

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

302 971

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLového
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2001-4154**
(22) Přihlášeno: **01.06.2000**
(30) Právo přednosti: **01.06.1999 US 60/137010**
(40) Zveřejněno: **13.11.2002**
(Věstník č. 11/2002)
(47) Uděleno: **16.12.2011**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **25.01.2012**
(Věstník č. 4/2012)
(86) PCT číslo: **PCT/US2000/015239**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2000/072876**

(56) Relevantní dokumenty:

WO 99/27944; WO 95/31996; US 5441870.

(73) Majitel patentu:

ELAN PHARMA INTERNATIONAL LIMITED,
County Westmeath, IE

(72) Původce:

Schenk Dale B., Burlingame, CA, US

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS Praha a.s., Jivenská 1273/1, Praha 4,
14021

(54) Název vynálezu:

**Farmaceutický prostředek pro léčbu
amyloidních onemocnění, způsoby prevence a
prognózy**

(57) Anotace:

Farmaceutický prostředek pro prevenci nebo léčbu řady amyloidních onemocnění, mezi něž patří Alzheimerova choroba, prionová onemocnění, familiální amyloidní neuropatie atd. Farmaceutické prostředky obsahují imunologicky účinná množství amyloidních vláknitých složek tvořících vlákna. Popsány jsou také léčebné prostředky a způsoby, které užívají imunitní činidla reagující s těmito vláknitými složkami.

CZ 302971 B6

Farmaceutický prostředek pro léčbu amyloidních onemocnění, způsoby prevence a prognózy

5 Oblast techniky

Tento vynález popisuje prostředky a metody pro léčbu amyloidních stavů u lidí a obratlovců.

10 Dosavadní stav techniky

Amyloidóza je obecný termín zahrnující množství nemocí jež jsou charakterizovány extra-
celulárním ukládáním proteinových vláken, která tvoří početní „amyloidní plak“, jež se mohou
objevit lokálně nebo systemicky. Vláknitá konstituce těchto plaků je pro různé formy amyloid-
ních onemocnění určující charakteristikou. Například intracerebrální a cerebrovaskulární plak
složené převážně z vláken beta amyloidního peptidu (β -AP) jsou charakteristikou Alzheimerovy
choroby (jak familiální tak sporadická forma), vlákna ostrůvkového amyloidního polypeptidové-
ho proteinu (IAPP – amylin) jsou charakteristická pro plak v buňkách pankreatických ostrůvků
spojených s diabetes typu II a β 2-mikroglobulin je hlavní složkou amyloidních plaků, tvořících
se následkem dlouhodobé léčby hemodialýzou. Nedávno byly jako amyloidní onemocnění
uznány také nemoci spojené s priony, například Creutzfeld–Jacobova nemoc.

Jednotlivé formy nemoci jsou děleny do skupin, většinou na základě toho jestli amyloidóza je
nebo není spojena se systemickým onemocněním. To znamená, že za primární jsou považovány
amyloidózy, u kterých není důkaz o předcházející nebo koexistující nemoci. Obecně jsou primár-
ní amyloidózy charakteristické přítomností proteinových vláken typu AL (amyloidní lehké řetěz-
ce), takto pojmenovaných pro homologii N-koncové oblasti AL vlákna s variabilním úsekem
lehkého řetězce imunoglobulinu (kappa nebo lambda).

Sekundární neboli reaktivní amyloidóza je charakterizována ukládáním vláken AA typu odvoze-
ných od sérového amyloidního A proteinu (ApoSSA). Tyto formy amyloidózy jsou charakterizo-
vány předcházejícím výskytem chronického zánětlivého nebo infekčního stavu (např. revmatoid-
ní artritida, osteomyelitida, tuberkulóza, lepra).

Heredofamiliální amyloidózy mohou být doprovázeny neuropatickými, ledvinovými nebo kar-
diovaskulárními plak ATTR transhyretinového typu. Jiné heredofamiliální amyloidózy zahrnují
jiné syndromy a mohou být odlišné amyloidní složky (např. familiální Středozemní horečka,
která je charakteristická AA vlákny). Jiné formy amyloidózy zahrnují lokální formy, které jsou
charakteristické ohniskovými ložisky a často usazeninami rakovinového typu, objevujícími se
v izolovaných orgánech. Jiné amyloidózy jsou spojeny se stárnutím a jsou všeobecně charakt-
rizovány tvorbou plaků v srdci a mozku. Časté jsou také amyloidní plak spojené s dlouhotrvající
hemodialýzou. Tyto a jiné formy amyloidních onemocnění jsou shrnuty v tabulce 1. (Tan, S.Y.
and Pepys, Histopathology 25:403–414, 1994; Harisson's Handbook of Internal Medicine, 13th
Ed. Isselbacher, K.J. et al, eds, McGraw–Hill, San Francisco, 1995).

Často se stává, že vlákna tvořící amyloidní plak jsou odvozena od vícero prekurzorových protei-
nů a jsou obvykle spojena se sulfátovanými glykosaminoglykany. Amyloidní plak mohou obsa-
hovat i minoritní proteiny a peptidy různých typů, společně s jinými složkami jako třeba s proteo-
glykany, gangliosidy a jinými cukry, což je detailněji popsáno v následující části.

V současnosti neexistují specifické způsoby léčby pro žádné z amyloidních onemocnění.
V případech kde se současně vyskytuje i doprovodné onemocnění, je snížení tvorby amyloido-
genního proteinu docilováno pomocí léčby doprovodného onemocnění. Typickým příkladem
může být léčba tuberkulózy antibiotiky, čímž se snižuje množství mykobakterií což vede k zmen-
šení zánětu a tím ke snížení hladiny SSA proteinu. V případě AL amyloidu způsobeného mnoho-

násobným výskytem myelomu, vede chemoterapie k snížení množství plazmatických buněk, a tím i ke snížení hladiny myelomových

Tabulka 1
Klasifikace amyloidních onemocnění

Amyloidní protein/ peptid	Proteinový prekurzor	Varianty proteinu	Klinické projevy
AA	Sérový amyloidní A protein (ApoSSA)		reaktivní (sekundární) amyloidózy: Familiální Středozemní horečka Familiální amyloidní nefropatie s kopřivkou a hluchotou (Muckle- Wellsův syndrom)
AA	Sérový amyloidní A protein (ApoSSA)		reaktivní systemická amyloidóza spojená se systemickými zánětlivými nemocemi
AL	lehké řetězce (kappa, lambda) monoklonálního imunoglobulinu	Ak, A (např. AKIII)	idiopatická (primární) amyloidóza spojená s myelomem nebo s makroglobulinémií; systemická amyloidóza spojená s imunocyty

AH	IgG (I(γ1)	Aγ1	dyskrazie; monoklonální gamopatie; skrytá dyskrazie; lokální nodulární amyloidóza spojená s chronickými zánětlivými nemocemi
ATTR	Transthyretin (TTR)	nejméně 30 známých bodových mutací	amyloidóza těžkého řetězce spojená s několika dyskrazemi imunocytů
ATTR	Transthyretin (TTR)	např. Met 111	familiální amyloidní polyneuropatie (např. Met 30, Portugalská)
ATTR	Transthyretin (TTR)	divoký typ TTR nebo Ile 122	familiální amyloidní kardiomyopatie (Dánská)
ApoAI	ApoAI	Arg 26	systemická senilní amyloidóza
Agel	Gelsolin	Asn 187	familiální amyloidní polyneuropatie
Acys	Cystatin C	Gln 68	familiální amyloidóza (Finská)
			dědičná cerebrální

A β	β amyloidní prekurzorový protein (např. β -APP ₆₉₅)	různé: Gln 618	hemoragie s amyloidózou (Islandská) Alzheimerova choroba Downův syndrom dědičná cerebrální hemoragie amyloidóza (Holandská) sporadická cerebrální amyloidní angiopatie zánětlivá myositida
AB ₂ M	β_2 -mikroglobulin		spojen s chronickou hemodialýzou
Acal	(Pro)kalcitonin	(Pro)kalcitonin	medulární karcinom štítné žlázy
AANF	atriální natriuretický faktor		ohniskové senilní amyloidózy: izolovaný atriální amyloid
A β	β amyloidní prekurzorový protein		mozek
SVEP ^a AB ₂ M	β_2 -mikroglobulin		semenné vajíčky prostata

Keratin			primárně lokalizovaný kožní amyloid (makulární, papulární)
PrP	prionový prekurzorový protein (33 až 35 kDa buněčná forma)	protein klusavky (27 až 30 kDa)	sporadická Creutzfeld- Jacobova nemoc Kuru (přenosná spongiformní encefalopatie; prionové nemoci
ALAPP	ostrůvkový amyloidní polypeptid (IAPP)		Langerhansovy ostrůvky diabetes typu II, insulinom
peptidové hormony, fragменты	např. prekalcitonin		exokrinní amyloidóza spojená s APUDomas
	^a Seminální váčkový exokrinní protein		

5 imunoglobulinů. S poklesem jejich hladiny může zmizet i AL amyloid. Přihlášky patentů US, USSN, 09/201 430, podaný 28. května 1999 odhalují, že zatížení amyloidním plakem spojené s Alzheimerovou chorobou může být značně snížena (a předejita) podáváním látek, které vyvolávají imunitní odpověď na β -amyloidní peptid (A β) a jeho fragmenty. Objevem předkládaného vynálezu je to, že indukce imunitní odpovědi pro různé složky amyloidních plaků je účinná při léčbě široké škály amyloidních onemocnění.

Podstata vynálezu

- Předkládaný vynález se týká farmaceutického prostředku, který obsahuje činidlo, které je schopno v těle pacienta vyvolat imunitní odpověď proti amyloidní složce, a farmaceutickou pomocnou látku a adjuvans, kde amyloidní složka je odvozená z vláknitého prekurzorového proteinu vybraného ze skupiny obsahující těžký řetězec imunoglobulinu, ApoA1, transthyretin, lysozym, gelsolin, β 2-mikroglobulin, atriální natriuretický faktor, ostrůvkový amyloidní polypeptid, (pro)-kalcitonin a synuklein.
- Předkládaný vynález je zaměřen na farmaceutické prostředky a metody pro léčbu řady amyloidních onemocnění. Podle jednoho hlediska zahrnuje vynález farmaceutické prostředky, které jako účinnou složku obsahují látku, jež je schopna vyvolat imunitní odpověď vůči amyloidní složce v pacientovi. V takovýchto prostředcích budou zpravidla obsaženy také pomocné látky a v navrhovaném provedení mohou obsahovat adjuvanty. V dále navrhovaných provedeních zahrnují adjuvanty například hydroxid hlinitý, fosforečnan hlinitý, MPLTM, QS-21 (StimulonTM) nebo Freundův nekompletní adjuvant. V navrhovaném provedení mohou takovéto farmaceutické prostředky obsahovat množství látek schopných vyvolat v pacientovi imunitní odpověď vůči více než jedné amyloidní složce.
- V popisovaném provedení je látka schopna vyvolat imunitní odpověď zaměřenou proti vláknité peptidové nebo proteinové amyloidní složce. Takovýto vláknitý peptid nebo protein je pokud možno odvozen od vláknitého prekurzorového proteinu, o němž je známo, že je spojen s určitými formami amyloidních onemocnění, jak je zde popsáno. Takovéto prekurzorové proteiny zahrnují kromě jiných také těžký řetězec imunoglobulinu, ApoA1, transthyretin, lysozym, gelsolin, β 2-mikroglobulin, prionový prekurzorový protein (PrP), atriální natriuretický faktor, keratin, IAPP (ostrůvkový amyloidní polypeptidový protein), (pro)kalcitonin a synuklein. Tyto prekurzory zahrnují také mutantní proteiny, fragmenty proteinů a peptidy vzniklé po proteolýze těchto prekurzorů. V popisovaném provedení je látka schopna vyvolat imunitní odpověď zaměřenou vůči neoepitopu tvořenému vláknitým proteinem nebo peptidem, a to podle s ohledem na vláknitý prekurzorový protein. To znamená, že mnoho peptidů nebo proteinů tvořících vlákna jsou fragmenty těchto prekurzorových proteinů, například těch co jsou vyjmenovány výše. Při tvorbě těchto fragmentů, například proteolytickým štěpením, mohou být odhaleny epitopy, jež na prekurzorové molekule nebyly, z čehož plyne, že dokud je fragment částí prekurzorového proteinu není přístupný imunitnímu systému. Látkami zacílenými na takovéto epitopy mohou být popisované terapeutické látky, jelikož je méně pravděpodobné, že u pacienta vyvolají autoimunitní odpověď.
- V popisovaném provedení zahrnují farmaceutické prostředky vynálezu látky zacílené na amyloidní složky, mezi něž patří nejen následující vláknité peptidy nebo proteiny: AH, ATTR, Agel, Acys, A β 2M, Ascr, Acal, AIAPP a fragment synuklein-NAC. Celé názvy a složení těchto peptidů jsou zde popsány. V oboru jsou dobře známy i metody přípravy takovýchto peptidů, což je zde popsáno.
- V dále popisovaném provedení zahrnují látky obsažené v takovémto farmaceutickém prostředku také určité sulfatované proteoglykany. V popisovaném provedení je proteoglykan heparin sulfát glykosaminoglykan, nejlépe perlecan, dermatan sulfát, chondroitin-4-sulfát nebo pentosan polysulfát.
- Ve shodě s dalším popisovaným hlediskem zahrnuje vynález metodu prevence nebo léčby poruchy charakterizované amyloidním plakem u savčího subjektu. Ve shodě s touto částí vynálezu je subjektu podávána účinná látka v dávce schopné vyvolat imunitní odpověď proti amyloidní složce charakteristické pro amyloidní poruchu, již subjekt trpí. Metody v podstatě zahrnují podávání farmaceutických prostředků obsahujících imunogenní amyloidní složku (viz výše), specifickou pro konkrétní poruchu. Takovéto metody jsou dále charakterizovány svou účinností ve vyvolání imunogenní odpovědi u subjektu. Podle předloženého provedení je metoda účinná ve

vyvolání imunologické odpovědi, jež je charakterizována sérovým titrem nejméně 1:1000 (podle amyloidní složky, vůči níž je imunogenní látka zacílena). Podle dále popisovaného provedení je, v závislosti na vláknité složce, sérový titr nejméně 1:5000. Podle popisovaného provedení je imunitní odpověď charakterizována množstvím sérové imunoreaktivity, odpovídající více než
 5 čtyřnásobné hladině sérové imunoreaktivity naměřené u kontrolního vzorku séra před započatím léčby. Naposledy zmíněná charakteristika je vhodná zvláště v případech když je sérová imunoreaktivita měřena technikou ELISA, přičemž ale může být využita k jakémukoli relativnímu nebo absolutnímu měření sérové imunoreaktivity. Podle předloženého provedení je imunoreaktivita měřena u séra ředěného 1:100.

10 Podle dále popisovaného hlediska zahrnuje vynález metodu pro určení prognózy u pacienta podrobujícího se léčbě amyloidní poruchy. V tomto případě je u pacienta měřeno množství sérové imunoreaktivity proti amyloidní složce charakteristické pro konkrétní poruchu, přičemž množství sérové imunoreaktivity nejméně čtyřikrát větší než kontrolní bazální hodnota indikuje prognózu zlepšení (podle konkrétní amyloidní poruchy). Podle předložených provedení je množství imunoreaktivity proti vybrané amyloidní složce, přítomné v pacientově séru charakteristické sérovým titrem nejméně okolo 1:1000 nebo nejméně 1:5000 (podle amyloidní složky).
 15

Podle popisovaného hlediska zahrnuje vynález také takzvanou pasivní imunizaci, tj. metody a farmaceutické prostředky pro prevenci nebo léčbu amyloidních onemocnění. Podle tohoto hlediska vynálezu je pacientům podáváno účinné množství protilátky, která se specificky váže na vybranou amyloidní složku, přednostně však na vláknitou část přítomnou v amyloidních placích charakteristických pro léčenou nemoc. Tyto protilátky jsou vybírány pro jejich schopnost specificky se vázat na různé proteiny, peptidy a složky popisované v souvislosti s farmaceutickými
 20 prostředky a metodami popsány v předchozích odstavcích této části. Podle popisovaného provedení mohou takovéto metody a prostředky obsahovat kombinace protilátek, které vážou nejméně dvě amyloidní vláknité složky. Obecně jsou tyto farmaceutické prostředky podávány pro zvýšení množství sérové imunoreaktivity proti cílové amyloidní složce, přičemž toto zvýšení je oproti sérovému množství imunoreaktivity v kontrolním vzorku séra nejméně čtyřnásobné. Protilátky mohou být také aplikovány s nosičem, což je zde popsáno. Obecně jsou takovéto protilátky, ve shodě s tímto hlediskem vynálezu, podávány (nebo připravovány pro podání) peritoneálně, orální cestou, intranasálně, subkutánně, intramuskulárně, lokálně nebo intravenózně, přičemž však mohou být podávány (nebo připravovány pro podání) jakoukoli farmaceuticky účinnou cestou (tj. schopnou zajistit udané terapeutické hladiny, jež jsou určeny výše).
 25 30

35 Podle popisovaného provedení mohou být pacientovi terapeutické protilátky aplikovány podáním polynukleotidu, jež kóduje nejméně jeden řetězec protilátky. Ve shodě s tímto hlediskem vynálezu je v pacientovi polynukleotid exprimován s výsledkem představujícím vznik řetězce protilátky v účinném množství. Takovýto polynukleotid může kódovat těžký a lehký řetězec nebo řetězec protilátky, a tím umožnit jejich expresi v pacientovi.
 40

Podle předložených provedení mohou výše popsané imunizační režimy zahrnovat vícenásobné podávání látek zahrnujících protilátky. Podání se takto mohou opakovat například během šestiměsíční periody s tím, že počáteční imunizace je v časových intervalech (např. 6 týdnů) následována posilovacími injekcemi, což je v oboru dobře známá metoda, přičemž časové intervaly se
 45 mohou upravit podle pacientovy potřeby (kritériem je dosažená imunologická odpověď). Alternativní nebo i doplňkovou cestou mohou být režimy zahrnující použití prostředků s postupným uvolňováním účinné látky. Což je v oboru známá metoda.

50 Tyto a ostatní předměty a znaky vynálezu se stanou více zřejmými, jestliže bude čten i detailní popis vynálezu ve spojení s doprovodnými výkresy.

A. Definice

Pokud není známo jinak, mají být všechny zde použité termíny chápány tak, jak by jim rozuměl odborník kvalifikovaný v oboru předkládaného vynálezu. Odborníci jsou pro definice, termíny a standardní metody v oborech biochemie a molekulární biologie odkazováni hlavně na Sambrook, et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Second Edition), Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y. a Ausubel, F.M., et al. (1998) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, NY. Je zřejmé, že tento vynález není omezen konkrétní metodologií, protokoly a popisovanými reagensy, jelikož tyto mohou být pro dosažení stejného výsledku různě měněny.

Termín „adjuvant“ popisuje látku, která při podání ve spojení s antigenem zvyšuje imunitní odpověď vůči antigenu, je-li však podána samotná tak žádnou imunitní odpověď vůči antigenu nevytváří. Adjuvanty mohou zesilovat imunitní odpověď způsoby mezi něž patří posílení tvorby leukocytů, stimulace B nebo T-buněk (nebo obou zároveň) a stimulace makrofágů.

„Amyloidní nemoc“ nebo „amyloidóza“ je míněno množství poruch, které jako symptom nebo jako část své patologie mají hromadění nebo tvorbu amyloidních plaků.

„Amyloidní plak“ je extracelulární usazenina složená hlavně z proteinových vláken. Obecně jsou vlákna tvořena jedním převládajícím proteinem nebo peptidem. Plaky však mohou být složeny i z dalších peptidových nebo nepeptidových složek, což je zde popsáno.

„Amyloidní složkou“ je jakákoli molekula, která je přítomna v amyloidním plaku obsahujícím antigenní část takovéto molekuly. Amyloidní složky zahrnují mimo jiné proteiny, peptidy, proteoglykany a uhlovodíky. „Specifickou amyloidní složkou“ je míněna molekula, jež se zejména nebo pouze v určitém amyloidním plaku.

„Činidlo“ je chemická molekula syntetického nebo biologického původu. V kontextu předkládaného vynálezu je činidlo hlavně molekula, která může být použita ve farmaceutickém prostředku.

„Protiamyloidní činidlo“ je činidlo, které je u obratlovců v případě podání technikami pasivní nebo aktivní imunizace schopno vytvářet imunitní odpověď proti složce amyloidního plaku.

Termínem „polynukleotid“ a „nukleová kyselina“, jež jsou zde střídavě používány, je míněna polymerická molekula s páteří nesoucí báze schopné vázat se vodíkovými vazbami specificky s jinými polynukleotidy, přičemž polymerická páteř předkládá báze způsobem umožňujícím takovéto sekvenčně specifické vodíkové vázání mezi polymerickou molekulou a komplementárním polynukleotidem (např. jednořetězcovou DNA). Tyto báze jsou typicky inosin, adenosin, guanosin, cytosin, uracyl a thymidin. Polymerické molekuly zahrnují dvou nebo jednovláknové RNA a DNA a jejich modifikace, například ty s methylfosfonátovými vazbami.

Termín „polypeptid“ je zde používán pro látku tvořenou jedním řetězcem aminokyselinových zbytků, spojených peptidovou vazbou. Termín „protein“ může být synonymem pro termín „polypeptid“ nebo může popisovat komplex dvou či více polypeptidů.

Termín „peptid“ popisuje také látku složenou z aminokyselinových zbytků spojených peptidickou vazbou. Obecně jsou peptidy složeny ze 100 či méně aminokyselin, zatímco polypeptidy nebo proteiny obsahují více než 100 aminokyselin. Zde používaný termín „proteinový fragment“ může být čten se stejným významem jako peptid.

„Vláknitý protein“ či „vláknitý peptid“ je monomerní nebo agregovaná forma proteinu nebo peptidu, jež tvoří vlákna vyskytující se v amyloidních placích. Příklady takovýchto proteinů a peptidů jsou zde uvedeny.

„Farmaceutický prostředek“ popisuje chemický nebo biologický prostředek vhodný pro podání do savčího organismu. Takovéto prostředky mohou být specificky připraveny pro podání jednou nebo více cestami, zahrnujícími mimo jiných i cestu orální, parenterální, intravenózní, intraarteriální, subkutánní, intranasální, sublingvální, intraspinální, intracerebroventrikulární apod.

„Farmaceutická pomocná látka“ nebo „farmaceuticky přijatelná pomocná látka“ je nosič, obvykle kapalina, ve které je podáváno terapeuticky aktivní činidlo. Pomocná látka obecně nedodává prostředku žádnou farmakologickou aktivitu, jakkoli však může zajišťovat chemickou nebo biologickou stabilitu (nebo chemickou i biologickou stabilitu zároveň) a ovlivňovat uvolňování aktivní složky apod. Ukázkové prostředky mohou být nalezeny například v Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Ed., Grennaro, A., Ed., 1995.

„Glykoprotein“ je protein, na který je kovalentně navázán nejméně jeden uhlovodíkový řetězec (oligopolysacharid).

„Proteoglykan“ je glykoprotein, ve kterém je nejméně jeden z uhlovodíkových řetězců glykosaminoglykan, což je dlouhý lineární polymer složený z opakujících se disacharidů, v němž jedním členem páru je obvykle „cukrokyselina“ (kyselina uronová) a druhým je aminocukr.

Termíny „imunologická“ nebo „imunitní“ nebo „imunogenní“ odpověď se týkají vzniku humorální (zprostředkované protilátkami) nebo buněčné odpovědi (zprostředkované antigenně specifickými T–buněkami nebo produkty jejich sekrece), nebo obou typů odpovědi zároveň, zaměřené proti antigenu v organismu jednotlivého obratlovce. Takováto odpověď může být aktivní odpovědí indukovanou podáním imunogenu nebo pasivní odpovědí indukovanou podáním protilátky nebo primárních T–buněk. Buněčná imunitní odpověď je vyvolána předkládáním polypeptidových epitopů ve spojení s MHC komplexem třídy I a II za účelem aktivace antigenně specifických CD4 T pomocných buněk nebo CD8 cytotoxických T–buněk (nebo obou typů zároveň). Tato odpověď může zahrnovat také aktivaci monocytů, makrofágů, NK buněk, bazofilů, dendritických buněk, astrocytů, mikroglie, eosinofilů nebo dalších složek přirozené imunity. Přítomnost buněčné zprostředkované imunologické odpovědi může být určeno standardní analýzou proliferace (CD4 T–buněk) nebo v oboru známými CTL analýzami (cytotoxické T lymfocyty). Relativní příspěvky humorální a buněčné odpovědi k ochrannému nebo léčebnému účinku imunogenu mohou být odlišeny pomocí oddělené izolace frakcí imunoglobulinu (IgG) a T–buněk z imunizovaného syngenního zvířete a měřením ochranného a léčebného účinku u druhého jedince.

„Imunogenní činidlo“ nebo „imunogen“ nebo „antigen“ je molekula, která je po podání pacientovi schopna indukovat imunologickou odpověď proti sobě samé, a to buď ve spojení, nebo i bez přítomnosti adjuvantu. Takovéto molekuly zahrnují například amyloidní vláknité peptidy nebo jejich fragmenty konjugované s nosným proteinem, jímž může být hemocyanin z *Diodora aspera*, Cd3 nebo toxin tetanu.

„Epitop“ nebo „antigenní determinanta“ je část antigenu, která se váže k antigen vázající části protilátky.

Termíny „A β “, „A β peptid“ a „Amyloidní β “ peptid jsou synonymní a popisují jednu nebo více peptidových směsí složených z 38 až 43 aminokyselin odvozených od Beta amyloidního prekursorového proteinu (β -APP). „A β xx“ popisuje amyloidní β peptid 1–xx, přičemž xx značí počet aminokyselin v peptidu; např., A β 42 je shodný s A β 1–42, který je zde popisován také jako „AN1792“ a A β 40 je shodný s A β 1–40, který je zde popisován také jako „AN1578“.

Disagregovaný nebo monomerní A β značí rozpustné, monomerní peptidové z A β . Jednou z metod přípravy monomerních A β je rozpuštění lyofilizovaného peptidu v čistém DMSO pomocí sonikace. Výsledný roztok je za účelem odstranění všech nerozpustných částic centrifugován.

Agregovaný A β je směs oligomerů, ve kterých drží monomerní jednotky pohromadě nekovalentními vazbami.

5 Termín „nahý polynukleotid“ značí polynukleotid bez obsahu koloidních látek. Nahé polynukleotidy jsou někdy klonovány v plazmidovém vektoru.

Termín „pacient“ zahrnuje lidský nebo savčí subjekt, který prodělává profylaktický nebo léčebný zásah.

10 Termíny „významně odlišný od“, „statisticky významný“, „významně vyšší (nebo nižší) než“, a jim podobná slovní spojení popisují porovnání různých dat, přičemž rozdíly mezi dvěma porovnávanými jednotlivci nebo skupinami jsou školenému pozorovateli zjevně nebo dostatečně zřejmé, nebo také statisticky významné (jestliže spojení zahrnuje termín „statisticky“, nebo když je přítomen nějaký údaj ze statistického testu, jako třeba p-hodnota, nebo když jsou data po analýze standardními statistickými testy statisticky rozdílná).

Prostředky nebo metody obsahující jednu nebo více z uvedených složek mohou obsahovat i jiné složky, jež nejsou zvlášť uvedeny. Například prostředek, který zahrnuje vláknitou peptidovou složku, zahrnuje jak peptid samotný, tak i jako součást delší polypeptidové sekvence. Zjednodušeně to lze vyjádřit tak, že prostředek obsahující složku A a B, zahrnuje také složení vymezené složkami A, B a C.

B. Amyloidní onemocnění

25 1. Přehled a patogeneze

Amyloidní onemocnění nebo amyloidózy zahrnují množství stavů s širokým spektrem vnějších příznaků. Společným znakem těchto poruch je přítomnost abnormálních extracelulárních usazenin, tvořených proteinovými vlákny a známými jako „amyloidní usazeniny“ nebo „amyloidní plaky“, jež jsou velké v okolo 10 až 100 μ m v průměru a jsou lokalizovány v určitých orgánech nebo částech tkáně. Takové plaky jsou složeny hlavně z přirozeně se vyskytujících rozpustných peptidů nebo proteinů. Tyto plaky (jež jsou nerozpustné) jsou většinou složeny z laterálních agregátů vláken, jejichž velikost je přibližně 10 až 15 nm v průměru. Amyloidní vlákna tvoří po obarvení barvou Congo Red v polarizovaném světle charakteristický, jablečně zelený dvojlom. Tyto poruchy jsou tříděny podle majoritní vláknité složky, jež tvoří amyloidní usazeniny, což je rozebráno dále.

Peptidy nebo proteiny tvořící amyloidní plaky vznikají často z prekursorového proteinu. Lze tak říci, že patogeneze usazenin tvořených amyloidními vlákny obecně zahrnuje proteolytické štěpení „abnormálního“ prekursorového proteinu na jednotlivé fragmenty. Tyto fragmenty se zpravidla seskupují do antiparalelních β -skládaných listů; nicméně u některých nedegradovaných forem prekursorového proteinu bylo zjištěno shlukování a tvorba vláken (různá vlákna transthyretinu u familiální polyneuropatie a vlákna β_2 -mikroglobulinu u amyloidózy spojené s dialýzou; Tan, et al., 1994, viz výše).

45

2. Klinické syndromy

V této části jsou popsány hlavní formy amyloidóz s popisem charakteristických vláknitých složek vyskytujících se v amyloidním plaku. Hlavním objevem předkládaného vynálezu je zjištění, že amyloidní onemocnění mohou být léčena podáváním činidel, která stimulují imunitní odpověď zacílenou proti specifické složce nebo složkám (podle konkrétní amyloidní poruchy) různých amyloidních plaků. Takovéto složky jsou nejlépe součástí vláken, jež tvoří plaky, což je podrobněji diskutováno v oddílu C. Následující oddíl slouží k příkladnému znázornění hlavních forem amyloidóz, přičemž jeho cílem není nijak vymezovat či limitovat možnosti vynálezu.

55

a. AA (reaktivní) amyloidóza

AA amyloidóza je většinou projevem množství nemocí, které způsobují trvalou akutní fázi. Takovéto nemoci zahrnují chronické záněty, chronické lokální nebo systemické mikrobiální infekce a zhoubné nádory.

AA vlákna jsou většinou složena z fragmentů o velikosti 8000 daltonů (AAS peptid nebo protein) vytvořených proteolytickým štěpením sériového amyloidního A proteinu (ApoSSA), což je cirkulující apolipoprotein, jenž se vyskytuje v HDL částicích, a který je syntetizován v hepatocytech následně po jejich stimulaci cytokiny (např. IL-1, IL-6 a TNF). Amyloidní plaky mohou být rozšířené po celém těle, přednostně však v orgánech s parenchymatickou stavbou. Místem s častým výskytem plaků je slezina, přičemž postiženy mohou být i ledviny. Plaky se běžně vyskytují i v srdci a gastrointestinálním traktu.

AA amyloidní onemocnění zahrnují mimo jiné zánětlivá onemocnění, jako jsou třeba revmatoidní artritida, juvenilní chronická artritida, ankylozní spondylitida, psoriáza, psoriatická arthropatie, Reiterův syndrom, Stillova choroba, Bechtěrevova nemoc a Crohnova nemoc. AA usazeniny vznikají také jako výsledek chronických mikrobiálních infekcí, jako jsou třeba lepra, tuberkulóza, bronchiektazie, dekubitální vředy, chronická pyelonefritida, osteomyelitida a Whippleova nemoc. Určité zhoubné nádory mohou být také příčinou vzniku AA vláknitých usazenin. Mezi tyto patří Hodgkinův lymfom, renální karcinom, karcinomy střeva, plic a urogenitálního traktu, karcinom bazálních buněk a leukémie vlasatých buněk.

b. AL amyloidózy

AL amyloidní usazeniny jsou spojeny se skoro každou dyskrázií B lymfocytární linie, sahající od zhoubného bujení plazmatických buněk (mnohonásobný myelom) až k nezhoubné monoklonální gamapatii. Přítomnost amyloidních usazenin může být občas prvotním indikátorem probíhající dyskrázie.

Vlákna AL amyloidních usazenin jsou složena z lehkých řetězců monoklonálního imunoglobulinu nebo z jejich fragmentů. Tyto fragmenty pocházejí z N-koncové části lehkého řetězce (kappa nebo lambda) a obsahují též celou nebo pouze část variabilní (V_L) domény. Usazeniny se objevují zejména v mesenchymatických tkáních, kde způsobují periferní a autonomní neuropatii, syndrom karpálního tunelu, makroglosii, restriktivní kardiomyopatie, arthropatii velkých kloubů, imunitní dyskrázii, myelomy, stejně tak jako skryté dyskrázie. Je však nutno poznamenat, že napadena může být v podstatě jakákoli tkáň, zvláště ale viscerální orgány (např. srdce).

c. Dědičné systemické amyloidózy

Vrozených systemických amyloidóz existuje mnoho druhů. Přestože se vyskytují relativně vzácně, nástup symptomů v dospělosti a jejich dědičné podmínění (obvykle jsou autosomálně dominantní) vede k přetrvávání těchto poruch v celkové populaci. Syndromy lze většinou přisoudit bodovým mutacím v prekurzorovém proteinu, jež vedou k tvorbě různých amyloidogenních peptidů nebo proteinů. Tabulka 2 shrnuje typické složení vláken druhů těchto poruch.

Údaje uvedené v tabulce 2 jsou pouze exemplární a není jimi zamýšleno nějak omezovat rozsah uplatnění vynálezu. V transthyretinu bylo například popsáno více než 40 odlišných bodových mutací, přičemž všechny vedou ke vzniku klinicky podobných forem familiální amyloidní polyneuropatie.

Transthyretin (TTR), který je často nazýván jako prealbumin, je protein o velikosti 14 kilodaltonů. Je vytvářen v játrech a v choroidním plexu a jeho funkcí je transport thyroidních hormonů a vitamínu A. Za různé formy familiální amyloidní polyneuropatie zodpovídá nejméně 50 různých forem proteinu, přičemž každá je charakteristická změnou jediné aminokyseliny. Například sub-

- stituce prolinu za leucin v pozici 55 vede k obzvláště progresivní formě neuropatie; substituce methioninu za leucin v pozici 111 vedlo u dánských pacientů k těžké neuropatii. Amyloidní usazeniny izolované ze srdeční tkáně pacientů se systemickou amyloidózou odhalilo, že usazeniny jsou složeny z heterogenní směsi TTR a jeho fragmentů, společně nazývané jako ATTR (jeho celá sekvence již byla určena). Vláknité složky ATTR mohou být z takovýchto plaků extrahovány a dále pak určena jejich struktura a sekvence, a to podle v oboru známých metod (např., Gustavsson, A. et al., Laboratory Invest. 73:703 až 708, 1995; Kametani, F., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 125:622 až 628, 1984; Pras, M., et al., PNAS 80:539 až 42, 1983).

Tabulka 2
Dědičné amyloidózy

Fibrilární peptid/protein	genetická varianta	klinické příznaky
Transthyretin a fragmenty (ATTR)	Met30, mnoho dalších	familiální amyloidní polyneuropatie (FAP), (hlavně periferní nervy)
Transthyretin a fragmenty (ATTR)	Thr45, Ala60, Ser84, Met111, Ile122	především srdeční účast bez neuropatie
N-koncový fragment Apolipoproteinu A1 (apoA1)	Arg26	familiální amyloidní polyneuropatie (FAP), (hlavně periferní nervy)
N-koncový fragment Apolipoproteinu A1 (apoA1)	Arg26, Arg50, Arg60, další	typ Ostertag, bez neuropatie (především viscerální účast)
Lysozym (ALys)	Thr56, His67	typ Ostertag, bez neuropatie (především viscerální účast)
fragment α řetězce Fibrinogenu	Leu554, Val526	typ Ostertag, bez neuropatie (především viscerální účast)

fragment Gelsolinu (Agel)	Asn187, Tyr187	kranální neuropatie s mřížkovitá korneální dystrofie
fragment Cystatinu C	Glu68	dědičná cerebrální hemoragie (cerebrální amyloidní angiopatie) - Islandský typ
β -amyloidní protein (A β) odvozený od amyloidního prekursorového proteinu (APP)	Gln93	dědičná cerebrální hemoragie (cerebrální amyloidní angiopatie) - Holandský typ
β -amyloidní protein (A β) odvozený od Amyloidního Prekursorového Proteinu (APP)	Ile717, Phe717, Gly717	familiální Alzheimerova choroba
β -amyloidní protein (A β) odvozený od amyloidního Prekursorového Proteinu (APP)	Asn670, Leu671	familiální demence - pravděpodobná Alzheimerova choroba
Prionový Protein (PrP) odvozený od PrP prekursorového proteinu insert 51 až 91	Leu102, Val167, Asn178, Lys200	familiální Creutzfeld- Jakobova nemoc; Gerstmann-Sträussler- Scheinker syndrom

(dědičná spongiformní
encefalopatiida, prionová
onemocnění)

familiální Středozemní
horečka, především účast
ledvin (autosomálně
recesivní)

Muckle-Wellův syndrom,
nefropatie, hluchota,
kopřivka, bolest ramenou

kardiomyopatie s
přetrvávajícím síňovým
vynecháváním

kožní usazeniny (bulózní,
papulární, pustulodermální)

AA odvozený od Sérového
amyloidního A proteinu
(ApoSSA)

AA odvozený od Sérového
amyloidního A proteinu
(ApoSSA)

Neznámý

Neznámý

^aData byla získána od Tan & Pepys, 1994, viz výše

Osoby s bodovou mutací v molekule apolipoproteinu AI (např., Gly→Arg26; Trp→Arg50; Leu→Arg60) vykazují formu amyloidózy („typ Östertag“) charakteristickou usazeninami protei-
5 nu apolipoprotein AI nebo jeho fragmentů (ApapoAI). Tito pacienti mají nízké hladiny vysoko-
densitního lipoproteinu (HDL) a vykazují periferní neuropatii nebo selhání ledvin.

Mutace v alfa řetězci enzymu lysozymu (např., Ile→Thr56 nebo Asp→His57) je základem jiné
10 formy nonneuropatické dědičné amyloidózy typu Östertag, jež se vyskytuje v anglických rodi-
nách. V tomto případě jsou usazeniny tvořeny vlákny mutantního proteinu lysozymu (Alys)
a pacienti vykazují většinou zhoršenou funkci ledvin. Tento protein je na rozdíl od většiny zde

popisovaných proteinů tvořících vlákna přítomen v nedotčené (nefragmentované) formě (Benson, M.D., et al. CIBA Fdn. Symp. 199:104 až 131, 1996).

5 β -amyloidní peptid (A β) je 39 až 43 aminokyselinový peptid, jež vzniká proteolýzou velkého proteinu známého jako beta amyloidní prekursorový protein (β APP). Mutace v β APP vedou ke vzniku familiálních forem Alzheimerovy nemoci, Downovu syndromu nebo senilní demence (nebo obou), jež jsou charakteristické mozkovými usazeninami, které jsou složeny z vláken A β a dalších složek popsaných detailněji níže. Známé mutace v APP, spojené s Alzheimerovou chorobou se objevují poblíž míst štěpení β nebo γ sekretázou nebo uvnitř A β . Například pozice 10 717 je přilehlá místu štěpení APP γ -sekretázou, při němž vzniká A β a pozice 670/671 je v sousedství místa kde APP štěpí β -sekretáza. Mutace v jakémkoli z těchto zbytků může vést ke vzniku Alzheimerovy choroby, pravděpodobně díky zvětšení podílu aminokyselinové formy 42/43 v celkovém množství vznikajícího A β z APP. Struktury a sekvence různých forem A β peptidů jsou v oboru dobře známy. Takovéto peptidy mohou být syntetizovány pomocí v oboru 15 známých metod (např., Glenner and Wong, Biochem. Biophys. Res. Comm. 129: 885 až 890, 1984; Glenner and Wong, Biochem. Biophys. Res. Comm. 122:1131 až 1135, 1984). Různé formy těchto peptidů jsou dokonce komerčně dostupné.

20 Synuklein je protein podobný apolipoproteinu a vyskytující se hojně v cytosolu neuronů a v pre-synaptickém zakončení. Peptidové fragmenty pocházející z α -synukleinu a nazývané NAC jsou také složkami amyloidních plaků tvořících se při Alzheimerově chorobě (Clayton, et al., 1998). Tato složka slouží také jako cíl při léčebných metodách založených na imunologických postupech a zahrnutých v předkládaném vynálezu, což je popsáno níže.

25 Gelsolin je vápník protein, který se váže na aktinová filamenta. Mutace tohoto proteinu v pozicích 187 (např., Asp $\rightarrow$ Asn; Asp $\rightarrow$ Tyr) vede ke vzniku formy dědičné systemické amyloidózy, obvykle se nacházející u pacientů ve Finsku, stejně tak jako u osob pocházejících z Holandska nebo Japonska. U postižených jedinců, sestávají vlákna tvořená z fragmentů gelsolinu (Agel) obvykle z aminokyselin 173 až 243 (68 kDa fragment na karboxylovém konci) a jsou ukládána 30 v krevních cévách a bazálních membránách, což dává vznik korneální dystrofii a kraniální neuropatii, která se rozvíjí v periferní neuropatii a vede k dystrofickým změnám kůže a ukládání usazenin v dalších orgánech (Kangas, H., et al. Human Mol. Genet. 5(9):1237 až 1243, 1996).

35 Jiné mutantní proteiny, jako třeba mutantní alfa řetězec fibrinogenu (AfibA) a mutantní cystatin C (Acys) také tvoří vlákna a dávají vznik charakteristickým vrozeným poruchám. Vlákna AfibA tvoří usazeniny charakteristické pro nonneuropatické dědičné amyloidózy při poruchách ledvin; usazeniny vláken Acys jsou charakteristické pro vrozenou cerebrální amyloidní angiopatii hlášenou na Islandu (Isselbacher, et al., Harrison's Principles of Internal Medicine, McGraw-Hill, San Francisco, 1995; Benson, et al., viz výše). Minimálně u jistého množství pacientů s cerebrální 40 amyloidní angiopatií (CAA) bylo prokázáno, že amyloidní vlákna obsahují nemutovanou formu cystatinu C ve spojení s beta proteinem (Nagai, A., et al., Molec. Chem. Neuropathol. 33:63 až 78, 1998).

45 Určité formy prionových onemocnění (až 15 % případů) se nyní považují za dědičné, i když dříve se myslelo, že jsou především infekčního původu (Baldwin, et al., in Research Advances in Alzheimer Disease and Related Disorders, John Wiley and Sons, New York, 1995). V případě takovýchto prionových poruch se u pacientů vytváří plaky tvořené abnormálními isoformami normálního prionového proteinu (PrP^C). Převládající mutantní isoforma (PrP^{Sc}), nazývá také jako AScr se liší od normálního buněčného proteinu svou resistencí proti degradaci proteázami, 50 nerozpustností po extrakci pomocí detergentu, ukládáním v sekundárních lysozomech, posttranslační úpravou a vysokým obsahem konformace β -skládaného listu. Genetická příčina byla prokázána nejméně u pěti mutací vedoucích ke vzniku Creutzfeldt-Jacobovy choroby (CJD), Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrom (GSS) a fatální familiální insomnie (FFI) (Baldwin).

Metody pro extrakci vláknitých peptidů z vláken scrapie, určení sekvencí a syntéza takových peptidů jsou v oboru známy (např., Beekes, M., et al., J. Gen. Virol. 76:256 až 76, 1995).

Například jedna z forem GSS byla spojena s mutací PrP v kodonu 102, zatímco telencefalická GSS byla segregována s mutací v kodonu 117. Mutace v kodonech 198 a 217 vedou ke vzniku formy GSS, u které neuritické plaky, charakteristické pro Alzheimerovu chorobu obsahují PrP namísto peptidu A β . U určitých forem familiální CJD byla prokázána souvislost s mutacemi v kodonech 200 a 210; mutace v kodonech 129 a 178 byly nalezeny jak u familiální CJD, tak i u familiální FFI (Baldwin, viz výše).

d. Senilní systemické amyloidózy

Množství systemických i lokálních amyloidních usazenin se s věkem zvyšuje. Například vlákna divokého typu transthyretinu (TTR) je možno běžně nalézt v srdeční tkáni starších jedinců, což může být asymptomatické, klinicky „tiché“ nebo skončit s výsledkem srdečního selhání. Asymptomatické vláknité lokální usazeniny se mohou objevit také v mozku (A β), v corpora amylacea prostaty (A β_2 mikroglobulin), v kloubech a v semenných váčcích.

e. Mozečkové amyloidózy

Lokální usazeniny amyloidu jsou běžné v mozku, zvláště u starších jedinců. Nejčastější typ amyloidu nacházejícího se v mozku, jenž složen hlavně z vláken peptidu A β , vede k demenci nebo sporadické (nedědičné) Alzheimerově chorobě. Ve skutečnosti však výskyt sporadických forem Alzheimerovy choroby daleko převyšuje formy dědičné. Vláknité peptidy tvořící tyto plaky jsou velmi podobné těm, jenž byly popsány v souvislosti s Alzheimerovou chorobou (AD) výše.

f. Amyloidózy spojené s dialýzou

U pacientů dlouhodobě se podrobujících hemodialýze nebo peritoneální dialýze je možno běžně nalézt plaky složené z vláken β_2 mikroglobulinu (A β_2 M). β_2 mikroglobulin je polypeptid o velikosti 11,8 kDa a je lehkým řetězcem antigenů MHC komplexu třídy I, přítomným na každé buňce s jádrem. Za normálních okolností je z buněčných membrán plynule uvolňován a filtrován ledvinami. Při poruše očišťovací schopnosti ledvin, jako například v případě zhoršené funkce ledvin dochází v ledvinách a na jiných místech (zejména v na kolagen bohatých kloubních tkáních) k jeho ukládání. Na rozdíl od jiných vláknitých proteinů jsou molekuly A β_2 M ve vláknech většinou přítomny v nefragmentované formě (Benson, viz výše).

g. Amyloidózy odvozené od hormonů

Endokrinní orgány mohou být sídlem amyloidních usazenin, zvláště u starších jedinců. Hormony vylučující tkáň zasažené tumory mohou obsahovat amyloidní plaky odvozené od hormonů také. Tyto plaky jsou tvořeny vlákny polypeptidových hormonů jakými jsou třeba kalcitonin (medulární karcinom štítné žlázy), IAPP (amylin; ostrůvkový amyloidní polypeptidový protein; objevující se u většiny pacientů s diabetem typu II) a atriální natriuretický peptid (izolovaná atriální amyloidóza). Sekvence a struktury těchto proteinů jsou v oboru dobře známé.

h. Nezařazené amyloidózy

Existuje množství dalších forem amyloidní choroby, které se za normálních okolností projevují lokalizovanými usazeninami amyloidu. Obecně platí, že tyto nemoci jsou pravděpodobně výsledkem lokalizované tvorby a/nebo chybějícím katabolismem určitých vláknitých prekurzorů nebo sklonem určité tkáně (jako třeba kloub) k ukládání usazenin. Mezi příklady takovýchto idiopatic-

kých usazenin lze zahrnout nodulární AL amyloidy, kožní amyloid, endokrinní amyloid a amyloid spojený s tumory.

C. Farmaceutické prostředky

Objevem předkládaného vynálezu je zjištění, že prostředky schopné vyvolat nebo vybavit imunitní odpověď zaměřenou proti určitým složkám amyloidních plaků jsou účinné při léčbě amyloidních onemocnění nebo při prevenci jejich vzniku. Podle zde poskytovaného vynálezu jde především o možné zabránění postupu choroby, zlepšení jejích příznaků a/nebo snížení amyloidní zátěže u postižených jedinců, to vše za předpokladu podání imunostimulační dávky anti-amyloidního činidla nebo odpovídající protiamyloidní imunitní složky pacientovi. Tato část popisuje ukázková protiamyloidní činidla, jež vyvolávají aktivní nebo pasivní imunitní odpovědi proti amyloidním plakům a poskytují ukázkové údaje znázorňující účinek vlivu těchto prostředků na amyloidní zátěž.

Protiamyloidní činidla tohoto vynálezu sestávají obecně ze specifické plakové složky, přičemž nejlépe složky tvořící vlákna. Takováto složka je obvykle charakteristický protein, peptid nebo jejich fragmenty, což bylo popsáno v předchozím oddílu a bude doloženo příklady níže. Léčebná činidla uváděná v předkládaném vynálezu vyvolávají nebo ovlivňují imunitní odpověď vůči plaku nebo spíše proti jeho vláknité složce. Takováto činidla tudíž mimo jiné zahrnují tyto složky samy, jejich varianty, analogy a mimetika těchto složek, jež indukují protilátky proti této vlastní složce a/nebo s nimi křížově reagují. Takováto činidla zahrnují dále i vlastní protilátky nebo T-buňky, které specificky reagují s amyloidní složkou. Důležitým znakem je to, že farmaceutické prostředky neobsahují nespecifické složky, tj. složky, které v těle cirkulují a nebo jsou v něm všudypřítomné. Příkladem může být sérový amyloidní protein (SAP), což cirkulující plazmatický glykoprotein, který vzniká v játrech a váže se na většinu známých forem amyloidních usazenin. Léčebné prostředky jsou přednostně zaměřeny na tuto složku.

Vyvolání imunitní odpovědi může být aktivní, jako v případě podání imunogenu pacientovi, což následně indukuje T-buňky reagující s danou složkou nebo pasivní, jako v případě podání samotné protilátky, jež se specificky váže na amyloidní složku přítomnou v těle pacienta. Zakázková činidla vyvolávající imunitní odpověď proti amyloidním plakům jsou popsána v následujících oddílech.

Farmaceutické prostředky předkládaného vynálezu mohou kromě imunogenního činidla nebo činidel zahrnovat v účinném množství také adjuvant a/nebo pomocnou látku. Farmaceuticky účinné a užitečné adjuvanty a pomocné látky jsou v oboru dobře známy a jsou detailněji popsány v následujících oddílech.

1. Imunostimulační činidla (Aktivní imunitní odpověď)

a. Prostředky proti vláknům

Jedna z hlavních tříd předkládaných protiamyloidních činidel obsahuje činidla odvozená od vláknitých amyloidních proteinů. Jak již bylo zmíněno výše, znakem amyloidních onemocnění je ukládání amyloidních plaků (tvořených hlavně z vláken, přičemž tato vlákna jsou sestavena hlavně z charakteristických vláknitých proteinů nebo peptidů) v orgánech. Podle předkládaného vynálezu je takováto vláknitá proteinová nebo peptidová složka účinným činidlem při vyvolání protiamyloidní imunitní odpovědi.

Tabulky 1 a 2 shrnují typické vlákna tvořící proteiny, jež jsou pro různá amyloidní onemocnění charakteristické. Ve shodě s tímto hlediskem předkládaného vynálezu má podání imunostimulačního prostředku, obsahujícího příslušné vláknité proteiny a zahrnujícího jejich homology nebo fragmenty postiženým jedincům, léčebné nebo profylaktické účinky.

Příkladem je A β , známý také jako β -amyloidní peptid nebo peptid A4 (viz patent US 4 666 829; Glenner & Wong, Biochem. Biophys. Res. Commun. 120, 113, 1131, 1984), jenž se skládá z 37 až 43 aminokyselin, a který je hlavní složkou charakteristickou pro plaky u Alzheimerovy choroby. A β je tvořen z většího proteinu APP pomocí dvou enzymů, zvaných β a γ sekretázy (viz Hardy, TINS 20, 154, 1997).

Příklad 1 popisuje výsledky experimentu provedeného pro podepření předkládaného vynálezu, a ve kterém byl peptid A β 42 podán heterozygotním transgenním myším, jež exprimovaly v nadbytečném množství lidský APP s mutací v pozici 717. Tyto myši, známé jako „PDAPP myši“ vykazují patologii shodnou s Alzheimerovou chorobou a jsou používány jako zvířecí model pro studium Alzheimerovy choroby (Games, et al., Nature 373:523 až 7, 1995). V tomto příkladu je popsáno, že tyto myši ve svém mozku vykazují zjistitelnou neuropatologií plaku A β už od šestého měsíce života, přičemž ukládání plaku s věkem roste. Ve zde popisovaných experimentech byl myším podáván agregovaný A β 42 (AN1792). Většina z léčených myší (7 z 9) neměla na rozdíl od kontrolních myší, jež nebyly nijak ošetřeny nebo jim byl aplikován pouze solný roztok, a u nichž bylo zjištěno významné množství amyloidní zátěže, ve 13. měsíci života v mozku žádné zjistitelné amyloidní plaky (obr. 2). Tyto rozdíly byly ještě více patrné v hipokampu (obr. 3). Léčené myši vykazovaly také významné titry sérových protilátek proti A β (všechny větší než 1:1000, 8 z 9 větší než 1:10 000; obr. 1, tabulka 3A). Myši, jimž byl aplikován pouze solný roztok vykazovaly při ředění séra 1:100 obecně víc než 4 až 5krát menší hladiny protilátek proti A β , a to v jakémkoli sledovaném čase a nevykazovaly tedy oproti kontrole žádnou významnou odpověď (tabulka 3B). Tyto studie ukazují, že injekce specifického vláknitého peptidu (A β) vede k ochraně proti ukládání A β amyloidních plaků.

Sérový amyloidní protein (SAP) je cirkulující plazmatický glykoprotein, jenž je tvořen v játrech a váže se na všechny typy amyloidních vláken (vazba závisí na přítomnosti vápníku). Mezi tato vlákna patří i vlákna cerebrálních amyloidních plaků u Alzheimerovy choroby. Částí uskutečněných experimentů byla injekce SAP skupině myší, přičemž u těchto myší došlo k vytvoření významných sérových titrů proti SAP (1:1000 až 1:30 000), ale nedošlo k vytvoření zjistitelných sérových titrů proti peptidu A β a došlo k vzniku neuropatologie cerebrálního plaku (obr. 2).

Další experimenty (viz příklad 2) ukázaly, že imunogenní účinek injekcí A β u myší léčených mezi 5 týdnem a asi 8 měsícem života je závislý na dávce. U těchto myší došlo s rostoucím počtem imunizací a se zvyšující se dávkou i k zvýšení sérového titru proti A β . Po čtyřech imunizacích se sérové titry (v dávkách od 1 do 300 μ g) měřené vždy pět dní po imunizaci ustálily na hladinách okolo 1:10 000 (obr. 5).

Dodatečné experimenty pro podpoření předkládaného vynálezu jsou popsány v příkladu 3. V tomto příkladu byl PDAPP myším v určitém časovém bodu (okolo 11 měsíce věku, což je doba, ve které jsou již zjistitelné amyloidní plaky v jejich mozku) zahájeno podávání A β 42. V těchto studiích byla zvířata imunizována A β 42 nebo solným roztokem, přičemž pro zjištění jejich amyloidní zátěže byla usmrcena ve věku 15 nebo 18 měsíců. Z obrázku 7 je vidět, že 18 měsíců staré myši vykazovaly významně nižší průměry amyloidní zátěže (plaková zátěž, 0,01 %) než 18 měsíců stará kontrolní zvířata, jimž bylo aplikováno PBS (solný roztok pufovaný fosfátem) (plaková zátěž, 4,7 %), i než 12 měsíců stará neléčená zvířata (0,28 %), u nichž byla amyloidní zátěž měřena obrazovou analýzou (podrobněji viz příklad 3, část 8). Tyto experimenty ukazují účinnost léčebných metod předkládaného vynálezu, definovanou snížením existující plakové zátěže a zabránění vzrůstu plakové zátěže u nemocných jedinců.

Podle tohoto hlediska vynálezu, jsou léčebná činidla odvozená z vláknitých peptidů nebo proteinů, které tvoří plaky charakteristické pro danou chorobu. Těmito činidly mohou být i látky složkám plaků antigenně obdobné do takové míry, aby byly schopny vyvolat imunitní odpověď, která také křížově reaguje s vláknitými složkami plaků. Tabulky 1 a 2 poskytují příklady takovýchto vláknitých peptidů a proteinů, přičemž jejich složení a sekvence jsou v oboru známy a mohou být

známými metodami jednoduše určeny (viz odkazy citované níže a v Sekci B2 pro reference, které popisují speciálně metody extrakce a/nebo tvorby různých vláknitých složek; další příklady vláknitých složek jsou popsány níže.

- 5 Takto bude, ve shodě s předkládaným vynálezem, v případě určení diagnózy amyloidního onemocnění (klinicky a/nebo biopsií) zkušený praktik schopen zjistit složení vláken amyloidní usazeniny a poskytnout činidlo, které vyvolá imunitní odpověď zaměřenou proti vláknitým peptidům nebo proteinům.
- 10 Jak již bylo popsáno výše, tak léčebným činidlem užívaným v případě léčby Alzheimerovy choroby nebo jiných amyloidních onemocnění, charakteristických ukládáním vláken A β mohou být přirozeně se vyskytující formy peptidu A β , obzvláště však lidské formy (tj. A β 39, A β 40, A β 41, A β 42 a A β 43). Sekvence těchto peptidů a jejich příbuznost s prekurzorem APP jsou v oboru známy resp. v oboru dobře známa (např., Hardy et al., TINS 20, 155 až 158, 1997).
- 15 Například A β 42 má sekvenci: 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-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala-OH. (SEQ ID No:1).

- 20 A β 41, A β 40 a A β 39 se od A β 42 liší nepřítomností Ala-Ala-Ile a Ala-Ile-Val na C-koncové části peptidu. A β 43 se od A β 42 liší přítomností threoninového zbytku na C-konci. Podle předloženého provedení vynálezu budou léčebná činidla vyvolávat imunitní odpověď proti části nebo celé vláknité složce dané nemoci. Například předložená imunogenní látka proti A β je činidlo, které indukují protilátku specifickou vůči volnému N-konci A β . Takováto látka má tu výhodu, že nerozeznává prekurzorový protein β -APP a snižuje tedy pravděpodobnost vzniku autoimunitní reakce.
- 25

- U dalšího příkladu týkajícího se pacientů postižených nemocemi charakteristickým ukládáním vláken AA (např. chronické záněty, chronické lokální nebo systemické mikrobiální infekce a zhoubné nádory) lze ocenit, že pacienti mohou být léčeni AA peptidem, což je známý, 8 kDa velký fragment sérového amyloidního A proteinu (ApoSSA). Mezi typické AA amyloidní poruchy patří mimo jiné zánětlivá onemocnění jako třeba revmatoidní artritida, juvenilní chronická artritida, ankylózní spondylitida, psoriáza, psoriatická arthropatie, Reiterův syndrom, Stillova choroba, Bechtěrevova nemoc, Crohnova nemoc, chronické mikrobiální infekce jako jsou třeba lepra, tuberkulóza, bronchiektázie, dekubitální vředy, chronická pyelonefritida, osteomyelitida a Whippleova nemoc a stejně tak i zhoubné nádory mezi něž patří Hodgkinův lymfom, renální karcinom, karcinomy střeva, plic a urogenitálního traktu, karcinom bazálních buněk a leukémie vlasatých buněk.
- 30
- 35

- AA peptid patří do heterogenní skupiny peptidů vznikajících z N-koncové části sérového amyloidního A proteinu (ApoSSA), počínající zbytkem prekurzorového proteinu 1, 2 nebo 3 a končící kdekoli mezi zbytky 58 a 84; vlákna AA jsou obvykle složena ze zbytků 1 až 76. Přesné struktury a složení mohou být určeny, přičemž následná syntéza příslušných peptidů je možná díky v oboru dobře známým metodám (Liepnieks, J. J., et al. Biochem. Biophys. Acta 1270:81 až 86, 1995).
- 40

- 45 Fragmenty vzniklé z N-koncové části lehkého řetězce (kappa nebo lambda řetězec) imunoglobulinu a obsahující jeho variabilní (V₁) doménu nebo její část, většinou tvoří amyloidní usazeniny v mesenchymatických tkáních, kde způsobují periferní a autonomní neuropatii, syndrom karpálního tunelu, makroglosii, restriktivní kardiomyopatie, arthropatii velkých kloubů, imunitní dyskrázii, myelomy, stejně tak jako skryté dyskrázie. Prostředky vynálezu budou přednostně vyvolávat imunitní odpověď pouze proti části lehkého řetězce, přednostně proti „neoepitopu“ (epitop, který vzniká jako výsledek rozpadu mateřské molekuly), aby bylo omezeno případné autoimunitní působení.
- 50

Léčebným metodám předkládaného vynálezu jsou přístupná i různá vrozená amyloidní onemocnění. Takovéto choroby jsou popsány výše, v části B.2. Například různé typy familiální amyloidní polyneuropatie jsou důsledkem existence více než 50 forem (každá je způsobena změnou jediné aminokyseliny) transthyretinu (TTR), 14 kDa velkého proteinu tvořeného v játrech. Mnoho typů této nemoci je rozlišitelný na základě své specifické patologie a/nebo demografického rozšíření, přičemž lze ocenit, že léčebné prostředky mohou být složeny také z činidel vyvolávajících imunitní odpověď proti více než jedné formě TTR. Takovým prostředkem může být směs dvou či více forem ATTR, jež obsahuje divoký TTR, a je tak široce využitelným léčebným prostředkem.

Amyloidní plaky obsahující ApoA1 se nalézají u osob s bodovou mutací v molekule apolipoproteinu A1. Pacienti s tímto typem onemocnění většinou vykazují periferní neuropatii nebo selhání ledvin. Podle předkládaného vynálezu obsahují léčebné prostředky jednu nebo více různých forem ApoA1, popsaných zde a v oboru známých.

Určité familiální formy Alzheimerovy choroby jsou stejně tak jako Downův syndrom výsledkem mutací v beta amyloidním prekurzorovém proteinu, což vede k ukládání plaků složených hlavně z β -amyloidního peptidu (A β). Užití peptidu A β v léčebných prostředcích předkládaného vynálezu je popsáno výše a na příkladech vysvětleno dále.

Určité postupy léčení vrozených forem amyloidóz, diskutované výše, zahrnují prostředky vyvolávající imunitní odpověď proti fragmentům gelsolinu (léčba dědičné systemické amyloidózy), mutantnímu proteinu lysozymu (Alys) (léčba dědičné neuropatie), mutantnímu alfa řetězci fibrinogenu (AfibA) (léčba nonneuropatické formy amyloidózy projevující se jako onemocnění ledvin), mutantnímu cystatinu C (Acys) (léčba dědičné cerebrální angiopatie vyskytující se na Islandu). Výskytem mutantní isoformy prionového proteinu (PrP^{Sc}) jsou charakterizovány určité dědičné typy prionových onemocnění, mezi něž patří např. Creutzfeldt-Jacobsova choroba (CJD), Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrom (GSS) a fatální familiální insomnie (FFI). Tento protein může být ve shodě s předkládaným vynálezem použit v prostředcích pro léčbu nebo prevenci ukládání plaků PrP.

Jak již bylo diskutováno výše, tvorba amyloidních usazenin (jak systemická tak ohnisková) souvisí se stárnutím. Této tvorbě může být podle dalšího hlediska předkládaného vynálezu předejito nebo zamezeno aplikací prostředků složených z jednoho či více proteinů spojených se stárnutím. Takže plaky složené z ATTR odvozeného od divokého typu TTR je možno často nalézt v srdeční tkáni starších lidí. U určitých starších jedinců se zas mohou v mozku vyvinout ohniskové asymptomatické vláknité usazeniny peptidu A β . U těchto jedinců je pak léčba peptidem A β , jak bylo již popsáno výše, nutná. β_2 mikroglobulin je častou složkou *corporata amyloacea* prostaty, a je tak podle předkládaného vynálezu dalším kandidátem (léčebným činidlem).

Kromě jiných existuje množství dalších typů amyloidních onemocnění, které nejsou dědičné, a které jsou vhodnými kandidáty pro léčbu metodami v předkládaném vynález. U pacientů dlouhodobě se podrobujících hemodialýze nebo peritoneální dialýze je možno běžně nalézt plaky složené z vláken β_2 mikroglobulinu. Tito pacienti mohou být ve shodě s předkládaným vynálezem léčení pomocí prostředků zaměřených proti β_2 mikroglobulinu nebo ještě lépe, jeho imuno-
genních epitopů.

Hormony vylučující tkáň zasažené tumory mohou obsahovat amyloidní plaky odvozené od hormonů také, přičemž jejich složení je charakteristickým znakem příslušného zasaženého endokrinního orgánu. Tyto plaky jsou tvořeny vlákny polypeptidových hormonů jakými jsou třeba kalcitonin (medulární karcinom štítné žlázy), IAPP (amylin; ostrůvkový amyloidní polypeptidový protein; objevující se u většiny pacientů s diabetem typu II) a atriální natriuretický peptid (izolovaná atriální amyloidóza). Prostředky zaměřené na amyloidní usazeniny tvořící se v intimě aorty při atheroskleróze jsou v předkládaném vynález zahrnuty také. Westermarck et al. popisuje například 69 aminokyselinový fragment N-koncové části apolipoproteinu A, který tvoří tyto

plaky (Westermarck et al., Am. J. Path. 147:1186 až 92, 1995); terapeutické prostředky předkládaného vynálezu zahrnují imunologická činidla zaměřená na tento fragment, stejně tak jako fragment samotný.

5 Předcházející diskuze byla zaměřena na vláknité amyloidní složky, které mohou být použity jako činidla při léčbě nebo prevenci různých typů amyloidních onemocnění. Léčebním činidlem může být také fragment nebo analog přirozeně se vyskytujícího nebo mutantního vláknitého proteinu nebo peptidu, jenž obsahuje epitop, který po podání jedinci vyvolává obdobnou ochrannou nebo léčebnou imunitní odpověď. Imunogenní fragmenty obsahují typicky sekvenci o nejméně 3, 5, 6,
10 10 nebo 20 aminokyselinách, jež jsou i v přirozeně se vyskytujícím peptidu. Mezi příkladné imunogenní fragmenty peptidu A β patří A β 1 až 5, 1 až 6, 1 až 7, 1 až 10, 3 až 7, 1 až 3, 1 až 4, 1 až 12, 13 až 28, 17 až 28, 1 až 28, 25 až 35, 35 až 40 a 35 až 42. V nějakých metodách jsou používány fragmenty, jimž chybí nejméně jedna a někdy nejméně 5 nebo 10 C-koncových aminokyselin, přítomných v přirozeně se vyskytujících formách této vláknité složky. Například fragment postrádající 5 C-koncových aminokyselin z A β 43 obsahuje prvních 38 aminokyselin z N-koncové části A β . Fragmenty z N-koncové poloviny A β jsou v některých metodách používány přednostně. Analogy zahrnují alelické, druhové a indukované varianty. Analogy se od přirozeně se vyskytujících peptidů liší v jedné nebo více aminokyselinových pozicích, často však jde o záměnu konzervativní. Analogy vykazují nejméně 80 až 90% sekvenční shodu s přirozeným peptidem. Některé analogy obsahují též nepřirozené aminokyseliny nebo modifikace N nebo C koncových aminokyselin. Příklady nepřirozených aminokyselin jsou α -, α -disubstituované aminokyseliny, N-alkyl aminokyseliny, kyselina mléčná, 4-hydroxyprolin, γ -karboxyglutamát, γ -N,N,N-trimethyllyzin, γ -N-acetyllyzin, O-fosfoserin, N-acetylserin, N-formylmethionin, 3-methylhistidin, 5-hydroxylyzin, ω -N-methylarginin.

25 Osoba zkušená v oboru ocení, že fragmenty a analogy vytvořené ve shodě s tímto hlediskem vynálezu mohou být testovány na to, zda křížově reagují s přirozeně se vyskytující vláknitou složkou a/nebo na to, jaká je jejich profylaktická či léčebná účinnost u transgenních zvířat (viz níže). Tyto fragmenty nebo analoga mohou být použity v léčebných prostředcích předkládaného vynálezu, ale za předpokladu, že jejich imunoreaktivita a účinnost v tomto zvířecím modelu je zhruba stejná nebo větší než v případě složek amyloidních vláken.

Takovéto peptidy, proteiny nebo fragmenty, analogy a další amyloidogenní peptidy mohou být připraveny pomocí syntézy peptidů na pevné fázi nebo rekombinantní expesí, což jsou v oboru
35 dobře známé metody, nebo mohou být získány z přírodních zdrojů. Ukázková složení vláken, metody extrakce vláken a sekvence vláknitých peptidů nebo proteinů jsou uvedeny v publikacích, jež jsou citovány ve spojení s popisem konkrétní vláknité složky. Složení dalších látek, metody jejich extrakce a určení jejich sekvence jsou v oboru dobře známé. Pro tvorbu těchto látek mohou být použity automatické přístroje pro syntézu peptidů, jež jsou komerčně dostupné u mnoha výrobců, jako například Applied Biosystems (Perkin Elmer, Foster City, California), přičemž postupy při přípravě syntetických peptidů jsou v oboru dobře známy. Pro rekombinantní expesi mohou být využity bakterie (např. *E. coli*), kvasinky, hmyzí buňky nebo savčí buňky; proteiny mohou být eventuálně vytvořeny použitím *in vitro* translace, což je v oboru známá metoda. Postupy rekombinantní exprese jsou popsány v Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory
45 Manual (C.S.H.P. Press, NY 2 ed., 1989). Určité peptidy a proteiny jsou dostupné také komerčně; například některé formy peptidu A β je možné získat třeba od American Peptides Company, Inc., Sunnyvale, California nebo California Peptide Research, Inc., Napa, California.

50 Léčebná činidla mohou být složena také z delších polypeptidů, jako například z aktivního fragmentu vláknitého peptidu nebo jeho analoga, spojeného dohromady s dalšími aminokyselinami. Například peptid A β může být přítomen jako intaktní APP protein nebo jeho část (např. fragment C-100, který začíná na N-konci A β a pokračuje do konce APP). Tyto polypeptidy mohou být testovány na to, jaká je jejich profylaktická či léčebná účinnost u transgenních zvířat (viz níže). A β peptid, jeho analog, účinný fragment nebo jiný polypeptid mohou být podávány v asociované

formě (tj. jako amyloidní peptidy) nebo v disociované formě. Léčebná činidla mohou zahrnovat také multimery z monomerních imunogenních činidel nebo konjugáty nosných proteinů a/nebo mohou být za účelem získání širšího pole protiamyloidního působení přidány s jinou vláknitou složkou.

5

Další obměnou může být předkládání imunogenního peptidu (např. fragment A β) virem nebo bakterií jako části imunogenního prostředku. Nukleová kyselina kódující imunogenní peptid je vložena do genomu nebo epizomu viru či bakterie. Další možností je zabudování nukleové kyseliny takovým způsobem, že imunogenní peptid je exprimován jako sekretovaný protein nebo jako fúzní protein s proteinem na vnějším povrchu viru nebo s transmembránovým proteinem v bakterií, a to tak, aby peptid byl vystaven. Viry nebo bakterie použité v těchto metodách by měly být nepatogenní nebo oslabené. Vhodné viry zahrnují adenovirus, HSV, virus venezuelské koňské encefalitidy a další alfa viry, virus vesikulární stomatitidy a další rhabdoviry, virus vakcinie a drůbeží poxviry. Vhodné bakterie zahrnují salmonelu a shigelu. Fúze imunogenního peptidu s HBsAg z HBV je zvláště vhodná. Léčebná činidla zahrnují také peptidy a další látky, které nutně nemusí mít v sekvenci aminokyselin s A β významnou shodu, nicméně však slouží jako mimetika A β a vyvolávají obdobnou imunitní odpověď. Vyzkoušeny mohou být třeba jakékoli peptidy a proteiny tvořící β -skládaný list. Anti-idiotypické protilátky proti monoklonálním protilátkám specifickým pro A β nebo jiným amyloidogenním peptidům mohou být použity také.

20

Tyto anti-Id protilátky napodobují antigen a vyvolávají proti němu imunitní odpověď (viz Essential Immunology (Roit ed., Blackwell Scientific Publications, Palo Alto, 6th ed.), p. 181). Činidla odlišná od peptidů A β by měla vyvolat imunogenní odpověď proti jednomu či více upřednostňovaných částí A β (viz výše; 1 až 10, 1 až 7, 1 až 3 a 3 až 7). Tato činidla vyvolávají imunogenní odpověď zaměřenou přednostně proti jedné z těchto částí, aniž by vyvolaly odpověď proti jiné části A β .

25

Zkoušeny mohou být i peptidy a jiné látky z náhodných knihoven (Random Libraries). Pro mnoho typů látek, jež lze sestavit po jednotlivých krocích, mohou být vytvořeny kombinační knihovny (Combinatorial libraries). Mezi tyto látky patří polypeptidy, β -skládaná mimetika, polysacharidy, fosfolipidy, hormony, prostaglandiny, steroidy, aromatické látky, heterocyklické sloučeniny, benzodiazepiny, oligomerní N-substituované glyciny a oligokarbamáty. Velké kombinační knihovny mohou být sestaveny podle kódovaných umělých knihoven (encoded synthetic libraries ESL) metodou popsanou v Affymax, WO 95/12608, Affymax WO 93/06 121, Columbia University, WO 94/08 051, Pharmacopeia, WO 95/35503 a Scripps, WO 95/30 642 (každý z nich je zahrnut podle odkazu pro všechny účely). Peptidové knihovny mohou být sestaveny s použitím metod fágového vystavování (viz např. Devlin, WO 91/18 980).

30

35

V kombinačních knihovnách a u dalších látek je zpočátku zjišťována jejich použitelnost měřením stupně schopnosti vázat na protilátky nebo na lymfocyty (B nebo T), jež jsou specifické pro A β nebo jiné amyloidogenní peptidy jako třeba ATTR. Například zahajovací testy tak mohou být vykonány s jakoukoli polyklonální nebo monoklonální protilátkou proti A β nebo kterémukoli dalšímu amyloidogennímu peptidu, jež nás zajímá. Látky identifikované těmito testy jsou pak dále analyzovány pro schopnost stimulovat protilátky nebo lymfocyty specifické pro A β nebo jiný amyloidogenní peptid. Mnohonásobná ředění séra mohou být například testována na mikrotitračních destičkách, které byly předem pokryty vláknitým peptidem, přičemž poté mohou následovat standardní ELISA testy pro zjištění protilátek specifických pro A β . U látek pak může být testována jejich profylaktická či léčebná účinnost u transgenních zvířat, predisponovaných pro amyloidogenní onemocnění, což je popsáno v příkladech. Tato zvířata zahrnují například myši s APP mutovaným v pozici 717 (Games et al., viz výše) a myši se Švédskou mutací 670/671 v APP (McConlogue et al., US 5 612 486 a Hsiao et al., Science 274, 99, 1996; Staufenbiel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 13287 až 13292, 1997; Sturchler-Pierrat et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 13287 až 13292, 1997; Borchlet et al., Neuron 19, 939 až 945, 1997). Stejný

50

studijní přístup může být použit na další potenciální činidla, mezi něž patří fragmenty A β , analoga A β a delší peptidy zahrnující A β (viz výše).

b. Další složky plaku

Imunologické odpovědi zaměřené proti jiným složkám amyloidního plaku mohou být také účinné v prevenci, zpomalení vývoje nebo zmenšení plakové usazeniny při amyloidním onemocnění. Tyto složky mohou být menšinovými částmi vláken, mohou být spojeny s těmito vlákny nebo s tvorbou těchto vláken tvořících plaky. Omezením je fakt, že složky, které jsou v těle všudepřítomné nebo jsou amyloidní usazeniny relativně nespecifické, nepředstavují pro léčebná činidla nejvhodnější terč.

Dalším objevem předkládaného vynálezu je tak zjištění, že činidla vyvolávající imunitní odpověď vůči specifickým složkám plaku jsou účinná při léčbě či zastavení postupu amyloidního onemocnění. Tato kapitola poskytuje základní informace o několika typických molekulách, které jsou spojeny s amyloidním plakem. Léčba vyvolávající imunitní odpověď proti jedné z těchto molekul nebo kombinovaná léčba zahrnující společnou aplikaci s imunogenním léčebným prostředkem proti jakékoli výše popsané vláknité složce, či proti jakékoli níže popsané nevláknité složce plaku, poskytuje podle předkládaného vynálezu doplňkovou protiamyloidní léčbu. Části předkládaného vynálezu jsou i metody pasivní imunizace založené na těchto plakových složkách, což je zde popsáno.

Příkladem může být synuklein, což je protein strukturálně podobný apolipoproteinům, ale nacházející se v cytosolu neuronů, zvláště v oblasti presynaptického zakončení. Existují nejméně tři formy tohoto proteinu, nazvané α , β a γ synuklein. Nedávno bylo prokázáno, že α a β synuklein se u určitých amyloidních onemocnění účastní nukleace amyloidních usazenin, zvláště v případě Alzheimerovy choroby (Clayton, D.F., et al., TINS 21(6): 249 až 255, 1998). Fragment NAC domény α a β synukleinu (zbytky 61 až 95) byl totiž izolován z amyloidních plaků u pacientů s AD; tento fragment tvořil ve skutečnosti 10 % nerozpustné formy plaku, což bylo zjištěno po rozpuštění plaku v SDS (dodecylsulfát sodný) (George, J.M., et al., Neurosci. News 1:12 až 17, 1995). Jak α synuklein, tak i jeho NAC fragment jsou známy tím, že *in vitro* urychlují agregaci β -amyloidního peptidu do nerozpustného amyloidu (Clayton, viz výše).

Další složky spojené s amyloidními plakami zahrnují nepeptidové látky. Například perlecan a od něj odvozené glykosaminoglykany jsou velké proteoglykany odvozené od heparinsulfátu, jež se vyskytují v amyloidních placích obsahujících A β (např. při Alzheimerově chorobě a jiných amyloidózách vyskytujících se v CNS či systemicky, tj. např. plaky s amylinem spojené s diabetes). U těchto látek bylo prokázáno, že napomáhají tvorbě A β vláken. Vazby na A β se účastní jak proteiny jádra, tak i glykosaminoglykanové řetězce perlecanu. Další glykosaminoglykany, konkrétně dermatan sulfát, chondroitin-4-sulfát nebo pentosan se běžně vyskytují v amyloidních placích různých typů a bylo prokázáno, že také pomáhají při tvorbě vláken. Působení dextranulfátu je stejné. Toto působení je významně sníženo po desulfataci těchto molekul. Imunogenní léky zaměřené proti sulfatovaným formám glykosaminoglykanů, mezi něž patří i některé glykosaminoglykany, tvoří jako součást primární nebo sekundární léčby doplňkové provedení předkládaného vynálezu. Vytvoření takovýchto molekul, a stejně tak i léčebných prostředků obsahujících tyto molekuly, je schopen běžný praktik z oboru.

2. Činidla vyvolávající pasivní imunitní odpověď

Léčebná činidla tohoto vynálezu zahrnují také imunitní látky (např. protilátky), které se specificky váží na vláknité peptidy nebo jiné složky amyloidního plaku. Tyto protilátky mohou být polyklonální i monoklonální, přičemž se váží specificky podle typu amyloidní nemoci. Léčebné prostředky a léčebné režimy mohou zahrnovat protilátky zaměřené na jednu vazebnou doménu

nebo epitop určité vláknité nebo nevláknité složky plaku, přičemž mohou zahrnovat i protilátky zaměřené na epitopy, jež se nalézají na více složkách plaku.

5 V pokusech uskutečňovaných pro podporu předkládaného vynálezu byly PDAPP myším starým 8,5 až 10,5 měsíce aplikovány intraperitoneálně (i.p.) injekce polyklonální protilátky proti A β 42 nebo injekce mononukleární protilátky proti A β , specificky zaměřené vůči epitopům A β peptidu nebo solný roztok (viz příklad 11). V těchto pokusech byly sledovány koncentrace cirkulujících protilátek, přičemž pro udržení koncentrace vyšší než 1:1000 (poměr mezi antigenem a proti-
10 němu specifické protilátky) byly aplikovány posilovací injekce. Snížení hladiny celkového A β bylo v porovnání s kontrolou pozorováno v hipokampu, kůře a v mozečku myši léčených proti-
látkou; maximální snížení bylo v těchto pokusech pozorováno u myši léčených polyklonální pro-
tilátkou.

15 V dalších pokusech uskutečněných pro podporu předkládaného vynálezu (prediktivní *ex vivo* analýza) byla testována očišťovací schopnost protilátky proti fragmentu synukleinu, známému jako NAC. Synuklein je protein spojený s amyloidním plakem. Protilátka proti NAC byla aplikována na vzorek mozkové tkáně, jež obsahoval amyloidní plaky a mikrogliální buňky. Jako kontrola bylo použito králičí sérum. Následující prozkoumání ukázalo jasné snížení množství a rozměru plaků a prokázalo tak očišťovací schopnost této protilátky.

20 Z těchto výsledků je zřejmé, že amyloidní plaky spojené s AD a dalšími amyloidními chorobami mohou být silně potlačeny aplikací imunitních činidel zaměřených proti epitopům v peptidu A β nebo proti fragmentu synukleinu NAC. Dále je jasné, že jako součást léčebných prostředků je použitelná široká škála protilátek. Protilátky, jež se specificky váží na agregované formy A β tak,
25 aniž by se vázaly na jeho disociované formy jsou pro použití v tomto vynálezu vhodné, stejně tak jako protilátky, které se specificky váží na disociovanou formu A β , aniž by se vázaly na jeho agregovanou formu. Další vhodné protilátky jsou ty, které se váží na obě jeho formy. Některé z těchto protilátek se váží na přirozeně se vyskytující krátkou formu A β (tj. A β 39, 40, 41), bez toho,
30 aby se vázaly na přirozeně se vyskytující dlouhou formu A β (tj. A β 42 a A β 43). Některé protilátky se váží na dlouhou formu, aniž by se vázaly na krátkou formu. Některé protilátky se váží na A β , aniž by se vázaly na amyloidní prekurzorový protein plné délky. Některé protilátky se váží na A β s vazebnou afinitou větší nebo rovnou 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 nebo 10^{10} M $^{-1}$.

35 Polyklonální séra obsahují obvykle smíšené populace protilátek vážících se na více epitopů po celém A β . Monoklonální protilátky se váží na specifický epitop v A β , přičemž tento epitop může být konformační nebo nekonformační. Některé monoklonální protilátky se váží na epitop mezi zbytky 1 až 28 v A β (zbytek 1 značí první N-koncový zbytek přirozeného A β). Jiné monoklonální protilátky se váží na epitop ze zbytků 1 až 10 v A β . Existují také monoklonální protilátky,
40 jež se váží na epitop ze zbytků 1 až 16 v A β . Některé monoklonální protilátky se váží na epitop z aminokyselin 1 až 5, 5 až 10, 10 až 15, 15 až 20, 25 až 30, 10 až 20, 20, 30 nebo 10 až 25. U protilátek pak může být testována jejich profylaktická či léčebná účinnost za použití transgenních zvířat, což je popsáno v příkladech.

45 Podle zde poskytnutých návodů si praktik může navrhnout, vytvořit a vyzkoušet protilátky zaměřené na vláknité proteiny nebo peptidy charakteristické pro další amyloidní onemocnění, mezi něž patří nemoci popsané v oddílu 2, přičemž může využít látky popsané zde, stejně tak jako i protilátky proti jiným amyloidním složkám.

a. Obecná charakteristika imunoglobulinů

50 Základní stavební jednotkou protilátky je tetramer ze čtyř podjednotek. Každý tetramer je složen ze dvou stejných párů polypeptidových řetězců, přičemž každý pár tvoří jeden „lehký“ (okolo 25 kDa) a jeden „těžký“ (okolo 50 až 70 kDa) řetězec. Část na aminovém konci každého řetězce obsahuje variabilní oblast složenou ze 100 až 110 nebo více aminokyselin, které primárně zodpo-

vídají za rozpoznání antigenu. Část na karboxylovém konci každého řetězce vymezuje konstantní oblast, která primárně zodpovídá za celkové působení.

Lehké řetězce jsou označovány jako kappa nebo lambda. Těžké řetězce jsou označeny jako gama, mí, alfa, delta, nebo epsilon a vymezují izotyp protilátky (IgG, IgM, IgA, IgD a IgE). Variabilní a konstantní oblasti lehkých a těžkých řetězců jsou spojeny „J“ oblastí složenou z asi 12 nebo více aminokyselin, s tím, že těžký řetězec obsahuje také „D“ oblast, složenou z asi 10 či více aminokyselin (obecně viz *Fundamental Immunology* (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y., 1989), Ch. 7 (zahrnuto podle odkazu ve své celistvosti pro všechny účely).

Variabilní oblasti každého z obou párů tvořených lehkým a těžkým řetězcem formují vazebné místo protilátky, což znamená, že funkční protilátka má dvě vazebná místa. Tato dvě vazebná místa jsou stejná (s výjimkou bifunkčních nebo bispecifických protilátek). Všechny řetězce vykazují stejnou základní stavbu relativně konzervovaných strukturních oblastí (FR), spojených třemi hypervariabilními oblastmi, které se nazývají také oblastí určující komplementaritu (CDRs). CDRs ze dvou řetězců každého páru jsou seřazeny podle strukturních oblastí, jež umožňují vazbu na specifický epitop. Lehké i těžké řetězce sestávají od N–konce k C–konci domén FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 a FR4. Sled aminokyselin v každé doméně je popsán v Kabat, *Sequence of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 a 1991) nebo v Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901 až 917 (1987); Chothia et al., *Nature* 342:878 až 883 (1989).

b. Tvorba protilátek nepocházejících z člověka

Tvorba protilátek nepocházejících z člověka, např. myších, morčecích, králičích nebo krysích může být zajištěna například imunizací zvířete složkou plaku, třeba A β nebo jiné vláknité složky. Delší polypeptidy obsahující A β nebo imunogenní fragment A β nebo anti-idiotypické protilátky (protilátky proti protilátce proti A β) A β mohou být také použity (viz např. Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (CSHP NY, 1988) (zahrnuto podle odkazu pro všechny účely). Takový imunogen může být získán z přirozeného zdroje, syntézou peptidu nebo rekombinantní exprese. Někdy může být imunogen podáván s adjuvantem. Některé typy těchto adjuvantů jsou popsány níže. Aplikace kompletního Freundova adjuvantu následovaná aplikací nekompletního Freundova adjuvantu je při imunizaci laboratorních zvířat oblíbenou cestou. Pro tvorbu polyklonálních protilátek se nejčastěji používají králíci nebo morčata. Pro přípravu monoklonálních protilátek se nejčastěji používají myši. Protilátky jsou testovány zda se specificky váží na imunogen. Protilátky jsou také testovány zda se váží na specifickou oblast imunogenu. Například, je-li imunogenem A β , může být testování provedeno určením vazby protilátky na řadu mutantů A β s delecí, z čehož se pak určí, které mutanty se váží na protilátku. Vazba může být vyhodnocena například pomocí Westernovy analýzy (Western blott) nebo pomocí ELISA. Nejmenší fragment, který vykazuje specifickou vazbu s protilátkou vymezuje epitop protilátky. Specifita epitopu může být také určena kompetiční analýzou, ve které zkoumaná a referenční protilátka soutěží o vazbu s určitou složkou. Jestliže zkoumaná a referenční protilátka o vazbu soutěží, pak je zřejmé, že se váží na stejný epitop nebo na epitopy dostatečně blízké na to, aby vazba jedné protilátky narušila vazbu druhé.

c. Chimérické a humanizované protilátky

Chimérické a humanizované protilátky mají stejnou nebo podobnou specifitu a afinitu jako protilátky myši nebo další protilátky nepocházející z člověka, které poskytují materiál pro konstrukci Chimérických a humanizovaných protilátek. Chimérické protilátky jsou protilátky, u nichž byly geny kódující lehký a těžký řetězec uměle vytvořeny, nejčastěji metodami genetického inženýrství, z částí imunoglobulinových genů patřících jiným druhům. Například variabilní (V) části genů kódujících myši monoklonální protilátku mohou být spojeny s lidskými konstantními (C) částmi (např. IgG1 a IgG4). Typická Chimérická protilátka je tak hybridním proteinem obsahujícím V,

neboli doménu vážící antigen, z myší protilátky a C, neboli efektorovou doménu, z lidské protilátky.

Humanizované protilátky mají strukturu variabilní oblasti v zásadě z lidské protilátky (akceptorová protilátka) a u oblasti určující komplementaritu z myší protilátky (donorový imunoglobulin) (viz Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:10 029 až 10 033 (1989) a WO 90/07 861, US 5 693 762, US 5 693 761, US 5 585 089, US 5 530 101 a Winter, US 5 225 539 (zahrnuto podle odkazu ve své celistvosti pro všechny účely). Konstantní oblast nebo oblasti pokud jsou přítomny, pocházejí od hlavně nebo zcela lidského imunoglobulinu. Lidské variabilní domény jsou vybírány z lidských protilátek, jejichž základní struktura vykazuje vysoký stupeň shody v sekvenci s doménami myší variabilní oblasti, ze které pocházejí CDRs. Sekvence variabilní oblasti těžkého a lehkého řetězce mohou být odvozeny ze sekvencí stejné nebo odlišné lidské protilátky. Sekvence lidské protilátky mohou být sekvencemi přirozeně se vyskytujícími lidských protilátek nebo mohou být konsensem sekvencí více lidských protilátek (viz Carter et al., WO 92/22 653). Určité aminokyseliny z lidské variabilní oblasti jsou nahrazeny, což pramení z jejich možného vlivu na konformaci CDR a/nebo na vazbu antigenu. Zkoumání těchto možných vlivů je uskutečňováno modelováním, zkoumáním vlastností aminokyselin v určitém místě nebo empirickým pozorováním účinků náhrady nebo mutageneze určité aminokyseliny.

Když se kupříkladu jedna aminokyselina ve variabilní oblasti myší a lidské protilátky liší, lidská aminokyselina by měla být vyměněna za ekvivalentní aminokyselinu z myší protilátky v případech, kdy je důvod očekávat, že aminokyselina:

- (1) váže přímo nekovalentně antigen
- (2) nachází se nedaleko CDR oblasti
- (3) jiným způsobem interaguje s CDR oblastí (vyskytuje se ve vzdálenosti okolo 6 Å od CDR oblasti) nebo
- (4) se podílí na vzájemném vztahu VL–VH

Dalšími kandidáty pro nahrazení jsou akceptorové aminokyseliny, které jsou v této pozici pro lidský imunoglobulin neobvyklé. Tyto aminokyseliny mohou být nahrazeny aminokyselinami z odpovídající pozice myší donorové protilátky nebo aminokyselinami z odpovídající pozice typičtější lidské protilátky. Struktura variabilní oblasti humanizovaných imunoglobulinů vykazuje obvykle 85% sekvenční shodu se sekvencí lidské variabilní oblasti nebo konsensem takovýchto sekvencí.

d. Lidské protilátky

Lidské protilátky proti Aβ jsou získávány různými technikami (viz níže). Některé lidské protilátky jsou vybírány v pokusech s kompetiční vazbou nebo využitím stejné epitopové specifity jako určitá myší protilátka (viz příklad 11). Lidské protilátky mohou být také pro určitou epitopovou specifitu testovány použitím fragmentu Aβ jako imunogenu a/nebo určením vazby protilátky na řadu mutantů Aβ s delecí.

(1) Metodika triomu

Základní postup a příkladný partner pro zde používanou buněčnou fúzi (SPAZ-4) je popsán v Oestberg et al., Hybridoma, 2:361 až 367 (1983); Oestberg patent US 4 634 664; a v Engleman et al., patent US 4 634 666 (každý z nich je zahrnut podle odkazu ve své celistvosti pro všechny účely). Buněčné linie tvořící protilátky, jež lze získat touto metodou se nazývají triomy, pocházejí totiž ze tří buněčných typů – dvou lidských a jednoho myšího. Základem je fúze buněk myšího myelomu s lidským B-lymfocylem, čímž vzniká protilátky tvořící xenogenní hybridní buněčná linie (např. SPAZ-4 popsána Oestberg et al., viz výše). Xenogenní buňka je pak fúzována s imunizovaným lidským B-lymfocylem, čímž vzniká protilátky tvořící triomová buněčná

linie. Bylo zjištěno, že triomy tvoří protilátky stabilněji než obyčejné hybridomy připravené z lidských buněk.

Imunizované B-lymfocyty se získávají z krve, sleziny, lymfatických uzlin a kostní dřeně lidského dárce. Jestliže jsou potřeba protilátky proti specifickým antigenům nebo epitopu, pak je vhodné užít tento antigen nebo jeho epitop pro imunizaci. Imunizace může probíhat buď *in vivo*, nebo *in vitro*. Pro *in vivo* imunizaci se nejčastěji používají B-buňky izolované z lidí imunizovaných A β , jeho fragmentem, větším polypeptidem obsahujícím A β nebo jeho fragment, nebo anti-idiotypickými protilátkami proti A β . V některých metodách se používají B-buňky izolované ze stejného pacienta, jenž má být léčen podáváním protilátek. Pro *in vivo* imunizaci jsou B-lymfocyty vystaveny po 7 až 14 dní antigenu, v médiu (např. RPMI-1640) doplněném 10% lidskou plazmou (Engleman, viz výše).

Imunizované B-lymfocyty jsou pomocí známých metod fúzovány s xenogenní hybridní buňkou (např. SPAZ-4). Buňky jsou vystaveny působení 40 až 50% polyethylenglykolu (m.v. 1000 až 4000), při 37 °C po 5 až 10 min. Buňky jsou odděleny od fúzní směsi a rozmnoženy v médiu vhodném pro dané hybridy (např. HAT nebo AH). Klony, jež vylučují protilátky s požadovanou specifitou jsou určeny analýzou kultivačního média triomů. Triomy tvořící protilátky s požadovanou specifitou jsou dále namnoženy technikou limitního ředění a pěstovány v *in vitro* kultuře. U získaných triomových buněk je dále testována schopnost vázat A β nebo jeho fragment.

Přestože jsou triomy geneticky stabilní, nevytvářejí protilátky ve velkém množství. Úroveň exprese může být zvýšena zaklonováním genu protilátky z triomu do jednoho či více expresních vektorů a transformováním vektoru do standardních savčích, bakteriálních nebo kvasinkových buněčných linií, pomocí metod v oboru dobře známých.

(2) Transgenní savci

Lidské protilátky proti A β mohou být tvořeny i v transgenních savcích, kteří mají zabudovánu v genomu nejméně část lokusu lidského imunoglobulinu. Endogenní imunoglobulinový lokus takového zvířete je obvykle funkčně inaktivován. Část lidského lokusu zahrnuje nejlépe neuspořádané sekvence kódující části lehkého a těžkého řetězce. Inaktivace endogenního genu pro imunoglobulin a zavedení exogenního imunoglobulinového genu může být provedeno cílenou homologní rekombinací nebo zavedením YAC chromozomů. Takto vzniklí transgenní savci jsou schopni funkčně uspořádat sekvence imunoglobulinových složek a exprimovat řadu protilátek různých izotypů, které jsou kódovány lidskými imunoglobulinovými geny, aniž by probíhala exprese endogenních imunoglobulinových genů. Příprava a charakteristika savců s těmito vlastnostmi jsou detailně popsány například v Longberg et al., WO 93/12 227 (1993); US 5 877 397, US 5 874 299, US 5 814 318, US 5 789 650, US 5 770 429, US 5 661 016, US 5 663 425, US 5 625 126, US 5 569 825, US 5 545 806, Nature 148:1547 až 1553 (1994), Nature Biotechnology 14, 826 (1996), Kucherlapati, WO 91/10 741 (1991) (každý z nich je zahrnut podle odkazu ve své celistvosti pro všechny účely). Transgenní myši jsou pro tyto účely zvláště vhodné. Protilátky proti A β jsou získávány imunizací transgenních savců (Longberg nebo Kucherlapati, viz výše) A β nebo jeho fragmentem. Monoklonální protilátky jsou připravovány například fúzí B-buněk z těchto savců s vhodnou myelomovou buněčnou linií, a to za použití běžné techniky (Kohler-Milstein). Lidské polyklonální protilátky mohou být ve formě sér získány také z lidí imunizovaných imunogenním činidlem. Tyto polyklonální protilátky mohou být koncentrovány pomocí afinitního přechištění za použití A β nebo jiného imunogenního amyloidního peptidu coby afinitního činidla.

(3) Metody fágového vystavování

Dalším způsobem získání lidských protilátek proti A β je prohledávání DNA knihovny z lidských B-buněk metodami obecně vymezenými v Huse et al., Science 246:1275 až 1281 (1989).

B-buňky mohou být stejně jako v případě triomů získány z lidí imunizovaných A β , jeho fragmentem, větším polypeptidem obsahujícím A β nebo jeho fragment, nebo anti-idiotypickými protilátkami proti A β . V některých metodách se používají B-buňky izolované ze stejného pacienta, jenž má být léčen podáváním protilátek. Vybrány jsou protilátky, jež se váží na epitop sledované amyloidní složky (např. A β nebo jeho fragment). Sekvence kódující tyto protilátky, nebo protilátky vážící jeho fragment, jsou pak klonovány a namnoženy. Protokol popsany Husem se stává efektivnějším v kombinaci s technologií fágového vystavování (viz např., Dower et al., WO 91/17 271 a McCafferty et al., WO 92/01 047, US 5 877 218, US 5 871 907, US 5 858 657, US 5 837 242, US 5 733 743 a US 5 565 332 (každý z nich je zahrnut podle odkazu ve své celistvosti pro všechny účely). Tyto metody popisují tvorbu fágových knihoven, kde členové vystavují na svém povrchu různé protilátky. Protilátky jsou obvykle vystavovány jako fragmenty Fv nebo Fab. Protilátky požadované specifity vystavované fágy jsou získány afinitním přečištěním, za použití A β nebo jiného imunogenního amyloidního peptidu coby afinitního činidla.

Obměnou metody fágového vystavování mohou být získány lidské protilátky vykazující stejnou vazebnou specifitu jako má vybraná myší protilátka (viz Winter, WO 92/20 791). Jako výchozí materiál je v tomto případě využita variabilní oblast lehkého nebo těžkého řetězce vybrané myší protilátky. Jestliže je jako výchozí materiál zvolena například variabilní oblast lehkého řetězce, pak je fágová knihovna konstruována tak, aby její členové vystavovali stejnou variabilní oblast lehkého řetězce a odlišnou variabilní oblast těžkého řetězce. Variabilní oblasti těžkého řetězce jsou získány z knihovny obsahující uspořádané variabilní oblasti lidského těžkého řetězce. Vybrán je fág, který vykazuje silnou specifickou vazbu ke sledované složce (např., nejméně 10^8 a nejlépe 10^9 M $^{-1}$). Variabilní oblasti lidského těžkého řetězce tohoto fágu slouží jako výchozí materiál pro konstrukci další fágové knihovny. V této knihovně vystavuje každý fág stejnou variabilní oblast těžkého řetězce (tj. oblast identifikovanou v první fágové knihovně) a odlišnou variabilní oblast lehkého řetězce. Variabilní oblasti lehkého řetězce jsou získány z knihovny obsahující uspořádané variabilní oblasti lidského lehkého řetězce. Opět je vybrán fág vykazující silnou specifickou vazbu se zvolenou složkou amyloidního peptidu. Tito fágové vystavují variabilní oblasti lidských protilátek specifických pro amyloidní peptid. Tyto protilátky mají obvykle stejnou epitopovou specifitu jako myší protilátky, jež byly použity jako výchozí materiál.

e. Výběr konstantní oblasti

variabilní oblasti těžkého a lehkého řetězce Chimérních humanizovaných nebo lidských protilátek mohou být připojeny alespoň k části lidské konstantní oblasti. Výběr konstantní oblasti záleží částečně na tom, zda je žádána aktivace komplementu nebo buněčně zprostředkované toxicity (nebo obou zároveň), jež závisí na aktivaci protilátkou. Například izotypy IgG1 a IgG3 komplement aktivují, izotypy IgG2 a IgG4 tuto schopnost nemají. Výběr izotypu může často ovlivnit přechod protilátky do mozku. Konstantní oblasti lehkého řetězce mohou být lambda nebo kappa. Protilátky mohou být exprimovány jako tetramery obsahující dva lehké a dva těžké řetězce, jako samotné těžké řetězce, jako samotné lehké řetězce, n jako Fab, Fab', F(ab') $_2$ a Fv nebo jako jednořetězcové protilátky, ve kterých jsou variabilní domény lehkého a těžkého řetězce spojeny „mezerníkem“ (spacer).

f. Expresce rekombinantních protilátek

Chimérické, humanizované a lidské protilátky jsou nejčastěji vytvářeny za použití rekombinantní exprese. Rekombinantní polynukleotidové konstrukty typicky obsahují sekvenci řídící expresi, spojenou se sekvencí kódující řetězce protilátky, jež zahrnují přirozeně spojené nebo heterologní promotorové oblasti. Sekvence řídící expresi jsou nejlépe eukaryotní promotorové systémy, které jsou ve vektorech schopné transformovat nebo transfekovat eukaryotickou buňku. Jakmile je vektor zabudován do příslušného hostitele, je hostitel udržován v podmínkách optimálních pro vysokou úroveň exprese nukleopeptidových sekvencí, a pro odběr a čištění křížově reagujících protilátek.

Tyto expresní vektory se nejčastěji v hostitelském organismu replikují jako epizómy nebo jako integrální(integrovaná) část hostitelské chromozomální DNA. Expresní vektory běžně obsahují selekční značky, např. odolnost vůči ampicilinu nebo hygromycinu, které dovolují identifikaci těch buněk, jež byly transformovány požadovanými sekvencemi DNA.

E. coli je prokaryotický hostitel, který je ke klonování DNA sekvencí z předkládaného vynálezu zvláště vhodný. Mikroorganismy, jako třeba kvasinky, jsou pro takovou expresi také užitečné. Upřednostňovaným kvasinkovým hostitelem s vhodnými vektory obsahujícími sekvenci řídící expresi, sekvenci pro početí replikace, terminační sekvenci atd., je *Saccharomyces*. Typické promotory zahrnují 3-fosfoglycerát kinázu a další enzymy glykolýzy. Indukovatelné kvasinkové promotory zahrnují mimo jiné promotory z alkoholdehydrogenázy, izocytochromu C a enzymy zodpovědné za odbourávání maltózy a galaktózy. Savčí buňky jsou přednostně používány pro expresi neukleotidových sekvencí kódujících imunoglobuliny nebo jejich fragmenty (viz Winnacker, From Genes to Clones, VCH Publishers, NY, 1987). V oboru bylo vyvinuto mnoho použitelných buněčných linií, schopných vylučovat intaktní heterologní proteiny. Mezi tyto linie patří CHO buněčné linie, různé COS buněčné linie, HeLa buňky, L buňky a myelomové buněčné linie. Expresní vektory pro tyto buňky mohou obsahovat sekvence řídící expresi (např. replikační počátek), promotor, zesilovač (enhancer) a místa nezbytná pro zpracování informací, mezi něž patří místa pro vazbu ribozómu, místa kde dochází k sestřihu RNA, polyadenylační místa a sekvence pro terminaci transkripce. Nejčastěji užívané sekvence řídící expresi jsou promotory odvozené od endogenních genů cytomegaloviru, SV40, adenoviru, hovězího papilomaviru atd. (viz Co et al., J. Immunol. 148:1149, 1992).

Sekvence kódující protilátky mohou být ve formě transgenů vestavěny také do genomu transgenního zvířete, a poté získány z mléka (např. podle metod popsanych v US 5 741 957, US 5 304 489, US 5 849 992, všechny zahrnuté podle odkazu ve své celistvosti). Mezi vhodné transgeny patří sekvence kódující lehké nebo těžké řetězce (nebo oba řetězce zároveň) ve funkčním spojení s promotorem a zesilovačem, pocházejícím z genu specifického pro mléčnou žlázu (např. kasein nebo β -laktoglobulin).

Vektory obsahující potřebné části DNA mohou být dobře známými metodami (záleží na typu hostitelské buňky) vloženy do hostitelské buňky. U prokaryotických buněk se například používá transfekce pomocí chloridu vápenatého, zatímco transfekce do jiných typů buněk využívá působení fosforečnanu vápenatého, elektroporaci, lipofekci a transfekci pomocí biolistiky nebo viru. Další metody transfekce savčích buněk používají polybren, fúzi protoplastů, lipozómy, elektroporaci a mikroinjekce (obecně viz Sambrook et al., výše). Pro tvorbu transgenních zvířat mohou být transgeny mikroinjikovány do oplodněných oocytů nebo mohou být zabudovány do genomu embryonálních kmenových buněk a jádra těchto buněk mohou být přenesena do enukleovaných oocytů.

Vytvořené protilátky mohou být očištěny podle standardních metod, mezi něž patří HPLC, sloupcová chromatografie, gelová elektroforéza atd. (obecně viz Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, NY, 1982).

4. Další léčebná činidla

Léčebná činidla užívaná v popisovaných metodách zahrnují také T-buňky, které se váží na plakovou složku (např. peptid A β). T-buňky mohou být proti peptidu A β aktivovány například expresí genu lidského MHC třídy I a genu lidského β_2 -mikroglobulinu v hmyzí buněčné linii, čímž se na jejich povrchu vytvoří komplex, který se může vázat s peptidem A β . T-buňky, které se dostanou do kontaktu s touto buněčnou linií se aktivují specificky proti tomuto peptidu (viz Peterson et al., US 5 314 813). Hmyzí buněčné linie exprimující antigen MHC třídy II mohou být obdobně použity k aktivaci CD4 T-buněk.

5. Nosné proteiny

Některá činidla vyvolávající imunitní odpověď obsahují příslušný epitop, jenž vyvolává imunitní odpověď proti amyloidním usazeninám, ale jsou příliš malá na to, aby byla imunogenní. V této situaci může být peptidový imunogen spojen s vhodným nosičem, jenž pomáhá vyvolat imunitní odpověď. Vhodné nosiče zahrnují sérové albuminy, hemocyanin z *Diodora aspera*, molekuly imunoglobulinu, thyroglobulin, ovalbumin, toxoid tetanu nebo toxoid z jiné patogenní bakterie (např. difterie, *E. coli*, cholera nebo *H. pylori*) nebo oslabený derivát toxinu. Další nosiče zahrnují epitopy T-buněk, které se váží na mnohé alely MHC (např. nejméně na 75 % všech lidských MHC alel). Takové nosiče jsou někdy v oboru nazývány jako „univerzální epitopy T-buněk“. Příklady univerzálních epitopů T-buněk zahrnují:

Chřipkový hemaglutinin: HA₃₀₇₋₃₁₉ PKYVKQNTLKLAT (SEQ ID NO: 1)
 PADRE : AKXVAAWTLKAAA (SEQ ID NO: 2)
 Malarie CS: T3 epitop EKIAKMEKASSVFNV (SEQ ID NO: 3)
 Povrchový antigen hepatitidy B: HBsAg₁₉₋₂₈ FFLTRILT (SEQ ID NO: 4)
 Protein tepelného šoku 65: hsp65₁₅₃₋₁₇₁ DQSIGDLIAEAMDKVGNEG (SEQ ID NO: 5)
 Bacillus Calmette-Guerin QVHFQPLPPAVVKL (SEQ ID NO: 6)
 Toxoid tetanu: TT₈₃₀₋₈₄₄ QYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO: 7)
 Toxoid tetanu: TT₉₄₇₋₉₆₇ FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO: 8)
 HIV gp120 T1: KQIINMWQEVGKAMYA. (SEQ ID NO: 9)

Další nosiče, jež stimulují nebo zesilují imunitní odpověď zahrnují cytokiny jako IL-1, IL-1 α a β peptidy IL-2, γ INF, IL-10, GM-CSF a chemokiny jako MIP1 α a β a RANTES. Imunogenní činidla mohou být spojena také s peptidy, které zvyšují transport přes tkáň (viz O'Mahony, WO 97/17 613 a WO 97/17 614.

Imunogenní činidla mohou být napojena na nosiče pomocí chemického spojování. Techniky napojení imunogenu na nosič zahrnují tvorbu disulfidových můstků použitím N-sukcinimidyl-3-(2-pyridyl-thio) propionátu (SPDP) a sukcinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyklohexan-1-karboxylát (SMCC) (když peptid postrádá sulfhydrylovou skupinu, může mu být poskytnuta přidáním cysteinového zbytku). Tyto látky tvoří disulfidové můstky mezi sebou a peptidovým cysteinem na jednom proteinu a amidové spojení přes ϵ -aminoskupinu lyzinu nebo volnou aminoskupinu jiné aminokyseliny. Různá taková činidla, tvořící disulfidová a amidová spojení jsou popsána v Immun. Rev. 62, 185 (1982). Jiná bifunkční spojovací činidla tvoří spíše než disulfidová spojení, spojení thioéterová. Mnohá z těchto činidel tvořících thioéterová spojení jsou komerčně dostupná a zahrnují reaktivní estery kyseliny 6-maleimidokaprové, kyseliny bromoctové, kyseliny 2-jodoctové a kyseliny 4-(N-maleimidomethyl) cyklohexan-1-karboxylové. Karboxylové skupiny mohou být aktivovány zkombinováním se sukcinimidem nebo se sodnou solí kyseliny 1-hydroxyl-2-nitro-4-sírové.

Imunogenní peptidy mohou být exprimovány také jako proteiny fúzované s nosiči (tj. heterologní peptidy). Imunogenní peptid může být napojen přes svůj aminový konec, karboxylový konec nebo oběma konci na nosič. Imunogenní peptid se může ve fúzním proteinu vyskytovat ve více kopiích. Imunogenní peptid může být také napojen na více kopií heterologního peptidu, například svým C-koncem i N-koncem. Některé nosné proteiny slouží k vyvolání odpovědi pomocných Z-buněk vůči sobě samým. Aktivované pomocné T-buňky pak obratem vyvolávají odpověď B-buněk proti imunogennímu peptidu připojenému k nosnému peptidu.

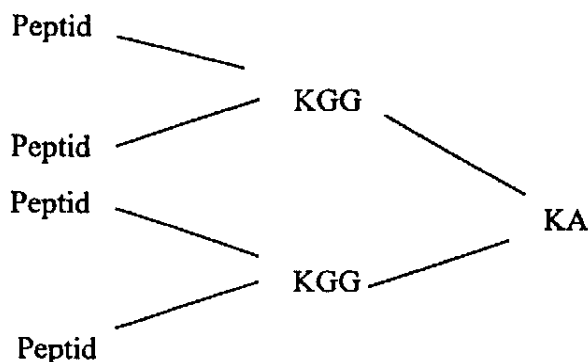
Některá činidla tohoto vynálezu obsahují fúzní protein, ve kterém je N-koncový fragment A β napojen svým C-koncem k nosnému peptidu. N-koncový zbytek fúzního proteinu je v těchto činidlech tvořen N-koncovým zbytkem fragmentu A β . Takovéto fúzní proteiny účinně působí při vyvolání protilátek, které vyžadují, aby epitop v N-koncovém zbytku byl ve volné formě. Někte-

rá z vynalezených činidel obsahují v molekule vícekrát opakované N-koncové části A β , jež jsou svým C-koncem napojena na jednu či více kopií nosného peptidu. N-koncový fragment A β , zabudovaný v těchto fúzních proteinech začíná někdy v A β 1 až 3 a končí v A β 7 až 11. Upřednostňovanými fragmenty A β jsou A β 1 až 7, A β 1 až 3, A β 1 až 4, A β 1 až 5 a A β 3 až 7. Některé fúzní proteiny obsahují různé N-koncové části A β za sebou. Fúzní protein může obsahovat například A β 1 až 7 následovaný heterologním peptidem.

V některých fúzních proteinech je N-koncová část A β fúzována svým koncem s heterologním nosným peptidem. Stejně různorodé N-koncové fragmenty A β mohou být použity i pro fúze s C-koncem. Některé fúzní proteiny obsahují heterologní peptid napojený na N-konec N-koncové části A β , jež je dále napojena na jednu nebo více dalších N-koncových částí A β za sebou.

Některé příklady fúzních proteinů vhodných pro použití v tomto vynálezu jsou ukázány níže. Některé z těchto fúzních proteinů obsahují části A β spojené s epitopy toxoidu tetanu (viz US 5 196 512, EP 378 881 a EP 427 347). Některé fúzní proteiny obsahují části A β napojené na nosné peptidy popsané v US 5 736 142. Některé heterologní peptidy představují pro T-buňky univerzální epitopy. V některých metodách je činidlo určené k podání pouze jednoduchý fúzní protein s částí A β spojenou s částí heterologní v lineární konfiguraci. V některých metodách je činidlem multimer složený z fúzních proteinů popsaných vzorcem 2^x, kde x značí číslo od 1 do 5, x je přednostně 1, 2 nebo 3, přičemž 2 bývá upřednostňována nejvíce. Když je x 2, obsahuje multimer 4 fúzní páry spojené do konfigurace známé jako MAP4 (viz US 5 299 490). Epitopy A β jsou podtrženy.

Konfigurace MAP4 je zobrazena níže. Větvené struktury vznikají zahájením syntézy peptidu jak v N-koncovém aminu lyzinu, tak i v aminu postranního řetězce lyzinové molekuly. Na tom kolikrát je lyzin v sekvenci zabudován a může se větvit, závisí konečné množství vzniklých N-konců. V tomto případě vznikají z rozvětveného lyzinu v jádře molekuly čtyři identické N-konce. Tato mnohočetnost mocně zvyšuje schopnost odezvy B-buněk.



AN90549 (A β 1–7/toxoid tetanu 830–844 v konfiguraci MAP4):

DAEFRHDQYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO: 10)

AN90550 (A β 1–7/toxoid tetanu 947–967 v konfiguraci MAP4):

DAEFRHDFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO: 11)

AN90542 (A β 1–7/toxoid tetanu 830–844 + 947–967 v lineární konfiguraci):

DAEFRHDQYIKANSKFIGITELFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE

(SEQ ID NO: 12)

AN90576 (A β 3-9/toxoid tetanu 830-844 v konfiguraci MAP4):

EFRHDSGQYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO: 13)

Peptidy pospané v US 5 736 142 (všechny v lineárních konfiguracích):

5 AN90562 (A β 1-7/peptid):

AKXVAAWTLKAAADAEFRHD (SEQ ID NO: 14)

AN90543 (A β 1-7 x 3/peptid):

DAEFRHDDAEFRHDDAEFRHDAKXVAAWTLKAAA

(SEQ ID NO: 15)

Další příklady fúzních proteinů (imunogenní epitop A β je zvýrazněn) zahrnují:

AKXVAAWTLKAAA-**DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD** (SEQ ID NO: 16)

DAEFRHD-AKXVAAWTLKAAA (SEQ ID NO: 17)

DAEFRHD-ISQAVHAAHAEINEAGR (SEQ ID NO: 18)

FRHDSGY-ISQAVHAAHAEINEAGR (SEQ ID NO: 19)

EFRHDSG-ISQAVHAAHAEINEAGR (SEQ ID NO: 20)

PKYVKQNTLKLAT-**DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD**

(SEQ ID NO: 21)

DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT-**DAEFRHD** (SEQ ID NO: 22)

DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT

(SEQ ID NO: 23)

DAEFRHD-DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT (SEQ ID NO: 24)

10 **DAEFRHD**-PKYVKQNTLKLAT-EKKIAKMEKASSVFNV-

QYIKANSKFIGITEL-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-

DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-

QYIKANSKFIGITEL-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE

(SEQ ID NO: 25)

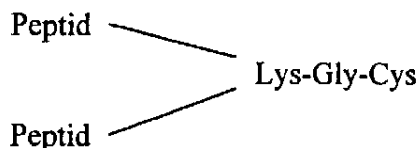
DAEFRHD-QYIKANSKFIGITELC

FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO: 26)

DAEFRHD-QYIKANSKFIGITELC

FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-**DAEFRHD** (SEQ ID NO: 27)

DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO: 28) 2 větve



EQVTNVGGAISOAVHAAHAEINEAGR (fúzní protein synukleinu
v konfiguraci MAP-4; SEQ ID NO: 29)

5 Stejně nebo podobné nosné proteiny a metody jejich spojení mohou být použity pro tvorbu imunogenů, určených pro stimulaci protilátek proti A β při pasivní imunizaci. Například A β nebo jeho fragment napojený na nosič mohou být podávány laboratorním zvířatům, která následně tvoří monoklonální protilátky proti A β .

10 6. Nukleové kyseliny kódující léčebná činidla

Imunitní odpověď proti amyloidním usazeninám může být vyvolána také podáním nukleových kyselin kódujících vybrané peptidové imunogeny nebo protilátky a jejich řetězce, jež jsou použí-
vány při pasivní imunizaci. Takové nukleové kyseliny mohou být DNA nebo RNA. Část nukleo-
15 vé kyseliny kódující imunogen je typicky napojena na regulační prvky (např. promotor a zesilovač), které dovolují expresi části DNA ve zvolených cílových buňkách pacienta. Pro expresi, jež je žádoucí pro vyvolání imunitní odpovědi, je vhodné použít promotor a zesilovač z genů pro lehký nebo těžký řetězec imunoglobulinu nebo hlavní promotor a enhancer ranných genů u CMV. Spojené regulační prvky a kódující sekvence jsou často vloženy do vektoru. Při
20 podávání dvouřetězcových protilátek mohou být dva řetězce vloženy do jednoho či více oddělených vektorů.

K dispozici je množství virových vektorů, mezi něž patří retrovirové vektory (viz např., Lawrie and Tumin, Cur. Opin. Genet. Develop. 3, 102 až 109, 1993); adenovirové vektory (viz např.,
25 Bett et al., J. Virol. 67, 5911, 1993); virové vektory spojené s adenoviry (viz např., Zhou et al., J. Exp. Med. 179, 1867, 1994), virové vektory z rodiny poxvirů, jako třeba virus vakcinie a ptačí pox viry, virové vektory z rodu alfa virů, například vektory odvozené od viru Sindbis a viru SFV (Semliki forest virus) (viz např., Dubensky et al., J. Virol. 70, 508 až 519, 1996), od viru venezuelské koňské encefalitidy (viz US 5 643 576) a virové vektory z rhabdovirů (např. virus vesikulární stomatitidy, viz WO 96/34 625) a z papilomavirů (Ohe et al., Human Gene Therapy 6, 325 až 333, 1995); Woo et al., WO 94/12 629 a Xiao & Brandsma, Nucleic Acids Res. 24, 2630 až 2622).

35 DNA kódující imunogen nebo vektor s touto DNA mohou být zabaleny do lipozómů. Vhodné lipidy a příbuzné analogy jsou popsány patenty US 5 208 036, 5 264 618, 5 279 833 a 5 283 185. Vektory a DNA kódující imunogen mohou být také adsorbovány nebo napojeny na částicové nosiče (např. polymery polymethylmethakrylátu a polylaktidy a poly(laktid-ko-glykosidy) (obecně viz McGee et al., J. Micro Encap., 1996).

40 Vektory pro genovou terapii nebo samotná DNA mohou být do pacienta dopraveny *in vivo*, s tím, že podání je nejčastěji systemické (např. intravenózní, intraperitoneální, intranasální, gastrické, intradermální, intramuskulární, subdermální nebo intrakraniální infúze) nebo lokální (viz např., US 5 399 346). Tyto vektory mohou dále obsahovat zesilující činidla jako třeba bupivakain (US 5 593 970). DNA může být podávána použitím „genové zbraně“ (viz Xiao & Brandsma,
45 výše). DNA kódující imunogen je vysrážena na povrchu mikroskopických kovových kuliček. Mikroprojektily jsou urychleny tlakovou vlnou expandujícího héliového plynu a pronikají tkáněmi do hloubky několika buněčných vrstev. Vhodný je například přístroj The Accel™ Gene Delivery Device (Agrocetus, Inc. Middleton, WI). Holá DNA může procházet kůží do krevního oběhu jednoduchou aplikací na chemicky nebo mechanicky porušenou kůži (viz WO 95/05 853).

Vektory kódující imunogeny se mohou do buněk dostat *ex vivo*, jako třeba do buněk získaných z pacienta (např., lymfocyty, vzorky kostní dřeně, vzorky tkáně) nebo do univerzálních dár-
covských krvetvorných kmenových buněk. Následujícím krokem je reimplantace buněk do paci-
enta předcházená obvykle výběrem buněk, jež přijaly vektor.

7. Testování očišťovacích schopností protilátek

Příklad 14 popisuje metody testování účinnosti protilátek při „očišťování“ od amyloidních usaze-
nin. Za účelem testování účinnosti při očišťování od amyloidních usazenin, byly z pacientů nebo
zvířat trpících amyloidózou odebrány vzorky tkáně (např. mozková tkáň při Alzheimerově
chorobě. Vzorky jsou zkontaktovány s fagocytárními buňkami nesoucími Fc receptor (např. mik-
rogliaální buňky) a s testovanou protilátkou přítomnou v médiu *in vitro*. Fagocytární buňky mohou
být v primární kultuře nebo buněčnou linií (např. BV-2, C8-B4 nebo THP-1). Tyto složky jsou
pro zesílení mikroskopického pozorování zkombinovány na mikroskopickém sklíčku, přičemž
mnoho paralelních reakcí může být uskutečněno v jamkách mikrotitrační destičky. V tomto pří-
padě mohou být jednotlivá miniaturní mikroskopická sklíčka upevněna do jednotlivých jamek.
Použity mohou být také jiné způsoby detekce A β (např. ELISA). Nejčastěji se uskutečňují série
měření množství amyloidních usazenin v reakční směsi *in vitro*, přičemž bazální hodnota značí
množství amyloidu v reakční směsi před započítáním reakce. Antigen může být detekován barve-
ním (např. fluorescenčně označená protilátka proti A β nebo jiné složce amyloidního plaku). Pro-
tilátka používaná pro barvení může, ale nemusí být tatáž protilátka, která je testována. Snížení
množství amyloidního plaku vzhledem k bazální hodnotě značí, že testovaná protilátka má očiš-
ťovací schopnost. Takovéto protilátky bývají užitečné při prevenci nebo léčbě Alzheimerovy
choroby a dalších amyloidogenních onemocnění. Jak již bylo popsáno výše, pokusy prováděné
pro podporu předkládaného vynálezu a využívající této analýzy odhalily, že protilátka proti NAC
fragmentu synukleinu jsou účinné při očišťování od amyloidních plaků, charakteristických pro
Alzheimerovu chorobu.

D. Pacienti podrobující se protiamyloidním léčebným režimům

Pacienti podrobující se léčbě zahrnují jedince s rizikem vzniku nemoci, kteří ještě nevykazují
symptomy nemoci, stejně tak jako pacienti, u nichž amyloidóza již propukla. V případě Alzhei-
merovy choroby je potenciálním budoucím zasaženým každý, kdo žije dostatečně dlouho. Před-
kládané metody mohou být tedy užívány v rámci profylaxe širokou populací, aniž by bylo nutné
zjišťovat riziko u jednotlivého pacienta. Předkládané metody jsou zvláště vhodné pro jedince,
kteří jsou dědičně svázáni s výskytem Alzheimerovy choroby nebo jakékoli jiné geneticky dané
amyloidní poruchy. Mezi tyto jedince patří ti, kteří mají příbuzné trpící takovou chorobou nebo
ti, jimž bylo riziko vzniku nemoci oznámeno po analýze genetických nebo biochemických indi-
kátorů. Genetické indikátory poukazující na možné riziko vzniku Alzheimerovy choroby zahrnují
mutace v genu APP, zvláště však mutace v pozici 717 (Hardyho mutace) a v pozicích 670 a 671
(Švédská mutace) (viz Hardy, TINS, výše). Dalšími indikátory jsou mutace v genech presenilinu,
PS1 a PS2, ApoE4, rodinná historie výskytu Alzheimerovy choroby, hypercholesterolemie nebo
ateroskleróza. Jedinci, kteří již Alzheimerovou chorobou trpí, mohou být rozpoznáni jak podle
charakteristické demence, tak i podle přítomnosti výše popsaných rizikových faktorů. Existuje
také množství diagnostických testů pro identifikaci jedinců s AD, mezi něž patří měření hladin
CSF tau a A β 42. Zvýšená hladina tau a nízká hladina A β značí přítomnost AD. Jedinci trpící
Alzheimerovou chorobou mohou být diagnostikováni také pomocí kritérií MMSE nebo ADRDA,
což je diskutováno v příkladech provedení vynálezu.

U asymptomatických pacientů může léčba začít v jakémkoli věku (např. 10, 20, 30). Léčba
ovšem není obvykle nutná dokud pacient nedosáhne 40, 50 nebo 70 let. Typická léčba znamená
aplikaci více dávek během časového období. Léčba může být sledována analyzováním protilátko-
vých nebo T nebo B-buněčných odpovědí na léčebné činidlo (např. peptid A β) (viz příklad 1 a
2). Jestliže odpověď poklesne, je aplikována posilovací dávka. V případě rozvinutí Downova

syndromu může léčba začít před narozením, a to podáváním léčebného činidla matce, a nebo krátce po narození.

5 Další formy amyloidóz často probíhají nediagnostikovány, kromě případů, kdy existuje zvláštní podezření pro vznik nemoci. Jedním z prvních příznaků je výskyt srdečního nebo ledvinového onemocnění u pacientů středního a staršího věku, přičemž pacienti jeví také známky účasti (ukládání plaků v) dalších orgánů. Nízké napětí nebo extrémní odchylky osy EKG a zbytnělá tkáň srdeční předsíně mohou být známkami srdeční poruchy. Proteinurie je symptomem účasti ledvin. Jestliže je při vyšetření pacienta zjištěna hepatomegalie, tak existuje podezření účasti jater. Periferní neuropatie se obvykle při určitých formách amyloidóz vyskytuje také, přičemž autonomní neuropatie, jež je charakteristická posturální hypotenzí se může objevit také. Každý jedinec s progresivní neuropatií neurčitého původu by měl být podezříván z výskytu amyloidózy. V případech kdy je to nutné, může být konečná diagnóza určena ze vzorků napadeného orgánu nebo orgánů. Vzorky jsou obarveny barvou Congo Red, přičemž pozitivní vzorky vykazují
15 v polarizovaném světle dvojlom jablečně zelené barvy.

E. Léčebné režimy

Při profylaktickém použití mohou být farmaceutické prostředky nebo léky podávány pacientovi, jenž je náchylný ke vzniku určité nemoci nebo zde existuje jiné riziko pro její vznik, a to v množství, které je dostatečné pro odstranění nebo snížení rizika vzniku onemocnění nebo jeho oddálení. Při terapeutickém použití jsou léčebné prostředky nebo léky podávány pacientovi, jenž je podezřelý z výskytu onemocnění nebo jím už trpí, a to v množství dostatečném pro vyléčení nebo alespoň pro částečné potlačení symptomů nemoci a s nemocí spojených komplikací. Množství dostatečné pro splnění právě vyjmenovaného je nazýváno jako terapeuticky nebo farmaceuticky účinná dávka. Jak pro profylaktické, tak i pro terapeutické účely jsou činidla obvykle podávána ve více dávkách, a to tak dlouho, dokud není dosaženo dostatečné imunitní odpovědi. Imunitní odpověď je sledována, a když začíná imunitní odpověď klesat, jsou podávány další dávky.

Účinné dávky prostředků předkládaného vynálezu, určené pro léčbu výše popsaných stavů, jsou závislé na mnoha různých faktorech, mezi něž patří způsoby podání, cílové místo, fyziologický stav pacienta, to, zda je pacientem zvíře nebo člověk, další podávané léky a to, zda aplikace probíhá za účelem profylaxe či terapie. Pacientem je obvykle člověk, ale u některých nemocí (např. s priony spojená nemoc šílených krav) může být pacientem jiný savec než člověk, například skot. Léčebné dávky je pro optimalizaci bezpečí a účinku nutno titrovat. Množství imunogenu záleží na tom, zda je podáván také adjuvant, přičemž větších dávek je obecně potřeba při neúčasti adjuvantu. V závislosti na imunogenicitě příslušného imunogenu se množství imunogenu pro podání může pohybovat od 1 do 500 µg na pacienta a od 5 do 500 µg na injekci určenou lidskému pacientovi. občas jsou používány vyšší dávky, tj. 0,5 až 5 mg na injekci. Pro injekci určenou lidskému pacientovi jsou používány dávky nejméně okolo 10, 20, 50 nebo 100 µg. Doba aplikace se může významně lišit, a to od frekvence jednou denně až k frekvenci jednou ročně nebo až jednou za deset let, jakkoli jsou pro svoji úspěšnost upřednostňovány „posilovací“ dávky imunogenu. Podle zde uvedených postupů lze účinné dávky sledovat analýzou vzorku tekutiny z pacienta (nejčastěji vzorku krevního séra) a určením protilátkového titru proti imunogenu, a to za použití v oboru dobře známých metod, které lze podle konkrétního antigenu dále adaptovat. Nejvýhodnější je získání vzorku tkáně ještě před aplikací první dávky, přičemž další vzorky jsou pak odebírány a titrovány po každé imunizaci. Žádanou je dávka nebo dávkovací schémata, která poskytují titry nejméně čtyřikrát vyšší než jsou kontrolní hladiny neboli hladiny „pozadí“, přičemž sérum je naředěno 1:100 a pozadí je definováno jako ve vztahu ke kontrolnímu vzorku séra nebo ve vztahu k hodnotě pozadí u ELISA testů. Podle předkládaného vynálezu jsou žádoucí titry nejméně 1:1000 nebo 1:5000.

V jakýkoli den kdy dochází k podání imunogenu spolu s adjuvantem, je dávka větší než 1 µg na pacienta, a ještě lépe vyšší než 100 µg na pacienta. Když je adjuvant nepřítomen, tak je množství imunogenu na pacienta vyšší než 10 µg, a ještě lépe vyšší než 100 µg. Dávky jednotlivých imu-

nogenů, zvolených ve shodě s předkládaným vynálezem, jsou určeny standardními dávkovacími a titrovacími metodami. Typický režim sestává z imunizace následované v časových intervalech (např. 6 týdnů) posilovacími injekcemi. Jiný režim sestává z imunizace následované posilovacími injekcemi po 1, 2 a 12 měsících. Jiný režim zahrnuje injekci vždy po každých dvou měsících až do konce života. Posilovací injekce mohou být v závislosti na zjištěném stavu imunitní odpovědi podávány nepravidelně.

U pasivní imunizace s protilátkou mají dávky rozpětí od asi 0,0001 do 100 mg/kg a ještě častěji od 0,01 do 5 mg/kg, a to podle hmotnosti pacienta. Dávky mohou být například 1 mg/kg tělesné váhy nebo 10 mg/kg tělesné váhy. Ukázkový léčebný režim zahrnuje podávání jednou za dva týdny nebo jednou za měsíc nebo jednou za tři až šest měsíců. Podle některých metod jsou současně podávány dvě či více monoklonálních protilátek s různou vazebnou specifitou, přičemž dávky každé z nich se pohybují ve vymezených hranicích. Protilátka je obvykle podávána vícekrát. Intervaly mezi jednotlivými dávkami mohou být týdenní, měsíční nebo roční. Intervaly mohou být i nepravidelné, což je určeno měřením hladiny protilátky proti A β v krvi pacienta. Protilátka může být podávána také ve formě prostředku s postupným uvolňováním, což je případ, ve kterém může být frekvence aplikací nižší. Dávka a frekvence se liší v závislosti na poločasu života protilátky v pacientovi. Nejčastěji vykazují nejdelší poločas života lidské protilátky následované humanizovanými protilátkami, Chimérickými protilátkami a zvířecími protilátkami. Dávka a frekvence podávání se může lišit v závislosti na tom, zda je léčba profylaktická nebo terapeutická. Při profylaktickém použití jsou v dlouhém časovém intervalu aplikovány relativně nízké dávky s relativně nízkou frekvencí. Někteří pacienti jsou léčeni po celý zbytek života. Při terapeutickém použití jsou aplikovány i relativně vysoké dávky v relativně krátkých intervalech, neboť někdy jsou nezbytné pro zbrzdění postupu nemoci nebo její zastavení, a nebo ještě lépe, pro částečné nebo celkové vymizení symptomů. Potom může být pacient léčen podle profylaktického režimu.

Dávky nukleových kyselin kódujících imunogeny se pohybují v rozmezí od asi 10 ng do 1 g, 100 ng do 100 mg, 1 μ g do 10 mg nebo 30 až 300 μ g DNA na pacienta. Množství infekčních virových vektorů se pohybují v rozmezí od 10 do 100 nebo více virionů na dávku.

Činidla vyvolávající imunitní odpověď mohou být pro profylaktické či terapeutické použití podány parenterálně, lokálně, intravenózně, orální cestou, subkutánně, intraperitoneálně, intranasálně nebo intramuskulárně. Typické cesty podání imunogenního činidla jsou cesta intramuskulární (i.m.), intravenózní (i.v.) nebo subkutánní (s.c.), nicméně ostatní cesty mohou být stejně účinné. Intramuskulární injekce je nejčastěji aplikována do svalů ruky či nohy. Podle některých metod jsou činidla injikována přímo do určité tkáně, ve které došlo k nahromadění usazenin (např. intrakraniální infúze). Intramuskulární injekce nebo intravenózní infúze jsou při podávání protilátky upřednostňovány. Podle některých metod jsou určité léčebné protilátky injikovány přímo do lebky. Podle některých metod jsou protilátky aplikovány jako prostředky s postupným uvolňováním, přičemž použita mohou být i zařízení konstruována pro tyto účely (např. zařízení MedipadTM).

Činidla tohoto vynálezu mohou být libovolně podávána v kombinaci s dalšími činidly, jež jsou při léčbě amyloidogenní nemoci alespoň částečně účinná. V případě Alzheimerovy choroby a Downova syndromu, u kterých se amyloidní usazeniny objevují v mozku, mohou být činidla tohoto vynálezu podávána ve spojení s dalšími činidly, která zesilují průnik čidel tohoto vynálezu přes hematoencefalickou bariéru. Léčebné koktejly obsahují imunogeny připravené tak, že jsou schopny vyvolat imunitní odpověď proti více než jedné amyloidní složce, jsou v předkládaném vynálezu zahrnuty také, jelikož jsou kombinací protilátky zaměřené proti jedné plakové složce a imunogenu, zaměřenému proti jiné plakové složce.

Imunogenní činidla tohoto vynálezu, jako třeba peptidy, se podávají někdy v kombinaci s adjuvanem. Pro vyvolání imunitní odpovědi může být v kombinaci s peptidem (např. A β) podáváno množství adjuvantů. Nejlepší je, když adjuvanty zesilují vnitřní odpověď na imunogen, aniž by

působily konformační změny imunogenu, které by zasáhly kvalitativní stránku odpovědi. Mezi upřednostňované adjuvanty patří hydroxid hlinitý a fosforečnan hlinitý, 3 De-O-acetylovaný monofosforyllipid A (MPL™) (viz GB 2 220 211; RIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton, Montana, nyní část Corixa). Stimulon™ QS-21 je triterpenový glykosid nebo saponin, izolovaný z kůry stromu *Quillaja Saponaria Molina*, jenž se nachází v Jižní Americe (viz Kensil et al., in Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach; eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995; patent US 5 057 540, Aquila BioPharmaceuticals, Framingham, MA). Dalšími adjuvanty jsou emulze oleje a vody (např. skvalenový olej nebo olej z podzemnice olejné), v libovolné kombinaci s imunostimulanty jako je monofosforyllipid A (viz Stoute et al., N. Engl. J. Med. 336, 86 až 91, 1997). Dalším adjuvancem je CpG (WO 98/40 100). Aβ může být také někdy spojeno s adjuvancem, přičemž takovéto spojení by nemělo nijak zásadně změnit konformaci Aβ, tj. nemělo by změnit povahu jím vyvolané imunitní odpovědi. Adjuvanty mohou být podávány jako složky léčebného prostředku spolu s účinným činidlem nebo mohou být podávány zvlášť, a to jak před, spolu s nebo i po podání léčebného činidla.

Upřednostňovanou skupinou adjuvantů jsou soli hliníku (alum), mezi něž patří hydroxid hlinitý, fosforečnan hlinitý a síran hlinitý. Tyto adjuvanty mohou být použity buď s, nebo bez dalších imunostimulačních činidel, jakými jsou MPL nebo 3-DMP, QS-21, polymerní nebo monomerní aminokyseliny (např. kyselina polyglutamová, polylyzin). Další třída adjuvantů obsahuje prostředky na základě emulze oleje a vody. Tyto adjuvanty mohou být použity s nebo bez dalších specifických imunostimulačních činidel, mezi něž patří muramylpeptidy (např. N-acetylmuramyl-L-threonyl-D-isoglutamin (thr-MDP), N-acetyl-normuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin (nor-MDP), N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanin-2-(1'-2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3-hydroxyfosforyloxy)-ethylamin (MTP-PE), N-Acetylglukaminyl-N-acetylmuramyl-L-Al-D-isoglu-L-Ala-dipalmitoxypropylamid (DTP-DPP), theramide™ nebo jiné složky z buněčné stěny bakterií. Emulze oleje a vody zahrnují (a) MF59 (WO 90/14 837), jenž obsahuje 5 % skvalenu, 0,5 % Tween 80 a 0,5 % Span 85 (volitelně obsahující různá množství MTP-PE), které jsou přítomny jako částice o velikosti menší než 1 μm, což je docíleno pomocí mikrofluidizéru (např. model 110Y, Microfluidics, Newton MA), (b) SAF, jenž obsahuje 10 % skvalenu, 0,4 % Tween 80, 5 % pluronic-blocked polymer L121 a thr-MDP, které jsou upravené mikrofluidizérem tak, aby byly přítomny jako částice o velikosti menší než 1 μm nebo pouze promíchány na vortexu (speciální laboratorní míchací zařízení), což vedlo k tvorbě emulze s většími částicemi, a (c) adjuvační systém s Ribi™ (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT), jenž obsahuje 2 % skvalenu, 0,2 % Tween 80 a jednu nebo více složek bakteriální buněčné stěny zahrnující monofosforyllipid A, dimykolát trehalózy (TDM) a kostru buněčné stěny (CWS), nejlépe však MPL + CWS (Detox™). Další třídou používaných adjuvantů jsou saponinové adjuvanty, jako třeba Stimulon™ (QS-21; Aquila, Framingham, MA) nebo z něho vytvořené částice, jako například ISCOMs (imunostimulační komplexy) a ISCOMATRIX. Další adjuvanty zahrnují Nekompletní Freundův adjuvant (IFA), cytokiny, jako třeba interleukiny (IL-1, IL-2 a IL-12), faktor stimulující kolonie makrofágů (M-CSF) a faktor nádorové nekrózy (TNF). Tyto adjuvanty jsou běžně dostupné z komerčních zdrojů.

Adjuvanty mohou být podávány spolu s imunogenem v jednom prostředku nebo mohou být podávány zvlášť, a to jak před, spolu s nebo i po podání imunogenu. Imunogen a adjuvant mohou být baleny a dodávány ve stejné lahvičce nebo mohou být baleny v oddělených lahvičkách, s tím, že před použitím budou promíchány. Imunogen a adjuvant jsou baleny se značkou udávající zamýšlené použití prostředku. Jestliže jsou imunogen a adjuvant zabaleny odděleně, tak balení obsahuje pokyny pro jejich smíšení před použitím. Volba adjuvantu nebo nosiče (nebo obou současně) závisí na takových faktorech, jakými jsou stabilita prostředku obsahujícího adjuvant, způsob podání, dávkovací schéma a účinnost adjuvantu u živočišných druhů, kterým je podáván. U člověka je upřednostňovaným farmaceuticky přijatelným adjuvancem látka, která pro podávání byla schválena příslušným řídicím orgánem. Příklady takovýchto adjuvantů zahrnují alum, MPL a QS-21. Současně mohou být použity i dva či více adjuvantů. Upřednostňované kombinace zahrnují alum s MPL, alum s QS-21, MPL s QS-21 a alum, MPL a QS-21 společně. Použít

může být i Nekompletní Freundův adjuvant (Chang et al., *Advanced Drug Delivery Reviews* 32, 173 až 186, 1998), případně v jakékoli kombinaci s alum, MPL a QS-21 nebo jejich směsí.

Činidla tohoto vynálezu jsou často podávána jako farmaceutické prostředky, které obsahují účinné léčebné činidlo a řadu dalších farmaceuticky přijatelných složek (viz Remington's Pharmaceutical Science, 19th ed., 1995). Konečné složení závisí na zamýšleném způsobu podání a na léčebném určení. Prostředky mohou v závislosti na zamýšleném složení obsahovat také farmaceuticky přijatelné netoxické nosiče nebo rozpouštědla, která jsou běžně používána pro přípravu farmaceutických prostředků, určených pro podání lidem nebo zvířatům. Rozpouštědlo je vybíráno tak, aby neovlivnilo biologickou účinnost směsí. Příklady takovýchto rozpouštědel jsou destilovaná voda, fyziologický roztok soli pufrovaný fosfátem, Ringerovy roztoky, roztok dextransů a Hankův roztok. Farmaceutický prostředek může obsahovat také další nosiče, adjuvanty nebo netoxické, neléčebné, neimunogenní stabilizátory atd.

Farmaceutické prostředky mohou také obsahovat velké, pomalu metabolizovatelné makromolekuly, mezi něž patří proteiny, polysacharidy (např. chitosan), polymléčné kyseliny, polyglykolové kyseliny a kopolymery (např. sepharóza, agaróza, celulóza atd.), polymerní aminokyseliny, kopolymery aminokyselin a lipidové agregáty (olejové kapičky nebo lipozómy). Tyto nosiče mohou fungovat také jako imunostimulační činidla (tj. adjuvanty).

Při parenterálním podání mohou být činidla tohoto vynálezu aplikována jako injikovatelné roztoky nebo suspenze látky ve fyziologicky přijatelném rozpouštědle s farmaceuticky přijatelným nosičem, jímž může být sterilní kapalina (např. voda, oleje, soli, glycerol nebo ethanol). Pomocné látky jako jsou zvlhčovací nebo emulzifikační činidla, surfaktanty, pufrující látky atd. mohou být také v prostředku obsaženy. Další složky farmaceutického prostředku jsou získávány z ropy, ze zvířat, ze zeleniny nebo jsou syntetického původu (např. olej z podzemnice olejné, sójový olej a minerální oleje). Pro injikovatelné roztoky platí, že upřednostňovanými kapalnými nosiči jsou glykoly (např. propylenglykol nebo polypropylenglykol). Protilátky mohou být podány ve formě depotních injekcí nebo implantovaného preparátu, který může být uzpůsoben pro postupné uvolňování účinné látky. Příkladný prostředek obsahuje monoklonální protilátku v množství 5 mg/ml ve vodném pufru, jenž obsahuje 50mM L-histidin, 150mM NaCl, pH upraveno na 6.0 pomocí HCl.

Prostředky jsou nejčastěji připravovány jako injikovatelné roztoky nebo suspenze. Prostředek může být pro zvýšení adjuvačního účinku také emulzifikován nebo zabalen v lipozómech nebo v mikročásticích (např. polyaktid, polyglykolid nebo kopolymer), což je diskutováno výše (viz Langer, *Science* 249, 1527 (1990) a Hanes, *Advanced Drug Delivery Reviews* 28, 97 až 119, 1997). Činidla tohoto vynálezu mohou být podána ve formě depotních injekcí nebo implantovaného preparátu, který může být uzpůsoben pro postupné uvolňování účinné látky.

Prostředky jsou vhodné i pro další způsoby podání, mezi něž patří podání orální, intranasální a pulmonární podání, čípky a transdermální aplikace.

Čípky, pojidla a nosiče obsahují například polyalkylenglykoly nebo triglyceridy. Čípky mohou být vytvořeny ze směsí obsahujících účinnou látku v rozmezí od 0,5 do 10 %, nejlépe však 1 až 2 %. Prostředky pro orální aplikaci zahrnují pomocné látky, mezi něž patří manitol, laktóza, škrob, stearan hořečnatý, sacharin sodný, celulóza a uhličitán hořečnatý. Tyto prostředky mají podobu roztoků, suspenzí, tablet, pilulek, kapslí, preparátů s postupným uvolňováním nebo prášků a obsahují 10 až 95 % účinné látky, nejlépe však 25 až 75 %.

Lokální aplikace může probíhat transdermálním nebo intradermálním podáním. Lokální aplikace může být zesílena podáním činidel alum s toxinem cholery nebo s jeho detoxifikovanými deriváty nebo s jejich podjednotkami nebo s jinými obdobnými bakteriálními toxiny (viz Glenn et al., *Nature* 391, 851, 1998). Společného podání může být dosaženo smísením roztoků jednotlivých

složek nebo spojením jejich molekul chemickým spojením nebo vytvořením fúzního proteinu z těchto složek.

- 5 Transdermální aplikace může být provedena s použitím náplastí nebo pomocí transferozómů (Paul et al., Eur. J. Immunol. 25, 3521 až 24, 1995; Cevc et al., Biochem. Biophys. Acta 1368, 201 až 15, 1998).

F. Diagnostické metody

- 10 Tento vynález uvádí metody pro zjištění imunitní odpovědi proti A β u pacienta trpícího nebo náchylného k Alzheimerově chorobě. Tyto metody jsou zvláště užitečné pro sledování průběhu léčby pacienta. Tyto metody mohou být použity pro sledování postupu léčby u pacientů se symptomy i pro sledování profylaktického postupu u asymptomatických pacientů. Tyto metody jsou užitečné pro sledování aktivní (např. protilátka vytvořená jako odpověď na podání imunogenu) a
15 pasivní imunizace (měření hladiny podané protilátky).

1. Aktivní imunizace

- 20 Některé metody zahrnují určení základní hodnoty imunitní odpovědi před podáním dávky činidla a její porovnání s hodnotou imunitní odpovědi po léčbě. Významné zvýšení (tj. větší než je typická experimentální chyba v opakovaných měřeních stejného vzorku, vyjádřená jako standardní odchylka průměru z těchto měření) hodnoty imunitní odpovědi signalizuje pozitivní výsledek léčby (tj. podání činidla vyvolalo nebo posílilo imunitní odpověď). Jestliže se hodnota imunitní odpovědi nezmění významně nebo poklesne, je to signálem negativního výsledku léčby.
25 U pacientů podstupujících léčbu s imunogenním činidlem se s další dávkou očekává zvýšení imunitní odpovědi, které pak případně dosáhne plató. Podávání činidla pokračuje většinou tak dlouho, dokud se imunitní odpověď zvyšuje. Dosažení plató je signálem pro přerušeni léčby nebo snížení dávky či frekvence podávání.

- 30 Dalšími metodami se určuje kontrolní hodnota (tj. průměr a standardní odchylka) imunitní odpovědi u kontrolní populace. Jedinci z kontrolní populace neabsolvovali předchozí léčbu. Změřené hodnoty imunitní odpovědi u pacienta po podání léčebného činidla jsou pak porovnány s kontrolní hodnotou. Významné zvýšení v poměru ke kontrole (tj. větší než jedna standardní odchylka průměru) signalizuje pozitivní výsledek léčby. Nepřítomnost významného zvýšení nebo
35 pokles odpovědi značí negativní výsledek léčby. V podávání činidla se většinou pokračuje dokud se hodnota imunitní odpovědi zvyšuje oproti kontrolní hodnotě. Dosažení plató je signálem pro přerušeni léčby nebo snížení dávky či frekvence podávání.

- 40 Dalšími metodami se zjišťuje kontrolní hodnota imunitní odpovědi (např. průměr a standardní odchylka) u kontrolní populace jedinců, kteří se již podrobili léčbě terapeutickým činidlem a jejichž imunitní odpovědi dosáhly po léčbě plata. Změřené hodnoty imunitní odpovědi u pacienta jsou porovnány s kontrolní hodnotou. Jestliže změřená hladina u pacienta není významně odlišná (např. více než jedna standardní odchylka) od kontrolní hodnoty, léčba může být přerušena. Jestliže je pacientova hladina významně pod kontrolní hodnotou, je zajištěno další podá-
45 vání činidla. Jestliže hladina v pacientovi zůstane pod kontrolní hodnotou, tak je nutné změnit například léčebný režim nebo použít jiný adjuvant.

- Dalšími metodami se sleduje imunitní odpověď pacienta, který se v současnosti léčbě nepodrobuje, ale prodělal ji už dříve, a to za účelem zjištění, zda není třeba léčbu znovu zahájit. Změřená
50 hladina imunitní odpovědi pacienta může být porovnána s hodnotou imunitní odpovědi dosažené u pacienta předchozí léčbou. Významné snížení v porovnání s předchozím měřením (tj. větší než je typická experimentální chyba v opakovaných měřeních stejného vzorku) je známkou nutnosti pokračování léčby. Hodnota změřená u pacienta může být také porovnána s kontrolní hodnotou (průměr plus standardní odchylka) zjištěnou u populace pacientů po ukončení léčby. Hodnota
55 změřená u pacienta může být porovnána s kontrolní hodnotou u populace profylakticky léčených

pacientů, kteří nevykazují symptomy nemoci nebo u populace terapeuticky léčených pacientů, kteří vykazují zlepšení charakteristik onemocnění. Ve všech těchto případech je významné snížení ve vztahu ke kontrolní hladině (tj. více než jedna standardní odchylka) známkou toho, že léčba pacienta by měla znovu začít.

Analyzované vzorky tkání pacienta jsou typicky krev, plazma, sérum a mukózní nebo cerebrospinální tekutina. Ve vzorku jsou zjišťovány známky imunitní odpovědi na sledovanou amyloidní složku (např. jakákoli forma peptidu A β). Imunitní odpověď může být určena například podle přítomnosti protilátek nebo T-buněk, které se specificky váží na sledovanou složku (např. peptid A β). Metody ELISA pro zjištění protilátek specifických pro A β jsou popsány v části příkladů a mohou být použity i na jiné peptidové antigeny. Metody zjištění reaktivních T-buněk jsou v oboru dobře známy.

2. Pasivní imunizace

Postupy pro sledování pasivní imunizace jsou většinou obdobné postupům pro sledování aktivní imunizace, která byla výše popsána. Profil protilátky při pasivní imunizaci je typický tím, že okamžitý vrchol koncentrace protilátky je následován exponenciálním poklesem. Bez dalších dávek dosahuje během dnů až měsíců (v závislosti na poločas života podané protilátky) hladin, které byly změřeny před léčbou. Například poločas života některých lidských protilátek se pohybuje okolo 20 dnů.

Podle některých metod se měření základní hladiny protilátky proti A β odehrává u pacienta před prvním podáním činidla, druhé měření brzy po podání (pro určení vrcholové hodnoty koncentrace protilátky) a jedno nebo více dalších měření se provádí v dalších intervalech pro určení poklesu hladiny protilátky. Když hladina protilátky poklesne na základní hladinu nebo blízko k ní (např. na 50, 25 nebo 10 %), proběhne aplikace další dávky protilátky. Podle některých metod jsou hodnoty vrcholové a hodnoty zjištěné v následných měřeních srovnány s dříve naměřenými referenčními hodnotami, které byly ustaveny pro zjištění prospěšných profylaktických nebo terapeutických léčebných režimů u jiných pacientů. Když je změřená hladina protilátky významně nižší než referenční hladina (např. méně než průměr minus jedna standardní odchylka referenční hodnoty v populaci pacientů, u kterých byla léčba úspěšná), je nutno podat další dávku protilátky.

3. Diagnostické sady

Vynález dále popisuje diagnostické sady pro použití při výše popsáných diagnostických metodách. Taková sada typicky obsahuje činidlo, které se specificky váže na protilátky proti složce amyloidního plaku (např. A β) nebo reaguje s T-buňkami specifickými pro danou složku. Sada může obsahovat také značku. Při detekci protilátek proti A β je značka typicky ve formě označených anti-idiotypických protilátek. Pro detekci protilátky může být činidlo dodáváno předem ukotveno v pevné fázi (např. v jamkách mikrotitrační destičky). Pro detekci reaktivních T-buněk může být značkou ^3H -thymidin, pomocí kterého se měří proliferativní odpověď. Sada je také typicky opatřena označením pro její použití. Označení může zahrnovat také tabulku nebo jiné hodnocení pro korelaci hladiny naměřené značky s hladinou protilátek proti A β nebo T-buněk reagujících s A β . Termín označení se vztahuje k jakémukoli psanému či jinak zaznamenanému materiálu, který je k sadě připevněn nebo jinak připojen, a to kdykoli během její výroby, převozu, prodeje a použití. Termín označení zahrnuje reklamní letáky a brožury, balicí materiály, návody, audio nebo video kazety, počítačové disky, stejně tak jako nápisy nacházející se přímo na sadě.

Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1: Protilátkový titr u transgenních myší po injekci A β 1 až 42.

Obr. 2: Amyloidní zátěž v hipokampu. Procento hipokampální oblasti obsazené amyloidními plaky, určenými reaktivitou s A β -specifickou monoklonální protilátkou 3D6, bylo určeno pomocí počítačové kvantitativní analýzy obrazu. Hodnoty pro jednotlivé myši jsou zobrazeny v jednotlivých léčebných skupinách. Horizontální čára u každé skupiny zobrazuje střední hodnotu rozdělení.

Obr. 3: Neuritická dystrofie v hipokampu. Procento hipokampální oblasti obsazené dystrofickými neurity, určenými reaktivitou s lidskou APP-specifickou monoklonální protilátkou 8E5, bylo určeno pomocí počítačové kvantitativní analýzy obrazu. Hodnoty pro jednotlivé myši jsou zobrazeny zvlášť pro skupinu vystavenou působení AN1792 a kontrolní skupinu vystavenou působení PBS. Horizontální čára u každé skupiny zobrazuje střední hodnotu rozdělení.

Obr. 4: Astrocytóza v retrosplenální kůře. Procento korové oblasti obsazené astrocyty pozitivními na gliální vláknitý acidický protein (GFAP) bylo určeno pomocí počítačové kvantitativní analýzy obrazu. Hodnoty pro jednotlivé myši jsou zobrazeny v jednotlivých léčebných skupinách a horizontální čára u každé skupiny zobrazuje střední hodnotu rozdělení.

Obr. 5: Geometrické průměry protilátkových titrů proti A β 42 po imunizaci pohybující se v rozmezí 8 dávek A β 42 („AN1792“) obsahujících 0,14, 0,4, 1,2, 3,7, 11, 33, 100 nebo 300 μ g.

Obr. 6: Kinetika protilátkové odpovědi na imunizaci pomocí AN1792. Titry jsou vyjádřeny jako geometrické průměry každé skupiny čítající 6 zvířat.

Obr. 7: Kvantitativní analýza obrazu korové amyloidní zátěže u myši vystavených působení PBS nebo AN1792.

Obr. 8: Kvantitativní analýza obrazu zatížení neuritickými plaky u myši vystavených působení PBS nebo AN1792.

Obr. 9: Kvantitativní analýza obrazu procenta retrosplenální kůry obsazeného astrocytózou u myši vystavených působení PBS nebo AN1792.

Obr. 10: Analýza lymfocytární proliferace v buňkách sleziny vystavených působení AN1792 (horní část) nebo PBS (dolní část).

Obr. 11: Totální hladiny A β v mozkové kůře. Bodový diagram jednotlivých A β profilů u myši imunizovaných s A β nebo APP deriváty kombinovanými s Freundovým adjuvancem.

Obr. 12: Amyloidní zátěž v kůře určená pomocí kvantitativní analýzy obrazu mozkových řezů u myši imunizovaných s konjugáty A β peptidu (A β 1 až 5, A β 13 až 28); A β agregáty o plné délce – A β 42 („AN1792“) a A β 1 až 40 („AN1528“) a léčebná skupina vystavená působení PBS.

Obr. 13: Geometrické průměry titrů protilátky specifické pro A β u skupin myši imunizovaných s A β nebo APP deriváty kombinovanými s Freundovým adjuvancem.

Obr. 14: Geometrické průměry titrů protilátky specifické pro A β u skupin morčat imunizovaných s AN1792 nebo jeho palmitoylovaným derivátem kombinovaným s různými adjuvanty.

Obr. 15 (A–E): Hladiny A β v kůře 12 měsíců starých PDAPP myši vystavených působení AN1792 nebo AN1528 s různými adjuvanty.

Obr. 16: Průměrný titr u myši léčených polyklonální protilátkou proti A β .

Obr. 17: Průměrný titr u myši léčených monoklonální protilátkou 10D5 proti A β .

Obr. 18: Průměrný titr u myší léčených monoklonální protilátkou 2F12 proti A β .

5 Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

10 Profylaktická účinnost A β proti Alzheimerově chorobě (AD)

Tyto příklady popisují podávání peptidu A β 42 transgenní myši overexprimující APP s mutací v pozici 717 (APP_{717→F}), která vede k neuropatologii shodné s Alzheimerovou chorobou. Vytváření a charakteristika těchto myší (PDAPP myši) je popsána v Games et al., Nature, viz výše. 15 Tato zvířata (ve své heterozygotní formě) začínají ukládat A β od šestého měsíce věku. Ve věku 15 měsíců již vykazují ukládání A β v hladinách odpovídajících Alzheimerově chorobě. PDAPP myším byl injikován agregovaný A β 42 (agregovaný A β 42) nebo solný roztok pufrovaný fosfátem. Agregovaný A β 42 byl vybrán pro svoji schopnost vyvolat tvorbu protilátek proti více epitopům A β .

20 A. Metody

1. Myši

25 Třicet PDAPP heterogenních myších samic bylo náhodně rozděleno do následujících skupin: 10 myší pro injekci agregovaného A β 42 (jedna zemřela při převozu), 5 myší pro injekci PBS/-adjuvant nebo PBS a 10 myší jako intaktní kontrola. 5 myším byly injikovány peptidy odvozené ze sérového amyloidního proteinu (SAP).

30 2. Příprava imunogenů

Příprava agregovaného A β 42: miligramy A β 42 (US Peptides Inc, lot K-42-12) byly rozpuštěny v 0,9 ml vody a objem byl doplněn do 1 ml přidáním 0,1 ml 10x PBS. Získaná směs byla vortexována a ponechána inkubovat v 37 °C přes noc, což jsou podmínky za nichž peptid agregoval. 35 Nepoužitý A β byl skladován jako suchý lyofilizovaný prášek při -20 °C, a to až do další injekce.

Je nutno poznamenat, že při použití takovýchto komerčně dostupných peptidů může být v suché hmotnosti započítána i hmotnost solí; hmotnosti zmiňované ve všech zde popisovaných příkladech zahrnují i hmotnosti solí (pokud není řečeno jinak). Přesná množství peptidů mohou být 40 stanovena analýzou prostředku standardními metodami, jako třeba určením množství dusíku v porovnání s prostředkem se známým obsahem dusíku.

3. Příprava injekcí

45 V každé injekci, určené pro jednu myš, bylo obsaženo 100 μ g agregovaného A β 42 v PBS, emulzifikovaného v poměru 1:1 s kompletním Freundovým adjuvancem (CFA) s konečným objemem emulze určené pro první imunizaci 400 μ l. První imunizace byla po dvou týdnech následována posilovací injekcí, jež obsahovala stejné množství imunogenu v nekompletním Freundově adjuvantu (IFA). Dvě další dávky v IFA byly podány v měsíčním intervalu. Následné imunizace byly 50 uskutečněny podáním v 500 μ l PBS. Injekce byly aplikovány intraperitoneálně (i.p.).

PBS bylo injikováno podle stejného schématu, přičemž myším byla injikována směs PBS s adjuvancem v dávce 400 μ l na myš nebo 500 μ l na myš. Injekce SAP probíhaly podle stejného schématu, přičemž byla použita dávka 100 μ g na injekci.

4. Titrace myší krve, preparace tkáně a imunohistochemie

Výše zmiňované metody jsou popsány níže v kapitole Všeobecný materiál a metody.

B. Výsledky

PDAPP myším byl injikován buď agregovaný A β 42 (agregovaný A β 42), peptidy SAP, nebo solný roztok pufrovaný fosfátem. Jedna skupina PDAPP myší – pozitivní kontrola, byla ponechána intaktní. Myší titry protilátek proti agregovanému A β 42 byly sledovány každý další měsíc po čtvrté posilovací injekci, a to až do věku jednoho roku. Myši byly usmrceny po 13 měsících života. Ve všech sledovaných časových bodech vykazovalo osm z devíti myší vysoký titr protilátek proti A β 42, přičemž tato hladina zůstala vysoká po celou dobu podávání injekcí (titry větší než 1:10 000). Devátá myš měla titr nízký, ale měřitelný (okolo 1:1000) (obr. 1, tabulka 3). Myši, jimž byl injikován SAP měly titr od 1:1000 do 1:30 000, přičemž hodnotu 1:10 000 překročila pouze jedna myš.

Séra z myší léčených PBS byla titrována proti agregovanému A β 42 po šesti, deseti a dvanácti měsících. V případě titrování (v séru ředěném 1:100) PBS myší proti agregovanému A β 42 byla hranice čtyřnásobku pozadí překročena pouze v jednom časovém bodě, přičemž v ostatních případech nebyla tato hranice překročena v žádném časovém bodě (tabulka 3). Odpověď specifická pro SAP byla v těchto časových bodech zanedbatelná (titry byly menší než 1:300).

Sedm z devíti myší ze skupiny léčené agregovaným A β 1–42 nevykazovalo v mozku žádné zjištěné amyloidy. Mozkové tkáně z myší ze skupin léčených SAP a PBS naopak vykazovaly početné amyloidní usazeniny v hipokampu, stejně tak jako ve frontální a cingulární kůře. Způsob usazování byl podobný tomu, jenž byl pozorován u neléčených kontrol, tj. s charakteristickou účastí zranitelných oblastí, mezi něž patří vnější molekulová vrstva hipokampálního dentálního gyru. U jedné myši ze skupiny s injikovaným A β 1–42 bylo pozorováno velké snížení amyloidní zátěže v hipokampu. U jiné myši z téže skupiny byl pozorován osamocený plak.

Kvantitativní obrazové analýzy amyloidní zátěže v hipokampu potvrdily její dramatické snížení dosažené u zvířat léčených A β 42 (AN1792) (obr. 2). Střední hodnoty amyloidní zátěže ve skupině léčené PBS (2,22 %) a v nijak neléčené kontrolní skupině (2,65 %)

Tabulka 3A

Titry při 50 % maximální O.D.

Myši s injikovaným agregovaným A β

Věk PDAPP (měsíce)	#100	#101	#102	#103	#104	#105	#106	#107	#108
4	70 000	150 000	15 000	120 000	1 000	15 000	50 000	60 000	100 000
6	15 000	65 000	30 000	55 000	300	15 000	15 000	50 000	60 000
8	20 000	55 000	50 000	50 000	400	15 000	18 000	50 000	60 000
10	40 000	20 000	60 000	50 000	900	15 000	50 000	20 000	40 000
12	25 000	30 000	60 000	40 000	2 700	20 000	70 000	25 000	20 000

Tabulka 3B

Titry při 50 % maximální O.D.

Myši s injikovaným PBS při ředění obou imunogenů 1/100

Věk PDAPP	#113	#114	#115	#116	#117
6	<4 x bkg	<4 x bkg	<4 x bkg	<4 x bkg	<4 x bkg
10	5 x bkg	<4 x bkg	<4 x bkg	<4 x bkg	<4 x bkg
12	<4 x bkg	<4 x bkg	<4 x bkg	<4 x bkg	<4 x bkg

byly oproti skupině imunizované AN1792 (0,00 %, $p = 0,0005$) významně vyšší. Střední hodnoty amyloidní zátěže dosahovaly ve skupině imunizované SAP peptidy (SAPP) hodnot 5,74 %. Mozková tkáň z neléčených kontrolních myši obsahovala četné usazeniny amyloidu A β , vizualizované pomocí A β -specifické monoklonální protilátky (mAb) 3D6 v hipokampu, stejně tak jako i v retrosplenální kůře. Podobný způsob usazování byl pozorován rovněž u myši imunizovaných SAPP nebo PBS (obr. 2). Tři posledně zmiňované skupiny byly charakteristické účastí zranitelných podoblastí (což je typické u AD), mezi něž patří vnější molekulová vrstva hipokampálního dentálního gyru.

Mozky, které neobsahovaly žádné amyloidní usazeniny, postrádaly také neuritické plaký, jenž jdou běžně vizualizovat pomocí protilátky 8E5 proti lidskému APP. Všechny mozky z ostatních skupin (s aplikovaným SAP nebo PBS a kontrolní skupina) měly početné neuritické plaký, typické pro neléčené PDAPP myši. Malé množství neuritických plaků bylo přítomno i u jedné myši
 5 léčené AN1792 a jeden shluk neuritických plaků byl pozorován i u druhé myši z téže skupiny. Pomocí obrazové analýzy hipokampu (také viz obr. 3) byla v porovnání s PBS skupinou (střední hodnota 0,28 %, $p = 0,005$) prokázána účinná eliminace dystrofických neuritů u myši léčených AN1792 (střední hodnota 0,00 %).

U skupin léčených injekcemi A β 1–42 nebyla přítomna ani astrocytóza, která je charakteristická pro záněty spojené s plaký. Mozky myši z ostatních skupin obsahovaly husté a shloučené GFAP–pozitivní astrocyty, typické pro gliózu spojenou s plaký A β . Část sklíček s na GFAP pozitivně reagujícími astrocyty byla pro lokalizaci plaků A β dále obarvena Thioflavinem S. GFAP–pozitivní astrocyty byly spojeny s A β plaký u skupin léčených SAP, PBS a v intaktních kontrolách.
 10 Žádné takové spojení nebylo nalezeno u myši léčených A β 1–42, přičemž, u jedné myši léčené AN1792 byla zjištěna minimální glióza spojená s plaký.

Obrazové analýzy retrosplenální kůry (obr. 4) potvrdily, že snížení výskytu astrocytózy bylo významné, což je zřejmé jestliže porovnáme průměrné hodnoty jejího výskytu u myši léčených
 20 AN1792 (1,56 %) a myši imunizovaných SAP peptidy, PBS nebo myši intaktních (všechny tři skupiny > 6 %, $p = 0,0017$).

Údaje ze vzorku myši, jimž byly injikovány A β 1–42 a PBS ukázaly, že MHC II imunoreaktivita spojená s plakem se u A β 1–42 myši nevyskytovala, což odpovídá nepřítomnosti zánětlivé reakce
 25 spojené s A β .

Na řezech z myších mozků bylo zkoušeno zda pozitivně reagují s mAb, představující specifickou monoklonální protilátku MAC–1 (protein v buněčné membráně). MAC–1 (CD11b) patří do rodiny integrinů a vyskytuje se spolu s CD18 jako heterodimer. Komplex CD11b/CD18 je přítomen
 30 na monocytech, makrofázích, neutrofilech, a NK–bunčkách (přirození zabíječi) (Mak a Simard). MAC–1–pozitivní buněčné typy v mozku jsou pravděpodobně mikroglie, což plyne z jim podobné morfologie pozorované na řezech, kde došlo k pozitivní reakci s protilátkou proti MAC–1. U myši léčených AN1792 bylo možno ve srovnání s kontrolní skupinou PBS pozorovat nižší výskyt MAC–1 imunoreaktivity, což odpovídá nepřítomnosti zánětlivé reakce spojené s A β .

35 C. Závěr

Nepřítomnost plaků A β a reaktivních neuronálních a gliotických změn v mozcích myši, jimž byl injikován A β 1–42, značí, že v jejich mozcích nedošlo (nebo pouze v extrémně malém množství)
 40 k uložení amyloidu, přičemž s tím souvisí i absence patologických následků případného ukládání, tj. např. glióza a neuritická patologie. PDAPP myši léčené pomocí A β 1–42 prokázaly naprosto shodnou nepřítomnost patologie jako kontrolní netransgenní myši. Injekce A β 1–42 jsou takto vysoce účinné při prevenci ukládání nebo očišťování lidského A β z mozkové tkáně, a také při odstraňování tímto způsobených neuronálních a zánětlivých degenerativních změn. Podávání
 45 peptidu A β může tedy mít tedy být použito při prevenci a léčbě AD.

Příklad 2

50 Studie závislosti na dávce

Skupiny samic myši Swiss Webster starých pět týdnů ($N = 6$ ve skupině) byly imunizovány 300, 100, 33, 11, 3,7, 1,2, 0,4 nebo 0,13 μ g A β připraveným v CFA/IFA a podaným intraperitoneálně. Tři dávky byly podány ve čtrnáctidenních intervalech, čtvrtá dávka byla podána o měsíc později.

První dávka byla emulzifikována s CFA, další dávky byly emulzifikovány s IFA. Zvířatům byla pro měření titru protilátek odebírána krev vždy 4 až 7 dní po každé imunizaci, tak, že první odběr byl proveden po druhé dávce. Části zvířat z každé ze tří skupin, která byla imunizována 11, 33 nebo 300 µg antigenu, byla krev odebrána ještě ve čtyřech měsíčních intervalech následně po čtvrté imunizaci, za účelem sledování poklesu protilátkové odpovědi v případě různých dávek imunogenních prostředků. Tato zvířata obdržela poslední pátou imunizaci v sedmém měsíci po zahájení studie. O týden později byla zvířata za účelem měření protilátkových odpovědí proti AN1792 a po provedení toxikologických analýz.

U dávek od 300 do 3,7 µg byla pozorována odpověď klesající s dávkou, přičemž u dvou nejnižších dávek nebyla pozorována odpověď žádná. Průměrné protilátkové titry po 3 dávkách okolo 1:1000 a po 4 dávkách 11 až 300 µg antigenu okolo 1:10 000 (obr. 5).

Protilátkové titry u všech skupin /kromě skupiny s nejnižší dávkou/ po třetí imunizaci dramaticky vzrostly, s tím že zvýšení geometrického průměru titrů (GMT) bylo 5ti až 25ti násobné. Nízká protilátková odpověď byla zjištělná dokonce i u recipientů, kteří dostali dávku 0,4 µg. Skupiny s dávkami 1,2 a 3,7 µg měly porovnatelné titry s GMT okolo 1000, skupiny s nejvyššími obdrženými dávkami se spojily do GMT okolo 25 000, s výjimkou skupiny s dávkou 33 µg, jejíž GMT byl 3000. Po čtvrté imunizaci byl u všech skupin vzrůst titru více pozvolný. Jasná závislost na dávce byla pozorována u skupin s nižšími dávkami antigenu (od 0,14 do 11 µg) sahající od žádné zjištělné odpovědi (u 0,14 µg) až k GMT 36 000 (11 µg). Titry čtyř nejvyšších skupin (11 až 300 µg) splývaly opět dohromady. Po dvou imunizacích tedy protilátkový titr vykazoval závislost na dávce antigenu u skupin od 0,4 do 300 µg. Po třetí imunizaci byly titry čtyř nejvyšších skupin srovnatelné a po další imunizaci tvořily plató.

Měsíc po čtvrté imunizaci byly u skupiny s 300 µg titry 2 až 3krát vyšší, než když byly stanovovány z krve odebrané pět dní po imunizaci (obr. 6). Toto zjištění napovídá, že nejvyšší protilátková odpověď se objevuje později než 5 dní po imunizaci. Mírnější (50%) vzestup byl ve stejném čase pozorován u skupiny s dávkou 33 µg. Po dvou měsících po poslední dávce, klesly GMT u skupiny s 300 µg prudce o 70 %. Po dalším měsíci byl pokles mírnější, a to 45% (100 µg) a asi 14% (33 a 11 µg). Rychlost poklesu cirkulujících protilátkových titrů po ukončení imunizace se zdá mít bifázický průběh s prudkým poklesem v prvním měsíci po nejvyšší protilátkové odpovědi, následovaným poté mírnějším poklesem.

Protilátkové titry a kinetika odpovědi myši Swiss Webster jsou podobné těm pozorovaným u mladých heterozygotních PDAPP transgenních myši, imunizovaných paralelním způsobem. Dávky schopné vyvolat u člověka imunitní odpověď jsou obdobné dávkám účinným u myši.

40 Příklad 3

Prověření terapeutické účinnosti proti rozvinuté AD

Tato analýza je určena pro testování imunogenních činidel, konkrétně jejich účinnosti zastavit nebo zvrátit neuropatologické charakteristiky AD u starých zvířat. Imunizace s 42 aminokyselin dlouhým Aβ (AN1792) počaly v čase, kdy byly amyloidní plaky v mozcích PDAPP myši již přítomné.

V průběhu této studie vzniklo u neléčených PDAPP myši množství neurodegenerativních změn podobných těm, které lze nalézt při AD (Games et al., viz výše a Johnson-Wood et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 1550 až 1555, 1997). Ukládání Aβ v amyloidních placích je spojeno s degenerativní neuronální odpovědí zahrnující aberantní axonální a dendritické elementy, nazývané dystrofické neurity. Amyloidní usazeniny, které jsou obklopeny a také obsahují dystrofické neurity, se nazývají neuritické plaky. U AD i PDAPP myši mají dystrofické neurity zřetel-

nou globulární strukturu, jsou imunoreaktivní s určitými protilátkami rozpoznávajícími APP a cytoskeletální složky a vykazují komplexní subcelulární degenerativní změny na ultrastrukturální úrovni. Tyto charakteristiky dovolují s nemocí související selektivní, reprodukovatelné měření tvorby neuronálních plaků v mozcích PDAPP myši. Dystrofická neuronální složka PDAPP neuritických plaků je pomocí protilátky specifické pro lidský APP (monoklonální protilátka 8E5) snadno vizualizovatelná a s pomocí počítačové analýzy obrazu snadno měřitelná. Kromě měření AN1792 na tvorbu amyloidních plaků jsme měřili i účinky této léčby na vývoj neuritické dystrofie.

Astrocyty a mikroglie jsou buňky odlišné od neuronů, které odpovídají a reagují na neuronální poškození. GFAP–pozitivní astrocyty a MHC II–pozitivní mikroglie jsou při AD běžně pozorovatelné a jejich aktivace se zvyšuje s vážností onemocnění. Proto jsme u myši léčených AN1792 pozorovali také vývoj reaktivní astrocytózy a mikroglie.

15 A. Materiál a metody

48 samic heterozygotních PDAPP myši, ve věku od 11 do 11,5 měsíců a získané z Charles River Laboratories, bylo náhodně rozděleno do dvou skupin: 24 myši pro imunizaci se 100 µg AN1792 a 24 myši pro imunizaci s PBS, v obou případech v kombinaci s Freundovým adjuvancem. Skupiny s AN1792 a PBS byly opět rozděleny po dosažení cca 15 měsíce věku. V 15 měsíci věku byla přibližně polovina zvířat z každé skupiny usmrcena ($n = 10$ pro AN1792 a $n = 9$ pro PBS), přičemž u druhé poloviny ($n = 9$ pro AN1792 a $n = 12$ pro PBS) se pokračovalo v imunizacích až do 18 měsíce. 8 zvířat (5 AN1792 a 3 PBS) během studie zemřelo. Kromě imunizovaných zvířat byly pro porovnání ELISA testů na množství A β a APP v mozku do studie přidány ještě intaktní PDAPP myši staré jeden rok ($n = 10$), 15 měsíců ($n = 10$), 18 měsíců ($n = 10$); jednorokní zvířata byla zahrnuta také v imunohistochemických analýzách.

Použitá metodologie byla shodná jako v příkladu 1 (pokud není zmíněno jinak), AN1792 od US Peptides (kat. č. 12) a California Peptides (kat. č. ME0339) byly použity pro přípravu antigenu určeného pro šest imunizací provedených před 15 měsícem. Výrobky ME0339 a ME0439 od California Peptides byly použity pro tři dodatečné imunizace provedené mezi 15 a 18 měsícem.

100 µg AN1792 ve 200 µl PBS nebo PBS samotné bylo emulzifikováno 1:1 (objem) s kompletním Freundovým adjuvancem (CFA) nebo s nekompletním Freundovým adjuvancem (IFA) nebo s PBS s konečným objemem emulze 400 µl. Adjuvancem při první imunizaci bylo CFA, další dvě dávky byly podány v IFA a poslední čtyři dávky v samotném PBS bez adjuvancu. Celkově imunizace proběhla během sedmiměsíčního intervalu devětkrát, přičemž první tři injekce ve dvou-týdenním intervalu, další injekce pak v měsíčním intervalu. Skupina léčená pouze čtyři měsíce a usmrcená v 15 měsíci věku se podrobila pouze prvním šesti imunizacím.

40 B. Výsledky

1. Účinek léčby pomocí A β 42 (AN1792 na amyloidní zátěž

Účinky léčby AN1792 na korovou amyloidní zátěž, určené pomocí kvantitativní analýzy obrazu jsou uvedeny na obr. 7. Průměrná hodnota korové amyloidní zátěže byla u skupiny intaktních 12ti měsíčních PDAPP myši 0,28 %, což reprezentuje plakovou zátěž myši při započetí studie. U 18ti měsíčních PBS myši vzrostla amyloidní zátěž více než 17krát na 4,87 %, zatímco u myši léčených AN1792 došlo k velkému snížení amyloidní zátěže (0,01 %), což je v porovnání s 12ti měsíčními intaktními myši a 15ti a 18ti měsíčními myši léčenými PBS pozoruhodně málo. Amyloidní zátěž byla v 15 (96% snížení; $p = 0,003$) i v 18 (> 99% snížení; $p = 0,0002$) měsíci u příjemců AN1792 významně snížena.

Korové ukládání amyloidu začíná u PDAPP myši typicky ve frontální a retrosplenální kůře (RSC) a pokračuje ventrolaterálním směrem k temporální a entorhinální kůře (EC). V EC 12

měsíců starých myší, což je věk, ve kterém bylo prvně podáno AN1792, nebyl nalezen amyloid žádný nebo jen v malém množství. Po čtyřech měsících léčby AN1792 bylo zásadně sníženo amyloidní ukládání v RSC, přičemž postupné usazování amyloidu v EC bylo podáváním AN1792 zcela eliminováno. Posledně zmíněné pozorování ukazuje, že AN1792 úplně zastavilo postupné ukládání amyloidu, jež by za normálních okolností postoupilo do temporální a ventrální kůry. Podávání AN1792 také zastavilo a pravděpodobně i zvrátilo ukládání amyloidu v RSC.

Zásadní účinky AN1792 na postup ukládání amyloidu v kůře u PDAPP myší je dále doloženo na 18ti měsíční skupině, jež byla léčena po sedm měsíců. Myš léčená pomocí AN1792 vykazovala skoro kompletní absenci korového amyloidu, naprostou absenci difúzních plaků a snížení množství existujících usazenin.

3. Buněčné a morfologické změny spojené s léčbou pomocí A β 42 (AN1792)

V částech mozku, jež jsou typické výskytem amyloidních usazenin byla nalezena populace A β -pozitivních buněk. Je pozoruhodné, že u několika mozků z myší léčených AN1792 nebylo nalezeno žádné množství extracelulárních korových plaků nebo jen malé množství. Zdá se, že většina imunoreaktivity byla lokalizována na vnitřek buněk s velkým laločnatým nebo shlučeným somatem. Fenotypicky se tyto buňky podobaly aktivovaným mikrogliím nebo monocytům. Imunoreaktivní protilátky specificky rozeznávající ligandy exprimované aktivovanými monocyty a mikroglií (MHC II a CD11b) a byly příležitostně spojeny se stěnou nebo lumen krevních kapilár. Porovnání přilehlých řezů označených protilátkami specifickými pro A β a MHC II odhalilo, že obě protilátky se vázaly na stejné typy buněk. Podrobné prozkoumání mozků vystavených působení AN1792 vedlo k zjištění, že výskyt MHC II-pozitivních buněk byl u těchto zvířat omezen a okolí zbylých amyloidů. Za použitých podmínek fixace nebyly buňky imunoreaktivní na protilátky specificky rozeznávající ligandy T-buněk (CD3, CD3e) nebo B-buněk (CD45a, CD45RB) nebo na obvyklý leukocytární antigen (CD45), ale reagovaly s protilátkou rozeznávající leukosialin (CD43), která křížově reaguje s monocyty. Žádné takové buňky nebyly nalezeny u myší vystavených působení PBS.

PDAPP myši vytvářejí stále rozsáhlé amyloidní usazeniny ve vnější molekulové vrstvě dentálního gyru. Usazeniny tvoří zřetelný pruh v perforované dráze, což je podoblast, který při AD klasicky obsahuje amyloidní plaky. Charakteristický vzhled těchto usazenin u myší vystavených působení PBS připomínal ten, který byl již dříve popsán u neléčených PDAPP myší. Amyloidní usazeniny sestávaly z difúzních i kompaktních plaků v souvislém proužku. U mnoha mozků z myší léčených AN1792 byl naopak tento vzhled drasticky pozměněn. Hipokampální amyloidní usazeniny již neobsahovaly difúzní amyloidy a proužkovité uspořádání bylo zcela roztrháno. Místo toho bylo přítomno množství neobvyklých tečkovaných struktur, které reagovaly s protilátkami proti A β , přičemž se zdálo, že některé z nich jsou buňkami obsahujícími amyloid.

MHC II-pozitivní buňky byly u zvířat léčených AN1792 opakovaně pozorovány v sousedství extracelulárního amyloidu. Způsob sdružení A β -pozitivních buněk s amyloidem byl velmi podobný tomu, jenž bylo možno pozorovat u některých mozků získaných z myší vystavených působení AN1792. Výskyt těchto monocytů byl omezen na oblast přilehlou k amyloidní usazenině, přičemž v jiných mozkových oblastech postrádajících plaky A β , byl zcela nulový.

Kvantitativní analýza obrazu řezů označených protilátkami proti MHC I a MHC II odhalila tendenci popsanou vzrůstající imunoreaktivitu v RSC a v hipokampu u myší vystavených působení AN1792, v porovnání se skupinou myší léčených pomocí PBS, jenž vykazovala pouze významné zvýšení MHC I-imunoreaktivity v hipokampu.

Tyto výsledky jsou důkazem aktivního, buněčně zprostředkovaného odstranění amyloidu z mozkových oblastí kde se vyskytoval.

3. Účinky AN1792 na hladiny A β : ELISA testy

(a) Hladiny v mozkové kůře

- 5 Průměrná hodnota celkového množství A β v kůře PDAPP myší byla ve 12 měsíci 1600 ng/g a v 15 měsíci vzrostla na 8700 ng/g (tabulka 4). V 18 měsíci byla tato hodnota 22 000 ng/g, což je od počátku experimentu více než 10ti násobný vzestup. Celkové množství A β u zvířat léčených PBS bylo v 15 měsíci 8600 ng/g, s tím, že toto množství vzrostlo v 18 měsíci na 19 000 ng/g. Celkové množství A β u zvířat léčených AN1792 bylo v 15 měsíci 1600 ng/g, což je
 10 o 81 % méně než v případě PBS. U zvířat léčených AN1792 bylo v 18 měsíci celkové množství A β 5200 ng/g, což je o v porovnání se skupinou léčenou PBS významně méně (o 72 %, $p = 0,0001$) (viz tabulka 4). Obdobné výsledky byly u těchto dvou skupin nalezeny při porovnávání hladin A β v kůře. V tomto případě však byly rozdíly hladin A β významné v 15 ($p = 0,04$) i
 15 18 měsíci ($p = 0,0001$, tabulka 4).

(b) Hladiny v hipokampu

- U intaktních PDAPP myší byly ve 12 měsíci průměrné hodnoty celkového množství A β 15 000 ng/g a v měsíci vzrostly na 51 000 ng/g a ještě dále v 18 měsíci na 81 000 ng/g (tabulka 5). PBS myši vykazovaly v těchto časových bodech hodnoty 40 000 ng/g (15 měsíc) respekti-
 20 ve 65 000 ng/g (18 měsíc). Zvířata imunizovaná AN1792 vykazovala nižší celková množství A β , a to 25 000 ng/g (15 měsíc) a 51 000 ng/g (18 měsíc). Hodnota A β byla u skupiny léčené AN1792 v 18 měsíci významně nižší než u skupiny léčené PBS ($p = 0,0105$, tabulka 5). Měření A β 42 dávalo výsledky obdobného typu, tj. jeho

Tabulka 4
Střední hodnoty hladin A β v kůře (ng/g)

Věk	Neléčení		PBS		AN1792	
	Celkový	A β 42 (n)	Celkový	A β 42 (n)	Celkový	A β 42 (n)
12	1 600	1 300 10				
15	8 700	8 300 10	8 600	7 200 9	1 600	1 300*
18	22 200	18 500 10	19 500	15 900 12	5 200**	4 000**

* p = 0,0412

** p = 0,0001

Tabulka 5
Střední hodnoty hladin A β v hipokampu (ng/g)

Věk	Neléčení		PBS		AN1792	
	Celkový	A β 42 (n)	Celkový	A β 42 (n)	Celkový	A β 42 (n)
12	15 500	11 100 10				
15	51 500	44 400 10	40 100	35 700 9	24 500	22 100
18	80 800	64 200 10	65 400	57 100 12	50 900*	38 900**

* p = 0,0105

** p = 0,00221

Tabulka 6
Střední hodnoty hladin A β v mozečku (ng/g)

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

* p = 0,0018

hladina byla v 18. měsíci u skupiny léčené AN1792 v porovnání se skupinou léčenou PBS významně nižší (39 000 ng/g oproti 57 000 ng/g, p = 0,002) (tabulka 3).

5

(c) Hladiny v mozečku

Průměrné hodnoty celkového množství A β v mozečku byly u neléčených PDAPP myší ve 12. měsíci 15 ng/g (tabulka 6). V 15 měsíci vzrostlo toto množství na 28 ng/g a v 18 měsíci na 35 ng/g. U zvířat léčených PBS byly naměřeny průměrné hodnoty 21 ng/g (15 měsíc) a 43 ng/g (18 měsíc). Zvířata léčená AN1792 měla v mozečku v 15 měsíci 22 ng/g celkového A β a v 18 měsíci významně nižší (p = 0,002) množství než skupina léčená PBS, a to 25 ng/g (tabulka 6).

10

4. Účinky léčby pomocí AN1792 na hladiny APP

Jak molekula APP- α , tak i molekula APP plné délky obsahují část nebo celou sekvenci A β , takže mohou být při imunitní odpovědi proti AN1792 potenciálně zasaženy. Současné studie popisují mírný vzestup hladiny APP jako neuropatologii u PDAPP myši. Hladiny APP- α /FL (plná délka) nebo APP- α v kůře zůstaly po léčbě v podstatě nezměněny, pouze v případě APP- α byla u myši léčených AN1792 v 18 měsíci naměřena o 19 % nižší hladina než u myši léčených PBS. Hodnoty APP u myši léčených AN1792 nebyly v 18 měsíci významně odlišné od hodnot naměřených u myši neléčených (ve 12 a 15 měsíci) a u myši léčených PBS (v 15 měsíci). Ve všech případech zůstaly hladiny APP v mezích, které lze normálně nalézt u PDAPP myši.

5. Účinky léčby pomocí AN1792 na neurodegenerativní a gliotické změny

U myši léčených AN1792 došlo ve frontální kůře v porovnání s PBS skupinou k významnému snížení neuritické plakové zátěže, a to v 15 (84%; $p = 0,03$) i 18 měsíci (55%; $p = 0,01$) (obr. 8). Průměrné hodnoty neuritické plakové zátěže vzrostly u skupiny PBS mezi 15 a 18 měsícem z 0,32 % na 0,49 %. U skupiny léčené AN1792 však došlo k zásadnímu snížení množství neuritických plaků, přičemž průměrné hodnoty neuritické plakové zátěže byly 0,05 % (15 měsíc) a 0,22 % (18 měsíc).

Imunizace pomocí AN1792 v porovnání se skupinou léčenou PBS významně snížila reaktivní astrocytózu v RSC, a to v 15 (o 56 %; $p = 0,011$) i v 18 měsíci (o 39 %; $p = 0,028$) (obr. 9). Průměrné procentuální hodnoty astrocytózy v PBS skupině vzrostly mezi 15. a 18. měsícem z 4,26 % na 5,21 %. Léčba pomocí AN1792 potlačila rozvoj astrocytózy v obou časových bodech, a to na 1,89 % respektive na 3,2 %. To značí, že při léčebném procesu nedocházelo k poškození neuro-pilu.

6. Protilátkové odpovědi

11 měsíců staré, heterozygotní PDAPP myši ($n = 24$) byly podrobeny sérii 5 imunizací se 100 μ g AN1792 emulzifikovaném ve Freundově adjuvantu, přičemž aplikace probíhala intraperitoneálně v týdnech 0, 2, 4, 8 a 12, s tím, že při šesté imunizaci (v 16 týdnu) byl Freundův adjuvant nahrazen PBS. Jako negativní kontrola sloužilo 24 transgenních myši stejného věku, jež byly imunizovány PBS emulzifikovaném se stejnými adjuvanty a ve stejném časovém schématu. Krev byla zvířatům odebírána mezi třetím a sedmým dnem po každé imunizaci, počínaje druhou dávkou. Protilátkové odpovědi na AN1792 nebyly měřeny pomocí ELISA. Geometrický průměr titrů (GMT) byl u zvířat imunizovaných AN1792 po druhé, třetí a poslední (šesté) dávce přibližně 1900, 7600 a 45 000. U kontrolních zvířat nebyly po šesté imunizaci naměřeny žádné protilátky specifické pro A β . Přibližně polovina zvířat byla léčena po další tři měsíce, přičemž imunizace probíhaly ve 20, 24 a 27 týdnu. Každá z těchto dávek byla podána v samotném PBS, tj. bez Freundova adjuvantu. Průměrné protilátkové titry zůstaly během této periody nezměněny. Ve skutečnosti se zdálo, že protilátkové titry zůstaly v období od páté do deváté imunizace nezměněny.

U části řezů z myši léčených AN1792 a PBS bylo zkoušeno zda pozitivně reagují s protilátkou specifickou pro myši IgG, a to za účelem zjištění zda A β -specifické protilátky, vyvolané v myších působením AN1792, byly také spojeny s mozkovými amyloidními plakami. Na rozdíl od skupiny léčené PBS, byly A β plakami v mozcích vystavených působení AN1792 pokryté endogenním IgG. Tento rozdíl mohl být u obou skupin pozorován v 15. i 18. měsíci. Zvláště překvapující byla nepřítomnost IgG u skupiny léčené PBS, přestože mozky těchto myši obsahovaly rozsáhlé amyloidní usazeniny. Tyto výsledky prokazují, že imunizace pomocí syntetického proteinu A β vede ke vzniku protilátek, které rozeznávají a váží se na A β v amyloidních usazeninách.

7. Buněčně zprostředkované imunitní odpovědi

Z devíti myší (18 měsíční PDAPP myši) imunizovaných AN1792 a z 12 myší imunizovaných PBS byly sedm dní po deváté imunizaci vyjmuty sleziny. Splenocyty byly izolovány a kultivovány po 72 h v přítomnosti A β 40, A β 42, nebo A β 40–1 (protein s obrácenou sekvencí). Mitogen Con A sloužil jako pozitivní kontrola. Optimálních odpovědí bylo dosaženo s méně než 1,7 μ M proteinem. Buňky ze všech devíti zvířat léčených AN1792 odpovídaly na aplikaci proteinu A β 1 až 40 nebo A β 1 až 42 proliferací, přičemž hodnoty inkorporace obou proteinů byly shodné (obr. 10, horní část). Aplikací reverzního proteinu A β 40–1 nebylo docíleno žádné odpovědi. Buňky z kontrolních zvířat nijak nereagovaly na žádný z A β proteinů (obr. 10, spodní část).

C. Závěr

Výsledky této studie ukazují, že imunizace pomocí AN1792 vede u PDAPP myší, jež se vyznačují výskytem amyloidních usazenin, k zpomalení a prevenci postupného ukládání amyloidu, přičemž s amyloidem související neuropatologické změny jsou také odvráceny. Imunizace s AN1792 podstatně zastavila amyloidní ukládání ve strukturách, které by za normálních okolností podlehlly amyloidóze. Podávání peptidu A β je tedy prospěšné při léčbě AD.

Příklad 4

Studie fragmentů A β

100 PDAPP myší ve věku od 9 do 11 měsíců bylo za účelem určení epitopů vedoucích k účinné odpovědi pomocí fragmentů APP a A β , jež obsahovaly 9 různých oblastí těchto molekul. Injekce obsahující 9 různých imunogenů a kontrolu byly aplikovány i.p. Imunogeny zahrnovaly čtyři lidské konjugáty peptidu A β , a to 1 až 12, 13 až 28, 32 až 28, 32 až 42, 1 až 5, přičemž všechny byly cysteinovými můstky připojeny k ovčímu IgG specifickému proti myšímu, dále APP polypeptid s aminokyselinami 592 až 695, agregovaný lidský A β 1–40, a agregovaný lidský A β 25–35, a agregovaný hlodavčí A β 42. Agregované A β 42 a PBS byly použity jako pozitivní, resp. negativní kontroly. Každou léčebnou skupinu tvořilo deset myší. Titry byly monitorovány jak již bylo uvedeno výše a myši byly usmrceny na konci čtvrtého měsíce podávání injekcí. Histochemie, hladiny A β , a toxikologické analýzy byly provedeny posmrtně.

A. Materiál a metody

1. Příprava imunogenů

Příprava spojených A β peptidů: čtyři konjugáty lidského A β (aminokyselinové zbytky 1 až 5, 1 až 12, 13 až 28, a 33 až 42, každý konjugovaný s ovčím IgG specifickým proti myšímu) byly připraveny spojením přes cystein (syntetický), který byl k peptidu A β přidán pomocí spojovací činidlo sulfo–EMCS. Deriváty A β peptidu byly nasyntetizovány s níže uvedenou výslednou sekvencí. U každé sekvence je podtržením zvýrazněn vložený cysteinový zbytek. Derivát A β 13–28 měl před koncovým cysteinem na karboxylovém konci ještě dva glycinové zbytky, což je také znázorněno.

Aβ1-12 peptid	NH ₂ -DAEFRHDSGYEV <u>C</u> -COOH (SEQ ID NO: 30)
Aβ1-5 peptid	NH ₂ -DAEFR <u>C</u> -COOH (SEQ ID NO: 31)
Aβ33-42 peptid	NH ₂ - <u>C</u> -aminoheptanoiková kyselina - -GLMVGGVVIA-COOH (SEQ ID NO: 32)
Aβ13-28 peptid	Ac-NH-HHQLVFFAEDVGSNKGGC-COOH (SEQ ID NO: 33)

Při přípravě spojovací reakce bylo 10 mg ovčího IgG specifického proti myším (Jackson ImmunoResearch Laboratories) dialyzováno přes noc s pufr (10mM boritan sodný, pH 8,5). Dialyzovaná protilátka byla poté za použití zkumavky Amicon Centriprep zkoncentrována do konečného objemu 2 ml. 10 mg sulfo-EMCS[N(γ-maleimidokuproyloxy)sukcinimidu] (Molecular Sciences Co.) bylo rozpuštěno v 1 ml deionizované vody. 40ti násobný molární přebytek sulfo-EMCS byl za stálého míchání po kapkách přidán k ovčímu IgG specifickému proti myším a poté byl roztok míchán po dalších 10 minut. Aktivovaný ovčí IgG specifický proti myším byl přečištěn průchodem přes 10 ml gelovou filtrační kolonu (Pierce Presto Column, získaná od Pierce Chemicals) naplněnou 0,1M NaPO₄, 5mM EDTA, pH 6,5. frakce obsahující protilátku, identifikované pomocí absorbance při 280 nm, byly shromážděny a naředěny do koncentrace ≈ 1 mg/ml, a to za použití poměru 1,4 mg/OD coby extinkčního koeficientu. 40ti násobný molární přebytek Aβ peptidu byl rozpuštěn v 20 ml 10mM NaPO₄, pH 8,0, přičemž výjimkou byl peptid Aβ33-42, který byl nejprve rozpuštěn v 0,5 ml DMSO a poté doplněn do 20 ml pomocí 10mM NaPO₄ pufru. Roztok každého peptidu byl přidán k 10 ml aktivovaného ovčího IgG specifického proti myším a dán na 4 h do míchačky (při pokojové teplotě). Výsledné konjugáty byly za použití zkumavky Amicon Centriprep zkoncentrovány do konečného objemu menšího než 10 ml a poté dialyzovány PBS, za účelem výměny pufru a odstranění volného peptidu. Konjugáty byly za účelem sterilizace přefiltrovány přes filtr s póry o velikosti 0,22 μm a poté rozděleny do alikvot po 1 mg, zmrazeny a skladovány při -20 °C. Koncentrace konjugátů byly určeny pomocí BCA proteinové analýzy (Pierce Chemicals) s použitím koňského IgG pro standardní křivku. Konjugaci bylo možno doložit vzrůstem molekulární hmotnosti konjugovaných peptidů vztahem k molekulární hmotnosti samotného aktivovaného ovčího IgG specifického proti myším. Konjugát Aβ1-5 a ovčího IgG specifického proti myším byl shromážděn ze dvou konjugací, ostatní konjugáty byly získány z jediné konjugací reakce.

2. Příprava agregovaných Aβ peptidů

Lidské peptidy 1 až 40 (AN1528; California Peptides Inc. kat. č. ME0541), 1 až 42 (AN1792; California Peptides Inc., kat. č. ME0339 a ME0439), 25 až 35, a hlodavčí 1 až 42 (California Peptides Inc., kat. č. ME0218) byly za čerstva rozpuštěny za účelem přípravy jednotlivých injekcí; injekce byly připraveny z lyofilizovaných prášků, jež byly skladovány vysušené při -20 °C. Takto byly tedy přidány 2 mg peptidu k 0,9 ml deionizované vody a směs byla následně vortexována až do vytvoření relativně uniformního roztoku nebo suspenze. V této fázi byl z těchto čtyř jediným rozpustným peptidem AN1528. V okamžiku kdy se začal AN1528 srážet, byl přidán 100 μl alikvot 10x PBS (1x PBS: 0,15 NaCl, 0,01M fosforečnan sodný, pH 7,5). Suspenze byla poté znovu vortexována a inkubována přes noc při 37 °C, přičemž druhý den již mohla být použita.

Příprava proteinu pBx6: Expresní plazmid kódující pBx6, což je fúzní protein skládající se ze 100 aminokyselinové N-koncové vedoucí sekvence bakteriofágní polymerázy MS-2 následované aminokyselinami 592 až 695 z APP (βAPP), byl zkonstruován způsobem popsaným

v Oltersdorf et al., J. Biol. Chem. 265, 4492 až 4497 (1990). Plazmid byl transfekován do E. coli a protein byl exprimován po indukci promotoru. Bakterie byly lyzovány v 8M močovíně a pBx6 bylo částečně purifikováno pomocí preparativní SDS PAGE. Frakce obsahující pBx6 byly identifikovány za použití králičí polyklonální protilátky proti pBx6 na membráně pro Westernovu analýzu, shromážděny, zkoncentrovány pomocí zkumavky Amicon Centriprep a dialyzovány PBS. Čistota přípravy, určená na SDS PAGE obarvené Coomassie Blue, byla asi 5 až 10 %.

B. Výsledky a diskuze

10 I. Schéma studie

Sto samic a samců (ve věku 9 až 11 měsíců) heterozygotních transgenních PDAPP myši bylo získáno od Charles River Laboratory a Taconic Laboratory. Myši byly rozděleny do deseti skupin a každá skupina byla určena pro imunizaci odlišnými oblastmi A β nebo APP zkombinovanými s Freundovým adjuvancem. Zvířata byla rozdělena tak, aby jejich pohlaví, stáří, původ a zdroj zůstaly v rámci skupiny co nejméně odlišné. Imunogeny zahrnovaly čtyři peptidy A β odvozené od lidské sekvence (1 až 5, 1 až 12, 13 až 28, a 33 až 42), každý konjugovaný s ovčím IgG specifickým proti myšimu; čtyři agregované peptidy, lidský 1 až 40 (AN1528), lidský 1 až 42 (AN1792), lidský 25 až 35, a hlodavčí 1 až 42; a fúzní polypeptid (pBx6), obsahující 592 až 695 aminokyselinové zbytky z APP. Desátá skupina (kontrola) byla imunizována PBS kombinovaným s adjuvancem.

Pro jednotlivé imunizace bylo 100 μ g každého A β peptidu, rozpuštěného ve 200 μ l PBS nebo 200 μ g derivátu APP (pBx6) rozpuštěného ve 200 μ l PBS nebo PBS samotné, emulzifikováno 1:1 (objem.) s Kompletním Freundovým adjuvancem (CFA), tak aby konečný objem emulze určené pro první imunizaci byl 400 μ l. Další čtyři imunizace proběhly s imunogenem emulzifikovaným v Nekompletním Freundově adjuvancu (IFA) a konečná dávka imunogenu byla podána v PBS. Imunizace byly aplikovány intraperitoneálně, a to vždy po dvou týdnech (první tři dávky) a poté v měsíčních intervalech. Zvířatům byla pro měření titru protilátek odebírána krev vždy 4 až 7 dní po každé imunizaci, a to tak, že první odběr byl proveden po druhé dávce. Zvířata byla usmrcena přibližně týden po poslední imunizaci.

2. Hladina A β a APP v mozku

Po čtyřech měsících imunizace s různými A β peptidy nebo derivátem APP byly mozky ze zvířat dialyzovaných solným roztokem vyjmuty. Jedna hemisféra byla připravena pro imunohistochemickou analýzu, druhá byla použita pro kvantifikaci množství A β a APP. Pro měření koncentrace různých forem A β a APP byly v 5M guanidinu homogenizovány hipokampální, korové a mozečkové oblasti vyjmuté hemisféry. Homogenáty byly rozředěny (sériové ředění) a následně bylo zjištěno množství amyloidu nebo APP. Kvantifikace byla založena na porovnání výsledků ELISA testů s řadou standardů peptidů A β nebo APP o známé koncentraci.

Průměrná koncentrace A β v kontrolní skupině imunizované PBS byla 5,8krát vyšší v hipokampu než v kůře (24 318 ng/g oproti 4221 ng/g). Průměrná koncentrace v mozečku (23,4 ng/g) byla u kontrolní skupiny asi 1000krát nižší než v hipokampu. Tyto hladiny odpovídají hodnotám, které byly pro heterozygotní transgenní PDAPP myši stejného věku publikovány dříve (Johnson-Woods et al., 1997, viz výše).

V mozkové kůře byly u skupin léčených AN1792, hlodavčí A β 1 až 42 nebo konjugátem A β 1 až 5 peptidu v porovnání s kontrolní skupinou, zjištěny významně nižší střední hodnoty množství ($p < 0,05$) A β a A β 1 až 42 (obr. 11). Střední hodnoty hladin celkového A β byly sníženy o 75, 79 a 61 %, a to v porovnání s kontrolní skupinou. V korové oblasti zvířat z jakékoli skupiny nebyly nalezeny žádné souvislosti mezi hladinou A β a titrem A β -specifických protilátek.

V případě hipokampu, nebyla střední hodnota snížení množství A β spojená s léčbou AN1792 tak velká (o 46 %, $p = 0,0543$) jako v případě kůry (o 75 %, $p = 0,0021$). Absolutní velikost této redukce však byla v mnohem větší v hipokampu než v kůře. Čisté snížení bylo o 11 186 ng/g tkáně v hipokampu oproti 3171 ng/g tkáně v kůře. Skupiny zvířat dostávající hlodavčí A β 1 až 42 nebo A β 1 až 5 vykazovaly snížení středních hodnot množství celkového A β o 36 resp. 26 %.

Díky malým množstvím zvířat ve skupinách a vysoké variabilitě hladin amyloidního peptidu mezi jednotlivými zvířaty v obou skupinách, však nebyla tato snížení významná. Při měření hladin A β 1 až 42 nedosáhlo žádné ze zjištěných snížení významnosti. Můžeme tedy říct, že díky menšímu množství A β zátěže v kůře, jsou změny v této mozkové oblasti citlivějším indikátorem léčebných účinků. Změny A β hladin v kůře měřené pomocí ELISA jsou podobné, ne však identické, s výsledky obdrženyými při imunohistochemické analýze (viz níže).

Celkové množství A β bylo měřeno i v mozečku, což je oblast, která je patologií AD zasažena minimálně. Žádná ze středních hodnot koncentrací A β u žádné ze skupin imunizovaných různými peptidy nebo derivátem APP nebyla odlišná od hodnot naměřených ve stejné oblasti u kontrolní skupiny. Tyto výsledky napovídají, že nepatologické hladiny A β jsou léčbou nezasazeny.

V kůře a v mozečku léčených a kontrolních myší byly ELISA technikou určovány i koncentrace APP. Pro určení množství APP byly použity dvě odlišné analýzy. První, nazvaná APP- α /FL, rozeznávala APP-alfa (α , sekretovaná forma, která vznikla štěpením uvnitř A β sekvence) a formy APP o plné délce (FL), zatímco druhý typ analýzy rozeznával pouze APP- α . Na rozdíl od úbytku A β u části z léčených skupin, zůstaly hladiny APP u léčených i kontrolních zvířat nezměněny. Tyto výsledky ukazují, že imunizace s A β peptidy nesnižuje množství APP nebo lépe, že léčebné účinky jsou specifické pro A β .

Celkově lze tedy říci, že hladiny A β a A β 1 až 42 v kůře zvířat léčených AN1792, hlodavčí A β 1 až 42 nebo A β 1 až 5 konjugátem, byly významně sníženy. V hipokampu došlo k významnému snížení A β pouze u skupiny léčené AN1792. Žádné další významné změny v hladinách A β nebo APP související s použitou léčbou, nebyly v hipokampu, mozkové kůře nebo v mozečku pozorovány.

2. Histochemické analýzy

Mozky z částí zvířat z šesti skupin byly připraveny na imunohistochemickou analýzu, tři skupiny byly imunizovány konjugáty A β peptidů A β 1 až 5, A β 1 až 12, a A β 13 až 28, dvě skupiny byly imunizovány s A β agregáty o plné délce AN1792 a AN1528; kontrolní skupina byla ošetřena pouze PBS. Výsledky obrazové analýzy amyloidní zátěže u mozkových řezů z těchto skupin jsou vidět na obr. 12. Významný pokles amyloidní zátěže v porovnání s kontrolními zvířaty byl pozorován v korových oblastech. Největší snížení amyloidní zátěže bylo zaznamenáno u skupiny léčené AN1792 (o 97 %, $p = 0,001$). Významných snížení bylo dosaženo také u zvířat léčených AN1528 (o 95 %, $p = 0,005$) a konjugátem A β 1 až 5 peptidu (o 67 %, $p = 0,02$).

Výsledky získané kvantifikací celkového A β nebo A β 1 až 42 technikou ELISA a množství amyloidní zátěže zjištěné obrazovou analýzou, se do jisté míry liší. Z hodnocení pomocí kvantitativní analýzy obrazu plyne, že léčba s AN1528 měla významný dopad na hladinu korové amyloidní zátěže, z výsledků ELISA analýz však plyne, že celková koncentrace A β zůstala v této oblasti nezměněna. Rozdíl mezi těmito dvěma výsledky je pravděpodobně způsoben specifickými jednotlivých analýz. Obrazová analýza měří pouze nerozpustné A β , agregované do plaků. ELISA testy jsou naopak schopny měřit všechny formy A β , tj. rozpustnou i nerozpustnou, monomerní i agregovanou. Jelikož patologie nemoci se zdá být spojena spíše s nerozpustnou formou A β , asociovanou s plaky, je tedy možné, že technika analýzy obrazu by v tomto případě mohla podat přesnější interpretaci účinků léčby. ELISA technika je však rychlejší a jednodušší analýza, a tak

je pro analytické účely velmi vhodná a může dokonce odhalit zda snížení A β , jež je spojené s léčbou, je větší u A β v placích nebo u celkového A β .

5 Za účelem zjištění zda A β -specifická protilátka vyvolaná imunizací pokusných zvířat reagovala s uloženým mozkovým amyloidem, byla část řezů z léčených i kontrolních zvířat inkubována s protilátkou specifickou proti myšimu IgG. U zvířat imunizovaných konjugáty A β , a to A β 1 až 5, A β 1 až 12, a A β 13 až 28, bylo na rozdíl od zvířat léčených PBS zjištěno, že plaky obsahující A β jsou pokryty endogenním IgG. Totéž platí i pro A β agregáty plné délky (AN1792 a AN1528). Mozky ze zvířat imunizovaných jinými A β peptidy nebo APP peptidem pBx6 nebyly
10 podrobeny této analýze.

3. Měření protilátkových titrů

15 Krev byla myším odebrána vždy 4 až 7 dní po každé imunizaci, a to tak, že první odběr byl proveden po druhé dávce a celkový počet odběrů byl roven pěti. Protilátkové titry byly určeny pomocí vazby (stanovené technikou sendvičové ELISA) protilátky proti A β 1 až 42 na A β 1 až 42, jež bylo umístěno v „multijamkových“ (multi-well plates) miskách. Nejvyšší hodnoty protilátkových titrů (měřeny byly protilátky proti AN1792) byly u těchto čtyř prostředků vyvolány po čtvrté imunizaci: AN1792 (mezní GMT: 94 467), AN1528 (mezní GMT: 88 231), konjugát A β 1 až 12 (mezní GMT: 47 216) a hlodavčí A β 1 až 42 (mezní GMT: 10 776). Po páté a šesté imunizaci hodnoty titrů těchto skupin trochu poklesly. U zbývajících pěti imunogenů bylo mezních hodnot dosaženo po páté a šesté imunizaci, i když tyto hodnoty byly v porovnání se čtyřmi výše uvedenými skupinami mnohem nižší: konjugát A β 1 až 5 (mezní GMT: 2356), pBx6 (mezní GMT: 1986), konjugát A β 13 až 28 (mezní GMT: 1183), konjugát A β 33 až 42 (mezní GMT: 658), A β 25 až 35 (mezní GMT: 125). Protilátkové titry byly technikou sendvičové ELISA stanovovány také proti dalším homologním peptidům, konkrétně proti A β 1 až 5, A β 13 až 28, A β 25 až 35, A β 33 až 42 nebo hlodavčímu A β 1 až 42. Tyto titry byly skoro stejné jako v případě A β 1 až 42, pouze s výjimkou hlodavčího A β 1 až 42, v jehož případě byly protilátkové titry zhruba dvakrát vyšší. Hodnoty AN1792-specifického protilátkového titru u jednotlivých zvířat nebo jeho
25 průměrné hodnoty u jednotlivých skupin nekorelovaly s účinností popisovanou snížením množství A β v kůře.
30

4. Lymfoproliferativní odpovědi

35 Lymfoproliferace vyvolaná přítomností A β byla zjišťována ve slezinných buňkách, shromážděných přibližně jeden týden po šesté imunizaci. Čerstvě získané buňky (10^5 na jamku) byly pěstovány v přítomnosti A β 1 až 40 v koncentraci 5 μ M/stimulaci po 5 dní. Část buněk ze sedmi skupin (celkově bylo 10 skupin) byla pěstována také v přítomnosti reverzního peptidu A β 40 až 1. Jako pozitivní kontrola sloužily buňky pěstované v přítomnosti T-buněk. PHA, za negativní kontroly byly považovány buňky pěstované bez peptidu.
40

U většiny zvířat reagovaly lymfocyty na přítomnost PHA proliferací. Žádná významná proliferace nebyla pozorována u skupiny s A β 40 až 1. Buňky ze zvířat imunizovaných většími agregovanými peptidy, AN1792, hlodavčím A β 1 až 42 a AN1528 v odpověď na stimulaci s A β 40
45 mocně proliferovala, přičemž nejvíce skupina imunizovaná AN1792. Jedno zvíře v každé skupině imunizované konjugátem A β 1 až 12, konjugátem A β 13 až 28 a A β 25 35 reagovalo na aplikaci A β 1 až 40 proliferací. Ostatní skupiny imunizované konjugátem A β 1 až 5, konjugátem A β 33 až 42, pBx6 nebo PBS neobsahovaly žádné zvíře, jež by na stimulaci A β reagovalo. Tyto výsledky jsou shrnuty v tabulce 7.

Tabulka 7

Imunogen	konjugát	aminokyseliny v A β	odpovědi
A β 1-5	ano	5	0/7
A β 1-12	ano	12	1/8
A β 13-28	ano	16	1/9
A β 23-35		11	1/9
A β 33-42	ano	10	0/10
A β 1-40		40	5/8
A β 1-42		42	9/9
r A β 1-42		42	8/8
pBx6			0/8
PBS		0	0/8

5 Tyto výsledky ukazují, že imunizace s AN1792 a AN1528 vedly k silným odpovědím T-buněk, nejspíše s fenotypem CD4+. Nepřítomnost A β -specifické odpovědi, zprostředkované T-buňkami u zvířat imunizovaných s A β 1 až 5 nebyla překvapující, protože peptidové epitopy rozeznávané CD4+ T-buňkami jsou obvykle dlouhé asi 15 aminokyselin, přestože kratší peptidy mohou někdy fungovat s nižší účinností. Většina epitopů T pomocných buněk je v případě čtyř konjugovaných peptidů pravděpodobně navázána na IgG polovinu konjugátu a ne na A β oblast. Tuto hypotézu podporuje velmi nízký výskyt proliferativních odpovědí u zvířat v těchto skupinách. Jelikož konjugát A β 1 až 5 byl při snižování hladiny A β v mozku účinný, a to i za zjevné nepřítomnosti A β -specifických T-buněk, klíčovým faktorem v mechanismu peptidem vyvolané imunitní odpovědi se zdá být protilátka.

15 Nepřítomnost T-buněk a nízká protilátková odpověď po aplikaci peptidu pBx6 (obsahuje aminokyseliny 592 až 695 z APP, zahrnující všechny A β zbytky) může být způsobena nízkou imunogenicitou konkrétního preparátu. Nízká imunogenicitu agregátu A β 25 až 35 je pravděpodobně způsobena tím, že peptid je příliš krátký na to, aby pro T-buňku představoval epitop schopný pomoci vyvolat imunitní odpověď. Předpokládá se, že konjugace tohoto proteinu s nosným proteinem by mohla zvýšit jeho imunogenicitu.

25 Příklad 5

Příprava polyklonálních protilátek pro pasivní ochranu

125 netransgenních myší bylo imunizováno A β s adjuvantem a usmrceno po 4 až 5 měsících. Krev z každé myši byla odebrána a IgG bylo izolováno od ostatních krevních složek. Protilátky specifické pro daný imunogen mohou být částečně přečištěny pomocí afinitní chromatografie. Z každé myši bylo získáno v průměru 0,5 až 1 mg pro imunogen specifické protilátky, což celkově znamenalo 60 až 120 mg.

35 Příklad 6

Pasivní imunizace s protilátkami proti A β

40 Skupinám 7 až 9 měsíčních PDAPP myší bylo injikováno v PBS 0,5 mg/myš polyklonální protilátky anti-A β nebo monoklonální protilátky anti-A β (viz níže). Všechny preparáty protilátek byly za účelem nízké hladiny endotoxinu přečištěny. Monoklonální protilátky proti danému

fragmentu mohou být získány injekcí fragmentu nebo delší formy A β do myši, přípravou hybridomů a jejich testováním na protilátku, která se specificky váže na požadovaný fragment A β , aniž by se vážala na jiné specifické fragmenty A β .

5

Tabulka 8

Protilátka	Epitop
2H3	A β 1-12
10D5	A β 1-12
266	A β 13-28
21F12	A β 33-42
myši polyklonální	proti agregovanému A β 42
proti lidskému A β 42	proti agregovanému A β 42

- 10 Myši byly po 4 měsíce injikovány i.p. protilátkou proti A β 42 nebo jinému imunogenu tak, aby byla dosažena hladina cirkulujících protilátek o titru vyšším než 1:1000, což bylo měřeno pomocí ELISA. Monitorování titrů bylo prováděno výše uvedeným způsobem, a s tím, že myši byly usmrceny na konci 6 měsíce podávání injekcí. Histochemie, hladiny A β , a toxikologické analýzy byly provedeny posmrtně. V každé skupině bylo 10 myši. Další studie pasivní imunizace jsou
- 15 popsány v příkladech 11 a 12.

Příklad 7

20 Porovnání různých adjuvantů

V tomto příkladu jsou za účelem zjištění schopnosti stimulace imunitní odpovědi porovnávány CFA, alum, emulze olej-voda a MPL.

25 A. Materiál a metody

1. Schéma studie

- 100 samic 6 týdnů starých morčat kmene Hartley (Elm Hill Breeding Laboratories, Chelmsford, MA) bylo rozděleno do deseti skupin za účelem imunizace pomocí AN1792 nebo jeho palmitoylovaného derivátu, kombinovaného s různými adjuvanty. Sedm skupin dostalo injekce AN1792 (33 μ g pokud není jinak upřesněno) v kombinaci s a) PBS, b) Freundovým adjuvantem, c) MPL, d) skvalen, e) MPL/skvalen, f) nízkou dávkou alum, g) vysokou dávkou alum (300 μ g AN1792). Dvě skupiny dostaly injekce palmitoylovaného derivátu AN1792 (33 μ g) v kombinaci s a) PBS nebo b) skvalenem. Poslední, desátá skupina dostala samotné PBS bez antigenu nebo dalšího adjuvantu. U skupiny dostávající Freundův adjuvant byla první dávka emulzifikována s CFA, další čtyři dávky s IFA. U všech skupin byl antigen podán v dávce 33 μ g, s výjimkou skupiny s vysokou dávkou alum, jenž obdržela 300 μ g AN1792. Injekce byly aplikovány intraperitoneálně (CFA/IFA) nebo intramuskulárně (ostatní skupiny) do zadní strany kvadricepsu, alternativně do levé nebo pravé. První tři dávky byly aplikovány ve 14 denních intervalech, další dvě dávky měsíčně. Krev určená pro měření titrů byla odebírána 6 až 7 dní po každé imunizaci, přičemž první odběr proběhl po druhé dávce.

2. Příprava imunogenů

K 2 mg A β 42 (California Peptide, kat. č. ME0339) bylo přidáno 0,9 ml deionizované vody a směs byla následně vortexována až do vytvoření relativně uniformní suspenze. Byl přidán 100 μ l alikvot 10x PBS (1x PBS: 0,15 NaCl, 0,01 M fosforečnan sodný, pH 7,5). Suspenze byla 5 poté znovu vortexována a inkubována přes noc při 37 °C, přičemž druhý den již mohla být použita. Nespotřebovaný A β 42 byl skladován s desikantem jako lyofilizovaný prášek při -20 °C.

Palmitoylovaný derivát AN1792 byl připraven připojením anhydridu kyseliny palmitové, rozpuštěném v dimethylformamidu, ke zbytku na aminovém konci AN1792 a poté byl nascentní peptid z pryskyřice získán pomocí kyseliny fluorovodíkové. 10

Pro přípravu směsi imunogenu a Kompletního Freundova adjuvantu (CFA) (skupina 2) bylo 33 μ g AN1792 ve 200 μ l PBS emulzifikováno 1:1 (objem) s CFA, při konečném objemu emulze 15 určené pro první imunizaci 400 μ l. Přípravy pro další imunizace proběhly shodným způsobem, místo CFA však bylo použito IFA.

Pro přípravu dávek v MPL (skupiny 5 a 8) bylo MPL ve formě lyofilizovaného prášku (Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MT) přidáno k 0,2% vodnému roztoku triethylaminu 20 v takovém množství, aby výsledná koncentrace byla 1 mg/ml. Poté byla směs vortexována. Směs byla následně zahřáta na 65 až 70 °C po 30 s, čímž došlo ke vzniku mírně opaleskující uniformní suspenze micel. Směs byla čerstvě namíchána pro každou sérii injekcí. Pro každou injekci ve skupině 5 bylo v borosilikátové zkumavce těsně před použitím smíšeno 33 μ g AN1792 v 16,5 μ l PBS, 50 μ g MPL (50 μ l) a 162 μ l PBS. 25

Pro přípravu dávek v slabé suspenzi olej–voda bylo AN1792 v PBS přidáno k 5% skvalenu, 0,5% Tween 80, 0,5% Span 85 v PBS tak, aby výsledná koncentrace pro jednu dávku byla 33 μ g AN1792 v 250 μ l (skupina 6). Směs byla emulzifikována průchodem přes dvoukomorový ručně ovládaný přístroj tak dlouho (15 až 20 otočení), dokud kapičky emulze nenabýly přibližně stejného průměru jako standardizované gumové bublinky s průměrem 1 μ m, což bylo určeno pomocí mikroskopu. Výsledná suspenze byla opaleskující, mléčně bílá. Emulze byly čerstvě namíchány pro každou sérii injekcí. U skupiny 8 bylo ke směsi skvalenu a detergentů (viz výše) na každou dávku přidáno 50 μ g MPL v 0,2% triethylaminu. Směs byla poté emulzifikována jak bylo popsáno výše. U palmitoylovaného derivátu (skupina 7) bylo ke skvalenu přidáno 33 μ g palmitoyl- 35 NH-A β 1–42 na dávku a směs byla vortexována. Poté byly přidány Tween 80 a Span 85 a směs byla vortexována. K této směsi byl přidán PBS tak, aby výsledné koncentrace byly: skvalen 5 %, Tween 80 0,5 %, a Span 85 0,5 %. Směs byla poté emulzifikována jak bylo popsáno výše.

Pro přípravu dávek s alum (skupiny 9 a 10) byl k Alhydrogelu (gel hydroxidu hlinitého, Accurate, Westbury, NY) přidán AN1792 v PBS tak, aby výsledné koncentrace byly 33 μ g (nízká dávka, skupina 9) nebo 300 μ g (vysoká dávka, skupina 10) na 5 mg alum při výsledném objemu dávky 250 μ l. Suspenze byla po 4 h jemně míchána při pokojové teplotě. 40

3. Měření protilátkových titrů

Krev byla morčatům odebírána 6 až 7 dní po každé imunizaci, přičemž první odběr proběhl po druhé imunizaci, s tím, že odběry byly celkem čtyři. Titry protilátek proti A β 42 byly měřeny technikou ELISA (viz Všeobecný materiál a metody). 45

4. Tkáňové preparace

Asi po 14 dnech byla všechna morčata usmrcena aplikací CO₂. Mozkomíšní mok byl odčerpán, mozky byly vyjmuty a poté následovala izolace tří mozkových oblastí (hipokampus, kůra a mozeček), které byly dále použity k měření celkové koncentrace A β proteinu technikou ELISA. 50

B. Výsledky

1. Protilátkové odpovědi

- 5 Při měření protilátkové odpovědi po imunizaci s AN1792 byl u různých adjuvantů zjištěn v potencích velký rozdíl. Jak je vidět na obr. 14, po aplikaci AN1792 v PBS nebyla po dvou či třech imunizacích zjištěna v krvi žádná protilátka. Zanedbatelnou odpověď bylo možno detekovat až po čtvrté a páté dávce, přičemž geometrické průměry titrů (GMTs) dosahovaly hodnot pouze okolo 45. Emulze olej–voda vyvolala po třetí dávce mírné zvýšení (GMT 255), které bylo zachováno i po čtvrté dávce (GMT 301), ale kleslo po konečné dávce (GMT 54). Jasná antigenní koncentrační závislost byla nalezena u AN1792 vázaného na alum, kdy aplikace 300 µg antigenu měla ve všech měřených časových bodech větší imunogenní účinek než aplikace 33 µg. V bodě nejvyšší protilátkové odpovědi, tj. po čtvrté imunizaci, byly rozdíly mezi dávkami 43 % s GMTs okolo 1940 (33 µg) a 3400 (300 µg). Protilátková odpověď na 33 µg AN1792 s MPL byla velmi podobná té, jež byla pozorována u více než desetinásobného množství antigenu (300 µg) vázaného v alum. Přidání MPL k emulzi olej–voda snížilo potenci tohoto prostředku v porovnání s prostředkem obsahujícím jako jediný adjuvant MPL o 75 %. Palmitoylovaný derivát AN1792 byl při podání v PBS naprosto neimunogenní, při podání v emulzi olej–voda vykazoval mírné imunogenní působení s GMTs 340 (po čtvrté dávce) a 105 (po páté dávce). Nejvyšších protilátkových titrů bylo docíleno s Freundovým adjuvancem s nejvyšším GMT okolo 87 000, což je hodnota bezmála 30krát vyšší než GMTs dvou dalších nejúčinnějších prostředků, MPL a vysoká dávka AN1792/alum.
- 25 Nejslibněji vypadajícími adjuvanty, identifikovanými v této studii jsou MPL a alum. Z těchto dvou vypadá lépe MPL, protože pro dosažení stejného účinku bylo zapotřebí 10krát nižší dávky antigenu než v případě alum. Odpověď může být zvýšena zvýšením dávky antigenu a/nebo adjuvantu a také optimalizací imunizačního postupu. Emulze olej–voda byla v případě AN1792 velmi slabým adjuvancem a její přidání k MPL mělo za následek vymizení adjuvanční schopnosti samotného MPL.
- 30

2. Hladiny Aβ v mozku

- Částem zvířat ze skupin imunizovaných Freundovým adjuvancem (skupina 2), MPL (skupina 5), alum o vysoké dávce, 300 µg AN1792 (skupina 10) a kontrolní skupina imunizovaná PBS (skupina 3) byl zhruba po čtrnácti týdnech při hluboké narkóze odebrán mozkomíšní mok (CSF) a poté jim byly vyjmuty mozky. Pro měření koncentrace Aβ peptidů byly v 5M guanidinu homogenizovány hipokampální, korové a mozečkové oblasti jedné z vyjmutých hemisfér. Kvantifikace byla založena na porovnání výsledků ELISA testů s řadou standardů peptidů Aβ o známé koncentraci. Hladiny proteinu Aβ v hipokampu, kůře a mozečku byly, nehledě na rozdílné protilátkové odpovědi proti Aβ vyvolané těmito prostředky, u všech čtyř skupin velmi podobné. Průměrná množství Aβ byla v hipokampu 25 ng/g tkáně, v kůře 21 ng/g tkáně, a v mozečku 12 ng/g tkáně. Přítomnost vysokého titru protilátek proti Aβ po skoro tři měsíce tak u některých zvířat nezměnila celkové množství Aβ v mozku. Množství Aβ v CSF bylo u různých skupin také podobné.
- 45 Nepřítomnost většího imunizačního účinku AN1792 na endogenní Aβ naznačuje, že odpověď je zaměřena na patologickou tvorbu Aβ.

Příklad 8

Imunitní odpověď na různé adjuvanty měřená u myší

- 50 V této studii byly používány šest týdnů staré samice myši Swiss Webster, 10 až 13 zvířat/skupinu. Imunizace probíhaly ve dnech 0, 14, 28, 60, 90 a 200, přičemž aplikace probíhala subkutánně, s objemem jedné dávky 200 µl. Jako pufr byl u všech prostředků použit PBS. Zvířatům byla pro

měření titru protilátek ELISA testem odebírána krev sedm dní po každé imunizaci a to tak, že první odběr byl proveden po druhé dávce. Léčebné protupy pro každou skupinu jsou shrnuty v tabulce 9.

Tabulka 9

5

Skupina	N ^a	Adjuvant ^b	Dávka	Antigen	Dávka(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		žádný	33
9	10	Skvalen	5 %	AN1792	33
10	10	Skvalen+	5 %	AN1792	33
11	10	Alum 2 mg		AN1792	33
12	13	MPL + Alum	50 μg/2 mg	AN1792	33
13	10	QS-21	5 μg	AN1792	33
14	10	QS-21	10 μg	AN1792	33
15	10	QS-21	25 AN1792	AN1792	33
16	13	QS-21	25 AN1792	AN1792	150
17	13	QS-21	25 AN1792	AN1528	33
18	13	QS-21 + MPL	25 μg/50μg	AN1792	33
19	13	QS-21 + Alum	25 μg/2mg	AN1792	33

^a Počet myší ve skupině při zahájení pokusu

^b Adjuvanty jsou zmíněny. Pufrem ve všech prostředcích byl PBS. Ve skupině 8 nebyl žádný adjuvant ani antigen.

10

Titry protilátek proti A β 42 (určené pomocí ELISA) pro každou skupinu, jsou uvedeny v tabulce 10.

5

Tabulka 10

Geometrické průměry protilátkových titrů

Skupina	Týdny odběru krve.				
	2,9	5,0	8,7	12,9	16,7
1	248	1797	2577	6180	4177
2	598	3114	3984	5287	6878
3	1372	5000	7159	12333	12781
4	1278	20791	14368	20097	25631
5	3288	26242	13229	9315	23742
6	61	2536	2301	1442	4504
7	37	395	484	972	2149
8	25	25	25	25	25
9	25	183	744	952	1823
10	25	89	311	513	817
11	29	708	2618	2165	3666
12	198	1458	1079	612	797
13	38	433	566	1080	626
14	104	541	3247	1609	838
15	212	2630	2472	1224	1496
16	183	2616	6680	2085	1631
17	28	201	375	222	1540
18	31699	15544	23095	6412	9059
19	63	243	554	299	441

Tabulka ukazuje, že nejvyšší titry byly obdrženy u skupin 4, 5 a 18, ve kterých byly adjuvanty 125 μ g MPL, 50 μ g MPL a QS-21 s MPL.

Příklad 9

Léčebná účinnost různých adjuvantů

5

Studie terapeutické účinnosti adjuvantů vhodných pro užití u lidí byla prováděna na transgenních PDAPP myších, za účelem stanovení jejich schopnosti potenciovat imunitní odpověď proti A β a vyvolat imunitou zprostředkované odstranění amyloidních usazenin v mozku.

10

180 samic a samců heterozygotních transgenních PDAPP myší, ve věku od 7,5 do 8,5 měsíců bylo získáno z Charles River Laboratories. Myši byly roztrženy do devíti skupin (15 až 23 zvířat ve skupině) a imunizovány AN1792 nebo AN1528 v kombinaci s různými adjuvanty. Zvířata byla rozdělena tak, aby jejich pohlaví, stáří a původ zůstaly v rámci skupiny co nejméně odlišné. Adjuvanty zahrnovaly alum, MPL, a QS-21, každý z nich kombinovaný s oběma antigeny, a Freundův adjuvant (FA) kombinovaný pouze s AN1792. Další skupina byla imunizována s AN1792 připraveném v PBS s thiomersalem a neobsahoval adjuvant. Devátá skupina byla imunizována pouze samotným PBS a představovala negativní kontrolu.

15

20

Příprava agregovaných A β peptidů: lidský A β 11 až 40 (AN1528; California Peptides Inc., Napa, CA; kat. č. ME0541) a lidský A β 1 až 42 (AN1792; California Peptides Inc., Napa, CA; kat. č. ME0439) peptid byly při přípravě každé série injekcí čerstvě rozpuštěny z lyofilizovaných prášků, které byly skladovány vysušené při -20°C . Poté byly přidány 2 mg peptidu k 0,9 ml deionizované vody a směs byla následně vortexována až do vytvoření relativně uniformního roztoku nebo suspenze. V tomto kroku byl rozpustný pouze AN1528. V okamžiku kdy se AN1528 začal srážet byl přidán 100 μl alikvot 10x PBS (1x PBS: 0,15 NaCl, 0,01M fosforečnan sodný, pH 7,5). Suspenze byly poté znovu vortexovány a inkubovány přes noc při 37°C , přičemž druhý den již mohly být použity. Pro přípravu dávek s alum (skupiny 5 a 9) byl k Alhydrogelu (2% vodný gel hydroxidu hlinitého, Sargeant, Inc., Clifton, NJ) přidán A β peptid v PBS tak, aby výsledná koncentrace byla 100 μg A β peptidu na 1 mg alum. 10x PBS byl poté přidán tak, aby ve výsledném objemu dávky 200 μl figuroval jako 1x PBS. Suspenze byla před injekcí po 4 h jemně míchána při pokojové teplotě.

25

30

35

Pro přípravu dávek v MPL (skupiny 2 a 6), bylo MPL ve formě lyofilizovaného prášku (Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MT) přidáno k 0,2% vodnému roztoku triethylaminu v takovém množství, aby výsledná koncentrace byla 1 mg/ml. Poté byla směs vortexována. Směs byla následně ohřata na 65 až 70°C po 30 s, čímž došlo ke vzniku mírně opaleskující uniformní suspenze micel. Roztok byl skladován při 4°C . Pro každou sérii injekcí bylo v borosilikátové zkumavce těsně před použitím smíšeno pro jednu dávku 100 μg peptidu v 50 μl PBS, 50 μg MPL (50 μl) a 100 μl PBS.

40

45

Pro přípravu dávek v QS-21 (skupiny 3 a 7), bylo QS-21 ve formě lyofilizovaného prášku (Aquila, MA; kat. č. A7018R) přidáno k PBS, pH 6,6 až 6,7, v takovém množství, aby výsledná koncentrace byla 1 mg/ml. Poté byla směs vortexována. Roztok byl skladován při -20°C . Pro každou sérii injekcí bylo v borosilikátové zkumavce těsně před použitím smíšeno pro jednu dávku 100 μg peptidu v 50 μl PBS, 25 μg QS-21 v 25 μl a 125 μl PBS.

50

Pro přípravu dávek s Freundovým adjuvancem (skupina 4) bylo 100 μg AN1792 ve 200 μl PBS bylo emulzifikováno 1:1 (objem) s kompletním Freundovým adjuvancem (CFA) při konečném objemu emulze pro první imunizaci 400 μl . Přípravy pro další imunizace proběhly shodným způsobem, místo CFA však bylo použito IFA. Pro prostředky obsahující alum, MPL nebo QS-21 bylo AN1792 (100 μg /dávku) nebo AN1528 (100 μg /dávku) smíšeno s alum (1 mg/dávku) nebo s MPL (50 μg /dávku) nebo s QS-21 (25 μg /dávku) tak, aby konečný objem v PBS byl 200 μl . Tyto prostředky byly aplikovány naočkováním pod kůži mezi lopatkami. U skupiny s FA bylo 100 μg AN1792 emulzifikováno 1:1 (objem) s kompletním Freundovým adjuvancem (CFA) při

konečném objemu 400 μ l. První imunizace proběhla intraperitoneálním podáním, přičemž následně posilovací injekce (5 dávek) obsahovaly stejné množství imunogenu, místo CFA však bylo použito IFA. U skupiny, již byl podán AN1792 bez adjuvantu bylo 10 μ g AN1792 smícháno s 5 μ g thiomersalu tak, aby konečný objem v PBS byl 50 μ l. Tento prostředek byl aplikován subkutánně. Devátá, kontrolní skupina dostala subkutánně pouze 200 μ l PBS. Imunizace probíhaly u prvních tří dávek ve čtrnáctidenních intervalech a poté po měsíčních intervalech v 0, 16, 28, 56, 85 a 112 den. Zvířatům byla pro měření titru protilátek ELISA testem odebírána krev šest až sedm dní po každé imunizaci, a to tak, že první odběr byl proveden po druhé dávce. Zvířata byla usmrcena přibližně jeden týden po poslední dávce. Hladiny A β a APP v mozku byly stanoveny pomocí ELISA testu a pomocí imunohistochemického vyhodnocení přítomnosti amyloidních plaků v mozkových řezech. Dále byly určeny titry A β -specifických protilátek a proliferativní a cytokinové odpovědi závislé na A β .

Tabulka 10 ukazuje, že nejvyšší protilátkové titry proti A β 1–42 byly vyvolány s AN1792 ve FA, přičemž mezních hodnot bylo dosaženo po čtvrté imunizaci (mezní GMT: 75 386), s tím, že po poslední, šesté imunizaci poklesla tato hodnota o 59 %. Nejvyšší protilátkový titr vyvolaný AN1792 s MPL byl v porovnání s FA o 62 % nižší (mezní GMT: 28 867), mezních hodnot bylo dosaženo po třetí imunizaci s tím, že po šesté imunizaci poklesla tato hodnota na 28 % mezního GMT. Nejvyšší protilátkový titr vyvolaný AN1792 s QS–21 (GMT: 1511) byl v porovnání s MPL 5krát nižší. Kinetiky odpovědi byly pomalejší, protože k dosažení mezních hodnot odpovědi bylo zapotřebí dodatečných imunizací. Titry vyvolané na alum vázanými AN1792 překročovaly jen o málo titry získané s QS–21, přičemž kinetika odpovědi byla rychlejší. U AN1792 aplikovaného v PBS s thiomersalem byla frekvence a velikost titrů jen o málo větší než u samotného PBS. Největší titry vyvolané u MPL s AN1528 (mezní GMT: 3 099) byly přibližně 9krát nižší než s AN1792. AN1528 vázaný v alum byl jen slabě imunogenní a dával nízké titry, a to ještě jen u některých zvířat. U kontrolních zvířat imunizovaných jen PBS nebyly pozorovány žádné protilátkové odpovědi.

Tabulka 11

Geometrické průměry protilátkových titrů^a

Léčba	Týdny odběru krve				
	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)
QS-21/ 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)

QS-21/ AN1528	29 (1/22)	221 (13/22)	51 (4/22)	820 (20/22)	2994 (21/22)
PBS + Thiomersal	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)

^a Geometrické průměry protilátkových titrů měřené proti Aβ1-42

^b Množství reagujících zvířat ve skupině

- 5 Účinky léčby AN1792 nebo AN1528 spolu s různými adjuvanty nebo s thiomersalem na korovou amyloidní zátěž u dvanáctiměsíčních myší, určené metodou ELISA, jsou zobrazeny na obr. 15. U kontrolních PDAPP myší byly střední hodnoty celkového Aβ v kůře ve dvanáctém měsíci 1871 ng/g. Významně snížené hladiny Aβ byly pozorovány u myší léčených AN1792 s CFA/IFA, AN1792 s alum, AN1792 s MPL a AN1792 s QS-21. Snížení dosáhlo statistické významnosti na hladině $p < 0,05$ pouze v případě AN1792 s CFA/IFA. Nicméně, jak je popsáno v příkladech 1 a 3, redukce hladin Aβ následkem imunizace u 15 a 18 měsíců myší nabyla postupně na síle. Předpokládá se tedy, že další prostředky, zvláště AN1792 s alum, AN1792 s MPL a AN1792 s QS-21 poskytnou při léčbě starších myší pozitivnější výsledky. Naproti tomu, AN1792 s konzervační látkou thiomersalem vyvolal skoro stejnou hladinu Aβ jako samotné PBS.
- 15 Obdobné výsledky byly získány v případě srovnání korových hladin Aβ42. Průměrná hladina Aβ42 u PBS kontrol byla 1624 ng/g. Významné snížení průměrných hladin bylo zjištěno u myší léčených AN1792 s CFA/IFA (403 ng/g), AN1792 s alum (1149 ng/g), AN1792 s MPL (620 ng/g) a u AN1792 s QS-21 (714 ng/g), přičemž snížení dosáhlo v případě skupiny léčené AN1792 s CFA/IFA statistické významnosti na hladině $p = 0,05$. Průměrná hladina Aβ42 u myší
- 20 léčených AN1792 s thiomersalem byla 1619 ng/g.

Příklad 10

25 Analýzy toxicity

- Po ukončení studií popsaných v příkladech 2, 3 a 7 byly tkáně shromážděny pro histopatologické prozkoumání. U krevních vzorků z příkladu 3 a 4 byly provedeny ještě hematologické a klinické testy. Prozkoumána byla většina hlavních orgánů jako jsou mozek, plíce, lymfatické tkáně, 30 gastrointestinální trakt, játra, ledviny, nadledvinky a gonády. Kromě sporadických lézí u zvířat léčených AN1792 nebyly mezi léčenými a intaktními zvířaty pozorovány žádné zjevné rozdíly v poškození tkání nebo vážnosti lézí. U zvířat imunizovaných AN1528 nebyly v porovnání se zvířaty léčenými PBS nebo neléčenými zvířaty zaznamenány žádné zvláštní histopatologické léze. Žádné rozdíly nebyly nalezeny ani při porovnání klinických chemických testů mezi skupinami 35 zvířat s adjuvanty a s PBS (příklad 6). Ačkoli došlo k významnému zvýšení některých hematologických parametrů u zvířat léčených AN1792 s Freundovým adjuvantem v porovnání se zvířaty léčenými PBS (příklad 6), toto působení bylo možno přisoudit účinku Freundova adjuvantu a doprovodné peritonitidě, a neimplikuje žádné nepříznivé léčby s AN1792. Pro posouzení dopadu léčení byly u PDAPP myší důkladně prozkoumány i případné patologické změny 40 v mozku. Žádný nepříznivý účinek léčby na morfologii mozku nebyl však v žádné z těchto studií zaznamenán. Tyto výsledky naznačují, že léčba s AN1792 je dobře přijímána a neprovázejí ji žádné vedlejší účinky (alespoň ne zásadní).

45 Příklad 11

Léčba protilátkami proti Aβ

Pokusy popisované v této části byly provedeny proto, aby bylo možno určit schopnosti různých monoklonálních a polyklonálních protilátek proti A β v inhibici hromadění A β v mozku heterozygotních transgenních myši.

5 A. Studie 1

1. Schéma studie

60 samic a samců heterozygotních transgenních PDAPP myši, ve věku od 8,5 do 10,5 měsíců bylo získáno z Charles River Laboratories. Myši byly rozděleny do šesti skupin vystavených působení různých protilátek proti A β . Zvířata byla rozdělena tak, aby jejich pohlaví, stáří a původ zůstaly v rámci skupiny co nejméně odlišné. Jak je vidět z tabulky 12, zahrnovaly protilátky čtyři myši monoklonální protilátky specifické proti A β , 2113 (zacílení na A β zbytky 1 až 12), 10D5 (zacílení na A β zbytky 1 až 16), 266 (zacílení na A β zbytky 13 až 28 a vázající se na monomerní, ale ne na agregovanou, formu AN1792), 21F12 (zacílení na A β zbytky 33 až 42). Pátá skupina byla léčena frakcí polyklonální protilátky specifické proti A β (připravené imunizací agregovaným AN1792). Skupina představující negativní kontrolu dostávala pouze PBS bez protilátky.

Monoklonální protilátky byly injikovány v dávce okolo 10 mg/kg (za předpokladu, že myši vážily 50 g). Injekce byly aplikovány intraperitoneálně každý sedmý den tak, aby titry anti-A β byly udržovány nad 1000. Přestože byly naměřeny nižší titry u mAb 266, zřejmě z důvodu špatné vazby na agregovaný AN1792, stejný dávkovací postup byl používán pro celou skupinu. Skupina dostávající monoklonální protilátku 2H3 byla z pokusu vyřazena během prvních tří týdnů, protože protilátka byla *in vivo* příliš rychle odbourávána. Pro měření protilátkových titrů byla zvířatům odebírána krev vždy před každou dávkou. Léčba probíhala 6 měsíců, celkově po 196 dní. Zvířata byla usmrcena jeden týden po poslední dávce.

Tabulka 12

Experimentální stavba studie 006

Léčebná skupina	N ^a	Léčebná protilátka	Specifita protilátky	Izotyp protilátky
1	9	žádná (samotné PBS)	NA ^b	NA
2	10	polyklonální	A β 1-42	smíšené
3	0	mAb ^c 2H3	A β 1-12	IgG1
4	8	mAb 10D5	A β 1-16	IgG1
5	6	mAb 266	A β 13-28	IgG1
6	8	mAb 21F12	A β 33-42	IgG2a

- ^a Počet myši ve skupině při skončení pokusu. Všechny skupiny měly na počátku 10 zvířat
^b NA: neměřitelná
^c mAb: monoklonální protilátka

2. Materiál a metody

b. Příprava protilátek

5 Polyklonální protilátka proti A β byla připravena z krve získané ze dvou skupin zvířat. První skupina byla složena ze 100 samic myši Swiss Webster, 6 až 8 týdnů starých, které byly v dny 0, 15, a 29 imunizovány 100 μ g AN1792 s CFA/IFA. Čtvrtá injekce, jež obsahovala poloviční dávku AN1792 byla podána 36. den. Zvířata byla po usmrcení (42. den) zbavena krve, z níž bylo pak izolováno sérum. Séra všech zvířat byla smíšena (celkový objem 64 ml). Druhá skupina byla
10 složena ze 24 samic izogenních s PDAPP myši, ale netransfekovaných lidským APP genem, 6 až 9 týdnů starých, které byly v dny 0, 14, 28 a 56 imunizovány 100 μ g AN1792 s CFA/IFA. Zvířata byla po usmrcení (63. den) zbavena krve, z níž bylo pak izolováno sérum. Séra všech zvířat byla smíšena (celkový objem 14 ml). Séra z obou skupin byla smíšena. Protilátková frakce byla přečištěna ve dvou následných srážecích krocích pomocí 50% nasyceného síranu amonného.
15 Výsledná sráženina byla dialyzována PBS a testována na výskyt endotoxinu. Hladina endotoxinu byla menší než 1 EU/mg.

Monoklonální protilátky proti A β byly připraveny z ascitové tekutiny. Ledově vychlazená ascitová tekutina byla za míchání na ledu nejprve zbavena lipidů přidáním koncentrovaného dextran-sulfátu sodného s výslednou koncentrací 0,238 %. Za neustálého míchání přidán koncentrovaný
20 CaCl₂ až k dosažení výsledné koncentrace 64mM. Roztok byl centrifugován při 10 000 x g a vzniklý pelet byl poté odstraněn. K supernatantu byl na ledu kapáním přidán stejný objem nasyceného síranu amonného. Roztok byl znovu centrifugován při 10 000 x g a vzniklý pelet byl poté odstraněn. Pelet byl resuspendován a dialyzován 20mM Tris-HCl, 0,4M NaCl, pH 7,5. Tato
25 frakce byla nanesena na kolonu Pharmacia FPLC Sepharose Q a vyluhována reverzním gradientem od 0,4M do 0,275M NaCl v 20mM Tris-HCl, pH 7,5.

30 Frakce s maximálním obsahem protilátky byla po určení měřením absorbance při 280 nm shromážděna. V preparátu obsahujícím očištěnou protilátku byla změřena metodou BCA koncentrace proteinu a jeho čistota pomocí SDS-PAGE. V preparátu byl zjišťován také obsah endotoxinu. Hladina endotoxinu byla menší než 1 EU/mg. Titry menší než 100 byly vyhodnoceny jako titry s hodnotou 25.

3. Hladiny A β a APP v mozku

35 Po asi šesti měsících léčby s různými preparáty protilátek anti-A β byly ze zvířat mozky vyjmuty a promývány solným roztokem. Jedna hemisféra byla připravena pro imunohistochemickou analýzu, druhá byla použita pro kvantifikaci množství A β a APP. Pro měření koncentrace různých forem A β a APP byly v 5M guanidinu homogenizovány hipokampální, korové a mozečkové
40 oblasti vyjmuté hemisféry. Homogenáty byly rozředěny (sériové ředění) a následně bylo zjištěno množství amyloidu nebo APP. Kvantifikace byla založena na porovnání výsledků ELISA testů s řadou standardů peptidů A β nebo APP o známé koncentraci.

45 Množství celkového A β a A β 1 až 42, měřené metodou ELISA v homogenátech mozkové kůry, hipokampu a mozečku jsou uvedeny v tabulkách 11, 12 a 13. Střední hodnota koncentrace celkového A β v kontrolní skupině, naočkované PBS, byly 3,6krát vyšší v hipokampu (střední hodnota 63 389 ng/g) než v kůře (střední hodnota 17 818 ng/g). Střední hodnota v mozečku z kontrolní skupiny (30,6 ng/g) byla více než 2000krát nižší než hodnota v hipokampu. Tyto hladiny odpovídají hodnotám, které byly pro heterozygotní transgenní PDAPP myši stejného věku publikovány
50 dříve (Johnson-Woods et al., 1997).

V kůře vykazovala jedna skupina (zvířata, jimž byla aplikována polyklonální protilátka anti-A β) střední hodnotu množství A β , měřeného jako A β 1 až 42, která se významně lišila od hodnot kontrolní skupiny ($p < 0,05$) (tabulka 13). Střední hodnota hladiny A β 1 až 42 byla u této skupiny sni-

žena v porovnání s kontrolní skupinou o 65 %. Střední hodnota hladin A β 1 až 42 byla v porovnání s kontrolní skupinou významně snížena (o 55 %) také v další testované skupině (zvířata, jimž byla aplikována mAb 10D5, $p = 0,0433$).

- 5 V hipokampu nebyla střední snížení celkového A β (o 50 %, $p = 0,0055$), jež byla spojena s působením polyklonální protilátky anti-Ab, tak velká jako v kůře (o 65 %) (tabulka 14). Absolutní velikost poklesu byla však v hipokampu ve srovnání s kůrou 3krát větší (pokles o 31 683 ng/g tkáně v hipokampu oproti 11 658 ng/g tkáně v kůře). V případě měření hladiny A β 1 až 42 (více amyloidogenní forma A β), spíše než celkového A β , dosáhlo snížení s polyklonální protilátkou významnosti ($p = 0,0025$). Střední hladiny u skupin léčených monoklonálními protilátkami 10D5 a 266 byly sníženy o 33 respektive 21 %.

- 15 Celkový A β byl měřen i v mozečku (tabulka 16). Skupiny, jimž byla aplikována polyklonální protilátka anti-Ab a mAb 266 vykazovaly významné snížení hladin celkového A β (o 43 a o 46 %, $p = 0,0033$ a $p = 0,0184$), u skupiny léčené 10D5 bylo zjištěno bezmála významné snížení (o 23 %, $p = 0,0675$).

- 20 Metodou ELISA byly v kůře a v mozečku zvířat léčených protilátkami a kontrolních (pouze PBS) zjišťovány i koncentrace APP. Pro stanovení APP byly použity dvě různé analýzy. První, označená APP- α /FL, rozeznávala APP- α (α , sekretovaná forma APP, která byla vyštípána z A β sekvence) a formy APP o plné délce (FL), přičemž druhá rozeznává pouze APP- α . Na rozdíl od snížení hladiny A β , pozorované u části léčených zvířat, zůstaly hladiny APP v porovnání s kontrolami prakticky nezměněny. Tyto výsledky naznačují, že

Tabulka 13
Kůra

Léčebná skupina	N ^a	Střední hodnoty						Průměry	
		Celkový Aβ			Aβ42			Celkový Aβ	Aβ42
		ELISA %	P	%	ELISA	p	%	ELISA	ELISA
		hodnota ^b	hodnota ^c	změny	hodnota	hodnota	změny	hodnota	hodnota
PBS	9	17818	NA ^d	NA	13802	NA	NA	16150 ± 7456 ^e	12621 ± 5738
Polyklonální anti-Aβ42	10	6160	0,0055	-65	4892	0,0071	-50	5912 ± 4492	4454 ± 3347
mAb 10D5	8	7915	0,1019	-56	6214	0,0433	-33	9695 ± 6929	6943 ± 3351
mAb 266	6	9144	0,1255	-49	8481	0,1255	-21	9204 ± 9293	7489 ± 6921
mAb 21F12	8	15158	0,2898	-15	13578	0,7003	-12	12481 ± 7082	11005 ± 6324

a. Počet zvířat ve skupině na konci pokusu

b. ng/g tkáně

c. Mann-Whitney analýza

d. NA: neměřitelné

e. standardní odchylka

Tabulka 14
Hipokampus

Léčebná skupina	N ^a	Střední hodnoty						Průměry	
		Celkový Aβ			Aβ42			Celkový Aβ	Aβ42
		ELISA	P	%	ELISA	p	%		
		hodnota ^b	hodnota ^c	změny	hodnota	hodnota	změny	ELISA	ELISA
PBS	9	63389	NA ^d	NA	54429	NA	NA	hodnota	hodnota
Polyklonální anti-Aβ42	10	31706	0,0055	-50	27127	0,0025	-50	58351 ± 13 308 ^e	52801 ± 14701
mAb 10D5	8	46779	0,0675	-26	36290	0,0543	-33	30058 ± 22454	24853 ± 18262
mAb 266	6	48689	0,0990	-23	43034	0,0990	-21	44581 ± 18632	36465 ± 17146
mAb 21F12	8	51563	0,7728	-19	47961	0,8099	-12	36419 ± 27304	32919 ± 25372
								57327 ± 28927	50305 ± 23927

a. Počet zvířat ve skupině na konci pokusu

b. ng/g tkáně

c. Mann-Whitney analýza

d. NA: neměřitelné

e. standardní odchylka

Tabulka 15
Mozeček

Léčebná skupina	N ^a	Střední hodnoty				Průměry	
		Celkový Aβ				Celkový Aβ	
		ELISA hodnota ^b	P hodnota ^c	% změny		ELISA hodnota	
PBS	9	30,64	NA ^d	NA		40,00 ± 31,89 ^e	
Polyklonální anti-Aβ42	10	17,61	0,0033	-43		18,15 ± 4,36	
mAb 10D5	8	21,68	0,0675	-29		27,29 ± 19,43	
mAb 266	6	16,59	0,0184	-46		19,59 ± 6,59	
mAb 21F12	8	29,80	>0,9999	-3		32,88 ± 9,90	

a. Počet zvířat ve skupině na konci pokusu

b. ng/g tkáně

c. Mann-Whitney analýza

d. NA: neměřitelné

e. standardní odchylka

Závěrem lze říci, že k významnému snížení hladin A β došlo u zvířat léčených polyklonální protilátkou připravenou imunizací s AN1792 v mozkové kůře, hipokampu a v mozečku. Léčebné účinky v menší míře prokázaly i monoklonální protilátky proti části aminového konce A β 1 až 42, konkrétně proti aminokyselinám 1 až 16 a 13 až 28.

5

4. Histochemické analýzy

U části myších mozků ze skupin léčených PBS, polyklonální A β 42, 21F12, 266 a 10D5 byla kvalitativně porovnávána morfologie A β -imunoreaktivních plaků s tou u zvířat z předchozích experimentů, jež dodržovaly standardní imunizační postupy s A β 42.

10

Největší změna, a to jak v rozsahu, tak i ve vzhledu amyloidních plaků, byla pozorována u zvířat imunizovaných polyklonální protilátkou proti A β 42. Snížení amyloidní zátěže, rozrušená morfologie plaku a buněčně zprostředkovaná A β imunoreaktivita blíže připomínaly účinky dosažené standardní imunizační procedurou. Tato zjištění souhlasí s výsledky docílenými ELISA testy, při kterých bylo po aplikaci polyklonální protilátky proti A β 42 zaznamenáno významné snížení celkového A β a A β 42.

15

V případě skupiny vystavené působení 10D5 bylo také dosaženo snížení amyloidní zátěže a změn morfologie plaku, spolu se známkami buněčné A β imunoreaktivity. V porovnání s PBS kontrolami nebyly u skupin léčených 21F12 a 266 zjištěny žádné větší rozdíly.

20

5. Měření protilátkových titrů

Třem myším náhodně vybraným z každé skupiny byla vždy před každou intraperitoneální aplikací odebrána krev (celkově 30 odběrů). Protilátkové titry byly určeny pomocí vazby, stanovené technikou sendvičové ELISA) protilátky proti A β 1 až 42 na A β 1 až 42, jež bylo umístěno v plastových vícejamkových (multi-well plates) miskách (detailněji viz Všeobecný materiál a metody). Průměrné titry polyklonálních protilátek a monoklonálních protilátek 10D5 a 21F12 pro každý odběr jsou ukázány na obr. 16 až 18. V případě polyklonálních protilátek měly titry v průměru hodnotu 1:1000, přičemž v případě monoklonálních protilátek 10D5 a 21F12 byly lehce nad touto hodnotou.

25

30

6. Lymfoproliferativní odpovědi

35

Lymfoproliferace vyvolaná přítomností A β byla zjišťována ve slezinných buňkách, shromážděných přibližně osm dní po poslední imunizaci. Čerstvě získané buňky (10^5 na jamku) byly pěstovány v přítomnosti A β 1–40 v koncentraci 5 μ M/stimulaci po 5 dní. Jako pozitivní kontrola sloužily buňky pěstované v přítomnosti mitogenu T–buněk, PHA, za negativní kontrolu byly považovány buňky pěstované bez peptidu.

40

Splenocyty ze starých PDAPP myší, pasivně imunizovaných různými protilátkami anti–A β byly *in vitro* stimulovány AN1792, načež byly měřeny proliferativní a cytokinové odpovědi. Cílem těchto analýz bylo zjistit zda pasivní imunizace podporuje předkládání antigenu a vybavuje tak pro AN1792 specifické odpovědi T–buněk. U myší pasivně imunizovaných protilátkami proti A β nebyly zjištěny žádné AN1792–specifické proliferativní a cytokinové odpovědi.

45

B. Studie 2

V druhé studii byla opakována léčba protilátkou 10D5, přičemž byly testovány ještě dvě další monoklonální protilátky, 3D6 (A β _{1–5}) a 16C11 (A β _{33–42}). Kontrolní skupiny dostávaly buď PBS, nebo irelevantní izotypově odpovídající protilátku TM2a. Použité myši byly starší (11,5 až 12 měsíců starí heterozygoti) než ty v předchozí studii; ostatní experimentální podmínky zůstaly zachovány. Po šesti měsících léčby snížila 10D5 v porovnání s kontrolami plakovou zátěž více

50

než o 80 % ($p = 0,003$). 3D6 bylo stejně účinné a vyvolávalo 86% snížení ($p = 0,003$). Protilátka 16C11 neměla, na rozdíl od dvou předchozích, na plakovou zátěž žádný účinek. Obdobných výsledků bylo dosaženo při A β ₄₂ ELISA. Tyto výsledky značí, že protilátková odpověď proti peptidu A β je, při neúčasti imunity zprostředkované T-buňkami, pro snížení amyloidního ukládání u PDAPP myši dostatečná, i když ne všechny protilátky anti-A β jsou účinné. Zvláště účinné jsou protilátky zaměřené proti epitopům A β obsahujícím aminokyseliny 1 až 5 a 3 až 7.

Tyto studie dokazují, že pasivní podání protilátek proti A β snižuje rozsah ukládání plaků u myšního modelu Alzheimerovy choroby. Při udržování mírných sérových koncentrací (25 až 70 $\mu\text{g/ml}$) se protilátky do CNS dostávají v množství dostatečném proto, aby zasáhly amyloidní plaky. Vstup protilátek nebyl způsoben abnormální propustností hematoencefalické bariéry, protože při měření Evansovou modří nebyla zjištěna zvýšená cévní propustnost. Koncentrace protilátky v mozковém parenchymu starých PDAPP myši byla stejná jako u myši netransgenních, přičemž představovala 0,1 % z koncentrace v séru (nehledě na izotyp).

D. Studie 3: Sledování vazby protilátky

Za účelem zjištění zda protilátky proti A β mohou působit přímo uvnitř CNS, byly mozky myši (promývané solným roztokem) z konce příkladu 11 zkoumány pro přítomnost periferně aplikovaných protilátek. Nefixované mozkové řezy z kryostatu byly vystaveny působení fluorescenčnímu činidlu proti myšimu imunoglobulinu (koží IgG-Cy3 proti myšimu IgG). Plaky uvnitř mozku ze skupin 10D5 a 3D6 byly silně obaleny protilátkami, přičemž skupina 16C11 nevykazovala žádnou fluorescenci. Za účelem určení celkové oblasti obsazené plakou byla u sériových řezů z každého mozku provedena nejprve imunoreakce s protilátkou anti-A β a poté se sekundárním činidlem 10D5 a 3D6 dosáhly po aplikaci v periférii většinu plaků v CNS. Plaková zátěž byla na rozdíl od skupiny 16C11 v těchto léčebných skupinách silně snížena. Tyto údaje naznačují, že periferně aplikované protilátky mohou vstoupit do CNS, kde přímo spouštějí odbourávání amyloidů. Je pravděpodobné, že 16C11 se k plakům dostala také, ale nebyla schopna se na ně vázat.

Příklad 12

Prevence a léčba u lidí

Jednodávková zkouška fáze I je uskutečňována pro zjištění bezpečnosti u lidí. Léčebné činidlo je podáváno ve vzrůstajících dávkách, přičemž se začíná na jedné setině hladiny zamýšlené účinnosti a pokračuje se takovým způsobem, že každá další dávka je trojnásobkem dávky předešlé, dokud není dosaženo desetinásobku dávky účinné u myši.

Zkouška fáze II je uskutečňována pro určení léčebné účinnosti. Vybírání jsou pacienti s lehkou až střední Alzheimerovou chorobou, což je určeno podle měřítek Asociace pro Alzheimerovu chorobu a příbuzné poruchy (ADARDA). Vhodní pacienti dosahují v mentálním testu MMSE (Mini-Mental State Exam) 12 až 26 bodů. Mezi další výběrová měřítka lze zahrnout i pravděpodobnost s jakou pacienti přežijí dobu trvání studie a nepřítomnost komplikujících faktorů, k nimž patří například nutnost užívání jiných léků, které mohou léčbu narušovat. Základní hodnocení pacientových funkcí jsou prováděna pomocí klasických psychometrických měření, například MMSE a ADAS (Alzheimer's Disease Assessment Scale). Tyto psychometrické škály poskytují míru postupu Alzheimerovy choroby. Vhodné škály určující kvalitu života mohou být pro sledování léčby použity také. Postup nemoci může být sledován i pomocí MRI. Krevní profily pacientů mohou být také sledovány (analýzy výskytu protilátek proti imunogenu a odpovědi T-buněk).

Po zjištění základních údajů začíná léčba pacientů. Pacienti jsou náhodně rozděleni léčení buď léčebným činidlem, nebo placebem (aniž by o tom věděli). Pacienti jsou sledováni nejméně každých šest měsíců. Účinnost je stanovena podle významného zpomalení postupu nemoci u pacientů v léčebné skupině při porovnání se skupinou dostávající placebo.

5

Zkouška fáze II je uskutečňována pro určení přechodu pacientů s předčasnou ztrátou paměti nepůsobenou AD, někdy popisovanou jako se stárnutím spojené oslabení paměti (AAMI) nebo mírné kognitivní oslabení, k předpokládané Alzheimerově chorobě, definované ADRDA kritérii. Pacienti s vysokým rizikem přechodu k Alzheimerově chorobě jsou vybíráni z normální populace pomocí sledování začínajících známek ztráty paměti nebo jiných těžkostí projevujících se symptomytologicky jako stavy před vznikem AD, podle předchozího výskytu AD v rodině, rizikových genetických faktorů, věku, pohlaví a dalších znaků, které poukazují na vysoké riziko vzniku AD. Shromážděny jsou základní výsledky jednotlivých potřebných testů, zahrnujících MMSE a ADAS, spolu s výsledky dalších testů, jež hodnotí normální populaci. Tito pacienti jsou rozděleni do skupin s placebem nebo s léčebným činidlem a jsou sledováni nejméně každých šest měsíců, přičemž léčba končí v bodě, kdy u nich dojde či nedojde k přechodu k předpokládané AD, definované ADRDA kritérii.

20 Příklad 13

Všeobecný materiál a metody

1. Měření protilátkových titrů

25

Myším byla odebrána krev z malého řezu v ocasní žíle, přičemž do mikrozkušavky bylo pak shromážděno asi 200 μ l krve. Morčatům byla krev po oholení zadní části zánárti odebírána z metatarzální žíly jehlou 18 gauge, přičemž poté byla shromážděna do mikrozkušavek. Krev byla ponechána srážet se po 1 h při pokojové teplotě (RT) a pak byla vortexována a centrifugována při 14 000 $\times$ g po 10 minut, za účelem oddělení sraženiny od séra. Sérum bylo přeneseno do čisté mikrozkušavky a skladováno při 4 °C až do stanovení titru. Protilátkové titry byly měřeny pomocí ELISA. Mikrotitrační destičky s 96 jamkami (Costar EIA plates) byly pokryty 100 μ l roztoku obsahujícího 10 μ l/ml A β 42 nebo SAPP nebo jiné antigeny (uvedeno v jednotlivých příkladech) v pufru pro pokrývání jamek (0,1M fosforečnan sodný, pH 8,5, 0,1% azid sodný) a nechány přes noc při RT. Zbýlý roztok v destičkách byl odsát a poté bylo do jamek přidáno sérum (počáteční ředění 1:100) ve vzorkovém rozpouštědle (0,014M fosforečnan sodný, pH 7,4, 0,15M NaCl, 0,6% sérový hovězí albumin, 0,05% thiomersal). Přímě v destičkách byly vzorky v sedmi krocích sériově naředěny (v násobcích tří), přičemž výsledné ředění bylo 1:218 700 a inkubovány po 1 h při RT. Destičky byly poté čtyřikrát opláchnuty PBS obsahujícím 0,05% Tween 20. Druhá protilátka, koží IgG proti myšimu IgG konjugovaný s křenovou peroxidázou (Boehringer Mannheim), byl přidán do jamek jako 100 μ l roztoku ředěného ve vzorkovém rozpouštědle 1:3000 a inkubován po 1 h při RT. Destičky byly poté znovu čtyřikrát opláchnuty v PBS s Tween 20. Pro vyvolání chromogenu bylo do každé jamky přidáno 100 μ l Slow TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin, Pierce Chemicals) a poté následovalo 15 min inkubace při RT. Reakce byla zastavena přidáním 25 μ l 2M H₂SO₄. Intenzita zbarvení byla vyhodnocena pomocí přístroje Vmax (Molecular Devices) při 450 až 480 nm.

Titry byly definovány jako převrácené hodnoty ředění séra, které představovalo polovinu maximální OD. Maximální OD byla určena při počátečním ředění 1:100, což neplatilo pouze u případů s velmi vysokými hodnotami titrů, pro které bylo nutné za maximální OD určit vyšší počáteční ředění. Jestliže 50 % bodů zapadá mezi dvě ředění, pak se hodnota výsledného titru spočítala pomocí lineární extrapolace. Pro spočítání geometrického průměru protilátkových titrů byly titry menší než 100 vyhodnoceny jako titry s hodnotou 25.

50

2. Analýza proliferace lymfocytů

Myši byly umrtveny isofluranem. Sleziny byly odebrány a dvakrát opláchnuty s 5 ml PBS obsahujícím 10% tepelně inaktivované fetální telecí sérum (PBS-FBS) a poté v 1,5 ml PBS-FBS po 10 s při 100 rpm homogenizovány pomocí zařízení Centricon 50 (Dako A/S, Denmark) v Medimachine (Dako). Homogenizát byl pak přefiltrován přes nylonovou síť s póry velikosti 100 μ m. Splenocyty byly jednou opláchnuty v 15 ml PBS-FBS a peletovány centrifugací při 200 x g 5 min. Červené krvinky byly lyzovány resuspendováním peletu v 5 ml pufru (0,15M NH₄Cl, 1M KHCO₃, 0,1M NaEDTA, pH 7,4) po 5 min při RT. Leukocyty byly poté opláchnuty stejně jako výše. Čerstvě izolované slezinové buňky (10⁵ buněk na jamku) byly pěstovány v triplicátech v 96ti jamkových mikrotitračních destičkách, určených pro tkáňové kultury a s dnem ve tvaru písmene U (Corning, Cambridge, MA), po 96 h při 37 °C. K pěstování bylo použito médium RPMI 1640 (JRH Bioscience, Lenexa, KS) doplněné 2,05mM L-glutaminem, 1% Penicilin/Streptomycin a 10% tepelně inaktivovaným FBS. V čtyřech krocích byly v dávkách od 5 do 0,18 μ M přidány také různé A β peptidy (A β 1–16, A β 1–40, A β 1–42 nebo protein s obrácenou sekvencí A β 40–1). Buňky v kontrolních jamkách byly pěstovány s konkanavalinem A (Con A) (Sigma, kat. č. C–5275), 1 μ g/ml) bez přidaného proteinu. Na posledních 24 h pěstování byl k buňkám přidán ³H-thymidin (1 μ Ci/jamku, Amersham Corp., Arlington Heights, IL). Poté byly buňky shromážděny na miskách UniFilter a radioaktivita spočítána v zařízení Top Count Microplate Scintillation Counter (Packard Instruments, Downers Grove, IL). Výsledky jsou vyjádřeny jako cpm (záblesky za minutu) radioaktivity inkorporované do nerozpustných molekul.

4. Preparace mozkové tkáně

Po umrtvení myši byly jejich mozky vyjmuty a jedna hemisféra byla připravena pro imunohistochemickou analýzu, druhá byla použita pro kvantifikaci množství A β a APP v hipokampu, kůře a mozečku pomocí specifických ELISA (Johnson et al., viz výše).

Tkáně určené pro ELISA byly homogenizovány v 10 dílech ledově studeného guanidinového pufru (5,0M guanidin-HCl, 50mM Tris-HCl, pH 8,0). Homogenáty byly promíchány jemným mícháním po 3 h při RT za použití přístroje Adams Nutator (Fisher) a před kvantifikací A β a APP uchovány v –20 °C. Předchozí pokusy ukázaly, že analyty byly za těchto skladovacích podmínek stabilní, a že protein zůstal co do množství zachován, což bylo zjištěno přidáním syntetického A β protein (Bachem) do homogenátu mozků z kontrolních zvířat (Johnson et al., viz výše).

5. Měření hladin A β

Mozkové homogenáty byly naředěny 1:10 s ledově studeným kaseinovým rozpouštědlem (0,25% kasein, 0,05% azid sodný, 20 μ g/ml aprotinin, 5mM EDTA pH 8,0, 10 μ g/ml leupeptin) a poté centrifugovány při 16 000 x g po 20 min při 4 °C. Standardy syntetického proteinu A β (1 až 42 aminokyselin) a standardy APP byly připraveny tak, aby ve výsledném složení obsahovaly 0,5M guanidin a 0,1 % hovězího sérového albuminu (BSA). Technika sendvičové ELISA pro zjištění „totálního“ A β používala monoklonální protilátku 266, specifickou pro aminokyseliny 13 až 28 v A β (Seubert et al., jako uchycenou protilátku a biotinylovanou monoklonální protilátku 3D6, specifickou pro aminokyseliny 1 až 5 (Johnson–Wood et al.) jako referenční (reporter) protilátku. Monoklonální protilátka 3D6 nerozeznávala sekretované APP nebo APP plné délky, ale pouze formy A β s kyselinou asparagovou na aminovém konci. Dolní hranice citlivosti se u této analýzy nachází okolo 50 ng/ml, přičemž křížové reakce s myším endogenním A β proteinem se neobjevují až do koncentrace 1 ng/ml (Johnson–Wood et al., viz výše).

Technika sendvičové ELISA specifická pro A β 1–42 používala monoklonální protilátku 21F12, specifickou pro aminokyseliny 33 až 42 v A β (Seubert et al.) jako uchycenou protilátku a opět

biotinylovanou monoklonální protilátkou 3D6 jako referenční protilátkou. Dolní hranice citlivosti je u této analýzy nižší a nachází se okolo 125 µg/ml (28 µM, Johnson–Wood et al.). Pro ELISA testy Aβ bylo buď 100 µl mAb 266 (10 µg/ml), nebo mAb 21F12 (5 µg/ml) aplikováno na misky s 96 jamkami určené pro imunoanalýzu (Costar) a ponecháno přes noc při 4 °C. Roztok byl odstraněn odsátím a jamky byly blokovány přidáním 200 µl 0,25% lidského sérového albuminu v PBS pufru po nejméně 1 h při RT. Blokovací roztok byl odstraněn a misky byly až do použití uchovány vysušené při 4 °C. Misky byly před použitím rehydratovány pomocí oplachovacího pufru [Tris pufovaný roztok solí (0,115M NaCl, 0,01M Tris–HCl, pH 7,5), plus 0,05% Tween 20]. Vzorky a standardy byly přidány z alikvotů v triplicátech, 100 µl na jamku a poté inkubovány přes noc při 4 °C. Misky byly mezi jednotlivými kroky v analýze nejméně třikrát opláchnuty pomocí oplachovacího pufru. Biotinylovaná mAb 3D6, naředěná na 0,5 µg/ml v kaseinovém pufru (0,25% kasein, PBS, 0,05% Tween 20, pH 7,4), byla přidána a inkubována v jamkách po 1 h při RT. Konjugát avidinu a křenové peroxidázy (Avidin–HRP, Vector, Burlingame, CA), naředěný 1:4000 v kaseinovém pufru, byl přidán do jamek na 1 h při RT. Kolorimetrický substrát, Slow–TMB–ELISA (Pierce), byl přidán a ponechán reagovat 15 min při RT. Poté byla enzymatická reakce zastavena přidáním 25 µl 2N H₂SO₄. Produkt reakce byl kvantifikován za použití čtecího přístroje Vmax (Molecular Devices), jenž měřil rozdíl absorbancí při 450 a 650 nm.

20 6. Měření hladin APP

Pro měření hladin APP byly použity dvě různé analýzy. První, označená APP–α/FL (α, sekretovaná forma APP, která byla vyštěpována z Aβ sekvence a obsahovala prvních 12 aminokyselin Aβ) a formy APP o plné délce (FL), přičemž druhá rozeznává pouze APP–α. Jelikož referenční protilátka (2H3) není specifická pro svorku α–části vyskytující se mezi aminokyselinami 612 až 613 v APP695 (Esch et al., Science 248, 1122 až 1124, 1990); tato analýza také rozeznává APP o plné délce (APP–FL). Předběžné pokusy, prováděné za účelem očištění mozkových homogenátů od APP–FL a používající imobilizované APP protilátky specifické pro cytoplazmatický konec v APP–FL, naznačily, že přibližně 30 až 40 % z APP–α/FL je FL (data neuvedena). Analýzy APP–α/FL i APP–α používaly monoklonální protilátku 8E5, specifickou pro aminokyseliny 444 až 592 v APP695 (Games et al., viz výše) jako uchycenou protilátku a biotinylovanou monoklonální protilátku 2H3 (APP–α/FL analýza), specifickou pro aminokyseliny 597 až 608 (Johnson–Wood et al.) a biotinylovanou monoklonální protilátku 16H9, specifickou pro aminokyseliny 605 až 611, jako referenční protilátku. Dolní hranice citlivosti těchto analýz se v případě APP–α/FL nachází okolo 11 ng/ml (150 pM) (Johnson–Wood et al., viz výše) a v případě APP–α okolo 22 ng/ml (0,3 nm). V obou APP analýzách byla mAb 8E5 aplikována na 96ti jamkové misky pro EIA způsobem popsaným pro mAb 266 (viz výše). Jako referenční standard pro analýzy APP–α a APP–α/FL bylo použito přečištěné rekombinantní sekretované APP–α (Esch et al., viz výše). Vzorky s mozkovými homogenáty v 5M guanidinu byly naředěny 1:10 ve vzorkovém pufru pro ELISA (0,014M fosfátový pufr, pH 7,4, 0,6% hovězí sérový albumin, 0,05% thiomersal, 0,5M NaCl, 0,1% NP40). Poté byly naředěny 1:4 ve vzorkovém pufru s 0,5M guanidinem. Naředěné homogenáty byly pak centrifugovány při 16 000 x g po 15 s při RT. Vzorky a standardy APP byly přidány z alikvot na misky v duplikátech a inkubovány přes noc při 4 °C. Biotinylovaná referenční protilátka 2H3 nebo 16H9 byla inkubována se vzorky po 1 h při RT. Konjugát streptavidinu a alkalické fosfatázy (Boehringer Mannheim), ředěný 1:1000 ve vzorkovém pufru, byl inkubován v jamkách po 1 h při RT. Na 30 min v RT byl přidán fluorescenční substrát (4–methyl–umbelliferyl–fosfát) a misky byly analyzovány fluorimetrem Cytofluor 2350 (Millipore), přičemž excitace probíhala při 350 nm a emise při 450 nm.

50 7. Imunohistochemie

Mozky byly fixovány po 3 dny při 4 °C ve 4% paraformaldehydu v PBS a pak do doby než byly nařezány skladovány 1 až 7 dní při 4 °C v 1% paraformaldehydu v PBS. Koronární řezy 40 µm silné byly nakrájeny na vibratomu při RT a skladovány v kryoprotektantu (30% glycerol,

30% ethylenglykol ve fosfátovém pufru) při -20°C než byly použity pro imunohistochemickou analýzu. Z každého mozku bylo pořízeno šest řezů v oblasti dorsálního hipokampu (mezera mezi řezy byla vždy $240\text{ }\mu\text{m}$), které byly přes noc inkubovány s jednou z následujících protilátek: (1) biotinylovaná anti- $\text{A}\beta$ (mAb, 3D6, specifická pro lidské $\text{A}\beta$) naředěná v koncentraci $2\text{ }\mu\text{g/ml}$ v PBS s 1% koňským sérem; nebo (2) biotinylovaná mAb specifická pro lidské APP, 8E5, naředěná v koncentraci $3\text{ }\mu\text{g/ml}$ v PBS s 1% koňským sérem; (3) mAb specifická pro gliální vláknitý acidický protein (GFAP, Sigma Chemical Co.), naředěná 1:500 v 0,25% Triton X-100 s 1% koňským sérem v solném roztoku pufovaném Tris, pH 7,4 (TBS); nebo (4) mAb specifická pro CD11b, MAC-1 antigen (Chemicon International), naředěná 1:100 v 0,25% Triton X-100 s 1% králičím sérem v TBS; nebo (6) kryší mAb specifická pro CD43 (Pharmingen), naředěná 1:100 s 1% králičím sérem v PBS; nebo (7) kryší mAb specifická pro CD45RA (Pharmingen), naředěná 1:100 s 1% králičím sérem v PBS; nebo (8) kryší mAb specifická pro CD45RB (Pharmingen), naředěná 1:100 s 1% králičím sérem v PBS; nebo (9) kryší mAb specifická pro CD45 (Pharmingen), naředěná 1:100 s 1% králičím sérem v PBS; nebo (10) biotinylovaná polyklonální křeččí specifická pro CD3e (Pharmingen) naředěná 1:100 s 1% králičím sérem v PBS; nebo (11) kryší mAb specifická pro CD3 (Serotec), naředěná 1:200 s 1% králičím sérem v PBS; nebo (12) roztok PBS bez primární protilátky a obsahující 1% normální koňské sérum.

Řezy určené pro reakci s roztoky protilátek 1, 2 a 6 až 12 byly nejprve vystaveny působení 1% Triton X-100 a 0,4% peroxidu vodíku v PBS po 20 min při RT, za účelem zablokování endogenní peroxidázy. Pak byly přes noc inkubovány při 4°C s primární protilátkou. Řezy určené pro reakci s 3D6 nebo 8E5 nebo CD3e byly pak po 1 h při RT vystaveny působení komplexu křenová peroxidáza-avidin-biotin spolu s částmi komerční sady, označenými „A“ a „B“, které byly naředěny 1:75 v PBS (Vector Elite Standard Kit, Vector Labs, Burlingame, CA). Řezy určené pro reakci s protilátkami specifickými pro CD45RA, CD45RB, CD45, CD3 a roztok PBS bez primární protilátky byly inkubovány po 1 h při RT s biotinylovaným IgG proti kryšimu IgG (Vector), naředěným 1:75 v PBS nebo s biotinylovaným IgG proti myšimu IgG (Vector), naředěným 1:75 v PBS. Řezy byly pak po 1 h při RT vystaveny působení komplexu křenová peroxidáza-avidin-biotin spolu s částmi komerčního kitu (komerční sady), označenými „A“ a „B“, které byly naředěny 1:75 v PBS (Vector Elite Standard Kit, Vector Labs, Burlingame, CA).

Řezy byly vyvolány v 0,01% peroxidu vodíku, 0,05% 3,3'-diaminobenzidinu (DAB) při RT. Řezy určené pro inkubaci s protilátkami specifickými pro GFAP, MAC-1, MHC II byly nejprve vystaveny působení 0,6% peroxidu vodíku při RT, za účelem zablokování endogenní peroxidázy a pak inkubovány přes noc při 4°C s primární protilátkou. Řezy, u nichž proběhla reakce s protilátkou proti GFAP byly inkubovány po 1 h při RT s biotinylovaným koňským IgG proti myšimu IgG (Vector Laboratories; Vectastain Elite ABC Kit) naředěným 1:200 v TBS. Řezy byly pak po 1 h při RT vystaveny působení komplexu křenová peroxidáza-avidin-biotin (Vector Laboratories; Vectastain Elite ABC Kit) naředěnému 1:1000 v TBS. Řezy inkubované s monoklonálními protilátkami specifickými pro MAC-1 a MHC II byly následně vystaveny působení biotinylovanému králičímu IgG proti myšimu IgG, naředěnému 1:200 v TBS, pak byly po 1 h při RT vystaveny působení komplexu křenová peroxidáza-avidin-biotin naředěnému 1:1000 v TBS. Řezy inkubované s protilátkami specifickými pro GFAP, MAC-1 a MHC II byly poté při RT vizualizovány působením 0,05% DAB, 0,01% peroxidu vodíku, 0,04% chloridu nikelnatého a TBS po 4 a 11 min.

Řezy označené protilátkou byly připevněny na podložní skla (VWR, Superfrost slides), přes noc vysušeny na vzduchu, propláchnuty v Propar (Anatech) a překryty krycími skličky za použití upevňujícího média Permount (Fisher).

Proto, aby byly zviditelněny i plaky $\text{A}\beta$, byla po imunohistochemickém zpracování část GFAP-pozitivních řezů upevněna na sklička Superfrost a inkubována v 1% vodném Thioflavinu S (Sigma) po 7 min. Řezy byly pak dehydratovány a omyty v Propar a pak překryty krycími skličky za použití upevňujícího média Permount.

8. Obrazová analýza

Pro kvantifikaci imunoreakcí v řezech byl používán systém analýzy obrazu Videometric 150 (Oncor, Inc., Gaithersburg, MD) připojený k CCD kamerou k mikroskopu Nikon Microphot-FX a monitoru Sony Trinitron. Obraz řezu byl uložen a na základě barvy a sytosti byl určen práh pro výběr a výpočet celkové oblasti obrazových prvků zobrazujících struktury, ve kterých proběhla imunitní reakce. U každého řezu byl ručně obrýsován hipokampus a pak spočítán celkový prostor obrazových prvků zobrazujících hipokampus. Procento amyloidní zátěže bylo měřeno jako: (část hipokampální oblasti obsahující usazeniny A β zjištěné imunoreakcí s mAb 3D6) x 100. Obdobně bylo měřeno procento neuritické zátěže: (část hipokampální oblasti obsahující dystrofické neurity reagující s monoklonální protilátkou 8E5) x 100. Pro zjištění procent retrosplenální oblasti obsazené GFAP–pozitivními astrocyty a MAC–1– a MHC II–pozitivní mikroglie byl použit systém C–Imaging (Compix, Inc., Cranberry Township, PA), jež operoval s programem Simple 32 Software Application a byl pomocí kamery Optronics napojen na mikroskop Nikon Microphot-FX. Obraz oblasti, v níž proběhla imunitní reakce byl uložen a na základě jedné barvy byl určen práh pro výběr a výpočet celkové oblasti obrazových prvků zobrazujících buňky, ve kterých proběhla imunitní reakce. U každého řezu byl ručně obrýsován retrosplenální kůra (RSC) a pak spočítán celkový prostor obrazových prvků zobrazujících RSC. Procento výskytu astrocytózy bylo měřeno jako: (část RSC oblasti obsazené GFAP–pozitivními astrocyty) x 100. Obdobně bylo měřeno procento mikroglie: (část RSC oblasti obsazené MAC–1– nebo MHC II–pozitivní mikroglie) x 100. U každého zvířete bylo při kvantifikaci obrazovou analýzou z mozku pořízeno šest řezů v oblasti dorsálního hipokampu (mezera mezi řezy byla vždy 240 μ m). V žádném z případů nebyl pozorovateli (pracovník provádějící analýzu obrazu) sdělen stav a prováděná léčba zvířete.

Příklad 14

Analýza *ex vivo* účinku protilátek na amyloidní usazeniny

Pro zjištění účinku protilátek na odbourávání plaků byla použita *ex vivo* analýza, při které byly primární mikrogliaální buňky pěstovány s nezafixovanými řezy z kryostatu, jež pocházely z mozku PDAPP myši nebo z lidských mozku s AD. Mikrogliaální buňky byly získány z mozkové kůry novorozenech DBA/2N myši (1 až 3 dny staré). Kůry byly mechanicky rozrušeny v HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution, Sigma) s 50 μ l/ml DNázy I (Sigma). Rozvolněné buňky byly přefiltrovány přes 100 μ m „cell stainer“ (Sigma) a centrifugovány při 1000 rpm po 5 min. Pelet byl resuspendován v růstovém médiu (DMEM s vysokým obsahem glukózy, 10% FBS, 25 ng/ml rmGM–CSF) a buňky byly pěstovány v hustotě 2 mozky na plastovou kultivační láhev 7–75. Po 7 až 9 dnech byly lahve stočeny na orbitálním třepadle při 200 rpm po 2 h při 37 °C. Buněčná suspenze byla centrifugována při 1000 rpm a resuspendována v analytickém médiu.

10 μ m široké kryostatické řezy z mozku PDAPP myši nebo z lidských AD mozku, jež byly pořízeny méně než 3 h po smrti, byly nechány rozehrát upevněny na kulatém sklíčku pokrytém polylysinem a umístěny do jamek (24ti jamková kultivační miska). Sklíčka byla dvakrát opláchnuta analytickým médiem obsahujícím H–SFM (hybridomové médium bez séra, Gibco BRL) s 1% FBS, glutaminem, penicilin/streptomycinem a 5 ng/ml rmGM–CSF (R&D). Kontrola nebo protilátky proti A β byly přidány koncentrované 2x (výsledná konc. 5 μ g/ml) na 1 h. Mikrogliaální buňky byly pak vysazeny v hustotě 0,8 x 10⁶ buněk/ml analytického média. Kultury byly udržovány ve vlhčeném inkubátoru (37 °C, 5 % CO₂) po 24 h nebo déle. Na konci inkubace byly kultury fixovány se 4% paraformaldehydem a membrány buněk narušeny pomocí 0,1% Triton X–100. Rezy byly vystaveny působení biotinylované 3D6 a pak konjugátu streptavidinu a Cy3 (Jackson ImmunoResearch). Exogenní mikrogliaální buňky byly zviditelněny jaderným barvivem (DAPI). Kultury byly pozorovány v invertovaném fluorescenčním mikroskopu (Nikon, TE300) a mikrofotografie pořízeny digitální kamerou SPOT, za použití programu SPOT (Diagnosic Instruments). Pro analýzu i Westernovu analýzu byly kultury extrahovány 8M močovinou, naředěnou

1:1 v tricinovém redukujícím vzorkovém pufru a aplikovány a 16% tricinový gel (Novex). Po přenosu na immobilon byly bloty vystaveny působení pAbA β 42 (5 μ g/ml) a pak konjugátu HRP s protilátkou proti myši a vyvolány s ECM (Amersham).

- 5 V případě analýzy prováděné s řezy z PDAPP myši v přítomnosti protilátky 16C11 (jedna z protilátek proti A β , které *in vivo* nebyly účinné) zůstaly β -amyloidní plaky nezměněny a nebyla pozorována žádná fagocytóza. Když však byly přilehlé řezy pěstovány v přítomnosti 10D5, amyloidní usazeniny se z větší části ztratily a mikrogliaální buňky obsahovaly početné fagocytární
- 10 měchýřky obsahující A β . Stejných výsledků bylo dosaženo u řezů z AD mozků; 10D5 vyvolala fagocytózu AD plaků, zatímco 16C11 byla neúčinná. Srovnatelné výsledky byly pozorovány při analýzách uskutečněných buď s myšimi, nebo lidskými mikrogliaálními buňkami, a také s myšimi, králíci nebo lidskými protilátkami proti A β .

- 15 Tabulka 16 ukazuje výsledky získané s různými protilátkami proti A β , porovnává jejich schopnosti ve vyvolání fagocytózy při *ex vivo* analýze a ve snížení plakové zátěže *in vivo* při studiích pasivního průniku. Přestože se 16C11 a 21F12 vážaly na agregovaný syntetický A β s velkou ochotou, nebyly tyto protilátky schopny reagovat s β -amyloidními plakami v nefixovaných mozkových řezech, nebyly schopny fagocytózu při *ex vivo* analýze a nebyly účinné ani *in vivo*. 10D5, 3D6 a polyklonální protilátka proti A β vykazovaly ve všech třech uvedených bodech účinné
- 20 působení. Protilátka 22C8 se silněji váže na analog formy přirozeně se vyskytujícího A β , který je charakteristický záměnou kyseliny asparagové v pozicích 1 a 7 za kyselinu izoasparagovou. Tyto výsledky ukazují, že *in vivo* účinnost se projevuje přímým odbouráváním plaku uvnitř CNS, zprostředkovaným protilátkami, a že analýza *ex vivo* předpovídá účinnost *in vivo*.

- 25 Stejná analýza byla použita při testování očišťovací schopnosti (zprostředkování odbourání plaku) protilátky proti fragmentu synukleinu, nazývanému NAC. U synukleinu se prokázalo, že je proteinem spojeným s amyloidními plakami. Protilátka proti NAC byla výše popsaným způsobem aplikována k vzorku mozkové tkáně obsahujícímu amyloidní plaky a mikrogliaální buňky. Jako kontrola bylo použito králíčí sérum. Následující prozkoumání ukázalo jasné snížení množství a
- 30 rozměru plaků a prokázalo tak očišťovací schopnost této protilátky.

- Při potvrzení, že A β bylo v průběhu *ex vivo* analýzy internalizováno byla použita metoda konfokální mikroskopie. V přítomnosti kontrolních protilátek zůstávají exogenní mikrogliaální buňky v konfokální rovině nad tkání, nejsou vidět žádné fagocytické měchýřky s A β a plakami v řezech
- 35 jsou neporušeny. V přítomnosti 10D5 byl skoro všude plakový materiál obsažen v měchýřkách exogenních mikrogliaálních buněk. Pro zjištění dalšího osudu internalizovaného peptidu byly kultury vystaveny působení 10D5, v různé časy extrahovány 8M močovinou a prozkoumány pomocí Westernovy analýzy. V čase 1 h, kdy ještě nebylo možno pozorovat fagocytózu, byl po reakci s polyklonální protilátkou proti A β patrný proužek silný 4 kDa (odpovídající peptidu A β).
- 40 A β imunoreaktivita poklesla během prvního dne a třetí den již nebyla přítomna. To znamená, že fagocytóza A β zprostředkovaná protilátkami vede k jeho degradaci.

- S cílem zjištění zda fagocytóza v *ex vivo* analýze probíhala zprostředkována Fc receptory byly připraveny F(ab')₂ fragmenty protilátky 3D6, specifické pro A β . Přestože si fragmenty F(ab')₂ zachovaly plnou schopnost vázat se na plakami, nebyly schopny spustit fagocytózu mikrogliaálních
- 45 buněk. A dále, fagocytóza spuštěná kompletní protilátkou mohla být znemožněna látkou blokující myši Fc receptory (anti-CD16/32). Tyto výsledky značí, že odbourávání A β *in vivo* probíhá fagocytózou zprostředkovanou Fc receptory.

Příklad 15

Tabulka 16
Ex vivo analýza při předpovědi *in vivo* účinnosti

Protilátka	Izotyp	Afinita k agregovanému A β (pM)	Vazba na β -amyloidní plaky	<i>Ex vivo</i> účinek	<i>In vivo</i> účinek
monoklonální					
3D6	IgG2b	470	+	+	+
10D5	IgG1	43	+	+	+
16C11	IgG1	90	-	-	-
21F12	IgG2a	500	-	-	-
TM2a	IgG1	-	-	-	-
polyklonální					
1-42	mš	600	+	+	+

5 Průchod protilátek přes hematoencefalickou bariéru

Níže popsané pokusy byly vykonány za účelem získání informací o schopnosti protilátek procházet po periferní intravenózní injekci do mozku a pro zajištění způsobů pro měření koncentrace protilátky v mozku po intravenózní injekci do periferní tkáně, a to jak u normálních, tak i u PDAPP myši. Takováto měření jsou užitečná při předpovědi a určení účinných dávek.

Myši PDAPP nebo kontrolní myši byly perfundovány 0,9% NaCl. Mozkové oblasti (hipokampus nebo kůra) byly vyjmuty a rychle zmrazeny. Mozky byly homogenizovány v 0,1% Triton s inhibitory proteáz. Imunoglobulin v extraktech byl detekován technikou ELISA. Kozí F(ab')₂

- IgG proti myššímu F(ab')₂ IgG, představující uchycenou protilátku, byl aplikován na RIAisky. Sérové nebo mozkové extrakty byly inkubovány po 1 h. Izotypy byly detekovány protimyššími protilátkami IgG1-HRP, IgG2a-HRP nebo IgG2b-HRP (Caltag). Protilátky, nehlédě a izotyp, se v CNS vyskytovaly v koncentraci 1:1000 v poměru ke koncentraci v krvi. Například když koncentrace IgG1 byla v krvi trojnásobná než koncentrace IgG2a, tak poměr jejich koncentrací zůstal v mozku zachován, přičemž koncentrace obou protilátek v mozku představovaly 0,1 % jejich hladiny v krvi. Tyto výsledky byly pozorovány jak u transgenních, tak i u normálních myši, z čehož plyne, že PDAPP myši nemají neobvykle propustnou hematoencefalickou bariéru.
- Přestože předkládaný vynález byl z důvodu jasnosti a srozumitelnosti popsán detailně, je zřejmé, že v rozsahu předkládaných nároků je možné provést určité modifikace. Všechny zde citované publikace a patentové dokumenty jsou takto zahrnuty podle odkazu ve své celistvosti pro všechny účely do stejné míry, jako by každý z nich byl jednotlivě označen.

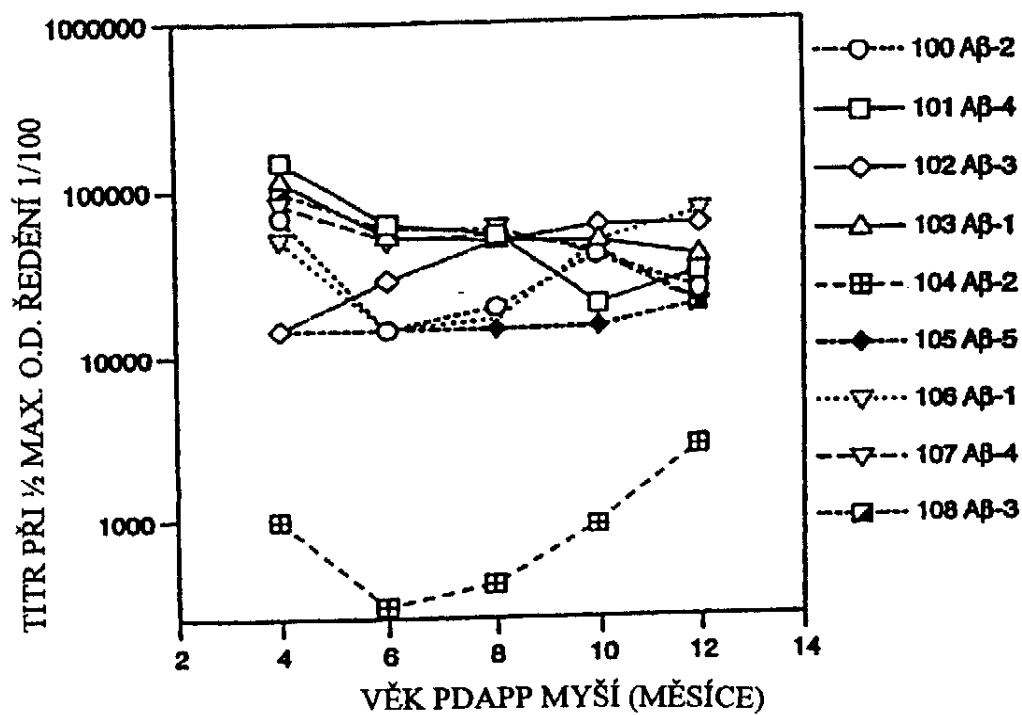
PATENTOVÉ NÁROKY

1. Farmaceutický prostředek obsahující amyloidní složku, schopnou vyvolat imunitní odpověď v těle pacienta, farmaceutickou pomocnou látku, a adjuvans, které podněcuje nebo zvětšuje imunitní odpověď na amyloidní složku, pro použití při léčení poruchy charakterizované amyloidními plaky, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že amyloidní složka je zvolena ze skupiny sestávající z AH, AL Lambda řetězce, AApoA1, ATTR, Alys, Agel, Aβ₂M, AANF, AIAPP, Acal a synuklein NAC.
2. Farmaceutický prostředek podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že amyloidní složkou je vláknitá složka.
3. Farmaceutický prostředek podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje nejmeně dvě rozdílné amyloidní složky.
4. Farmaceutický prostředek podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že amyloidní složkou je peptid spojený s nosným proteinem.
5. Farmaceutický prostředek podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že adjuvans je zvoleno ze skupiny sestávající z QS21, monofosforyllipidu, alum, a Freundova adjuvans.
6. Farmaceutický prostředek podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že jeho imunitní odpověď je charakterizována sérovým titrem nejméně 1:1000, a to podle dané amyloidní složky.
7. Farmaceutický prostředek podle nároku 6, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že sérový titr je nejméně 1:5000, vzhledem k dané složce.
8. Farmaceutický prostředek podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že jeho imunitní odpověď je charakterizována množstvím sérové imunoreaktivity, odpovídající více než čtyřnásobné hladině sérové imunoreaktivity naměřené u kontrolního vzorku séra před započítím léčby.
9. Farmaceutický prostředek podle nároku 8, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že zmiňované sérové množství imunoreaktivity je měřeno v séru ředěném asi 1:100.
10. Způsob pro určení prognózy pacienta, podrobujícího se léčbě amyloidní poruchy, zahrnující měření množství imunoreaktivity proti vybrané amyloidní složce ve vzorku séra pacienta, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že množství pacientovy sérové imunoreaktivity, nejméně čtyřikrát

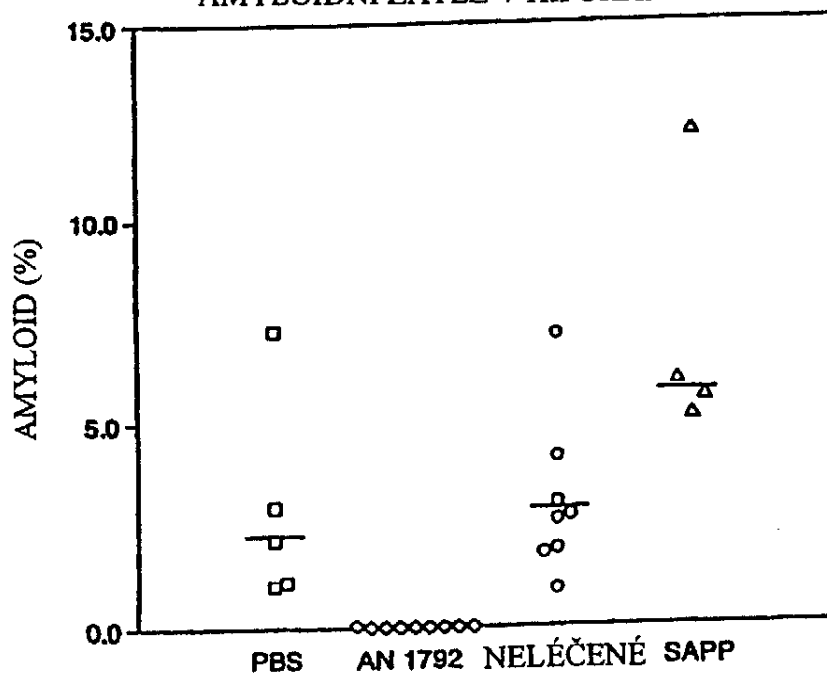
větší než kontrolní bazální hodnota sérové imunoreaktivity pacienta před léčbou, indikuje prognózu zlepšení, podle konkrétní poruchy, přičemž amyloidní složka je zvolena ze skupiny sestávající z AH, AL Lambda řetězce, AApoA1, ATTR, Alys, Agel, Aβ₂M, AANF, AIAPP, Acal a synuklein NAC.

- 5 11. Způsob podle nároku 10, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že zmiňované pacientovo množství sérové imunoreaktivity proti zmiňované amyloidní složce je charakterizováno sérovým titrem nejméně 1:1000, výhodně nejméně 1:5000.
- 10 12. Protilátka, která se specificky váže na amyloidní složku přítomnou v amyloidním plaku, pro použití při prevenci a léčbě poruchy, charakterizované zmiňovaným amyloidním plakem, přičemž amyloidní složka je zvolena ze skupiny sestávající z AH, AL Lambda řetězce, AApoA1, ATTR, Alys, Agel, Aβ₂M, AANF, AIAPP, Acal a synuklein NAC.
- 15 13. Protilátka podle nároku 12, kde amyloidní složka je vláknitá složka.
14. Protilátka podle nároku 13, kde protilátka se váže na epitop zmiňované vláknité složky.
- 20 15. Protilátka podle nároku 14, kde protilátka se specificky váže na jmenovanou vláknitou složku, aniž by se vážala na prekursor zmiňované vláknité složky.
16. Protilátka podle nároku 15, kde protilátka je lidská protilátka proti zmiňované vláknité složce, připravená z lidských B-buněk imunizovaných epitopem vláknité složky.
- 25 17. Protilátka podle nároku 13, kde protilátka je lidská protilátka.
18. Protilátka podle nároku 13, kde protilátka je humanizovaná protilátka.
19. Protilátka podle nároku 13, kde protilátka je chimérická protilátka.
- 30 20. Protilátka podle nároku 13, kde protilátka je lidský IgG1 izotyp.
21. Farmaceutický prostředek pro použití při prevenci nebo léčbě poruchy, charakterizované ukládáním amyloidního plaku, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje protilátku podle náro-
35 ků 12 až 20, která je specificky vázána na amyloidní složku přítomnou v amyloidním plaku, v kombinaci s druhou protilátkou vázající druhou amyloidní složku v amyloidním plaku, přičemž amyloidní složky jsou zvoleny ze skupiny sestávající z AH, AL Lambda řetězce, AApoA1, ATTR, Alys, Agel, Aβ₂M, AANF, AIAPP, Acal a synuklein NAC.
- 40 22. Protilátka podle alespoň jednoho z nároků 12 až 20 nebo farmaceutický prostředek podle nároku 21, které jsou přizpůsobeny pro intraperitoneální, orální, subkutánní, intramuskulární, intranasální, lokální nebo intravenózní podání.
- 45 23. Protilátka nebo farmaceutický prostředek podle nároků 12 až 22, které jsou přizpůsobeny pro podávání ve více dávkách po dobu nejméně šesti měsíců.
24. Protilátka nebo farmaceutický prostředek podle nároků 12 až 22, které jsou přizpůsobeny pro podávání jako postupně se uvolňující prostředek.

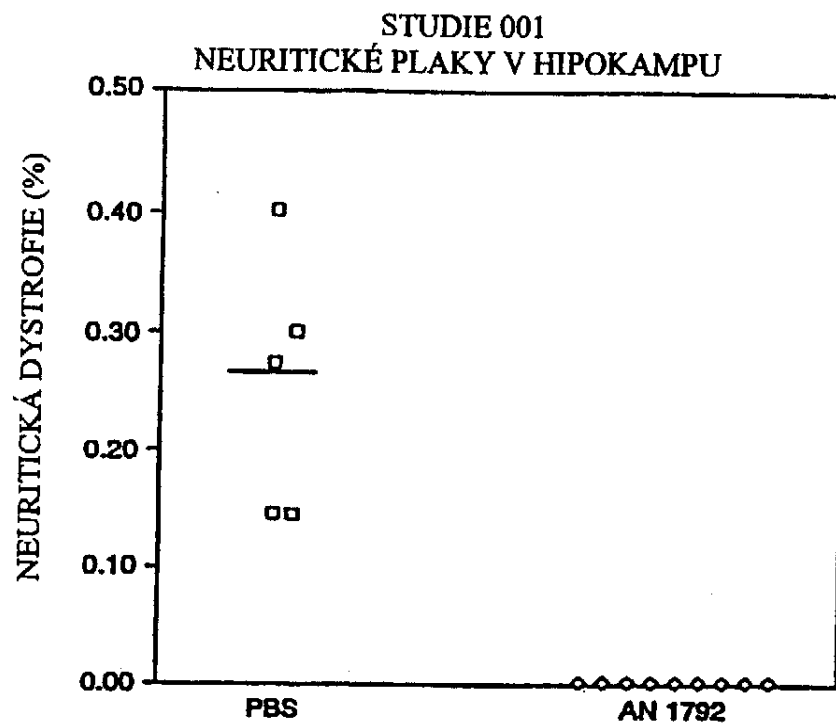
50

TITR AGREGOVANÉHO A β 42 INJIKOVANÉHO V RŮZNÉ ČASY PDAPP MYŠÍM

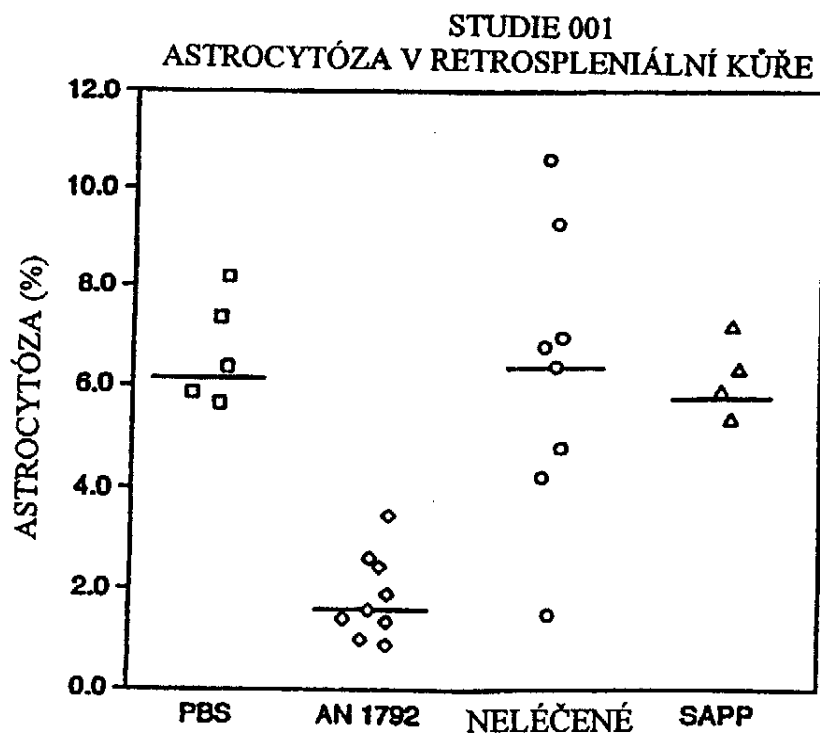
Obr. 1

STUDIE 001
AMYLOIDNÍ ZÁTĚŽ V HIPOKAMPU

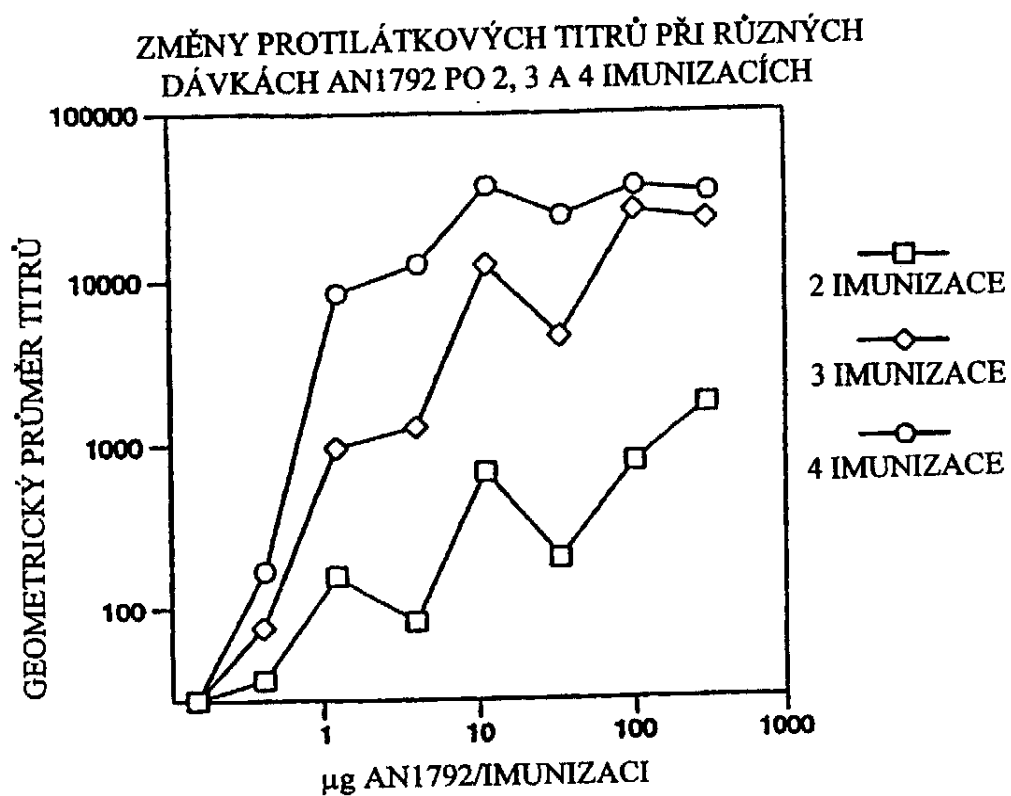
Obr. 2



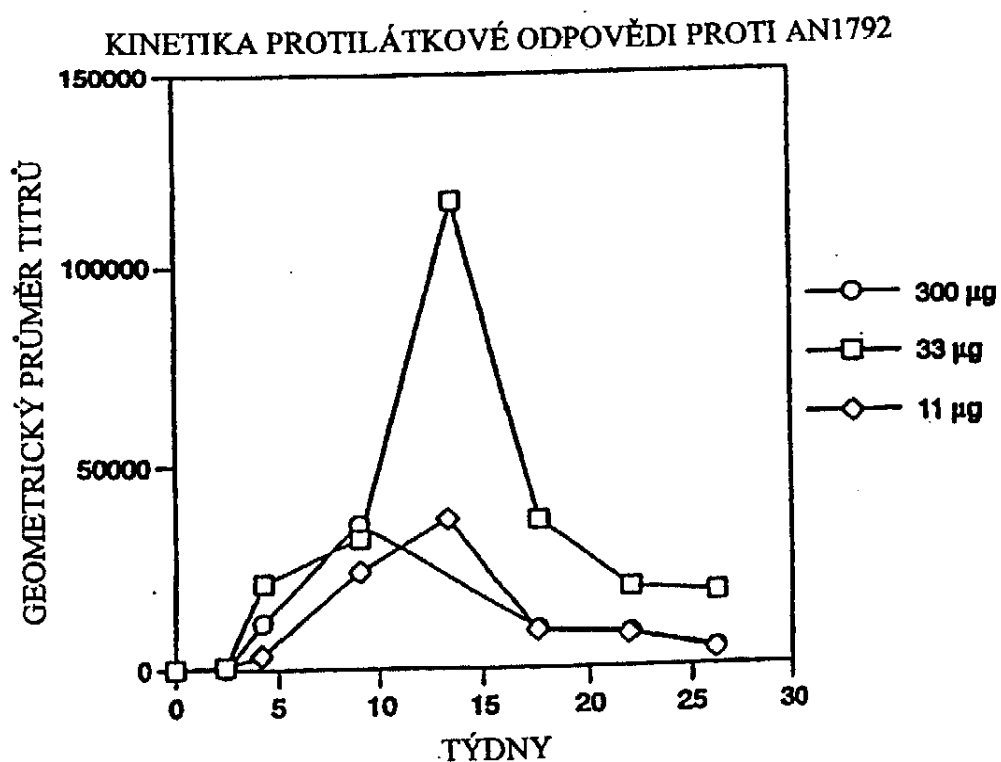
Obr. 3



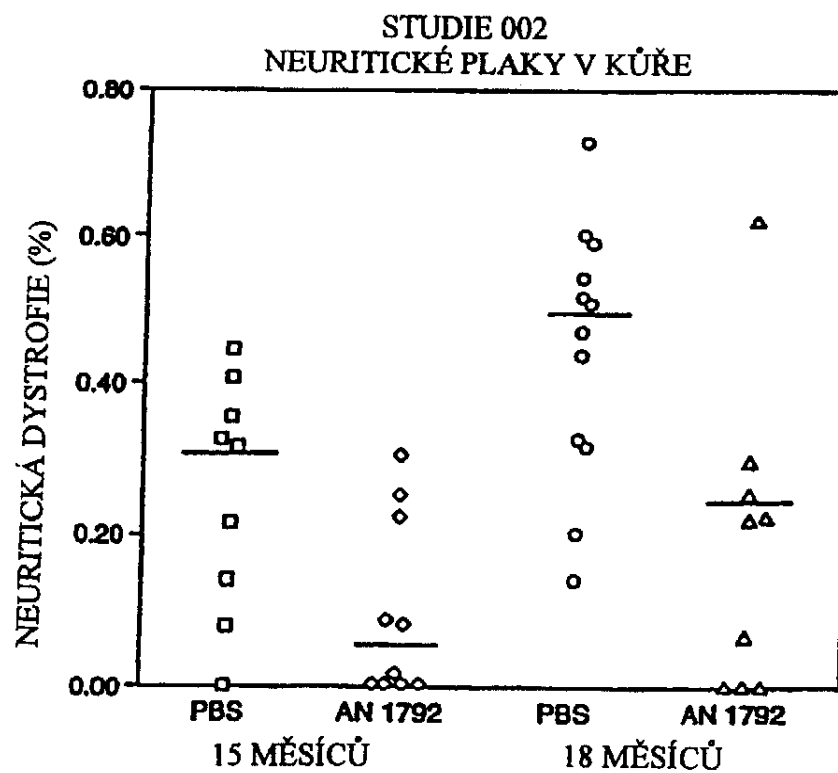
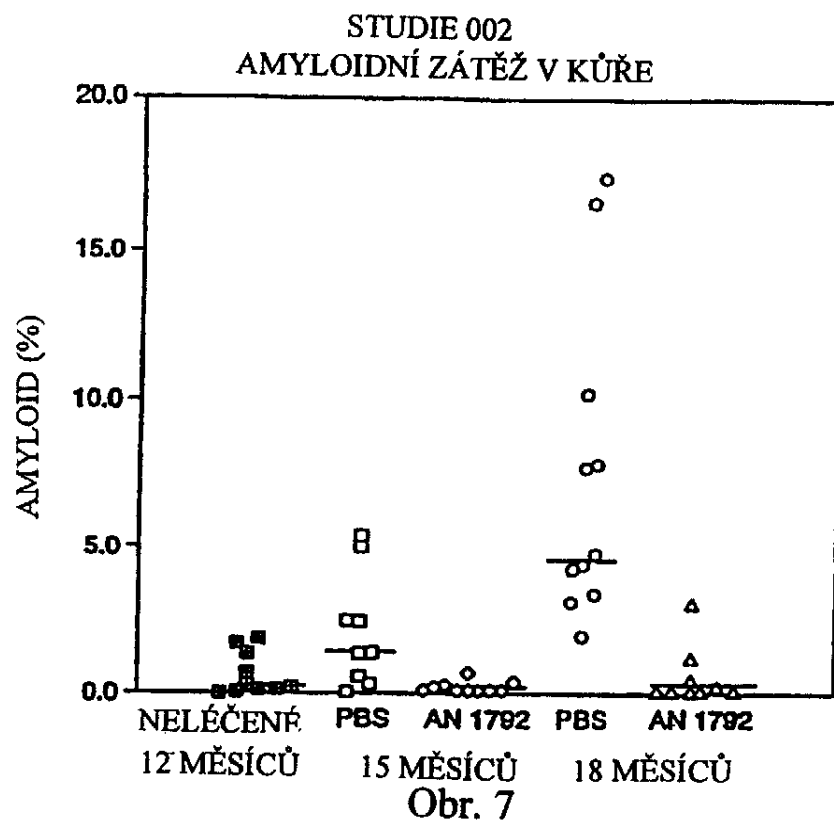
Obr. 4



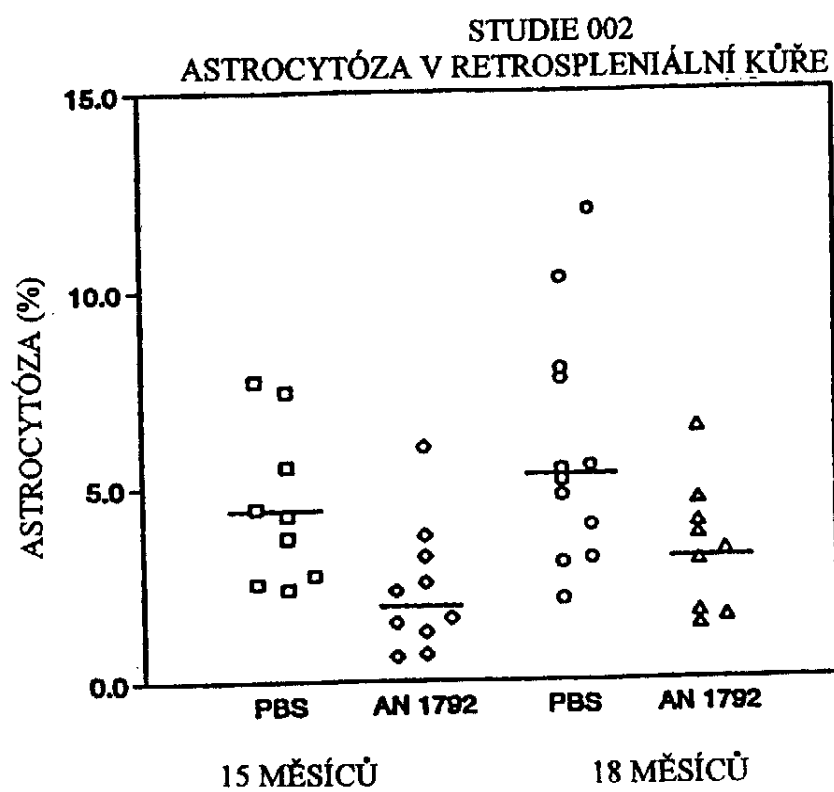
Obr. 5



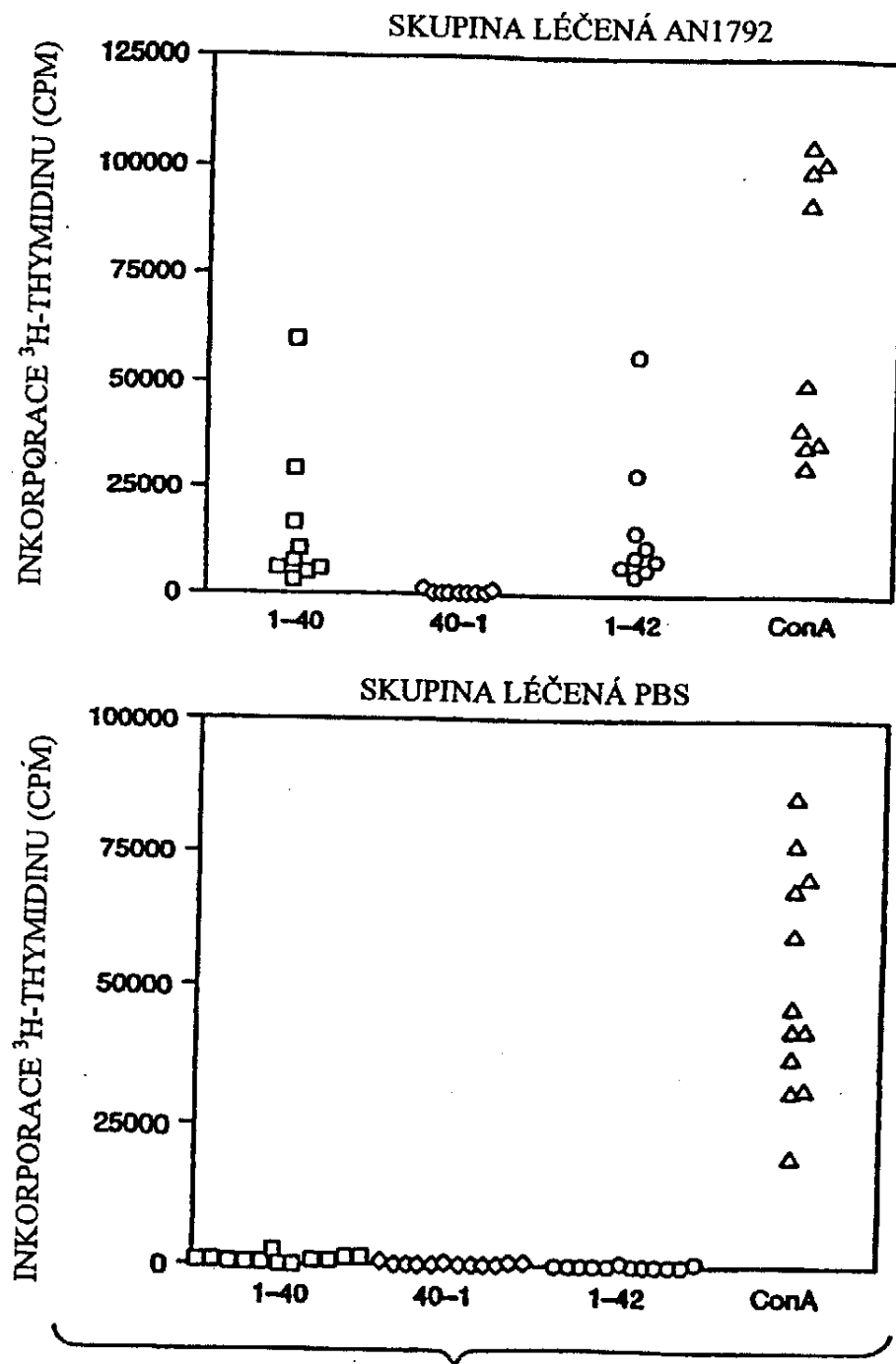
Obr. 6



Obr. 8

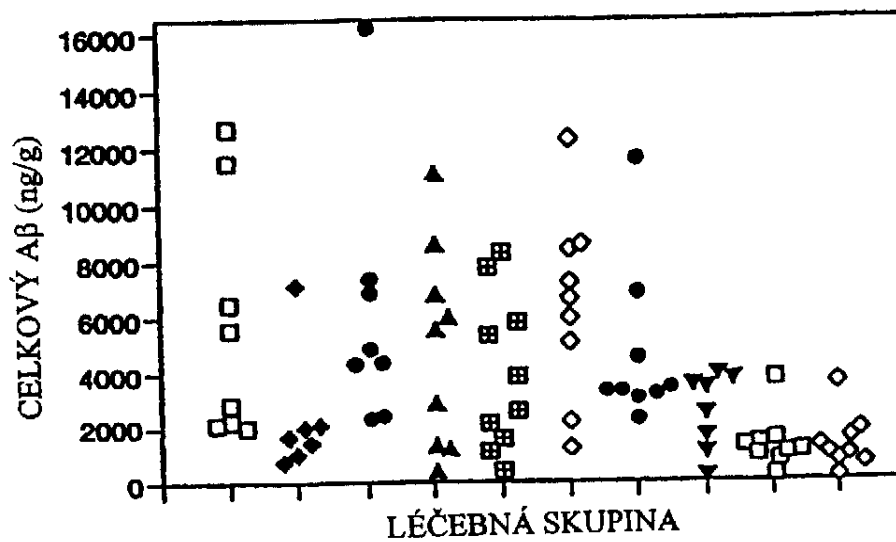


Obr. 9

STUDIE 002
ASTROCYTÓZA V RETROSPLÉNIALNÍ KŮŘE

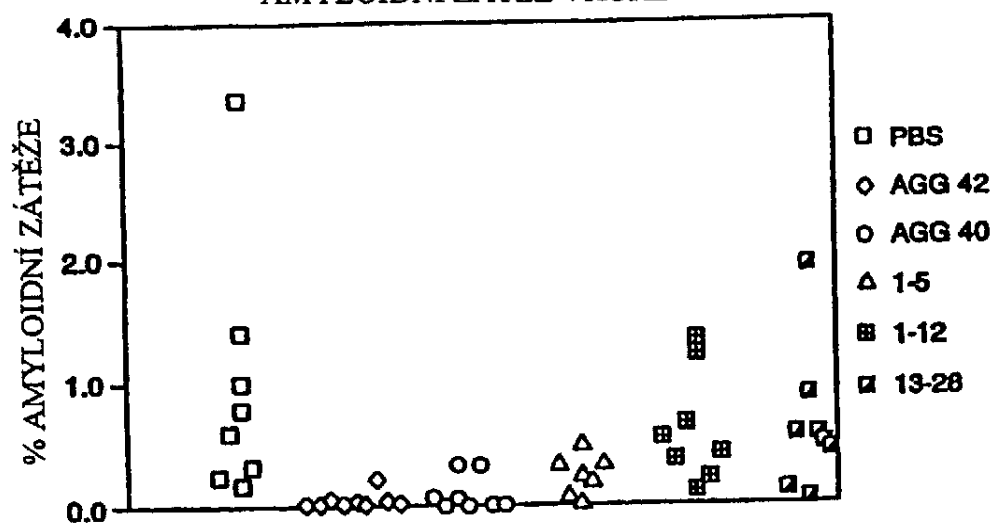
Obr. 10

STUDIE 006
LÉČEBNÁ ÚČINNOST FRAGMENTŮ A β
CELKOVÝ A β V KŮŘE



Obr. 11

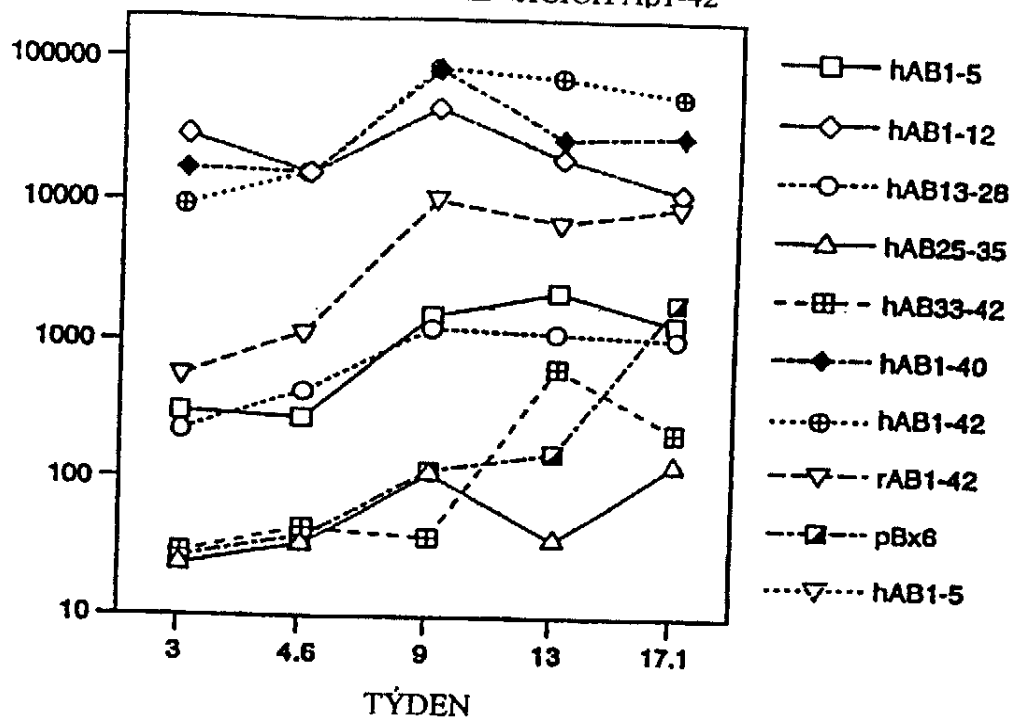
STUDIE 006
AMYLOIDNÍ ZÁTĚŽ VKŮŘE



Obr. 12

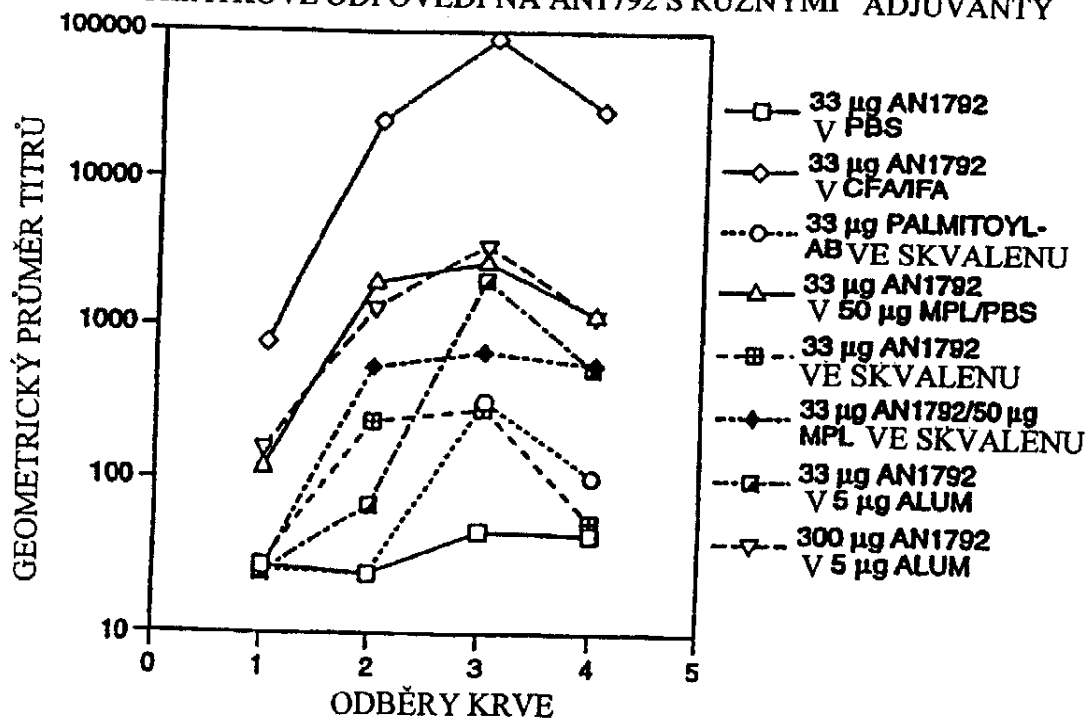
GEOMETRICKÝ PRŮMĚR PROTILÁTKOVÝCH TITRŮ

STUDIE 006
TITRY PROTILÁTEK VÁZAJÍCÍCH AB1-42



Obr. 13

PROTILÁTKOVÉ ODPOVĚDI NA AN1792 S RŮZNÝMI ADJUVANTY



Obr. 14

KÚRA

KONTROLA S PBS		INTAKTNÍ KONTROLA	
624-165	272	764-181	3470
625-166	1802	785-182	171
626-167	62	766-183	91
633-168	4696	767-184	6692
634-169	3090	768-185	1353
671-170	2417	771-186	1153
672-171	2840	772-187	3800
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		
STŘEDNÍ HODNOTA p HODNOTA (M-W)	1817	STŘEDNÍ HODNOTA p HODNOTA (M-W)	1153
PRŮMĚR	1931	PRŮMĚR	1825
ST. ODCH.	1718	ST. ODCH.	1769
% VK (VARIČNÍ KOEF.)	89	% VK	97
p HODNOTA	n=16	p HODNOTA	n=15

Obr. 15A

KÚRA

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

Obr. 15B

KÚRA

25 µg 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		
STŘEDNÍ HODNOTA p HODNOTA (M-W)	1199	STŘEDNÍ HODNOTA p HODNOTA (M-W)	475 0.0481
PRŮMĚR ST. ODCH. % VK p HODNOTA	1552 1364 88 n=21	PRŮMĚR ST. ODCH. % VK p HODNOTA	637 655 103 0.0106 n=15

Obr. 15C

KÚRA

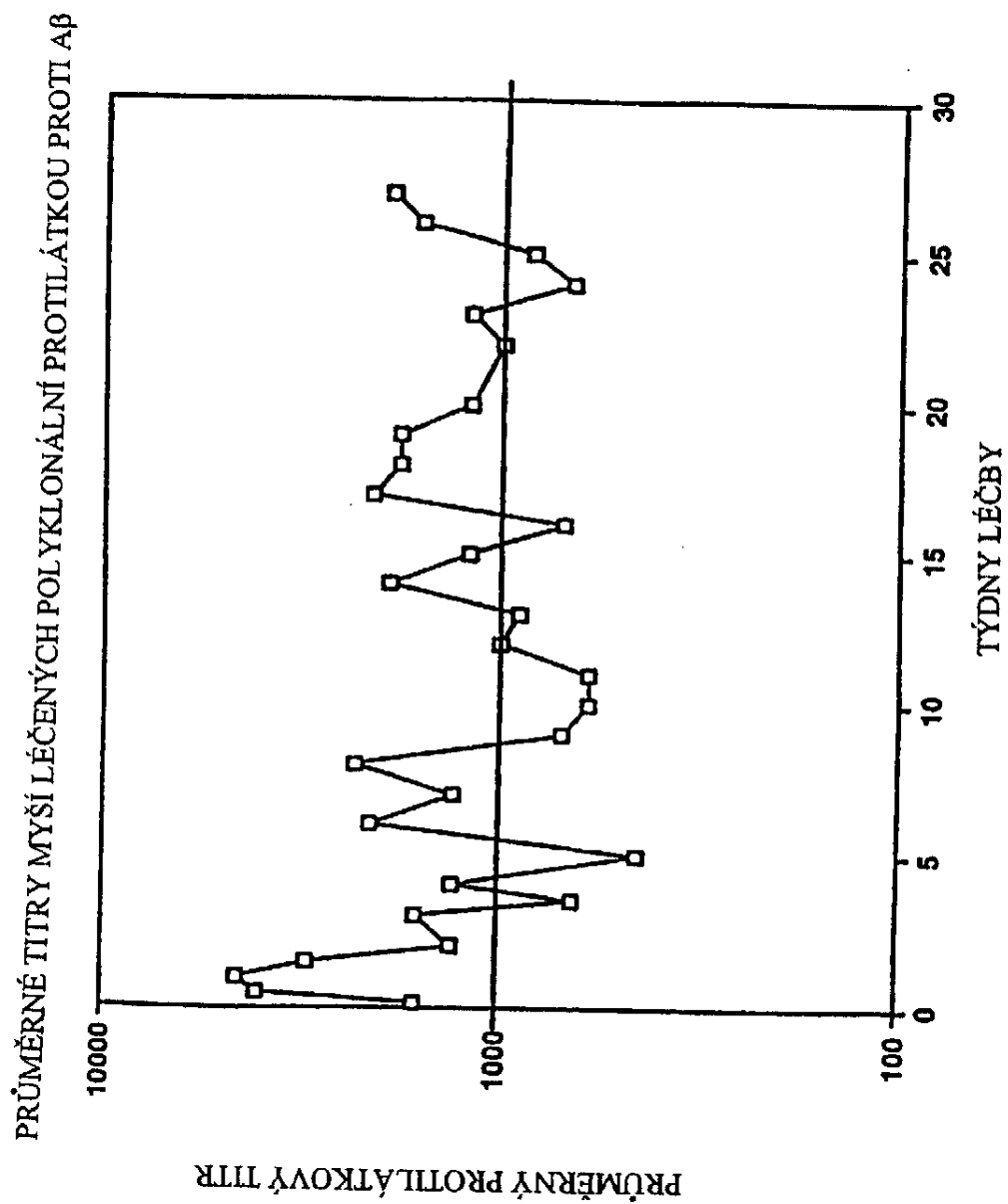
5 µg THIMEROSAL/PBS 10 µg AN1792		2 µg ALUM 100 µg AN1792	
635-149	1337	610-001	432
669-150	4644	611-002	1012
670-151	6335	612-003	3607
673-152	3700	613-004	508
674-153	2750	620-005	465
676-154	1687	621-006	16
681-156	185	622-007	28
682-157	8031	623-008	217
683-158	3450	708-009	2738
754-159	157	709-010	927
755-160	6857	710-011	1609
756-161	482	716-012	1608
805-162	524	784-014	3890
806-163	397	785-015	1614
807-164	234	786-018	285
		787-017	3102
		788-018	1617
		789-019	1474
		815-020	424
		816-021	1375
		817-022	2323
STŘEDNÍ HODNOTA p HODNOTA (M-W)	1687	STŘEDNÍ HODNOTA p HODNOTA (M-W)	1375 0.5000
PRŮMĚR		PRŮMĚR	1394
ST. ODCH.	2718	ST. ODCH.	1166
% VK	99	% VK	84
p HODNOTA	n=15	p HODNOTA	0.2650 n=21

Obr. 15D

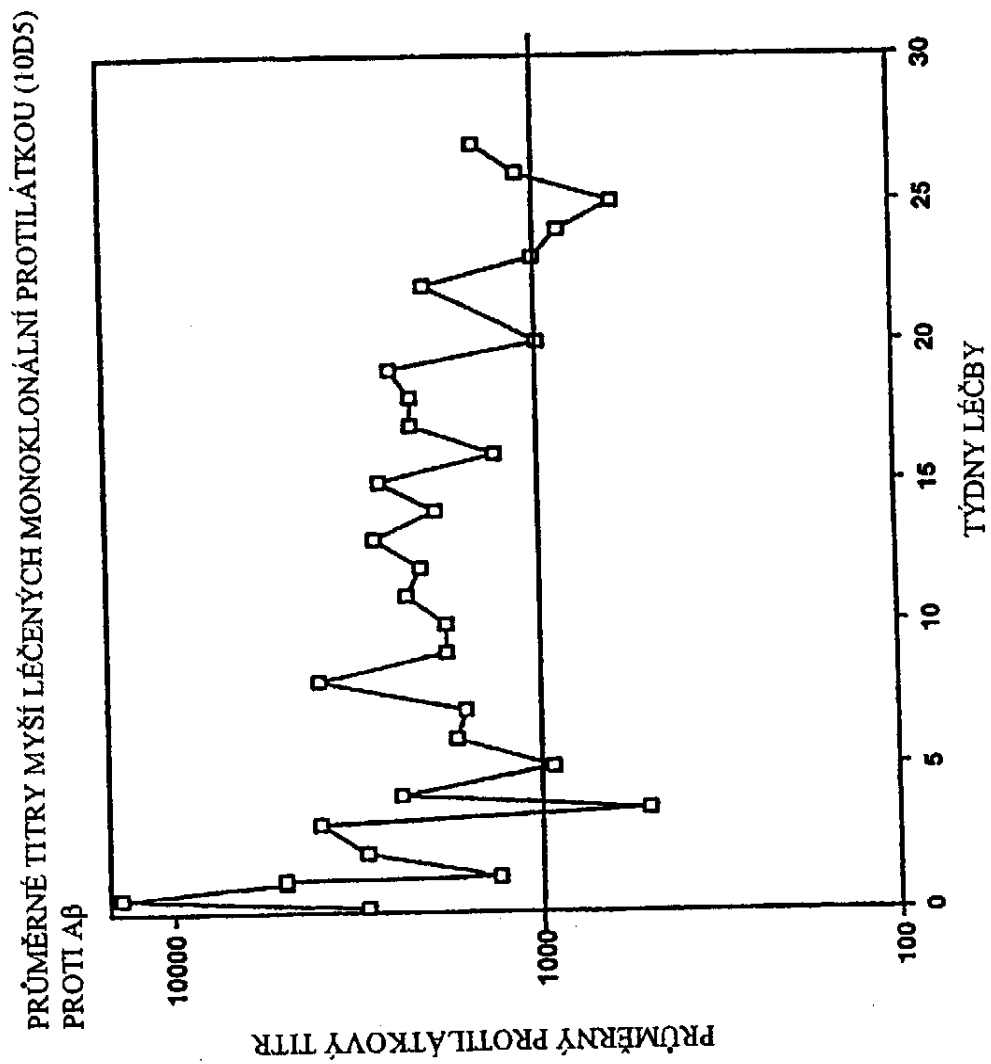
KÚRA

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	1968	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		
STŘEDNÍ HODNOTA	774	STŘEDNÍ HODNOTA	950
p HODNOTA (M-W)	0.1710	p HODNOTA (M-W)	0.4076
PRŮMĚR	1192	PRŮMĚR	2199
ST. ODCH.	1299	ST. ODCH.	4187
% VK	109	% VK	190
p HODNOTA	0.1506	p HODNOTA	0.8131
	n=21		n=18

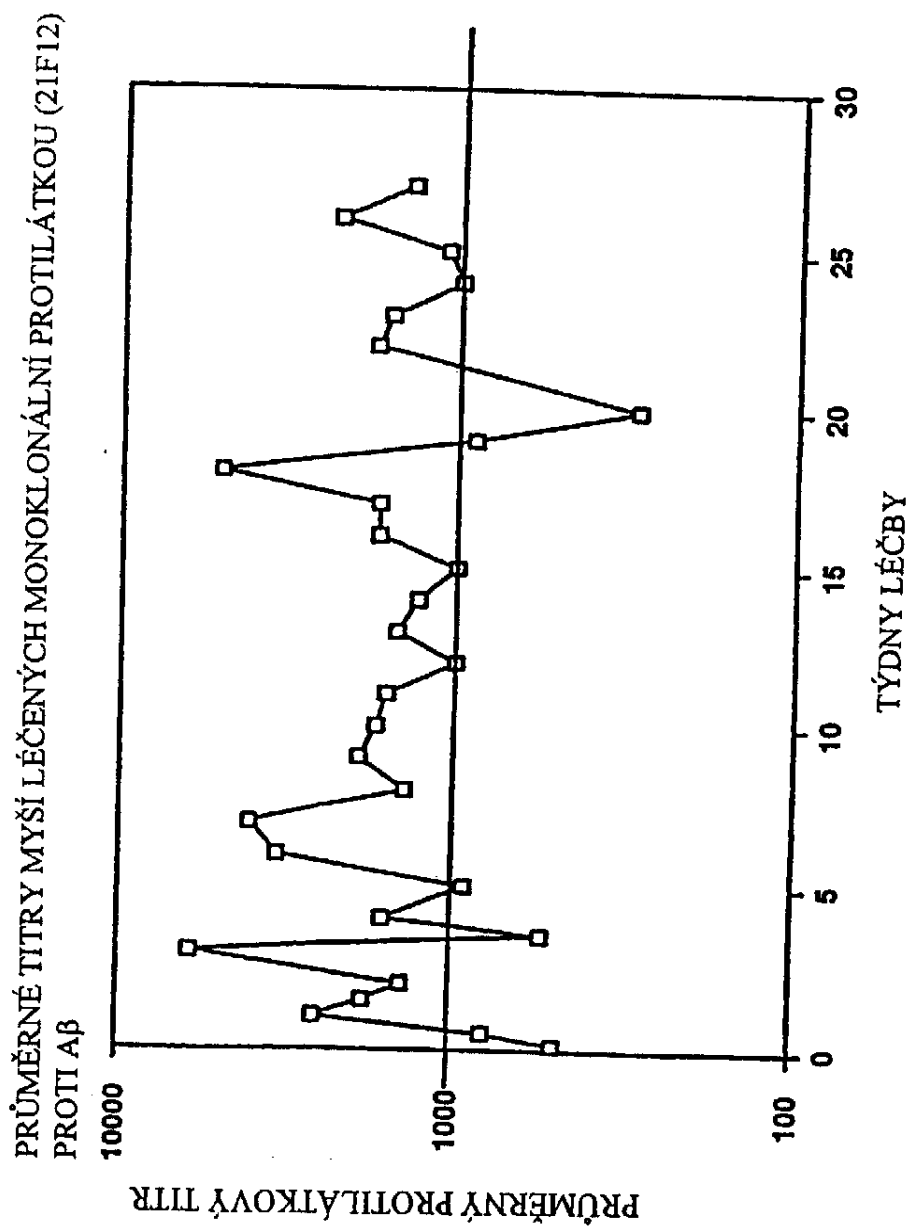
Obr. 15E



Obr. 16



Obr. 17



Konec dokumentu

Obr. 18