten des Nervensystems (NS) zu verbessern. Insbesondere betrifft die Erfindung Zusammensetzungen, die Copolymer 1 (Cop 1) oder ein mit Cop 1 verwandtes Peptid oder Polypeptid, und/oder aktivierte T-Zellen, die mit Cop 1 oder einem mit Cop 1 verwandten Peptid oder Polypeptid behandelt werden, umfassen, um die Nervenregeneration zu fördern oder um neuronale Degeneration zu verhindern oder zu hemmen, die durch eine Nervenverletzung oder -Krankheit innerhalb des zentralen Nervensystems oder des peripheren Nervensystems eines menschlichen Individuums verursacht wird. Die Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung können allein verabreicht werden, oder können fakultativ in jeder gewünschten Kombination verabreicht werden.

## HINTERGRUND DER ERFINDUNG

**[0002]** Das Nervensystem umfasst das zentrale und das periphere Nervensystem. Das Zentralnervensystem (ZNS) besteht aus dem Gehirn und dem Rückenmark; das periphere Nervensystem (PNS) besteht aus allen anderen neuronalen Elementen, nämlich den Nerven und Ganglien außerhalb des Gehirns und des Rückenmarks.

**[0003]** Ein Schaden des Nervensystems kann aus einer traumatischen Verletzung, wie einem eindringenden Trauma oder einem stumpfen Trauma, oder einer Krankheit oder Störung, einschließlich der Alzheimer Krankheit, der Parkinsonschen Krankheit, der Huntington Krankheit, amyotropher Lateralsklerose (ALS), diabetischer Neuropathie, seniler Demenz und Ischämie herrühren.

**[0004]** Die Aufrechterhaltung der Unversehrtheit des zentralen Nervensystems ist ein komplexer „Balanceakt“, bei dem Kompromisse mit dem Immunsystem zu schließen sind. In den meisten Geweben spielt das Immunsystem beim Schutz, bei der Reparatur und der Heilung eine wichtige Rolle. Im Zentralnervensystem sind immunologische Reaktionen auf Grund seines einzigartigen Immunprivilegs relativ beschränkt (Streilein, 1993, 1995). Eine wachsende Anzahl an Nachweisen zeigt an, dass das Versagen des zentralen Nervensystems, beim Säuger nach einer Verletzung eine funktionale Erholung zu erzielen, einen ineffektiven Dialog zwischen dem beschädigten Gewebe und dem Immunsystem widerspiegelt. Die eingeschränkte Kommunikation zwischen dem Zentralnervensystem und Makrophagen im Blut beeinträchtigt die Fähigkeit axotomierter Axone erneut zu wachsen; Transplantate von aktivierten Makrophagen können das erneute Wachstum des Zentralnervensystems fördern (Lazarov Spiegler et al, 1996; Rapalino et al, 1998).

**[0005]** Es wurde gezeigt, dass aktivierte T-Zellen unabhängig von ihrer Antigenspezifität in das Parenchym des Zentralnervensystems eindringen, es scheinen jedoch nur T-Zellen dort zu bleiben, die in der Lage sind, mit einem Zentralnervensystem-Antigen zu reagieren (Hickey et al, 1991; Werkele, 1993; Kramer et al, 1995). T-Zellen, die mit Antigenen der weißen Substanz des Zentralnervensystems reagieren, wie basisches Myelinprotein (MBP), können die paralytische Krankheit experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) innerhalb von wenigen Tagen nach ihrer Inokulierung in unbehandelte Empfängerratten induzieren (Ben-Nun, 1981a). Anti-MBP-T-Zellen können ebenfalls an der menschlichen Krankheit Multiple Sklerose beteiligt sein (Ota, K. et al, 1990; Martin, 1997). Trotz ihres pathogenen Potenzials sind jedoch anti-MBP-Zellclone im Immunsystem gesunder Personen vorhanden (Burns, 1983; Pette, M. et al, 1990; Martin et al, 1990; Schluesener et al, 1985). Aktivierte T-Zellen, die normalerweise das intakte Zentralnervensystem patrouillieren, reichern sich transient an Orten mit Läsionen der weißen Substanz des Zentralnervensystems an (Hirschberg et al, 1998).

**[0006]** Eine katastrophale Konsequenz von Verletzungen des zentralen Nervensystems ist, dass der primäre Schaden häufig mit dem schrittweisen sekundären Verlust von benachbarten Neuronen verbunden ist, die durch die anfängliche Verletzung offensichtlich unbeschädigt oder nur marginal beschädigt waren (Faden et al, 1992; Faden 1993; McIntosh, 1993). Die primäre Läsion verursacht Veränderungen in den extrazellulären Ionenkonzentrationen, die Zunahme der Menge an freien Radikalen, die Freisetzung von Neurotransmittern, die Entfernung von Wachstumsfaktoren und lokale Entzündungen. Diese Veränderungen lösen eine Kaskade destruktiver Vorgänge in den benachbarten Neuronen aus, die der primären Verletzung anfänglich entkommen sind (Lynch et al, 1994; Bazan et al, 1995; Wu et al, 1994). Dieser sekundäre Schaden wird durch die Aktivierung von spannungsabhängigen oder Agonistgesteuerten Kanälen, Ionenlecks, Aktivierung von calciumabhängigen Enzymen wie Proteasen, Lipasen und Nucleasen, Mitochondrien-Dysfunktion und Energieverlust

vermittelt, was in neuronalem Zelltod kulminiert (Yoshina et al, 1991; Hovda et al, 1991; Zivin et al, 1991; Yoles et al, 1992). Der weitverbreitete Verlust von Neuronen, der über den Verlust hinausgeht, der direkt durch die primäre Verletzung verursacht wird, wurde „sekundäre Degeneration“ genannt.

**[0007]** Einer der üblichsten Vermittler, die eine Eigenvermehrung der Krankheit verursachen, auch wenn der primäre Risikofaktor entfernt oder abgeschwächt ist, ist Glutamat, eine excitatorische Aminosäure, die in der Lage ist, eine duale Aktivität zu zeigen: sie spielt eine zentrale Rolle im normalen Zentralnervensystem (ZNS), wobei sie als wichtiger Neurotransmitter fungiert, sie wird jedoch toxisch, wenn ihre physiologischen Mengen überstiegen werden. Von einem Anstieg des Glutamats wurde bei vielen ZNS-Störungen berichtet. In seiner Rolle als excitatorische Verbindung ist Glutamat einer der üblichsten Vermittler von Toxizität bei akuten und chronischen degenerativen Störungen (einschließlich der Degeneration des Sehnervs beim Glaucom) (Pitt et al, 2000 und Schoepp et al, 1996). Endogenes Glutamat wurde dem Hirnschaden zugeschrieben, der akut nach Status epilepticus, cerebraler Ischämie oder traumatischen Gehirnverletzungen auftritt. Es kann ebenfalls zur chronischen Neurodegeneration in Störungen wie amyotropher Lateralsklerose und Chorea Huntington beitragen.

**[0008]** Intensive Forschung wurde darauf verwendet, die cytotoxische Wirkung von Glutamat durch die Verwendung von örtlich wirkenden Wirkstoffen wie NMDA-Rezeptorantagonisten (Brauner-Osborne et al, 2000) abzuschwächen. Herkömmliche Therapie dieser Art ist oft nicht zufriedenstellend, wobei es jedoch bei der Neutralisation der toxischen Wirkung wahrscheinlich ist, dass es mit der physiologischen Funktion interferiert. Beim Menschen haben solche Verbindungen psychotrope und andere Nebenwirkungen, die sie als therapeutische Mittel ungeeignet werden lassen. Sie haben auch den Nachteil, dass sie mit der essenziellen physiologischen Funktion von Glutamat als einem ubiquitären ZNS-Neurotransmitter interferieren. Da die Glutamat-Aktivität für die normale physiologische Funktion essenziell ist, jedoch potenziell nach akuter Verletzung oder bei chronischen ZNS-Störungen verheerend ist, muss jeder Versuch, seine gefährliche Wirkung zu neutralisieren, dies tun, ohne seine essenzielle Aktivität an anderen Stellen im Körper zu eliminieren.

**[0009]** Eine andere tragische Folge von Verletzungen des zentralen Nervensystems ist, dass Neuronen im Säuger-Zentralnervensystem nach einer spontanen Verletzung keine spontane Regeneration erfahren. Somit verursacht eine Verletzung des zentralen Nervensystems eine ständige Verschlechterung motorischer und sensorischer Funktionen.

**[0010]** Läsionen des Rückenmarks ergeben anfänglich, unabhängig von der Schwere der Verletzung, eine vollständige funktionale Lähmung, bekannt als Spinalschock. Eine spontane Erholung von Spinalschock kann beobachtet werden, die wenige Tage nach der Verletzung beginnt und innerhalb von drei oder vier Wochen langsam aufhört. Je weniger schwer die Verletzung, desto besser das funktionelle Ergebnis. Das Ausmaß der Erholung ist eine Funktion der Menge an unbeschädigtem Gewebe minus dem Verlust auf Grund von sekundärer Degeneration. Eine Erholung von der Verletzung würde durch neuroprotektive Behandlung verbessert werden, die die sekundäre Degeneration reduzieren könnte. Zum Beispiel ist ein Ausschalten der Wirkung von Glutamat ein häufiges Ziel der neuroprotektiven Wirkstoffentwicklung. Unter den Wirkstoffen, die für diesen Zweck entwickelt werden, sind N-Methyl-D-aspartat(NMDA)-Rezeptor oder alpha-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure(AMPA)-Rezeptorantagonisten. Diese Wirkstoffe werden unvermeidlicherweise schwere Nebenwirkungen haben, da sie mit der Funktion der NMDA- und AMPA-Rezeptoren interferieren, die für die ZNS-Aktivität entscheidend sind. Einer der am intensivsten untersuchten NMDA-Rezeptor-Antagonisten ist MK801, das eine wirksame Neuroprotektion bereitstellt, jedoch mit schweren Nebenwirkungen. Bei Tiermodellen von cerebraler Ischämie und traumatischer Hirnverletzung schützen NMDA- und AMPA-Rezeptorantagonisten gegen akute Hirnschädigung und verzögerten Verhaltensmängel. Solche Verbindung werden am Menschen getestet, eine therapeutische Wirksamkeit muss jedoch noch etabliert werden. Andere klinische Zustände, die auf Wirkstoffe reagieren können, die auf die Übertragung durch Glutamat wirken, umfassen Epilepsie, Amnesie, Angst, Hyperalgesie und Psychose (Meldrum, 2000).

**[0011]** Im Labor der vorliegenden Erfinder wurde kürzlich entdeckt, dass aktivierte T-Zellen, die ein Antigen des Nervensystems (NS) des Patienten erkennen, die Nervenregeneration fördern beziehungsweise die Neuroprotektion übertragen. Es wird sich auf die PCT-Veröffentlichung WO 99/60021 bezogen.

**[0012]** Genauer, es wurde gezeigt, dass T-Zellen, die auf MBP reagieren, in Rattenmodellen von teilweise gequetschtem Sehnerv (Moalem et al, 1999) und bei Verletzung des Rückenmarks (Hauben et al, 2000) neuroprotektiv sind. Bis vor kurzem dachte man, dass das Immunsystem Immunzellen bei der Beteiligung an der Reparatur des Nervensystems ausschloss. Es war recht überraschend festzustellen, dass NS-spezifische aktivierte T-Zellen bei der Förderung der Nervenzellregeneration oder dem Schutz des Nervensystem-Gewebes

vor sekundärer Degeneration, die einem Schaden, der durch Verletzung oder Krankheit des ZNS oder PNS verursacht wurde, folgen kann, verwendet werden können.

**[0013]** NS-spezifische aktivierte T-Zellen, wie in der Veröffentlichung WO 99/60021 beschrieben, sind aktivierte T-Zellen, die eine Spezifität für ein Antigen des NS eines Patienten haben. Das Antigen, das verwendet wurde, um den T-Zellen die Spezifität zu verleihen, kann ein eigenes NS-Antigen des Patienten sein, ein Peptid, das davon abstammt, oder ein NS-Antigen eines anderen Individuums oder sogar einer anderen Art, oder ein Peptid, das davon abstammt, solange die aktivierte T-Zelle ein Antigen im NS des Patienten erkennt.

**[0014]** Die NS-spezifischen aktivierten T-Zellen sind für die Verwendung zur Förderung der Nervenregeneration oder zur Vorbeugung oder Hemmung der Wirkungen einer Erkrankung. Wenn die behandelte Erkrankung eine Autoimmunerkrankung ist, bei der das Autoimmun-Antigen ein NS-Antigen ist, sind die T-Zellen, die zur Behandlung einer durch eine solche Erkrankung verursachten neuronalen Störung oder Degeneration verwendet werden, nicht gegen das gleiche an der Krankheit beteiligten Autoimmun-Antigen aktiviert.

**[0015]** Die vorstehend zitierte PCT-Veröffentlichung WO 99/60021 offenbart, dass eine Therapie zur Linderung der Wirkungen von Verletzung oder Erkrankung, die eine Verabreichung von NS-spezifischen aktivierten T-Zellen umfasst, gegebenenfalls in Kombination mit einem NS-spezifischen Antigen oder einem davon abgeleiteten Peptid erfolgen kann. Ein NS-spezifisches Antigen wie in der WO 99/60021 definiert, bezieht sich auf ein Antigen, das spezifisch T-Zellen aktiviert, so dass nach der Aktivierung die aktivierten T-Zellen sich an einer Verletzungs- oder Erkrankungsstelle in dem NS des Patienten anreichern. Weiterhin kann die orale Verabreichung von NS-spezifischem Antigen oder einem davon abgeleiteten Peptid mit einer aktiven Immunisierung kombiniert werden, um eine kritische T-Zell-Antwort unmittelbar nach der Verletzung zu erzeugen.

**[0016]** In dieser vorherigen Erfindung kann das NS-spezifische Antigen, das verwendet wird, um die T-Zellen in vitro oder in vivo zu aktivieren, oder um den Patienten zu immunisieren, ein Antigen sein, das von NS-Gewebe erhalten wird, vorzugsweise von Gewebe an einer Stelle der NS-Verletzung oder -Krankheit. Es stellte sich heraus, dass natürliche oder synthetische Antigene oder Epitope MBP, MOG, PLP, MAG, S-100,  $\beta$ -Amyloid, Thy-1, P0, P2 und einen Neurotransmitter-Rezeptor umfassen. Spezifische veranschaulichende Beispiele für solche nützlichen NS-spezifischen Antigene, die in WO 99/60021 offenbart sind, sind menschliches MBP, menschliches Proteolipid-Protein (PLP) und menschliches Oligodendrocyten-Glycoprotein. Ebenfalls offenbart wurden Peptide, die von NS-spezifischen Selbst-Antigenen oder Derivaten von NS-spezifischen Antigenen abstammen, die T-Zellen aktivieren, jedoch keine Autoimmunkrankheit induzieren, wie ein Peptid, das die Aminosäuren 51–70 von basischem Myelinprotein (MBP) umfasst.

**[0017]** Der Wirkmechanismus solcher NS-spezifischer T-Zellen muss noch entdeckt werden, jedoch legt die massive Anreicherung von exogen verabreichten T-Zellen an der Stelle der ZNS-Verletzung nahe, dass die Gegenwart von T-Zellen an der Stelle der Verletzung eine hervorstechende Rolle bei der Neuroprotektion spielt. Es scheint jedoch, dass die Anreicherung, obwohl eine notwendige Bedingung, für den Zweck nicht ausreicht, da sich T-Zellen, die für das nicht-Selbst-Antigen Ovalbumin spezifisch sind, ebenfalls an der Stelle anreichern, jedoch keine neuroprotektive Wirkung haben (Hirschberg et al, 1998).

**[0018]** Ein basisches synthetisches Zufalls-Copolymer, das aus L-Ala-, L-Glu-, L-Lys- und L-Tyr-Resten besteht, im molaren Verhältnis von etwa 6 Teilen Ala zu 2 Teilen Glu zu 4,5 Teilen Lys zu einem Teil Tyr, und das ein Molekulargewicht von 15.000–25.000 hat, wurde zuerst im US-Patent Nr. 3.849.550 als Mittel zur Behandlung oder zur Prävention von experimenteller allergischer Encephalomyelitis (EAE), einer Krankheit, die Multipler Sklerose (MS) ähnelt, die in empfänglichen Tieren induziert werden kann, beschrieben. Es zeigte sich, dass Sätze von diesem Copolymer mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 23.000, genannt Copolymer 1 oder Cop 1, beim Schutz und bei der Unterdrückung von EAE bei verschiedenen Tierarten sehr wirksam waren (Teitelbaum et al, 1971, 1974a, 1974b).

**[0019]** Später zeigte sich, dass Cop 1 die Anzahl von Rückfällen bei Patienten mit schubförmigem Form von MS (Bornstein et al, 1990; Sela et al, 1990; Johnson et al, 1994) reduzierte. Copolymer 1, in Form der Acetat-salze von synthetischen Polypeptiden, die L-Glu, L-Ala, L-Tyr und L-Lys mit einer durchschnittlichen molaren Fraktion von 0,141, 0,427, 0,095 und 0,338 enthalten, ist aktiver Bestandteil von COPAXONE<sup>®</sup>, einem Medikament zur Behandlung von Multipler Sklerose.

**[0020]** Es ist somit offensichtlich, dass die Wirkung von Copolymer 1 bei der Behandlung von MS im Erreichen einer Unterdrückung oder Deaktivierung von Autoimmun-T-Zell-Reaktivität gegen Myelin-Antigene bei Patienten mit Multipler Sklerose liegt. Zu diesem Zweck wird Copolymer 1 ohne Adjuvans durch tägliche subkutane

Injektion verabreicht.

**[0021]** Cop 1 wurde ursprünglich hergestellt, um MBP nachzuahmen und um EAE zu induzieren, es wurde jedoch herausgefunden, dass es nicht encephalitogen ist und dass es sogar EAE, das durch MBP (Teitelbaum et al, 1971), (PLP) (Teitelbaum et al, 1996) oder (MOG) (Ben-Nun et al, 1996) induziert wird, unterdrückt. Die genauen Mechanismen, durch die Cop 1 die Entwicklung von EAE verhindert und Multiple Sklerose (MS) verbessert, sind noch nicht bekannt. Trotzdem sind einige wichtige immunologische Eigenschaften dieses Copolymers aufgetaucht. Untersuchungen zeigten eine teilweise Kreuzreaktivität von Cop 1 mit MBP sowohl auf der Ebene der T-Zellen (Webb et al, 1973) als auch der Antikörper (Teitelbaum et al, 1988). Cop 1 kann als ein Antagonist des T-Zell-Antigenrezeptors für das immun-dominante MBP-Epitop (Aharoni, 1998) dienen. Es kann auch an verschiedene MHC Klasse II-Moleküle binden und sie von einer Bindung an T-Zellen mit spezifischen Antigen-Erkennungseigenschaften abhalten (Fridkis-Hareli et al, 1999a). Bei Wiederkäuern induziert Cop 1 regulatorische Zellen, die wahrscheinlich als Zuschauer-Suppressoren von encephalitogenen T-Zellen wirken (Aharoni, 1998). Es zeigte sich, dass der adoptive Transfer solcher T-Zellen die Entwicklung von EAE, das durch MBP (Aharoni et al, 1993), PLP (Aharoni, 1998) oder das gesamte Rückenmarks-Homogenat (Aharoni et al, 1997) induziert war, verhindert. Des Weiteren wurde von einem direkten Hinweis darauf berichtet, dass es sowohl eine kompetitive Interaktion von Cop 1 und damit in Verbindung stehenden Copolymeren und Kollagen II (CII)-Peptid mit den mit rheumatoider Arthritis (RA) in Verbindung stehenden HLA-DR-Molekülen und eine Hemmung der CII-spezifischen Zellreaktionen gab, was nahe legt, dass diese Verbindungen gegen rheumatoide Arthritis wirksam sein können (Fridkis-Hareli, 1998, 1999b).

**[0022]** Die orale Verabreichung von Autoantigenen zur Erhaltung von „oralen Toleranz“ wurde für die Behandlung verschiedener Autoimmunkrankheiten offenbart. Zum Beispiel offenbart EP 359 783 die orale Verabreichung von MBP für die Behandlung von Multipler Sklerose. Die internationalen PCT-Veröffentlichungen WO 91/12816, WO 91/08760 und WO 92/06704 offenbaren alle die Behandlung anderer Autoimmunkrankheiten, wobei das orale Toleranzverfahren mit verschiedenen Auto-Antigenen verwendet wird. Die Behandlung von Multipler Sklerose durch die Aufnahme oder Inhalation von Copolymer 1, um eine Unterdrückung der autoimmun T-Zellreaktion auf Myelin-Antigene zu erreichen, wurde in der PCT-Veröffentlichung WO 98/30227 offenbart.

**[0023]** Verbindungen, die mit Copolymer 1 in Verbindung stehen, wurden ebenfalls untersucht und es wurde herausgefunden, dass sie ähnliche Eigenschaften wie Copolymer 1 haben. Zum Beispiel binden Copolymere, die aus drei der vier Aminosäuren zusammengesetzt sind, die in Copolymer 1 zu finden sind, an gereinigte MHC Klasse II-Moleküle (Fridkis-Hareli et al., 1999a, WO 005250). Zusätzlich wurden Bindungsmotive von Copolymer 1 an mit multipler Sklerose und rheumatoider Arthritis in Verbindung stehende HLA-DR-Moleküle kürzlich erläutert (Fridkis-Hareli et al, 1999b). Von diesen Bindungsmotiven können Polypeptide einer festgelegten Sequenz leicht vorhergesagt und auf die Bindung an die Peptid-Bindungstasche der HLA-DR-Moleküle getestet werden. Von diesen Peptiden würde erwartet, dass sie auf eine Weise wirken, die der von Cop 1 selbst ähnlich ist. Beispiele für solche synthetischen Peptide sind in WO 005249 offenbart.

**[0024]** Ein Zitat oder eine Identifizierung eines Dokuments in diesem Abschnitt oder einem anderen Teil dieser Anmeldung soll nicht als Zugeständnis verstanden werden, dass ein solches Dokument als Stand der Technik für die Erfindung erhältlich ist.

#### ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0025]** Die vorliegende Erfindung ist auf Verwendungsmöglichkeiten und Zusammensetzungen für die Förderung der Nervenregeneration oder die Prävention oder Inhibition von neuronale Degeneration, zur Verbesserung und Behandlung der Auswirkungen einer Verletzung oder Krankheit des Nervensystems (NS) gerichtet. Die vorliegende Erfindung basiert zum Teil auf der unerwarteten Entdeckung der Anmelder, dass gegen Cop 1 aktivierte T-Zellen die Nervenregeneration fördern oder Neuroprotektion verleihen. Sie basiert weiterhin zum Teil auf der unerwarteten Entdeckung der Erfinder, dass aktivierte T-Zellen gegen Cop 1 die Nervenzellen vor Glutamat-Toxizität schützen. Wie hierin verwendet bezieht sich „Neuroprotektion“ auf die Prävention oder Inhibition von degenerativen Wirkungen einer Verletzung oder Krankheit im NS, einschließlich dem Schutz vor den sekundären neurodegenerativen Wirkungen, die sogar dann fortbestehen, wenn der primäre Risikofaktor entfernt oder abgeschwächt wird. Dies umfasst sowohl den Schutz der weißen Substanz als auch der grauen Substanz. Bis vor kurzem wurde angenommen, dass das Immunsystem Immunzellen von der Teilnahme an der Reparatur des Nervensystems ausschloss. Es war recht überraschend festzustellen, dass Cop 1-aktivierte Zellen verwendet werden können, um die Nervenregeneration zu fördern oder um Gewebe des Nervensystems vor sekundärer Degeneration zu schützen, das einer Schädigung, verursacht durch Verletzung oder

Krankheit des ZNS oder PNS, folgen kann. „Aktivierte T-Zellen“, wie hierin verwendet, umfasst (i) T-Zellen, die durch Exposition zu Cop 1 oder ein Cop 1-verwandtes Peptid oder Polypeptid aktiviert wurden und (ii) Abkömmlinge solche aktivierter T-Zellen. In einer Ausführungsform beschreibt die vorliegende Erfindung Arzneimittel, die eine therapeutisch wirksame Menge von Cop 1-spezifischen aktivierten T-Zellen umfasst und bedient sich solcher Zusammensetzungen für die Herstellung eines Medikaments zur Förderung der Nervenregeneration oder zur Prävention oder Inhibition von neuronaler Degeneration im ZNS oder PNS, in einer Menge, die zur Verbesserung der Auswirkungen einer Verletzung oder Krankheit des NS wirksam ist. „Cop 1-spezifische aktivierte T-Zellen“, wie hierin verwendet, bezieht sich auf aktivierte T-Zellen, die eine Spezifität zu Cop 1 oder ein Cop 1-verwandtes Peptid oder Polypeptid haben.

**[0026]** Die Cop 1-spezifischen aktivierten T-Zellen werden verwendet für die Herstellung eines Medikaments zur Förderung der Nervenregeneration oder zur Prävention oder Inhibition sekundärer degenerativen Wirkungen, die einer primären NS-Verletzung oder den Auswirkungen von neurodegenerativen Vorgängen, verursacht durch eine Krankheit oder einen Zustand, wie im folgenden Abschnitt (3) beschrieben, jedoch ausschließlich Multipler Sklerose, folgen können. Nichtbeschränkende Beispiele, einschließlich Glaukom, Schlaganfall, Ischämie, Schussverletzungen und Hirnschädigungen, die durch gefährliche Sportarten verursacht werden. Die Cop 1-spezifischen aktivierten T-Zellen dienen nicht nur der Bereitstellung von Neuroprotektion gegen primäre und sekundäre Risikofaktoren, die mit Myelin (weiße Substanz) in Verbindung stehen, sondern, im Hinblick auf den nachgewiesenen Schutz gegen Glutamat-Toxizität, ebenfalls gegen primäre und sekundäre Risikofaktoren, die mit den neuronalen Zellkörpern selbst (graue Substanz) in Verbindung stehen. Somit ist zu erwarten, dass Cop 1-spezifische aktivierte T-Zellen für den Zweck der vorliegenden Erfindung nützlich sind und durch bekannte Immuntherapie-Verfahren nicht vorgeschlagen würden. Des Weiteren wirkt Cop 1 nicht nur über Kreuzreaktion mit Myelin, da es vor Glutamat-Toxizität schützt. Es muss auch eine regulatorische Aktivität haben, wie zum Beispiel durch die Erzeugung von regulatorischen Zellen oder regulatorischen Stoffen. Hinsichtlich dieser regulatorischen Aktivität wird erwartet, dass die Cop 1-Impfung und die Cop 1-spezifischen aktivierten T-Zellen auch die weiße und die graue Substanz vor einem Schaden durch oxidativen Stress und andere Schadensquellen an Nervenzellen schützen. Zusätzlich kann die vorliegende Erfindung auf Grund dieser regulatorischen Aktivität auch verwendet werden, um Nervenzellen nicht nur vor Multipler Sklerose, wie auf dem Fachgebiet empfohlen, sondern auch vor anderen Autoimmunkrankheiten als Multipler Sklerose zu schützen. Die vorliegende Erfindung beschreibt auch Arzneimittel, die eine therapeutisch wirksame Menge an Cop 1 oder einem Cop 1-verwandten Peptid oder Polypeptid umfassen und Verwendungsmöglichkeiten solcher Zusammensetzungen für die Herstellung eines Medikaments zur Förderung der Nervenregeneration oder zur Prävention oder Inhibition von neuronaler Degeneration im ZNS oder PNS, wobei die Menge zur Aktivierung von T-Zellen in vivo oder in vitro wirksam ist, worin die aktivierten T-Zellen die Auswirkungen einer Verletzung oder Krankheit des NS hemmen. In der Praxis der Erfindung kann die Verwendung von Cop 1-spezifischen aktivierten T-Zellen für die Herstellung eines Medikaments zur Therapie für die Verbesserung und Behandlung der Auswirkungen einer Verletzung oder einer Krankheit optional in Kombination mit Cop 1 oder einem mit Cop 1 verwandten Peptid oder Polypeptid stattfinden. Zusätzlich ist die Verwendung von Cop 1 oder einem mit Cop 1 verwandten Peptid- oder Polypeptid-Antigen zur Herstellung eines Medikaments, das für die orale Verabreichung geeignet ist, zur Neuroprotektion nach Priming mit Cop 1, das in einem Adjuvans verabreicht ist, wirksam. Somit kann orales Cop 1 verwendet werden, um die Aktivität der T-Zellen nach der primären Aktivierung eines solchen Cop 1, vorzugsweise in einem Adjuvans, zu verstärken, um direkt nach der Verletzung eine kritische T-Zellreaktion aufzubauen.

**[0027]** Des Weiteren beschreibt die Anmeldung, dass Zellbanken eingerichtet werden können, um mit Cop 1 sensibilisierte T-Zellen für neuroprotektive Behandlung von Individuen zu einem späteren Zeitpunkt, an dem sie gebraucht werden, zu lagern. In diesem Fall können autologe T-Zellen von einem Individuum erhalten werden. Alternativ können allogene oder semi-allogene T-Zellen gelagert werden, so dass eine Bank von T-Zellen, jeweils von den üblichsten MHC-Klasse II-Typen vorhanden sind. Im Fall, dass ein Individuum wegen einer Verletzung behandelt werden muss, werden vorzugsweise autologe, gelagerte T-Zellen für die Herstellung eines Medikaments verwendet, sind jedoch autologe T-Zellen nicht erhältlich, so sollten Zellen verwendet werden, die ein MHC-Typ II-Molekül mit dem Patienten gemein haben, und es würde erwartet, dass diese in dem Individuum verwendbar sind. Die Zellen werden vorzugsweise nach Exposition zu Cop 1 oder einem mit Cop 1 verwandten Peptid oder Polypeptid in aktiviertem Zustand gelagert. Die Zellen können jedoch auch in ruhenem Zustand gelagert werden und aktiviert werden, wenn sie aufgetaut und für die Verwendung vorbereitet sind. Die Zelllinien der Bank sind vorzugsweise kryokonserviert. Die Zelllinien sind auf eine Weise hergestellt, wie auf dem Fachgebiet wohlbekannt ist. Wenn die Zellen aufgetaut sind, werden sie vorzugsweise vor der Injektion gezüchtet, um nicht lebensfähige Zellen zu eliminieren. Während dieser Züchtung können die Zellen unter Verwendung des Cop 1-Antigens oder -Peptids wie in der ursprünglichen Aktivierung aktiviert oder reaktiviert werden. Alternativ kann eine Aktivierung durch Züchtung in Gegenwart eines Mitogens wie Phytohäm-

agglutinin (PHA) oder Concanavalin A (vorzugsweise ersteres) erreicht werden. Dies wird die Zellen in einen noch höheren Aktivierungszustand bringen. Die wenigen Tage, die man benötigt, um die Zellen zu züchten, sollten für den Patienten nicht schädlich sein, da die Behandlung gemäß der vorliegenden Erfindung zu jeder Zeit bis zu einer Woche nach der Verletzung stattfinden kann, um noch wirksam zu sein. Alternativ können die gelagerten Zellen, wenn die Zeit drängt, direkt nach dem Auftauen verabreicht werden.

#### KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

**[0028]** [Fig. 1A](#) und [Fig. 1B](#) sind Graphiken, die die Anzahl von markierten (überlebenden) RGCs/mm<sup>2</sup> in Netzhäuten zeigen, die von Ratten ausgeschnitten waren, denen PBS in unvollständigem Freund's Adjuvans (IFA) (in den Figuren mit PBS gekennzeichnet) oder Cop 1-spezifische T-Zellen in IFA (als Tcop1 gekennzeichnet) direkt nach leichter ([Fig. 1A](#)) oder schwerer ([Fig. 1B](#)) Verletzung des Sehnervs injiziert worden war.

**[0029]** [Fig. 2A](#) und [Fig. 2B](#) sind Graphiken, die den ELISA von sezernierten neurotrophen Faktoren darstellen. Ratten-anti-MBP (weiße Säulen in [Fig. 2A](#))- oder -anti-Cop 1 (schwarze Säulen in [Fig. 2A](#))-T-Zellen wurden 48 Stunden mit ihrem spezifischen Antigen in Stimulierungsmedium gezüchtet. Die T-Zellüberstände wurden aufgefangen und einem Sandwich-ELISA unterzogen. Die Graphik zeigt die Konzentration von NT3, BDNF, NGF und NT-4/5, die in jeder Probe sezerniert wurden. Die Verhältnisse der Mengen an BDNF oder NT-3, die durch anti-Cop 1-T-Zellen sezerniert wurden, zu den Mengen, die durch anti-MBP-T-Zellen sezerniert wurden, sind in [Fig. 2B](#) gezeigt. Die mittleren Verhältnisse  $\pm$  SD von fünf unabhängigen Versuchen mit Neurotrophin (NT) werden gezeigt.

**[0030]** [Fig. 3](#) ist eine Graphik, die zeigt, wie eine Immunisierung mit Cop 1 Sehnervenfasern vor sekundärer Degeneration schützt. Direkt nach leichter Verletzung des Sehnervs wurden Ratten subkutan mit PBS in IFA oder Cop 1 in IFA immunisiert. Um die sekundäre Degeneration festzustellen, wurde zwei Wochen nach der Quetschverletzung die Neurotracer-Färbung 4-Di-10-Asp distal zur Stelle der Verletzung auf den Sehnerv aufgetragen. Fünf Tage später wurden die Ratten getötet und ihre Netzhäute wurden ausgeschnitten und flach aufpräpariert. Markierte (überlebende) RGCs von vier Feldern, die sich in jeder Netzhaut in etwa demselben Abstand von der Papille befanden, wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop gezählt. Die neuroprotektive Wirkung der Cop 1-Immunisierung im Vergleich zu der der PBS-Injektion war signifikant ( $P < 0,05$ , Student's t-Test). Die Ergebnisse sind die Summe von zwei Versuchen. Jede Gruppe enthielt acht bis zehn Ratten.

**[0031]** [Fig. 4](#) ist eine Graphik, die zeigt, wie eine Immunisierung mit Cop 1 die Sehnervenfasern vor Glutamat-Toxizität schützt. Mäuse wurden mit Cop 1 immunisiert, das in vollständigem Freund's Adjuvans (CFA) emulgiert war, und Kontrollmäusen wurde CFA allein injiziert. Einem Auge jeder Maus wurde dann Kochsalzlösung allein und dem anderen Kochsalzlösung, die 200 nMol Glutamat enthielt, injiziert. Sieben Tage nach der Glutamat-Verabreichung wurden die Netzhäute ausgeschnitten und flach aufpräpariert. Markierte (überlebende) retinale Ganglionzellen (RGCs) wurden gezählt. Die Säulen zeigen die übriggebliebenen RGCs als prozentualer Anteil der Kontrolle für die mit CFA behandelten Mäuse, die entweder Kochsalzlösung oder Kochsalzlösung mit Glutamat erhielten, und die mit CFA-Cop 1 behandelten Mäuse, die entweder Kochsalzlösung oder Kochsalzlösung mit Cop 1 erhielten.

**[0032]** [Fig. 5A](#) und [Fig. 5B](#) zeigen, dass die Immunisierung mit pMOG ([Fig. 5A](#)) oder die passive Übertragung von anti-MBP-Zellen ([Fig. 5B](#)) die Mäuse-RGCs vor der Glutamat-Toxizität nicht schützt. In [Fig. 5A](#) wurden C57BL/6J-Mäuse 14 Tage bevor ihre RGCs durch intravitreale Injektion von L-Glutamat (200 nMol) direkt einer Glutamat-Toxizität ausgesetzt wurden, mit pMOG immunisiert. Vier Tage später wurden die RGCs mit FluoroGold rückläufig markiert, und diesem folgte nach drei Tagen ein Ausschneiden der Netzhaut und Zählen (vgl. Abschnitt Material und Methoden von Beispiel 3, Versuch 2). RGC-Überleben wird als Mittelwert  $\pm$  SEM pro mm<sup>2</sup> ausgedrückt. Es wurden zwischen den Gruppen, die mit pMOG in CFA behandelt wurden ( $n = 8$ ) und der Kontrollgruppe, die mit PBS in CFA behandelt wurde ( $n = 7$ ) keine signifikanten Unterschiede des RGC-Überlebens beobachtet. In [Fig. 5B](#) wurde Glutamat intravitreal in Lewis-Ratten injiziert. Vier Tage später wurden die RGCs durch Aufbringen der Färbung 4-Di-10-Asp markiert, und diesem folgte nach fünf Tagen ein Ausschneiden der Netzhaut und Zählen. Es ist zu bemerken, dass sich das Überleben der Netzhaut in der mit T-Zellen behandelten Gruppe nicht signifikant von dem in der Kontrollgruppe unterschied (Anzahl von RGCs pro mm<sup>2</sup>, Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n = 6$  in jeder Gruppe)).

**[0033]** [Fig. 6A](#) und [Fig. 6B](#) zeigen das Eindringen von Lymphocyten nach intravitrealer Injektion von Glutamat. Glutamat wurde intravitreal in C57bl/6-Mäuse injiziert. Nach 24 h wurde das Auge entfernt und für die Histologie weiterverarbeitet. Mit H&E gefärbte Schnitte (10  $\mu$ m dick) sowohl von den mit Glutamat injizierten ([Fig. 6A](#)) als auch den Kontrollmäusen ([Fig. 6B](#)) sind gezeigt. Balken = 200  $\mu$ m.

**[0034]** [Fig. 7](#) zeigt die Überlebensrate retinaler Ganglionzellen nach Verletzung des Sehnervs. Die RGCs von adulten Balb/c Inzuchten wurden 10 Tage nachdem sie mit 50 µg Cop-1, das in CFA emulgiert war, immunisiert worden waren, rückläufig mit FluoroGold markiert (vgl. Abschnitt Material und Methoden von Beispiel 3, Versuch 2). Kontrollmäuse wurden PBS in CFA injiziert (n = 8 – 12 in jeder Gruppe). Drei Tage nach Markieren der RGCs wurden die Mäuse einer schweren Quetschverletzung des intraorbitalen Abschnitts des Sehnervs unterworfen. Zwei Wochen nach der Verletzung wurden die Netzhäute ausgeschnitten und ihre markierten RGCs wurden gezählt (vgl. Abschnitt Material und Methoden von Beispiel 3, Versuch 2). Verglichen mit den nicht-immunisierten Kontrollen waren die Überlebensraten bei Mäusen, die mit Cop-1 in CFA immunisiert waren, signifikant höher ( $p < 0,001$ , Students t-Test).

**[0035]** [Fig. 8A–Fig. 8D](#) zeigen die Neuroprotektion vor Glutamat-Toxizität durch aktive Immunisierung mit Cop-1. In [Fig. 8A](#) wurden Mäuse zehn Tage vor Glutamat-Injektion durch subkutane Injektion mit Cop-1 in CFA (5 mg/ml Bakterien) immunisiert, oder ihnen wurde PBS in CFA injiziert. Die Ergebnisse eines Versuchs sind gezeigt (n = 5 in jeder Gruppe). Die Anzahl an überlebenden RGCs pro mm<sup>2</sup> (Mittelwert ± SEM) war bei den mit Cop-1 immunisierten Mäusen signifikant höher als bei den Mäusen, denen PBS in CFA injiziert worden war, oder bei den Mäusen, die nur Glutamat erhielten ( $p < 0,02$ , 2-tailed t-Test). Die Injektion mit PBS in CFA hatte auf die Anzahl der RGCs keine nachweisbare Wirkung. Der Versuch wurde dreimal wiederholt, mit identischen Ergebnissen. Insgesamt wurden 13 Tiere in der mit Cop-1 behandelten Gruppe und 15 Tiere in der mit PBS behandelten Gruppe getestet. In [Fig. 8B](#) wurden Mäuse direkt nach der intravitrealen Injektion von Glutamat mit Cop-1, das in CFA emulgiert war (5 mg/ml Bakterien), immunisiert. Die Anzahl der überlebenden RGCs pro mm<sup>2</sup> (Mittelwert ± SEM) wurde eine Woche später bestimmt. Die Ergebnisse eines Versuchs sind gezeigt. Die Wirkung der Immunisierung mit Cop-1 war signifikant ( $p < 0,05$ ; 2-tailed t-Test; n = 12 bei Cop-1 und n = 8 bei der Kontrolle). Dieser Versuch wurde unter Verwendung von 11 Mäusen für die Cop-1-Immunisierung und 8 Mäusen für die Injektion mit PBS in CFA (5 mg/ml Bakterien) wiederholt. In [Fig. 8C](#) folgte das RGC-Überleben der Glutamat-Beeinträchtigung und der sofortigen Immunisierung mit Cop-1 in Adjuvans, das 0,5 mg/ml Bakterien enthielt. Die Anzahl überlebender RGCs pro mm<sup>2</sup> war bei den mit Cop-1 immunisierten Mäusen signifikant höher (n = 15) als bei den Mäusen, denen Glutamat (n = 5) injiziert wurde ( $p < 0,04$ ; 2-tailed t-Test). In [Fig. 8D](#) wurde das Überleben von RGCs nach der zuvor durchgeführten Immunisierung, sofort danach, beziehungsweise 48 Stunden nach der Beeinträchtigung mit Glutamat gezeigt. Die Säulen zeigen die zusammengekommenen Ergebnisse, die für alle Mäuse, die mit jeder Behandlung untersucht wurden, gesammelt aus wiederholten Versuchen. Es wurde keine Wirkung beobachtet, wenn die Immunisierung 48 h nach der Beeinträchtigung durchgeführt wurde.

**[0036]** [Fig. 9](#) zeigt, dass die Cop-1-Immunisierung Mäuse nicht vor NMDA-Toxizität schützt. Zehn Tage vor der Injektion von NMDA (75 nMol), wurden die Mäuse (n = 5 – 7) durch subkutane Injektion von Cop-1 in CFA oder mit PBS in CFA immunisiert. Die Markierung der RGCs und das Zählen lebensfähiger RGCs unter dem Fluoreszenzmikroskop waren wie für [Fig. 5A](#) beschrieben. RGC-Überleben bei mit Cop-1 immunisierten Mäusen, ausgedrückt als prozentualer Anteil an Überleben in einem normalen Auge, ähnelte dem bei mit PBS injizierten Mäusen ( $p = 0,55$ , Students t-Test), was anzeigt, dass keine Neuroprotektion erreicht wurde.

**[0037]** [Fig. 10](#) zeigt, dass Cop-1-reaktive T-Zellen RGCs vor Glutamat-Toxizität schützen. Direkt nach der Injektion von Glutamat (200 nMol) wurden den Mäusen Cop-1-reaktive T-Zellen oder PBS injiziert. Die Auftragung von Färbung, die Herstellung und das Zählen von RGCs, sowie die Berechnung des RGC-Überlebens waren wie für [Fig. 5B](#) beschrieben. Signifikant mehr markierte RGCs sind in den Netzhäuten von Mäusen zu sehen, denen Cop-1-reaktive T-Zellen injiziert worden waren, als in den Netzhäuten von PBS-injizierten Kontrollmäusen ( $p < 0,0007$ , Students t-Test).

**[0038]** [Fig. 11A–Fig. 11D](#) zeigen die Wirkung von chronisch erhöhter IOP- und Cop-1-Immunisierung auf retinale Ganglionzellen bei Lewis-Ratten. In [Fig. 11A](#) ergibt eine Laser-Kauterisation, die einen Verschluss der episkleralen und limbalen Venen verursacht, einen Anstieg von IOP und nachfolgenden Tod von retinalen Ganglionzellen. Drei Wochen nach dem Lasern lag das mittlere IOP bei  $30,4 \pm 0,42$  mm Hg (Mittelwert ± SEM, n = 5) bei Ratten, die einem venösen Verschluss ausgesetzt waren, im Vergleich zu  $15,8 \pm 0,2$  mm Hg (n = 7) bei unbehandelten Ratten. In [Fig. 11B](#) wurden drei Wochen nach venösem Verschluss bei den mit Laser behandelten Ratten  $19,9\% \pm 0,51\%$  (Mittelwert ± SEM) weniger retinale Ganglionzellen gezählt als bei den unbehandelten Ratten. In [Fig. 11C](#) reduziert eine Immunisierung mit Cop-1 direkt nach venösem Verschluss den Verlust an retinalen Ganglionzellen. Die Ratten wurden direkt nach dem Lasern mit Cop-1 (200 µg) in CFA immunisiert (n = 15) oder mit PBS in CFA injiziert (n = 13). Drei Wochen später wurden die Retinas ausgeschnitten und im Ganzen aufpräpariert, und die Anzahl an retinalen Ganglionzellen, die zuvor mit Rhodamindextran markiert waren, wurde gezählt. Die Säulen stellen den Verlust an retinalen Ganglionzellen in jeder Gruppe von Ratten dar, berechnet als prozentualer Anteil an retinalen Ganglionzellen in unbehandelten Ratten (Mittelwert

± SEM). Die Differenz hinsichtlich der Anzahl an retinalen Ganglionzellen in den 2 Gruppen war signifikant ( $p < 0,0001$ , 2-tailed t-Test). In [Fig. 11D](#) wurde die Wirkung von verzögerter Immunisierung mit Cop-1 auf Verlust von retinalen Ganglionzellen durch Immunisierung von Ratten 10 Tage nach venösem Verschluss untersucht. Die Säulen stellen den Verlust an retinalen Ganglionzellen in Gruppen dar, die mit Cop-1 ( $n = 5$ ) oder PBS ( $n = 4$ ) behandelt worden waren, berechnet als prozentualer Anteil der Anzahl an retinalen Ganglionzellen (Mittelwert ± SEM) bei unbehandelten Tieren. Eine Tendenz zu einer neuroprotektiven Wirkung wurden nach verzögerter Immunisierung mit Cop-1 beobachtet; der Unterschied war nur im 1-tailed t-Test signifikant ( $p = 0,04$ ).

#### DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

**[0039]** Hauptsächlich um die Erklärung zu erleichtern, wird die detaillierte Beschreibung der vorliegenden Erfindung in folgende Unterabschnitte geteilt: (1) Cop 1-spezifische aktivierte T-Zellen; (2) Cop 1 und Cop 1-verwandte Peptide und Polypeptide; (3) Therapeutische Verwendungen; (4) Formulierungen und Verabreichung; (5) Einrichtung autologer Zellbanken für T-Lymphocyten; (6) Beispiele; und (7) Diskussion der Ergebnisse.

##### (1) Cop 1-spezifische aktivierte T-Zellen

**[0040]** Cop 1-spezifische aktivierte T-Zellen (ATCs) sind T-Zellen, die in Gegenwart von Cop 1 oder einem Cop 1-verwandten Peptid oder Polypeptid aktiviert wurden, wie in Abschnitt (2) definiert. Solche ATCs können für die Herstellung eines Medikaments zur Behandlung, z.B. Verbesserung oder Hemmung der Auswirkungen einer Verletzung oder Krankheit des ZNS oder PNS, die eine Degeneration ergeben, oder zur Förderung der Regeneration im NS, insbesondere im ZNS, verwendet werden. Zusätzlich wird, da Glutamat bei allen neurodegenerativen Krankheiten, ob chronisch oder akut, ein Vermittler ist, beabsichtigt, dass solche ATCs zum Schutz von ZNS-Zellen vor Glutamat-Toxizität und zur Behandlung von Krankheiten oder Zuständen, die durch Glutamat-Toxizität verursacht oder verschlimmert wurden, wie abnormaler intraocularer Druck, verwendet werden. Die Cop 1-spezifischen aktivierten T-Zellen sind bevorzugt autolog, am stärksten bevorzugt von den CD4- und/oder CD8-Phänotypen, aber sie können auch allogene T-Zellen von verwandten Spendern, z.B. Geschwistern, Eltern, Kindern beziehungsweise HLA-passende oder teilweise passende, semi-allogene oder vollständig allogene Spender sein. Zusätzlich zur Verwendung von autologen T-Zellen, die zur Herstellung eines Medikaments von der Person isoliert wurden, umfasst die vorliegende Erfindung auch die Verwendung von semi-allogenen T-Zellen zur Herstellung eines Medikaments zur Neuroprotektion. Diese T-Zellen können als kurz- oder langfristige Linien hergestellt werden und durch herkömmliche Kryokonservierungsverfahren zum Auftauen und zur Verabreichung, entweder direkt oder nach Inkulturnahme über 1–3 Tage, an ein Individuum, das an einer Verletzung des zentralen Nervensystems leidet und das eine T-Zell-Neuroprotektion braucht, gelagert werden.

**[0041]** Die Verwendung von semi-allogenen T-Zellen basiert auf der Tatsache, dass T-Zellen ein spezifisches Antigen-Epitop, das durch fremde Antigen-aufweisende Zellen (APC) gezeigt wird; erkennen können, vorausgesetzt, dass die APC das MHC-Molekül, Klasse I oder Klasse II, auf das die spezifische reaktive T-Zellpopulation beschränkt ist, zusammen mit dem Antigen-Epitop exprimieren, das von den T-Zellen erkannt wird. Somit wird eine semi-allogene Population von T-Zellen, die mindestens ein allelisches Produkt der MHC-Moleküle des Individuums, vorzugsweise ein HLA-DR oder ein HLA-DQ oder ein anderes HLA-Molekül erkennen kann und die für ein Cop 1-Epitop spezifisch ist, in der Lage sein, die Antigene zu erkennen, die mit Cop 1 in dem Bereich, wo das NS des Individuums beschädigt ist, kreuzreagieren, und die notwendige neuroprotektive Wirkung erzeugen. Es gibt wenig oder keinen Polymorphismus in den Adhäsionsmolekülen, den Leukocyten-Migrationsmolekülen und Hilfsmolekülen, die für die T-Zellen notwendig sind, um zu dem Schadensbereich zu wandern, sich dort anzuhäufen und eine Aktivierung zu durchlaufen. Somit werden die semi-allogenen T-Zellen in der Lage sein, zu der Stelle im ZNS, das eine Neuroprotektion braucht, zu wandern und sich anzuhäufen und werden aktiviert, um die gewünschte Wirkung zu erzielen.

**[0042]** Es ist bekannt, dass semi-allogene T-Zellen durch das Immunsystem des Individuums abgestoßen werden, aber diese Abstoßung braucht etwa 2 Wochen, um sich zu entwickeln. Somit haben die semi-allogenen T-Zellen ein zweiwöchiges Fenster für die Gelegenheit, Neuroprotektion auszuüben. Nach zwei Wochen werden die semi-allogenen T-Zellen vom Körper des Individuums abgestoßen, aber diese Abstoßung ist für das Individuum von Vorteil, da es das Individuum von den fremden T-Zellen befreit und alle nachteiligen Folgen der aktivierten T-Zellen verhindern wird. Somit stellen die semi-allogenen T-Zellen einen wichtigen Sicherheitsfaktor zur Verfügung und sind eine bevorzugte Ausführungsform.

**[0043]** Es ist bekannt, dass sich die meisten Individuen in einer Population eine relativ kleine Zahl an HLA-Klasse II-Molekülen teilen. Zum Beispiel exprimieren etwa 50% der jüdischen Bevölkerung das

HLA-DR5-Gen. Somit wäre eine Bank spezifischer T-Zellen, die auf Cop 1-Epitope reagieren, die sich auf HLA-DR5 beschränken, für 50% dieser Population nützlich. Die gesamte Population kann im Wesentlichen durch eine kleine Zahl an zusätzlichen T-Zelllinien abgedeckt werden, die auf wenige andere vorherrschende HLA-Moleküle wie DR1, DR4, DR2, etc. beschränkt sind. Somit kann eine funktionale Bank einheitlicher T-Zelllinien hergestellt und für die sofortige Verwendung bei fast jedem Individuum einer gegebenen Population gelagert werden. Eine solche T-Zellbank würde jedes technische Problem der Gewinnung einer ausreichenden Zahl an spezifischen T-Zellen von dem Individuum, das während des offenen Fensters der Behandlungsmöglichkeit eine Neuroprotektion braucht, lösen. Die semi-allogenen Zellen werden, nachdem sie ihre Rolle der Neuroprotektion erfüllt haben, sicher abgestoßen. Diese Ausführungsform der Erfindung widerspricht der Verwendung der autologen T-Zellen, wie hierin beschrieben, nicht und ist zusätzlich dazu.

**[0044]** Die Cop 1-spezifischen aktivierten T-Zellen sind vorzugsweise nicht abgeschwächt, obwohl abgeschwächte Cop 1-spezifische aktivierte T-Zellen verwendet werden können. T-Zellen können unter Verwendung von Verfahren, die auf dem Fachgebiet wohlbekannt sind, abgeschwächt werden, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Gamma-Bestrahlung, z.B. 1,5–10,0 Rad (Ben-Nun et al, 1981 b; Ben-Nun et al, 1982); und/oder durch Druckbehandlung, zum Beispiel wie in U.S.-Patent Nr. 4,996,194 (Cohen et al) beschrieben. In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Cop 1-spezifischen aktivierten T-Zellen wie nachstehend beschrieben isoliert. T-Zellen können gemäß Verfahren, die auf dem Fachgebiet bekannt sind (Mor et al, 1995) isoliert und gereinigt werden. Für ein veranschaulichendes Beispiel vgl. Abschnitt (6), Beispiel 1.

**[0045]** Zirkulierende T-Zellen eines Individuums, die Cop 1 erkennen, werden unter Verwendung bekannter Verfahren isoliert und vermehrt. Um Cop 1-spezifische aktivierte T-Zellen zu erhalten werden T-Zellen isoliert und die Cop 1-spezifischen ATCs werden dann durch ein bekanntes Verfahren (Burns et al, 1983; Pette et al, 1990; Martin et al, 1990; Schluesener et al, 1985; Suruhan-Dires Keneli et al, 1993) vermehrt.

**[0046]** Während der Aktivierung der T-Zellen ex vivo können die T-Zellen durch Züchten in einem Medium, dem mindestens ein geeigneter wachstumsfördernder Faktor zugesetzt war, aktiviert werden. Für diesen Zweck geeignete wachstumsfördernde Faktoren umfassen uneingeschränkt Cytokine, zum Beispiel Tumor-Nekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin 2 (IL-2) und Interleukin 4 (IL-4).

**[0047]** In einer Ausführungsform stellen die aktivierten T-Zellen endogen einen Stoff her, der die Auswirkungen einer Verletzung oder Krankheit im NS verbessert.

**[0048]** In einer anderen Ausführungsform stellen die aktivierten T-Zellen endogen einen Stoff her, der andere Zellen, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf transformierenden Wachstumsfaktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), Nerven-Wachstumsfaktor (NGF), neurotrophen Faktor 3 (NT-3), neurotrophen Faktor 4/5 (NT-4/5), von Hirn abgeleiteten neurotrophen Faktor (BDNF); Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und Interleukin-6 (IL-6), stimuliert, wobei die anderen Zellen, direkt oder indirekt die Auswirkungen von Verletzung oder Krankheit verbessern.

**[0049]** Nach ihrer Vermehrung in vitro werden die T-Zellen zur Herstellung eines Medikaments verwendet, das geeignet ist, an ein Säuger-Individuum verabreicht zu werden. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Medikament geeignet, an ein menschliches Individuum verabreicht zu werden. T-Zellexpansion wird vorzugsweise unter Verwendung von Cop 1 oder einem Cop 1-verwandten Peptid oder Polypeptid durchgeführt. Cop 1-aktivierte T-Zellen können direkt verwendet werden oder sie können, z.B. durch Kryokonservierung, wie nachstehend beschrieben, für die spätere Verwendung konserviert werden. Cop 1-spezifische aktivierte T-Zellen können auch unter Verwendung von zuvor kryokonservierten T-Zellen, d.h. nach Auftauen der Zellen, gewonnen werden, die T-Zellen können mit Cop 1 oder einem Cop 1-verwandten Peptid oder Polypeptid, optimalerweise zusammen mit peripheren Blut-Lymphocyten (PBL), inkubiert werden, um eine Herstellung Cop 1-spezifischer ATCs zu erhalten.

**[0050]** Wie für den Fachmann offensichtlich können die T-Zellen z.B. durch Kryokonservierung, entweder vor oder nach der Kultur, konserviert werden. Kryokonservierungsmittel, die verwendet werden können, umfassen Dimethyl-Sulfoxid (DMSO) (Lovelock et al, 1959; Ashwood-Smith, 1961), Glycerin, Polyvinylpyrrolidon (Rinfret, 1960), Polyethylenglykol (Sloviter et al, 1962), Albumin, Dextran, Saccharose, Ethylenglycol, i-Erythrit, D-Ribit, D-Mannit (Rowe et al, 1962), D-Sorbit, i-Inosit, D-Lactose, Cholinchlorid (Rowe et al, 1962), Aminosäuren (Phan The Tran et al, 1960a), Methanol, Acetamid, Glycerinmonoacetat (Lovelock, 1954), anorganische Salze (Phan The Tran et al, 1960b; Phan The Tran et al), und DMSO kombiniert mit Hydroxyethylstärke und menschlichem Serumalbumin (Zaroulis et al, 1980), sind jedoch nicht darauf beschränkt.

**[0051]** Kritisch ist eine kontrollierte Abkühlungsrate. Verschiedene kryoprotektive Mittel (Rapatz et al, 1968)

und verschiedene Zelltypen haben hinsichtlich der Auswirkungen der Abkühlungsgeschwindigkeit auf das Überleben von Zellen und auf ihr Transplantationspotenzial verschiedene optimale Abkühlungsraten. Vgl., z.B., Rowe et al (1962b); Rowe (1966); Lewis et al, (1967); und Mazur, (1970). Die Wärme bei der Fusionsphase, bei der Wasser zu Eis wird, sollte minimal sein. Das Kühlungsverfahren kann z.B. durch die Verwendung eines programmierbaren Gefriergeräts oder eines Methanolbad-Verfahrens durchgeführt werden.

**[0052]** Programmierbare Gefriergeräte erlauben die Bestimmung optimaler Abkühlungsraten und erleichtern eine reproduzierbare Standard-Abkühlung. Programmierbare Gefriergeräte mit einer kontrollierten Rate, wie Cryomar oder Planar erlauben eine Feinabstimmung des Gefriervorgangs hin zur gewünschten Kurve der Abkühlungsrate.

**[0053]** Nach gründlichem Einfrieren können die Zellen schnell in ein kryogenes Langzeit-Aufbewahrungsgefäß überführt werden. In einer Ausführungsform können die Proben in mechanischen Gefriergeräten, wie Gefriergeräten, die eine Temperatur von etwa  $-80^{\circ}\text{C}$  oder etwa  $-20^{\circ}\text{C}$  aufrechterhalten, kryogen gelagert werden. In einer bevorzugten Ausführungsform können die Proben in flüssigem Stickstoff ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) oder dessen Dampf kryogen gelagert werden. Eine solche Aufbewahrung wird durch die Erhältlichkeit von hocheffizienten Flüssig-Stickstoff-Kühlschränken, die großen Thermosbehältern ähneln, mit einem extrem niedrigen Vakuum und innerer Super-Isolierung in der Weise, dass Hitzeverlust und Stickstoffverluste auf einem absoluten Minimum gehalten werden, stark begünstigt.

**[0054]** Betrachtungen und Verfahren für die Handhabung, Kryokonservierung und langfristige Lagerung von T-Zellen können zum Beispiel in den folgenden Dokumenten, Gorin (1986) und International Atomic Energy Agency (1969) gefunden werden.

**[0055]** Andere Verfahren der Kryokonservierung lebensfähiger Zellen oder Modifikationen davon sind erhältlich und für die Verwendung in z.B. Kaltmetall-Spiegelverfahren vorgesehen. Vgl. Livesey et al (1987); Linner et al (1986); vgl. auch U.S.-Patent Nr. 4,199,022 durch Senken et al, U.S.-Patent Nr. 3,753,357 von Schwartz und U.S.-Patent Nr. 4,559,298 von Fahy.

**[0056]** Gefrorene Zellen werden vorzugsweise schnell (z.B. in einem Wasserbad, das bei  $37-47^{\circ}\text{C}$  gehalten wird) aufgetaut und sofort nach dem Auftauen gekühlt. Es kann wünschenswert sein, die Zellen zu behandeln, um das Klumpen von Zellen bei Auftauen zu verhindern. Um Klumpen zu verhindern, können verschiedene Verfahren verwendet werden, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf Zusetzen von DNAse vor oder nach dem Einfrieren (Spitzer et al, 1980), Dextran von niedrigem Molekulargewicht und Citrat, Citrat, Hydroxyethylstärke (Stift et al, 1983) oder saurer Citrat-Dextrose (Zaroulis et al, 1980), etc.

**[0057]** Das Gefrierschutzmittel sollte, wenn es für Menschen toxisch ist, vor der therapeutischen Verwendung der aufgetauten T-Zellen entfernt werden. Ein Weg, auf dem das Gefrierschutzmittel entfernt werden kann, ist durch Verdünnung auf unbedeutende Konzentration.

**[0058]** Sind gefrorene T-Zellen einmal aufgetaut und gewonnen, werden sie wie hierin in Bezug auf nicht-gefrorene T-Zellen beschrieben, verwendet, um eine neuronale Regeneration zu fördern. Einmal aufgetaut können die T-Zellen sofort verwendet werden, wenn man annimmt, dass sie vor dem Einfrieren aktiviert wurden. Vorzugsweise werden die aufgetauten Zellen jedoch vor Injektion in den Patienten gezüchtet, um nicht-lebensfähige Zellen auszuschließen. Des Weiteren kann im Verlauf dieser Züchtung über einen Zeitraum von etwa einem bis drei Tagen ein geeignetes Aktivierungsmittel zugesetzt werden, um die Zellen zu aktivieren, wenn die gefrorenen Zellen ruhende Zellen waren, oder um den Zellen dabei zu helfen, eine höhere Aktivierungsrate zu erreichen, wenn sie vor dem Einfrieren aktiviert waren. Üblicherweise ist Zeit zur Verfügung, um einen solchen Züchtungsschritt vor der Verabreichung in Form eines Medikaments zu erlauben, da die T-Zellen bis zu einer Woche nach der Verletzung und wahrscheinlich länger verabreicht werden können, und immer noch ihre neuroregenerative und neuroprotektive Wirkung behalten.

## (2) Cop 1 und Cop 1-verwandte Peptide und Polypeptide

**[0059]** Arzneimittel, die Cop 1 oder ein Cop 1-verwandtes Peptid- oder Polypeptid-Antigen oder ein Derivat davon umfassen, können für die Verhinderung oder Hemmung der Auswirkungen von Verletzung oder Krankheit, die eine NS-Degeneration ergeben, zur Förderung der Nervenregeneration im NS, insbesondere im ZNS, zum Schutz der ZNS-Zellen vor Glutamat-Toxizität oder zur Behandlung von Verletzung oder Krankheiten, die durch Glutamat-Toxizität verursacht oder verschlimmert wurden, verwendet werden. Zusätzlich können Cop 1 oder ein Cop 1-verwandtes Peptid- oder Polypeptid-Antigen oder ein Derivat davon für die Aktivierung von

T-Zellen in vivo oder in vitro verwendet werden. In einer Ausführungsform wird die Verwendung von Cop 1 oder einem Cop 1-verwandten Peptid- oder Polypeptid-Antigen oder einem Derivat davon für die Herstellung eines Medikaments zur Förderung der Nervenregeneration, oder zur Verhinderung oder Hemmung der Auswirkungen von ZNS- oder PNS-Verletzung oder -Krankheit in einem Säuger bereitgestellt, worin das Cop 1- oder Cop 1-verwandte Peptid- oder Polypeptid-Antigen oder das Derivat davon T-Zellen in vivo aktiviert, um eine T-Zell-population herzustellen, die sich an einer Verletzungs- oder Krankheitsstelle des ZNS oder PNS anhäuft. In einer anderen Ausführungsform wird Cop 1 oder ein Cop 1-verwandtes Peptid- oder Polypeptid-Antigen oder ein Derivat davon für die Herstellung eines Medikaments verwendet, das geeignet ist, zum Schutz von ZNS-Zellen vor Glutamat-Toxizität oder zur Behandlung einer Verletzung oder Krankheit verabreicht zu werden, die durch Glutamat-Toxizität verursacht oder verschlimmert wird. Die Zusammensetzung, die in der vorliegenden Erfindung verwendet wird, kann Cop 1 oder ein Cop 1-verwandtes Peptid oder Polypeptid sein. Für den Zweck der vorliegenden Erfindung soll „Cop 1 oder ein Cop 1-verwandtes Peptid oder Polypeptid“ jedes Peptid oder Polypeptid einschließlich eines Zufalls-Copolymers umfassen, das funktionell mit basischem Myelinprotein (MBP) kreuzreagiert, und das in der Lage ist, mit MBP auf dem MHC Klasse II-Molekül in der Antigen-Präsentation zu konkurrieren.

**[0060]** Die Zusammensetzung kann Zufalls-Copolymere umfassen, die eine geeignete Quantität einer Aminosäure mit positiver elektrischer Ladung, wie Lysin oder Arginin, zusammen mit einer Aminosäure mit einer negativen elektrischen Ladung (vorzugsweise in geringerer Menge), wie Glutaminsäure oder Asparaginsäure, optional in Kombination mit einer elektrisch neutralen Aminosäure wie Alanin oder Glycin, die als Auffüller dienen, und optional mit einer Aminosäure, die so adaptiert ist, dass sie immunogene Eigenschaften auf das Copolymer überträgt, wie zum Beispiel eine aromatische Aminosäure wie Tyrosin oder Tryptophan einschließen. Solche Zusammensetzungen können alle umfassen, die in WO 005250 offenbart sind.

**[0061]** Genauer, die Zusammensetzung zur Verwendung in der vorliegenden Zusammensetzung umfasst mindestens ein Copolymer, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Zufallscopolymeren, die eine Aminosäure umfassen, ausgewählt aus jeder von mindestens dreien der folgenden Gruppen:

- (a) Lysin und Arginin;
- (b) Glutaminsäure und Asparaginsäure;
- (c) Alanin und Glycin;
- (d) Tyrosin und Tryptophan.

**[0062]** Die Copolymere zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung zur Herstellung eines Medikaments können aus L- oder D-Aminosäuren oder Gemischen davon zusammengesetzt sein. Wie dem Fachmann bekannt ist, kommen L-Aminosäuren in den meisten natürlichen Proteinen vor. D-Aminosäuren sind jedoch im Handel erhältlich und können mit einigen oder allen Aminosäuren substituiert werden, die verwendet werden, um die Terpolymere und andere Copolymere der vorliegenden Erfindung herzustellen. Die vorliegende Erfindung zieht Copolymere in Betracht, die sowohl D- als auch L-Aminosäuren enthalten, sowie Copolymere, die im Wesentlichen entweder aus L- oder D-Aminosäuren bestehen.

**[0063]** In einer Ausführungsform der Erfindung enthält das Copolymer vier verschiedene Aminosäuren, jede von einer unterschiedlichen der Gruppen (a) bis (d). Ein bevorzugtes Copolymer gemäß dieser Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst in Kombination Alanin, Glutaminsäure, Lysin und Tyrosin, mit einer positiven elektrischen Nettoladung und einem Molekulargewicht von etwa 2.000 bis etwa 40.000 Dalton, vorzugsweise von etwa 2.000 bis etwa 13.000 Dalton. Das am meisten bevorzugte Beispiel ist Copolymer 1 (Cop 1) mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von etwa 4.700 bis etwa 13.000 Dalton. Bevorzugte Molekulargewichts-Bereiche und Verfahren zur Herstellung einer bevorzugten Form von Copolymer 1 sind im U.S.-Patent Nr. 5,800,808 beschrieben. Es ist deutlich, dass dies nur als Beispiel gegeben ist und dass die Zusammensetzung sowohl in Hinsicht auf die Bestandteile als auch auf die relativen Anteile der Bestandteile variiert werden kann, wenn man sich an die vorstehenden allgemeinen Kriterien hält. Somit kann das Copolymer ein Polypeptid von etwa 15 bis etwa 100, vorzugsweise von etwa 40 bis 80 Aminosäuren Länge sein.

**[0064]** In einer anderen Ausführungsform enthält das Copolymer drei verschiedene Aminosäuren, jede von einer unterschiedlichen von drei Gruppen aus den Gruppen (a) bis (d). Diese Copolymere werden hierin als Terpolymere bezeichnet.

**[0065]** In einer Ausführungsform enthalten die Terpolymere zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung Tyrosin, Alanin und Lysin, im Folgenden als YAK bezeichnet. Die durchschnittliche molare Fraktion der Aminosäuren in diesen Terpolymeren kann variieren. Zum Beispiel kann Tyrosin in einer molaren Fraktion von etwa 0,005 bis etwa 0,250 vorliegen; Alanin kann in einer molaren Fraktion von etwa 0,3 bis etwa 0,6 vorliegen; und

Lysin kann in einer molaren Fraktion von etwa 0,1 bis etwa 0,5 vorliegen. Das durchschnittliche Molekulargewicht liegt zwischen 2.000 und etwa 40.000 Dalton und vorzugsweise zwischen etwa 3.000 bis etwa 35.000 Dalton. In einer stärker bevorzugten Ausführungsform liegt das durchschnittliche Molekulargewicht bei etwa 5.000 bis etwa 25.000 Dalton. Es ist möglich, Arginin für Lysin, Glycin für Alanin und/oder Tryptophan für Tyrosin zu ersetzen.

**[0066]** In einer anderen Ausführungsform enthalten die Terpolymere zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung Tyrosin, Glutaminsäure und Lysin, im Folgenden bezeichnet als YEK. Die durchschnittliche molare Fraktion der Aminosäuren in diesen Terpolymeren kann variieren: Glutaminsäure kann in einer molaren Fraktion von etwa 0,005 bis etwa 0,300 vorliegen, Tyrosin kann in einer molaren Fraktion von etwa 0,005 bis etwa 0,250 vorliegen, und Lysin kann in einer molaren Fraktion von etwa 0,3 bis etwa 0,7 vorliegen. Das durchschnittliche Molekulargewicht liegt zwischen 2.000 und etwa 40.000 Dalton und bevorzugt zwischen etwa 3.000 und etwa 35.000 Dalton. In einer stärker bevorzugten Ausführungsform liegt das durchschnittliche Molekulargewicht bei etwa 5.000 bis etwa 25.000 Dalton. Es ist möglich, Asparaginsäure für Glutaminsäure, Arginin für Lysin und/oder Tryptophan für Tyrosin zu ersetzen.

**[0067]** In einer anderen Ausführungsform enthalten die Terpolymere zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung Lysin, Glutaminsäure und Alanin, im Folgenden bezeichnet als KEA. Die durchschnittliche molare Fraktion der Aminosäuren in diesen Polypeptiden kann ebenfalls variieren: Zum Beispiel kann Glutaminsäure in einer molaren Fraktion von etwa 0,005 bis etwa 0,300 vorliegen, Alanin kann in einer molaren Fraktion von etwa 0,005 bis etwa 0,600 vorliegen, Lysin kann in einer molaren Fraktion von etwa 0,2 bis etwa 0,7 vorliegen. Das durchschnittliche Molekulargewicht liegt zwischen 2.000 und 40.000 Dalton und bevorzugt zwischen etwa 3.000 und 35.000 Dalton. In einer stärker bevorzugten Ausführungsform liegt das durchschnittliche Molekulargewicht bei etwa 5.000 bis etwa 25.000 Dalton. Es ist möglich, Asparaginsäure für Glutaminsäure, Glycin für Alanin und/oder Arginin für Lysin zu ersetzen.

**[0068]** In einer anderen Ausführungsform enthalten die Terpolymere zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung Tyrosin, Glutaminsäure und Alanin, im Folgenden bezeichnet als YEA. Die durchschnittliche molare Fraktion der Aminosäuren in diesen Polypeptiden kann variieren. Zum Beispiel kann Tyrosin in einer molaren Fraktion von etwa 0,005 bis etwa 0,250 vorliegen, Glutaminsäure kann in einer molaren Fraktion von etwa 0,005 bis etwa 0,300 vorliegen, und Alanin kann in einer molaren Fraktion von etwa 0,005 bis etwa 0,800 vorliegen. Das durchschnittliche Molekulargewicht liegt zwischen 2.000 und etwa 40.000 Dalton und bevorzugt zwischen etwa 3.000 und etwa 35.000 Dalton. In einer stärker bevorzugten Ausführungsform liegt das durchschnittliche Molekulargewicht bei etwa 5.000 bis etwa 25.000 Dalton. Es ist möglich, Tryptophan für Tyrosin, Asparaginsäure für Glutaminsäure und/oder Glycin für Alanin zu ersetzen.

**[0069]** In einer stärker bevorzugten Ausführungsform ist die molare Fraktion der Aminosäuren der Terpolymere etwa so, wie sie für Copolymer 1 bevorzugt ist. Die molare Fraktion der Aminosäuren in Copolymer 1 ist etwa 0,14 Glutaminsäure, etwa 0,43 Alanin, etwa 0,10 Tyrosin und etwa 0,34 Lysin. Das am meisten bevorzugte durchschnittliche Molekulargewicht für Copolymer 1 liegt zwischen etwa 5.000 und etwa 9.000 Dalton. Es wird erwartet, dass die Aktivität von Copolymer 1 für die hierin offenbarten Verwendungsmöglichkeiten bestehen bleibt, wenn eine oder mehrere der folgenden Substitutionen gemacht werden: Asparaginsäure für Glutaminsäure, Glycin für Alanin, Arginin für Lysin und Tryptophan für Tyrosin.

**[0070]** Die molaren Verhältnisse der Monomere des stärker bevorzugten Terpolymers von Glutaminsäure, Alanin und Tyrosin, oder YEA ist etwa 0,21 bis etwa 0,65 bis etwa 0,14.

**[0071]** Die molaren Verhältnisse der Monomere des stärker bevorzugten Terpolymers von Glutaminsäure, Alanin und Lysin, oder KEA ist etwa 0,15 bis etwa 0,48 bis etwa 0,36.

**[0072]** Die molaren Verhältnisse der Monomere des stärker bevorzugten Terpolymers von Glutaminsäure, Tyrosin und Lysin, oder YEK ist etwa 0,26 bis etwa 0,16 bis etwa 0,58.

**[0073]** Die molaren Verhältnisse der Monomere des stärker bevorzugten Terpolymers von Tyrosin, Alanin und Lysin, oder YAK ist etwa 0,10 bis etwa 0,54 bis etwa 0,35.

**[0074]** Die Terpolymere können durch jedes Verfahren, das für den Fachmann erhältlich ist, hergestellt werden. Zum Beispiel können die Terpolymere unter Kondensationsbedingungen unter Verwendung des gewünschten molaren Verhältnisses von Aminosäuren in Lösung, oder durch synthetische Festphasen-Verfahren hergestellt werden. Kondensationsbedingungen umfassen die richtige Temperatur, pH-Wert und Lösungs-

mittelbedingungen zur Kondensation der Carboxylgruppe einer Aminosäure mit der Aminogruppe einer anderen Aminosäure, um eine Peptidbindung zu erzeugen. Kondensationsmittel, zum Beispiel Dicyclohexylcarbodiimid, können verwendet werden, um die Bildung der Peptidbindung zu erleichtern. Gruppen können verwendet werden, um funktionelle Gruppen, wie die Seitenkettenreste und einige der Amino- oder Carboxylgruppen gegen unerwünschte Nebenreaktionen zu schützen.

**[0075]** Zum Beispiel kann das Verfahren, offenbart im U.S.-Patent 3,849,650, in dem die N-Carboxyanhydride von Tyrosin, Alanin,  $\gamma$ -Benzylglutamat und N- $\epsilon$ -Trifluoroacetyl-lysin bei Umgebungstemperatur in wasserfreiem Dioxan mit Diethylamin als Initiator, polymerisiert werden, verwendet werden. Die  $\gamma$ -Carboxylgruppe der Glutaminsäure kann durch Bromwasserstoffsäure in Eisessig von Schutzgruppen befreit werden. Die Trifluoroacetylgruppen werden durch 1 molares Piperidin von Lysin entfernt. Der Fachmann versteht, dass das Verfahren angepasst werden kann, um Peptide und Polypeptide herzustellen, die die erwünschten Aminosäuren enthalten, das heißt, drei der vier Aminosäuren in Copolymer 1, durch selektive Entfernung der Reaktionen, die mit irgendeinem von Glutaminsäure, Alanin, Tyrosin oder Lysin in Verbindung stehen. Zum Zweck dieser Anwendung bedeuten die Begriffe „Umgebungstemperatur“ und „Raumtemperatur“ eine Temperatur im Bereich von etwa 20 bis etwa 26°C.

**[0076]** Das Molekulargewicht der Terpolymere kann während der Polypeptidsynthese oder nach Herstellung der Terpolymere angepasst werden. Um das Molekulargewicht während der Polypeptidsynthese anzupassen, werden die synthetischen Bedingungen oder die Mengen an Aminosäuren so angepasst, dass die Synthese stoppt, wenn das Polypeptid die ungefähre Länge, die erwünscht ist, erreicht. Nach der Synthese können Polypeptide mit dem erwünschten Molekulargewicht durch jedes verfügbare Größenselektionsverfahren, wie die Chromatographie der Polypeptide auf einer nach Molekulargewicht trennenden Säule oder einem Gel und Auffangen der erwünschten Molekulargewichtsbereiche erhalten werden. Die vorliegenden Polypeptide können ebenfalls teilweise hydrolysiert werden, um Spezies mit hohem Molekulargewicht zu entfernen, zum Beispiel durch saure oder enzymatische Hydrolyse, und dann gereinigt werden, um die Säure oder die Enzyme.

**[0077]** In einer Ausführungsform können die Terpolymere mit einem erwünschten Molekulargewicht durch ein Verfahren hergestellt werden, das die Reaktion eines geschützten Polypeptids mit Bromwasserstoffsäure einschließt, so dass ein Trifluoroacetyl-Polypeptid mit dem gewünschten Molekulargewichtprofil gebildet wird. Die Reaktion wird für eine Zeit und bei einer Temperatur durchgeführt, die durch eine oder mehrere Testreaktionen vorherbestimmt ist. Während der Testreaktion werden Zeit und Temperatur variiert und der Molekulargewichtsbereich eines bestimmten Satzes der Test-Polypeptide wird bestimmt. Die Testbedingungen, die den optimalen Molekulargewichtsbereich für diesen Ansatz an Polypeptiden zur Verfügung stellen, werden für den Ansatz verwendet. Somit kann ein Trifluoroacetyl-Polypeptid, das das erwünschte Molekulargewichtprofil hat, durch ein Verfahren, das die Reaktion des geschützten Polypeptids mit Bromwasserstoffsäure über einen Zeitraum und eine Temperatur, die durch Testreaktion vorherbestimmt sind, einschließt, hergestellt werden. Das Trifluoroacetyl-Polypeptid mit dem erwünschten Molekulargewichtprofil wird dann weiter mit einer wässrigen Piperidinlösung behandelt, so dass ein Polypeptid mit niedriger Toxizität, das das gewünschte Molekulargewicht hat gebildet wird.

**[0078]** In einer bevorzugten Ausführungsform wird eine Testprobe von geschütztem Polypeptid aus einem bestimmten Ansatz über etwa 10–50 Stunden bei einer Temperatur von etwa 20–28°C mit Bromwasserstoffsäure ungesetzt. Die besten Bedingungen für diesen Ansatz werden durch einen Durchlauf von mehreren Testreaktionen bestimmt. In einer Ausführungsform wird das geschützte Polypeptid zum Beispiel über etwa 17 Stunden bei einer Temperatur von etwa 26°C mit Bromwasserstoffsäure ungesetzt.

**[0079]** Da Bindungsmotive von Cop 1 an MS-assoziierte HLA-DR-Moleküle bekannt sind (Fridkis-Hareli et al, 1999b), können Polypeptide mit festgesetzter Sequenz gut hergestellt und auf die Bindung an die Bindungstasche der NLA-DR-Moleküle getestet werden, wie in der Veröffentlichung von Fridkis-Hareli et al (1999b) beschrieben. Beispiele für solche Peptide sind die, die in WO 005249 beschrieben werden. 32 der Peptide, die in der Anmeldung spezifisch offenbart sind, werden in der hier folgenden Tabelle 1 dargestellt. Es ist zu erwarten, dass solche Peptide und andere, ähnliche Peptide eine ähnliche Aktivität wie Cop 1 haben. Dies kann jedoch leicht durch Testen ihrer Fähigkeit zur Aktivierung von T-Zellen gemäß der vorliegenden Erfindung bestimmt werden. Dies alles kann ohne unzumutbare Versuche durchgeführt werden. Es wird ebenfalls in Betracht gezogen, dass solche Peptide und andere ähnliche Peptide innerhalb der Definition von Cop 1-verwandten Peptiden oder Polypeptiden sind und dass ihre Verwendung als Teil der vorliegenden Erfindung betrachtet wird.

Tabelle 1

SEQ ID NO.	Peptidsequenz
1	AAAYAAAAAAKAAAA
2	AEKYAAAAAAKAAAA
3	AKEYAAAAAAKAAAA
4	AKKYAAAAAAKAAAA
5	AEAYAAAAAAKAAAA
6	KEAYAAAAAAKAAAA
7	AEEYAAAAAAKAAAA
8	AAEYAAAAAAKAAAA
9	EKAYAAAAAAKAAAA
10	AAKYEAAAAAAKAAAA
11	AAKYAEAAAAAAKAAAA
12	EAAYAAAAAAKAAAA
13	EKKYAAAAAAKAAAA
14	EAKYAAAAAAKAAAA
15	AEKYAAAAAAAAAAAA
16	AKEYAAAAAAAAAAAA
17	AKKYEAAAAAAAAAAAA
18	AKKYAEAAAAAAAAAAAA
19	AEAYKAAAAAAAAAAAA
20	KEAYAAAAAAAAAAAA
21	AEEYKAAAAAAAAAAAA
22	AAEYKAAAAAAAAAAAA
23	EKAYAAAAAAAAAAAA
24	AAKYEAAAAAAAAAAAA
25	AAKYAEAAAAAAAAAAAA
26	EKKYAAAAAAAAAAAA
27	EAKYAAAAAAAAAAAA
28	AEYAKAAAAAAAAAAAA
29	AEKAYAAAAAAAAAAAA
30	EKYAAAAAAAAAAAAA
31	AYKAEAAAAAAAAAAAA
32	AKYAEAAAAAAAAAAAA

**[0080]** Das bevorzugte Copolymer zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung ist Copolymer 1, hierin auch als Cop 1 bezeichnet. Copolymer 1 wurde in mehreren Ländern unter dem Markennamen COPAXONE<sup>®</sup>, Glatiramer-Acetat, zur Behandlung von Multipler Sklerose (MS) zugelassen. COPAXONE<sup>®</sup> ist eine Marke von Teva Pharmaceuticals Ltd., Petah Tikva, Israel. Mehrere klinische Studien zeigten, das Copolymer 1 mit nur geringfügigen Nebenwirkungen, meist leichten Reaktionen an der Injektionsstelle, gut toleriert wird (Johnson et al, 1995).

### (3) Therapeutische Verwendungsmöglichkeiten

**[0081]** Die in den Abschnitten (1) bis (2) beschriebenen Zusammensetzungen können verwendet werden für

die Herstellung eines Medikaments zur Förderung der Nervenregeneration oder die Verhinderung oder Hemmung von sekundärer Degeneration, die andernfalls nach primärer NS-Verletzung, z.B. geschlossenen Kopfverletzungen und stumpfem Trauma, wie jenen, die durch die Teilnahme an gefährlichen Sportarten verursacht werden, eindringendes Trauma, wie Schussverletzungen, hämorrhagischem Schlaganfall, ischämischem Schlaganfall, Glaukom, cerebraler Ischämie oder Verletzungen, die durch chirurgische Eingriffe wie der Tumorentfernung verursacht werden, verwendet werden. Zusätzlich können solche Zusammensetzungen für die Herstellung eines Medikaments zur Verbesserung der Auswirkungen von Krankheiten verwendet werden, die in einen degenerativen Prozess münden, z.B. eine Degeneration, die entweder in der grauen oder in der weißen Substanz (oder beiden) als eine Folge verschiedener Krankheiten oder Störungen, einschließlich ohne Einschränkung: diabetischer Neuropathie, seniler Demenz, Alzheimer-Krankheit, Parkinson-Krankheit, Gesichtsnerven (Bells)-Lähmung, Glaukom, Chorea Huntington, amyotropher Lateralersklerose (ALS), Status epilepticus, nicht-arterieller optischer Neuropathie, vertebralem Bandscheibenvorfall, Vitaminmangel, Prionenkrankheiten wie der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit, Carpal-Tunnel-Syndrom, peripheren Neuropathien, die mit verschiedenen Krankheiten assoziiert sind, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf Urämie, Porphyrie, Hypoglykämie, Sjogren-Larsson-Syndrom, akuter sensorischer Neuropathie, chronischer ataxischer Neuropathie, biliärer Zirrhose, primärer Amyloidose, obstruktiven Lungenkrankheiten, Acromegalie, Malabsorptions-Syndromen, Polycythemia vera, IgA- und IgG-Gammopathien, Komplikationen verschiedener Wirkstoffe (z.B. Metronidazol) und Toxinen (z.B. Alkohol oder Organosphosphaten), Charcot-Marie-Tooth-Krankheit, Ataxia telangiectasia, Friedreichs Ataxie, amyloiden Polyneuropathien, Adrenomyeloneuropathie, axonaler Riesens-Neuropathie, Refsum-Krankheit, Fabry-Krankheit, Lipoproteinämie, etc.. In Anbetracht der Ergebnisse hinsichtlich der vor Glutamat-schützenden Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfassen andere klinische Zustände, die gemäß der vorliegenden Erfindung behandelt werden können, Epilepsie, Amnesie, Angst, Hyperalgesie, Psychose, Anfälle, abnormal erhöhten intraokularen Druck, oxidativer Stress und Opiat-Toleranz und -abhängigkeit. Zusätzlich kann die vor Glutamat-schützende Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, d.h. die Behandlung einer Verletzung oder einer Krankheit, die durch Glutamat-Toxizität verursacht oder verschlimmert wird, wie die Entfernung eines Tumors vom ZNS und anderen Formen chirurgischer Eingriffe am ZNS, post-operative Behandlungen umfassen. Im Hinblick auf die Tatsache, dass herausgefunden wurde, dass Cop 1-Immunsierung überraschenderweise beim Schutz gegen Glutamat-Toxizität nützlich ist, wird erwartet, dass die Verwendung von Cop 1 für die Herstellung eines Medikaments zur Behandlung, oder die Behandlung mit Cop1-verwandten T-Zellen gemäß der vorliegenden Erfindung bei der Behandlung der vorstehend aufgelisteten Zustände wirksam sein wird, nicht nur in der späten Phase, wenn Myelin beeinträchtigt wird, sondern auch in den frühen Stadien, in denen die Neuronen durch Faktoren angegriffen werden, die einen Anstieg der Glutamatwerte auf toxische Werte verursachen. Somit ist die vorliegende Erfindung für jede Indikation, d.h. chronische oder akute Neurodegeneration, die durch einen Anstieg der Glutamatwerte verursacht oder verschlimmert wird, einschließlich der frühen Stadien von ischämischem Schlaganfall, Alzheimer-Krankheit, etc. nützlich. Des Weiteren führt dieser Schutz vor Glutamat-Toxizität dazu, dass die Rolle von Cop 1 nicht auf ihre Kreuzreaktivität mit Myelin beschränkt ist. Es muss auch eine regulatorische Aktivität haben, wie zum Beispiel durch die Erzeugung regulatorischer Zellen oder regulatorischer Stoffe. Im Hinblick auf diese regulatorische Aktivität wird erwartet, dass Cop 1-Impfung und Cop 1-spezifische aktivierte T-Zellen ebenfalls die weiße Substanz und die graue Substanz vor Schaden schützt, der durch oxidativen Stress und andere Schadensquellen an Nervenzellen verursacht wird. Zusätzlich kann die vorliegende Erfindung auf Grund dieser regulatorischen Aktivität ebenfalls verwendet werden, um Nervenzellen nicht nur vor Multipler Sklerose, wie auf dem Stand der Technik vorgeschlagen wurde, sondern auch vor anderen Autoimmunkrankheiten als Multipler Sklerose zu schützen. In einer bevorzugten Ausführungsform werden die aktivierten T-Zellen oder die Immunsierungszusammensetzung, umfassend Cop 1 oder ein Cop 1-verwandtes Peptid oder Polypeptid der vorliegenden Erfindung verwendet, um Krankheiten oder Störungen zu behandeln, bei denen die Förderung der Nervenregeneration oder die Verhinderung oder Hemmung von sekundärer neuraler Degeneration angezeigt ist, jedoch ausschließlich Multipler Sklerose und Neoplasien. In einer bevorzugten Ausführungsform sind die Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung dafür geeignet, an ein menschliches Individuum verabreicht zu werden. Wie im Vorstehenden offenbart, wurde Cop 1 als ein Mittel zur Erhaltung der Suppression oder Deaktivierung der autoimmunen T-Zellreaktivität auf Myelinantigene bei Multiple Sklerose-Patienten verwendet. Zu diesem Zweck wurde Cop 1 ohne Adjuvans durch tägliche subkutane Injektion verabreicht. Der Stand der Technik offenbart auch die Verabreichung von Cop 1 auf oralem Weg an Multiple Sklerose-Patienten, was auch darauf abzielt, die Suppression der autoimmunen T-Zellreaktion auf Myelin-Antigene zu induzieren. Es ist zu bemerken, dass diese Verwendungen von Cop 1 sich auf dem Fachgebiet zur Behandlung von Multipler Sklerose fundamental von der Verwendung von Cop 1 zur Neuroprotektion unterscheiden, was das Thema der vorliegenden Erfindung ist. Zuerst, wie in WO99/60021 aus dem Labor der vorliegenden Erfinder gezeigt, wird die Neuroprotektion durch die Aktivierung von Autoimmunzellen vermittelt, die spezifisch auf Myelin-Antigene gerichtet sind. Daher ist es höchst überraschend, dass Cop 1, ein Mittel, das zur Suppression der T-Zell-Autoimmunität hergestellt ist, eine Wirkung haben soll, die die Aktivierung spezifischer Anti-My-

elin-T-Zell-Autoimmunität benötigt. Zweitens basiert die Verwendung von Cop 1 zur Neuroprotektion gemäß der vorliegenden Erfindung auf der Verabreichung von anti-Cop 1-T-Zellen, was nicht der Weg ist, wie Cop 1 zur Behandlung von Multipler Sklerose verwendet wird. Drittens zieht die vorliegende Erfindung in einer bevorzugten Ausführungsform die Verwendung von Cop 1 für die Herstellung eines Medikaments in Betracht, das geeignet ist, in Adjuvantien, wie unvollständigem Freundeschem Adjuvans oder komplettem Freundeschem Adjuvans verabreicht zu werden, und das eine Art einer Cop 1-Herstellung ist, die zuvor nicht für die Behandlung von Multipler Sklerose oder einen anderen therapeutischen Zweck verwendet wurde. Während die vorliegende Erfindung die orale Verabreichung des beschriebenen Medikaments, das Cop 1 zur Neuroprotektion umfasst, in Betracht zieht, folgt dies immer einer primären Aktivierung mit Cop 1, vorzugsweise in einem Adjuvans. Somit kann orales Cop 1 verwendet werden, um die Aktivität der T-Zellen nach der primären Aktivierung mit Cop 1 zu verstärken. Entsprechend sind die Zusammensetzung und ihre Wirkungsweise und Neuroprotektion sowohl praktisch als auch konzeptuell neu. Für den Durchschnittsfachmann, der mit der Verwendung von Cop 1 bei der Suppression oder Deaktivierung der T-Zellreaktivität auf Myelin-Antigenen vertraut ist, wäre es nicht offensichtlich, Cop 1 auf eine Weise, die speziell dafür angelegt ist, T-Zellen, zu aktivieren, die spezifisch auf Myelin-Antigene gerichtet sind, auf Grund ihrer heilsamen Wirkung bei der Neuroprotektion, einschließlich der Verbesserung des degenerativen Prozesses, der durch Autoimmunkrankheiten verursacht wird, zu verwenden. Cop 1-aktivierte T-Zellen können ebenfalls für die Herstellung eines Medikaments zur Verbesserung der degenerativen Wirkung verursacht durch Neoplasmen ohne Verwendung von Immuntheraphieverfahren verwendet werden. T-Zellen, die mit Cop 1 aktiviert werden, werden sich an der Stelle der neuralen Degeneration anreichern und die Hemmung dieser Degeneration erleichtern.

#### (4) Formulierungen und Verabreichung

**[0082]** Arzneimittel zur Verwendung gemäß der vorliegenden Erfindung können auf herkömmliche Weise unter Verwendung eines oder mehrerer physiologisch verträglicher Träger oder Exzipienten formuliert werden. Der/die Träger muss/müssen „verträglich“ in dem Sinne sein, dass sie mit den anderen Bestandteilen der Zusammensetzung kompatibel sind und für ihren Empfänger nicht schädlich sind. Die folgende beispielhafte Darstellung von Trägern, Verabreichungsweisen, Dosierungsformen etc., werden als bekannte Möglichkeiten aufgelistet, von denen die Träger, Verabreichungsweisen, Dosierungsformen etc., zur Verwendung mit der vorliegenden Erfindung ausgewählt werden können. Der Durchschnittsfachmann wird jedoch verstehen, dass jede ausgewählte gegebene Formulierung und Verabreichungsweise zuerst getestet werden sollte, um festzustellen, dass es die gewünschten Ergebnisse erzielt. Somit muss zum Beispiel die bestimmte Formulierung und Verabreichungsweise, wenn das aktive Prinzip Cop 1 oder ein Cop 1-verwandtes Peptid oder Polypeptid ist, gewährleisten, dass das aktive Prinzip als Impfstoff wirkt, um die dagegen aktivierten T-Zellen in vivo anzuheben. Wird eine derartige Immunantwort nicht erreicht, dann sollte diese bestimmte Formulierung und Verabreichungsweise nicht gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

**[0083]** Ähnlich sollten, wenn das aktive Prinzip aktivierte T-Zellen sind, die bestimmte Formulierung und Verabreichungsweise getestet werden, um sicherzustellen, dass die aktiven T-Zellen, die verabreicht werden, den Blutstrom in aktivem Zustand erreichen, so dass sie gemäß der vorliegenden Erfindung zur Stelle der Verletzung im ZNS kommen können.

**[0084]** Der Begriff „Träger“ betrifft ein Verdünnungsmittel, Adjuvans, einen Exzipienten oder ein Vehikel, mit dem das Therapeutikum verabreicht wird. Die Träger in der vorliegenden Zusammensetzung können ein Bindemittel, wie mikrokristalline Cellulose, Polyvinylpyrrolidon (Polyvidon oder Povidon), Gummi-Tragant, Gelatine, Stärke, Lactose oder Lactose-Monohydrat; ein Desintegrationsmittel, wie Alginsäure, Maisstärke und Ähnliches; ein Schmier- oder Oberflächenmittel wie Magnesiumstearat, oder Natriumlaurylsulfat; ein Gleitmittel wie kolloidales Silikondioxid, ein Süßmittel wie Saccharose oder Saccharin; und/oder ein Geschmacksmittel wie Pfefferminz, Methyl-Salicylat, oder Orangengeschmack umfassen.

**[0085]** Verabreichungsverfahren umfassen parenterale, z.B. intravenöse, intraperitoneale, intramuskuläre, subkutane, mucose (z.B. orale, intranasale, buccale, vaginale, rektale, intraokulare), intrathekale, topische und intradermale Wege. Die Verabreichung kann systemisch oder lokal sein.

**[0086]** Für die orale Verabreichung kann die pharmazeutische Herstellung in flüssiger Form, zum Beispiel Lösungen, Sirups oder Suspensionen sein oder sie kann als Wirkstoffprodukt zur Wiederherstellung vor der Verwendung mit Wasser oder anderen geeigneten Vehikeln präsentiert werden. Solche flüssigen Herstellungen können durch herkömmliche Methoden mit pharmazeutisch verträglichen Additiven wie Suspensionsmitteln (z.B. Sorbitsirup, Cellulose-Derivate oder hydrierte essbare Fette); Emulgatoren (z.B. Lecithin oder Gummi arabicum); nicht-wässrigen Vehikeln (z.B. Mandelöl, Ölestern oder fraktionierten Pflanzenölen); und Konsevi-

erungsmitteln (z.B. Methyl- oder Propyl-p-hydroxybenzoaten oder Sorbinsäure) hergestellt werden. Die Arzneimittel können zum Beispiel in Form von Tabletten oder Kapseln sein, hergestellt durch herkömmliche Verfahren mit pharmazeutisch verträglichen Excipienten wie Bindemitteln (z.B. vorgelatinisierter Maisstärke, Polyvinylpyrrolidon oder Hydroxypropylmethylcellulose); Füllmitteln (z.B. Lactose, mikrokristalliner Cellulose oder Calciumhydrogenphosphat); Schmiermitteln (z.B. Magnesiumstearat, Talk oder Kieselerde); Disintegrationsmitteln (z.B. Kartoffelstärke oder Natriumstärkeglycolat); oder Befeuchtungsmitteln (z.B. Natrium-laurylsulfat). Die Tabletten können durch Verfahren beschichtet sein, die auf dem Fachgebiet wohlbekannt sind.

**[0087]** Herstellungen zur oralen Verabreichung können passend formuliert sein, so dass sie eine kontrollierte Freisetzung der aktiven Verbindung gewährleisten.

**[0088]** Für die buccale Verabreichung können die Zusammensetzungen die Form von Tabletten oder Pastillen annehmen, die auf herkömmliche Weise hergestellt sind.

**[0089]** Die Zusammensetzungen können für die parenterale Verabreichung durch Injektion, z.B. durch Bolus-Injektion oder kontinuierliche Infusion formuliert sein. Formulierungen für die Injektion können in Einheits-Dosierungsform, z.B. in Ampullen oder in Behältern mit mehreren Dosen mit zugesetztem Konservierungsmittel präsentiert werden. Die Zusammensetzungen können Formen wie Suspensionen, Lösungen oder Emulsionen in öligen oder wässrigen Vehikeln annehmen und können Formulierungsmittel wie Suspensions-Stabilisations- und/oder Dispersionsmittel enthalten. Alternativ kann der aktive Bestandteil vor der Verwendung in Pulverform für die Verarbeitung mit einem geeigneten Vehikel, z.B. sterilem pyrogenfreiem Wasser vorliegen.

**[0090]** Die Zusammensetzungen können auch in rektalen Zusammensetzungen wie Zäpfchen oder Retentions-Enemata, die zum Beispiel herkömmliche Zäpfchen-Grundstoffe wie Kakaobutter oder andere Glyceride enthalten, formuliert werden.

**[0091]** Für die Verabreichung durch Inhalation werden die Zusammensetzungen zur Verwendung gemäß der vorliegenden Erfindung normalerweise in Form einer Aerosolspray-Präsentation aus unter Druck stehenden Packungen oder einem Zerstäuber, unter Verwendung eines geeigneten Treibgases, z.B. Dichlordifluormethan, Trichlorfluormethan, Dichlortetrafluorethan, Kohlendioxid oder einem anderen geeigneten Gas zur Verfügung gestellt. Im Fall eines Aerosols mit Druckausgleich kann die Dosierungseinheit durch Bereitstellen eines Ventils zur Abgabe einer gemessenen Menge bestimmt werden. Kapseln und Kartuschen z.B. mit Gelatine, zur Verwendung in einem Inhalationsgerät oder Ballon, können so formuliert werden, dass sie ein Pulvergemisch der Verbindung und eine geeignete Pulver-Grundlage wie Lactose oder Stärke enthalten.

**[0092]** In einer bevorzugten Ausführungsform sind Zusammensetzungen, die Cop 1-aktivierte T-Zellen, eine Cop 1- oder ein Cop 1-verwandtes Peptid oder Polypeptid umfassen, gemäß Routineverfahren als Arzneimittel, die für die intravenöse Verabreichung an Menschen adaptiert sind, formuliert. Typischerweise sind Zusammensetzungen für die intravenöse Verabreichung Lösungen in sterilem isotonischem wässrigem Puffer. Dort wo nötig, kann die Zusammensetzung auch ein Lösungsmittel und ein lokales Anästhetikum wie Lignocain umfassen, um den Schmerz an der Injektionsstelle zu lindern. Im Allgemeinen werden die Bestandteile entweder getrennt oder miteinander vermischt angewendet. Dort wo die Zusammensetzung durch Infusion verabreicht werden soll, kann sie in einer Infusionsflasche, die steriles Wasser von pharmazeutischem Grad oder Kochsalzlösung enthält, dispensiert werden. Dort wo die Zusammensetzung durch Injektion verabreicht wird, kann eine Ampulle sterilen Wassers oder Kochsalzlösung enthält für die Injektion bereitgestellt werden, so dass die Bestandteile vor der Verabreichung vermischt werden können.

**[0093]** Pharmazeutische Zusammensetzungen, die Cop 1 oder Cop 1 verwandtes Peptid oder Polypeptid enthalten, können optional mit einem Adjuvans auf die für Immunisierungen übliche Weise verabreicht werden. Nicht-beschränkende Beispiele für solche Adjuvantien umfassen Alaun und unvollständiges Freundsches Adjuvans. Andere Arten, die Immunogenität des verabreichten Peptids oder Polypeptids zu verbessern, umfassen die Verabreichung in Form eines Aggregats oder Komplexes mit Albumin oder mit anderen Trägern, wie dem Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet der Impfstoffe wohlbekannt ist. Metabolisierbare Lipidemulsionen wie Intralipid oder Lipofundin können ebenfalls als Vehikel für die Cop 1-Therapie auf die in WO 97/02016 offenbarte Weise verwendet werden. Während von diesen Materialien bekannt ist, dass sie eine Verschiebung des Cytokins TH1 zu TH2 verursachen, gibt es keinen Grund zu der Annahme, dass TH2-Cytokine für den Zweck der vorliegenden Erfindung nicht verwendbar und vielleicht sogar vorzuziehen sind.

**[0094]** Wird Cop 1 oral eingeführt, kann es mit anderen Nahrungsmittelformen vermischt werden und in fester, halbfester, suspensierter oder emulgierter Form aufgenommen werden; und es kann mit pharmazeutisch ver-

träglischen Trägern, einschließlich Wasser, Suspensionsmitteln, Emulgatoren, Geschmacksverstärkern und Ähnlichen vermischt werden. In einer Ausführungsform ist die orale Zusammensetzung mit einem erst im Darm löslichen Überzug versehen. Die Verwendung von erst im Darm löslichen Überzug ist auf dem Fachgebiet wohlbekannt. Zum Beispiel lehrt Lehman (1971) darmlösliche Überzüge wie Eudragit S und Eudragit L. Das Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2. Ausgabe, lehrt ebenfalls die Anwendung von Eudragit S und Eudragit L. Ein Eudragit, das in der vorliegenden Erfindung verwendet werden kann, ist L30D55.

**[0095]** Cop 1 kann in einigen der vorstehend erwähnten Formen ebenfalls nasal durch Inhalation oder Nasentropfen verabreicht werden. Des Weiteren kann die orale Inhalation verwendet werden, um Cop 1 zu den Schleimhautauskleidungen der Luftröhre und der Bronchialwege zu transportieren.

**[0096]** Die Erfindung beschreibt ebenfalls eine pharmazeutische Packung oder einen pharmazeutischen Kit, die einen oder mehrere Behälter umfassen, die mit einem oder mehreren der Bestandteile der Arzneimittel der Erfindung gefüllt sind.

**[0097]** In einer bevorzugten Ausführungsform wird in Betracht gezogen, die Arzneimittel der Erfindung an einen Säuger, vorzugsweise einen Menschen, kurz nach Verletzung oder den Nachweis einer degenerativen Läsion im NS zu verabreichen. Die therapeutischen Verwendungsmöglichkeiten der Erfindung können die Verabreichung von Cop 1-aktivierten T-Zellen oder Cop 1 oder Cop 1-verwandtem Peptid oder Polypeptid oder eine Kombination davon umfassen. Verwendet man eine Kombinationstherapie, so kann Cop 1 vor, gleichzeitig mit oder nach Verabreichung von Cop 1-aktivierten T-Zellen verabreicht werden.

**[0098]** In einer Verabreichungsform sind die Zusammensetzungen der Erfindung geeignet, in Kombination mit einem oder mehreren der folgenden verabreicht zu werden: (a) mononucleäre Phagozyten, vorzugsweise gezüchtete Monocyten (wie in PCT-Veröffentlichung Nr. WO97/09985 beschrieben, die hierin unter Bezugnahme gänzlich eingeschlossen ist), die stimuliert wurden, um ihre Fähigkeit zur Förderung neuronaler Regeneration zu fördern; (b) einem neurotrophen Faktor, wie dem saurem Fibroblasten-Wachstumsfaktor; und (c) einem anti-entzündlichen therapeutischen Stoff (z.B. einem anti-entzündlichem Steroid wie Dexamethason oder Methylprednisolon, oder einem nicht-steroidalen anti-entzündlichen Peptid wie Thr-Lys-Pro (TKP)).

**[0099]** In einer anderen Ausführungsform werden mononucleäre Phagozytenzellen gemäß der PCT-Veröffentlichung Nr. WO 97/09985 und der U.S.-Patentanmeldung Seriennummer 09/041,280, eingereicht am 11. März 1998, in die Stelle der Verletzung oder der Läsion innerhalb des ZNS, entweder gleichzeitig, vor oder nach der parenteralen Verabreichung von Cop 1-aktivierten T-Zellen, Cop 1 oder einem Cop 1-verwandten Peptid oder Polypeptid injiziert.

**[0100]** In einer anderen Ausführungsform von Cop 1-aktivierten T-Zellen kann Cop 1 oder ein Cop 1-verwandtes Peptid oder Polypeptid als einzelne Dosis verabreicht werden oder sie können, vorzugsweise in Intervallen von zwei Wochen und dann in aufeinanderfolgenden längeren Intervallen einmal im Monat, einmal im Vierteljahr, einmal alle sechs Monate, etc. wiederholt werden. Der Verlauf der Behandlung kann mehrere Monate, mehrere Jahre oder gelegentlich auch über die Lebensdauer des Individuums andauern, abhängig von dem Zustand, der behandelt wird. Im Fall einer ZNS-Verletzung kann die Behandlung im Bereich zwischen mehreren Tagen bis Monaten oder sogar Jahren liegen, bis sich der Zustand stabilisiert hat und es kein oder nur ein begrenztes Risiko der Entwicklung einer sekundären Degeneration gibt. Bei einer chronischen Erkrankung am Menschen oder bei der Parkinson-Krankheit kann die therapeutische Behandlung gemäß der Erfindung über das Leben andauern.

**[0101]** Wie für den Fachmann offensichtlich sein wird, hängt die therapeutische Wirkung zeitweise vom Zustand oder der Krankheit, die behandelt werden sollen, vom Alter und Gesundheitszustand, von anderen körperlichen Parametern (z.B. Geschlecht, Gewicht etc.) des Individuums sowie von verschiedenen anderen Faktoren ab, z.B. davon, ob das Individuum andere Arzneistoffe einnimmt, etc.

**[0102]** Die optimale Dosis der therapeutischen Zusammensetzungen, umfassend Cop 1-aktivierte T-Zellen der Erfindung, ist proportional zur Anzahl der Nervenfasern, die durch Verletzung oder Krankheit an der behandelten Stelle beeinträchtigt sind. In einer bevorzugten Ausführungsform liegt die Dosis im Bereich zwischen etwa  $5 \times 10^6$  bis etwa  $10^7$  Zellen zur Behandlung einer Läsion, die etwa  $10^5$  Nervenfasern beeinträchtigt, wie etwa der vollständigen Durchtrennung des optischen Nervs einer Ratte, und liegt etwa im Bereich von  $10^7$  bis etwa  $10^8$  Zellen bei der Behandlung einer Läsion, die etwa  $10^6$ – $10^7$  Nervenfasern beeinträchtigt, wie einer vollständigen Läsion des optischen Nervs beim Menschen. Wie für den Fachmann offensichtlich sein wird, kann die Dosis der T-Zellen im Verhältnis zur Anzahl an Nervenfasern, von denen an der Läsion oder der Stelle der

Verletzung angenommen wird, dass sie beeinträchtigt sind, herauf- oder heruntergesetzt werden.

#### (5) Einrichtung autologer Zellbanken für T-Lymphocyten

**[0103]** Um sekundären Schaden nach Nervenverletzung zu minimieren, können Patienten durch Verabreichung eines Medikaments einschließlich autologer oder semi-allogener T-Lymphocyten, die auf Cop 1 oder ein Cop 1-verwandtes Peptid oder Polypeptid sensibilisiert sind, behandelt werden. Da das mögliche Zeitfenster bis jetzt noch nicht genau definiert wurde, sollte sobald wie möglich, vorzugsweise innerhalb einer Woche nach der primären Verletzung, eine Therapie angewendet werden, um die Erfolgchancen zu maximieren.

**[0104]** Um die Lücke zwischen der Zeit, die für die Aktivierung benötigt wird und der Zeit, die für die Behandlung gebraucht wird, zu überbrücken, kann mit persönlichen Vorräten autologer T-Lymphocyten, die für die zukünftige Verwendung für die neuroprotektive Therapie gegen sekundäre Degeneration im Fall einer NS-Verletzung hergestellt sind, eine Bank eingerichtet werden. T-Lymphocyten werden aus dem Blut isoliert und dann für Cop 1 oder ein Cop 1-verwandtes Peptid oder Polypeptid sensibilisiert. Die Zellen werden dann eingefroren und üblicherweise unter dem Namen der Person, Identitätsnummer und Blutgruppe in einer Zellbank gelagert, bis sie gebraucht werden.

**[0105]** Zusätzlich können im Fall von traumatischen Störungen des NS wie Ischämie oder mechanischer Verletzung sowie für behandelte neurodegenerative Zustände wie der Alzheimer-Krankheit oder der Parkinson-Krankheit autologe Stammzellen aus dem ZNS prozessiert und für potenzielle Verwendung durch einen einzelnen Patienten gelagert werden. Alternativ können semi-allogene oder allogene T-Zellen zur Verwendung durch jede Person, die ein MHC-Typ II-Molekül mit der Quelle der T-Zellen gemeinsam hat, in Banken eingefroren gelagert werden.

**[0106]** Die folgenden Beispiele veranschaulichen bestimmte Merkmale der vorliegenden Erfindung.

#### (6) Beispiele

##### Materialien und Methoden für die Beispiele 1 und 2

**[0107]** Tiere. Durch Inzucht erzeugte weibliche adulte Lewis-Ratten (8–12 Wochen alt) wurden durch das Animal Breeding Center des Weizmann Institute of Science bereitgestellt. Die Ratten wurden in einem licht- und temperaturgesteuerten Raum untergebracht und in jedem Experiment nach dem Alter zusammengebracht. Die Tiere wurden gemäß den Regulierungen, die durch IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee) formuliert sind, behandelt.

**[0108]** Antigene. Basisches Myelinprotein (MBP) aus dem Rückenmark von Meerschweinchen und Ovalbumin (OVA) wurden von Sigma (St. Lewis, MO) bezogen. Das Cop 1, das in den vorliegenden Beispielen verwendet wurde, war das Produkt COPAXONE® von Teva Pharmaceuticals (Israel), wobei das Produkt im Handel bezogen wurde.

**[0109]** Antikörper. Monoclonaler Mäuse-anti-Ratten-T-Zellrezeptor (TCR) wurde freundlicherweise von Dr. Boris Reizis bereitgestellt. Cy-3-konjugiertes Ziegen-anti-Maus-IgG (mit minimaler Kreuzreaktion auf Ratten-, menschliche, Rinder- und Pferde-Serumproteine) wurde bei Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA) bezogen.

**[0110]** T-Zelllinien. T-Zelllinien wurden durch Drainieren von Lymphknotenzellen, die von Lewis-Ratten erhalten wurden, die mit den vorstehenden Antigenen (Ben-Nun et al, 1981a) immunisiert worden waren, erzeugt. Das Antigen wurde in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) (1 mg/ml) gelöst und mit einem gleichen Volumen an unvollständigem Freundschem Adjuvans (IFA) (Difco Laboratories, Detroit, MI), das mit 4 mg/ml Mycobacterium tuberculosis (Difco) ergänzt war, emulgiert. Zehn Tage nachdem das Antigen in 0,1 ml der Emulsion in die Hinterpfotenballen der Ratten injiziert worden war, wurden die Ratten getötet und ihre drainierten Lymphknoten chirurgisch entfernt und dissoziiert. Die Zellen wurden gewaschen und mit dem Antigen (10 µg/ml) in Stimulierungsmedium, das Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium (DMEM) ergänzt mit L-Glutamin (2 mM), 2-Mercaptoethanol ( $5 \times 10^{-5}$ M), Natriumpyruvat (1 mM), Penicillin (100 IU/ml), Streptomycin (100 µg/ml), nicht-essenzielle Aminosäuren (1ml/100 ml) und autologes Serum 1 % (Vol./Vol.) enthielt, aktiviert. Nach Inkubation über 72 Stunden bei 37°C, 98% relativer Feuchtigkeit und 10% CO<sub>2</sub> wurden die Zellen auf ein Vermehrungsmedium bestehend aus DMEM, L-Glutamin, 2-Mercaptoethanol, Natriumpyruvat, nicht-essenziellen Aminosäuren und Antibiotika in denselben Konzentrationen wie vorstehend mit Zusetzen von 10% foe-

talem Kälberserum (FCS) (Volumen/Volumen) und 10% T-Zell-Wachstumsfaktor, abgeleitet von dem Überstand von mit Concanavalin A (ConA)-stimulierten Milzzellen (Gillis et al, 1978), überführt. Die Zellen wurden 4–10 Tage in Vermehrungsmedium gezüchtet, bevor sie erneut mit ihrem Antigen (10 µg/ml) in Gegenwart von bestrahlten (2000 rad) Thymuszellen ( $10^7$  Zellen/ml) in Stimulierungsmedium stimuliert wurden. Die T-Zelllinien wurden durch wiederholte Stimulierung und Vermehrung vermehrt (Ben-Nun et al, 1982).

**[0111]** Quetschverletzung des Sehnervs. Der Sehnerv wurde wie vorstehend beschrieben einer Quetschverletzung unterzogen (Duvdevani et al, 1990). Kurz, Ratten wurden durch intraperitoneale (i.p.) Injektion von Rompun (Xylazin, 10 mg/kg; Vitamed, Israel) und Vetalar (Ketamin, 50 mg/kg; Fort Dodge Laboratories, Fort Dodge, IA) tief anästhesiert. Unter Verwendung eines binokular arbeitenden Mikroskops wurde im rechten Auge eine laterale Canthotomie durchgeführt und die Netzhaut wurde seitlich zur Hornhaut eingeschnitten. Nach Abtrennung der Retractor bulbi-Muskeln wurde der Sehnerv intraorbital durch stumpfe Durchtrennung exponiert. Unter Verwendung einer kalibrierten Kreuzwirkungs-Zange wurde der Sehnerv 1–2mm vom Auge entfernt einer Quetschverletzung unterzogen. Milde und schwere traumatische Verletzungen wurden in Kurzzeit-Versuchen (2 Wochen) zugefügt, da es sich zeigte, dass dieser Zeitraum für ein Aufzeigen von sekundärer Degeneration und seiner Reaktion auf Behandlung optimal war (Yoles, 1988). Den unverletzten kontralateralen Nerv ließ man ungestört.

**[0112]** Messung der sekundären Degeneration durch retrograde Markierung retinaler Ganglionzellen. Die sekundäre Degeneration der Axone des optischen Nervs und ihrer anhängenden Ganglionzellen (RGCs) wurde nach Anwendung der fluorescenten lipophilen Färbung 4-(4-(Didecylamino)styryl)-N-methylpyridin-Iod (4-Di-10-Asp) (Molecular Probes Europe BV, Niederlande) 2 Wochen nach der Quetschverletzung distal zur Stelle der Läsion gemessen. Da nur Axone, die intakt sind, die Färbung zurück zu ihren Zellkörpern transportieren können, stellt die Anwendung der Färbung distal zur Läsionsstelle nach zwei Wochen sicher, dass nur Axone, die sowohl die primäre Verletzung als auch die sekundäre Degeneration überlebt haben, gezählt werden. Dieser Ansatz ermöglichte eine Differenzierung zwischen Neuronen, die noch funktionell intakt sind, und Neuronen, in denen die Axone verletzt, die Zellkörper jedoch noch lebensfähig sind, da nur die Neuronen, deren Fasern morphologisch intakt sind, Färbung aufnehmen können, die distal zur Stelle der Verletzung aufgebracht ist, und sie zu ihren Zellkörpern transportieren können. Unter Verwendung dieses Verfahrens spiegelt die Anzahl an markierten RGCs die Anzahl an noch funktionierenden Neuronen verlässlich wieder. Die Markierung und die Messung wurden wie folgt durchgeführt: der rechte optische Nerv wurde zum zweiten Mal exponiert, wiederum ohne die retinale Blutversorgung zu beschädigen. 1–2 mm von der distalen Begrenzung der Verletzungsstelle wurde eine vollständige Axotomie durchgeführt, und feste Kristalle (0,2–0,4 mm Durchmesser) von 4-Di-10-Asp wurden an der Stelle der neu gebildeten Axotomie hinterlegt. Fünf Tage nach Aufbringen der Färbung wurden die Ratten getötet. Die Netzhaut wurde vom Auge abgelöst, als abgeflachtes ganzes Präparat in 4% Paraformaldehyd-Lösung präpariert und durch Fluoreszenz-Mikroskopie auf markierte RGCs untersucht.

**[0113]** Enzymverbundener Immunabsorptions-Test. Anti-MBP T-Zellen wurden über eine Woche in einem Vermehrungsmedium gezüchtet, dann mit PBS gewaschen und in Stimulierungsmedium resuspendiert. Die T-Zellen ( $0,5 \times 10^6$  Zellen/ml) wurden in Gegenwart von bestrahlten Thymocyten ( $10^7$  Zellen/ml) mit ConA (1,25 µg/ml), oder mit MBP-Antigen (10 µg/ml) oder mit Cop 1-Antigen (10 µg/ml) oder mit OVA-Antigen (10 µg/ml), oder mit keinem Antigen bei 37°C, 98% relativer Feuchtigkeit und 10% CO<sub>2</sub> in Stimulierungsmedium inkubiert. Zusätzlich wurden bestrahlte Thymocyten ( $10^7$  Zellen/ml) allein in Stimulierungsmedium inkubiert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen zentrifugiert und ihre Überstände wurden aufgefangen und Proben genommen. Die Konzentrationen an Neurotrophin (NT)-3, Nerven-Wachstumsfaktor (NGF) und NT-4/5 in den Proben wurden durch Bestimmen mit enzymverbundenen Sandwich-Immunabsorptionstest (ELISA)-Kits (Promega, Madison, WI) und Vergleich mit einem NT-Standard (Absorptionsmessung bei 450 nm unter Verwendung eines ELISA-Lesegeräts) bestimmt. Die Konzentrationen von Gehirn abgeleitetem neurotrophen Faktor (BDNF) in den Proben wurden mit einem empfindlichen Sandwich-ELISA bestimmt. Kurz, Platten mit 96 Vertiefungen und flachem Grund wurden mit einem Hühner-anti-Mensch-BDNF-Antikörper (Promega, Madison, WI) in 0,025 M NaHCO<sub>3</sub> und 0,025 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 8,2) beschichtet. Rekombinantes menschliches BDNF (als Standard verwendet; Research Diagnostics, Flanders, NJ) wurde in Reihenverdünnungen in Blocking-Lösung enthaltend 3% Rinderserum-Albumin (BSA), 0,05% Polyoxyethylensorbitanmonolaureat (Tween-20), und 1 % FCS in PBS (pH 8,2) verwendet. Gebundenes BDNF wurde durch Inkubieren der Platten mit einem Mäuse-anti-Mensch-BDNF-Antikörper (Research Diagnostics) und danach mit Peroxidase-konjugiertem Ziegen-anti-Maus-IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) in Blocking-Lösung nachgewiesen. Die Platten wurden unter Verwendung eines 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin-Flüssigsubstratsystems (Sigma, St. Louis, MO) entwickelt. Die Reaktion wurde durch Zusetzen von 1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> gestoppt, und die optische Dichte wurde bei 450 nm bestimmt. Die Ergebnisse für jeden Versuch wurden als die Menge an sezerniertem NT pro 1 ml Probe,

nach Subtraktion der Hintergrund-Mengen der bestrahlten Thymocyten, die mit dem Stimulierungsmedium inkubiert worden waren, berechnet.

**[0114]** Immunhistochemie. Longitudinale-Gefrierschnitte (10 µm dick) der Nerven wurden auf mit Gelatine beschichtete Glas-Träger gegeben und bis zur Präparierung für Fluoreszenz-Färbung eingefroren. Die Schnitte wurden 10 Min bei Raumtemperatur fixiert, zweimal mit doppelt destilliertem Wasser gewaschen und drei Minuten in PBS, das 0,05% Tween-20 enthielt, inkubiert. Die Abschnitte wurden dann eine Stunde bei Raumtemperatur mit monoclonalen Mäuse-anti-Ratten-Antikörpern gegen TCR (Hunig, 1989), die in PBS, das 3% FCS und 2% BSA enthielt, verdünnt waren, inkubiert. Die Schnitte wurden dann drei Mal mit PBS, das 0,05% Tween-20 enthielt, gewaschen und mit Cy3-konjugiertem Ziegen-anti-Maus-IgG (mit minimaler Kreuzreaktion mit Ratten-, menschlichen, Rinder- und Pferde-Serumproteinen; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Schnitte wurden mit PBS, das Tween-20 enthielt, gewaschen und mit Glycerin, das 1,4-Diazobicyclo-(2, 2, 2)octan enthielt, behandelt, um eine Fluoreszenzlöschung zu hemmen. Die Schnitte wurden mit einem Zeiss Universal Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht.

#### BEISPIEL 1: NEUROPROTEKTION DURCH ANTI-COP 1 T-ZELLEN

Adoptiver Transfer von T-Zellen, die auf Cop 1 reagieren, ist im verletzten optischen Nerv neuroprotektiv

**[0115]** In einer vorherigen Studie wurde aus dem Labor der vorliegenden Erfinder gezeigt, dass nach aktuellem ZNS-Trauma bei der Ratte ein passiver Transfer von enzephalitogenen T-Zellen, der für ZNS eigene Antigene wie MBP spezifisch ist, die Ausbreitung einer Schädigung verhindert und somit die sekundäre Degeneration eindämmt (vgl. WO 99/60021). Hier wird die neuroprotektive Wirkung von T-Zellen, die auf Cop 1 reagieren, gezeigt, wobei die T-Zellen, anders als MBP-reaktive T-Zellen, nicht enzephalitogen sind. Direkt nach leichter ([Fig. 1A](#)), oder schwerer ([Fig. 1B](#)) Verletzung des Sehnervs wurde Ratten PBS in IFA oder Cop 1-spezifische T-Zellen in IFA injiziert. Um die sekundäre Degeneration festzustellen, wurde zwei Wochen nach der Verletzung die Neurotracer-Färbung 4-Di-10-Asp distal zur Stelle der Verletzung auf den Sehnerv aufgetragen. Nach fünf Tagen wurden die Ratten getötet und ihre Netzhäute wurden ausgeschnitten und flach präpariert. Markierte (überlebende) RGCs von vier Feldern, die sich ungefähr in demselben Abstand von der Papille in jeder Netzhaut befinden, wurden unter einem Fluoreszenz-Mikroskop gezählt. Die Ergebnisse sind in [Fig. 1A](#) und [Fig. 1B](#) gezeigt. Die neuroprotektive Wirkung der Cop 1-reaktiven T-Zellen im Vergleich zu der von PBS war sowohl für leichte ( $P < 0,005$ , Students t-Test) als auch für schwere ( $P < 0,05$ , Students t-Test) Quetschverletzung signifikant. Die Ergebnisse sind die Summe von drei Versuchen. Jede Gruppe enthielt sechs bis zehn Ratten.

Cop 1-reaktive T-Zellen akkumulieren sowohl in verletztem als auch in unverletztem Nervengewebe

**[0116]** Im Labor der vorliegenden Erfinder wurde vor kurzem gezeigt, dass dem passiven Transfer von anti-MBP-T-Zellen in quetschverletzte Ratten eine starke Anhäufung der injizierten T-Zellen an der Stelle der Verletzung folgt. Der passive Transfer von Cop 1-reaktiven T-Zellen in der vorliegenden Studie verursachte ebenfalls eine signifikante Anhäufung der injizierten T-Zellen an der Verletzungsstelle im Vergleich zur Anhäufung von endogenen anti-MBP-T-Zellen bei den mit PBS behandelten verletzten Ratten. Die T-Zell-Anhäufung bei den mit Cop 1 behandelten Ratten war am Tag 7 nach der Injektion am größten. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Ergebnissen mit injizierten T-Zelllinien verschiedener Spezifitäten überein. In dieser Studie war die T-Zell-Anhäufung an der Stelle der Läsion bei verletzten Nerven nicht-selektiv, im Gegensatz zu unverletzten Nerven, bei denen man nur T-Zellen, die für ZNS-eigene Antigene spezifisch waren, angehäuft fand. Somit stellt eine Anhäufung von T-Zellen gegen Cop 1 im verletzten Nerv keinen Hinweis auf eine Kreuzerkennung mit einem der vorhandenen ZNS-Proteine und damit auf Aktivität dar. T-Zellen gegen Cop 1, ähnlich wie T-Zellen gegen MBP häuften sich jedoch im unverletzten Nerv an, anders als T-Zellen gegen OVA (Ergebnisse nicht gezeigt). Obwohl es eine geringere Anhäufung von T-Zellen, die auf Cop 1 reagierten als von T-Zellen, die für MBP spezifisch waren, gab, unterstützen diese Ergebnisse weiterhin den Hinweis auf eine Kreuzreaktivität zwischen Cop 1 und MBP in vivo.

Cytokin- und Neurotrophin-Profile von injizierten T-Zelllinien spezifisch für MBP und Cop 1

**[0117]** Überstände von unstimulierten T-Zellen oder von T-Zellen, die über 48 Stunden mit ConA-Mitogen stimuliert wurden, oder MBP-Antigen oder Cop 1-Antigen in Stimulierungsmedium wurden einem Sandwich-ELISA unterzogen. Die gezüchteten Medien, die Produkte enthielten, die von diesen Zellen sezerniert wurden, wurden aufgefangen und ihre Cytokin-Inhalte wurden durch ELISA quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 gezeigt. Die aktivierten T-Zellen sezernierten viel höhere Mengen an Cytokinen als die nicht-stimulierten

T-Zellen. Die mit MBP stimulierten T-Zellen exprimierten vorzugsweise das für Th1 spezifische Cytokin INF, wohingegen die mit Cop 1 stimulierten T-Zellen vorzugsweise das für Th2 spezifische Cytokin IL-10 exprimierten. Die größten Mengen an sezernierten Cytokinen wurden in den Überständen von T-Zellen nachgewiesen, die mit ConA stimuliert wurden (Tabelle 2).

Tabelle 2

	Ruhender Zustand		Stimulierung mit MBP		Stimulierung mit Cop 1		Stimulierung mit ConA	
	Tmbp	Tcop	Tmbp	Tcop	Tmbp	Tcop	Tmbp	Tcop
<b>IFN-<math>\gamma</math></b> (pg/ml)	725	6645	15692	925	7242	11825	22758	22525
<b>IL-10</b> (pg/ml)	41	382	1941	13	365	7244	3565	6503

**[0118]** Die Hochregulierung der neurotrophen Expression und die Sezernierung durch T-Zellen, die durch ihre spezifischen Antigene aktiviert sind, wurde kürzlich im Labor der vorliegenden Erfinder gezeigt. In einem Versuch, einen Einblick in den Mechanismus zu erhalten, dem die T-Zell-vermittelte Neuroprotektion unterliegt, wurden die T-Zell-Überstände in der vorliegenden Studie einem ELISA unterzogen, um die Neurotrophin (NT)-Profile von T-Zellen zu bestimmen, die für die Neuroprotektion verantwortlich sind. Die Cop 1-stimulierten T-Zellen sezernierten sowohl NGF als auch NT-4/5, jedoch in geringeren Mengen als jenen, die von den Anti-MBP-Zellen sezerniert wurden. Relativ zur Herstellung durch anti-MBP-T-Zellen war die Herstellung von NT-3 durch die Cop 1-stimulierten T-Zellen nicht signifikant; die Herstellung von BDNF war jedoch massiv ([Fig. 2A](#)). Demnach produzierten die Cop 1-stimulierten T-Zellen geringere Mengen aller untersuchten neurotrophen Faktoren, mit der bemerkenswerten Ausnahme von BDNF ([Fig. 2A](#)). Vier unabhängige Bestimmungen der Mengen an NT-3 und BDNF, sezerniert durch die unterschiedlich stimulierten T-Zellen, ergaben ähnliche Ergebnisse. In jedem Fall stellten Cop 1-stimulierte T-Zellen etwa 2,5 Mal mehr BDNF her als Anti-MBP-T-Zellen und nur 10% der Mengen an NT-3 ([Fig. 2B](#)).

#### BEISPIEL 2: IMPFUNG MIT COP 1

**[0119]** Impfung mit Cop 1 schützt Sehnervenfasern vor sekundärer Degeneration Dieses Beispiel soll zeigen, dass die Impfung mit Cop 1 in IFA mit einem Booster, der zwei Tage später gegeben wird, eine Immunantwort ergibt, die für die Neuroprotektion innerhalb des kritischen Zeitfensters stark genug ist.

**[0120]** Anästhetisierte Ratten wurden leichter traumatischer Verletzung des Sehnervs unterzogen, sofort mit Cop 1 in IFA geimpft, und ein Booster wurde zwei Tage später gegeben. Nach zwei Wochen wurden die RGCs rückläufig markiert, und fünf Tage später wurden die Ratten getötet und ihre Netzhäute ausgeschnitten. Ratten, die mit Cop 1 geimpft waren, zeigten im Vergleich zu Kontrollratten, denen PBS in IFA injiziert wurde ([Fig. 3](#)), einen Hinweis auf signifikante Neuroprotektion.

#### BEISPIEL 3: SCHUTZ VOR GLUTAMAT-TOXIZITÄT

##### Versuch 1: Impfung mit Cop 1 schützt Sehnervenfasern vor Glutamat-Toxizität

**[0121]** Auf Grund der vielversprechenden Neuroprotektion verletzter Nerven, erhalten durch Immunisierung mit Cop 1, ist es wichtig, herauszufinden, ob die Protektion auf einen Nervenschaden beschränkt ist, der durch ein Trauma verursacht ist, oder ob es allgemeiner eine Neuroprotektion vor feindlichen Umweltbedingungen, verursacht durch Glutamat-Toxizität, wäre. Entsprechend wurde der folgende Versuch durchgeführt.

**[0122]** Immunisierung. C57B1/6J-OLA-Mäusen (8–10 Wochen alt) wurden jede mit insgesamt 75  $\mu$ g Cop 1 injiziert, das mit einem gleichen Volumen vollständigem Freundschens Adjuvans (CFA), das 5 mg/ml H37 RA-Mycobakterien (Difco) enthielt, emulgiert war. Mäusen aus einer zweiten Gruppe wurde eine Emulsion von phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) in CFA injiziert. Die Emulsion, mit einem Gesamtvolumen von 0,1 ml, wurde 10 Tage bevor Glutamat in die Netzhaut eingeführt wurde, infradermal injiziert.

**[0123]** Glutamat-Toxizität. Zehn Tage nach der Immunisierung wurden die Mäuse anästhesiert, und 1  $\mu$ l Kochsalzlösung, die 200 nMol Glutamat enthielt, wurde in den Glaskörper des rechten Auges injiziert. In das linke

Auge wurde nichts injiziert und es diente als Kontrolle.

**[0124]** Markierung von retinalen Ganglionzellen. Drei Tage (72 Stunden) vor Erfassung des RGC-Überlebens wurde jede Maus anästhesiert und in ein stereotaktisches Gerät platziert. Der Schädel wurde exponiert und trocken und sauber gehalten. Das Bregma wurde identifiziert und markiert. Der bestimmte Injektionspunkt lag in einer Tiefe von 2 mm von der Hirnoberfläche, 2,92 mm hinter dem Bregma in der anteroposterioren Achse und 0,5 mm lateral zur Mittellinie. Ein Fenster wurde oberhalb der bestimmten Koordinaten in der rechten und der linken Hemisphäre in den Schädel gebohrt. Die Neurotracer-Färbung FluoroGold (4% Lösung in Kochsalzlösung; Fluorochrom, Denver, CO) wurde dann unter Verwendung einer Hamilton-Spritze eingebracht (1 µl, in einer Rate von 0,5 µl/min).

**[0125]** Erfassung des RGC-Überlebens. Sieben Tage nach der Glutamat-Verabreichung wurden die Augen enukleiert und ihre Netzhäute wurden abgelöst und als abgeflachte Gesamtpräparate in 4% Paraformaldehyd-Lösung aufpräpariert. Markierte Zellen von 6 bis 8 Feldern identischer Größe (0,078 mm<sup>2</sup>), die sich etwa 1 mm entfernt vom Sehnervenkopf befanden, wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop gezählt und gemittelt. Die Ergebnisse sind in [Fig. 4](#) gezeigt. Es wurde herausgefunden, dass die Glutamat-Toxizität in den Kontrollen etwa 4-Mal höher war als in Mäusen, die mit Cop 1 immunisiert waren.

#### Versuch 2: Impfung zum Schutz von Neuronen gegen Glutamat-Toxizität und Augenhochdruck

**[0126]** In dieser Studie wird gezeigt, dass die aktive oder passive Immunisierung mit einem Peptid, das von Myelin-Oligodendrocyten-Glycoprotein (MMOG) abgeleitet ist, oder mit MBP, das wirksame Neuroprotektion nach axonaler Verletzung bereitstellt (Moalem et al., 1999a; Moalem et al., 1999b und Fisher et al., 2000), die Neuronen nicht vor der Toxizität, die durch Glutamat verursacht wird, schützt. Ein Schutz vor Glutamat-Toxizität wurde jedoch durch Impfung mit Cop-1 erzielt. Es zeigte sich weiterhin, dass die Immunisierung mit Cop-1 einen hochwirksamen Schutz vor dem Tod der retinalen Ganglionzellen zur Verfügung stellt, der im Rattenmodell durch Augenhochdruck durch Glaukom induziert wird, unter Bedingungen, bei denen der Druck hoch bleibt und durch die Immunisierung nicht beeinträchtigt wird.

#### Materialien und Methoden

**[0127]** Tiere. Alle Tiere wurden nach den Vorschriften, die vom Institutional Animal Care and Use Committee formuliert wurden, behandelt. Mäuse der C57BL/6J- und Balb/c-Stämme im Alter von 8–13 Wochen und durch Inzucht gezüchtete adulte Lewis Ratten im Alter von 8–12 Wochen wurden vom Animal Breeding Center des Weizmann Institute of Science geliefert und in licht- und temperaturkontrollierten Räumen untergebracht. Die Tiere wurden in jedem Versuch nach Alter und Größe zusammengebracht. Vor ihrer Verwendung in Versuchen wurden die Tiere durch intraperitoneale Verabreichung von 80 mg/kg Ketamin und 16 mg/kg Xylazin anästhesiert.

**[0128]** Antigene. Cop-1 wurde von Teva Pharmaceuticals (Petah Tikva, Israel) bezogen. Myelin-Oligodendrocyten-Glycoprotein (MOG)-Peptid (pMOG) 1–22 (GQFRVIGPGHPIRALVGDEAEL) (SEQ ID NR:33) wurde unter Verwendung des Fmoc-Verfahrens mit einem automatischen multiplen Peptid-Synthesegerät (AMS422, Abimed, Langenfeld, Deutschland) im Labor von Prof. M. Fridkin am Department of Chemistry des Weizmann Institute of Science synthetisiert. MBP aus dem Rückenmark von Meerschweinchen wurde von Sigma (Israel) bezogen.

**[0129]** Immunisierung. Mäuse oder Ratten wurden mit 75 µg beziehungsweise 100 µg Cop-1 oder 300 µg pMOG, das mit einem gleichen Volumen an vollständigem Freundschens Adjuvans (CFA) emulgiert war, das 0,5 oder 5 mg/ml Myobacterium tuberculosis enthielt, immunisiert. Die Emulsion (Gesamtvolumen 0,15 ml) wurde subcutan an eine Stelle in der Seite injiziert. Eine Woche später gab man den mit pMOG immunisierten Mäusen auf der anderen Seite eine identische Immunisierung als Booster. Den Kontrollmäusen wurde phosphatpufferte Kochsalzlösung (PBS) in CFA (Difco, Detroit, Michigan, USA) injiziert.

**[0130]** Quetschverletzung des Sehnervs. Mäuse oder Ratten wurden anästhesiert und im intraorbitalen Abschnitt des Sehnervs, 1–2 mm vom Augapfel entfernt, einer Quetschverletzung unterzogen. Mit Hilfe eines binokular arbeitenden Mikroskops wurde die Bindehaut eingeschnitten und der Sehnerv exponiert. Unter Verwendung einer kalibrierten Kreuzzange und unter besonderer Vorsicht, damit man die Blutzufuhr nicht unterbricht, wurde der Sehnerv 2 s (Mäuse) beziehungsweise 3 s (Ratten) gequetscht.

**[0131]** Glutamat- und NMDA-Injektionen. Das rechte Auge der anästhesierten Maus oder Ratte wurde mit ei-

ner 27er Nadel im oberen Teil der Lederhaut punktiert, und eine 10- $\mu$ l Hamilton-Spritze mit einer 10 Gange-Nadel wurde bis zum Glaskörper eingeführt. Mäusen wurde ein Gesamtvolumen von 1  $\mu$ l (200 nMol) L-Glutamat oder 1  $\mu$ l N-Methyl-D-aspartat (NMDA; 75 nMol; RBI, Boston, MA), gelöst in Kochsalzlösung injiziert. Ratten wurden 2  $\mu$ l (375 nMol) L-Glutamat injiziert.

**[0132]** Ausbringen von stereotaktischer Färbung vor der Verletzung bei Mäusen. Der Schädel wurde exponiert und unter Verwendung von 15% Wasserstoffperoxid trocken und sauber gehalten. Das Bregma wurde identifiziert und markiert. Ein Loch wurde oberhalb des oberen Colliculus jeder Hemisphäre (0,292 mm hinter und 0,05 mm seitlich zur Mittellinie) gebohrt. Unter Verwendung eines stereotaktischen Messgeräts und eines Hamilton-Injektors wurde den Mäusen an einem Punkt oberhalb des oberen Colliculus jeder Hemisphäre, in einer Tiefe von 0,16 mm beziehungsweise 0,175 mm (abhängig vom Mäusestamm) von der knöchernen Oberfläche des Gehirns Fluorogold (5% in Kochsalzlösung, Fluorochrome, Denver, CO; 1  $\mu$ l) injiziert. Nach Abschluss der Injektion wurde die Wunde genäht. Rückläufige Aufnahme der Färbung stellt eine Markierung der lebenden Zellen dar.

**[0133]** Beurteilung des Überlebens retinaler Ganglionzellen bei Mäusen. Mäusen wurde eine letale Dosis Pentobarbiton (170 mg/kg) gegeben. Ihre Augen wurden enukliert und die Netzhäute wurden abgelöst und als flache vollständige Präparate in Paraformaldehyd (4% in PBS) präpariert. Markierte Zellen von 4–6 ausgewählten Feldern identischer Größe (0,7 mm<sup>2</sup>) wurden gezählt. Die ausgewählten Felder befanden sich etwa in derselben Entfernung von der Sehnervpapille (0,3 mm), um die Variation der RGC-Dichte als Funktion der Entfernung von der Sehnervpapille zu überwinden. Die Felder wurden von Beobachtern, die über die Behandlung, die die Maus erhalten hatte, im Unklaren waren, unter dem Fluoreszenzmikroskop (Vergrößerung  $\times$  800) gezählt. Die durchschnittliche Anzahl an RGCs pro Feld in jeder Netzhaut wurde berechnet.

**[0134]** Beurteilung des Überlebens retinaler Ganglionzellen bei Ratten. Das Überleben von RGCs bei Ratten wurde nach Aufbringen der lipophilen Fluoreszenzfärbung 4-(4-(Didecylamino)styryl)-N-methylpyridin-Iod (4-Di-10-Asp) (Molecular Probes Europe BV, Niederlande) distal zum Sehnervenkopf gemessen. Markierung und Messung wurden wie folgt durchgeführt: der Sehnerv wurde exponiert, ohne die retinale Blutzufuhr zu beschädigen. Eine vollständige Axotomie wurde 1–2 mm vom Sehnervenkopf entfernt durchgeführt und feste Kristalle (0,2–0,4 mm Durchmesser) von 4-Di-10-Asp wurden an der Stelle der gebildeten Axotomie hinterlegt. Fünf Tage nach Aufbringen der Färbung wurden die Ratten getötet. Die Netzhaut wurde vom Auge abgelöst, als abgeflachtes Gesamtpräparat in 4% Paraformaldehydlösung präpariert und durch Fluoreszenzmikroskopie auf markierte RGCs hin untersucht. Bei den IOP-Versuchstieren wurden die Ganglionzellen durch rückläufiges Transport-Dextran-tetramethylrhodamin (DTMR) (Molecular Probes, OR) markiert. Kristalle von 3000 MW-DTMR wurden etwa 2 bis 3 mm vom Augapfel entfernt auf das Schnittende des Sehnervs aufgebracht. 24 Stunden später wurden die Netzhäute im Ganzen präpariert und markierte Ganglionzellen in 8 Regionen, 2 pro Quadranten (0,66 bis 1,103 mm von der Kante der Sehnervpapille entfernt) wurden mit einer 400-fachen Vergrößerung gezählt.

**[0135]** Erzeugung einer Mäuse-Cop-1-T-Zelllinie. Eine Mäuse-T-Zelllinie wurde durch Drainieren von Lymphknotenzellen, die von C57BL/6J-Mäusen erhalten wurden, die mit Cop-1-Antigen immunisiert worden waren, erzeugt. Das Antigen wurde in PBS (1 mg/ml) gelöst und mit einem gleichen Volumen CFA, ergänzt mit 5 mg/ml Mycobacterium tuberculosis (Difco), emulgiert. Zehn Tage nach der Immunisierung in die Hinterpfotenballen wurden die Mäuse getötet und ihre drainierten Lymphknoten wurden chirurgisch entfernt und dissoziiert. Die Zellen wurden gewaschen und in Stimulierungsmedium, das RPMI ergänzt mit L-Glutamin (2 mM), 2-Mercaptoethanol ( $5 \times 10^{-5}$  M), Penicillin (100 Einheiten/ml), Streptomycin (100  $\mu$ g/ml) und 0,5% (Vol./Vol.) autologes Serum enthielt, mit dem Antigen (10  $\mu$ g/ml) aktiviert. Nach Inkubation über 72 h bei 37°C, 98% relativer Feuchtigkeit und 10% CO<sub>2</sub>, wurden die Zellen in Vermehrungsmedium, bestehend aus RPMI, ergänzt mit nicht-essenziellen Aminosäuren (1 ml/100 ml), Natriumpyruvat (1 mM), L-Glutamin,  $\beta$ -Mercaptoethanol, Penicillin und Streptomycin in denselben Konzentrationen wie vorstehend, mit Zusetzen von 5% foetalem Kälberserum (Vol./Vol.) und 10% T-Zell-Wachstumsfaktor, der von dem Überstand von mit Concanavalin A stimulierten Milzzellen stammte, überführt. Die Zellen wurden 10–14 Tage in Vermehrungsmedium gezüchtet, bevor sie in Gegenwart von bestrahlten (2500 rad) Milzzellen ( $10^7$  Zellen/ml) mit ihrem Antigen (10  $\mu$ g/ml) in Stimulierungsmedium erneut stimuliert wurden. Die T-Zelllinie wurde durch wiederholte Stimulierung und Vermehrung vermehrt. Im Wesentlichen hat die Linie einen ähnlichen Phänotyp zur zuvor beschriebenen (Aharoni et al., 1997).

**[0136]** Erzeugung einer Ratten-Cop-1-T-Zelllinie. T-Zelllinien wurden durch Drainieren von Lymphknotenzellen, erhalten von Lewis Ratten, die mit den vorstehenden Antigenen immunisiert worden waren, gebildet. Das Antigen wurde in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) (1 mg/ml) gelöst und mit einem gleichen Volumen an unvollständigem Freundschem Adjuvans (IFA) (Difco Laboratories, Detroit, MI) ergänzt mit 4 mg/ml Myo-

bacterium tuberculosis (Difco) emulgiert. Zehn Tage nachdem das Antigen in 0,1 ml der Emulsion in die Hinterpfotenballen der Ratten injiziert worden war, wurden die Ratten getötet und ihre drainierten Lymphknoten wurden chirurgisch entfernt und dissoziiert. Die Zellen wurden gewaschen und mit dem Antigen (10 µg/ml) in Stimulierungsmedium, enthaltend Dulbeccos modifiziertes Eagles Medium (DMEM), ergänzt mit L-Glutamin (2 mM), 2-Mercaptoethanol ( $5 \times 10^5$ ) Natriumpyruvat (1 mM), Penicillin (100 IU/ml), Streptomycin (100 µg/ml), nicht-essenziellen Aminosäuren (1 ml/100 ml) und autologem Serum 1 % (Vol./Vol.) stimuliert. Nach Inkubation über 72 h bei 37°C, 98% relativer Luftfeuchtigkeit und 10% CO<sub>2</sub> wurden die Zellen in Vermehrungsmedium überführt, bestehend aus DMEM, L-Glutamin, 2-Mercaptoethanol, Natriumpyruvat, nicht-essenziellen Aminosäuren und Antibiotika in denselben Konzentrationen wie vorstehend, mit Zusetzen von 10% foetalem Kälberserum (FCS) (Vol./Vol.) und 10% T-Zell-Wachstumsfaktor, der vom Überstand von Concanavalin A (ConA)-stimulierten Milzzellen stammt. Die Zellen wurden 4–10 Tage in Vermehrungsmedium gezüchtet, bevor sie erneut mit ihrem Antigen (10 µg/ml) in Gegenwart von bestrahlten (2000 rad) Thymuszellen (10<sup>7</sup> Zellen/ml) in Stimulierungsmedium stimuliert wurden. Die T-Zelllinien wurden durch wiederholte Stimulierung und Vermehrung vermehrt.

**[0137]** Histologische Analyse. Sieben Tage nach Glutamat- oder Kochsalzlösungsinjektion wurden die Mäuse durch eine letale Dosis Pentobarbiton (170 mg/kg) getötet und ihre Augen wurden entfernt und 48h bei 4°C in Formaldehyd (4% in PBS) fixiert. Schnitte (10µm dick) wurden in Paraffin eingebettet und mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) gefärbt.

**[0138]** Erzeugung von Augenhochdruck bei Ratten/Erhöhung des Augeninnendrucks bei Ratten. Männliche Lewi-Ratten wurden mit einem Gemisch aus Ketamin (15 mg/kg), Acepromazin (1,5 mg/kg) und Xylazin (0,3 mg/kg) anästhesiert. Eine Zunahme des Augeninnendrucks (IOP) wurde durch Laser-Photokoagulation der limbalen und episkleralen Venen erzielt. Ratten erhielten 2 Laserbehandlungen, 1 Woche auseinander, mit einem blaugrünen Argonlaser (1 Watt über 0,2 s, ergibt insgesamt 130–150 Punkte von 50 µm in den beiden Behandlungen; Coherent, Palo Alto, CA). IOP wurde einmal pro Woche unter Verwendung von TONO-PEN (Mentor, Norwell), MA gemessen, nachdem den Ratten intramuskulär das tierärztliche Beruhigungsmittel Acepromazin zu 0,3 mg/kg injiziert worden war und Proparacain zu 0,5% topisch auf die Augen aufgetragen worden war, um die Hornhaut zu anästhesieren.

## Ergebnisse

### Myelin-assoziierte Antigene schützen nicht gegen Glutamat-Toxizität

**[0139]** Das Labor des vorliegenden Erfinders zeigte vor kurzem, dass passive und aktive Immunisierung mit Myelin-assoziierten Antigenen die posttraumatische Degeneration, die mit einer Quetschung des Sehnervs bei Mäusen und Ratten (Beispiele 1 und 2; Moalem et al., 1999 und Fisher et al., 2000) und mit Quetschverletzungen des Rückenmarks bei adulten Ratten (Hauben et al., 2000a und Hauben et al., 2000b) einhergeht, reduzieren kann. Um zu bestimmen, ob eine solche Neuroprotektion ebenfalls nach einer nicht-mechanischen Verletzung ausgeübt wird, wurde zuerst untersucht, ob eine aktive Immunisierung mit Myelinassoziierten Antigenen oder ein passiver Transfer von T-Zellen, die auf diese Antigene reagieren, eine Neuroprotektion gegen Toxizität bereitstellt, die durch intravitreale Injektion von Glutamat induziert wurde. Die Sehnerven von Ratten und Mäusen wurden einer Quetschverletzung unterzogen. Unter Verwendung von vom Labor der vorliegenden Erfinder etablierten Protokollen zur Immunoneuroprotektion wurde eine aktive Immunisierung mit von MOG abgeleiteten Peptiden (Fisher et al., 2000) an Mäusen und ein passiver Transfer von Anti-MBP-T-Zellen bei Ratten (Moalem et al., 1999) durchgeführt. Ein Glutamat-Eindringen wurde durch intravitreale Injektion von Glutamat in einer Konzentration zugefügt, von der zuvor gezeigt wurde, dass sie zu einem RGC-Tod führt, der sowohl bei Mäusen als auch bei Ratten nach einer Woche messbar ist (Yoles et al., 2000).

**[0140]** Die Mäuse wurden vor der intravitrealen Injektion von Glutamat (200 nMol) mit pMOG immunisiert. Wurde die RGC-Überlebensrate 1 Woche nach Glutamat-Injektion bestimmt, konnte kein Hinweis auf eine heilsame Wirkung der Immunisierung mit pMOG nachgewiesen werden (**Fig. 5A**). In ähnlicher Weise war keine vorteilhafte Wirkung nachweisbar, wenn der Glutamatinjektion bei Ratten direkt ein passiver Transfer von Anti-MBP-T-Zellen folgte (**Fig. 5B**). Somit wurde, obwohl die Impfung mit pMOG (1–22) kürzlich gezeigt hatte, dass sie bei Mäusen nach Quetschverletzung des Sehnervs eine neuroprotektive Reaktion induzierte (Fisher et al., 2000), in der vorliegenden Studie keine solche Neuroprotektion gesehen, nachdem die mit pMOG geimpften Mäuse einem Glutamin-Eindringen unterzogen wurden.

**[0141]** Diese Ergebnisse ließen die vorliegenden Erfinder zwei Möglichkeiten annehmen: entweder ist der Verlust an RGCs nach Glutamat-Toxizität nicht einer Immun-Neuroprotektion zuzuschreiben, was impliziert,

dass Glutamat-induzierter RGC-Zelltod das Immunsystem nicht beteiligt, oder Myelin-assoziierte Antigene wie pMOG und MBP sind nicht die richtigen Antigene für eine Protektion gegen Glutamat-Toxizität. Kürzliche Ergebnisse aus dem Labor der vorliegenden Erfinder (Kipnis et al., 2000), die zeigten, dass die Rate an Zelltod, der durch Glutamat verursacht wird, bei Ratten beziehungsweise Mäusen, denen reife T-Zellen im Vergleich zu normalen Tieren fehlen, höher ist, weisen stark darauf hin, dass die heilsame physiologische Reaktion auf eine ZNS-Verletzung T-Zellen beteiligt. Dementsprechend hat eine Verstärkung dieser endogenen Glutamat-induzierten T-Zellreaktion wahrscheinlich eine vorteilhafte Wirkung auf die verletzte Netzhaut.

#### Cop-1-Immunisierung schützt gegen Glutamat-Toxizität

**[0142]** Während die Suche nach einem physiologischen Antigen, das eine heilsame Immunreaktion auf Glutamat-induzierte Toxizität hervorrufen könnte, in diesem Stadium weiterhin ein primäres Ziel ist, waren die vorliegenden Erfinder daran interessiert, ein Antigen zu finden, das für Zwecke der exogenen Manipulation des Immunsystems auf die Immunreaktion auf Glutamat verwendet werden könnte. Zuerst wurde untersucht, ob eine Glutamat-Injektion verursacht, dass die RGCs für Lymphocyten zugänglich werden. Es wurde herausgefunden, dass innerhalb von 24 h nach der Glutamat-Injektion große Mengen an Lymphocyten in das mit Glutamat injizierte Auge einwandern ([Fig. 6A](#) und [Fig. 6B](#)), was annehmen lässt, dass eine Immunmanipulation das Überleben von RGCs nach ihrer lokalen Exposition zu Glutamat beeinflussen könnte. Zusammengekommen führten diese beiden Beobachtungen die vorliegenden Erfinder dazu, anzunehmen, dass die Glutamat-Toxizität eine T-Zell-vermittelte Schutzwirkung aktiviert, und ermutigten die vorliegenden Erfinder, nach einem Weg zu suchen, diese vorteilhafte Immunreaktion zu verstärken. Auf der Suche nach einem geeigneten Antigen wurde das synthetische Polymer Copolymer-1 (Cop-1), das ein Oligopeptid ist, das bei Patienten mit Multipler Sklerose als Arzneistoff verwendet wird, und von dem kürzlich gezeigt wurde, dass es in einem Modell einer Quetschverletzung des Sehnervs bei der Ratte (Kipnis et al., 2000a) die Neuroprotektion verstärkt, als geeigneter Kandidat angesehen.

**[0143]** Zunächst wurde untersucht, ob die Immunisierung mit Cop-1 eine vorteilhafte Wirkung auf RGC-Überleben nach optischer Quetschverletzung bei Mäusen und nicht nur Ratten hat. Für diese Untersuchung wurden Balb/c-Mäuse verwendet. Die Immunisierung mit Cop-1 unter Verwendung eines Protokolls, von dem gefunden wurde, dass es nach Quetschverletzung des Sehnervs bei Ratten heilsam war, war auch nach Quetschverletzung des Sehnervs bei Mäusen heilsam ([Fig. 7](#)).

**[0144]** Als nächstes wurde untersucht, ob dasselbe Protokoll zu einer Neuroprotektion gegen Glutamat-induzierte Toxizität führen kann. Für diese Untersuchung wurden C57bl/6-Mäuse verwendet, bei denen der Verlust an retinalen Ganglionzellen nach Glutamat-Eindringen höher ist als bei Balb/c (Kipnis et al., 2000b). Zehn Tage vor der intravitrealen Injektion von Glutamat wurden die C57bl/6-Mäuse mit Cop-1, das in Adjuvans emulgiert war, das 5 mg/ml Bakterien enthielt, immunisiert. Dieser Stamm wurde in Hinblick auf die kürzlichen Ergebnisse aus dem Labor der vorliegenden Erfinder, dass der Verlust an RGCs, der durch Glutamat-Injektion bei diesen Mäusen induziert wird, auf Grund einer genetischen Verbindung zwischen neuronalem Verlust und Resistenz gegen Autoimmunkrankheiten größer ist als bei Balb/c-Mäusen (Kipnis et al., 2000b), ausgewählt. Die Immunisierung mit Cop-1 ergab eine signifikante Reduktion der Glutamat-Toxizität ([Fig. 8A](#)). In einem Versuch, das therapeutische Fenster für die Immunisierung mit Cop-1 in diesem Modell einzurichten, wurde der Versuch unter Verwendung von Cop-1, emulgiert in Adjuvans, das 2 verschiedene Konzentrationen an Bakterien (0,5 beziehungsweise 5 mg/ml) enthielt, wiederholt und die Mäuse wurden zu verschiedenen Zeitpunkten bezogen auf das Glutamat-Eindringen immunisiert. Mäuse, die am Tag der Glutamat-Injektion immunisiert wurden, zeigten noch signifikant höhere Raten an RGC-Überleben als die, die bei Mäusen beobachtet wurden, denen PBS emulgiert im entsprechenden Adjuvans injiziert wurde ([Fig. 8B](#) und [Fig. 8C](#)). Beide Adjuvantien erzielten signifikante Wirkungen. Die Schutzwirkung von Cop-1 verringerte sich mit der Zeit zwischen Immunisierung und Glutamat-Eindringen: die mittlere prozentuale Überlebensrate an RGCs war signifikant höher als in den PBS-injizierten Netzhäuten, wenn eine Cop-1-Immunisierung sofort oder 24 h nach der Glutamat-Injektion gegeben wurde und war nicht signifikant, wenn Cop-1 48 h nach der Glutamat-Injektion gegeben wurde ([Fig. 8D](#)). Interessanterweise schützte die Immunisierung mit Cop-1 die Mäuse nicht vor Toxizität, die durch NMDA verursacht wurde ([Fig. 9](#)), von dem kürzlich durch das Labor der vorliegenden Erfinder gezeigt wurde, dass es in diesem Modell in vivo einen RGC-Tod mit anderen Merkmalen als jenen, die für apoptotischen Tod typisch sind, verursacht.

Adoptiver Transfer von T-Zellen, die auf Cop-1 reagieren, schützt gegen Glutamat-Toxizität.

**[0145]** Um festzustellen, ob die beobachtete Immunisierung mit Cop-1 zur T-Zell-vermittelten Neuroprotektion gegen Glutamat-Toxizität führt, wurden  $5 \times 10^6$  Cop-1-reaktive T-Zellen (250  $\mu$ l intraperitoneal) sofort nach der

Injektion von Glutamat (200 nMol) passiv in Mäuse überführt. Eine Woche später hatten signifikant mehr RGCs in den Mäusen überlebt, denen Cop-1-reaktive T-Zellen ( $1978 \pm 86$ ,  $n = 6$ ) injiziert wurden, als in den Kontrollmäusen ( $1238 \pm 2$ ,  $n = 3$ ), denen PBS intraperitoneal injiziert wurde ([Fig. 10](#)).

Cop-1-Immunisierung schützt retinale Ganglionzellen vor Tod, der durch Augenhochdruck bei Ratten induziert wird.

**[0146]** Lewis-Ratten wurden mit einem Abstand von 1 Woche 2 Laserbehandlungen unterzogen, um die IOP zu erhöhen. Nachfolgende Messungen zu den angezeigten Zeitpunkten über einen Zeitraum von 3 Wochen zeigten, dass der IOP 2 Wochen nach den Laserbehandlungen auf  $30 \pm 0,4$  mm HG (Mittelwert  $\pm$  SEM) angestiegen war und danach etwa auf diesem Wert blieb ([Fig. 11A](#)). Die Überlebensrate der retinalen Ganglionzellen, gemessen 3 Wochen nach der anfänglichen Laserbehandlung, war bei diesen Ratten signifikant geringer (um  $19,9\% \pm 0,51\%$ , Mittelwert  $\pm$  SEM) als bei nicht-gelaserten Kontrollratten ([Fig. 11B](#)). Um die Wirkung der Cop-1-Immunisierung auf das Überleben der retinalen Ganglionzellen zu untersuchen, wurden Ratten mit Cop-1 emulgiert in CFA am Tag der ersten Laserbehandlung immunisiert. Kontrollratten wurde PBS im gleichen Adjuvans injiziert. Nach drei Wochen wurden die retinalen Ganglionzellen rückläufig markiert und 24 h später wurden die Netzhäute ausgeschnitten, im Ganzen präpariert und die markierten retinalen Ganglionzellen wurden gezählt. Die Anzahl der überlebenden retinalen Ganglionzellen in den mit Cop-1 immunisierten Ratten war signifikant höher als in den PBS/CFA-injizierten Kontrollen ([Fig. 11C](#)), der IOP in beiden Gruppen von Ratten blieb so hoch wie in der Gruppe der mit Laser behandelten Ratten, die keine Injektionen erhalten hatten ([Fig. 11A](#)). Eine ähnliche, jedoch leicht geringere Wirkung wurde bei Ratten beobachtet, die mit Cop-1 immunisiert wurden, wenn ihr IOP schon hoch war ([Fig. 11D](#)).

#### (7) Diskussion der Ergebnisse

**[0147]** Bis jetzt wurde für Läsionen des Rückenmarks, eine der üblichsten, jedoch zerstörerischen traumatischen Verletzungen in Industriegesellschaften kein Heilmittel gefunden. Seit mehr als 40 Jahren ist bekannt, dass ZNS-Neuronen, anders als Neuronen des peripheren Nervensystems nur eine begrenzte Fähigkeit haben, sich nach einer Verletzung zu regenerieren. Während der letzten 20 Jahre ergaben Versuche, die Regeneration zu fördern, Ansätze, die zu einer teilweisen Erholung führten. Während der letzten Jahre wurde offensichtlich, dass obwohl die meisten der traumatischen Verletzungen, die dem menschlichen Rückenmark zugefügt werden, partiell sind, der entstandene funktionelle Verlust trotzdem schlimmer ist als der Schwere der anfänglichen Verletzung zugeschrieben werden kann; der selbstverlängernde Prozess der sekundären Degeneration scheint entscheidend zu sein.

**[0148]** Kürzlich führte ein wesentlicher Forschungsversuch zur Hemmung der durch Verletzung induzierten sekundären Degeneration. Alle Versuche hatten bis jetzt pharmakologische Grundlagen und einige ergaben eine verbesserte Erholung von spinalem Schock. Die vorliegenden Studien beschreiben im Gegensatz dazu eine Zelltherapie, die das, was ein natürlicher Mechanismus der Selbsterhaltung zu sein scheint, ausweitet und führt nach einer einzigen Behandlung zu langanhaltender Genesung. Das Ausmaß dieser Genesung scheint jenes zu übertreffen, von dem bei Verwendung von pharmakologischen Verfahren berichtet wird.

**[0149]** In den meisten Geweben löst ein durch Verletzung ausgelöster Schaden eine zelluläre Immunreaktion aus, die so wirkt, dass sie das Gewebe schützt und seine Homöostase erhält. Diese Reaktion wurde Makrophagen und anderen Zellen zugeschrieben, die die natürliche Waffe des Immunsystems umfassen. Es wurde nicht angenommen, dass Lymphocyten, die für die adaptive Immunität verantwortlich sind, bei der Erhaltung des Gewebes beteiligt sind. Adaptive Immunität wird, gemäß traditioneller Lehrmeinung, gegen Gefahren von außen gerichtet. Die vorliegenden Studien zeigen jedoch nun, dass die adaptive T-Zell-Immunantwort sogar dann schützend sein kann, wenn es keine Invasion durch Krankheitserreger von außen gibt. Im Fall der Gewbeerhaltung liegt die Spezifität der T-Zellen bei Selbst-Antigenen des Gewebes.

**[0150]** Die Ergebnisse der vorstehenden Beispiele zeigen die neuroprotektive Wirkung von T-Zellen, die in einem quetschverletzten ZNS-Nerv sowie in einem Sehnerv, der einer Glutamat-Toxizität ausgesetzt ist, auf Cop-1 reagieren. Im Ratten-Modell einer partiellen Quetschung des Sehnervs hatte die adoptive Verabreichung von Cop 1-reaktiven T-Zellen oder die Impfung mit Cop 1 am Tag der ZNS-Verletzung eine deutliche präventive Wirkung auf die sekundäre Degeneration von Nervenfasern. Dies ist das erste Mal, dass es sich zeigt, dass eine Impfung ein mögliches Verfahren ist, um die Ausbreitung des Schadens nach traumatischer Verletzung des Sehnervs zu verhindern.

**[0151]** Nach Quetschverletzung des Ratten-Sehnervs ergab eine Injektion von Cop 1-reaktiven T-Zellen ei-

nen signifikanten Schutz gegen die zerstörerische Wirkung von sekundärer Degeneration. T-Zellen reicherten sich wie erwartet an der Stelle der Verletzung an, aber sie reicherten sich auch im unverletzten Nerv an. Die Anreicherung von T-Zellen im unverletzten ZNS ist nur möglich, wenn es durch das präsentierte Antigen eine Erkennung des T-Zellrezeptors gibt. Aktivierte T-Zellen können unabhängig von ihrer Spezifität durch die Blut-Hirn-Schranke wandern, jedoch nur die, die auf ZNS-Antigene reagieren, können sich im unverletzten Nerv anreichern (Hickey, 1991). Somit zeigen die vorliegenden Ergebnisse zum ersten Mal eine Kreuzerkennung zwischen Cop 1-reaktiven T-Zellen und Bestandteilen von ZNS-Myelin *in vivo*. Diese Erkennung an der Verletzungsstelle dient wahrscheinlich als Auslöser für die T-Zell-Aktivierung, die, möglicherweise über die Sezernierung von geeigneten neurotrophen Faktoren oder anderen, noch zu entdeckenden Faktoren durch die aktivierten T-Zellen zum Umschalten der T-Zellen auf den protektiven Phänotyp führt. Diese Studie zeigt, dass Cop 1-reaktive T-Zellen, die durch ihr spezifisches Antigen aktiviert werden, signifikante Mengen an BDNF sezernieren, ein Neurotrophin, das beim Überleben von Nervenzellen eine wichtige Rolle spielt (Yan et al., 1992; Sendtner et al., 1992).

**[0152]** Cop-1 wurde ursprünglich hergestellt, um die Aktivität von basischem Myelin-Protein (MBP) nachzunehmen und um die entzündliche demyelinisierende Krankheit EAE bei Wiederkäuern zu induzieren. Es wurde jedoch herausgefunden, dass es nicht-enzephalitogen ist und sogar EAE, das durch MBP (Teitelbaum et al., 1971), Proteolipid-Protein (PLP) (Teitelbaum et al., 1996), oder MOG (Ben-Nun et al., 1996) induziert wird, unterdrückt. Cop-1 verhindert die Entwicklung von EAE bei Wiederkäuern und verbessert Multiple Sklerose beim Menschen. Studien haben eine partielle Kreuzreaktivität zwischen Antikörpern und Cop-1 und MBP oder zwischen T-Zellen, die auf diese Antigene gerichtet sind gezeigt (Webb et al., 1973 und Teitelbaum et al., 1988). Cop-1 kann als Antagonist des T-Zell-Antigenrezeptors für das immundominante MBP-Epitop dienen (Aharoni et al., 1998). Es kann ebenfalls an verschiedene Haupt-Histokompatibilitätskomplex (MHC)-Klasse II-Moleküle binden und sie daran hindern, an T-Zellen mit spezifischen Antigen-Erkennungseigenschaften zu binden (Fridkis-Hareli et al., 1998). Bei Wiederkäuern induziert Cop-1 die Expression regulatorischer Zellen, die die enzephalitogenen T-Zellen supprimieren. Es wurde herausgefunden, dass adoptiver Transfer solcher T-Zellen bei Wiederkäuern die Entwicklung von EAE, das durch MBP (Aharoni et al., 1993), (PLP) (Teitelbaum et al., 1996), oder Homogenat des gesamten Rückenmarks (Aharoni et al., 1997) induziert wird, hemmt.

**[0153]** Somit induziert die Immunisierung mit Cop-1, anders als die Immunisierung mit MBP und anderen Myelin-assoziierten Proteinen EAE nicht, und die T-Zellen, die in Abwesenheit von Adjuvantien durch Cop-1 hervorgerufen werden, sind regulatorischer Natur. Die Immunisierung mit Cop-1 in IFA direkt nach der Verletzung, gefolgt von einem Booster zwei Tage später, hatten eine starke neuroprotektive Wirkung. Eine solche Immunisierung erreicht den Höhepunkt ihrer zellulären Reaktion wahrscheinlich innerhalb von einer Woche, es ist jedoch berechtigt anzunehmen, dass die Anzahl an T-Zellen, die im ZNS vorliegen, offensichtlich sogar vor diesem Zeitpunkt groß genug ist, um wenigstens einige neuroprotektive Aktivität auszuüben. Es ist bekannt, dass nach der Immunisierung mit MBP Symptome von EAE 10 Tage später auftreten, was anzeigt, dass die Immunreaktion zu diesem Zeitpunkt für enzephalitogene T-Zellen stark genug ist, so dass sie sich an der Verletzungsstelle anreichern, ihren Schaden anrichten und EAE-Symptome hervorrufen. Die vorliegende Studie lässt annehmen, dass die Immunreaktion am Sehnerv nach Immunisierung mit Cop-1 in IFA, gefolgt von einem Booster nach zwei Tagen, ausreichend war, die sekundäre Degeneration zu verhindern. Es ist möglich, dass diese Reaktion im Vergleich zu der Reaktion, die nach passivem Transfer von T-Zellen erhalten wurde, etwas verspätet auftrat, aber sie wurde nichtsdestotrotz noch innerhalb des Zeitfensters erreicht, das zum Schutz der Nervenfasern, die der primären Läsion entkamen, notwendig ist. Frühere Studien am Sehnerv der Ratte zeigten, dass der Verlust an Neuronen, der von der sekundären Degeneration herrührt, eine Woche nach leichter Quetschverletzung etwa 25% und zwei Wochen nach der Verletzung etwa 55% beträgt (Yoles, 1998). Somit gäbe es, auch wenn die Reaktion eine Woche benötigte, um die benötigte Stärke zu erreichen, zu diesem Zeitpunkt immer noch Nervenfasern, die Schutz brauchten. Ein Vergleich der Ergebnisse, die nach adoptivem Transfer aktivierter Cop-1-reaktiver T-Zellen und nach aktiver Immunisierung mit Cop-1 erzielt wurden, lässt annehmen, dass es hinsichtlich der Zeit, die für eine maximale Wirksamkeit benötigt wird, zwischen beiden Behandlungen keinen signifikanten Unterschied gibt, da das Ausmaß des Schutzes vor sekundärer Degeneration bei beiden in etwa gleich war. Es ist zu betonen, dass Cop-1 hier eine Wirkung zeigt, die zu seiner bekannten Wirkung gegenteilig ist; Cop-1 ist als Mittel bekannt, das hergestellt wurde, um T-Zell-Autoimmunität zu unterdrücken, wohingegen es hier eine Wirkung hat, die die Aktivierung spezifischer Anti-Myelin-T-Zell-Autoimmunität benötigt.

**[0154]** Zusammengefasst haben frühere Studien gezeigt, dass die axonale Verletzung im ZNS von Ratten eine autoimmun T-Zellreaktion hervorruft, die gegen Myelinproteine gerichtet ist, die jedoch zu schwach ist, um die Nervenfasern vor sekundärer Degeneration zu schützen. Eine Verstärkung dieser Immunantwort ohne das Risiko einer begleitenden Autoimmunkrankheit wurde in dieser Studie unter Verwendung eines Copoly-

mers erreicht, der vom ZNS kreuz-erkannt wird, jedoch nicht enzephalitogen ist. Die T-Zellimmunreaktion auf das Polymer, erhalten entweder durch passiven Transfer oder durch Immunisierung zum Zeitpunkt der Verletzung, stellt ein wirksames Mittel der post-traumatischen Erhaltung bereit. Die hier gezeigte T-Zell-vermittelte Neuroprotektion ist sowohl auf chronische als auch akute Verletzungen von Nerven des ZNS, bei denen Neuronen für Degeneration anfällig und für eine Neuroprotektion zugänglich sind, anwendbar. Sie ist ebenfalls zum Schutz vor der primären und sekundären Degeneration, die durch Glutamat-Toxizität verursacht wird, anwendbar. Hier in den Ergebnissen wird auch gezeigt, dass T-Zell-abhängige Immun-Neuroprotektion, erhalten durch passive oder aktive Immunisierung mit Cop-1, eine wirksame Therapie für Glutamat-induzierte Toxizität bei Mäusen und in einem Ratten-Modell mit chronisch hohem IOP ist.

**[0155]** Da die Ergebnisse der Studien aus Beispiel 3 zeigen, dass sowohl die passive als auch die aktive Immunisierung mit Cop-1 eine wirksame Neuroprotektion vor Glutamat-Toxizität bereitstellen, kann eine Impfung als Weg, die neuronale Toxizität, die mit Glutamat in Verbindung steht, zu reduzieren, entwickelt werden. Diese Beobachtungen haben eine Vielzahl interessanter Auswirkungen: (i) Cop-1, das als immunsuppressiver Wirkstoff bei Patienten mit der Autoimmunkrankheit Multiple Sklerose verwendet wird, ist als Impfung gegen Glutamat-induzierte Neurotoxizität wirksam; (ii) der Verlust von ZNS-Neuronen auf Grund eines lokalen Stresssignals kann von systemischer Immun-Manipulation profitieren; (iii) dieselben Neuronen, in diesem Fall die RGCs, können von einer systemischen Immunreaktion profitieren, unabhängig von der Beschaffenheit und der Stelle der Verletzung, obwohl die antigenische Spezifität der Reaktion variieren kann; (iv) die vorteilhafte Aktivität von Cop-1, scheint, obwohl sie offensichtlich nicht von der Art der Verletzung (mechanisch oder biochemisch) abhängt, auf kritische Weise vom Mechanismus des Todes, den die Verletzung aktiviert, abzuhängen. In Beispiel 3 schützte die induzierte Immunaktivität die Zellen vor Tod, der durch Glutamat verursacht wurde, jedoch nicht gegen Tod, verursacht durch NMDA; (v) Cop-1, das als Immunogen wirkt, kann die Neuroprotektion durch einen Mechanismus induzieren, der nicht notwendigerweise eine Kreuzerkennung von Myelin-Proteinen benötigt.

**[0156]** Es sollte betont werden, dass es einen wichtigen Unterschied zwischen Immun-Neuroprotektion gegen sekundäre Degeneration und Immuntherapie für Autoimmunkrankheiten gibt. Während ersteres eine aktive Beteiligung von heilsamen T-Zellen benötigt, kann letzteres entweder von der Immunmodulation von enzephalitogenen T-Zellen oder von ihrer Suppression profitieren. Cop-1, das als Immunogen wirkt, kann beiden Zwecken, der Neuroprotektion vor neuronaler Verletzung und der Therapie von Autoimmunkrankheiten, dienen. Wahrscheinlich erreicht es dies durch Hervorrufen einer „sicheren“ T-Zellreaktion, die auf der einen Seite die zuträgliche autoimmune T-Zellreaktion, die für die Neuroprotektion benötigt wird (Moalem et al., 1999a; Moalem et al., 1999b; Kipnis et al., 2000a; Moalem et al., 2000c; und Schwartz et al., 1999) und auf der anderen Seite die Immunmodulation bereitstellt, die für eine Vermeidung von Autoimmunkrankheiten benötigt wird (Neuhaus et al., 2000).

**[0157]** Es wurde im Labor der vorliegenden Erfinder gezeigt, dass T-Zellen, die auf MBP reaktiv sind, in Ratten-Modellen von teilweise gequetschten Sehnerven (Moalem et al., 1999 und Schwartz et al., 1999) und Quetschverletzung des Rückenmarks (Hauben et al., 2000a) neuroprotektiv sind. Die vorherigen Ergebnisse im Labor der vorliegenden Erfinder zeigten eine Kreuzerkennung zwischen Cop 1-reaktiven T-Zellen und Bestandteilen von ZNS-Myelin in vivo (Kipnis et al., 2000a). Die vorliegenden Erfinder nahmen an, dass eine solche Erkennung durch Auslösen der T-Zellreaktivierung und somit durch Verursachen, dass die T-Zellen auf einen protektiven Phänotyp umschalten, einen möglichen Mechanismus darstellen könnten, dem die T-Zell-Neuroprotektion nach axonaler Verletzung unterliegt. Weiterhin wurde durch die vorliegenden Erfinder gezeigt, dass Cop-1-reaktive T-Zellen (Beispiele 1 und 2; Kipnis et al., 2000a) wie MBP-reaktive T-Zellen (Moalem et al., 2000) signifikante Mengen an vom Gehirn abgeleitetem neurotrophem Faktor, ein Neurotrophin, das bei neuronalem Überleben eine große Rolle spielt (Sendtner et al, 1992 und Yan et al., 1992) sezernieren, wenn sie durch ihr spezifisches Antigen aktiviert werden. In Beispiel 1 untersuchte das Labor der vorliegenden Erfinder T-Zell-Immunität gegen Cop-1 nach physischem Trauma der weißen Substanz, bei der Anti-Cop-1-T-Zellen mit freigelegten Myelin-Epitopen kreuzreagieren können. Das aus Beispiel 3 vorliegende Ergebnis, dass die Immunisierung mit Cop-1 gegen Glutamat-Toxizität aktiv ist, was neuronale Zellkörper unter Bedingungen, bei denen wahrscheinlich keine Myelin-Antigene beteiligt sind, direkt beeinträchtigt, lässt annehmen, dass Anti-Cop-1-T-Zellen auf Grund ihrer Heterogenität auf verschiedene Antigene, einschließlich jener, die mit der Netzhaut in Verbindung stehen, reagieren. Die Cop-1-reaktiven T-Zellen können direkt mit Glutamat selbst interagieren. Eine solche Interaktion könnte die Cop-1-reaktiven T-Zellen, oder endogene T-Zellen in einen protektiven Phänotyp umzuwandeln.

**[0158]** Die Möglichkeit, dass Cop-1-reaktive T-Zellen innerhalb des Glaskörpers mit dem injizierten Glutamat oder innerhalb der Netzhaut mit Microglia-aktivierten Zellen interagieren könnten, wird durch die großen Zah-

len an eindringenden Lymphocyten, die 24 h nach Glutamat-Injektion im Glaskörper beobachtet wurden, unterstützt. Bei Mäusen, denen Cop-1 injiziert wurde, umfassen die eindringenden Lymphocyten wahrscheinlich einige, die für Cop-1 spezifisch sind. Diese Beobachtung, zusammen mit dem Ergebnis, dass der passive Transfer von Cop-1-reaktiven T-Zellen eine ähnliche Wirkung hat wie die aktive Immunisierung mit Cop-1, lässt annehmen, dass die Wirkung der Impfung in der Tat eher durch T-Zellen vermittelt wird denn durch humorale Immunität oder durch Cop-1 selbst. Da Glutamat, als Mediator der sekundären Degeneration, in einiger zeitlicher Distanz von der primären Verletzung auftaucht (Yoles et al., 1998), kann im Fall einer direkten Glutamat-Toxizität ein Behandlungsfenster von 24 h annehmen lassen, dass das Behandlungsfenster bei Fällen von ZNS-Trauma viel weiter ist. Es ist interessant zu bemerken, dass Cop-1 keine Schutzwirkung hatte, wenn die toxische Verletzung durch NMDA induziert wurde. Dies stimmt mit Studien aus dem Labor der vorliegenden Erfinder überein, die zeigten, dass NMDA ein beinahe sofortiges Todessignal aussendet, ohne klare Signale der Apoptose und anscheinend ohne andere Therapiemöglichkeit als der durch NMDA-Rezeptor-Antagonisten. Es ist deshalb nicht überraschend, dass die Immunisierung mit Cop-1 gegen NMDA-induzierte Toxizität unwirksam war. Es bleibt noch festzustellen, ob die Aktivität von Cop-1 als eher neuroprotektives denn als suppressives Mittel von seinem Verabreichungsweg abhängig ist. Es muss ebenfalls noch bestimmt werden, wie die lokale Anreicherung von für ZNS-Antigen spezifischen T-Zellen oder von T-Zellen, die für kreuzreagierende Antigene wie Cop-1 spezifisch sind, die Neuroprotektion nach ZNS-Verletzungen vermitteln.

**[0159]** Die T-Zell-vermittelte Neuroprotektion, die in den Studien von Beispiel 3 gezeigt wurde, könnte sowohl für chronische als auch für akute Verletzungen von ZNS-Nerven anwendbar sein, bei denen Neuronen für Degeneration empfänglich und für die Neuroprotektion zugänglich sind (Schwartz et al., 2000a; Schwartz et al., 2000b; Doble et al., 1999; und Grunblatt et al., 2000). Ein chronischer Zustand, Glaukom, wird oft mit IOP in Verbindung gebracht, und ist ein führender Verursacher von Blindheit. Es ist jedoch eine allgemeine Erfahrung, dass die Krankheit weiter fortschreiten kann, obwohl der IOP innerhalb des normalen Bereichs bleibt, was annehmen lässt, dass eine mechanische Kompression wahrscheinlich nicht der einzige Grund für einen Schaden des Sehnervs ist, und dass eine Behandlung zusätzlich zur Verringerung der IOP deshalb eine neuroprotektive Therapie umfassen sollte (hinsichtlich einer Rezension vgl. Osborne et al., 1999; Schwartz et al., 2000c; und Weinreb et al., 1999). Jüngste Studien haben zum Beispiel gezeigt, dass eine Behandlung mit einem Glutamat-Antagonisten (Chaudhary et al., 1998) oder einem Stickstoffoxid-Synthaseinhibitor (Neufeld et al., 1999) in einem Ratten-Modell mit erhöhtem IOP retinalen Ganglionzelltod abschwächt. Es besteht jedoch die Gefahr, dass eine Interferenz durch diese Mittel mit der physiologischen Reaktion, obwohl an der pathologischen Stelle möglicherweise zuträglich, für normales Gewebe schädlich sein könnte, was zu unerwünschten Nebenwirkungen führt. Ein stärker bevorzugter Ansatz vom klinischen Gesichtspunkt her ist deshalb, die eigene Verteidigungsmechanik des Gewebes zu nutzen und zu verstärken.

**[0160]** Das vorliegende Ergebnis der Neuroprotektion, das sogar dann erreicht wird, wenn der Druck hoch bleibt, ist möglicherweise aus klinischer Sicht sehr vorteilhaft. Und zwar deshalb, weil sogar ein Druck, der auf einen normalen Wert reduziert ist, für Patienten mit Glaukom, bei denen die übriggebliebenen Neuronen verletzlicher sind als normale (Agies, 2000) nicht notwendigerweise sicher ist. Darüber hinaus könnte eine Reduktion des IOP dahingehend, was bei solchen Patienten als sicher betrachtet werden könnte, nämlich auf 12 mm Hg, nicht durchführbar sein.

**[0161]** Nachdem diese Erfindung nun vollständig beschrieben ist, wird der Fachmann verstehen, dass diese innerhalb eines weiten Bereichs äquivalenter Parameter, Konzentrationen und Bedingungen ohne unzumutbares Experimentieren durchgeführt werden kann.

**[0162]** Während diese Erfindung in Verbindung mit spezifischen Ausführungsformen davon beschrieben worden ist, ist zu verstehen, dass weitere Modifikationen durchgeführt werden können. Diese Anmeldung soll alle Varianten, Verwendungsmöglichkeiten oder Adaptationen der Erfindung abdecken, die im Allgemeinen den Prinzipien der Erfindung folgen und solche Abweichungen von der vorliegenden Offenbarung umfassen, wie sie mit bekannter oder gewohnheitsmäßiger Praxis auf dem Fachgebiet einhergehen, zu dem die Erfindung gehört, und wie zu den vorstehenden wichtigen Merkmalen, die im Folgenden im Bereich der angehängten Patentansprüche gezeigt werden, angefügt werden können.

**[0163]** Bezugnahmen auf bekannte Verfahrensschritte, herkömmliche Verfahrensschritte, bekannte Verfahren oder herkömmliche Verfahren sind in keiner Weise ein Zugeständnis, dass irgendein Aspekt, eine Beschreibung oder Ausführungsform der vorliegenden Erfindung auf dem jeweiligen Fachgebiet offenbart, gelehrt oder vorgeschlagen wird.

**[0164]** Die vorangehende Beschreibung der spezifischen Ausführungsformen wird die allgemeine Natur der

Erfindung vollständig zeigen, so dass andere, durch Anwendung von Wissen aus dem Fachgebiet (einschließlich der hierin zitierten Bezugnahmen), solche spezifischen Ausführungsformen ohne unzumutbares Experimentieren, ohne Abweichen vom allgemeinen Konzept der vorliegenden Erfindung leicht modifizieren und/oder für verschiedene Anwendungsformen adaptieren können. Deshalb sollen solche Adaptationen und Modifikationen, basierend auf der hierin dargestellten Lehre und Anleitung, innerhalb der Bedeutung und des Bereichs von Äquivalenten der offenbarten Ausführungsformen sein. Es ist zu verstehen, dass die Phraseologie oder Terminologie hierin zum Zweck der Beschreibung und keine Beschränkung ist, so dass die Terminologie oder Phraseologie der vorliegenden Spezifizierung vom Fachmann hinsichtlich der hierin dargelegten Lehre und Anleitung in Kombination mit dem Wissen des Durchschnittsfachmanns zu interpretieren sind.

## REFERENCES

- Agis, Am, J. *Ophthalmol* (2000)
- Aharoni et al, "T suppressor hybridomas and interleukin-2-dependent lines induced by copolymer 1 or by spinal cord homogenate down-regulate experimental allergic encephalomyelitis", *Eur. J. Immunol.* 23:17–25 (1993)
- Aharoni et al, "Copolymer 1 induces T cells of the T helper type 2 that crossreact with myelin basic protein and suppress experimental autoimmune encephalomyelitis", *Proc Natl Acad Sci (USA)* 94(20):10821–10826 (1997)
- Ashwood-Smith, *Nature* 190:1204–1205 (1961)
- Bazan et al, "Mediators of injury in neurotrauma: intracellular signal transduction and gene expression", *J. Neurotrauma* 12(5):791–814 (1995)
- Ben-Nun et al, "The rapid isolation of clonable antigenspecific T lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis", *Eur. J. Immunol.* 11(3):195–199 (1981a)
- Ben-Nun et al, "Vaccination against autoimmune encephalomyelitis with T-lymphocyte line cells reactive against myelin basic protein", *Nature* 292(5818):60–61 (1981b)
- Ben-Nun et al, "Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mediated by T cell lines: process of selection of lines and characterization of the cells", *J. Immunol.* 129(1):303–308 (1982)
- Ben-Nun et al, "The autoimmune reactivity to myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) in multiple sclerosis is potentially pathogenic: effect of copolymer 1 on MOG-induced disease", *J. Neurol.* 243(4Sup1):514–22 (1996)
- Bornstein et al, "Clinical trials of Cop 1 in multiple sclerosis", *Handbook of Multiple Sclerosis*, ed. Cook S.D. Marcel Dekker, Inc., p. 469 (1990)
- Brauner-Osborne et al, "A new structural class of subtypeselective inhibitor of cloned excitatory amino acid transporter, EAAT2" *Eur J Pharmacol*, 406:41–44 (2000)
- Burns et al, "Isolation of myelin basic protein-reactive T-cell lines from normal human blood", *Cell Immunol.* 81(2):435–440 (1983)
- Chaudhary et al, "MK801-a neuroprotectant in rat hypertensive eyes", *Brain Res*, 792(1):159–8 (1998)
- Doble, "The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy", *Pharmacol Ther*, 81:163–221
- Dreyer et al., "Elevated glutamate levels in the vitreous body of humans and monkeys with glaucoma", *Arch Ophthalmol*, 114:299–305 (1996)
- Duvdevani et al, *Restor. Neurol. Neurosci.* 2:31–38, (1990)
- Faden et al, "Pharmacological strategies in CNS trauma", *Trends Pharmacol. Sci.* 13(1):29–35 (1992)
- Faden, A.I., "Experimental neurobiology of central nervous system trauma", *Crit. Rev. Neurobiol.* 7(3–4):175–186 (1993)
- Fisher et al., *J. of Neuroscience* (2000)
- Fridkis-Hareli et al, "Direct binding of myelin basic protein and synthetic copolymer 1 to class II major histocompatibility complex molecules on living antigenpresenting cells – specificity and promiscuity", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(11):4872–76 (1994).
- Fridkis-Hareli et al, "Promiscuous binding of synthetic copolymer 1 to purified HLA-DR molecules", *J. Immunol.* 160(9):4386–4397 (1998)
- Fridkis-Hareli et al, "Binding of random copolymers of three amino acids to class II MHC molecules", *Int. Immunol.* 11(5):635–641 (1999a)
- Fridkis-Hareli et al, "Binding motifs of copolymer 1 to multiple sclerosis- and rheumatoid arthritis-associated HLA-DR molecules", *J. Immunol.* 162 (8):4697–4704 (1999b)
- Gillis et al, "T cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity", *J Immunol* 120:2027–2032 (1978)
- Gorin, N.C., "Collection, manipulation and freezing of haemopoietic stem cells", *Clin. Haematol.* 15(1):19–48 (1986);
- Grunblatt et al., "MPTP and 6-hydroxydopamine-induced neurodegeneration as models for Parkinson's di-

- sease: neuroprotective strategies", *J Neurol, Suppl* 2:1195–102 (2000)
- Hauben et al, "Autoimmune T cells as potential neuroprotective therapy for spinal cord injury", *Lancet* 355:286–287 (2000)
- Hickey, W.F. et al, "T-lymphocyte entry into the central nervous system", *J. Neurosci. Res.* 28(2):254–260 (1991)
- Hirschberg et al, "Accumulation of passively transferred primed T cells independently of their antigen specificity following central nervous system trauma" *J. Neuroimmunol.* 89(1–2):88–96 (1998)
- Hovda et al, "Diffuse prolonged depression of cerebral oxidative metabolism following concussive brain injury in the rat: a cytochrome oxidase histochemistry study", *Brain Res.* 567(1):1–10 (1991)
- Hunig et al, "A monoclonal antibody to a constant determinant of the rat T cell antigen receptor that induces T cell activation. Differential reactivity with subsets of immature and mature T lymphocytes", *J Exp Med* 169:73–86 (1989)
- International Atomic Energy Agency, Bone-Marrow Conservation, Culture and Transplantation, Proceedings of a Panel, Moscow, July 22–26, 1968, Vienna, pp. 107–186 (1969).
- Johnson et al, "Cop 1 positive results – a phase III trial in relapsing remitting", MS. 11th Annual Meeting A.N.A. (1994).
- Johnson et al, "Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group," *Neurology* 1:65 (1995).
- Kipnis et al., "T cell immunity to copolymer 1 confers neuroprotection on the damaged optic nerve: possible therapy for optic neuropathies", *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:7446–51 (2000a)
- Kipnis et al., (2000b)
- Kramer et al, "Gene transfer through the blood-nerve barrier: NGF-engineered neuritogenic T lymphocytes attenuate experimental autoimmune neuritis", *Nat. Med.* 1(11):1162–1166 (1995)
- Lazarov Spiegler et al, "Transplantation of activated macrophages overcomes central nervous system re-growth failure", *FASEB J.* 10(11):1296–1302 (1996)
- Lehman, K., "Acrylic Coatings in Controlled Release Tablet Manufacturer", *Manufacturing Chemist and Aerosol News*, p. 39 (1973)
- Lewis et al, "The effect of cooling regimens on the transplantation potential of marrow", *Transfusion* 7(1):17–32 (1967)
- Linner et al, "A new technique for removal of amorphous phase tissue water without ice crystal damage: a preparative method for ultrastructural analysis and immunoelectron microscopy", *J. Histochem. Cytochem.* 34(9):1123–1135 (1986)
- Livesey and Linner, *Nature* 327:255 (1987)
- Lovelock, *Biochem. J.* 56:265 (1954)
- Lovelock and Bishop, *Nature* 183:1394–1395 (1959)
- Lynch et al, "Secondary mechanisms in neuronal trauma, *Curr. Opin. Neurol.* 7(6):510–516 (1994)
- Martin et al, "Fine specificity and HLA restriction of myelin basic protein-specific cytotoxic T cell lines from multiple sclerosis patients and healthy individuals", *J. Immunol.* 145(2):540–598 (1990)
- Martin, R., "Immunological aspects of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis and their application for new therapeutic strategies", *J. Neural. Transm. Suppl.* 49:53–67 (1997)
- Mazur, P., "Cryobiology: the freezing of biological systems", *Science* 168(934):939–949 (1970)
- McIntosh, T.K., "Novel pharmacologic therapies in the treatment of experimental traumatic brain injury: a review", *J. Neurotrauma* 10(3):215–261 (1993)
- Meldrum, "Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology", *J. Nutr.* 130: (4S Suppl):10075–1015S (2000)
- Moalem et al, "Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy", *Nat. Med.* 5:49–55 (1999a)
- Moalem et al., "Differential T cell response in central and peripheral nerve injury: connection with immune privilege", *Faseb J*, 13:1207–17 (1999b)
- Moalem et al., "Production of neurotrophins by activated T cells: implications for neuroprotective autoimmunity", *J. Autoimmun.* 15:331–345 (2000)
- Mor et al, "Clinical modeling of T cell vaccination against autoimmune diseases in rats. Selection of antigen-specific T cells using a mitogen", *Clin. Invest.* 85(5):1594–1598 (1990)
- Mor et al, "Pathogenicity of T cells responsive to diverse cryptic epitopes of myelin basic protein in the Lewis rat", *J. Immunol.* 155(7):3693–3699 (1995)
- Neufeld et al, "Inhibition of nitric-oxide synthase 2 by aminoguanidine provides neuroprotection of retinal ganglion cells in a rat model of chronic glaucoma", *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(17):994408 (1999)
- Neuhaus et al., "Multiple sclerosis: comparison of copolymer-1-reactive T cell lines from treated and untreated subjects reveals cytokine shift from T helper 1 to T helper 2 cells", *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:7452–7 (2000)

- Osborne et al., "The potential of neuroprotection in glaucoma treatment", *Curr Opin Ophthalmol*, 10(2):82–92 (1999)
- Ota et al., "T-cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis", *Nature* 346(6280):183–187 (1990)
- Pette et al., "Myelin basic protein-specific T lymphocyte lines from MS patients and healthy individuals", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87(2):7968–7972 (1990)
- Phan The Tran and Bender, *Exp. Cell Res.* 20:651, 1960a
- Phan The Tran and Bender, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 104:388, 1960b;
- Phan The Tran and Bender, in *Radiobiology, Proceedings of the Third Australian Conference on Radiobiology*, Ilbery, P.L.T., ed., Butterworth, London, p. 59 (1961)
- Pitt et al., "Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis", *Nat Med*, 6:67–70 (2000)
- Rapalino et al., "Implantation of stimulated homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats", *Nat. Med.* 4(7):814–821 (1998)
- Rapatz et al., "Preservation of erythrocytes in blood containing various cryoprotective agents, frozen at various rates and brought to a given final temperature", *Cryobiology* 5(1):18–25 (1968)
- Rinfret, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 85:576 (1960)
- Rowe et al, *Fed. Proc.* 21:157 (1962a)
- Rowe and Rinfret, *Blood* 20:636 (1962b)
- Rowe A., "Biochemical aspects of cryoprotective agents in freezing and thawing", *Cryobiology* 3(1):12–18 (1966)
- Schwartz et al., "Innate and adaptive immune responses can be beneficial for CNS repair", *Trends Neurosci*, 22:295–9 (1999a)
- Schwartz et al., *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41:349–51 (2000a)
- Schwartz et al., *Current Opinion in Ophthalmology* 11:107–111 (2000b)
- Schwartz et al., "Neuroprotection: a new treatment modality for glaucoma?", *Curr Opin Ophthalmol*, 11(2):82–92 (1999b)
- Schluesener et al, "Autoaggressive T lymphocyte lines recognizing the encephalitogenic region of myelin basic protein: in vitro selection from unprimed rat T lymphocyte populations", *J. Immunol.* 135(5):3128–3133 (1985)
- Schoepp et al., "Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors", *Neuropharmacology*, 38:1931–76 (1999)
- Sendtner et al, "Brain-derived neurotrophic factor prevents the death of motoneurons in newborn rats after nerve section", *Nature* 360:757–759 (1992)
- Sela et al, *Bull. Inst. Pasteur (Paris)* 88:303–314 (1990).
- Sloviter and Ravdin, *Nature* 196:548 (1962)
- Spitzer et al, "High-dose combination chemotherapy with autologous bone marrow transplantation in adult solid tumors", *Cancer* 45(12):3075–3085, 1980
- Streilein, J.W., "Immune privilege as the result of local tissue barriers and immunosuppressive microenvironments", *Curr. Opin. Immunol.* 5(3):428–423 (1993)
- Streilein, J.W., "Unraveling immune privilege", *Science* 270(5239):1158–1159 (1995)
- Suruhan-Dires Keneli et al, *Eur. J. Immunol.* 23:530 (1993)
- Teitelbaum et al, "Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by a synthetic polypeptide" *Eur. J. Immunol.* 1(4):242–248 (1971)
- Teitelbaum et al, "Suppression of experimental allergic encephalomyelitis in rhesus monkeys by a synthetic basic copolymer", *Clin. Immunol. Immunopathol.* 3(2):256–262 (1974a).
- Teitelbaum et al, "Suppression of experimental allergic encephalomyelitis in baboons by Cop 1", *Israel J. Med. Sci.* 13:1038 (1974b).
- Teitelbaum et al, "Specific inhibition of the T-cell response to myelin basic protein by the synthetic copolymer Cop 1", *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 85(24):9724–9728 (1988)
- Teitelbaum et al, "Copolymer 1 inhibits chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis induced by proteolipid protein (PLP) peptides in mice and interferes with PLP-specific T cell responses", *J Neuroimmunol* 64:209–217 (1996)
- Webb et al, "Correlation between strain differences in susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis and the immune response to encephalitogenic protein in inbred guinea pigs", *Immunol Commun* 2(2):185–192 (1973)
- Weinreb et al., "Is neuroprotection a viable therapy for glaucoma?", *Arch Ophthalmol*, 117(11):1540–4 (1999)
- Werkele, H., in *The Blood-Brain Barrier*, Pardridge, Ed., Raven Press, Ltd. New York, pp. 67–85 (1993)
- Wu, D. et al, *J. Neurochem.* 62:37–44 (1994)
- Yan et al, "Brain-derived neurotrophic factor rescues spinal motor neurons from axotomy-induced cell death", *Nature* 360:753–755 (1992)
- Yoles, et al, "GM1 reduces injury-induced metabolic deficits and degeneration in the rat optic nerve", *Invest.*

Ophthalmol. Vis. Sci. 33(13):3586–3591 (1992)

Yoles et al, "Degeneration of spared axons following partial white matter lesion: implications for optic nerve neuropathies", Exp. Neurol. 153:1–7 (1998a)

Yoles et al, "Elevation of intraocular glutamate levels in rats with partial lesion of the optic nerve", Arch Ophthalmol, 116:906–10 (1998)

Yoles et al., J. Neurosci (2000)

Yoshina, A. et al, Brain Res. 561:106–119 (1991)

Zaroulis et al, "Successful freeze-preservation of human granulocytes", Cryobiology 17(3):311–317 (1980)

Zivin et al, "Stroke therapy", Sci. Am. 265(1):56–63 (1991)

SEQUENZPROTOKOLL

<110> EISENBACH-SCHWARTZ, Michal  
 COHEN, Irun R.  
 SELLA, Michael  
 YOLES, Eti  
 KIPNIS, Jonathan

<120> DIE VERWENDUNG VON COPOLYMER 1 UND VERWANDTER PEPTIDE UND POLYPEPTIDE UND DAMIT BEHANDELTE T-ZELLEN FÜR DIE NEUROPROTEKTIVE THERAPIE

<130> EIS-SCHWARTZ13 PCT

<150> 09/487,793  
 <151> 2000-01-20

<150> 06/209,799  
 <151> 2000-06-07

<150> 09/620,216  
 <151> 2000-07-20

<160> 33

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Künstlich: Synthetische Konstruktion

<400> 1

Ala Ala Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

<210> 2  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Künstlich: Synthetische Konstruktion

<400> 2

Ala Glu Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

<210> 3  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Künstlich: Synthetische Konstruktion

<400> 3

Ala Lys Glu Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

<210> 4  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Künstlich: Synthetische Konstruktion

<400> 4

Ala Lys Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

<210> 5  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Künstlich: Synthetisches Konstrukt  
 <400> 5

Ala Glu Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

<210> 6  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Künstlich: synthetische Konstruktion  
 <400> 6

Lys Glu Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

<210> 7  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Künstlich: synthetische Konstruktion  
 <400> 7

Ala Glu Glu Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

<210> 8  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Künstlich: synthetische Konstruktion  
 <400> 8

Ala Ala Glu Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

<210> 9  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Künstlich: synthetische Konstruktion  
 <400> 9

Glu Lys Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

<210> 10  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Künstlich: synthetische Konstruktion  
 <400> 10

Ala Ala Lys Tyr Glu Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

<210> 11  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Künstlich: Synthetische Konstruktion  
 <400> 11

Ala Ala Lys Tyr Ala Glu Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

<210> 12  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Künstlich: Synthetische Konstruktion  
 <400> 12

Glu Ala Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

<210> 13  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Künstlich: Synthetische Konstruktion  
 <400> 13

Glu Lys Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

<210> 14  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Künstlich: Synthetische Konstruktion  
 <400> 14

Glu Ala Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

<210> 15  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Künstlich: Synthetische Konstruktion  
 <400> 15

Ala Glu Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

<210> 16  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Künstlich: Synthetische Konstruktion  
 <400> 16

Ala Lys Glu Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

<210> 17  
 <211> 15  
 <212> PRT

<213> Künstlich: Synthetische Konstruktion

<400> 17

Ala Lys Lys Tyr Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich: Synthetische Konstruktion

<400> 18

Ala Lys Lys Tyr Ala Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich: Synthetische Konstruktion

<400> 19

Ala Glu Ala Tyr Lys Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

<210> 20

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich: Synthetische Konstruktion

<400> 20

Lys Glu Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

<210> 21

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich: Synthetische Konstruktion

<400> 21

Ala Glu Glu Tyr Lys Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

<210> 22

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich: Synthetische Konstruktion

<400> 22

Ala Ala Glu Tyr Lys Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

<210> 23

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich: Synthetische Konstruktion

<400> 23

Glu Lys Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

<210> 24  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Künstlich: Synthetische Konstruktion

<400> 24

Ala Ala Lys Tyr Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

<210> 25  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Künstlich: Synthetische Konstruktion

<400> 25

Ala Ala Lys Tyr Ala Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

<210> 26  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Künstlich: Synthetische Konstruktion

<400> 26

Glu Lys Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

<210> 27  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Künstlich: Synthetische Konstruktion

<400> 27

Glu Ala Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

<210> 28  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Künstlich: Synthetische Konstruktion

<400> 28

Ala Glu Tyr Ala Lys Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

<210> 29  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Künstlich: Synthetische Konstruktion

<400> 29

Ala Glu Lys Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

<210> 30  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Künstlich: Synthetische Konstruktion  
 <400> 30

Glu Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

<210> 31  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Künstlich: Synthetische Konstruktion  
 <400> 31

Ala Tyr Lys Ala Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

<210> 32  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Künstlich: Synthetische Konstruktion  
 <400> 32

Ala Lys Tyr Ala Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

<210> 33  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> HUMAN  
 <400> 33

Gly Gln Phe Arg Val Ile Gly Pro Gly His Pro Ile Arg Ala Leu Val  
 1 5 10 15

Gly Asp Glu Ala Glu Leu  
 20

### Patentansprüche

1. Verwendung von Cop 1 oder einem Cop 1-verwandten Peptid oder Polypeptid für die Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer Krankheit, die durch Glutamatoxizität verursacht oder verschlimmert wird, wobei die Krankheit nicht Multiple Sklerose ist.

2. Verwendung von Cop 1 nach Anspruch 1.

3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Cop 1-verwandte Peptid oder Polypeptid ein zufälliges Copolymer ist, das funktionell mit basischem Myelinprotein (MBP) kreuzreagiert und befähigt ist, mit MBP auf dem MHC Klasse II-Molekül in der Antigenpräsentation zu konkurrieren.

4. Verwendung nach Anspruch 3, wobei das zufällige Copolymer eine Aminosäure umfasst, die ausgewählt ist aus jeder von mindestens drei der folgenden Gruppen:

- (a) Lysin und Arginin;
- (b) Glutaminsäure und Asparaginsäure;
- (c) Alanin und Glycin; und
- (d) Tyrosin und Tryptophan.

5. Verwendung nach Anspruch 4, wobei das zufällige Copolymer vier unterschiedliche Aminosäuren enthält, jede von einer unterschiedlichen der Gruppen (a) bis (d).

6. Verwendung nach Anspruch 5, wobei diese vier unterschiedlichen Aminosäuren Alanin, Glutaminsäure,

Lysin und Tyrosin sind.

7. Verwendung nach Anspruch 5, wobei das zufällige Copolymer drei unterschiedliche Aminosäuren enthält, jede von einer unterschiedlichen der Gruppen (a) bis (d).

8. Verwendung nach Anspruch 7, wobei diese drei unterschiedlichen Aminosäuren Tyrosin, Alanin und Lysin; Tyrosin, Glutaminsäure und Lysin; Lysin, Glutaminsäure und Alanin; oder Tyrosin, Glutaminsäure und Alanin sind.

9. Verwendung von T-Zellen, die durch Cop 1 oder ein Cop 1-verwandtes Peptid oder Polypeptid aktiviert wurden, für die Herstellung eines Medikaments zum Schutz von Zellen des Zentralnervensystems vor Glutamattoxizität.

10. Verwendung von T-Zellen, die durch Cop 1 oder ein Cop 1-verwandtes Peptid oder Polypeptid aktiviert wurden, für die Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer Krankheit, die durch Glutamattoxizität verursacht oder verschlimmert wird.

11. Verwendung nach Anspruch 9 oder 10, wobei die T-Zellen durch Cop 1 aktiviert wurden.

12. Verwendung nach einem der Ansprüche 9 bis 11, wobei die aktivierten T-Zellen autologe T-Zellen sind.

13. Verwendung nach einem der Ansprüche 9 bis 11, wobei die aktivierten T-Zellen allogene T-Zellen von verwandten Spendern oder HLA-passenden oder teilweise passenden, semi-allogenen oder voll-allogenen Spendern sind.

14. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei das Medikament für die Behandlung einer Krankheit ist, die mit einem abnormal erhöhten intraokulären Druck assoziiert ist.

15. Verwendung nach Anspruch 14, wobei die Krankheit grüner Star ist.

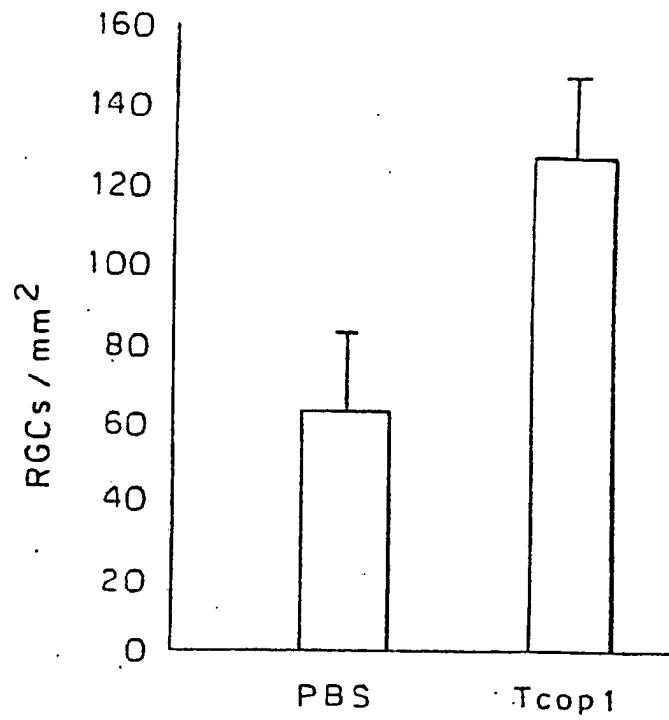
16. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei das Medikament für die Behandlung einer Krankheit ist, ausgewählt aus diabetischer Neuropathie, seniler Demenz, Alzheimer-Krankheit, Parkinson-Krankheit, Gesichtsnerven(Bell's)-Lähmung, Chorea Huntington, amyotropher Lateralsklerose, epileptischem Zustand, nicht-arteritischer optischer Neuropathie oder Vitaminmangel, grünem Star, Bandscheibenvorfall, Prionkrankheiten wie Creutzfeldt-Jakob-Krankheit, Karpaltunnelsyndrom, peripheren Neuropathien assoziiert mit verschiedenen Krankheiten einschließlich Urämie, Porphyrie, Hypoglykämie, Sjorgren Larsen-Syndrom, akuter sensorischer Neuropathie, chronischer ataktischer Neuropathie, biliärer Cirrhose, primärer Amyloidose, obstruktiven Lungenkrankheiten, Akromegalie, Malabsorptionsyndromen, Polycythämia Vera, IgA- und IgG-Gammopathien, Komplikationen verschiedener Arzneistoffe (z.B. Metronidazol) und Toxine (z.B. Alkohol oder Organophosphate), Charcot-Marie-Tooth-Krankheit, telangiektatischer Ataxie, Friedreich-Ataxie, amyloiden Polyneuropathien, Adrenomyeloneuropathie, Riesenaxon-Neuropathie, Refsum-Krankheit, Fabry-Krankheit, Lipoproteinämie, Epilepsie, Amnesie, Angstzustand, Hyperalgesie, Psychose, Krämpfen, abnormal erhöhtem intraokulärem Druck, oxidativem Stress und Opiattoleranz und -abhängigkeit.

17. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei das Medikament für die Behandlung nach Tumorentfernung aus dem Zentralnervensystem oder Operation am Zentralnervensystem ist.

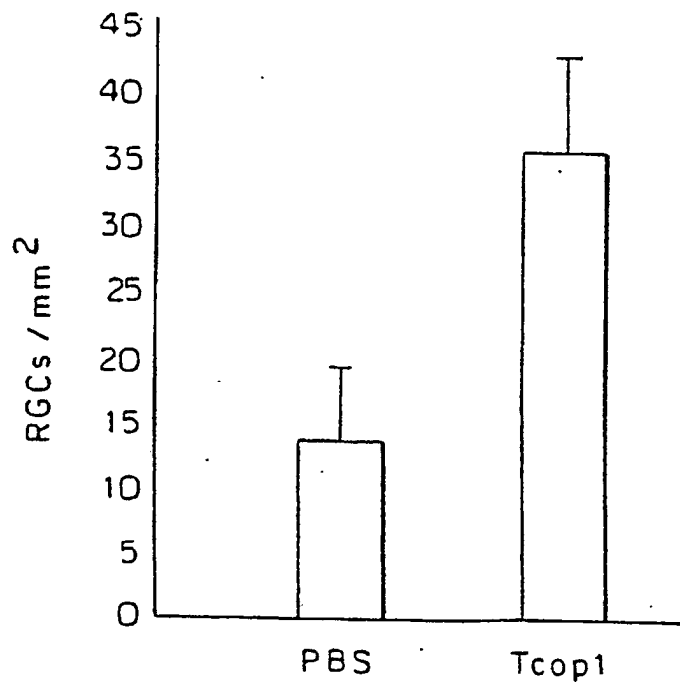
18. Verwendung von Cop 1 oder einem Cop 1-verwandten Peptid oder Polypeptid für die Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von grünem Star.

Es folgen 10 Blatt Zeichnungen

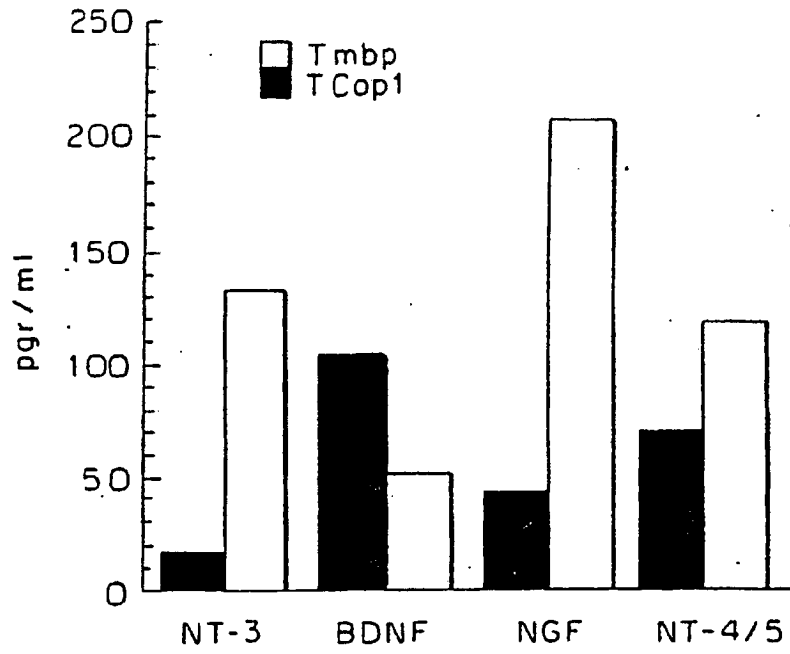
**FIG. 1A**



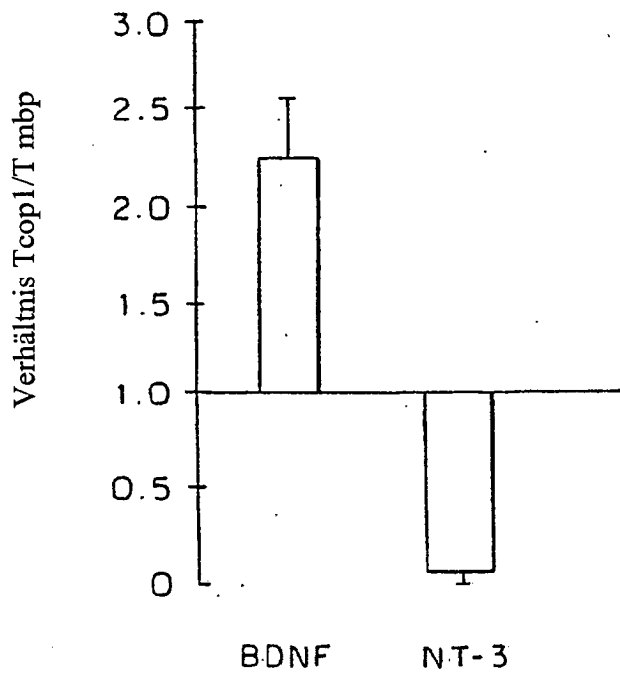
**FIG. 1B**



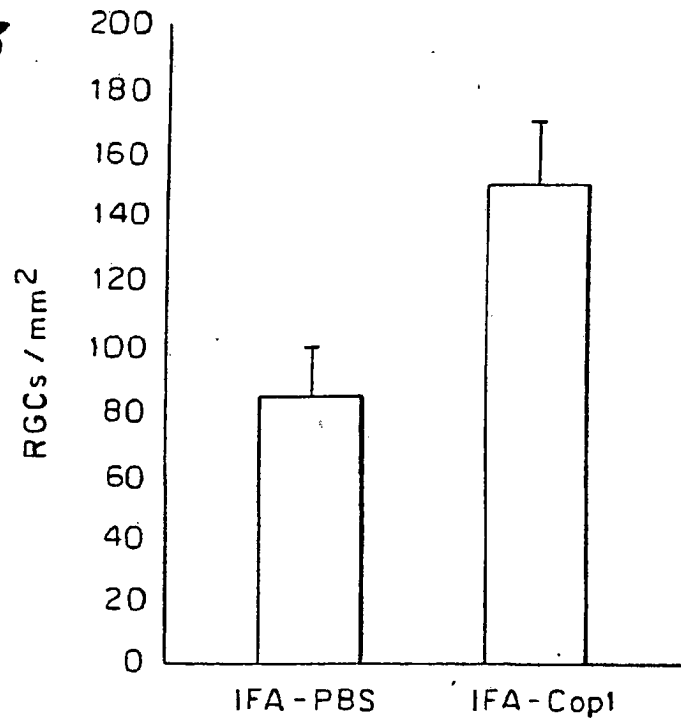
*FIG. 2A*



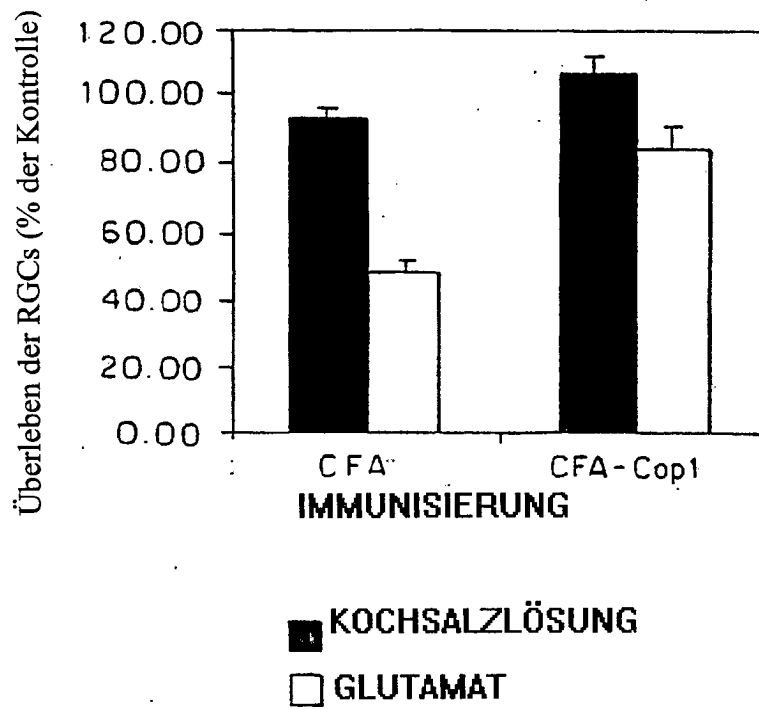
*FIG. 2B*



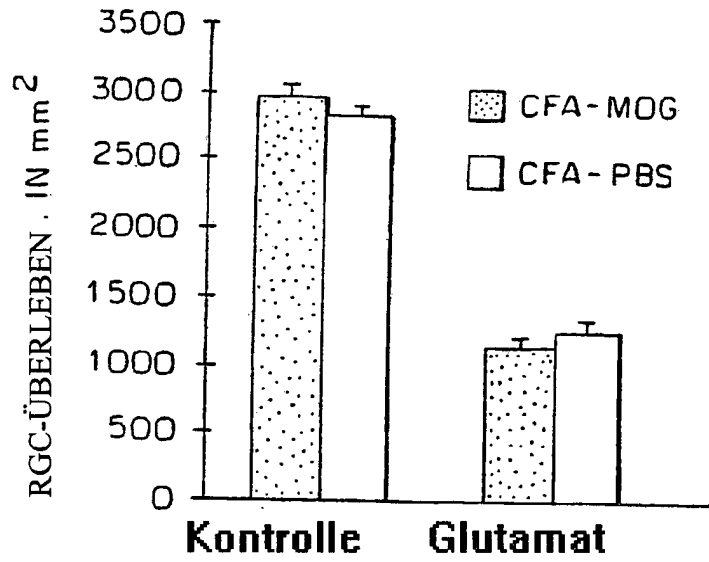
*FIG. 3*



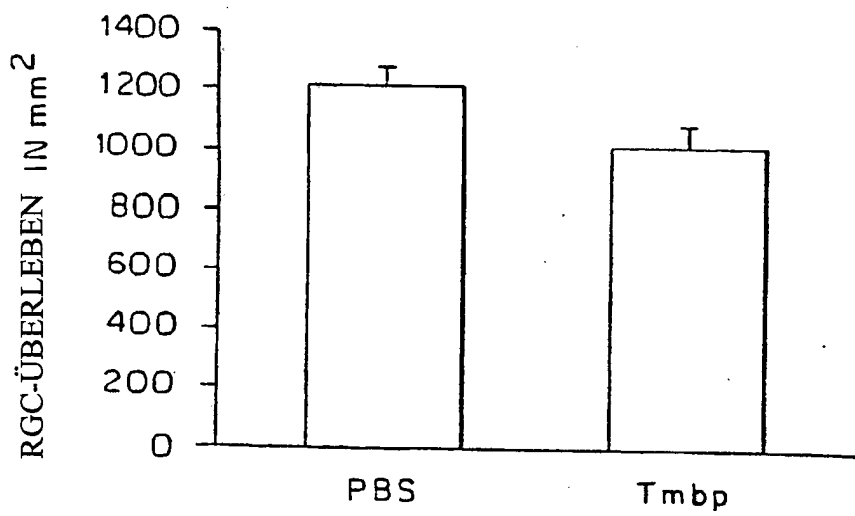
*FIG. 4*



*FIG. 5A*



*FIG. 5B*



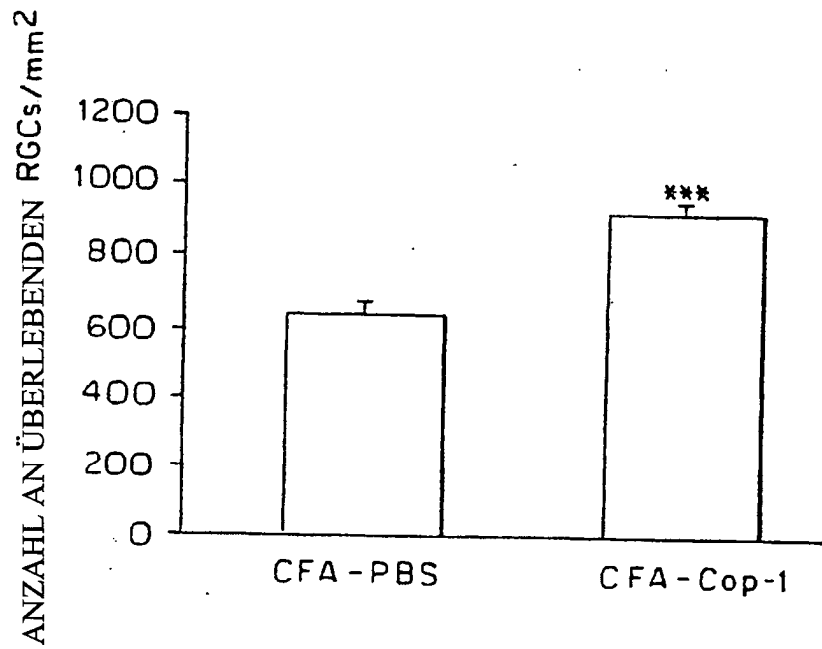
*FIG. 6A*



*FIG. 6B*



*FIG. 7*



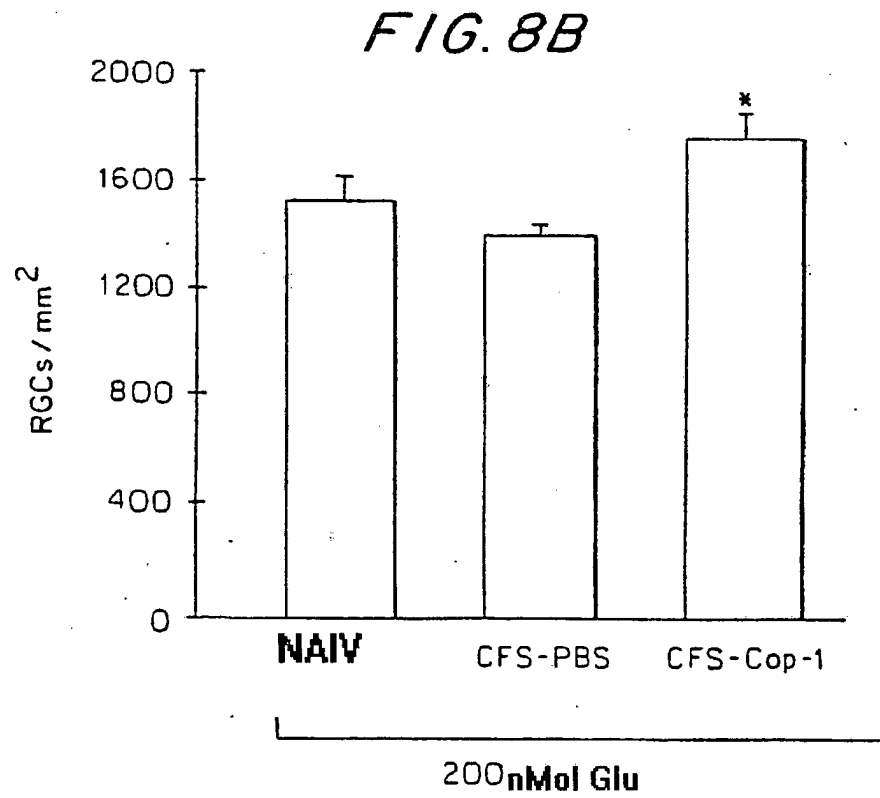
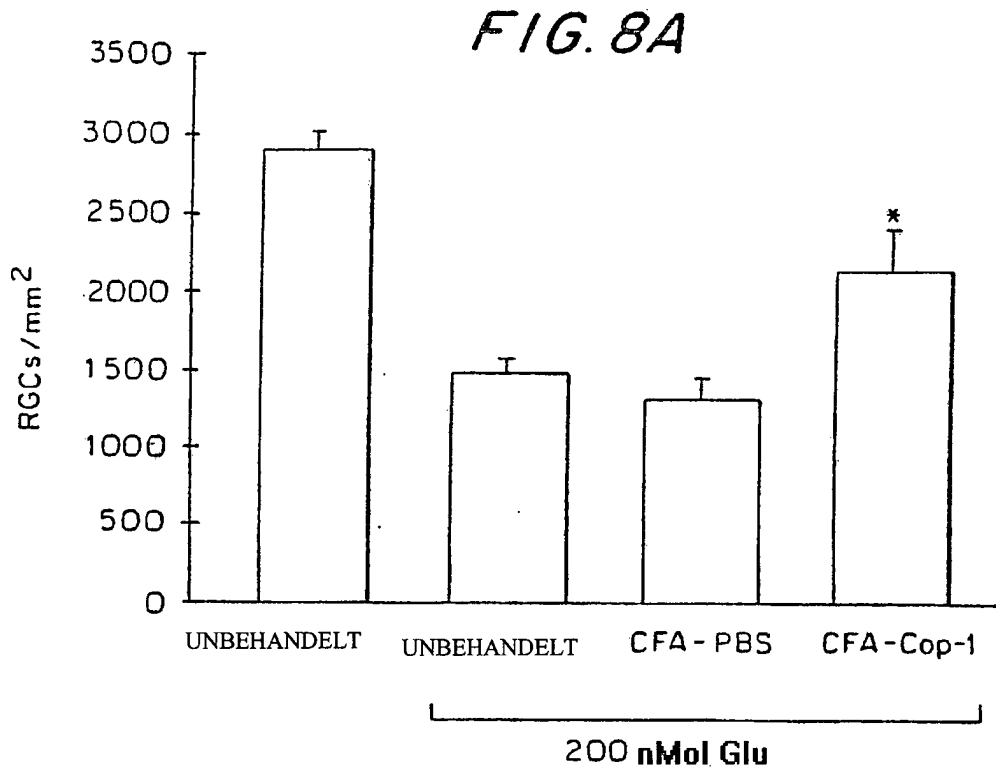


FIG. 8C

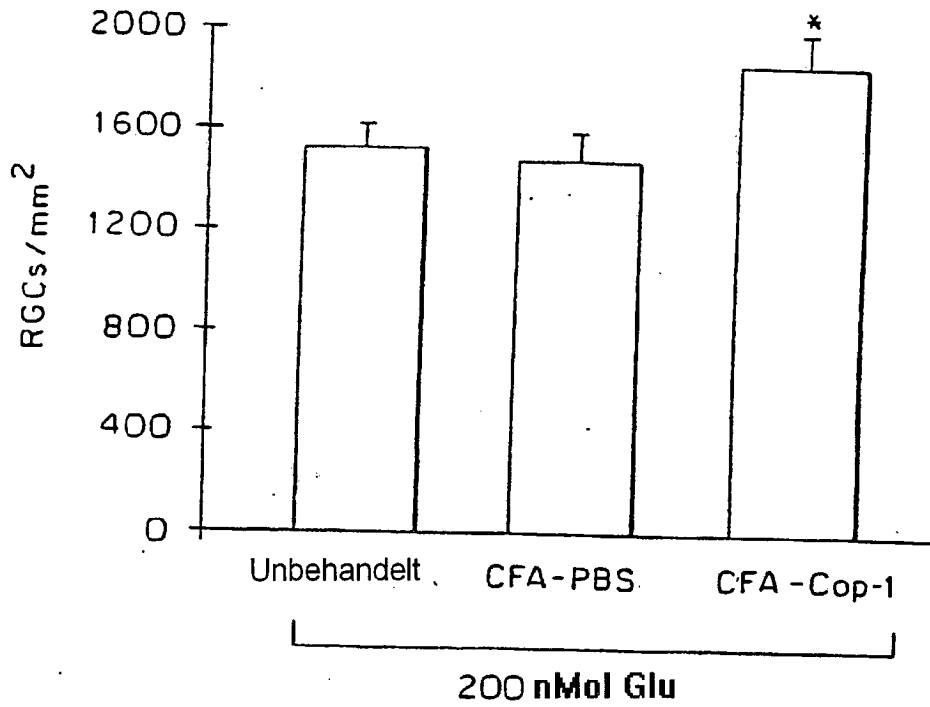


FIG. 8D

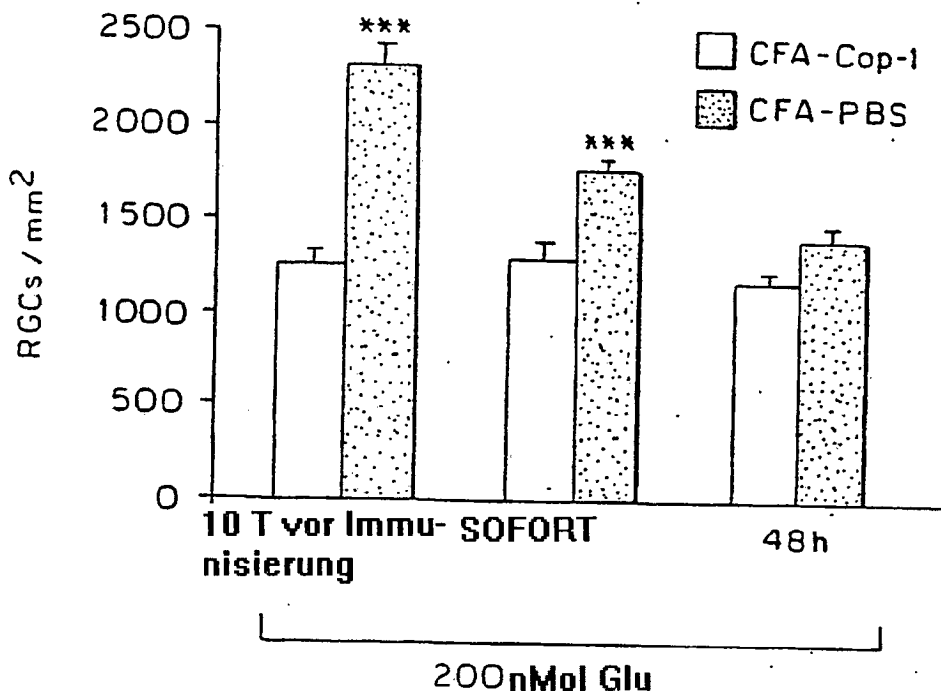


FIG. 9

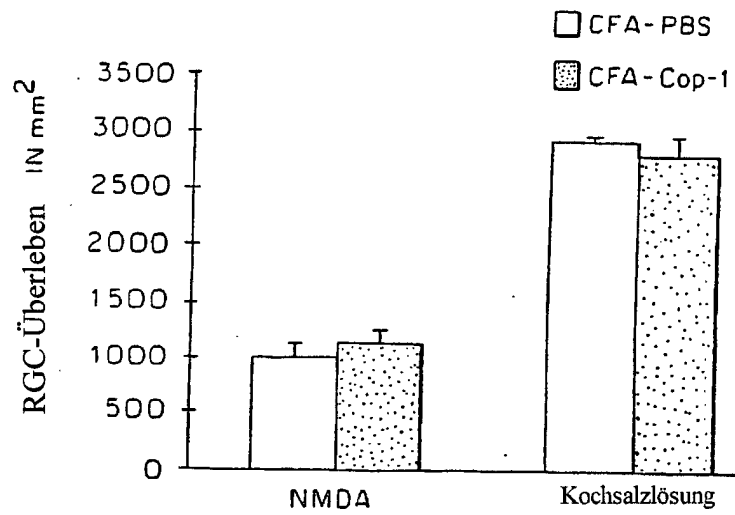


FIG. 10

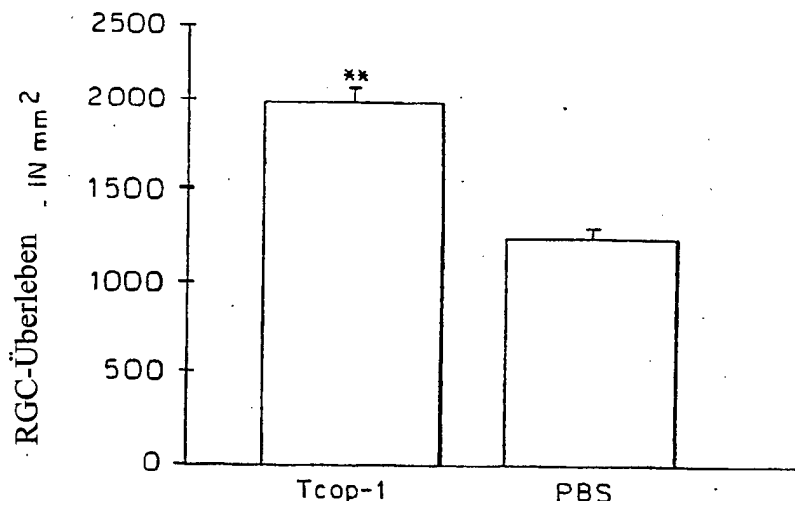


FIG. 11A

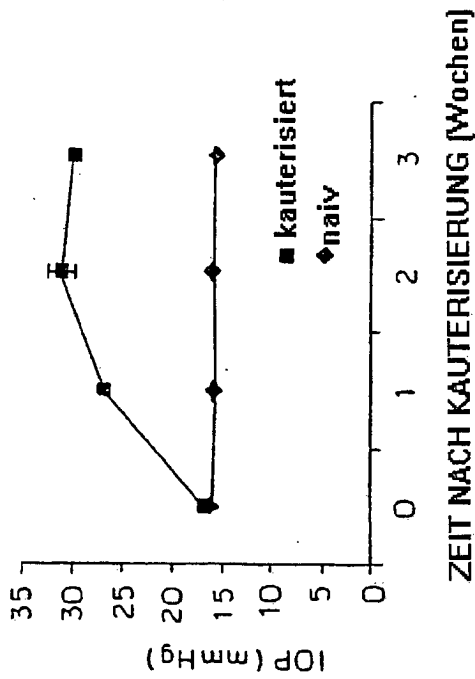
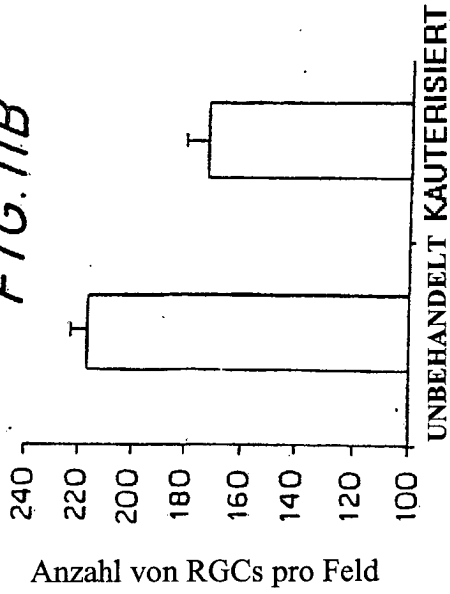


FIG. 11B



10 / 10

FIG. 11C

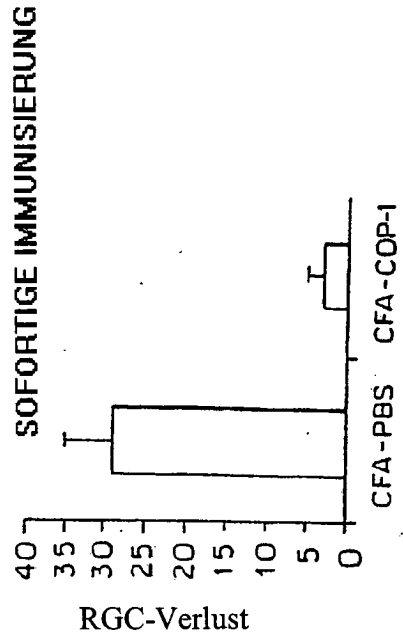


FIG. 11D

