



(19) REPUBLIKA HRVATSKA
DRŽAVNI ZAVOD ZA
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO

(10) Identifikator
dokumenta:



HR P20090568 A2

HR P20090568 A2

(12) PRIJAVA PATENTA

(51) MKP:

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 38/28 (2006.01)

A61K 9/26 (2006.01)

A61K 33/06 (2006.01)

(21) Broj prijave u HR: P20090568A

(22) Datum podnošenja prijave patenta u HR: 26.10.2009.

(43) Datum objave prijave patenta u HR: 30.06.2010.

(86) Broj međunarodne prijave: PCT/US98/25386

Datum podnošenja međunarodne prijave 30.11.1998.

(87) Broj međunarodne objave: WO 99/27944

Datum međunarodne objave 10.06.1999.

(31) Broj prve prijave: 60/067,740
60/080,970

(32) Datum podnošenja prve prijave: 02.12.1997.
07.04.1998.

(33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: US
US

(62) Broj i datum prvobitne prijave u slučaju podjele patenta: P20000443A 30.06.2000.

(71) Podnositelj prijave:

**Elan Pharma International Limited, Monksland, Athlone, County
Westmeath, IE**

(72) Izumitelj:

Dale B. Schenk, 1542 Los Altos Drive, 94010-5941 Burlingame, CA, US

(74) Zastupnik:

Hraste & Partneri odvjetničko društvo, Zagreb, HR

(54) Naziv izuma: **PREVENCIJA I TRETMAN AMILOIDOGENSKE BOLESTI**

(57) Sažetak: Izum daje sastave i postupke za tretiranje amiloidnih bolesti. Ti postupci zahtijevaju davanje sredstava koja pobuđuju imunološki odgovor na amiloidne naslage u pacijenta. Postupci su osobito korisni za profilaktički i terapijski tretman Alzheimerove bolesti. Kod takvih postupaka, pogodno sredstvo je A peptid ili njegova antitijela.

HR P20090568 A2

OPIS IZUMA**Prijave povezane s izumom**

- 5 Ova prijava ima prioritet nad podacima iz USSN 60/067, 740, uvedenim 2. prosinca 1997 i USSN 60/080, 970, od 7. travnja 1998., a ovdje u cijelosti i za svaku potrebu uključenim referencama.

Tehničko područje

- 10 Ovaj izum pripada u tehničko polje imunologije i medicine.

Pozadina izuma

- Alzheimerova bolest (AD) je progresivna bolest koja rezultira senilnom demencijom. Za detaljnije podatke pogledati: Selkoe, TINS 16, 403-409 (1993); Hardy i suradnici, WO 92/13069; Selkoe, J. Neuropathol. Exp. Neurol. 53, 438-447 (1994); Duff i suradnici, Nature 373, 476-477 (1995); Games i suradnici, Nature 373, 523 (1995). Općenito govoreći bolest se dijeli u dvije kategorije: s kasnim naletom, koji se javlja u starijoj dobi (65 i više godina) i s ranim naletom, koji se javlja puno prije perioda senilnosti, tj., između 35 i 60 godina. U oba tipa bolesti patologija je jednaka, no abnormalnosti koje se javljaju u ranijoj dobi su često znatno jače i raširenije. Bolest je karakterizirana s dva tipa oštećenja mozga, senilnim plakovima (pločastim naslagama) i neurofibrilarnim čvorovima (tangles). Senilni plakovi su područja dezorganiziranih neuropila promjera do 150 µm koje dovode do izvan staničnih amiloidnih naslaga koje se mogu uočiti mikroskopskom analizom područja moždanog tkiva. Neurofibrilarni čvorovi su unutar stanične naslage tau proteina koji se sastoje od 2 međusobno obavijena vlakna. Glavni sastojak plakova je peptid naznačen oznakom Aβ ili β-amiloidni peptid. Aβpeptid je unutarnji fragment od 39 do 43 aminokiseline prekursorskog proteina nazvanog amiloidni prekursorski protein (APP). Nekoliko mutacija unutar APP proteina je povezano s prisutnošću Alzheimerove bolesti. Vidjeti na pr. Goate i suradnici, Nature 349, 704 (1991) (valin⁷¹⁷ u izoleucin); Chartier Harlan i suradnici, Nature 353, 844 (1991) (valin⁷¹⁷ u glicin); Murrell i suradnici, Science 254, 97 (1991) (valin⁷¹⁷ u fenilalanin); Mullan i suradnici, Nature Genet. 1, 345 (1992) (dvostruka mutacija kojom se mijenjaju lizin⁵⁹⁵-metionin⁵⁹⁶ u asparagin⁵⁹⁵-leucin⁵⁹⁶). Smatra se da takve mutacije uzrokuju Alzheimerovu bolest, povećavanjem ili mijenjanjem načina prevođenja APP-a u Aβ, a osobito prevođenjem APP-a koje dovodi do porasta količine dugačke forme Aβ(tj., Aβ1-42 i Aβ1-43). Smatra se da mutacije drugih gena, kao što su presenilin geni, PS1 i PS2, posredno utječu na prevođenje APP-a kojom se generira povećana količina dugačke forme Aβ(vidjeti Hardy, TINS 20, 154 (1997)). Ova zapažanja ukazuju da je Aβ, a posebno njegova dugačka forma, uzročni element Alzheimerove bolesti. McMichael, EP 526, 511, je preporučio davanje homeopatskih doza (manje ili jednako 10⁻² mg/dan) Aβ, pacijentima kod kojih je prethodno utvrđen AD. Kod prosječnog čovjeka, s približno 5 litara plazme, može se očekivati da čak i gornja granica te doze neće dati koncentracije veće od 2 pg/ml. Normalna koncentracija Aβu ljudskoj plazmi je obično u rangu od 50 do 200 pg/ml (Seubert i suradnici, Nature 359, 325-327 (1992)). Budući da doza predložena u EP 526,511 vrlo malo mijenja nivo unutarnjeg protoka Aβ, te da EP 526,511 ne preporuča upotrebu pomoćnog sredstva, ne čini se vjerojatnim da će takav tretman rezultirati ikakvom terapijskom koristi. Nasuprot tome, ovaj izum je usmjeren inter alia na tretiranje Alzheimerove i drugih amiloidogenih bolesti, davanjem Aβili drugih imunogena pacijentima, u uvjetima koji mogu generirati povoljan imunološki odgovor kod pacijenta. Ovaj izum stoga ispunjava dugo očekivanu potrebu za terapijskim režimom kojim se sprječava ili poboljšava neuropatologija povezanu s Alzheimerovom bolešću.

Bit izuma

- U jednom aspektu, izum daje postupke prevencije ili tretiranja bolesti karakteriziranih amiloidnim naslagama u pacijenta. Takvi postupci pobuđuju imunološki odgovor na peptidne komponente amiloidnih naslaga u pacijenta. Takvo pobuđivanje može biti aktivno, davanjem imunogena ili pasivno, davanjem antitijela ili aktivnog fragmenta ili derivata antitijela. Kod nekih pacijenata amiloidne naslage su nakupina Aβpeptida, a bolest je Alzheimerova bolest. Kod nekih postupaka pacijenti su asimptomatični. Kod nekih postupaka pacijenti imaju manje od 50 godina. Kod nekih postupaka pacijenti imaju naslijeđen faktor rizika koji ukazuje na osjetljivost prema Alzheimerovoj bolesti. Takvi faktori rizika uključuju promjene alela u presenilin genima PS1 i PS2, te promjene oblika APP-a. Kod drugih postupaka pacijenti ne posjeduju niti jedan poznati faktor rizika povezan s Alzheimerovom bolešću.
- Kod tretiranja pacijenata koji pate od Alzheimerove bolesti, jedan režim tretiranja uključuje davanje pacijentima doze Aβpeptida koja pobuđuje imunološki odgovor. Kod nekih postupaka Aβpeptid se daje uz stipsu kao pomoćno sredstvo. Kod nekih postupaka pomoćno sredstvo je MPL. Uobičajena doza Aβpeptida koja se daje pacijentima je najmanje 1 ili 10 µg u slučajevima kada se daje uz pomoćno sredstvo, a najmanje 50 µg kada se daje bez pomoćnog sredstva. Kod nekih postupaka doza je najmanje 100 µg.

Kod nekih postupaka A β peptid je A β 1-42. Kod nekih postupaka A β peptid se daje u obliku agregata. Kod drugih postupaka A β peptid se daje u disociranom obliku. Kod nekih postupaka terapijsko sredstvo je efektivna doza nukleinske kiseline koja kodira A β ili njegov aktivni dio ili fragment, čime se pobuđuje imunološki odgovor. U nekim takvim postupcima nukleinska kiselina se daje kroz kožu, po volji preko flastera. Kod nekih postupaka terapijsko sredstvo se identificira pretraživanjem baze podataka spojeva da bi se pronašao spoj koji reagira s antitijelima na A β , nakon čega se spoj daje pacijentu da bi pobudio imunološki odgovor.

Kod nekih postupaka, imunološki odgovor je usmjeren prema agregiranom A β peptidu bez usmjerenja k disociranom A β peptidu. Na primjer, imunološki odgovor može obuhvatiti antitijela koja se vežu na agregate A β peptida, a ne vežu se na disocijane A β peptide. Kod nekih postupaka, imunološki odgovor obuhvaća T-stanice koje se vežu na A β u kompleksu s MCH1 ili MCH2 na CD8 ili CD4 stanicama. Kod drugih postupaka, imunološki odgovor je pobuđen davanjem pacijentima antitijela za A β . Kod nekih postupaka imunološki odgovor je pobuđen vađenjem T-stanica iz pacijenta, njihovim dovođenjem u kontakt s A β peptidima, pod uvjetima, u kojima se T stanice aktiviraju, te njihovim ponovnim vraćanjem u pacijenta.

Tipični načini davanja terapijskog sredstva su: oralno, intranazalno, intradermalno, potkožno, intramuskularno, lokalno ili intravenozno. Kod nekih postupaka je pacijent praćen za vrijeme davanja da bi se procijenio imunološki odgovor. Ukoliko je promatranje ukazalo na smanjenje imunološkog odgovora s vremenom, pacijentu se može dati jedna ili više dodatnih doza sredstva.

U drugom aspektu, izum daje farmaceutske sastave koji sadrže A β i inertni nosač pogodan za davanje oralnim ili nekim drugim putem. Izum također daje farmaceutske sastave koji sadrže sredstvo koje je u stanju pobuditi imunogeni odgovor na A β u pacijenta, te farmaceutski prihvatljivo pomoćno sredstvo. Kod nekih takvih sastava, sredstvo je A β ili njegov aktivni fragment. U nekim sastavima, pomoćno sredstvo sadrži stipsu. U nekim sastavima, pomoćno sredstvo je emulzija ulja u vodi. U nekim sastavima, A β ili njegov aktivni fragment je komponenta polilaktidnog poliglikolidnog kopolimera (PLPG) ili druge čestice. Izum pored toga daje sastave koji sadrže A β ili njegov aktivni fragment vezan na konjugiranu molekulu koja pospješuje dostavu A β u krvotok pacijenta i/ili pospješuje imunološki odgovor na A β . Na primjer, konjugat može poslužiti za pospješivanje imunološkog odgovora na A β . U nekim sastavima je konjugat kolera toksin. U nekim sastavima je konjugat imunoglobulin. U nekim sastavima je konjugat oslabljeni toksin difterije CRM 197 (Gupta, Vaccine 15, 1341-3 (1997).

Izum također daje farmaceutske sastave koji obuhvaćaju tvar koja je u stanju pobuditi imunogeni odgovor na A β u pacijenta, uz uvjet da sastav ne sadrži kompletno Freundovo pomoćno sredstvo.

Izum također daje sastave koji sadrže viralni vektor za kodiranje A β ili njegovog aktivnog fragmenta, te je stoga sposoban pobuditi imuni odgovor na A β . Pogodni viralni vektori su: herpes, adenovirus, virus u vezi s adenovirusom, retrovirus, sindbis, Semiliki Forest virus, kravlje boginje ili ptičje boginje.

Izum pored toga daje metode prevencije ili tretiranja Alzheimerove bolesti. Kod takvih metoda se pacijentima daje efektivna doza A β peptida. Izum pored toga daje uz način korištenja A β ili antitijela uz njega, način pravljenja lijekova koji se koriste za prevenciju ili tretiranje Alzheimerove bolesti.

U drugom aspektu, izum daje način procjene efikasnosti postupka tretiranja Alzheimerove bolesti kod pacijenta. U tim postupcima osnovna količina antitijela specifičnih za A β peptid je određena iz uzorka pacijentovog tkiva, prije početka tretiranja sredstvom. Količina antitijela specifičnih za A β peptid u uzorku tkiva pacijenta određena je nakon tretmana sredstvom i uspoređena s količinom antitijela specifičnih za A β peptid iz bazne linije. Znatno veća količina antitijela specifičnih za A β peptid određena nakon tretmana u odnosu na osnovnu količinu antitijela specifičnih za A β peptid ukazuje na pozitivan rezultat.

Kod drugih načina procjene efikasnosti postupka tretiranja Alzheimerove bolesti u pacijenta, osnovna količina antitijela specifičnih za A β peptide u uzorku pacijentovog tkiva određena je prije tretiranja sredstvom. Količina antitijela specifičnih za A β peptide u uzorku tkiva subjekta, određena nakon tretiranja sa sredstvom, je uspoređena s osnovnom količinom antitijela specifičnih za A β peptide. Smanjenje ili nedostatak znatne razlike u količini antitijela specifičnih za A β peptid izmjenjenih nakon tretmana i osnovne količine antitijela specifičnih za A β peptid ukazuje na negativan rezultat tretmana.

Kod drugih načina procjenjivanja efikasnosti postupaka tretiranja Alzheimerove bolesti u pacijenata, kontrolna količina antitijela specifičnih za A β peptid je određena iz uzoraka tkiva kontrolne skupine. Količina antitijela specifičnih za A β peptid dobivena iz uzorka tkiva pacijenta nakon davanja sredstva je uspoređena s kontrolnom količinom antitijela

specifičnih za A β peptid. Ukoliko je količina antitijela, specifičnih za A β peptid, određena nakon navedenog tretmana, značajno veća od kontrolne količine, onda to ukazuje na pozitivan rezultat tretmana.

Kod drugih načina procjenjivanja efikasnosti postupaka tretiranja Alzheimerove bolesti u pacijenata, kontrolna količina antitijela specifičnih za A β peptid je određena iz uzoraka tkiva kontrolne skupine. Količina antitijela specifičnih za A β peptid dobivena iz uzorka tkiva pacijenta nakon davanja sredstva je uspoređena s kontrolnom količinom antitijela specifičnih za A β peptid. Nedostatak značajnije razlike između količine antitijela specifičnih za A β peptid određene nakon početka navedenog tretmana u usporedbi s kontrolnom količinom antitijela specifičnih za A β peptid ukazuje na negativan rezultat tretmana.

Drugi postupci praćenja Alzheimerove bolesti i osjetljivosti pacijenata na nju, obuhvaćaju prepoznavanje imunološkog odgovora na A β peptide iz uzorka pacijenta. Kod nekih takvih postupaka pacijentu je davano sredstvo, djelotvorno u tretiranju ili prevenciji Alzheimerove bolesti, a nivo dobivenog odgovora je odredio daljnji režim tretiranja pacijenta.

Kod drugih načina procjene efikasnosti postupaka tretiranja Alzheimerove bolesti u pacijenata, određivana je vrijednost količine antitijela specifičnih za A β peptid dobivena nakon tretiranja pacijenta sredstvom. Dobivena vrijednost je uspoređena s kontrolnom vrijednošću dobivenom iz populacije pacijenata kod kojih je došlo do poboljšanja ili nestanka simptoma Alzheimerove bolesti, kao rezultat tretmana sredstvom. Veće ili jednake vrijednosti dobivene kod pacijenata u odnosu na kontrolnu vrijednost ukazuju da tretman daje pozitivan odgovor.

Izum pored navedenog daje i dijagnostička sredstva za provedbu ranije navedenih postupaka. Takva sredstva obično uključuju reagens koji se specifično veže na antitijela na A β ili koji stimulira proliferaciju T-stanica reaktivnih s A β .

Kratak opis slika

Slika 1: Titar antitijela dobiven nakon ubrizgavanja A β 1-42 u transgenskog miša.

Slika 2: Amiloidna naslaga u hipokampusu. Postotak površine hipokampalnog područja prekriven amiloidnim slojem, definiranim reaktivnošću s Ab-specifičnim mAb3D6, određen je pomoću računala, kvantitativnom analizom slike područja mozga kod kojih se javila imuna reakcija. Vrijednosti dobivene za pojedine miševе su prikazane raspoređene prema tretiranoj skupini. Horizontalna linija ukazuje na vrijednost medijana dobivenu iz raspodjele svakog pojedinog grupiranja.

Slika 3: Neuritska distrofija u hipokampusu. Postotak površine hipokampusnog područja prekrivenog distrofičnim neuritima, definiranim njihovom reaktivnošću s ljudskim APP-specifičnim mAb8E5, određen je pomoću računala, kvantitativnom analizom slike područja mozga kod kojih se javila imuna reakcija. Vrijednosti dobivene za pojedine miševе su prikazane za tretiranu skupinu AN1792 i za tretiranu kontrolnu skupinu PBS. Horizontalna linija ukazuje na vrijednost medijana dobivenu iz raspodjele svakog pojedinog grupiranja.

Slika 4: Astrocitoza u retrosplenijalnom korteksu. Postotak površine kortikalnog područja prekriven astrocitima pozitivnim na fibrilarne kisele proteine glie (GFAP), određen je pomoću računala, kvantitativnom analizom slike područja mozga kod kojih se javila imunološka reakcija. Vrijednosti dobivene za pojedine miševе su prikazane sortirane prema tretiranoj skupini, a vrijednosti medijana pojedinih skupina su prikazane horizontalnim linijama.

Slika 5: Geometrijska sredina titara antitijela na A β 1-42 dobivenih imunizacijom s osam doza AN1792 od 0,14, 0,4, 1,2, 3,7, 11, 33, 100 ili 300 μ g.

Slika 6: Kinetika reakcije antitijela na AN1792 imunizaciju. Količine su prikazane kao geometrijske sredine vrijednosti dobivenih za 6 životinja iz svake skupine.

Slika 7: Kvantitativna analiza slike kortikalne naslage amiloida u PBS- i AN1792 tretiranim miševima.

Slika 8: Kvantitativna analiza slike neuritskih pločastih naslaga u PBS- i AN1792 tretiranim miševima.

Slika 9: Kvantitativna analiza slike postotka retrosplenijalnog korteksa zauzetog astrocitom u PBS- i AN1792 tretiranim miševima.

Slika 10: Ispitivanje limfocitne proliferacije stanica slezene nakon tretiranja s AN1792 (gornja slika) ili tretiranja s PBS (donja slika).

Slika 11: Ukupni nivo A β u korteksu. Prikaz pojedinih A β profila u miševa imuniziranih s A β ili APP derivatima kombiniranim s Freundovim pomoćnim sredstvom.

Slika 12: Amiloidna naslaga u korteksu je određena kvantitativnom analizom slike područja mozga u kojem se javila imunološka reakcija, kod miševa imuniziranih A β peptidnim konjugatima A β 1-5, A β 1-12 i A β 13-28; agregatima A β pune dužine: AN1792 (A β 1-42) i AN1528 (A β 1-40), te kod kontrolne grupe tretirane PBS-om.

Slika 13: Geometrijska sredina količine A β specifičnih antitijela za skupinu miševa imuniziranih A β ili APP derivatima kombiniranim s Freundovim pomoćnim sredstvom.

Slika 14: Geometrijska sredina količine A β specifičnih antitijela za skupinu zamoraca imuniziranih s AN1792 ili njegovim palmitinskim derivatom, kombiniranim s različitim pomoćnim sredstvima.

Slika 15: Nivo A β u korteksu 12 mjeseci starih PDAPP miševa tretiranih s AN1792 ili AN1528 uz različita pomoćna sredstva.

DEFINICIJE

Pojam "znatna podudarnost" znači da dvije peptidne sekvence kad ih optimalno poravnamo, kao što se može postići primjenom programa GAP ili BESTFIT, uz standardnu statističku težinu odstupanja, dijele najmanje 65 posto podudarnosti sekvence, preferirano 80 ili 90 posto podudarnosti sekvenci, a još više preferirano najmanje 95 posto podudarnosti sekvenci ili više (na pr., 99 posto podudarnosti sekvenci ili više). Razlike preostalih položaja koji nisu identični se najčešće javljaju kao rezultat konzervativnih zamjena aminokiselina.

Za usporedbu sekvenci obično se jedna sekvenca uzima kao referentna sekvenca po kojoj se vrši usporedba ispitivanih sekvenci. Kod upotrebe algoritma za usporedbu sekvenci, ispitivana i referentna sekvenca se unose u računalo, koordinate podsekvenci su označene ukoliko je to nužno, te unosi algoritam s parametrima sekvenci. Nakon toga algoritam za usporedbu sekvenci računa postotak podudarnosti ispitivane sekvence ili sekvenci u odnosu na referentnu sekvenču, zasnovanu na označenim parametrima u programu.

Optimalno poravnanje sekvenci koje se uspoređuju može se provesti, na primjer, algoritmom lokalne homolognosti Smith & Waterman-a, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), algoritmom homolognog poravnanja Needleman & Wunsch-a, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), sličnim postupcima istraživanja Person-a & Lipman-a, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), računalnom primjenom tih algoritama (GAP, BESTFIT, FASTA i TFASTA u Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) ili vizualnom provjerom (vidjeti detalje kod Ausubel i suradnika, gore). Jedan primjer algoritma pogodnog za određivanje postotka sekvencijske podudarnosti i sekvencijske sličnosti je BLAST algoritam, kojeg su opisali Altschul-a i suradnici, J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990). Program kojim se provodi BLAST analiza je javno dostupan u Nacionalnom centru za biotehnoške informacije (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Standardni programski parametri se mogu koristiti za provedbu usporedbe sekvenci, a također se mogu koristiti i posebno podešeni parametri. Za aminokiselinske sekvence standardna upotreba BLASTP programa uključuje duljinu riječi (W) 3, očekivanje (E) 10 i BLOSUM62 aranžiranu matricu (vidjeti Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10915 (1989)).

U svrhu klasificiranja aminokiselinske zamjene kao konzervativne ili nekonzervativne, aminokiseline su grupirane na slijedeći način: Skupina I (lanci s hidrofobnim krajevima): norleucin, met, ala, val, leu, ile; Skupina II (neutralni hidrofilni krajevi lanca): cys, ser, thr; Skupina III (kiseli krajevi lanca): asp, glu; Skupina IV (bazični krajevi lanca): asn, gln, his, lys, arg; Skupina V (završeci utječu na orijentaciju lanca): gly, pro; i Skupina VI (aromatski krajevi lanca): trp, tyr, phe. Kod konzervativne zamjene dolazi do zamjene aminokiselina iz iste skupine. Nekonkonzervativna zamjena uključuje zamjenu člana iz jedne od navedenih skupina s članom druge skupine.

Terapeutska sredstva iz ovog izuma su uobičajeno velike čistoće. To znači da je tipična čistoća sredstva najmanje oko 50% w/w (težina/težina), kao i da su slobodna od ometajućih proteina i nečistoća. Ponekad je čistoća sredstva najmanje 80% w/w, a još je više preferirana čistoća od najmanje 90 ili oko 95% w/w. Međutim, korištenjem uobičajenih tehnika pročišćavanja proteina mogu se postići homogeni peptidi s najmanje 99%-tnim w/w.

Specifično vezanje između dva entiteta označava afinitet od najmanje 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 M $^{-1}$ ili 10^{10} M $^{-1}$. Afiniteti veći od 10^8 M $^{-1}$ su preferirani.

Pojam "antitijelo" se odnosi na nevezana antitijela i njihove vezne fragmente. Obično se ti fragmenti natječu s nevezanim slobodnim antitijelima iz kojih su dobiveni, da bi se specifično vezali za antigen. Stoga se antitijela ili njihovi vezni fragmenti mogu kemijski vezati ili prikazati kao fuzija proteina s drugim proteinima.

APP695, APP751 i APP770 se odnose na polipeptidne lance s 695, 751 i 770 aminokiselinskih ostataka kodiranih pomoću humanog APP gena. Vidjeti Kang i suradnici, *Nature* 331, 525 (1988); i Kitaguchi i suradnici, *Nature* 331, 530 (1988). Aminokiseline unutar humanog amiloidnog prekursorskog proteina (APP) su naznačene brojem prema izoformnoj sekvenci APP770. Termini kao što su A β 39, A β 40, A β 41, A β 42 i A β 43 odnose se na A β peptide koji sadrže aminokiselinske ostatke: 1-39, 1-40, 1-41, 1-42 i 1-43.

Termini "epitop" ili "glavni antigenski faktor" odnose se na dio antigena na koji reagiraju B i/ili T stanice. Epitopi B stanica mogu se formirati od susjednih aminokiselina ili od udaljenijih aminokiselina poredanih u nizu tercijskim presavijanjem proteina. Epitopi formirani od susjednih aminokiselina obično bivaju sačuvani nakon izlaganja denaturirajućem otapalu, dok se epitopi formirani tercijskim presavijanjem obično gube nakon tretmana s denaturirajućim otapalom. Epitopi obično uključuju najmanje 3, a češće, najmanje 5 ili 8 do 10 aminokiselina u jedinstvenoj prostornoj konformaciji. Postupci utvrđivanja prostorne konformacije epitopa uključuju, na pr., kristalografsku analizu rendgenskim zrakama i dvodimenzionalnu nuklearnu magnetsku rezonanciju. Vidjeti, na pr., *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996). Antitijela koja prepoznaju isti epitop mogu se identificirati jednostavnim imunološkim ispitivanjem koje pokazuje sposobnost jednog antitijela da blokira vezanje drugog antitijela za ciljni antigen T stanice, te prepoznaje epitopni niz od približno devet aminokiselina za CD8 stanice ili oko 13 do 15 aminokiselina za CD4 stanice. T stanice koje prepoznaju epitop mogu se identificirati *in vitro* ispitivanjem kojim se mjeri ovisnost proliferacije o antigenu, kao što je: inkorporiranje ³H-timidina pomoću T stanica aktiviranih epitopom (Burke i suradnici, *J. Inf. Dis.* 170, 1110-19 (1994)); o antigenu ovisno uništavanje (citotoksično T limfocitno ispitivanje, Tigges i suradnici, *J. Immunol.* 156, 3901-3910) ili citokina sekrecija.

Termin "imunološki" ili "imuni" odgovor odnosi se na razvoj korisnih humoralnih (posredstvom antitijela) i/ili staničnih (posredstvom za antigen specifičnih T stanica ili njihovih sekrecijskih produkata) odgovora usmjerenih protiv amiloidnih peptida u pacijenta primaoca. Takvi odgovori mogu biti aktivni, pobuđeni davanjem imunogena, ili pasivni, pobuđeni davanjem antitijela ili primarnih T stanica. Stanični imunološki odgovor se javlja dovođenjem polipeptidnih epitopa u asocijaciju s klasa I ili klasa II MHC molekulama koje aktiviraju za antigen specifične CD4+ T pomoćne stanice i/ili CD8+ citotoksične T stanice. Odgovor može također uključivati aktivaciju monocita, makrofaga, NK stanica, basofila, dendritskih stanica, astrocita, mikroglija stanica, eozinofile ili neke druge komponente prirodnog imuniteta. Prisutnost stanično posredovanog imunološkog odgovora može se odrediti ispitivanjem proliferacije (CD4+ T stanice) ili ispitivanjem CTL-a (citotoksični T limfociti) (vidjeti Burke, ranije navedena referenca; Tigges, ranije navedena referenca). Relativni doprinos humoralnog i staničnog odgovora na zaštitni ili terapijski učinak imunogena može se utvrditi razdvojenim izoliranjem IgG i T stanica iz imuniziranih sisavskih životinja, te mjerenjem zaštitnog ili terapijskog učinka kod drugog subjekta.

Nakon davanja pacijentu, "imunogeno sredstvo" ili "imunogen" je sposoban pobuditi imunološki odgovor na sebe samog, a obično povezan zajedno s pomoćnim sredstvom.

Termin "goli polinukleotid" se odnosi na polinukleotide koji nisu kompleksirani s koloidnim materijalima. Goli polinukleotidi se ponekad kloniraju u plazmidnim vektorima.

Termin "pomoćno sredstvo" odnosi se na spoj koji kad ga se daje povezanog s antigenom povećava imunološki odgovor na antigen, ali kad ga se daje samog ne generira imunološki odgovor na antigen. Pomoćna sredstva mogu povećati imunološki odgovor preko nekoliko mehanizama, što uključuje angažiranje limfocita, stimulaciju B i/ili T stanica, te stimulaciju makrofaga.

Termin "pacijent" uključuje ljude i druge sisavce podvrgnute profilaktičkom ili terapijskom tretmanu.

Neagregirani ili monomerni A β se odnosi na topljivu monomernu peptidnu jedinicu A β -a. Jedan postupak dobivanja monomernog A β je otapanje liofiliziranog peptida u DMSO-u uz upotrebu ultrazvučne kupelji. Rezultirajuća otopina je centrifugirana radi uklanjanja netopljivih čestica. Agregirani A β je smjesa oligomera u kojima se monomerne jedinice drže zajedno nekovalentnim vezama.

Sastavi ili postupci "obuhvaćaju" jedan ili više nabrojanih elemenata, a mogu uključivati i druge elemente koji nisu specifično navedeni. Na primjer, sastav koji obuhvaća A β peptide uključuje i izolirani A β peptid i A β peptid kao dio veće polipeptidne sekvence.

Detaljan opis izuma**I. Opći dio**

Izum daje farmaceutske sastave i postupke za profilaktički i terapijski tretman bolesti karakteriziranih nakupljanjem amiloidnih naslaga. Amiloidne naslage obuhvaćaju peptide agregirane u netopljivu masu. Priroda peptida varira kod različitih bolesti, ali u najvećem broju slučajeva agregati imaju strukturu β -nabrane ploče s mrljama Congo crvene boje. Bolesti karakterizirane amiloidnim naslagama uključuju Alzheimerovu bolest (AD), pri čemu su uključeni i kasni i rani nalet. Kod obje bolesti amiloidna naslaga obuhvaća peptid označen s A β koji se nakuplja u mozgu i pogađa pojedince. Primjer nekih drugih bolesti karakteriziranih amiloidnim naslagama su SAA amiloidozis, nasljedni Islandski sindrom, višestruka mieloma, te "spungiformne" encefalopatije, uključujući bolest kravljeg ludila, Creutzfeldt Jakobovu bolest, ovčji "skrapi" i zerdavljeva "spungiformna" encefalopatija (vidjeti Weissmann i suradnici, Curr. Opin. Neurobiol. 7, 695-700 (1997); Smits i suradnici, Veterinary Quarterly 19, 101-105 (1997); Nathanson i suradnici, Am. J. Epidemiol. 145, 959-969 (1997)). Peptidi koji formiraju agregate kod tih bolesti su, za prve tri bolesti serum-amiloid A, cistatin C, IgG kappa mali lanac, dok se za ostale bolesti radi o prionskim proteinima.

II Terapeutska sredstva**1. Alzheimerova bolest**

Terapeutska sredstva koja se koriste u ovom izumu pobuđuju imunološki odgovor na A β peptide. Ta sredstva uključuju sam A β peptid i njegove varijante, analoge i oponašatelje A β peptida, koji uključuju i/ili reakciju s antitijelima na A β peptid i antitijela ili T stanice reaktivne s A β peptidima. Pobuđivanje imunološkog odgovora može biti aktivno kao u slučaju davanja imunogena u svrhu pobuđivanja antitijela ili T stanica reaktivnih s A β pacijenta ili pasivno, kao u slučaju kad se antitijelo daje da bi se vezalo na A β pacijenta.

A β također poznat kao β -amiloidni peptid ili A4 peptid (vidjeti US 4,666,829; Glenner & Wong, Biochem. Biophys. Res. Commun. 120, 1131 (1984)), je peptid od 39-43 aminokiselina, koje čine glavnu komponentu karakterističnih pločastih naslaga kod Alzheimerove bolesti. A β je generiran iz većih proteina APP pomoću dva enzima, nazvanih β i γ sekretaza (vidjeti Hardy, TINS 20, 154 (1997)). Poznate mutacije u APP-u povezane s Alzheimerovom bolešću dešavaju se blizu mjesta djelovanja β i γ sekretaze, ili unutar A β . Na primjer, položaj 717 je blizu položaja cijepanja APP djelovanjem γ -sekretaze tijekom njenog procesiranja u A β položaji 670/671 su blizu mjesta cijepanja djelovanjem β -sekretaze. Vjeruje se da mutacije uzrokuju AD bolest, interakcijom s reakcijama cijepanja koje dovode do formiranja A β čime se povećava količina 42/43 aminokiselinskih oblika iz dobivenog A β .

A β ima neobično svojstvo da može stabilizirati i aktivirati i klasičnu i dopunske kaskade. Osobito, može se vezati na C1q, a krajnje na C3bi. Ta veza pospješuje vezanje na makrofage koje dovodi do aktiviranja B stanica. Pored toga, C3bi dalje puca i nakon toga se veže na CR2 na B stanicama u ovisnosti o T stanicama što dovodi do porasta aktivacije tih stanica do 10000 puta. Tim mehanizmom A β dovodi do generiranja imunološkog odgovora u suvišku tog ili drugih antigena.

Terapeutsko sredstvo koje se koristi u postupcima iz izuma može biti bilo koji prirodni oblik A β peptida, a osobito neki ljudski oblik (tj., A β 39, A β 40, A β 41, A β 42 ili A β 43). Sekvence tih peptida i njihovi odnosi s APP prekursorom su prikazani na slici 1 u radu Hardyja i suradnika, TINS 20, 155-158 (1997)). Na primjer, A β 42 ima sekvencu: H₂N-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala-OH.

A β 41, A β 40 i A β 39 se razlikuju od A β 42 ispuštanjem Ala, Ala-Ile i Ala-Ile-Val u odnosu na C-terminalni kraj. A β 43 se razlikuje od A β 42 po prisutnosti treoninskog ostatka na C-terminusu. Terapeutsko sredstvo može također biti aktivni fragment ili analog prirodnog A β peptida koji sadrži epitop koji pobuđuje sličan zaštitni ili terapijski imunološki odgovor kada ga se daje ljudima. Imunogeni dijelovi obično sadrže sekvence od najmanje 3, 5, 6, 10 ili 20 susjednih aminokiselina iz prirodnog peptida. Imunogeni fragmenti uključuju A β 1-5, 1-6, 1-12, 13-28, 17-28, 25-35, 35-40 i 35-42. Fragmenti s N-terminalne polovice A β su preferirani u nekim postupcima. Analози uključuju alele, specije i pobuđene varijante. Analози se obično razlikuju od peptida koji se javljaju u prirodi u jednom ili nekoliko položaja, često dobivenih konzervativnom supstitucijom. Analози obično pokazuju najmanje 80 ili 90% sekvencijske podudarnosti s prirodnim peptidima. Neki analози također uključuju i aminokiseline kojih nema u prirodi ili modifikacije N ili C terminalnih aminokiselina. Primjeri aminokiselina koje se ne javljaju u prirodi su α -dvostruko supstituirane aminokiseline, N-alkil aminokiseline, mliječna kiselina, 4-hidroksiprolin, γ -karboksiglutarat, ϵ -N,N,N-

trimetilizin, ϵ -N-acetilizin, O-fosfoserin, N-acetilserin, N-formilmetionin, 3-metilhistidin, 5-hidroksilizin, ω -N-metilarginin. Profilaktička ili terapijska efikasnost fragmenata i analoga može se ispitati u transgenskim životinjama kao što je opisano u daljnjem tekstu.

- 5 Aβnjegovi fragmenti, analozi i drugi amiloidogeni peptidi mogu se pripremiti sintezom peptida iz čvrste faze ili rekombinantnom ekspresijom ili se mogu dobiti iz prirodnih izvora. Automatski sintetizatori peptida brojnih dobavljača, kao što je Applied Biosystems, Foster City, California, komercijalno su dostupni. Rekombinantna ekspresija se može provesti u bakteriji kao što je *E. coli*, kvascu, stanicama kukaca ili stanicama sisavaca. Postupci za provedbu rekombinantne ekspresije su opisani od Sambrooka i suradnika, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (C.S.H.P. Press, NY 2d ed., 1989). Neki oblici Aβpeptida su također dostupni komercijalno (na pr., American Peptides Company, Inc., Sunnyvale, CA i California Peptide Research, Inc. Napa, Ca).

15 Terapijska sredstva također obuhvaćaju dulje polipeptide koji uključuju, na primjer, Aβpeptid, aktivni fragment ili analog zajedno s drugim aminokiselinama. Na primjer, Aβpeptid se može predstaviti kao nedirnuti APP protein ili njegov segment, kao što je fragment C-100 koji počinje sa N-terminusom Aβi nastavlja se sve do kraja APP-a. Profilaktička ili terapijska efikasnost takvih polipeptida može se ispitati u životinjskim modelima kao što je opisano u daljnjem tekstu. Aβpeptid, analog, aktivni fragment ili neki drugi polipeptid mogu se davati u asociranom obliku (tj. kao amiloidni peptid) ili u disociranom obliku. Terapijska sredstva također uključuju multimerne monomernih imunogenih sredstava.

20 U daljnjim varijacijama, imunogeni peptid, kao što je Aβmože biti uveden kao virusno ili bakterijsko cjepivo. Nukleinska kiselina koja kodira imunogeni peptid je inkorporirana u genom ili episom virusa ili bakterije. Po volji, nukleinska kiselina je inkorporirana na takav način da se imunogeni peptid javlja kao petid u izlučevinama ili kao protein vezan s vanjskom površinom virusnih proteina ili transmembranskih proteina kod bakterija, tako da je peptid izložen. Virusi ili bakterije koji se koriste kod takvih postupaka morali bi biti nepatogeni ili oslabljeni. Pogodni virusi uključuju adenovirus, HSV, kravlje boginje i pićje boginje. Spajanje imunogenih peptida s HbsAg-om od HBV-a osobito je pogodno. Terapijska sredstva također uključuju peptide i druge spojeve koji nemaju nužno znatnu sličnost aminokiselinske sekvence s Aβali bez obzira na to služe kao oponašatelji Aβi pobuđuju sličan imunološki odgovor. Na primjer, bilo koji od peptida i proteina koji formiraju pokrov s β naborom mogu biti ispitani radi utvrđivanja pogodnosti. Anti-idiotipska antitijela mogu također biti korištena pored monoklonalnih antitijela za Aβili drugih amiloidogenih peptida. Takva anti-Id antitijela oponašaju antigen i generiraju i pobuđuju imunološki odgovor na njega (vidjeti *Essential Immunology* (Roit ed., Blackwell Scientific Publications, Palo Alto, 6th ed.), p. 181).

35 Pogodnost baza podataka (libraries) peptida ili drugih spojeva može se također ispitati. Kombinatorne baze podataka mogu biti proizvedene za mnoge tipove spojeva koji se mogu sintetizirati postepeno korak po korak. Takvi spojevi uključuju polipeptide, beta-oblikovane oponašatelje, polisaharide, fosfolipide, hormone, prostaglandine, steroide, aromatske spojeve, heterocikličke spojeve, benzodiazepine, oligomerne N-supstituirane glicine i oligokarbamate. Velike kombinatorne baze podataka spojeva mogu se konstruirati iz kodiranih sintetskih baza podataka (ESL) postupkom opisanom u Affymax, WO 95/12608, Affymax, WO 93/06121, Columbia University, WO 94/08051, Pharmacoepia, WO 95/35503 i Scripps, WO 95/30642 (ovdje za sve svrhe uključenih referencama). Peptidne baze podataka se također mogu generirati postupkom prikazivanja faga (phage-display). Vidjeti, na primjer, Devlin, WO 91/18980.

45 Pogodnost spojeva iz kombinatorne baze podataka, kao i drugih spojeva, prvotno se ispituje radi utvrđivanja njihovog kapaciteta vezanja na antitijela ili limfocite (B ili T), za koje se zna da su specifični za Aβili druge amiloidogene peptide. Na primjer, prvotna ispitivanja se mogu provesti s poliklonalnim serumima ili monoklonalnim antitijelom na Aβili drugim amiloidogenim peptidom. Spojevi identificirani takvim ispitivanjem se nakon toga dalje analiziraju radi utvrđivanja kapaciteta pobuđivanja antitijela ili reaktivnih limfocita na Aβili druge amiloidogene peptide. Na primjer, višestruko razrjeđivanje seruma se može testirati na pločama za mikrokoličinsko određivanje (microtiter) prevučenim Aβpeptidima, nakon čega se može provesti standardna ELISA u svrhu testiranja reaktivnih antitijela na Aβ. Nakon toga se može testirati profilaktička i terapijska efikasnost spojeva u transgenskim životinjama s predispozicijom prema amiloidogenoj bolesti, kao što je opisano u primjerima. Takve životinje uključuju, na primjer, miševe sa 717 mutacija APP-a, što je opisano u ranije navedenoj referenci Gamesa i suradnika, miševe koji nose Švedsku mutaciju APP-a kao što je opisano u radovima McConlogue-a i suradnika, US 5,612,486 i Hsiao-a i suradnika, *Science* 274, 99 (1996); Staufenbiela i suradnika, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13287-13292 (1997); Sturchler-Pierrat i suradnika, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13287-13292 (1997); Borchelt i suradnika, *Neuron* 19, 939-945 (1997)). Isti pristup, kao što je opisano ranije, može se koristiti kod ispitivanja drugih potencijalnih sredstava kao što su fragmenti Aβanalozi Aβte dulji peptidi koji uključuju Aβ.

Terapeutska sredstva iz ovog izuma također uključuju antitijela koja se specifično vežu s A β . Takva antitijela mogu biti monoklonalna ili poliklonalna. Neka takva antitijela se specifično vežu za agregatnu formu A β a ne vežu se za disociranu formu. Neka se specifično vežu za disociranu formu, a ne vežu se za agregatnu formu. Neki se vežu i za agregirane i za disocirane forme. Dobivanje monoklalnog antitijela koje ne potječe od ljudi, na primjer od miševa ili

5 štakora, može se primjerice provesti imunizacijom životinja s A β . Vidjeti Harlow & Lane, *Antibodies, A laboratory Manual* (CSHP NY, 1988) (za sve potrebe uključen literaturnim navodom). Takvi imunogeni se mogu dobiti iz prirodnih izvora, peptidnom sintezom ili rekombinantnom ekspresijom.

Humanizirane forme mišjih antitijela se mogu generirati povezivanjem CDR područja nehumanih antitijela s ljudskim područjima, koristeći se tehnikom rekombinantne DNA. Vidjeti Queen i suradnici, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 10029-10033 (1989) i WO 90/07861 (za sve potrebe uključenim literaturnim navodom).

Ljudska antitijela se mogu dobiti pomoću postupaka prikazivanja faga (phage-display). Vidjeti, na pr., Dower i suradnici, WO 91/17271; McCafferty i suradnici, WO 92/01047. Kod tih postupaka, dobivene su banke podataka faga u kojima članovi pokazuju različita antitijela na svojoj vanjskoj površini. Antitijela su obično prikazana kao Fv ili Fab fragmenti. Fagi koji su pokazivali antitijela s željenom specifičnošću su izdvojeni povećanjem afiniteta prema A β ili njegovim fragmentima. Ljudska antitijela za A β mogu također biti proizvedena iz transgenskih sisavaca koji ne uključuju ljude, a posjeduju transgen za kodiranje najmanje jednog segmenta humanog imunoglobulina i deaktiviraju endogeni položaj imunoglobulina. Vidjeti, na pr., Lonberg i suradnici, WO93/12227 (1993); Kucherlapati, WO 91/10741 (1991) (svi u cijelosti i za svaku potrebu uključeni literaturnim navodom). Ljudska antitijela se mogu selektirati eksperimentalno, kompetitivnim vezanjem ili, u drugom slučaju, kao osobita mišja antitijela koja posjeduju istu epitopnu specifičnost. Takva antitijela vrlo vjerojatno posjeduju korisna funkcionalna svojstva mišjih antitijela. Ljudska poliklonalna antitijela se mogu također javiti u obliku seruma iz ljudi imuniziranih pomoću imunogenog sredstva. Po volji, takva poliklonalna antitijela se mogu koncentrirati afinitetnim pročišćavanjem pomoću A β ili drugih

15 20 25 amiloidnih peptida kao afinitetnih sredstava.

Ljudska ili humanizirana antitijela se mogu dizajnirati da posjeduju IgG, IgD, IgA i IgE nepromjenljive regije i bilo koji izotip, uključujući IgG1, IgG2, IgG3 i IgG4. Antitijela se mogu javiti kao tetrameri s po dva lagana i dva teška lanca, kao razdvojeni teški lanci, lagani lanci, kao Fab, Fab', F(ab')₂ i Fv, ili kao jednolančana antitijela kod kojih su promjenljiva područja teških i lakih lanaca povezana premostnicom (spacer). Terapeutska sredstva koja se koriste u postupcima iz ovog izuma također uključuju T-stanice koje se vežu na A β peptid. Na primjer, T-stanice se mogu aktivirati protiv A β peptida dovođenjem ljudskog MHC klasa I gena i ljudskog β -2-mikroglobulin gena iz stanične linije kukaca, čime se na površini stanica formira prazni kompleks koji se može vezati za A β peptid. T stanice u kontaktu sa staničnom linijom postaju specifično aktivirane na peptid. Vidjeti Peterson i suradnici, US 5,314,813. Stanične linije kukaca koje daju MHC klasa II antigen mogu na sličan način biti korištene za aktiviranje CD4 T stanica.

30 35

2. Druge bolesti

Isti ili analogni principi određuju proizvodnju terapeutskih sredstava koja se koriste za tretiranje drugih amiloidogenih bolesti. Općenito, ranije navedena sredstva za tretiranje Alzheimerove bolesti mogu se također koristiti za tretiranje ranijeg naleta Alzheimerove bolesti povezane s Downovim sindromom. Kod bolesti kravljeg ludila, prionski peptidi, aktivni fragmenti i analozi i antitijela za prionske peptide se koriste umjesto A β peptida, aktivnih fragmenata, analoga i antitijela za A β peptid u tretiranju Alzheimerove bolesti. Kod tretiranja multiple mielome korišteni su IgG lagani lanci i analozi, te antitijela uz njih, a isto tako i kod drugih bolesti.

40 45

3. Proteinski nosači

Neka sredstva za pobuđivanje imunološke reakcije sadrže odgovarajuće epitope koji pobuđuju imunološki odgovor na amiloidne naslage, ali su previše mali da bi bili imunogeni. Kod takve situacije peptidni imunogen se može vezati na odgovarajući nosač koji pomaže u pojavljivanju imunološkog odgovora. Odgovarajući nosači uključuju albuminski (proteinski) serum, "keyhole limpet" hemocianin, imunoglobulinske molekule, tiroglobulin, ovalbumin, toksoid tetanusa ili toksoid drugih patogenih bakterija kao što su: difterija, *E. coli*, kolera ili *H. pylori*, ili oslabljeni derivati toksina. Drugi nosači za stimuliranje ili pojačavanje imunološkog odgovora uključuju citokine kao što su: IL-1, IL-1 α i β peptidi, IL-2, γ INF, IL-10, GM-CSF i kemokine kao što su MIP1 α i β i RANTES. Imunogenska sredstva se također mogu vezati za peptide koji pospešuju prijenos kroz tkiva, kao što je opisao O'Mahony, WO 97/17613 i WO 97/17614.

50 55

Imunogenska sredstva se mogu vezati za nosač kemijskim vezama. Tehnike vezanje imunogena za nosač uključuju formiranje disulfidnih veza pomoću N-sukcinimidil-3-(2-piridil-tio)-propionata (SPDP) i sukcinimidilnog 4-(N-maleimidometil)cikloheksan-1-karboksilata (SMCC) (ako peptidu nedostaje sulfhidrilna skupina, može je se dovesti dodatkom cisteinskog ostatka). Ti reagensi stvaraju disulfidne veze između sebe i peptidnog cisteinskog ostatka na

60

jednom proteinu, te amidnu vezu preko ε -amino skupine na lizinu ili preko drugih slobodnih amino skupina kod drugih aminokiselina. Vrste takvih sredstava, koja tvore disulfid/amidne veze su opisane u Immun. Rev. 62, 185 (1982). Druga bifunkcionalna sredstva spajanja formiraju umjesto disulfidne veze, tioetersku vezu. Mnoga od tih sredstava za formiranje tioeterskih veza su komercijalno dostupna i uključuju reaktivne estere 6-maleimidoheksan kiseline, 2-bromoctene kiseline i 2-jodoctene kiseline, te 4-(N-maleimido-metil)cikloheksan-1-karboksilne kiseline. Karboksilne skupine se mogu aktivirati kombiniranjem sa sukcinimidom ili natrijevom solju 1-hidroksil-2-nitro-4-sulfonske kiseline.

Imunogeni peptidi mogu također biti proteini spajanja s nosačem. Imunogeni peptid se može vezati za nosač preko terminalne amino skupine, terminalne karboksilne skupine ili interno. Po volji, višestruka ponavljanja imunogenog peptida mogu biti prisutna u proteinu spajanja.

4. Nukleinska kiselina koja kodira imunogene

Imunološki odgovor na amiloidne naslage može također biti pobuđen davanjem nukleinskih kiselina koje kodiraju A β peptid ili druge peptidne imunogene. Takve nukleinske kiseline mogu biti DNA ili RNA. Segment nukleinske kiseline koji kodira imunogen je obično vezan za elemente regulacije, kao što su promotori i pojačivači, koji dozvoljavaju ekspresiju DNA segmenata u određenim ciljnim stanicama pacijenta. Za ekspresiju u krvnim stanicama, što je poželjno za pobuđivanje imunološkog odgovora, promotorski i pojačivački elementi iz gena lakih ili teških imunoglobulinskih lanaca ili glavnog međuprodukta CMV-a, rani promotori i pojačivači su pogodni za usmjerenje ekspresije. Vezani elementi reguliranja i kodne sekvence se često kloniraju u vektoru.

Raspoloživi su brojni viralni vektorski sustavi, uključujući retroviralne sustave (vidjeti, na pr., Lawrie i Tumin, Cur. Opin. Genet. Develop. 3, 102-109 (1993)); adenoviralne vektore (vidjeti, na pr., Bett i suradnici, J. Virol. 67, 5911 (1993)); adeno-vezane virusne vektore (vidjeti, na pr., Zhou i suradnici, J. Exp. Med. 179, 1867 (1994)), viralne vektore iz porodice boginja uključujući i virus kravljih boginja i viruse ptičjih boginja, viralne vektore iz alfa virusnog genusa kao što su oni dobiveni iz Sindibis i Semliki Forest virusa (vidjeti, na pr., Dubensky i suradnici, J. Virol. 70, 508-519 (1996)), i papilomaviruse (Ohe i suradnici, Human Gene Therapy 6, 325-333 (1995)); Woo i suradnici, WO 94/12629 i Xiao & Brandsma, Nucleic Acids. Res. 24, 2630-2622 (1996)).

DNA koja kodira imunogen, ili vektor koji ga sadržava, može biti sadržana u liposomima. Pogodni lipidi i njihovi analozi su opisani u US 5,208,036, 5,264,618, 5,279,833 i 5,283,185. Vektori i DNA koji kodiraju imunogen mogu također biti adsorbirani ili povezani s odgovarajućim nosačima, primjeri kojih uključuju polimetil-metakrilatne polimere i polilaktide, te poli(laktide-ko-glikolide), vidjeti, na pr., McGee i suradnici, J. Micro Encap. (1996).

Vektori genske terapije ili sama DNA mogu se dostavljati *in vivo*, davanjem pojedinim pacijentima, obično sustavnim davanjem (na pr., intravenozno, intraperitonealno, nazalno, gastrično, intradermalno, intramuskularno, subdermalno ili intrakranijalnom infuzijom) ili lokalnom primjenom (vidjeti na pr., US 5,399,346). DNA se također može davati pomoću genskog pištolja. Vidjeti ranije navedeni literaturni navod od Xiao & Brandsme. DNA koja dekodira imunogen je istaložena na površinu mikroskopskih metalnih kuglica. Mikroprojektili su ubrzani udarnim valom ili nadirućim plinom helijem i penetriraju u tkiva do dubine od nekoliko staničnih slojeva. Za to je pogodan, na primjer, "The Accel TM Gene Delivery Device" koji je proizveo Agacetus, Inc. Middleton WI. Drugi način kojim DNA može proći kroz kožu do krvotoka je jednostavnim nanošenjem DNA na kožu uz kemijsku ili mehaničku iritaciju (vidjeti WO 95/05853).

U daljnjim varijacijama, vektori koji kodiraju imunogene se mogu dostavljati do stanica *ex vivo*, kao stanice eksplantirane od individualnog pacijenta (na pr., limfociti, aspirirane koštane moždine, biopsija tkiva) ili univerzalnog davatelja hematopojetičkih matičnih stanica, što je praćeno reimplantacijom stanica u pacijenta, obično nakon selektiranja stanica koje imaju inkorporiran vektor.

III. Pacijenti podložni tretmanu

Pacijenti podložni tretmanu uključuju pojedince s rizikom od oboljenja, ali bez posjedovanja simptoma, kao i pacijente koji su počeli pokazivati simptome. U slučaju Alzheimerove bolesti praktično svatko je u rizičnoj skupini za oboljenje ako dovoljno dugo živi. Stoga se prezentirani postupci mogu primjenjivati profilaktički na cijeloj populaciji, bez procjene rizičnosti za pojedinog pacijenta. Prezentirani postupci su posebno korisni za pojedince za koje je poznato da posjeduju genetsku sklonost za dobivanje Alzheimerove bolesti. Takvi pojedinci uključuju one koji posjeduju rođake koji su imali tu bolest, te one kod kojih je rizik određen pomoću genetskih ili biokemijskih markera. Genetski markeri rizika za dobivanje Alzheimerove bolesti uključuju mutacije na APP genu, osobito mutaciju na položaju 717 poznatu kao Hardyeva mutacija, te mutaciju na položajima 670 i 671 poznatu kao Swedish mutacija (vidjeti Hardy, TINS, literaturni navod od ranije). Drugi markeri rizika su mutacije presenilin gena, PS1 i PS2, i ApoE4, porodična povijest

AD-a, hiperkolesterolemia ili ateroskleroza. Pojedinci koji pate od Alzheimerove bolesti mogu se prepoznati po karakterističnoj demenciji, kao i po prisutnosti faktora rizika opisanih ranije. Pored toga, raspoloživi su brojni dijagnostički testovi za prepoznavanje pojedinaca koji imaju AD. To uključuje mjerenje CSF tau i A β 42 nivoa. Povišeni tau i smanjeni A β 42 nivo naznačuju prisustvo AD-a. Pojedinci koji pate od Alzheimerove bolesti mogu također biti dijagnosticirani pomoću MMSE ili ADRDA kriterija, kao što je raspravljeno u dijelu teksta s primjerima.

Kod asimptomatičnih pacijenata tretman može početi u bilo kojoj dobi (na pr., 10, 20, 30). Obično, međutim, nije potrebno početi tretman sve dok pacijent ne dosegne 40, 50, 60 ili 70 godina. Tretman obično zahtjeva primanje višestrukih doza tijekom određenog vremenskog perioda. Tretman se može pratiti procjenjivanjem odgovora na terapijsko sredstvo, koji antitijela ili aktivirane T-stanice ili B-stanice pružaju tijekom vremena. Ukoliko odgovor izostane, indicira se pojačana doza. U slučaju pacijenta s potencijalnim Downovim sindromom, tretman počinje prije rođenja, davanjem terapijskog sredstva majci, ili u kratkom vremenu nakon rođenja.

IV Režimi tretiranja

Kod profilaktičkih primjena, farmaceutski sastavi ili lijekovi se daju pacijentu, koji je osjetljiv ili posjeduje rizik od dobivanja određene bolesti, u količini dovoljnoj da bi eliminirala ili smanjila rizik ili odložila nalet bolesti. Kod terapijskih primjena, sastavi ili lijekovi se daju pacijentu, za kojeg se sumnja ili koji već pati od takve bolesti, u količini dostatnoj da bi izliječila ili barem djelomično primirila simptome bolesti i komplikacije povezane s njima. Adekvatna količina za postizanje tog cilja se definira kao terapijski ili farmaceutski efektivna doza. I kod profilaktičkih i kod terapijskih režima sredstva se obično daju u nekoliko doza sve dok se ne postigne dovoljan imunološki odgovor. Imunološki odgovor se obično prati, te se u slučaju kad imunološki odgovor slabi ponavlja davanje doza.

Efektivne doze sastava iz ovog izuma za tretiranje već opisanih stanja variraju ovisno o velikom broju različitih faktora, što uključuje način davanja, ciljno mjesto, fiziološko stanje pacijenta, je li pacijent čovjek ili životinja, jesu li davani drugi lijekovi, te da li je tretman profilaktički ili terapijski. Obično je pacijent čovjek, ali kod nekih bolesti, kao što je bolest kraljevskog ludila, pacijent može biti neki drugi sisavac kao što je govedo. Doze u tretmanu moraju biti kvantitativno određene radi postizanja maksimalne sigurnosti i efikasnosti. Količina imunogena ovisi o tome je li uz njega dano i pomoćno sredstvo, pri čemu odsutnost pomoćnog sredstva zahtijeva davanje većih doza. Količina imunogena koja se daje varira, kod davanja čovjeku, od 1 μ g do 500 μ g po pacijentu, a češće od 5 do 500 μ g po ubrizgavanju. Povremeno se koriste veće doze od 1 do 2 mg po ubrizgavanju. Tipične količine koje se koriste kod pojedinog davanja injekcije čovjeku su: 10, 20, 50 ili 100 μ g. Periodi davanja injekcije mogu znatno varirati, od jednom na dan, jednom na godinu, do jednom u dekadi. Na svaki dan, u kojem je doza imunogena davana, iznos doze je, u slučaju kad je dodano i pomoćno sredstvo, veći od 1 μ g/pacijent, a obično je veći od 10 μ g/pacijent. Kad pomoćno sredstvo nije dodano doze su veće od 10 μ g/pacijent, a obično su veće od 100 μ g/pacijent. Tipični režim se sastoji od imunizacije praćene s ubrizgavanjem dodatnih doza tijekom 6 tjednih intervala. Drugi režim se sastoji od imunizacije praćene s ubrizgavanjem dodatnih doza 1, 2 i 12 mjeseci kasnije. Drugi režim zahtijeva ubrizgavanje doze svaka dva mjeseca tijekom cijelog života. Alternativni režim predviđa neregularno ubrizgavanje dodatnih doza, indiciranih na osnovi promatranja imunološkog odgovora. Kod pasivne imunizacije antitijelima, doze variraju od približno 0,0001 do 100 mg/kg, a puno češće od 0,01 do 5 mg/kg u odnosu na težinu tijela domaćina. Doze nukleinskih kiselina koje kodiraju imunogene kreću se od približno 10 ng do 1 g, 100 ng do 100 mg, 1 μ g do 10 mg, ili 30 do 300 μ g DNA po pacijentu. Doze potrebne za infekciju viralnim vektorima variraju od 10 do 10⁹ ili više viriona po dozi. Sredstva za pobuđivanje imunološkog odgovora kod profilaktičkog i/ili terapijskog tretmana se mogu davati parenteralno, lokalno, intravenozno, oralno, podkožno, intraperitonealno, intranazalno, ili intramuskularno. Najuočajaniji način davanja je potkožno, premda i drugi načini mogu biti podjednako efikasni. Slijedeći najčešći način davanja je intramuskularno ubrizgavanje. Ubrizgavanje tog tipa se najčešće provodi davanjem injekcije u ručne ili nožne mišiće. Intravenozno ubrizgavanje kao i intraperitonealno, intraarterialno, intrakranijalno ili intradermalno ubrizgavanje je također efikasno u postizanju imunološkog odgovora. Kod nekih postupaka sredstva se ubrizgavaju direktno u određeno tkivo u kojem se nakupljaju naslage.

Sredstva iz ovog izuma mogu se po volji davati u kombinaciji s drugim sredstvima koja su barem djelomično efikasna u tretiranju amiloidogenih bolesti. U slučaju Alzheimerove bolesti i Downovog sindroma, kod kojih se amiloidne naslage javljaju u mozgu, sredstva iz izuma se također mogu davati zajedno s drugim sredstvima koja povećavaju prijenos sredstava iz izuma kroz barijeru krv-mozak.

Imunogenska sredstva iz izuma, kao što su peptidi ponekad se daju u kombinaciji s pomoćnim sredstvom. Različita pomoćna sredstva se mogu koristiti u kombinaciji s peptidom, kao što je A β da bi pobudila imunološki odgovor. Preferirana pomoćna sredstva povećavaju intrinzični odgovor na imunogen, a da pri tome ne uzrokuju konformacijske promjene u imunogenu koje bi utjecale na kvalitativni oblik odgovora. Preferirana pomoćna sredstva uključuju "alum",

3 De-O-acilirani monofosforil lipid A (MPL) (vidjeti GB 2220211). QS21 je triterpensi glikozid ili saponin izoliran iz kore drveta *Quillaja Saponaria Molina* nađenog u Južnoj Americi (vidjeti Kensil i suradnici, in *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); US Patent No. 5,057,540). Druga pomoćna sredstva su emulzije ulja u vodi (kao što je skvalen ili ulje od kikirikija), po volji u kombinaciji s imunološkim stimulansima, kao što je monofosforil lipid A (vidjeti Stoute i suradnici, *N. Engl. J. Med.* 336, 86-91 (1997)). Drugo pomoćno sredstvo je CpG (Bioworld Today, Nov. 15, 1998). Alternativno, Aβse može vezati na pomoćno sredstvo. Na primjer, lipopeptidna verzija Aβse može prirediti direktnim spajanjem palmitinske kiseline ili drugih lipida na N-terminusu od Aβ kao što je opisano kod cijepjenja na antigen hepatitisa B (Livingston, *J. Immunol.* 159, 1383-1392 (1997)). Međutim, takvo spajanje ne bi smjelo bitno promijeniti konformaciju Aβ jer bi time utjecalo na prirodu imunološkog odgovora. Pomoćna sredstva se mogu davati kao dio terapijskog sastava zajedno s aktivnim sredstvom ili se mogu davati odvojeno, prije, zajedno ili nakon davanja terapijskog sredstva.

Preferirana klasa pomoćnih sredstava su aluminijeve soli (alum), kao što su aluminijev hidroksid, aluminijev fosfat i aluminijev sulfat. Takva pomoćna sredstva se mogu koristiti sa ili bez drugih specifičnih imunostimulativnih sredstava kao što su MPL ili 3-DMP, QS21, polimerne ili monomerne aminokiseline kao što je poliglutaminska kiselina ili polilizin. Drugu klasu pomoćnih sredstava čine formulacije emulzija ulja u vodi. Takva pomoćna sredstva se mogu koristiti sa ili bez drugih specifičnih imunostimulativnih sredstava kao što su muramil peptidi (na pr., N-acilmuramil-1-treonil-D-izoglutamin (thr-MDP), N-acilmuramil-1-treonil-D-izoglutamin (nor-MDP), N-acil-normuramil-1-alanil-D-izoglutaminil-1-alanil-2-(1'-2' dipalmitoil-sn-glicerol-3-hidroksifosforiloksi)-etilamin (MTP-PE), N-acetilgluksaminil-N-acilmuramil-1-Al-D-izoglu-1-Ala-dipalmitoksi propilamid (DTP-DPP) teramidTM), ili druge komponente stanične stijenke bakterija. Emulzije ulja u vodi uključuju (a) MF59 (WO 90/14837), koji sadrži 5% skvalena, 0,5% Tween 80 i 0,5% Span 85 (po volji sadrži različite količine MTP-PE-a) u submikronskim česticama, unesenih u pravilnim omjerima pomoću mikrofluidizatora kao što je mikrofluidizator model 110Y (Microfluidics, Newton MA), (b) SAF, koji sadrži 10% skvalen, 0,4% "Tween 80", 5% pluronik-blokirani polimer L121 i thr-MDP, bilo mikrofluidizirane u submikronsku emulziju ili vrtložene da bi dale emulziju s velikim česticama, te (c) RibiTM pomoćno sredstvo sustav (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) s 2% skvalena, 0,2% Tween 80 i jednom ili više komponenti bakterijske stanične stijenke iz grupe koja sadrži monofosforilipid A (MPL), trehalozu dimikolat (TDM), kostur stanične stijenke (CWS), a preferirano MPL + CWS (DetoxTM). Druga klasa preferiranih pomoćnih sredstava su saponinska pomoćna sredstva kao što je StimulonTM (QS21, Aquila, Worcester, MA) ili čestice generirane od njih kao što su ISCOM (imunostimulacijski kompleksi) i ISCOMATRIX. Druga pomoćna sredstva uključuju kompletno Freundovo pomoćno sredstvo (CFA) i nekompletno Freundovo pomoćno sredstvo (IFA). Druga pomoćna sredstva uključuju citokine kao što su interleukini (IL-1, IL-2 i IL-12), faktor stimulacije kolonije makrofaga (M-CSF), faktor tumorske nekroze (TNF).

Pomoćna sredstva se mogu davati zajedno s imunogenom kao jedan sastav, ili se mogu davati prije, u isto vrijeme ili nakon davanja imunogena. Imunogen i pomoćno sredstvo se mogu pakirati i dostavljati u istim bočicama ili se mogu pakirati u odvojene bočice i pomiješati prije primjene. Imunogen i pomoćno sredstvo se obično pakiraju zajedno s uputstvom koje pokazuje način terapijske primjene. Ako su imunogen i pomoćno sredstvo pakirani odvojeno, paket obično sadrži i upute za miješanje prije upotrebe. Izbor pomoćnog sredstva i/ili nosača ovisi o stabilnosti cjepiva koje sadrži pomoćno sredstvo, načinu davanja, rasporedu doziranja, efikasnosti djelovanja pomoćnog sredstva na vrstu koja je cijepljena, a kod ljudi, farmaceutski prihvatljivo pomoćno sredstvo je ono, koje su relevantna regulacijska tijela odobrila ili ga mogu odobriti za davanje ljudima. Na primjer, kompletna Freundova pomoćna sredstva nisu pogodna za davanje ljudima. Alum, MPL i QS21 su preferirani. Po volji, dva ili više različitih pomoćnih sredstava mogu biti korištena simultano. Preferirane kombinacije uključuju alum i MPL, alum i QS21, MPL i QS21, te alum, QS21 i MPL zajedno. Također se mogu koristiti nekompletna Freundova pomoćna sredstva (Chang i suradnici, *Advanced Drug Delivery Reviews* 32, 173-186 (1998)), po volji u kombinaciji s bilo kojim pomoćnim sredstvom od alum-a, QS21 i MPL-a, te u svim njihovim kombinacijama.

Sredstva iz izuma su često davana kao farmaceutski sastavi koji sadrže aktivno terapijsko sredstvo i mnoštvo drugih farmaceutski prihvatljivih komponenta. Vidjeti Remington's Pharmaceutical Science (15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1980). Preferirani oblik zavisi od namjeravanog načina davanja i terapijske primjene. Sastavi mogu također uključivati, ovisno o željenoj formulaciji, farmaceutski prihvatljive netoksične nosače ili razrjeđivače, koji se obično koriste kao prenosnici u svrhu formuliranja farmaceutskih sastava namijenjenih davanju ljudima ili životinjama. Odabiru se takvi razrjeđivači koji neće utjecati na biološku aktivnost smjese. Primjeri takvih razrjeđivača su: destilirana voda, fiziološki fosfatno puferirana slana voda, Ringerove otopine, otopina dekstroze i Hankova otopina. Pored toga, farmaceutski sastavi ili formulacije mogu također uključiti druge nosače, pomoćna sredstva ili netoksične, neterapeutske, neimunogene stabilizatore i tome slično. Međutim, neki reagensi pogodni za davanje životinjama, kao što je kompletno Freundovo pomoćno sredstvo, obično nisu uključeni u sastave za ljudsku upotrebu.

Farmaceutski sastavi mogu također uključivati velike sporo probavljive makromolekule kao što su proteini, polisaharidi, polilaktinske kiseline, poliglikolne kiseline i kopolimeri (kao što su lateks funkcionalizirana sefaroza, agaroza, celuloza i tome slično), polimerne aminokiseline, aminokiselinski kopolimeri i lipidni agregati (kao što su uljne kapljice ili liposomi). Pored toga, ti nosači mogu funkcionirati kao imunostimulacijska sredstva (tj. pomoćna sredstva).

Kod parenteralnog davanja, sredstva iz izuma mogu se davati u dozama dozvoljenim za ubrizgavanje, kao otopine ili suspenzije tvari u fiziološki prihvatljivom razrjeđivaču s farmaceutskim nosačima koji mogu biti sterilne otopine kao što su vodena ulja, slana voda, glicerol ili etanol. Pored toga, dodatne tvari, kao što su sredstva za ovlaživanje i emulgiranje, površinski aktivne tvari, pH puferi i tome slične tvari mogu biti prisutne u sastavima. Druge komponente farmaceutskih sastava su od petroleja, životinja, jestivog bilja, ili sintetskog porijekla, na primjer, ulje od kikirikija, sojino ulje i mineralno ulje. Općenito su glikoli, kao što su propilen glikol ili polietilen glikol, preferirani tekući nosači, osobito kod otopina koje se daju pomoću injekcije.

Obično se sastavi priređuju tako da ih se može davati injekcijom, kao tekuće otopine ili suspenzije; također se mogu prirediti kao kruti oblici pogodni za uvođenje u otopinu, u suspenziju ili tekuće prenosnike prije ubrizgavanja. Preparat može također biti preveden u emulziju ili zatvoren u liposome ili mikro čestice kao što su poliacetid, poliglikolid ili kopolimeri za pojačavanje djelovanja pomoćnog sredstva, o čemu je raspravljano ranije (vidjeti Langer, Science 249, 1527 (1990) i Hanes, Advanced Drug Delivery Reviews 28, 97-119 (1997)). Sredstva iz ovog izuma se mogu davati u obliku injekcije ili implantata koji može biti formuliran na način koji omogućava neprekidno ili pulsirajuće oslobađanje aktivnog sastojka.

Dodatne formulacije pogodne za druge načine davanja uključuju oralne, intranazalne, plućne formulacije, supozitorije i za transdermalnu primjenu.

Kod supozitorija, veziva i nosači uključuju, na primjer, polialkilen glikole ili trigliceride; takvi supozitoriji se mogu formirati iz smjese koje sadrže aktivni sastojak u omjeru od 0,5% do 10%, a preferirano od 1% do 2%. Oralne formulacije uključuju nosače kao što su farmaceutski čisti manitol, laktoza, škrob, magnezijev stearat, natrijev saharin, celuloza i magnezijev karbonat. Takvi sastavi uzimaju oblik: otopina, suspenzija, tableta, pilula, kapsula, formulacija za kontinuirano otpuštanje ili praška i sadrže od 10% do 95% aktivnog sastojka, a preferirano 25% do 70%.

Lokalna primjena može rezultirati u transdermalnoj ili intradermalnoj dostavi. Lokalno davanje se može olakšati usporednim davanjem sredstava s kolera toksinom ili detoksificiranim derivatima ili njihovim podjedinicama ili drugim sličnim bakterijskim toksinima (vidjeti Glenn i suradnici, Nature 391, 851 (1998)). Usporedno davanje se može postići korištenjem smjese komponenata ili povezanih molekula dobivenih kemijskim povezivanjem ili ekspresijom u fuzioni protein.

Alternativno, transdermalna dostava se može postići preko kože ili korištenjem transferosoma (Paul i suradnici, Eur. J. Immunol. 25, 3521-24 (1995); Cevec i suradnici, Biochem. Biophys. Acta 1368, 201-15 (1998)).

V. Postupci dijagnoze

Izum daje postupke detektiranja imunološkog odgovora na A β peptid u pacijenata koji pate od osjetljivosti na Alzheimerovu bolest. Postupci su osobito korisni za praćenje smjera kojim ide tretman primjenjen na pacijenta. Postupci se mogu koristiti za praćenje i terapijskih tretmana kod simptomatičnih pacijenata i profilaktičkog tretmana kod asimptomatičnih pacijenata.

Neki postupci zahtijevaju određivanje vrijednosti bazne linije imunološkog odgovora u pacijenta prije davanja doze sredstva, te njenim uspoređivanjem s vrijednošću imunološkog odgovora dobivenom nakon tretmana. Znatni porast (tj., veći od tipične granice eksperimentalne pogreške u ponovljenim mjerenjima istog uzorka, prikazan kao standardna devijacija od srednje vrijednosti takvih mjerenja) vrijednosti imunološkog odgovora ukazuje na pozitivan rezultat tretmana (tj., da je davanje sredstva postiglo ili pojačalo imunološki odgovor). Ako se vrijednost imunološkog odgovora ne mijenja znatno, ili smanjuje, to ukazuje na negativan rezultat tretmana. Općenito, očekuje se da će pacijenti podvrgnuti početnoj kurti liječenja terapijskim sredstvima pokazati povećanje imunološkog odgovora s povećanjem davanja doza, što eventualno dostiže plato. Davanje sredstava se općenito nastavlja sve dok imunološki odgovor raste. Postizanje platoa pokazuje da se primjena tretmana može prekinuti ili reducirati u doziranju ili frekvenciji.

Kod drugih postupaka, kontrolna vrijednost (tj., srednja vrijednost i standardna devijacija) imunološkog odgovora se određuje za kontrolnu populaciju. Individue iz kontrolne populacije obično nisu prethodno bile podvrgnute tretmanu. Mjerene vrijednosti imunološkog odgovora, dobivene kod pacijenta nakon davanja terapijskog sredstva, se potom uspoređuju s kontrolnom vrijednošću. Znatni porast u odnosu na kontrolnu vrijednost (na pr., veći od standardne

devijacije u odnosu na srednju vrijednost) signala, ukazuje na pozitivan rezultat tretmana. Izostanak znatnijeg porasta ili smanjenje ukazuje na negativan rezultat tretmana. Davanje terapijskih sredstava se općenito nastavlja sve dok imunološki odgovor raste u odnosu na kontrolnu vrijednost. Kao i ranije, postizanje platoa u odnosu na kontrolnu vrijednost ukazuje da primjena tretmana može biti prekinuta ili reducirana u doziranju ili frekvenciji.

Kod drugih postupaka, kontrolna vrijednost imunološkog odgovora (na pr., srednja vrijednost i standardna devijacija) je određena iz kontrolne populacije pojedinaca koji su bili podvrgnuti tretmanu s terapijskim sredstvom i čiji imunološki odgovor je dosegao plato u odnosu na tretman. Mjerene vrijednosti imunološkog odgovora u pacijenta su uspoređene s kontrolnom vrijednošću. Ako se nivo izmjeren kod pacijenta ne razlikuje znatno (na pr., više od jedne standardne devijacije) od kontrolne vrijednosti, tretman se može prekinuti. Ako je nivo dobiven kod pacijenta znatno ispod kontrolne vrijednosti, kontinuirano davanje sredstva je opravdano. Ako nivo, dobiven kod pacijenta, ostaje ispod kontrolne vrijednosti, potrebno je promijeniti režim tretiranja, na primjer, upotreba drugog pomoćnog sredstva može biti indicirana.

Kod drugih postupaka, promatra se imunološki odgovor kod pacijenta koji nije do sada primao tretman, ali je bio podvrgnut ranijim kurama liječenja, da bi se utvrdilo da li je potrebno ponavljanje tretmana. Mjerena vrijednost imunološkog odgovora u pacijenta se može usporediti s ranije postignutom vrijednošću imunološkog odgovora u pacijenta, dobivenom nakon prijašnje kure liječenja. Znatno smanjenje u odnosu na prijašnje mjerenje (tj., veće od tipičnih granica pogreške dobivene kod ponavljanog mjerenja istog uzorka) je pokazatelj da se tretman može nastaviti. U drugom slučaju, vrijednost izmjerena kod pacijenta se može usporediti s kontrolnom vrijednošću (srednja vrijednost plus standardna devijacija) određenom iz populacije pacijenata nakon podvrgavanja kure liječenja. U drugom slučaju, vrijednost izmjerena kod pacijenta se može usporediti s kontrolnom vrijednošću iz populacije profilaktički tretiranih pacijenata koji su ostali bez simptoma bolesti, ili iz populacije terapijski tretiranih pacijenata koji su pokazali poboljšanje stanja bolesti. Kod svih tih slučajeva, znatno smanjenje u odnosu na kontrolni nivo (tj., veće od standardne devijacije) ukazuje na to da se treba nastaviti s tretmanom pacijenta.

Uzorci tkiva za analizu su obično krv, plazma, serum, sluz ili cerebralna spinalna tekućina iz pacijenta. Uzorak se analizira radi indiciranja imunološkog odgovora na bilo koji oblik A β peptida, a obično na A β 42. Imunološki odgovor se može utvrditi iz prisustva, na pr., antitijela ili T-stanica koje se specifično vežu na A β peptide. ELISA postupci detektiranja antitijela specifičnih za A β su opisani u primjerima. Postupci detektiranja reaktivnih T-stanica su bili opisani ranije (vidjeti definicije).

Izum dalje daje dijagnostički alat za provedbu ranije opisanih dijagnostičkih postupaka. Obično, takvi alati sadrže sredstvo koje se specifično veže na antitijela za A β ili reagira s T-stanicama specifičnim za A β . Alat može također uključivati i oznaku. Za detektiranje antitijela za A β oznaka je obično u obliku označenih antiidiotskih antitijela. Za detektiranje antitijela, sredstva se mogu dostavljati prevedena u krutu fazu, pri čemu se koristi mikrotitracijsko posuđe. Za detekciju reaktivnih T-stanica, oznaka se može dostavljati kao ³H-timidin u svrhu mjerenja proliferativnog odgovora. Alati obično također sadrže uputu za način korištenja alata. Upute mogu također sadržati grafički prikaz ili neki drugi odgovarajući režim koji korelira odnos izmjerenog nivoa oznake i nivoa antitijela za A β ili T-stanica koje reagiraju s A β . Pojam označavanja se odnosi na bilo koji pisani ili zabilježeni materijal vezan za, ili na neki drugi način pridružen alatu u svako vrijeme tijekom njegove proizvodnje, transporta, prodaje ili upotrebe. Na primjer, pojam označavanja obuhvaća reklamne letke i brošure, upakirane materijale, instrukcije, audio ili video kazete, kompjuterske diskove, kao i ispise utisnute direktno na alatima.

PRIMJERI

I. Profilaktička efikasnost A β u odnosu na AD

Ovi primjeri opisuju davanje A β ₄₂ peptida transgentskim miševima s povećanom ekspresijom APP-a s mutacijom na položaju 717 (APP_{717V→F}) koja stvara predispoziciju za stvaranje Alzheimeru slične neuropatologije. Proizvodnja i karakteristike tih miševa (PDAPP miševi) je opisana u ranije navedenoj referenci Games-a i suradnika, Nature. Te životinje, u njihovom heterozigotnom obliku, počinju stvarati naslage A β u dobi od šest mjeseci pa na dalje. U dobi od petnaest mjeseci pokazuju nivo naslaga A β ekvivalentan onom koji je primijećen kod Alzheimerove bolesti. PDAPP miševima je davana injekcija agregiranog A β ₄₂ (agregirani A β ₄₂) ili fosfatno puferirane slane vodene otopine. Agregirani A β ₄₂ je odabran zbog njegove sposobnosti da pobudi antitijela na višestruke epitope od A β .

A. Postupci

1. Porijeklo miševa

Trideset PDAPP heterogenih ženki miševa je nasumično podijeljeno u sljedeće skupine: 10 miševa je dobilo injekciju s agregiranim A β ₄₂ (jedan je uginuo prilikom prijenosa), 5 miševa je dobilo injekciju s PBS-om i pomoćnim sredstvom ili s PBS-om, a deset kontrolnih miševa nije dobilo injekcije. Pet miševa je primilo injekcije seruma amiloidnog proteina (SAP).

2. Priprava imunogena

Priprava agregiranog A β ₄₂: dva miligrama A β ₄₂ (US Peptides Inc, lot K-42-12) je otopljeno u 0,9 ml vode i otopina je nadopunjena do 1 ml dodavanjem 0,1 ml 10 × PBS. Smjesa je vrtložena i ostavljena preko noći u inkubatoru na 37 °C, kod tih uvjeta dolazi do agregiranja peptida. Do sljedećeg davanja injekcije, svaki neupotrijebljeni A β je pohranjen kao suhi lipofilizirani prah pri -20 °C.

3. Priprava injekcija

100 μ g agregiranog A β ₄₂ u PBS-u po mišu je emulgirano u omjeru 1:1 s kompletnim Freundovim pomoćnim sredstvom (CFA) do konačnog volumena emulzije od 400 μ l, upotrijebljene kod prve imunizacije praćene pojačanjem s istom količinom imunogena u nekompletnom Freundovom pomoćnom sredstvu (IFA) tijekom 2 tjedna. Dvije dodatne doze u IFA su dane u mjesečnim intervalima. Daljnje imunizacije su provedene s mjesečnim intervalima u 500 μ l PBS-a. Injekcije su davane intraperitonealno (i.p.).

Davanje injekcija PBS-a je pratilo isti raspored, a miševima su davane injekcije od 400 μ l po mišu, sa smjesom PBS-a i pomoćnog sredstva u omjeru 1:1, ili s 500 μ l PBS-a po mišu. Slično tome, davanje injekcija SAP-a prati isti raspored uz davanje doza od 100 μ g po injekciji.

4. Titracija mišje krvi, preparacija tkiva i imunohistokemija

Navedeni postupci su opisani u daljnjem tekstu u dijelu općih materijala i postupci.

B. Rezultati

PDAPP miševima su dane injekcije bilo s agregiranim A β ₄₂ (agregirani A β ₄₂), SAP peptidima, ili fosfatno puferiranom slanom vodenom otopinom. Jednoj skupini PDAPP miševa nije dana nikakva injekcija, da bi poslužili kao pozitivna kontrola. Količina agregiranih A β ₄₂ je određivana svakog drugog mjeseca od četvrte pojačane doze pa do kad su miševi bili stari godinu dana. Miševi su žrtvovani nakon 13 mjeseci. Kod svih ispitanih vremenskih točaka, osam od devet miševa s agregatima A β ₄₂ je razvilo visoki titar antitijela, koji je ostao visok tijekom niza ubrizgavanja (titri veći od 1/10000). Deveti miš je imao nizak, ali mjerljiv titar od približno 1/1000 (slika 1, tablica 1). Miševi s ubrizganim SAPP-om su imali titrove od 1:1000 do 1:30000 za taj imunogen, sa samo jednim mišem čiji je titar prelazio 1:100000.

Kod miševa tretiranih PBS-om određivana je količina antitijela na agregirani A β ₄₂ nakon šest, deset i dvanaest mjeseci. Kod razrijeđenja od 1/100 PBS, količina antitijela na agregirani A β ₄₂ prešla je 4 puta vrijednost pozadine samo u jednoj točki, kod svih drugih vremenskih točaka dobivene vrijednosti ne prelaze 4 puta vrijednost pozadine (tablica 1). SAP-specifičan odgovor je bio zanemariv kod tih vremenskih točaka, sa količinama manjim od 300.

Sedam od devet miševa iz agregirane A β ₁₋₄₂ skupine nisu imali mjerljivu količinu amiloida u svojim mozgovima. Nasuprot tome, moždano tkivo u miševa iz SAP i PBS skupina su sadržavala brojne 3D6-pozitivne amiloidne naslage u hipokampusu kao i u frontalnom i cingularnom korteksu. Uzorak depozita je sličan onome iz netretirane kontrolne skupine, s karakterističnim uključanjem ranjivih područja, kao što je vanjski molekularni sloj hipokampalnog dentatnog girusa (vijuge). Jedan miš iz skupine kojoj je ubrizgan A β ₁₋₄₂ je imao znatno smanjenu amiloidnu naslagu, ograničenu na područje hipokampusa. Izolirani plak je identificiran kod drugog miša tretiranog s A β ₁₋₄₂.

Kvantitativna analiza slike amiloidne naslage u hipokampusu je potvrdila dramatično smanjenje postignuto kod AN1792-tretiranih životinja (slika 2). Vrijednosti medijana amiloidne naslage kod PBS skupine (2,22%) i kod netretirane kontrolne skupine (2,65%) su znatno veće nego li za one imunizirane s AN1792 (0,00%, p=0,0005). Nasuprot tome, vrijednost medijana za skupinu imuniziranu sa SAP peptidima (SAPP) je 5,74%. Moždano tkivo iz netretiranih kontrolnih miševa sadrži brojne A β amiloidne naslage vizualizirane s Ab-specifičnim monoklonalnim antitijelima (mAb) 3D6 u hipokampusu, kao i u retrosplenialnom korteksu. Sličan uzorak amiloidnih naslaga je također opažen kod miševa imuniziranih sa SAPP-om ili PBS-om (slika 2). Pored toga, kod potonjih triju skupina javlja se karakteristično uključivanje ranjivih područja mozga, klasično viđeno kod AD-a, kao što je, kod svih triju navedenih grupa, vanjski molekularni sloj hipokampalnog dentatnog girusa.

Mozgovi koji ne sadrže A β naslage su također lišeni neurotskih plakova koji se obično javljaju kod PDAPP miševa s humanim APP antitijelom 8E5. Svi mozgovi iz preostalih skupina (miševi s ubrizganim SAP-om, PBS-om i bez ubrizgavanja) imaju velik broj neurotskih plakova tipične za netretirane PDAPP miševe. Mali broj neurotskih plakova je bio prisutan u mišu tretiranom s AN1792, a jedan klaster distrofičnih neurita je nađen kod drugog miša tretiranog s AN1792. Analiza slike hipokampusa, prikazana na slici 3, pokazuje praktično eliminiranje distrofičnih neurita kod AN1792-tetiranih miševa (medijan 0,00%) u odnosu na primaoce PBS-a (medijan 0,28%, $p = 0,0005$).

Astrocitoza karakteristična za upalu povezanu s pločastim naslagama također nije bila prisutna u mozgovima skupine s ubrizganim A β 1-42. Mozgovi miševa iz drugih skupina sadrže velik broj nagomilanih GFAP -pozitivnih astrocita obično od glioze povezane s A β plakovima. Dio uzoraka, koji je reagirao s GFAP-om, tretiran je tioflavinom S u svrhu lokaliziranja A β naslaga. GFAP pozitivni astrociti su povezani s A β plakovima iz SAP-, PBS- i netretirane kontrolne skupine. Takva povezivanja nisu nađena kod miševa tretiranih s A β 1-42, negativnih na plakove, dok je minimalna gliozna povezana s plakovima identificirana kod jednog miša tretiranog s AN1792.

Analiza slike retrosplenialnog korteksa, prikazana na slici 4, potvrđuje znatno smanjenje astrocitoze kod miševa tretiranih s AN1792, s vrijednošću medijana od 1,56%, nasuprot tome vrijednost medijana veća od 6% je dobivena kod skupina imuniziranih sa SAP peptidima, PBS-om ili netretiranim ($p=0,0017$).

Dokazi dobiveni iz podskupa miševa s ubrizganim A β 1-42 i PBS-om ukazuju da MHC II imunoreaktivnost povezana s plakovima nije prisutna kod miševa s ubrizganim A β 1-42, što je u skladu s odsutnošću upalnog odgovora povezanog s A β

Područja mišjeg mozga su također reagirala s mA β specifičnim za MAC-1 protein stanične površine. MAC-1 (CD11b) je član obitelji integrina i javlja se kao heterodimer s CD18. CD11b/CD18 kompleks je prisutan na monocitima, makrofagima, neutrofilima i prirodnim staničnim ubojicama (Mak i Simard). Vjerojatno je da će tip stanica reaktivnih na MAC-1 smještenih u mozgu biti mikroglie, zasnovane na sličnoj fenotipskoj morfologiji u MAC-1 imunoreakcijskom području. S plakovima povezano označavanje MAC-1 je bilo niže u mozgovima miševa tretiranih s AN1792 u odnosu na PBS kontrolnu skupinu. To otkriće je u skladu s nedostatkom A β pobuđenog upalnog odgovora.

C. Zaključak

Izostanak A β plakova i reaktivnih neuronskih i gliotičkih promjena u mozgovima miševa s ubrizganim A β 1-42 ukazuje na to da nije došlo ili je došlo do ekstremno malog amiloidnog taloženja u njihovim mozgovima, a patološke posljedice, kao što su gliozna i neuritska patologija, nisu prisutne. PDAPP miševi tretirani s A β 1-42 pokazuju u biti isti izostanak patologije kao i kontrolni netransgenski miševi. Zbog toga su ubrizgavanja A β 1-42 vrlo učinkovita u sprječavanju taloženja ili pročišćavanju humanog A β iz moždanog tkiva, te eliminaciji kasnijih neuronskih i upalnih degenerativnih promjena. Stoga, davanje A β peptida pruža terapijsku korist u prevenciji AD-a.

II Studija odgovora na doziranje

Skupine pet tjedana starih ženki Swiss Webster miševa ($N=6$ po skupini) su imunizirane s 300, 100, 33, 11, 3,7, 1,2, 0,4 ili 0,13 μ g A β formuliranog u CFA/IFA i davanog intraperitonealno. Tri doze su dane unutar dvotjednih intervala, praćene četvrtom dozom mjesec dana kasnije. Prva doza je emulgirana s CFA, a preostale doze su emulgirane s IFA. Životinjama je vađena krv 4 do 7 dana nakon svake imunizacije s početkom nakon druge doze, a u svrhu mjerenja količine antitijela. Životinjama iz tri skupine, imuniziranim s 11, 33 ili 300 μ g antigena, je dodatno vađena krv u približno mjesečnim intervalima tijekom četiri mjeseca, nakon četvrte imunizacije u svrhu promatranja opadanje odgovora antitijela s povećanjem broja dozi cijepljenja. Te životinje su primile konačnu petu imunizaciju u sedmom mjesecu nakon početka studije. Žrtvovane su tjedan dana poslije, da bi se izmjerile reakcije antitijela na AN1792 i provela toksikološka analiza.

Opadanje odgovora na davane doze je opaženo kod 300 do 3,7 μ g, pri čemu nije došlo do nikakvog odgovora kod dviju najmanjih doza. Srednja vrijednost titara antitijela je bila oko 1:1000 nakon 3 primljene doze i oko 1:10000 nakon 4 doze s 11 do 300 μ g antigena (vidjeti sliku 5).

Nakon treće imunizacije porast količine antitijela je dramatičan za sve skupine, osim one s primljenom najnižom dozom, uz porast GMT-a od 5 do 25 puta. Mali odgovor antitijela je nakon toga detektiran i kod primatelja doze od 0,4 μ g. Grupe koje su primile 1,2 i 3,7 μ g imaju usporedive titrove s GMT-om od oko 1000, a četiri najveće doze imaju također međusobno slične rezultate s GMT-om od oko 25000, izuzetak je skupina s dozom od 33 μ g s GMT-om nižim od 3000. Nakon četvrte imunizacije, porast zabilježen u titrovima najvećeg broja skupina je puno skromniji. Postoji

jasan odgovor na danu dozu kod skupina s dozama antigena od 0,14 µg do 11 µg, rangiran od nemogućnosti detektiranja antitijela kod primaoca 0,14 µg do GTM-a od 36000 kod primaoca 11 µg. Rezultati dobiveni iz četiri skupine s najvišim primljenim dozama od 11 do 300 µg ponovo su grupirani zajedno. Stoga, nakon dvije imunizacije titrovi antitijela ovise o širokom rasponu dozi antigena, od 0,4 do 300 µg. Nakon treće imunizacije, svi titrovi dobiveni iz četiri najveće doze imaju usporedive vrijednosti koje ostaju u platou nakon dodatnih imunizacija.

Mjesec dana nakon četvrte imunizacije titrovi iz skupine koja je primila 300 µg su dali 2 do 3 puta više vrijednosti od krvi ispuštene pet dana nakon imunizacije (slika 6). To opažanje sugerira da se vrhunac anamnestičkog odgovora antitijela događa više od 5 dana nakon imunizacije. Puno skromniji (50%) porast je opažen u tom vremenu kod 33 µg skupine. Kod skupine koja je primila 300 µg doze, nakon dva mjeseca od primanja zadnje doze GTM naglo opada za oko 70%. Nakon još jednog mjeseca, opadanje je sporije 45% (100 µg) i oko 14% za 33 i 11 µg doze. Iz toga proizlazi da se, nakon prekida imunizacije, brzina opadanja količine antitijela odvija u dvije faze, s naglim opadanjem u prvom mjesecu nakon vrhunca odgovora, nakon čega dolazi do puno skromnije brzine opadanja u kasnijem periodu.

Titri antitijela i kinetike odgovora kod Swiss Webster miševa su slične s onima dobivenim kod mladih heterozigotnih PDAPP transgenskih miševa imuniziranih na isti način. Efektivno doziranje za pobuđivanje imunološkog odgovora kod čovjeka je obično slično s dozama efektivnim kod miševa.

III. Provjera terapijske efikasnosti u odnosu na uspostavljeni AD

Ovo ispitivanje je dizajnirano radi testiranja aktivnosti imunogenih sredstava kod zaustavljanja ili popravljavanja neuropatoloških karakteristika u starijih životinja povezanih s AD-om. Imunizacije s 42 aminokiseline dugim Aβ(AN1792) su započele u vremenskoj točki u kojoj su amiloidni plakovi već prisutni u mozgovima PDAPP miševa.

Za vrijeme vrijeme korišteno u ovoj studiji, netretirani PDAPP miševi su razvili brojne neurodegenerativne promjene koje slične onim nađenim kod AD-a (Games i suradnici, referenca navedena ranije i Johnson-Wood i suradnici, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 1550-1555 (1997)). Taloženje Aβ-a u amiloidne plakove povezano je s degenerativnim neuronalnim odgovorom koji se sastoji od aberacije aksonalnih i dendritskih elemenata, s nazivom distrofični neuriti. Amiloidne naslage koje sadrže i okružene su s distrofičnim neuritima zovu se neuritski plakovi. I kod AD i kod PDAPP miševa, distrofični neuriti imaju jasnu globularnu strukturu, imunoreaktivni su s antitijelima koja prepoznaju APP i citoskeletalne komponente i pokazuju kompleksne unutarstanične degenerativne promjene na višem strukturnom nivou. Te karakteristike omogućavaju za bolest relevantno, selektivno i reproducibilno mjerenje formiranja neuritskog plaka u PDAPP mozgovima. Distrofična neuronska komponenta PDAPP neuritskih plakova postaje lako vidljiva primjenom antitijela specifičnih za humani APP (mAβ8E5) i redovito je mjerena pomoću kompjuterom pomognute analize slike. Stoga, pored mjerenja efekta koji AN1792 ima na formiranje amiloidnih plakova, mi smo promatrali efekte tog tretmana na razvoj neuritske distrofije.

Astrociti i mikroglie nisu neuronske stanice, ali reagiraju na i odražavaju stupanj neuronskog oštećenja. GFAP-pozitivni astrociti i MHC II-pozitivne mikroglie su često viđene kod AD-a, a njihova aktivnost raste s porastom žestine bolesti. Zbog toga smo također promatrali i razvoj reaktivne astrocitoze i mikroglie kod miševa tretiranih s AN1792.

A. Materijali i postupci

Četrdeset i osam heterozigotnih ženki PDAPP miševa, starosti od 11 do 11,5 mjeseci, dobivenih od Charles River-a, nasumično su podijeljeni u dvije skupine: 24 miša za imuniziranje sa 100 µg AN1792 i 24 miša za imuniziranje sa PBS-om, pri čemu je svako sredstvo kombinirano s Freundovim pomoćnim sredstvom. AN1792 i PBS skupine su ponovno podijeljene nakon dosezanja dobi od približno 15 mjeseci. U dobi od 15 mjeseci približno polovica životinja iz svake skupine, tretirane s AN1792 i PBS-om, je bila eutanazirana (n=10 i 9, u odnosu na AN1792 i PBS), preostali miševi su nastavili dobivati imunizaciju sve do okončanja nakon približno 18 mjeseci (n=9 i 12, u odnosu na AN1792 i PBS). Ukupno osam životinja (5 AN1792, 3 PBS) je uginulo za vrijeme ispitivanja. Pored imuniziranih životinja, uključeni su netretirani PDAPP miševi stari jednu godinu, 15 mjeseci (n=10) i 18 mjeseci (n=10) u svrhu ELISA usporedbe u kojoj se mjere nivoi Aβi APP-a u mozgu; životinje stare jednu godinu su također uključene u imunohistokemijske analize.

Metodologija je bila ista kao i u primjeru 1, osim kada je naznačeno drugačije. AN1792 od US Peptides lot 12 i California Peptides lot ME0339 su korišteni za dobivanje antigena za šest imunizacijskih davanja, prvenstveno u 15-o mjesечноj vremenskoj točki. California Peptides lots ME0339 i ME0439 su korišteni i kod triju dodatnih imunizacijskih davanja između 15-tog i 18-tog mjeseca.

U svrhu imunizacije, emulgirano je u omjeru 1:1 (vol:vol) 100 µg AN1792 u 200 µl PBS-a ili sam PBS s kompletnim Freundovim pomoćnim sredstvom (CFA) ili nekompletnim Freundovim pomoćnim sredstvom (IFA) ili PBS-om do

konačnog volumena od 400 µl. Prva imunizacija je dana uz CFA kao pomoćno sredstvo, slijedećih četiri doza je dano uz IFA, a konačnih četiri doza samo uz PBS bez dodavanja pomoćnog sredstva. Ukupno je provedeno devet imunizacija tijekom perioda od sedam mjeseci uz dvotjedni raspored za prve tri doze nakon čega su preostale doze davane u intervalima od četiri tjedna. Skupina tretirana četiri mjeseca, eutanazirana u dobi od 15 mjeseci, je primila samo prvih 6 imunizacija.

B. Rezultati

1. Efekti tretmana s AN1792 na amiloidnu naslagu

Rezultati tretmana s AN1792 na kritičnu amiloidnu naslagu, određeni pomoću kvantitativne analize slike, prikazani su na slici 7. Vrijednost medijana kritične amiloidne naslage je 0,28% za skupinu netretiranih 12 mjeseci starih PDAPP miševa, a vrijednost je reprezentativna za količinu plaka kod miševa na početku ispitivanja. Nakon 18 mjeseci amiloidna naslaga kod miševa tretiranih s PBS-om je porasla za više od 17 puta, do 4,87%, dok se kod miševa tretiranih s AN1792 amiloidna naslaga smanjila na samo 0,01%, što je znatno manje u odnosu na 12 mjesečnu netretiranu skupinu, te 15 i 18 mjesečne skupine tretirane s PBS-om. Amiloidna naslaga se znatno smanjila kod primatelja AN1792 nakon 15 mjeseci (96%-tno smanjenje; $p=0,003$) kao i nakon 18 mjeseci (>99%-tno smanjenje; $p=0,0002$).

Obično kortikalno amiloidno taloženje kod PDAPP miševa započinje u frontalnom retrosplenialnom korteksu (RSC) i napreduje u ventralnom lateralnom smjeru da bi uključilo temporalni i entorhinalni korteks (EC). U EC-u 12 mjeseci starih miševa, prosječnoj dobi u kojoj je AN1792 prvi put davan, nađeno je malo ili ništa amiloida. Nakon 4 mjesečnog tretmana s AN1792, amiloidne naslage su znatno smanjene u RSC-u, a progresivno uključivanje EC-a je u potpunosti eliminirano AN1792 tretmanom. Kasnija promatranja su pokazala da AN1792 u potpunosti zaustavlja napredak amiloida koji bi se inače proširili na temporalni i ventralni korteks, kao i da zaustavlja ili čak pokrene u suprotnom pravcu taloženje u RSC-u.

Značajni efekti tretmana s AN1792 na napredujuće kortikalne amiloidne naslage u PDAPP miševima dodatno su demonstrirane na 18 mjesečnoj skupini koja je bila tretirana sedam mjeseci. Kod miševa tretiranih s AN1792 je nađena gotovo potpuna odsutnost kortikalnih amiloida, te potpuna odsutnost difuznih plakova kao i smanjenje kompaktnih naslaga.

2. Stanične i morfološke promjene povezane s AN1792 tretmanom

Populacija Aβ-pozitivnih stanica je nađena u područjima mozga koji obično sadrže amiloidne naslage. Značajno, u nekoliko mozgova primatelja AN1792 je nađeno vrlo malo ili ništa izvanstaničnih kortikalnih amiloidnih plakova. Pokazalo se da je većina Aβimunoreaktivnosti sadržana unutar stanica s velikim lobularnim ili nagomilanim soma-ma. Fenotipski, te stanice sličje aktiviranim mikroglia ili monocitima. One su imunoreaktivne s antitijelima koja prepoznaju ligande dobivene ekspresijom aktiviranih monocita i mikroglia (MH II i CD11b) i povremeno su povezane sa stijenkama ili kanalima (lumen) krvnih žila. Usporedba bliskih područja označenih s antitijelima specifičnim za Aβi MHC II je pokazala da su slični uzorci stanica prepoznati od obje klase antitijela. Detaljni pregled mozgova tretiranih s AN1792 je otkrio da su MHC II-pozitivne stanice ograničene na područje u blizini preostalih amiloida u tim životinjama. Pod korištenim uvjetima fiksacije stanice nisu imunoreaktivne s antitijelima koja prepoznaju ligande T stanica (CD3, CD3e) ili B stanica (CD45RA, CD45RB) ili s leukocitnim antigenom (CD43) koji reagira s monocitima. Niti jedna od tih stanica nije nađena kod bilo kojeg miša tretiranog PBS-om.

Svi PDAPP miševi su bez razlike razvili teške amiloidne naslage u vanjskom molekularnom sloju hipokampalnog dentatnog girusa. Naslaga je formirala jasnu crtu unutar perforiranog (perforant) prolaza, područja koje obično sadrži amiloidne plakove kod AD-a. Karakteristično javljanje tih naslaga kod miševa tretiranih PBS-om sličje onom iz ranije karakterizacije netretiranih PDAPP miševa. Amiloidna naslaga sadrži i difuzne i zbijene plakove u neprekinutom pojasu. Nasuprot tome, kod mnogih mozgova iz miševa tretiranih s AN1792 ta slika je znatno izmijenjena. Hipokampalna amiloidna naslaga više ne sadrži difuzne amiloide, a pojasni uzorak je u cijelosti poremećen. Prisutne su brojne neuobičajene rupičaste strukture reaktivne s anti-Aβantitijelima od kojih se za nekoliko pokazalo da su stanice koje sadrže amiloide.

Kod životinja tretiranih s AN1792, MHC II-pozitivne stanice su često opažene u blizini vanstaničnog amiloida. Uzorak povezan s Aβ-pozitivnim stanicama koje posjeduju amiloid je vrlo sličan u nekoliko mozgova miševa tretiranih s AN1792. Raspodjela tih monocitnih stanica je bila ograničena na područje blizu istaloženog amiloida, a u potpunosti je odsutna u drugim područjima mozga lišenih Aβplakova.

Kvantitativna analiza slike područja označenih s MHC II i MAC I otkriva trend porasta imunoreaktivnosti u RSC-u i hipokampusu miševa tretiranih s AN1792 u odnosu na PBS skupinu, kod koje je mjerenje pokazalo značajnu reaktivnost MAC I u hipokampusu.

- 5 Ovi rezultati su indikativni za aktivno, stanicom posredovano uklanjanje amiloida iz područja mozga koji sadrže plakove.

3. Efekti AN1792 na nivoe A β : ELISA određivanja

10 (a) kortikalni nivoi

Kod netretiranih PDAPP miševa, nakon 12 mjeseci, medijan ukupnog A β u korteksu je bio 1600 ng/g, da bi nakon 15 mjeseci porastao na 8700 ng/g (tablica 2). Nakon 18 mjeseci vrijednost je iznosila 22000 ng/g, što je porast za više od 10 puta tijekom eksperimenta. Ukupni A β kod životinja tretiranih s PBS-om je, nakon 15 mjeseci, iznosio 8600 ng/g, da bi porastao do 19000 ng/g nakon 18 mjeseci. Nasuprot tome, životinje tretirane s AN1792 su imale 81% manji ukupni A β nakon 15 mjeseci (1600 ng/g) u odnosu na PBS-om imuniziranu skupinu. Znatno manji ($p=0,0001$) ukupni A β (5200 ng/g) je dobiven nakon 18 mjeseci kad su uspoređene AN1792 i PBS skupine (tablica 2), što predstavlja 72%-tno smanjenje A β koji bi inače bio prisutan. Slični rezultati su dobiveni prilikom usporedbe kortikalnog nivoa A β 42, to jest utvrđeno je da skupina tretirana s AN1792 sadrži puno manje A β 42, no u ovom slučaju razlika između AN1792 i PBS skupine je bila znatna i kod 15 mjeseci ($p=0,04$) i kod 18 mjeseci ($p=0,0001$, tablica 2).

Tablica 2: Medijan količine A β (ng/g) u korteksu

	NETRETIRANI			PBS			AN1792		
Starost	Ukupni A β	A β 42	(n)	Ukupni A β	A β 42	(n)	Ukupni A β	A β 42	(n)
12	1600	1300	(10)						
15	8700	8300	(10)	8600	7200	(9)	1600	1300*	(10)
18	22200	18500	(10)	19000	15900	(12)	5200**	4000**	(9)

* $p = 0,0412$

25 ** $p = 0,0001$

(b) Hipokampalni nivoi

Kod netretiranih PDAPP miševa u dobi od 12 mjeseci medijan hipokampalnog nivoa ukupnog A β bio je 15000 ng/g, te je narastao na 51000 ng/g nakon 15 mjeseci i dalje na 81000 ng/g nakon 18 mjeseci (tablica 3). Slično tome, miševi imunizirani s PBS-om su dali vrijednosti od 40000 ng/g nakon 15 mjeseci i 65000 ng/g nakon 18 mjeseci. Životinje imunizirane s AN1792 su dale manji ukupni A β 25000 ng/g i 51000 ng/g u odnosu na 15 mjesecni i 18 mjesecni vremenski period. Vrijednost dobivena za 18 mjesecnu skupinu tretiranu s AN1792 je bila znatno niža u odnosu na skupinu tretiranu s PBS-om ($p = 0,0105$; tablica 3). Mjerenje A β 42 je dalo istu sliku rezultata, to jest ti nivoi su nakon 18 mjeseci kod skupine tretirane s AN1792 bili znatno niži nego li kod PBS skupine (39000 ng/g naprema 57000 ng/g; $p=0,0022$) (tablica 3).

Tablica 3: Medijan količine A β (ng/g) u hipokampusu

	NETRETIRANI			PBS			AN1792		
Starost	Ukupni A β	A β 42	(n)	Ukupni A β	A β 42	(n)	Ukupni A β	A β 42	(n)
12	15500	11100	(10)						
15	51500	44400	(10)	40100	35700	(9)	24500	22100	(10)
18	80800	64200	(10)	65400	57100	(12)	50900*	38900**	(9)

40 * $p = 0,0105$

** $p = 0,0022$

(c) Nivoi u malom mozgu (cerebellumu)

45 Kod 12 mjesecnih netretiranih miševa, medijan nivoa ukupnog A β u malom mozgu je bio 15 ng/g (tablica 4). U 15-tom mjesecu, ta vrijednost je porasla na 28 ng/g, a u 18 mjesecu je porasla na 35 ng/g. Medijan vrijednost ukupnog A β kod životinja tretiranih PBS-om je bila 21 ng/g u 15-tom mjesecu i 43 ng/g u 18 mjesecu. Za životinje tretirane s AN1792 je nađeno da imaju 22 ng/g ukupnog A β u 15-tom mjesecu, te znatno manji ($p=0,002$) ukupni A β u 18 mjesecu (25 ng/g) u odnosu na odgovarajuću PBS skupinu (tablica 4).

Tablica 4: Srednji A β nivoi (ng/g) u malom mozgu (cerebellumu)

Starost	NETRETIRANI		PBS		AN1792	
	Ukupni Ab	(n)	Ukupni Ab	(n)	Ukupni Ab	(n)
12	15,6	(10)				
15	27,7	(10)	20,8	(9)	21,7	(10)
18	35,0	(10)	43,1	(12)	24,8*	(9)

*p = 0,0105

4. Efekti tretmana s AN1792 na nivoi APP-a

APP- α i molekule APP u punoj duljini sadrže cijelu ili dio A β sekvence i stoga mogu biti pod potencijalnim djelovanjem AN1792-usmjerenog nastanka imunološkog odgovora. U do sada napravljenim studijama, zabilježen je mali porast APP nivoa s porastom neuropatologije u PDAPP miševa. U korteksu su nivoi, bilo APP- α /FL (puna duljina) ili APP- α , ostali u biti nepromijenjeni nakon tretmana, s izuzetkom da se APP- α u 18 mjesecom vremenskom periodu smanjio za 19% kod tretmana s AN1792 u odnosu na skupinu tretiranu s PBS-om. Vrijednost APP dobivena u 18-tom mjesecu nakon tretiranja s AN1792 nije se znatno razlikovala od vrijednosti dobivenih kod netretirane skupine u 12-tom i 15-tom mjesecu, te kod skupine tretirane s PBS-om u 15-tom mjesecu. U svim slučajevima su APP vrijednosti ostale u rangu koji se normalno nalazi kod PDAPP miševa.

5. Efekti tretmana s AN1792 na neurodegenerativnu i gliotsku patologiju

Naslaga neuritskog plaka se znatno smanjila u frontalnom korteksu miševa tretiranih s AN1792 u odnosu na PBS skupinu u dobi od 15 (84%; p=0,03) kao i u dobi od 18 (55%; p=0,01) mjeseci (slika 8). Medijan količine neuritskog plaka je, kod PBS skupine, narastao od 0,32% do 0,49% u dobi između 15 i 18 mjeseci. Tome nasuprot AN1792 skupina je pokazala znatno smanjenje razvoja neuritskih plakova, sa medijanom količine neuritskih plakova od 0,05% kod 15 mjesecne skupine i 0,22% kod 18 mjesecne skupine.

Čini se da se imunizacije s AN1792 dobro podnose, a reaktivna astrocitoza je također znatno smanjena u RSC-u miševa tretiranih s AN1792 u odnosu na PBS skupinu u dobi od 15 mjeseci (56%; p=0,011) kao i 18 mjeseci (39%; p=0,028) (slika 9). Medijan vrijednosti udjela astrocitoze u PBS skupini su rasle između 15 i 18 mjeseca od 4,26% do 5,21%. Tretman s AN1792 je potisnuo razvoj astrocitoze u oba vremenska perioda na 1,89% i 3,2%. To sugerira da neuropila nije bila oštećena za vrijeme procesa pročišćavanja.

6. Reakcija antitijela

Kao što je opisano ranije, jedanaest mjeseci stari heterozigotni PDAPP miševi (N=24) su primili seriju od 5 imunizacija s 100 μ g emulzije AN1792 i Freundovog pomoćnog sredstva, davanih intraperitonealno nakon 0, 2, 4, 8 i 12 tjedana, a šesta imunizacija samo s PBS-om (bez Freundovog pomoćnog sredstva) je dana u 16-tom tjednu. Kao negativna kontrola, paralelan skup od 24 podjednako starih transgenskih miševa je primilo imunizaciju s PBS-om emulgiranim s istim pomoćnim sredstvima i davan prema istom rasporedu. Životinjama je puštana krv unutar tri do sedam dana nakon svake imunizacije, s početkom nakon druge doze. Reakcija antitijela na AN1792 je mjerena pomoću ELISA testa. Geometrijska sredina titrova (GMT) životinja koje su imunizirane s AN1792 je bila približno 1900 nakon druge doze, 7600 nakon treće i 45000 nakon zadnje (šeste) doze. Antitijela specifična za A β nisu određena u kontrolnoj skupini nakon šeste imunizacije.

Približno polovica životinja je tretirana još dodatna tri mjeseca i primila imunizacije oko 20., 24. i 27. tjedna. Svaka od tih doza je dostavljena samo s PBS prijenosnikom bez Freundovog pomoćnog sredstva. Srednji titrovi antitijela su ostali nepromijenjeni za vrijeme tog vremenskog perioda. U stvari, pokazalo se da su titrovi antitijela ostali stabilni od četvrtog do osmog puštanja krvi, što je odgovaralo periodu od petog do devetog davanja injekcije.

Da bi se utvrdilo jesu li antitijela specifična za A β dobivena imunizacijom i detektirana u serumima miševa tretiranih s AN1792 također povezana i s amiloidnim naslagama u mozgu, dio AN1792- i PBS-tretiranih miševa je podvrgnut reakciji s antitijelom specifičnim za mišji IgG. Za razliku od PBS skupine, A β plakovi iz mozgovia tretiranih s AN1792 su bili prevučeni s endogenim IgG-om. Ta razlika između dviju skupina opažena je i kod 15 i kod 18 mjesecnih skupina. Osobito je bio izražen izostanak označivača u PBS skupini, usprkos prisutnosti teških amiloidnih naslaga kod tih miševa. Ti rezultati pokazuju da imunizacija sa sintetičkim A β proteinom generira antitijela koja prepoznaju i vežu se *in vivo* za A β u amiloidnim plakovima.

7. Stanično posredovani imunološki odgovori

Slezene su uklonjene iz devet AN1792-imuniziranih i 12 PBS-imuniziranih, 18 mjeseci starih, PDAPP miševa, 7 dana nakon devete imunizacije. Splenociti su izolirani i uzgajani 72 sata u prisustvu A β 40, A β 42 ili A β 40-1 (nasuproti red proteina). Mitogen Con A je poslužio kao pozitivna kontrola. Optimalni odgovori su dobiveni s >1,7 μ M proteina. Stanice iz svih devet životinja tretiranih s AN1792 su umnožene kao odgovor, bilo na A β 1-40 ili A β 1-42 proteine, s jednakim nivoima ugradnje za oba proteina (slika 10, gornji panel). Nije bilo nikakvog odgovora na nasuproti A β 40-1 protein. Stanice iz kontrolnih životinja nisu reagirale niti na jedan od A β proteina (slika 10, donji panel).

C. Zaključak

Rezultati iz ove studije su pokazali da AN1792 imunizacija PDAPP miševa koji posjeduju amiloidne naslage, usporava i sprječava progresivno amiloidno taloženje i usporava posljedične neuropatološke promjene kod starijih mozгова PDAPP miševa. Imunizacije s AN1792 u biti zaustavljaju amiloidni razvoj u strukturama koji bi u normalnim okolnostima doveo do amiloidoze. Stoga, davanje A β peptida pruža terapijsku korist kod tretmana AD-a.

IV. Usporedno ispitivanje A β fragmenata

100 PDAPP miševa starih od 9 do 11 mjeseci je imunizirano s 9 različitih područja APP i A β da bi se odredilo koji epitopi dovode do odgovora. Devet različitih imunogena i jedna kontrola su ubrizgani i.p. kao što je opisano ranije. Imunogeni uključuju četiri humana A β peptidna konjugata: 1-12, 13-28, 32-42, 1-5, svi povezani preko cistijske veze s ovčjim antiimišjim IgG; APP polipeptid aa 592-695, agregirani ljudski A β 1-40 kao i agregirani ljudski A β 25-35 i agregirani A β 42 glodavca. Agregirani A β 42 i PBS su korišteni kao kontrole. Korišteno je deset miševa po tretiranoj skupini. Titrovi su promatrani kao i ranije, a miševi su eutanazirani na kraju 4. mjeseca ubrizgavanja. Histokemija, A β nivoi i toksikologija su određivani *post mortem*.

A. Materijali i postupci

1. Priprava imunogena

Priprava povezanih A β peptida: četiri ljudska A β peptidna konjugata (aminokiselinski ostaci 1-5, 1-12, 13-28 i 33-42, svaki konjugiran s ovčjim antiimišjim IgG-om) je provedena spajanjem preko cisteina dodanog A β peptidu koristeći vezni reagens sulfo-EMCS. Derivati A β peptida su sintetizirani s pridodanim konačnim aminokiselinskim sekvencama. Kod svakog slučaja, položaj unesenog cisteinskog ostatka je naznačen podcrtavanjem. Derivati A β 13-28 peptida su također imali dva glicinska ostatka dodanih prije karboksilnog kraja cisteina, kao što je naznačeno.

A β 1-12 peptid	NH ₂ -DAEFRHDSGYEVC COOH
A β 1-5 peptid	NH ₂ -DAEFRCC COOH
A β 33-42 peptid	NH ₂ -C-amino-heptanska kiselina-GLMVGGVVIA COOH
A β 13-28 peptid	Ac-NH-HHQLVFFAEDVGSNKGCC COOH

Da bi se pripremilo za reakciju spajanja, deset mg ovčjeg antiimišjeg IgG-a (Jackson ImmunoResearch Laboratories) je dijalizirano preko noći uz 10 mM natrijevog boratnog pufera, pH 8,5. Dijalizirana antitijela su nakon toga koncentrirana na volumen od 2 mL pomoću Amicon Centriprep cijevi. Deset mg sulfo-EMCS [N(ε-maleimidokuproiloksi) suksinimida] (Molecular Sciences Co.) je bilo otopljeno u 1 mL deionizirane vode.

Četrdeseterostruki molarni suvišak sulfo-EMCS-a je dodan dokapavanjem uz miješanje u ovčji antiimišji IgG, nakon čega je otopina miješana još 10 minuta. Aktivirani ovčji antiimišji IgG je pročišćen i puferiran prolaskom kroz 10 mL gel filtracijske kolone (Pierce Presto kolona, dobivena od Pierce Chemicals), te uravnotežene s 1,1 M NaPO₄, 5 mM EDTA, pH 6,5. Frakcije koje su sadržavale antitijela, identificirane apsorbancijom na 280 nm, bile su razrijeđene do koncentracija od približno 1mg/mL, uz upotrebu 1,4 mg po OD-u (koeficijentu ekstinkcije). Četrdeseterostruki molarni suvišak A β peptida je otopljen u 20 mL 10 mM NaPO₄, pH 8,0, uz izuzetak A β 33-42 peptida koji su prvo otopljeni u 0,5 mL DMSO-a, a nakon toga razrijeđeni na 20 mL s 10 mM NaPO₄ pufera. Peptidne otopine su svaka za sebe dodane u 10 mL aktiviranog ovčjeg antiimišjeg IgG-a i tresene pri sobnoj temperaturi tijekom 4 sata. Rezultirajući konjugati su koncentrirani pomoću Amico Centriprep cijevi do konačnog volumena manjeg od 10 mL, te nakon toga podvrgnuti dijalizi s PBS-om da bi došlo do izmjene pufera i uklonili se slobodni peptidi. Konjugati su propušteni kroz filtre s 0,22 μ -porama radi sterilizacije, nakon čega su razdijeljeni u alikvote od 1 mg i spremljeni zamrznuti na -20 °C. Koncentracije konjugata su bile određene ispitivanjem BCA proteina (Pierce Chemicals) uz konjsku IgG kao standardnu krivulju. Konjugacija je dokumentirana porastom molekularne težine konjugiranih peptida u odnosu na

pobuđeni ovčji anti-mišji IgG. A β 1-5 ovčji anti-mišji konjugat je nastao iz dviju konjugacija, dok ostatak potječe od jedne priprave.

2. Priprava agregiranih A β peptida

Ljudski peptidi 1-40 i 25-35 (AN1528; California Peptides Inc., Lot ME0541), 1-42 (AN1792; California Peptides Inc., Lots ME0339 i ME0439), te peptidi glodavaca 1-42 (California Peptides Inc., Lot ME0218) pripremljeni su za otapanje u svrhu priprave niza injekcija od liofiliziranih osušenih prašaka pohranjenih na -20°C . Za tu svrhu, dva mg peptida je dodano u 0,9 ml deionizirane vode i smjesa je vrtložena da bi dala relativno uniformnu otopinu ili suspenziju. Od četiri peptida, AN1528 je jedini peptid topljiv u tom koraku. Alikvot od 10X PBS (1X PBS: 0,15 M NaCl, 0,01 M natrijevog fosfata, pH 7,5) je nakon toga dodan, te se u tom trenutku počinje taložiti AN1528. Suspenzija je ponovo bila vrtložena i inkubirana preko noći na 37°C za upotrebu slijedećeg dana.

Priprava pBx6 proteina: ekspresijski plazmid koji kodira pBx6, fuzioni protein koji se sastoji od 100 aminokiselina bakteriofaga MS-2 polimeraze N-terminalne sekvence praćene s 592-695 aminokiselina APP-a (β APP) bila je provedena na način opisan od Oltersdorfa i suradnika, J. Biol. Chem. 265, 4492-4497 (1990). Plazmid je unesen u E. coli, a ekspresija proteina je slijedila nakon pobuđivanja promotora. Bakterije su rastvorene u 8 M urei i pBx6 je djelomično pročišćen preparativnom SDS PAGE. Frakcije koje su sadržavale pBx6 su identificirane pomoću "Western blot"-a koristeći zečja anti-pBx6 poliklonalna antitijela, skupljene, koncentrirane pomoću Amicon Centriprep cijevi i dijalizirane od PBS-a. Čistoća preparacije, procijenjena obojenjem SDS PAGE-a s Coomassie plavilom, je bila približno 5 do 10%.

B. Rezultati i diskusija

1. Plan ispitivanja

Stotinu muških i ženskih heterozigotnih PDAPP transgenskih miševa, starih između devet i jedanaest mjeseci, dobivenih iz Charles River laboratorija i Taconic laboratorija podijeljeno je u deset skupina da bi bili imunizirani različitim dijelovima A β ili APP uz dodatak Freund-ovog pomoćnog sredstva. Životinje su tako podijeljene da bi se pojedine skupine čim bolje podudarale s obzirom na spol, dob i podrijetlo. Imunogeni su uključivali četiri A β peptida dobivenih iz ljudskih sekvenci 1-5, 1-12, 13-28 i 33-42, svaki spojen na ovčji anti-mišji IgG; četiri spojena A β peptida, ljudski 1-40 (AN1528), ljudski 1-42 (AN1792), ljudski 25-35, peptid glodavaca 1-42 i fuzijski polipeptid označen kao pBx6, koji je sadržavao APP ostatak amino-kiselina 592-695. Deseta skupina je, kao kontrolna, imunizirana PBS-om kombiniranim s pomoćnim sredstvom.

Za svaku imunizaciju emulgirano je po 100 μg svakog A β peptida u 200 μl PBS-a ili 200 μg APP derivata pBx6 u istom volumenu PBS-a ili sam PBS s kompletnim Freund-ovim pomoćnim sredstvom (CFA) u omjeru 1:1 (vol.: vol.) tako da je dobiveno 400 μl emulzije, koja je upotrijebljena za prvu imunizaciju. Za slijedeće četiri doze upotrijebljena je ista količina imunogena u nekompletnom Freund-ovom pomoćnom sredstvu (IFA), a u posljednjoj dozi je upotrijebljen PBS. Imunizacija je primijenjena intraperitonealno u razmaku od dva tjedna za prve tri doze, a nakon toga u razmaku od mjesec dana. Životinjama je uziman uzorak krvi četiri do sedam dana nakon svake imunizacije, počevši od druge doze, da bi se izmjerila količina antitijela. Životinje su ubijene približno tjedan dana nakon posljednje doze.

2. Količina A β i APP u mozgu

Približno četiri mjeseca nakon imunizacije raznim A β peptidima ili APP derivatima, izvađeni su mozgovi iz životinja prethodno obrađenih slanom otopinom. Jedna polutka je pripremljena za imunohistokemijsku analizu, a druga je upotrijebljena za određivanje sadržaja A β i APP. Za mjerenje koncentracije raznih oblika beta amiloidnih peptida i amiloidnih prekursor-proteina homogenizirana su hipokampalna, kortikalna i cerebralna područja iz izrezanih polutki u 5 M gvanidinu, razrijeđena i uspoređena s standardima A β peptida ili APP poznatih koncentracija u ELISA formatu.

Medijan koncentracije ukupnog A β za kontrolnu skupinu imuniziranu PBS-om bio je 5,8 puta viši u hipokampusu nego u korteksu (24.318 ng/g hipokampalnog tkiva u usporedbi s 4.221 ng/g za korteks). Medijan koncentracije u cerebelumu bio je za kontrolnu skupinu (23,4 ng/g tkiva) oko 1000 puta niži nego u hipokampusu. Ovi nivoi su slični onima, koje smo ranije objavili za heterozigotne PDAPP transgenske mišve ove dobi (Jonson-Woods i suradnici, 1997).

Za korteks bio je medijan ukupnog nivoa A β i A β 1-42 kod tretiranih skupina značajno različit od onog za kontrolnu skupinu ($p < 0,05$) i to za životinje koje su primale AN1792, A β 1-42 glodavaca ili A β 1-5 peptidni kompleks, kao što je prikazano na slici 11. Vrijednosti medijana ukupnog nivoa A β bile su smanjene za 75%, 79% i 61% u usporedbi s

kontrolnim skupinama za te tretmane. Nije postojala uočljiva korelacija između količine A β -specifičnog antitijela i količine A β u kortikalnom području mozga za bilo koju skupinu.

U hipokampusu smanjenje medijana ukupnog A β vezanog uz AN1792 tretman (46%, $p = 0,0543$) nije bio tako velik kao onaj u korteksu (75%, $p = 0,0021$). Međutim iznos smanjenja u hipokampusu bio je znatno veći nego u korteksu: 11.186 ng/g tkiva za hipokampus, a 3.171 ng/g tkiva za korteks. Odnosna smanjenja medijana ukupnog nivoa A β za skupine životinja, koje su primale A β 1-42 glodavaca ili A β 1-5 iznosila su 36% i 26%. Međutim obzirom na malu veličinu skupina i velike varijacije u količini amiloidnog peptida između pojedinih životinja unutar obje skupine, ova smanjenja nisu bila signifikantna. Kada su količine A β 1-42 mjerene u hipokampusu nijedno smanjenje izazvano tretmanom nije doseglo signifikantnost. Stoga su, zbog manje količine A β u korteksu, promjene u ovom području osjetljiviji pokazatelj efekta tretmana. Promjene količine A β u korteksu, mjerene pomoću ELISA testa su slične, ali ne i identične rezultatima imunohistokemijske analize (vidi u daljnjem tekstu).

Ukupni A β je mjeran i u cerebelumu, području koje obično nije pogođeno AD patologijom. Nijedan medijan A β koncentracija bilo koje skupine imunizirane raznim A β peptidima ili APP derivatima nije se razlikovao u ovom području mozga od onih kontrolne skupine, što sugerira da tretman ne utječe na ne-patološke količine A β .

APP koncentracija u korteksu i cerebelumu tretiranih i kontrolnih miševa je također određivana pomoću ELISA testa. Određivana su dva različita sadržaja APP. Prvi, označen kao APP- α /FL, prepoznaje oba: APP-alfa (α , oblik APP, koji je cijepan unutar A β sekvence), i punu dužinu (FL) APP-a, dok drugi prepoznaje samo APP- α . Za razliku od smanjenja A β kod tretiranih skupina, vezanog uz tretman, sadržaj APP kod svih tretiranih skupina ostao je nepromijenjen u odnosu na kontrolne životinje. Ovi rezultati pokazuju da imunizacija A β peptidima ne smanjuje količinu APP, već da je efekt tretmana specifičan za A β .

Zaključak: ukupan sadržaj A β i A β 1-42 signifikantno je smanjen u korteksu tretmanom s AN1792, A β 1-42 glodavaca ili spojem A β 1-5. U hipokampusu je ukupni A β signifikantno smanjen jedino tretmanom s AN1792. Ni jedna druga promjena, vezana uz tretman, u području hipokampusa, korteksa ili cerebeluma nije bila signifikantna.

2. Histokemijska analiza

Mozgovi šest skupina su pripremljeni za imunohistokemijsku analizu: tri skupine imunizirane A β peptidima i to: A β 1-5, A β 1-12 i A β 13-28; dvije skupine imunizirane punom dužinom A β agregata AN1792 i AN1528 te kontrolna skupina tretirana PBS-om. Rezultati sadržaja amiloida, dobivenih analizom slike u područjima mozga kod ovih skupina prikazani su na slici 12. Postojalo je signifikantno smanjenje sadržaja amiloida u kortikalnoj regiji triju tretiranih skupina u usporedbi s kontrolnim životinjama. Najveće smanjenje sadržaja amiloida je opaženo kod skupine, koja je primala AN1792, kod koje je srednja vrijednost smanjena za 97% ($p = 0,001$). Signifikantno smanjenje je opaženo i kod životinja tretiranih s AN1528 (95%, $p = 0,005$) te s A β 1-5 peptidom (67%, $p = 0,02$).

Rezultati dobiveni kvantitativnim određivanjem ukupnog A β ili A β 1-42 pomoću ELISA testa i analize slike se donekle razlikuju. Tretman s AN1528 ima znatan utjecaj na sadržaj kortikalnog amiloida ako se mjeri kvantitativnom analizom slike, ali ne i na koncentraciju ukupnog A β u istom području, ako se mjeri ELISA testom. Ova razlika je vjerojatno uzrokovana specifičnostima ovih analiza. Analiza slike određuje samo netopljivi A β u pločastim nakupinama. Nasuprot tome, ELISA test mjeri sve oblike A β , kako topljive tako i netopljive, monomerne i agregirane. Obzirom da se smatra da je patologija bolesti vezana uz netopljivi dio A β u pločastim nakupinama, to je tehnika analize slike možda osjetljivija u prikazivanju rezultata tretiranja, ali je ELISA test brži i jednostavniji pa je vrlo pogodan za brzi pregled rezultata. To pokazuje i da je smanjenje A β , uzrokovano tretiranjem, veće za A β vezan uz pločaste nakupine nego za ukupni A β .

Da bi se ustanovilo da li A β -specifična antitijela, potaknuta imunizacijom, reagiraju kod tretiranih životinja s nakupljenim amiloidom u mozgu, sekcije tretiranih i kontrolnih miševa su podvrgnute antitijelima specifičnim za mišji IgG. Za razliku od PBS skupine, pločaste nakupine, koje su sadržavale A β , bile su prekrivene s IgG za životinje imunizirane A β peptidima: A β 1-5, A β 1-12 i A β 13-28 te agregatima A β pune dužine: AN1792 i AN1528. Mozgovi životinja imuniziranih drugim A β peptidima ili APP peptidom pBx6 nisu analizirani na ovaj način.

3. Mjerenje količine antitijela

Miševima su uzimani uzorci krvi četiri do sedam dana nakon imunizacije, počevši od druge, a ukupno je uzeto pet uzoraka. Sadržaj antitijela je mjeran vezanjem na A β 1-42 pomoću ELISA testa na ploči s udubinama prevučanim s A β 1-42. Kao što je prikazano na slici 13, sadržaj antitijela postiže maksimum nakon četvrte doze, za ona cjepliva, koja

izazivaju najveću produkciju AN1792-specifičnih antitijela: AN1792 (max. GMT: 94.647), AN1528 (max. GMT: 88.237), Aβ1-12 (max. GMT: 47.216) i Aβ1-42 glodavaca (max. GMT: 10.766). Sadržaj ovih skupina je nešto opao nakon pete i šeste doze. Za preostalih pet imunogena maksimum je postignut nakon pete i šeste doze i bio je mnogo niži nego kod prethodno navedenih: Aβ1-5 (max. GMT: 2.356), pBx6 (max. GMT: 1.986), Aβ13-28 (max. GMT: 1.183), Aβ33-42 (max. GMT: 658), Aβ25-35 (max. GMT: 125). Sadržaj antitijela prema homolognim peptidima je također mjereno uz isti ELISA format za podskup imunogena kod skupina imuniziranih s Aβ1-5, Aβ13-28, Aβ25-35, Aβ33-42 ili Aβ1-42 glodavaca. Ovi sadržaji su bili približno isti kao oni mjereni za Aβ1-42 osim za imunogen Aβ1-42 glodavaca, u kojem slučaju je sadržaj antitijela prema homolognom imunogenu bio približno dva puta viši. Sadržaj AN1792-specifičnih antitijela pojedinih životinja ili srednja vrijednost za tretiranu skupinu nije bio u korelaciji s efikasnošću redukcije Aβ u korteksu.

4. Odgovor produkcijom limfocita

Produkcija limfocita u ovisnosti o količini Aβ je mjerena pomoću stanica slezene uzetih približno jedan tjedan nakon zadnje, šeste imunizacije. Svježe skupljene stanice, 10^5 po udubini, kultivirane su tijekom 5 dana u prisutnosti Aβ1-40 u koncentraciji od 5 μM za stimulaciju. Stanice iz sedam, od ukupno deset skupina, su također kultivirane u prisutnosti reverznog peptida, Aβ40-1. Kao pozitivna kontrola kultivirane su dodatne stanice s mitogenom T stanica, PHA, a kao negativna kontrola, stanice su kultivirane bez dodatka peptida.

Limfociti iz većine životinja su se umnožavali pod djelovanjem PHA. Nije bilo značajnog reagiranja na Aβ40-1 reverzni peptid. Stanice životinja imuniziranih većim agregiranim Aβ peptidima, kao AN1792, Aβ1-42 glodavaca i AN1528 umnožavale su se jako uz stimulaciju s Aβ1-40, uz najviši cpm kod primaoca AN1792. Po jedna životinja u svakoj od skupina, imuniziranih s Aβ1-12, Aβ13-28 i Aβ25-35, pokazivala je umnožavanje pod utjecajem Aβ1-40. Ostale skupine, koje su primile Aβ1-5, Aβ33-42, pBx6 ili PBS nisu imale životinja koje bi reagirale na Aβ. Ovi rezultati su prikazani u tablici 5.

Tablica 5

Imunogen	Konjugirano	Aβ amino kiseline	Reagiralo
Aβ1-5	Da	5-mer	0/7
Aβ1-12	Da	12-mer	1/8
Aβ13-28	Da	16-mer	1/9
Aβ25-35		11-mer	1/9
Aβ33-42	Da	10-mer	0/10
Aβ1-40		40-mer	5/8
Aβ1-42		42-mer	9/9
Aβ1-42 glodavaca		42-mer	8/8
pBx6			0/8
PBS		0-mer	0/8

Ovi rezultati pokazuju da AN1792 i AN1528 izazivaju snažan odgovor T stanica, najvjerojatnije CD4⁺ fenotipa. Odsutnost odgovora Aβ-specifičnih T stanica, kod životinja imuniziranih s Aβ1-5, ne iznenađuje jer su peptidni epitopi, koje prepoznaju CD4⁺ T stanice, obično dugi oko 15 aminokiselina, premda katkada i kraći peptidi mogu djelovati, ali manje efikasno. Tako je većina epitopa pomoćnih T stanica za četiri konjugirana peptida vjerojatno smještena u IgG konjugiranom partneru, a ne u Aβ području. Ovu hipotezu podržava vrlo malen broj slučajeva umnožavanja kod životinja u svakoj od ovih skupina tretiranja. Obzirom da je Aβ1-5 spoj značajno snižavao količinu Aβ u mozgu, usprkos odsutnosti Aβ-specifičnih T stanica antitijelo je ključni faktor izazivanja imunološke reakcije pri imunizaciji ovim peptidom.

Pomanjkanje T stanica i slabi odgovor antitijela za spojeni peptid pBx6, koji obuhvaća APP aminokiseline 592-695 uključujući sve Aβ ostatke, moglo je biti uzrokovano slabom imunogenošću ovog konkretnog preparata. Slaba imunogenost Aβ25-35 agregata je vjerojatno uzrokovana time što je peptid premalen, te je mala vjerojatnost da bi sadržavao dobar epitop T stanica i izazvao produkciju antitijela. Da je taj protein bio vezan na neki protein-nosač vjerojatno bi bio djelotvorniji.

5. Dobivanje poliklonalnih antitijela za pasivnu zaštitu

20 netransgenskih miševa imunizirano je s A β ili nekim drugim imunogenom, eventualno uz dodatak pomoćnog sredstva. Nakon 4-5 mjeseci miševi su ubijeni i uzeta im je krv. Kao opcija, odvojen je IgG od ostalih komponenti krvi. Antitijelo specifično za imunogen može se djelomično pročitati afinitetnom kromatografijom. U prosjeku se dobije 0,5-1 mg antitijela specifičnog za imunogen po mišu, ukupno 5-10 mg.

6. Pasivna imunizacija antitijelima na A β

Skupinama PDAPP miševa starih 7-9 mjeseci ubrizgano je po 0,5 mg poliklonalnog anti-A β u PBS-u ili monoklonalnog specifičnog anti-A β , kao što je pokazano u daljnjem tekstu. Svi preparati antitijela su pročišćeni da bi imali malu količinu endotoksina. Monoklonalna antitijela za neki dio A β se mogu dobiti ubrizgavanjem tog dijela ili duljeg oblika A β u miša, pripravom hibridoma i ispitivanjem hibridoma na antitijelo, koje se specifično veže na željeni fragment A β , a ne veže se na ostale dijelove A β .

Tablica 6

Antitijelo	Epitop
2H3	A β 1-12
10D5	A β 1-12
266	A β 13-28
21F12	A β 33-42
Mišji poliklonalni anti-ljudski A β 42	Anti-agregatni A β 42

Miševima je, prema potrebi, injektiran ip tijekom 4 mjeseca da bi se u cirkulaciji održala koncentracija antitijela mjerena ELISA testom, veća od 1/1000, definirana kao ELISA za A β 42 ili drugi imunogen. Količina je praćena kako je ranije opisano, a nakon 4 mjeseca injektiranja miševi su ubijeni. Histokemija, količina A β i toksikologija su vršeni na mrtvim životinjama. Korišteno je deset miševa po skupini.

7. Usporedba različitih pomoćnih sredstava

Ovi primjeri uspoređuju djelotvornost CFA, alumina, emulzije ulja u vodi i MPL u stimuliranju imunološke reakcije.

A. Materijali i metode

1. Plan ispitivanja

Stotina ženskih, šest tjedana starih zamoraca, Hartley sorte, dobivenih od Elm Hill-a, podijeljeni su u deset skupina da bi bili imunizirani s AN1792 ili njegovim palmitinskim derivatom, kombiniranim s raznim pomoćnim sredstvima. Sedam skupina je primilo injekcije AN1792 (33 μ g, ukoliko nije drugačije specificirano), kombinirane s a) PBS-om, b) Freund-ovim pomoćnim sredstvom, c) MPL-om, d) skvalenom, e) MPL/skvalen-om, f) malom dozom alumina, g) velikom dozom alumina (300 μ g AN1792). Dvije skupine su primile injekcije palmitinskog derivata AN1792 (33 μ g) kombinirane s a) PBS-om, b) skvalenom. Posljednja, deseta skupina je primila samo PBS bez antigena ili dodatnog pomoćnog sredstva. Za skupinu, koja je primila Freund-ovo pomoćno sredstvo, prva doza je bila emulgirana s CFA, a ostale četiri s IFA. Antigen je doziran po 33 μ g za sve skupine, osim one koja je primila veliku dozu alumina, kojoj je dozirano 300 μ g AN1792. Injekcije su davane intraperitonealno za CFA/IFA, a intramuskularno u kvadriiceps stražnjih udova, naizmjenice u lijevu i desnu stranu, za sve ostale skupine. Prve tri doze su davane svaka dva tjedna, a preostale dvije jednom mjesečno. Uzorci krvi za određivanje sadržaja antitijela su uzimani šest do sedam dana nakon svake imunizacije, počevši od druge doze.

2. Dobivanje imunogena

2 mg A β 42 (California Peptide, Lot MEO339) je dodano u 0,9 ml deionizirane vode i energično miješano da bi nastala relativno homogena suspenzija. Dodano je 100 μ l alikvota 10X PBS (1X PBS, 0,15 M NaCl, 0,01 M natrijevog fosfata, pH 7,5). Suspenzija je ponovo energično miješana i inkubirana preko noći na 37 °C, da bi se upotrijebila slijedećeg dana. Neiskorišteni A β 1-42 je spremljen sa sredstvom za sušenje kao liofilizirani prah kod -20 °C.

Palmitinski derivat AN1792 je dobiven spajanjem palmitinskog anhidrida, otopljenog u dimetil-formamidu, na terminalni amino ostatak AN1792 prije uklanjanja nascentnog peptida iz smole tretmanom s fluorovodičnom kiselinom.

Da bi se dobile doze cjepiva s kompletnim Freund-ovim pomoćnim sredstvom (CFA) (grupa 2), emulgirano je 33 µg AN1792 u 200 µl PBS s CFA u omjeru 1:1 (vol:vol) te je dobiveno 400 µl za prvu imunizaciju. Za slijedeće imunizacije, antigen je na sličan način emulgiran s nekompletnim Freund-ovim pomoćnim sredstvom (IFA).

Da bi se dobile doze cjepiva s MPL-om za grupe 5 i 8, dodavan je liofilizirani prah (Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MT) u 0,2%-tnu vodenu otopinu trietilamina do konačne koncentracije od 1 mg/ml i snažno miješano. Smjesa je grijana na 65 do 70 °C tijekom 30 sekundi te je dobivena lagano zamućena, homogena suspenzija micelija. Otopina je pripravljena svježa za svaku seriju injekcija. Za svaku injekciju u grupi 5, miješano je 33 µg AN1792 u 16,5 µl PBS-a s 50 µg MPL-a (50 µl) i 162 µl PBS-a u borosilikatnoj cjevčici, neposredno prije upotrebe.

Da bi se dobile doze cjepiva u niskoj emulziji ulja u vodi, dodavan je AN1792 u PBS-u u 5%-tni skvalen, 0,5%-tni "Tween 80" i 0,5%-tni "Span" u PBS-u da bi se dobila konačna koncentracija pojedine doze od 33 µg AN1792 u 250 µl (grupa 6). Smjesa je emulgirana prolazom kroz ručni uređaj s dvije komore 15 do 20 puta, dok nisu kapljice emulzije pod mikroskopom bile približno istog promjera od 1,0 µm kao one u standardnom lateksu. Dobivena suspenzija bila je opalescentno mliječno bijela. Emulzija je svježe pripremljena za svaku seriju injekcija. Za skupinu 8, dodan je MPL u 0,2%-tnom trietilaminu, u koncentraciji od 50 µg po dozi, u smjesu skvalena i detergenta za emulgiranje, kao što je opisano ranije. Za palmitinski derivat (skupina 7) dodano je 33 µg po dozi palmitin-NH-Aβ1-42 u skvalen i snažno miješano, nakon čega su dodani "Tween 80" i "Span 85" i dalje uz miješanje. Ova smjesa je dodana u PBS do konačne koncentracije od 5% skvalena, 0,5% "Tween 80" i 0,5% "Span 85" te emulgirana kao ranije.

Za dobivanje doza cjepiva s alumom (skupine 9 i 10), dodavan je AN1792 u PBS-u u "Alhydrogel" (gel aluminijevog hidroksida, Accurate, Westbury, NY) do koncentracije od 33 µg (niska doza, skupina 9) ili 300 µg (visoka doza, skupina 10) AN1792 na 5 mg aluma u konačnom volumenu od 250 µl po dozi. Smjesa je lagano miješana 4 sata na sobnoj temperaturi.

3. Mjerenje sadržaja antitijela

Zamorcima su uzimani uzorci krvi šest do sedam dana nakon imunizacije, počevši od druge imunizacije, a ukupno su uzeta 4 uzorka. Količina antitijela na Aβ42 je mjerena ELISA testom kao što je opisano ranije.

4. Dobivanje tkiva

Nakon 14 tjedana svim zamorcima je dan CO₂, skupljena cerebrospinalna tekućina, mozgovi su izvađeni i tri područja mozga (hipokampus, korteks i cerebelum) su izrezani i upotrijebljeni za mjerenje koncentracije ukupnog Aβ proteina pomoću ELISA testa.

B. Rezultati

1. Odgovor antitijela

Postojao je širok raspon djelotvornosti raznih pomoćnih sredstava u izazivanju antitijela nakon imunizacije s AN1792. Kao što je pokazano na slici 14, ako je dodavan AN1792 u PBS-u, nisu nađena antitijela nakon druge ili treće imunizacije, a neznatne količine nakon četvrte i pete doze s geometrijskom sredinom količine (GMT) od samo 45. Emulzija ulje/voda izazvala je osrednju količinu nakon treće doze (GMT 255), koja se održala nakon četvrte doze (GMT 301) i opala nakon konačne doze (GMT 54). Postojao je jasan odgovor antitijela na AN1792 vezan na alum, a količina od 300 µg je bila jače imunogena u svim točkama od one od 33 µg. Na vrhuncu odgovora antitijela, nakon četvrte imunizacije, razlika između dvije doze iznosila je 43% uz GMT od oko 1940 (33 µg) i 3400 (300 µg). Odgovor antitijela na 33 µg AN1792 uz MPL bio je vrlo sličan onome za gotovo deset puta veću količinu antitijela (300 µg) vezan uz alum. Dodavanje MPL u ulje/voda emulziju smanjilo je djelotvornost cjepiva u odnosu na MPL, kao jedini promotor, za 75%. Palmitinski derivat AN1792 bio je potpuno neimunogen u kombinaciji s PBS-om, a umjereno aktivan u ulje/voda emulziji, dajući GMT od 340 u trećem uzorku, a 105 u četvrtom. Najveću količinu antitijela je izazvalo Freund-ovo pomoćno sredstvo s GMT-om od 87000, dakle gotovo 30 puta većim od onog za dva slijedeća najdjelotvornija cjepiva: MPL i veća doza AN1792/alum.

Najviše obećavajuća pomoćna sredstva iz ovog rada su MPL i alum. Od ova dva MPL ima, čini se, prednost, jer je potrebna 10 puta manja doza nego s alumom da bi se postigao isti efekt. Taj se efekt može povećati povećanjem doze antigena i/ili pomoćnog sredstva i optimizacijom vremena imunizacije. Ulje/voda emulzija je vrlo slabo pomoćno sredstvo za AN1792, a dodavanje emulzije u MPL smanjuje njegovu aktivnost.

2. Aβ nivo u mozgu

Nakon približno 14 tjedana, zamorci su duboko anestetizirani, izvađena im je cerebrospinalna tekućina (CSF) i izrezani su mozgovci u podgrupi iz slijedećih skupina: imunizirane uz Freund-ovo pomoćno sredstvo (skupina 2), uz MPL (skupina 5), uz alum i visoku dozu (300 µg) AN1792 (skupina 10) i kontrolne skupine imunizirane PBS-om (skupina 3). Da bi se odredio nivo Aβ peptida, izrezana je jedna hemisfera i priređeni su homogenati hipokampalnog, kortikalnog i cerebelarnog područja u 5 M gvanidinu. Razrijeđeni su i uspoređeni sa serijom Aβ standarda poznate koncentracije u ELISA formatu. Količina Aβ proteina u hipokampusu, korteksu i cerebelumu bila je slična za sve četiri skupine unatoč širokom rasponu proizvedenih antitijela na Aβ izazvanih tim cjepivima. Srednja vrijednost količine Aβ iznosila je u hipokampusu 25 ng/g tkiva, u korteksu 21 ng/g, a u cerebelumu 12 ng/g.. Velika količina cirkulirajućeg Aβ, tijekom gotovo tri mjeseca kod nekih životinja, nije dakle mijenjala ukupnu količinu Aβ u njihovom mozgu. Količina Aβ u CSF bila je također vrlo slična među skupinama. Pomanjkanje velikog utjecaja imunizacije s AN1792 na urođenu razinu Aβ ukazuje da je imunološka reakcija usmjerena na patološko stvaranje Aβ.

VIII. Imunološka reakcija uz razna pomoćna sredstva kod miševa

Za ovo ispitivanje upotrijebljene su šest tjedana stare ženke švicarskih Webster miševa, s po 10-13 životinja po skupini. Imunizacija je provedena potkožno, u dozama po 200 µl, na dane: 0, 14, 28, 60, 90 i 20. U svim formulacijama je korišten PBS kao pufer. Životinjama je uzimana krv sedam dana nakon svake imunizacije, počevši od druge doze, za analizu sadržaja antitijela pomoću ELISA testa. Režim tretiranja svake skupine prikazan je u tablici 7.

Tablica 7

Eksperimentalni dizajn betablok ispitivanja 010					
Skupina	N ^a	Promotor ^b	Doza	Antigen	Doza (µg)
1	10	MPL	12,5 µg	AN1792	33
2	10	MPL	25 µg	AN1792	33
3	10	MPL	50 µg	AN1792	33
4	13	MPL	125 µg	AN1792	33
5	13	MPL	50 µg	AN1792	150
6	13	MPL	50 µg	AN1528	33
7	10	PBS		AN1792	33
8	10	PBS		-	33
9	10	Skvalen emulgiran	5%	AN1792	33
10	10	Skvalen umiješan	5%	AN1792	33
11	10	Alum	2 mg	AN1792	33
12	13	MPL + alum	50 µg / 2 mg	AN1792	33
13	10	QS21	5 µg	AN1792	33
14	10	QS21	10 µg	AN1792	33
15	10	QS21	25 µg	AN1792	33
16	13	QS21	25 µg	AN1792	150
17	13	QS21	25 µg	AN1528	33
18	13	QS21 + MPL	25 µg / 50 µg	AN1792	33
19	13	QS21 + alum	25 µg / 2 mg	AN1792	33

^a broj miševa u svakoj skupini na početku eksperimenta.

^b Pomoćna sredstva su navedena. Pufer za svaku formulaciju je bio PBS. Za skupinu 8 nije bilo ni pomoćnog sredstva ni antigena.

Količine antigena na Aβ42, određene ELISA testom, u svakoj skupini prikazane su u tablici 8.

Tablica 8

Geometrijska sredina količine antitijela					
Tjedan uzimanja uzorka krvi					
Skupina	2,9	5,0	8,7	12,9	16,7
1	248	1797	2577	6180	4177
2	598	3114	3984	5287	6878
3	1372	5000	7159	12333	12781
4	1278	20791	14368	20097	25631
5	3288	26242	13229	9315	23742
6	61	2536	2301	1442	4504
7	37	395	484	972	2149
8	25	25	25	25	25
9	25	183	744	952	1823
10	25	89	311	513	817
11	29	708	2618	2165	3666
12	198	1458	1079	612	797
13	38	433	566	1080	626
14	104	541	3247	1609	838
15	212	2630	2472	1224	1496
16	183	2616	6680	2085	1631
17	28	201	375	222	1540
18	31699	15544	23095	6415	9059
19	63	243	554	299	441

Iz tablice se vidi da su najveće količine dobivene za skupine 4, 5 i 18, u kojima su pomoćna sredstva bila 125 µg MPL, 50 µg MPL i QS21 plus MPL.

IX. Terapeutska djelotvornost raznih pomoćnih sredstava

Ovo ispitivanje je provođeno na PDAPP transgenskim miševima sa skupinom pomoćnih sredstava podesnih za primjenu na ljudima, kako bi se odredila njihova sposobnost da izazovu imunološku reakciju na Aβ i s tim u vezi uklanjanje amiloidnih nakupina u mozgu.

Sto osamdeset muških i ženskih, 7,5 do 8,5 mjeseci starih heterozigotnih PDAPP transgenskih miševa dobiveno je od Charles River Laboratories. Miševi su podijeljeni u devet skupina s po 15 do 23 životinje da bi bili imunizirani s AN1792 ili AN1528 uz razna pomoćna sredstva. Životinje su bile raspoređene po spolu, dobi i porijeklu tako da skupine budu što sličnije. Pomoćna sredstva su uključivala alum, MPL i QS21, svaki kombiniran s oba antigena te Freund-ovo pomoćno sredstvo (FA), kombinirano samo s AN1792. Dodatna skupina je imunizirana s AN1792 u PBS puferu s konzervansom timerosalom, ali bez pomoćnog sredstva. Deveta skupina je imunizirana samo s PBS-om za negativnu kontrolu.

Dobivanje agregiranih Aβ peptida: ljudski Aβ1-40 (AN1528; California Peptides Inc., Napa, CA; Lot ME0541) i ljudski Aβ1-42 (AN1792; California Peptides Inc., Lot ME0439) peptidi bili su svježe otopljeni, za svaku seriju injekcija, od liofiliziranog praha čuvanog na suhom pri -20 °C. Za tu svrhu 2 mg peptida je dodano u 0,9 ml deionizirane vode i miješano do nastanka relativno homogene otopine ili suspenzije. AN1528 je pri tome bio topljiv, a AN1792 nije. Tada je dodano 100 µl alikvota 10X PBS-a (1X PBS: 0,15 M NaCl, 0,01 M natrijevog fosfata, pH 7,5), pri čemu se AN1528 počeo taložiti. Suspenzija je ponovo miješana i držana na 37 °C za primjenu slijedećeg dana.

Za dobivanje doza cjepiva s alumom (skupine 1 i 5), dodan je Aβ peptid u PBS-u u "Alhydrogel" (2%-tni vodeni gel aluminijevog hidroksida, Sargeant, Inc., Clifton, NJ) da bi se postigla koncentracija od 100 µg Aβ peptida na 1 mg aluma. Dodano je 10X PBS do konačnog volumena doze od 200 µl u 1X PBS-u. Suspenzija je, prije davanja injekcije, lagano miješana približno 4 sata na sobnoj temperaturi.

Za dobivanje doza cjepiva s MPL-om (skupine 2 i 6), dodan je liofilizirani prah (Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MT, Lot 67039-E0896B) u 0,2%-tnu vodenu otopinu trietilamina do konačne koncentracije od 1 mg/ml te snažno miješano. Smjesa je grijana na 65 do 70 °C tijekom 30 sekundi te je dobivena lagano zamućena, homogena suspenzija micelija. Otopina je čuvana na 4 °C. Za svaku seriju injekcija, pomiješano je po dozi 100 µg peptida u 50 µl PBS-a, 50 µg MPL-a (50 µl) i 100 µl PBS-a u borosilikatnoj cjevčici, neposredno prije upotrebe.

Za dobivanje doza cjepiva s QS21-om (skupine 3 i 7), liofilizirani pah (Aquila, Framingham, MA; Lot A7018R) je dodan u PBS, pH 6,6-6,7, do konačne koncentracije od 1 mg/ml i snažno miješan. Otopina je čuvana na –20 °C. Za svaku seriju injekcija, pomiješano je po dozi 100 µg peptida u 50 µl PBS-a, 25 µg QS21 u 25 µl PBS-a i 125 µl PBS-a u borosilikatnoj cjevčici, neposredno prije upotrebe.

Za dobivanje doza cjepiva s Freund-ovim pomoćnim sredstvom (skupina 4), emulgirano je 100 µg AN1792 u 200 µl PBS-a u omjeru 1:1 (vol.:vol.) s kompletnim Freund-ovim pomoćnim sredstvom (CFA) do konačnog volumena od 400 µl za prvu imunizaciju. Za sljedeće imunizacije je antigen na sličan način emulgirano s nekompletnim Freund-ovim pomoćnim sredstvom (IFA). Za cjepiva, koja su kao pomoćno sredstvo sadržavala alum, MPL ili QS21, miješano je 100 µg po dozi AN1792 ili AN1528 s alumom (1 mg po dozi), MPL-om (50 µg po dozi) ili s QS21 (25 µg po dozi) do konačnog volumena od 200 µl PBS-a te je unošeno potkožnim cijepjenjem u leđa između lopatica. Za skupine, koje su primale FA, emulgirano je 100 µg AN1792 u omjeru 1:1 (vol.:vol.) s kompletnim Freund-ovim pomoćnim sredstvom (CFA) do konačnog volumena od 400 µl i davano, za prvu imunizaciju, intraperitonealno, a sljedećih pet doza, s istom količinom imunogena, je davano s nekompletnim Freund-ovim pomoćnim sredstvom (IFA). Za skupine, koje su primale AN1792 bez pomoćnog sredstva, kombinirano je 10 µg AN1792 i 5 µg timerosala do konačnog volumena od 50 µl u PBS-u te je nanašano potkožno. Prve tri doze su davane svaka dva tjedna, a zatim mjesečno na dane 0, 16, 28, 56, 85 i 112. Životinjama je uziman uzorak krvi šest do sedam dana nakon svake imunizacije, počevši od druge doze, da bi se izmjerila količina antitijela. Životinje su ubijene približno tjedan dana nakon posljednje doze. ELISA testom određivana je količina Aβ i APP u mozgu, a imunohistokemijskom procjenom određivana je prisutnost amiloidnih pločastih nakupina. Osim toga određivan je sadržaj Aβ-specifičnih antitijela te imunološki odgovor na Aβ i citokine.

Tablica 9 pokazuje da je najveći sadržaj antitijela na Aβ1-42 izazvan kombinacijom FA i AN1792 te da je kulminirao nakon četvrte imunizacije (GMT: 75386), a opao za 59% nakon posljednje, šeste imunizacije. Maksimalni sadržaj antitijela izazvan kombinacijom MPL i AN1792 bio je za 62% niži nego kod prethodne kombinacije (GMT: 28867), a izazvan je rano u imunizacijskoj shemi, nakon 3 doze, nakon čega je slijedio pad od 28% nakon šeste imunizacije. Kombinacija QS21 i AN1792 je dala oko pet puta niži sadržaj od MPL (GMT: 1511), a i kinetika razvoja je bila sporija, jer je trebala dodatna imunizacija da bi se postigla ta vrijednost. Sadržaj antitijela generiran s AN1792 vezanim na alum bio je neznatno veći od onog s QS21, a i brzina odgovora je bila veća. Za AN1792 u PBS-u uz timerosal bili su sadržaj antitijela i brzina jedva nešto veći nego za sam PBS. Maksimalni sadržaj antitijela za kombinaciju MPL i AN1528 (pik GMT 3099) bio je oko 9 puta niži nego onaj s AN1792. AN1528 vezan na alum, jedva da je bio imunogen i pokazivao je slabu reakciju samo kod nekih životinja. Nikakva reakcija nije opažena kod kontrolnih životinja imuniziranih sa samim PBS-om.

Tablica 9

Geometrijska sredina količine antitijela ^a					
Tjedan uzimanja uzorka					
Tretman	3,3	5,0	9,0	13,0	17,0
Alum/ AN1792	102 (12/21) ^b	1081 (17/20)	2366 (21/21)	1083 (19/21)	572 (18/21)
MPL/ AN1792	6241 (21/21)	28867 (21/21)	11242 (21/21)	5665 (20/20)	8204 (20/20)
QS21/ AN1792	30 (1/20)	227 (10/19)	327 (10/19)	1511 (17/18)	1188 (14/18)
CFA/ AN1792	10076 (15/15)	61279 (15/15)	75386 (15/15)	41628 (15/15)	30574 (15/15)
Alum/ AN1528	25 (0/21)	33 (1/21)	39 (3/20)	37 (1/20)	31 (2/20)
MPL/ AN1528	184 (15/21)	2591 (20/21)	1653 (21/21)	1156 (20/20)	3099 (20/20)
QS21/ AN1528	29 (1/22)	221 (13/22)	51 (4/22)	820 (20/22)	2994 (21/22)
PBS plus Timerosal	25 (0/16)	33 (2/16)	39 (4/16)	37 (3/16)	47 (4/16)
PBS	25 (0/16)	25 (0/16)	25 (0/15)	25 (0/12)	25 (0/16)

Opaske:

^a Geometrijska sredina količine antitijela na A β 1-42

^b Broj odziva po skupini

Rezultati tretmana s AN1792 ili AN1528, uz razna pomoćna sredstva ili timerosal, na količinu kortikalnog amiloida kod 12 mjeseci starih miševa, određeni ELISA testom, prikazani su na slici 15. Kod kontrolnih PDAPP miševa, starih 12 mjeseci, tretiranih samo PBS-om, medijan količine ukupnog A β u korteksu bio je 1817 ng/g. Primjetno niže količine A β nađene su kod miševa tretiranih s AN1792 plus CFA/IFA, AN1792 plus alum, AN1792 plus MPL i QS21 plus AN1792. Smanjenje je dostiglo statističku signifikantnost ($p < 0,05$) samo za AN1792 plus CFA/IFA. Međutim, kao što je pokazano u primjerima I i III, efekti imunizacije na smanjenje količine A β postali su se bitno veći kod miševa starih 15 i 18 mjeseci. Očekuje se da će u najmanju ruku AN1792 plus alum, AN1792 plus MPL i AN1792 plus QS21 dostići statističku signifikantnost kod tretmana starijih miševa. Nasuprot tome AN1792 plus konzervans timerosal pokazivao je približno isti medijan količine A β kao kod miševa tretiranih PBS-om. Slični rezultati su dobiveni kad su uspoređivane kortikalne količine A β 42. Medijan količine A β 42 kod kontrolnih miševa tretiranih PBS-om bio je 1624 ng/g. Zamjetno niži medijani: 403, 1149, 620 i 714 nađeni su kod miševa tretiranih s AN1792 plus CFA/IFA, AN1792 plus alum, AN1792 plus MPL i AN1792 plus QS21, a sniženje je dostiglo statističku signifikantnost ($p = 0,05$) kod skupine tretirane s AN1792 plus CFA/IFA. Medijan količine A β 42 kod miševa tretiranih s AN1792 plus timerosal iznosio je 1619 ng/g.

X. Analiza toksičnosti

Nakon ispitivanja, opisanih u primjerima 2, 3 i 7, uzeti su uzorci tkiva za histopatološku analizu. Dodatno su izvršena hematološka i kliničko-kemijska ispitivanja na konačnim uzorcima krvi za primjer 3 i 7. Ispitana je većina bitnih organa uključujući mozak, pluća, limfni sustav, gastrointestinalni trakt, jetra, bubrege, nadbubrežne i spolne žlijezde. Premda su povremeno opažene ozljede kod ispitivanih životinja, nije bilo zamjetne razlike, bilo u tkivu, koje je pogođeno ili u ozbiljnosti ozljeda kod netretiranih životinja i onih tretiranih s AN1792. Nije bilo specifičnih histopatoloških povreda zapaženih kod životinja tretiranih s AN1792 u usporedbi s netretiranima ili onim tretiranim s PBS-om, a isto važi i za AN1782. Također nije bilo razlike u kliničko-kemijskom profilu između skupina tretiranih uz razna pomoćna sredstva i životinja iz primjera 7, koje su tretirane PBS-om. Premda je bilo značajnog povećanja nekih hematoloških parametara kod životinja iz primjera 7 tretiranih s AN1792 uz Freund-ovo pomoćno sredstvo u usporedbi s životinjama tretiranim PBS-om, taj tip efekata je očekivan za tretman Freund-ovim pomoćnim sredstvom i prateći peritonitis i ne ukazuje na neki štetni efekt tretmana s AN1792. Premda ne kao dio toksikološkog ispitivanja, patologija mozga PDAPP miševa je pažljivo proučavana zbog ocjene konačne efikasnosti. Ni kod jednog ispitivanja nije opažen neki štetni efekt na morfologiju mozga vezan uz tretman. Ovi rezultati pokazuju da se tretman s AN1792 dobro podnosi i da je barem u osnovi bez štetnih nuspojava.

XI. Prevencija i tretman subjekata

Prva faza ispitivanja je uključivala jednu dozu za utvrđivanje sigurnosti. Terapeutsko sredstvo je davano raznim pacijentima uz povećavanje doze, počevši s 0,01 očekivane efikasne količine i povećavajući uz faktor tri do količine 10 puta veće od doze efikasne kod miševa.

Faza II je provedena da bi se utvrdila terapijska efikasnost. Izabrani su pacijenti s ranim ili srednjim stadijem Alzheimerove bolesti, prema kriterijima "Alzheimer's disease and Related Disorders Association" (ADRD). Podesni pacijenti su oni s ocjenom 12-26 prema "Mini-Mental State Exam" (MMSE). Ostali kriteriji su bili: vjerojatnost da će pacijent živjeti dovoljno dugo te da ne postoji mogućnost komplikacija, na primjer, uslijed primanja nekih lijekova. Osnovna procjena pacijentovog stanja je izvršena klasičnim psihometrijskim mjerenjima kao što su MMSE i ADAS, što je opsežna skala za procjenu pacijenata sa statusom Alzheimer-ove bolesti. Ova skala daje mjeru za napredovanje Alzheimer-ovog stanja. Tretman se može pratiti i raznim podesnim procjenama za kvalitetu života. Napredovanje bolesti se može pratiti i pomoću MRI, određivanjem količine antitijela specifičnih za imunogen u krvi i odgovorom T-stanica.

Nakon osnovnih postupaka, počinje se s tretmanom pacijenata, koji su prema slučajnom ključu podijeljeni u dvije skupine od kojih jedna prima terapijsko sredstvo, a druga placebo. Pacijenti se kontroliraju najmanje svakih šest mjeseci. Efikasnost se određuje prema signifikantnosti razlika u napredovanju bolesti između ovih dviju skupina.

Drugo ispitivanje druge faze se provodi da bi se pratio prijelaz pacijenata od stanja gubitka pamćenja, katkad nazivanog staračkim gubitkom pamćenja (AAMI), u stanje Alzheimer-ove bolesti, definirano prema ADRD kriteriju. Pacijenti sa visokim rizikom za prijelaz u stanje Alzheimer-ove bolesti se biraju među nekliničkom populacijom prema ranim znakovima gubitka pamćenja ili drugim poteškoćama vezanim za pre-Alzheimer-ovu simptomatologiju, zatim prema obiteljskoj povijesti, genetskim faktorima rizika, dobi, spolu i ostalim simptomima koji upućuju na visoki rizik od

Alzheimer-ove bolesti. Skupljaju se rezultati osnovnih mjerenja uključujući MMSE i ADAS te mjerenja namijenjenih normalnoj populaciji. Pacijenti su podijeljeni u dvije skupine, od kojih jedna prima tretman, a druga placebo. Pacijenti se prate u intervalima od oko šest mjeseci, a na kraju promatranja daje se konačna ocjena da li je pacijent prešao u stanje Alzheimer-ove bolesti prema ADRDA kriteriju.

XII. Materijali i postupci

1. Mjerenje sadržaja antitijela

Miševima su uzimani uzorci krvi od oko 200 μ l, iz malog zareza u repnoj veni, u mikro-cjevčice. Zamorci su najprije obrijani na stražnjem dijelu gležnja, a zatim je u mikro-cjevčicu uziman uzorak krvi iglom br. 18 iz metatarsalne vene. Krv je ostavljena da se grušta kroz jedan sat na sobnoj temperaturi (RT), a zatim je promiješana i centrifugirana kod 14000 g tijekom 10 minuta da bi se zgrušani dio odvojio od seruma. Serum je prenet u čistu mikro-cjevčicu i pohranjen na 4 °C do mjerenja.

Sadržaj antitijela je određivan ELISA testom. Mikro-ploča sa 96 udubina ("Costar EIA" ploče) je prevučena sa 100 μ l otopine, koja je sadržavala 10 μ g/ml A β 42 ili SAPP ili druge antigene u puferu, za prevlačenje udubina (0,1 M natrijevog fosfata, pH 8,5, 0,1% natrijev azid) i držana preko noći na sobnoj temperaturi. Udubine su ispuhane te su dodani uzorci seruma počevši sa razrjeđenjem 1/100 u razrjeđivaču za uzorke (0,014 M natrijevog fosfata, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 0,6% albumina iz goveđeg seruma, 0,05% timerosala). Serija od sedam razrjeđenja u koracima od 3 $\times$ do konačnog razrjeđenja od 1/218.700 je ubačena u udubljenja i inkubirana jedan sat na sobnoj temperaturi. Ploče su četiri puta isprane PBS-om, koji je sadržavao 0,05% "Tween 20". Dodano je u udubine drugo antitijelo: anti-mišji Ig iz koze, vezan na peroksidazu (dobiveno od Boehringer-a, Mannheim) i to po 100 μ l 1/3000 razrijeđene otopine u razrjeđivaču za uzorke, i držano 1 sat na sobnoj temperaturi. Ploče su ponovo isprane četiri puta PBS-om uz "Tween 20". Da bi se razvili kromogeni, dodano je u svaku udubinu po 100 μ l "Slow TMB" (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin, dobiveno od Pierce Chemicals-a) i držano 15 minuta na sobnoj temperaturi. Reakcija je zaustavljena dodatkom 25 μ l 2 M H₂SO₄. Intenzitet boje je određivan instrumentom "Molecular Devices Vmax" kod 450 nm do 650 nm). Količina je definirana kao recipročna vrijednost razrjeđenja seruma, koje je dalo polovicu maksimalne ekstinkcije. Maksimalna efikasnost je općenito očitana kod početnog 1/100 razrjeđenja, osim u slučajevima vrlo velikog sadržaja, kada je trebalo koristiti veća razrjeđenja. Ako je točka 50% padala između dva razrjeđenja, korištena je linearna ekstrapolacija za izračunavanje sadržaja. Za računanje geometrijske sredine količine antitijela, dodijeljena je vrijednostima manjim od 100 vrijednost 25.

2. Određivanje proliferacije limfocita

Miševi su anestetizirani izofluranom, odstranjena im je slezena, isprana dva puta sa 5 ml PBS-a, koji je sadržavao 10% toplinom inaktiviranog goveđeg, fetalnog seruma (PBS-FBS), homogenizirana u 50 μ l "Centricon" jedinici (Dako A/S, Danska) u 1,5 ml PBS-FBS tijekom 10 sekundi kod 100 o/min. u "Medimachine" (Dako) i filtrirana kroz najlonsko sito sa porama veličine 100 μ . Splenociti su isprani sa 15 ml PBS-FBS i granulirani centrifugiranjem kod 200 g tijekom 5 minuta. Crvena krvna zrnca su otopljena suspendiranjem granula u 5 ml pufera, koji je sadržavao 0,15 M NH₄Cl, 1 M KHCO₃, 0,1 M NaEDTA, pH 7,4, tijekom 5 minuta na sobnoj temperaturi. Leukociti su isprani na već opisani način. Svježe izolirane stanice slezene (10⁵ stanica po udubini) su kultivirane u trostrukim serijama, tijekom 96 sati na 37 °C, u mikrotitar pločama sa dnom u obliku slova U (Corning, Cambridge, MA) u RPMI 1640 mediju ("JRH Biosciences", Lenexa, KS) uz dodatak 2,05 mM/l glutamina, 1% penicilin/streptomcina i 10% FBS-a, inaktiviranog toplinom. Razni A β peptidi, A β 1-16, A β 1-40, A β 1-42 ili A β 40-1 sa proteinom obrnutog slijeda su također dodani u dozama od 5 μ M do 0,18 μ M u četiri koraka. Stanice u kontrolnim udubinama su kultivirane sa "Concanavalinom A" (Con A) ("Sigma", kat # C-5275) u količini od 1 μ g/ml bez dodatka proteina. Stanice su posljednja 24 sata tretirane sa ³H timidinom (1 μ Ci / udubini) dobivenim od Amersham Corp., Arlington Heights, IL. Stanice su tada skupljene na "Unifilter" ploče, a radioaktivnost je mjerena brojačem "TopCount Microplate Scintillation Counter" firme "Packard Instruments", Downers Grove, IL. Rezultati su izraženi kao broj impulsa na minutu (cpm) radioaktivnosti ugrađene u netopljive makromolekule.

4. Dobivanje moždanog tkiva

Nakon eutanazije mozak je izvađen i jedna polutka je uzeta za imunohistokemijsku analizu, dok su iz druge izrezane tri regije (hipokampus, korteks i cerebelum) i korištene za mjerenje koncentracije raznih A β proteina i APP oblika upotrebom specifičnog ELISA testa (Johnson-Wood i suradnici, opisano ranije).

Tkiva određena za ELISA test su homogenizirana u 10-terostrukom volumenu ledenog gvanidin pufera (5,0 M gvanidin-HCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0). Homogenizirani uzorci su lagano mućkani na Adams-mučkalici ("Fisher")

tijekom tri sata na sobnoj temperaturi i spremljeni na -20°C prije određivanja A β i APP. Raniji pokusi su pokazali da su materijali stabilni pod ovim uvjetima i da se sintetski A β protein (Bachem) može kvantitativno odrediti nakon dodavanja u kontrolno moždano tkivo miševa iz istog legla. (Johnson-Wood i suradnici, opisano ranije).

5. Mjerenje količine A β

Homogenizirani uzorci mozga su razrijeđeni u omjeru 1:10 ledenim kazeinskim razrjeđivačem (0,25% kazeina, PBS, 0,05% natrijevog azida, 20 $\mu\text{g/ml}$ aprotinina, 5 mM EDTA, pH 8,0, 10 $\mu\text{g/ml}$ leupeptina) i centrifugirani kod 16000 g tijekom 20 minuta na 4°C . Sintetski standardi A β proteina (1-42 aminokiselina) i APP standardi su tako priređeni da uključuju 0,5 M gvanidina i 0,1% albumina iz goveđeg seruma (BSA) u konačnom sastavu. "Totalni" A β ELISA sendvič koristi monoklonalno antitijelo (mAb) 266, specifično za A β -aminokiseline 13-28 (Seubert i suradnici) kao hvatač antitijela, a biotinirani mAb 3D6 specifičan za A β aminokiseline 1-5 (Johnson-Wood i suradnici), kao dojavno antitijelo. 3D6 mAb ne prepoznaje izlučeni APP ili APP pune dužine, već detektira samo A β vrste sa aspartatnom kiselinom kao terminalnom. Ova analiza ima donju granicu osjetljivosti od ~ 50 pg/ml (11 pM) i ne reagira na urođeni mišji A β protein do koncentracija od 1 ng/ml (Johnson-Wood i suradnici, vidi ranije).

A β 1-42 specifični ELISA sendvič koristi mAb 21F12, specifičan za A β aminokiseline 33-42 (Johnson-Wood i suradnici) kao hvatače antitijela. Biotinirani mAb 3D6 je dojavno antitijelo i kod ove analize, koja ima donju granicu osjetljivosti od oko 125 pg/ml (28 pM, Johnson-Wood i suradnici). Za A β ELISA testove korišteno je po 100 μl mAb 266 (kod 10 $\mu\text{g/ml}$) ili mAb 21F12 (kod 5 $\mu\text{g/ml}$) za prevlačenje udubina u pločama sa 96 udubina ("Costar") uz inkubiranje preko noći na sobnoj temperaturi. Otopina je uklonjena odsisavanjem, a udubine su blokirane dodavanjem 200 μl 0,25%-tnog albumina iz ljudskog seruma PBS pufera tijekom 1-og sata na sobnoj temperaturi. Tekućina za blokiranje je uklonjena, a osušene ploče su, do upotrebe, čuvane na 4°C . Ploče su, prije upotrebe, ponovo navlažene puferom za ispiranje (Tris-puferirana slana otopina (0,15 M NaCl, 0,01M tris-HCl, pH 7,5), plus 0,05% "Tween 20"). Uzorci i standardi su dodani tripliciranim alikvotima od 100 μl po udubini i inkubirani preko noći na 4°C . Ploče su isprane barem tri puta puferom za ispiranje između svakog koraka analize. Dodan je biotinirani mAb 3D6, razrijeđen na 0,5 $\mu\text{g/ml}$ u kazeinskom puferu (0,25% kazeina, PBS, 0,05% "Tween 20", pH 7,4) i inkubirano u udubinama kroz 1 sat na sobnoj temperaturi. Avidin-peroksidaza, (Avidin-HRP dobiven od "Vector", Burlingame, CA), razrijeđena u omjeru 1:4000 u kazeinskom puferu, dodana je u udubine i držana 1 sat na sobnoj temperaturi. Dodan je kolorimetrijski supstrat "Slow TMB-ELISA" (Pierce) i ostavljen da reagira 15 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega je zaustavljena enzimatska reakcija dodatkom 25 μl 2 N H_2SO_4 . Produkt reakcije je kvantificiran mjerenjem na "Molecular Devices Vmax" razlike u apsorbanciji na 450 i 650 nm.

6. Mjerenje APP nivoa

Korištene su dvije različite analize za određivanje APP. Prva, označena kao APP- α /FL, prepoznaje i APP-alfa (α) i oblik APP pune dužine (FL). Druga je specifična za APP- α . Analiza APP- α /FL prepoznaje izlučeni APP uključivši prvih 12 aminokiselina A β -a. Budući da dojavno antitijelo (2H3) nije specifično za α -clip položaj, koji se nalazi između aminokiselina 612 i 613 u APP695 (Esch i suradnici, Science 248, 1122-1124 (1990)), ova analiza također prepoznaje punu dužinu APP (APP-FL). Preliminarni pokusi sa APP antitijelima imobiliziranim na citoplazmatski kraj APP-FL-a, da bi se odstranio APP-FL iz moždanih homogeniziranih uzoraka, sugeriraju da je približno 30-40% APP- α /FL zaista FL (podaci nisu dati). Hvatačko antitijelo i za APP- α /FL i za APP- α analizu je mAb 8E5 usmjeren na aminokiseline 444 do 592 iz APP695 (Games i suradnici, navedeno ranije). Dojavni mAb za APP- α /FL analizu je mAb 2H3, specifičan za aminokiseline 597-608 u APP695 (Johnson-Wood i suradnici, navedeno ranije), a dojavno antitijelo za APP- α analizu je biotinirani derivat mAb 16H9 usmjeren na aminokiseline 605 do 611 APP-a. Donja granica osjetljivosti APP- α /FL analize je oko 11 ng/ml (150pM) (Johnson-Wood i suradnici), a za analizu specifičnu za APP- α 22 ng/ml (0,3 nM). Za obje APP analize, mAb 8E5 je nanesen u udubine EIA ploča sa 96 udubina, kao što je navedeno ranije za mAb 266. Pročišćeni, rekombinirani, izlučeni APP- α je upotrijebljen kao referentni standard za APP- α i APP- α /FL analizu (Esch i suradnici, navedeno ranije). Moždani homogenizirani uzorci u 5 M gvanidinu su razrijeđeni u omjeru 1:10 u ELISA razrjeđivaču za uzorke (0,014 M fosfatni pufer, pH 7,4, 0,6% albumina iz goveđeg seruma, 0,05% timerosala, 0,5 M NaCl, 0,1% NP40). Nakon toga su razrijeđeni u omjeru 1:4 u razrjeđivaču za uzorke, koji je sadržavao 0,5 M gvanidina. Razrijeđeni homogenizirani uzorci su zatim centrifugirani kod 16000 g tijekom 15 sekundi na sobnoj temperaturi. APP standardi i uzorci su dodani na ploče u duplim alikvotima i inkubirani 1,5 sata na sobnoj temperaturi. Biotinirana dojavna antitijela 2H3 ili 16H9 su inkubirana sa uzorcima 1 sat na sobnoj temperaturi. Streptavidin-alkalna fosfataza ("Boehringer", Mannheim), razrijeđena u omjeru 1:1000 u razrjeđivaču za uzorke, je inkubirana u udubinama 1 sat na sobnoj temperaturi. Fluorescentni supstrat 4-metil-umbeliferil-fosfat je dodan i inkubiran 30 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega su ploče očitane na "Cytofluor tm 2350" fluorimetru ("Millipor") kod 365 nm ekscitacije i 450 nm emisije.

7. Imunohistokemija

Mozgovi su fiksirani tri dana na 4 °C u PBS-u sa 4%-tnim paraformaldehidom i tada spremljeni tijekom 1-og do 7 dana na 4 °C u PBS-u sa 1% paraformaldehida, do sekcije. Četrdeset mikrona debele koronalne sekcije su rezane na vibratomu kod sobne temperature i spremljene u krioprotektantu (30% glicerol, 30% etilenglikol u fosfatnom puferu) na -20 °C prije imunohistokemijskog procesiranja. Za svaki mozak, šest sekcija na nivou dorsalnog hipokampusa, svaka odijeljena konsekvativnim intervalom od 240 µm, inkubirano je preko noći sa jednim od slijedećih antitijela: (1) biotiniranim anti-Aβ (mAb, 3D6, specifični za ljudski Aβ) razrijeđenom do koncentracije od 3 µg/ml u PBS-u i 1%-tnom konjskom serumu; (2) biotiniranim mAb specifičnom za ljudski APP, 8E5, razrijeđenim do koncentracije od 3 µg/ml u PBS-u i 1%-tnom konjskom serumu; (3) mAb, specifičnim za glialne fibrilne kisele proteine (GFAP; "Sigma Chemical Co."), razrijeđenom u omjeru 1:500 smjesom 0,25% Triton X-100 i 1% konjskog seruma u Tris-puferiranoj slanoj otopini, pH 7,4 (TBS); (4) mAb specifičnim za CD11B, MAC-1 antigen ("Chemicon International") razrijeđenim u omjeru 1:100 smjesom 0,25% Triton X-100 i 1% seruma kunića u TBS-u; (5) mAb specifičnim za MHC II antigen, (Pharmingen) razrijeđenom u omjeru 1:100 smjesom 0,25% Triton X-100 i 1% seruma kunića u TBS-u; (6) štakorskim mAb specifičnim za CD 43, ("Pharmingen") razrijeđenim u omjeru 1:100 sa 1% seruma kunića u PBS-u; (7) štakorskim mAb specifičnim za CD 45RA, ("Pharmingen") razrijeđenim u omjeru 1:100 sa 1% seruma kunića u PBS-u; (8) štakorskim monoklonalnim mAb specifičnim za CD 45RB, ("Pharmingen") razrijeđenim u omjeru 1:100 sa 1% seruma kunića u PBS-u; (9) štakorskim monoklonalnim mAb specifičnim za CD 45, ("Pharmingen") razrijeđenim u omjeru 1:100 sa 1% seruma kunića u PBS-u; (10) biotiniranim poliklonalnim Aβ hrčka specifičnim za CD3e, ("Pharmingen") razrijeđenim u omjeru 1:100 sa 1% seruma kunića u PBS-u; (11) štakorskim mAb specifičnim za CD3, ("Serotec") razrijeđenim u omjeru 1:200 sa 1% seruma kunića u PBS-u; (12) otopinom PBS-a bez primarnog antitijela sa 1% normalnog konjskog seruma.

Uzorci, koji su reagirali sa otopinama antitijela navedenim ranije u 1,2 i 6-12, prethodno su tretirani sa 1%-tnim Tritonom X-100 i 0,4%-tnim vodikovim peroksidom u PBS-u tijekom 20 minuta na sobnoj temperaturi da bi se blokirala unutarnja peroksidaza. Nakon toga su inkubirani preko noći na 4 °C sa primarnim antitijelima. Uzorci, koji su reagirali sa 3D6, 8E5 ili CD3e mAb, tretirani su tada tijekom jednog sata na sobnoj temperaturi sa peroksidaza-avidin-biotin kompleksom, sa komponentama A i B ("Vector Elite Standard Kit", "Vector Labs", Burlingame, CA), razrijeđenima u omjeru 1:75 u PBS-u. Uzorci, koji su reagirali sa antitijelima specifičnim za CD 45RA, CD 45RB, CD 45, CD3 i sa otopinom PBS-a bez primarnog antitijela, inkubirani su 1 sat na sobnoj temperaturi sa biotiniranim anti-štakorskim IgG (Vector) razrijeđenim u omjeru 1:75 u PBS-u ili biotiniranim anti-mišjim IgG (Vector) razrijeđenim u omjeru 1:75 u PBS-u. Uzorci su tada tretirani tijekom jednog sata na sobnoj temperaturi sa peroksidaza-avidin-biotin kompleksom, sa komponentama A i B ("Vector Elite Standard Kit", "Vector Labs", Burlingame, CA), razrijeđenima u omjeru 1:75 u PBS-u.

Uzorci su razvijeni u 0,01%-tnom vodikovom peroksidu i 0,05%-tnom 3,3'-diaminobenzidinu (DAB) na sobnoj temperaturi. Uzorci, određeni za inkubaciju sa GFAP-, MAC-1- i MHC II-specifičnim antitijelima, prethodno su tretirani sa 0,6%-tnim vodikovim peroksidom na sobnoj temperaturi da bi se blokirala unutarnja peroksidaza, a nakon toga su inkubirani preko noći sa primarnim antitijelima pri 4 °C. Uzorci, koji su reagirali sa GFAP-antitijelom, inkubirani su 1 sat na sobnoj temperaturi sa biotiniranim anti-mišjim IgG, priređenim u konju ("Vector Laboratories"; "Vectastain Elite ABC kit") razrijeđenim u omjeru 1:200 sa TBS-om. Uzorci su nakon toga tretirani 1 sat avidin-biotin-peroksidaza kompleksom (Vector Laboratories; Vectastain Elite ABC kit) razrijeđenim u omjeru 1:1000 sa TBS-om. Uzorci inkubirani sa MAC-1- ili MHC II-specifičnim mAb, kao primarnim antitijelima, tretirani su nakon toga 1 sat na sobnoj temperaturi sa biotiniranim anti-štakorskim IgG proizvedenim u kuniću, razrijeđenim u omjeru 1:200 sa TBS-om, nakon čega su inkubirani 1 sat sa avidin-biotin-peroksidaza kompleksom, razrijeđenim u omjeru 1:1000 sa TBS-om. Uzorci, inkubirani sa GFAP-, MAC-1- i MHC II-specifičnim antitijelima, vizualizirani su tretmanom na sobnoj temperaturi sa 0,05%-tnim DAB-om, 0,01%-tnim vodikovim peroksidom, 0,04%-tnim niklovim kloridom ili TBS-om tijekom 4 ili 11 minuta.

Imuno-označeni uzorci su stavljeni na stakalca ("VWR", "Superfrost slides"), sušeni na zraku preko noći, uronjeni u "Propar" ("Anatech") i pokriiveni pokrovnim stakalcem uz primjenu "Permout"-a ("Fisher") kao medija.

Obojene Aβ naslage, podskup GFAP-pozitivnih uzoraka, stavljene su na "Superfrost" stakalca i inkubirane 7 minuta u 1%-tnoj vodenoj otopini Tioflavina S (Sigma), a nakon toga su imunohistokemijski obrađene, dehidrirane i izbistrene u "Propar"-u i prekrivene pokrovnim stakalcem uz primjenu "Permout"-a.

8. Analiza slika

"Videometric 150" sistem za analizu slika ("Oncor", inc., Gaithersburg, MD), povezan sa "Nikon Microphot-FX" mikroskopom preko CCD video kamere i "Sony Trinitron" monitora, korišten je za kvantitativnu procjenu imunoreaktivnih dijapozitiva. Slika uzorka je spremljena u video-pufer i na temelju boje i zasićenja određena je ukupna površina piksela, koji obuhvaćaju imuno-označene strukture. Za svaki uzorak je hipokampus ručno označen te je izračunata ukupna površina piksela, koju zauzima hipokampus. Postotak sadržaja amiloida je određen kao: udio površine hipokampusa koji sadrži A β nakupine koje su imunološki reagirale sa mAb 3D6 $\times$ 100. Na sličan način određen je sadržaj neurita kao: udio površine hipokampusa koja sadrži distrofične neurite koji su reagirali sa mAb 8E5 $\times$ 100. "C-Imaging System" ("Compix", Inc., Cranberry Townshio, PA) uz "Simple 32" program bio je povezan na "Nikon Microphot-FX" mikroskop preko "Optronics" kamere i korišten za kvantitativno određivanje postotka retrosplenialnog korteksa zauzetog GFAP-pozitivnim astrocitima te MAC-1 i MHC II pozitivnim mikroglia. Slika uzorka podvrgnutog imunoj reakciji je pohranjena u video-puferu te je određen monokromni prag za određivanje ukupne površine piksela zauzete imuno-označenim stanicama. Za svaki uzorak je ručno označen retrosplenialni korteks (RSC) i izračunata je ukupna površina piksela, koju zauzima RSC. Postotak astrocitoze je određen kao: udio RSC-a zauzet GFAP-reaktivnim astrocitima $\times$ 100. Na sličan način je definiran postotak mikroglioze kao: udio RSC-a zauzet MAC-1 ili MHC II-reaktivnim mikroglia $\times$ 100. Za svaku slikovnu analizu, kvantitativno su za svaku životinju određena po šest uzoraka dorsalnog hipokampusa, odvojena konsektivnim intervalima od 240 μ m. U svim slučajevima je tretman životinja bio nepoznat mjeritelju.

Premda je ovaj izum detaljno opisan zbog boljeg razumijevanja, očito je da su moguće i izvjesne modifikacije unutar postavljenih zahtjeva. Sve publikacije i patentni dokumenti, ovdje citirani, obuhvaćeni su u potpunosti referencom.

TABLICA 1									
KOLIČINA KOD 50% MAKS. EKSTINKCIJE									
Skupina A β injektiranih miševa									
Dob PDAPP	Miš 100	Miš 101	Miš 102	Miš 103	Miš 104	Miš 105	Miš 106	Miš 107	Miš 108
4	70000	150000	15000	120000	1000	15000	50000	80000	100000
6	15000	65000	30000	55000	300	15000	15000	50000	60000
8	20000	55000	50000	50000	400	15000	18000	50000	60000
10	40000	20000	60000	50000	900	15000	50000	20000	40000
12	25000	30000	60000	40000	2700	20000	70000	25000	20000
PBS injektirani miševi sa oba imunogena na 1/100									
	Miš 113	Miš 114	Miš 115	Miš 116	Miš 117				
6	<4 $\times$ bkg	<4 $\times$ bkg	<4 $\times$ bkg	<4 $\times$ bkg	<4 $\times$ bkg				
10	5 $\times$ bkg	<4 $\times$ bkg	<4 $\times$ bkg	<4 $\times$ bkg	<4 $\times$ bkg				
12	<4 $\times$ bkg	<4 $\times$ bkg	<4 $\times$ bkg	<4 $\times$ bkg	<4 $\times$ bkg				

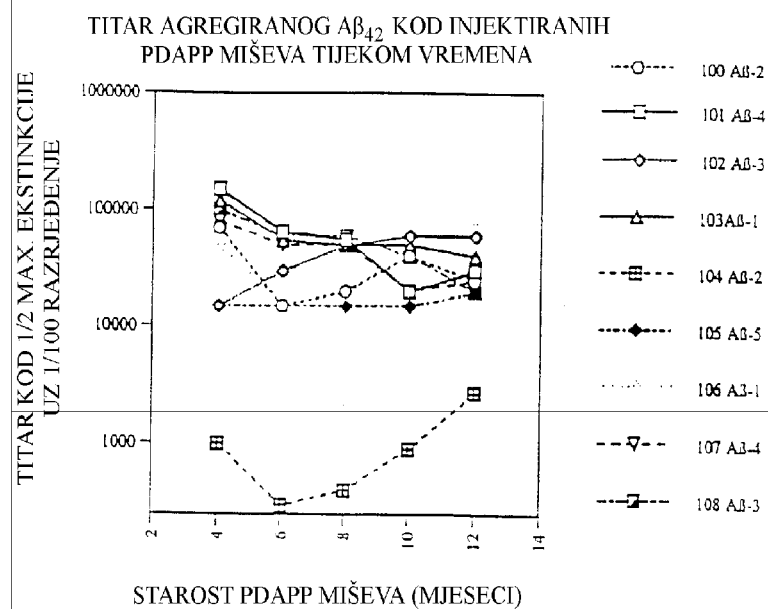
PATENTNI ZAHTJEVI

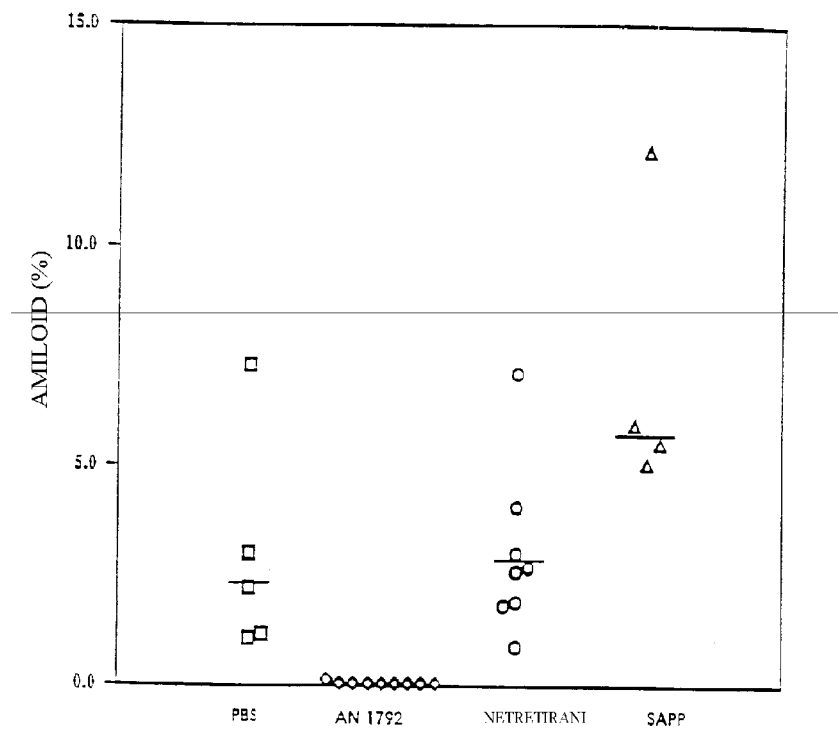
1. Protutijelo na A β , ili aktivni fragment ili derivat protutijela, **naznačeno time** da je za uporabu u prevenciji ili liječenju bolesti koju karakteriziraju amiloidne naslage kod pacijenta, gdje navedeno protutijelo inducira imuni odgovor vežući se na A β u pacijentu.
2. Protutijelo prema zahtjevu 1, **naznačeno time** da je monoklonsko protutijelo.
3. Protutijelo prema zahtjevu 2, **naznačeno time** da je humanizirano protutijelo ili humano protutijelo.
4. Protutijelo prema zahtjevu 3, **naznačeno time** da je izotop humani IgG1.
5. Protutijelo prema bilo kojim od prethodnih zahtjeva, **naznačeno time** da je Fab, Fab', F(ab')₂ ili Fv fragment, ili koje je jednolančano protutijelo.
6. Protutijelo prema bilo kojem od prethodnih zahtjeva, **naznačeno time** da se specifično veže na agregirani oblik peptida A β bez da se veže za disocirani oblik.
7. Protutijelo prema bilo kojem od zahtjeva 1-5, **naznačeno time** da se specifično veže na disocirani oblik peptida A β bez da se veže na agregirani oblik.
8. Protutijelo prema bilo kojem od zahtjeva 1-5, **naznačeno time** da se veže i na agregirani i disocirani oblik peptida A β .
9. Protutijelo prema bilo kojem od prethodnih zahtjeva, **naznačeno time** da se amiloidne naslage sastoje od agregiranog peptida A β .
10. Protutijelo prema bilo kojem od prethodnih zahtjeva, **naznačeno time** da je pacijent čovjek.
11. Protutijelo prema bilo kojem od prethodnih zahtjeva, **naznačeno time** da je bolest Alzheimerova bolest.
12. Protutijelo prema bilo kojem od prethodnih zahtjeva, **naznačeno time** da je pacijent asimptomatski opcionalno da je pacijent mlađi od 50, i/ili je naslijedio faktore rizika koje indiciraju sklonost ka Alzheimerovoj bolesti.
13. Protutijelo prema bilo kojem od prethodnih zahtjeva, **naznačeno time** da se antitijelo primjenjuje oralno, subkutano, intramuskularno, topikalno ili intravenozno.
14. Protutijelo prema bilo kojem od prethodnih zahtjeva, **naznačeno time** da se primjenjuje u dozama od 0,01 do 5 mg/kg tjelesne mase domaćina primatelja.
15. Protutijelo prema bilo kojem od prethodnih zahtjeva, **naznačeno time** da se primjenjuje prva imunizacijom nakon koje slijede pobuđivači u intervalima od 6 tjedana, ili kod kojeg se primjenjuje prva imunizacija nakon koje slijede pobuđivači 1, 2 i 12 mjeseci kasnije, ili koje se primjenjuje svaka 2 mjeseca doživotno.
16. Postupak in vitro praćenja Alzheimerove bolesti ili sklonosti ka njoj kod pacijenta, **naznačen time** da se sastoji od: detekcije protutijela koje se specifično veže na peptid A β u uzorku od pacijenta, gdje se protutijelo, o kojem se govori u u bilo kojem od zahtjeva 1-8, učinkovito u liječenju ili prevenciji Alzheimerove bolesti primjenjuje kod pacijenta, i nivo detektiranog protutijela određuje režim tretmana pacijenta u budućnosti.
17. Postupak in vitro procjene učinkovitosti postupka liječenja Alzheimerove bolesti kod pacijenata, **naznačen time** da se sastoji od određivanja vrijednosti za količinu protutijela specifičnih za peptid A β u tkivnom uzorku pacijenta koji se tretira protutijelom o kojem se govori u bilo kojem od zahtjeva 1-8; usporedba vrijednosti s kontrolnom vrijednosti određenoj u populaciji pacijenata kod kojih je došlo do poboljšanja, ili nestanka simptoma Alzheimerove bolesti zbog liječenja s protutijelom o kojem se govori u bilo kojem od zahtjeva 1-8; gdje je vrijednost kod pacijenta najmanje jednaka kontrolnoj vrijednosti koja označava pozitivan odgovor na liječenje.

SAŽETAK

Izum daje sastave i postupke za tretiranje amiloidnih bolesti. Ti postupci zahtijevaju davanje sredstava koja pobuđuju imunološki odgovor na amiloidne naslage u pacijenta. Postupci su osobito korisni za profilaktički i terapijski tretman Alzheimerove bolesti. Kod takvih postupaka, pogodno sredstvo je A β peptid ili njegova antitijela.

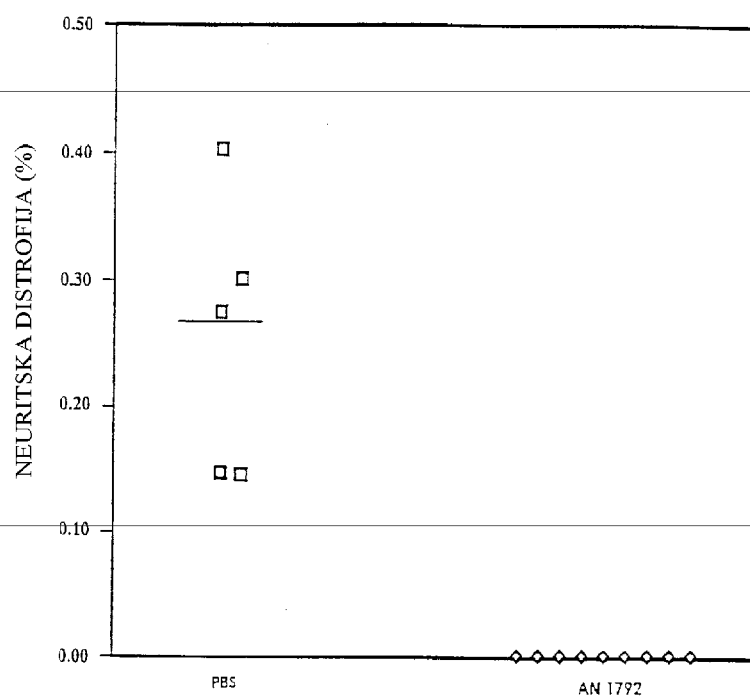
Slika 1



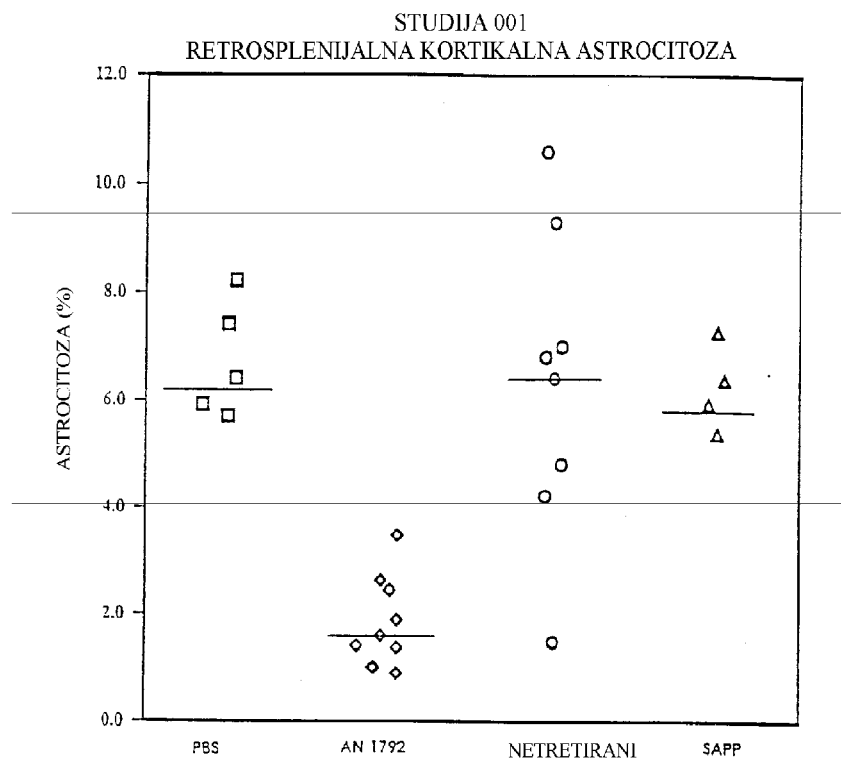


Slika 3

STUDIJA 001
KOLIČINA HIPOKAMPALIH NEURITSKIH PLAKOVA

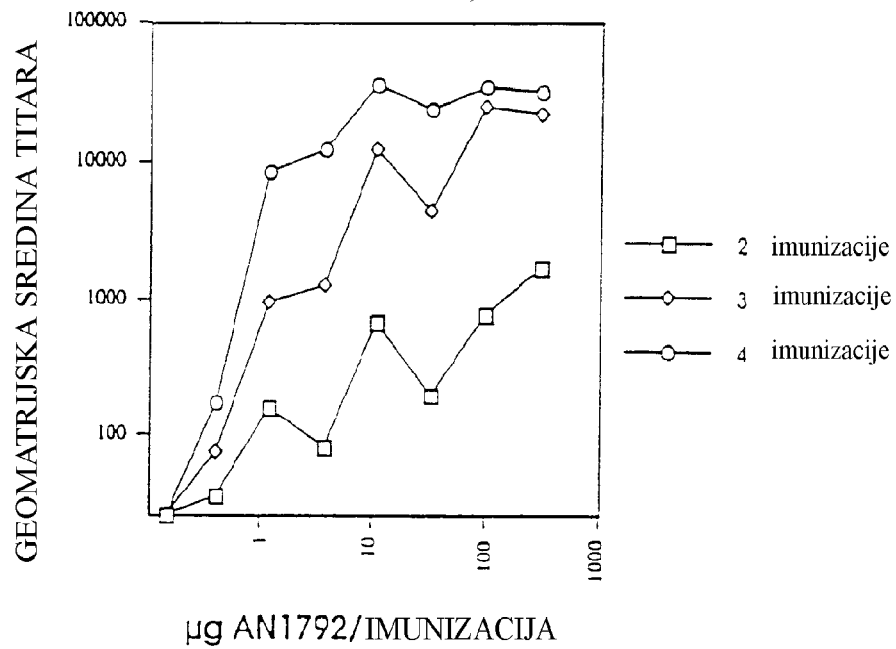


Slika 4



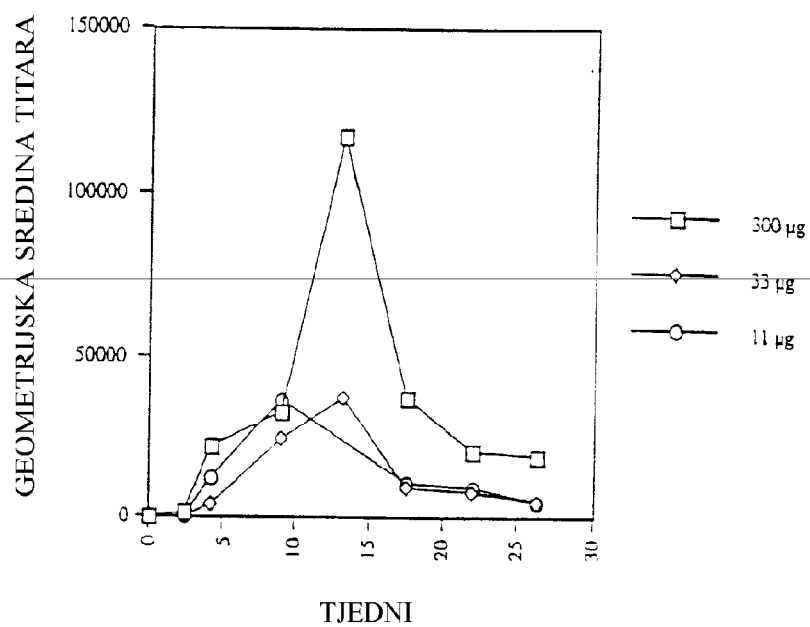
Slika 5

TITAR ANTITIJELA KAO ODGOVOR NA
RAZNE DOZE AN1792 POSLIJE 2,3 i 4 IMUNIZACIJE



Slika 6

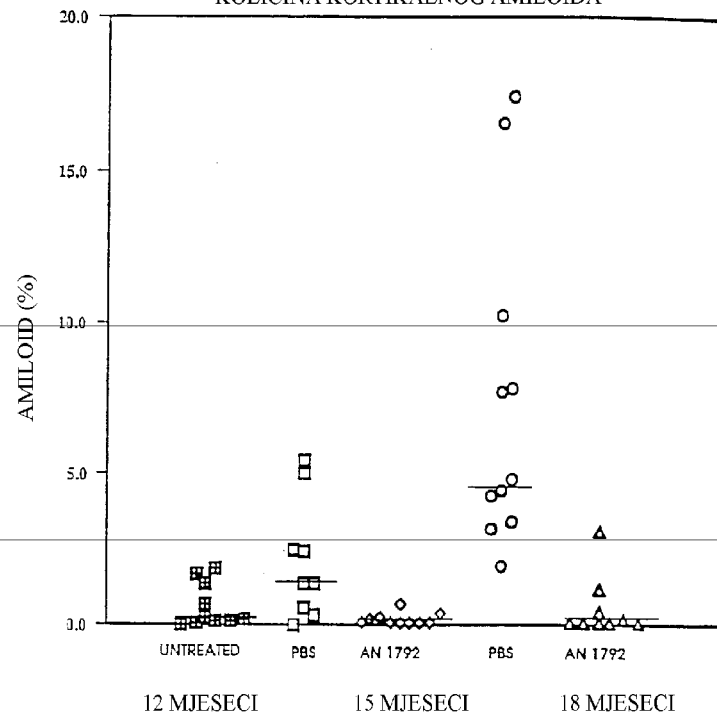
KINETIKA ODGOVORA ANTITJELA NA AN1792

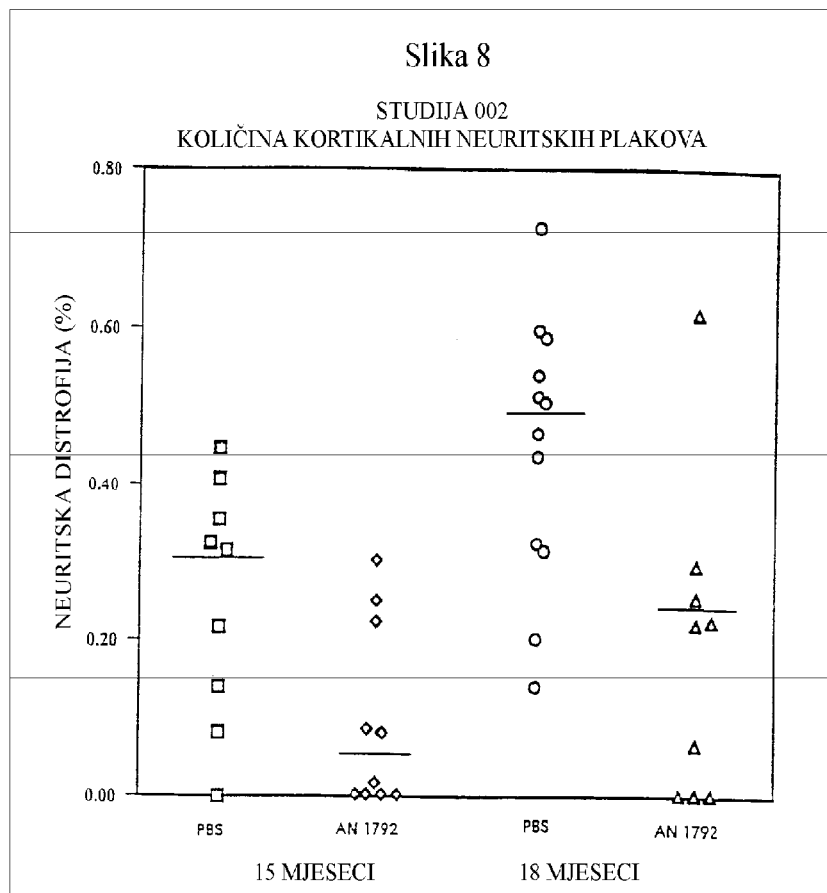


Slika 7

STUDIJA 002

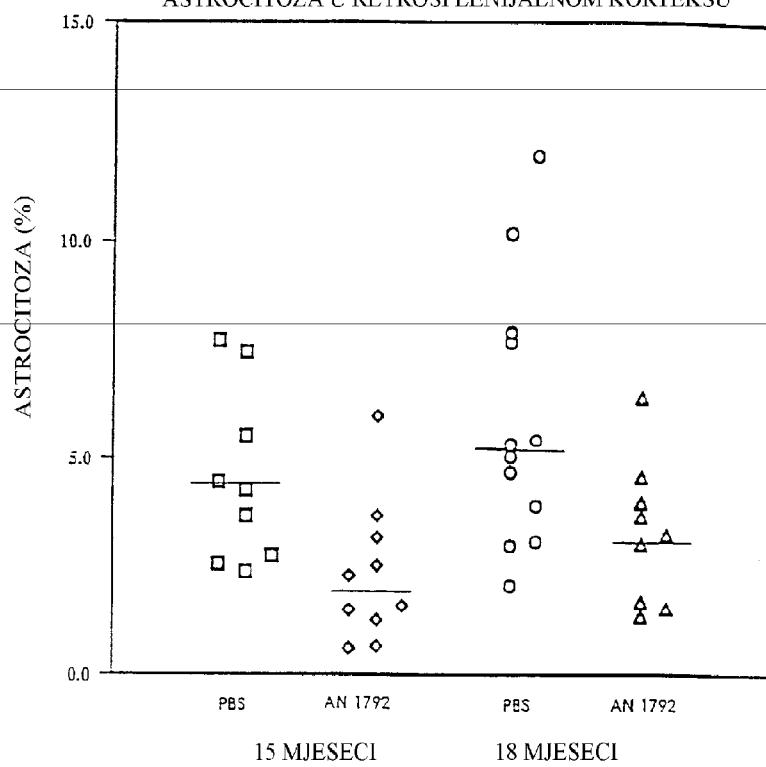
KOLIČINA KORTIKALNOG AMILOIDA





Slika 9

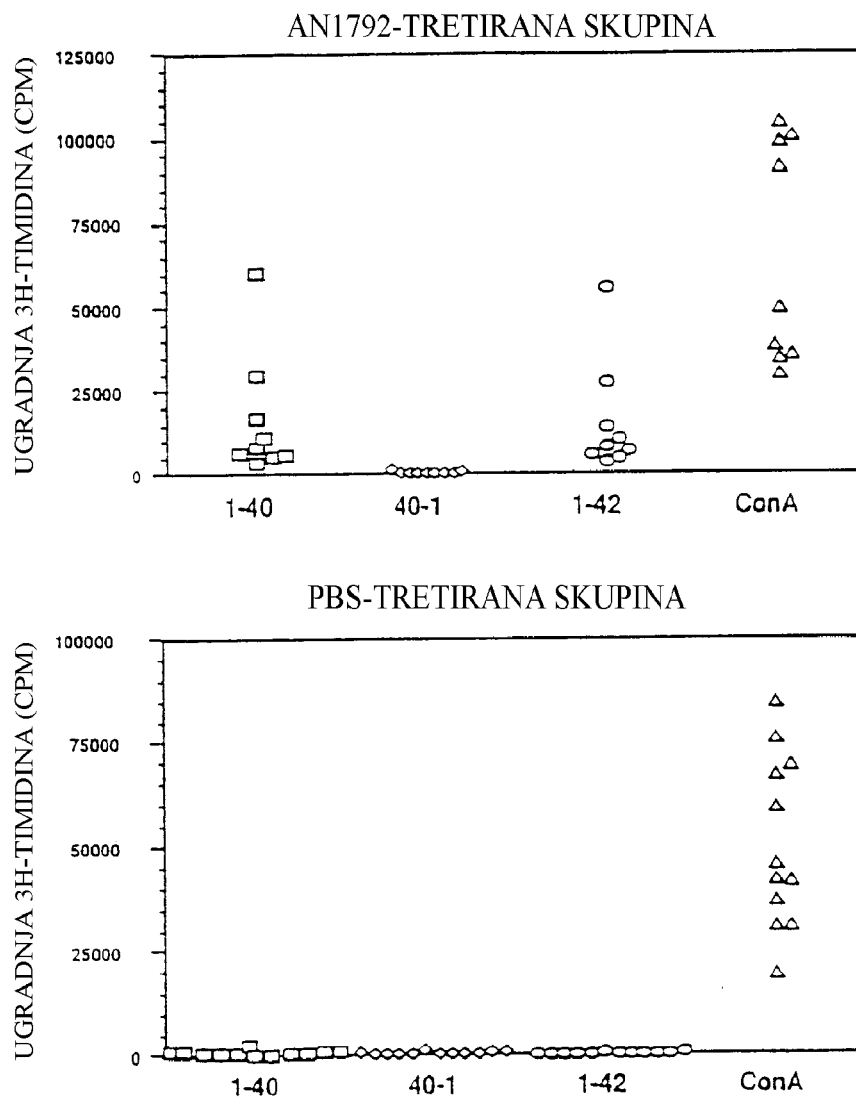
STUDIJA 002
ASTROCITOZA U RETROSPLENIJALNOM KORTEKSU



Slika 10

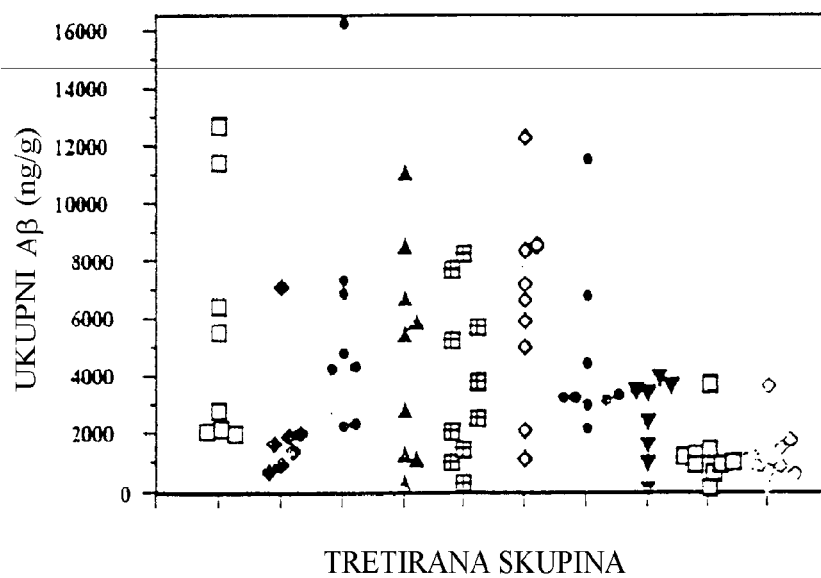
STUDIJA 002

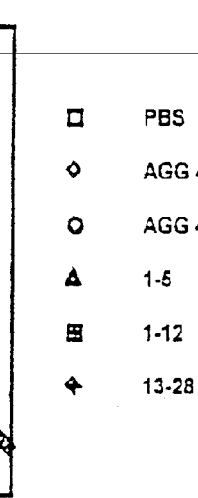
ASTROCITOZA U RETROSPLENIJALNOM KORTEKSU



Slika 11

STUDIJA 006
TERAPIJSKA DJELOTVORNOST $A\beta$ FRAGMENTATA
PODACI ZA UKUPNI $A\beta$ U KORTIKUSU

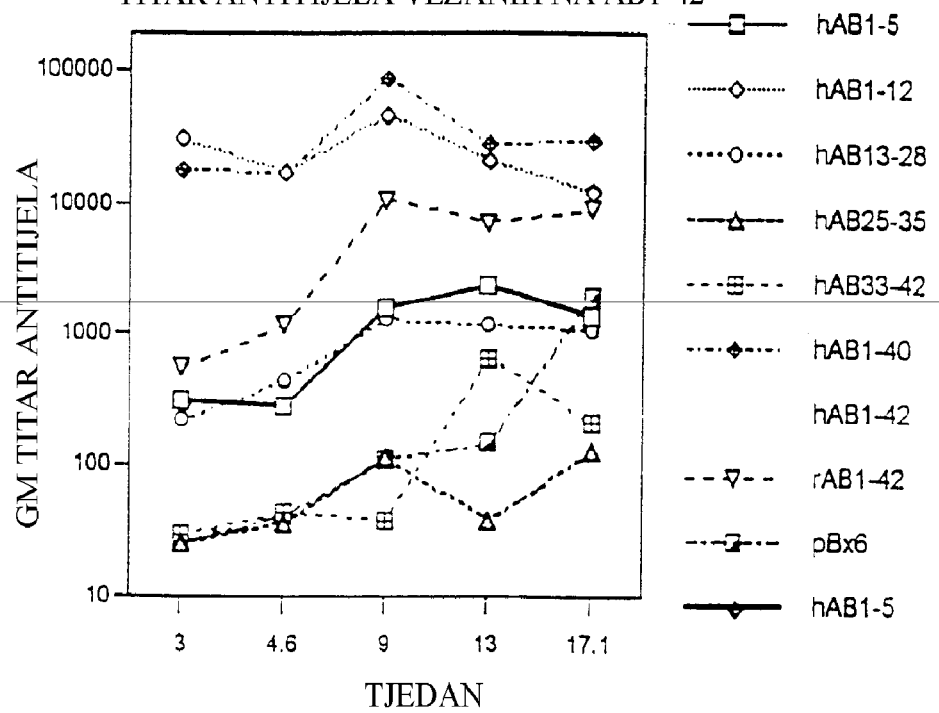




Slika 13

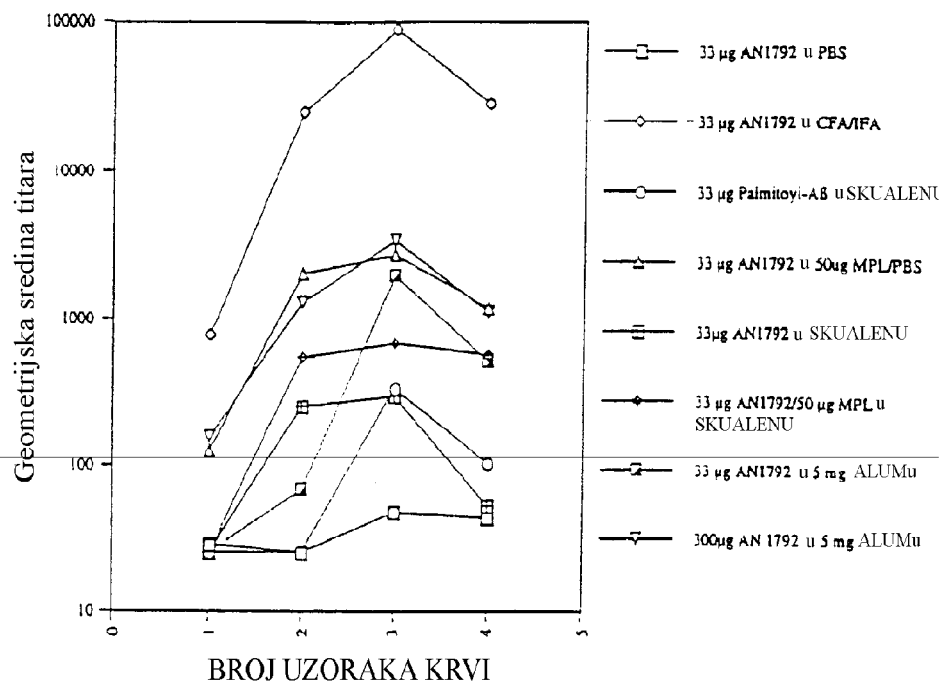
STUDIJA 006

TITAR ANTITIJELE VEZANIH NA AB1-42



Slika 14

ODGOVOR ANTITIJELA NA AN1792
SA RAZNIM POMOĆNIM SREDSTVIMA



KORTEKS

PBS KONTROLNI		NETRETIRANI KONTROLNI	
624-165	272	764-181	3470
625-166	1802	785-182	171
626-167	62	766-183	91
633-168	4696	767-184	6692
634-169	3090	768-185	1353
671-170	2417	771-186	1153
672-171	2840	772-187	3800
829-172	3320	780-188	3740
830-173	1833	843-189	163
831-174	416	844-190	122
792-175	126	845-191	427
793-176	2559	846-192	2674
794-177	289	887-193	453
732-178	179	888-194	2996
733-179	1329	889-195	1075
734-180	5665		
MEDIJAN	1817	MEDIJAN	1153
p VRIJEDNOST (M-W)		p VRIJEDNOST (M-W)	
PROSJEK	1931	PROSJEK	1825
ST. DEVIJACIJA	1718	ST. DEVIJACIJA	1769
% CV	89	% CV	97
p VRIJEDNOST (t TEST)	n=16	p VRIJEDNOST (t TEST)	n=15

SLIKA 15A

KORTEKS

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

SLIKA 15B

KORTEKS

25 mg QS21 100 µg AN1528		CEA/IFA 100 µg AN1792	
615-128	1257	539-068	693
616-129	361	640-069	508
617-130	1008	641-070	440
536-131	3290	642-071	467
637-132	2520	690-072	42
638-133	3880	691-073	2491
744-134	627	692-074	121
745-135	58	795-075	137
746-136	2610	796-076	822
747-137	1509	797-077	475
769-138	1788	748-087	600
770-139	988	749-079	78
773-140	1199	750-080	1267
774-141	339	751-081	1351
775-142	402	761-082	69
776-143	537		
840-144	1119		
841-145	194		
821-146	1259		
822-147	5413		
823-148	2233		
MEDIJAN	1199	MEDIJAN	475
p VRIJEDNOST (M-W)		p VRIJEDNOST (M-W)	0,0481
PROSJEK	1552	PROSJEK	637
ST. DEVIJACIJA	1364	ST. DEVIJACIJA	655
% CV	88	% CV	103
p VRIJEDNOST (t TEST)	n=21	p VRIJEDNOST (t TEST)	0,0106 n=15

SLIKA 15C

KORTEKS

5 µg THIMEROSAL/PBS 10 µg AN1792		2 µg ALUMA 100 µg AN1792	
635-149	1337	610-001	432
669-150	4644	611-002	1012
670-151	6335	612-003	3607
673-152	3700	613-004	508
674-153	2750	620-005	465
676-154	1687	621-006	16
681-156	185	622-007	28
682-157	8031	623-008	217
683-158	3450	708-009	2738
754-159	157	709-010	927
755-160	6857	710-011	1609
756-161	482	716-012	1608
805-162	524	784-014	3890
806-163	397	785-015	1614
807-164	234	786-018	285
		787-017	3102
		788-018	1617
		789-019	1474
		815-020	424
		816-021	1375
		817-022	2323
MEDIJAN	1687	MEDIJAN	1375
p VRIJEDNOST (M-W)		p VRIJEDNOST (M-W)	0,5000
PROSJEK	2718	PROSJEK	1394
ST. DEVIJACIJA	2685	ST. DEVIJACIJA	1166
% CV	99	% CV	84
p VRIJEDNOST (t TEST)		p VRIJEDNOST (t TEST)	0,2650
	n=15		n=21

SLIKA 15D

KORTEKS

50 µg MPL 100 µg AN1792		25 µg QS21 100 µg AN1792	
646-023	2002	627-045	91
647-024	147	628-046	3397
648-025	1304	631-049	3702
649-026	34	632-050	1776
650-027	980	667-052	1832
724-028	1282	668-053	3023
726-030	1966	686-054	189
727-031	733	687-055	891
720-032	2563	688-056	240
721-033	5563	689-057	110
802-034	113	712-059	3311
803-035	671	825-061	1009
804-036	51	826-062	18165
811-037	613	827-063	73
812-038	332	828-064	78
813-039	1454	837-065	1051
814-040	2441	838-066	270
833-014	742	839-067	371
834-042	40		
836-044	807		
MEDIJAN	774	MEDIJAN	950
p VRIJEDNOST (M-W)	0,1710	p VRIJEDNOST (M-W)	0,4076
PROSJEK	1792	PROSJEK	2199
ST. DEVIJACIJA	1299	ST. DEVIJACIJA	4187
% CV	109	% CV	190
p VRIJEDNOST (t TEST)	0,1506	p VRIJEDNOST (t TEST)	0,8131
n=21		n=18	

SLIKA 15E