



(12) **PATENT**

(19) **NO**

(11) **335602**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

A61K 39/08 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/385 (2006.01)
A61K 35/74 (2006.01)
A61K 35/76 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/31 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 25/14 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20040431	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2002.08.02 PCT/DK2002/00547
(22)	Inng.dag	2004.01.30	(85)	Videreføringssdag	2004.01.30
(24)	Løpedag	2002.08.02	(30)	Prioritet	2001.08.20, DK, PA200101231
(41)	Alm.tilgj	2004.04.16			
(45)	Meddelt	2015.01.12			
(73)	Innehaver	H. Lundbeck A/S, Ottiliavej 9, DK-2500 VALBY, Danmark			
(72)	Oppfinner	Martin Roland Jensen, c/o Pharmexa A/S, Kogle Allé 6, DK-2970 HØRSHOLM, Danmark Klaus Gregorius Nielsen, c/o Pharmexa A/S, Kogle Allé 6, DK-2970 HØRSHOLM, Danmark Peter Birk Rasmussen, c/o Pharmexa AS, Kogle Allé 6, DK-2970 HØRSHOLM, Danmark Peter Koefoed, c/o Pharmexa AS, Kogle Allé 6, DK-2970 HØRSHOLM, Danmark Florence Dal Degan, c/o Pharmexa AS, Kogle Allé 6, DK-2970 HØRSHOLM, Danmark			
(74)	Fullmektig	Onsagers AS, Postboks 1813 Vika, 0123 OSLO, Norge			

(54)	Benevnelse	Farmasøytisk sammensetning for nedregulering av amyloid inneholdende et immunogen omfattende en polyaminosyre som induserer produksjon av antistoff mot dyrets autologe amyloid forløperprotein (APP) eller amyloid-beta (A-beta), nukleinsyrefragment kodende for polyaminosyren, vektor og transformert celle.			
(56)	Anførte publikasjoner	WO 9323076 A1 WO 9315760 A1			
(57)	Sammendrag				

Det beskrives nye fremgangsmåter for bekjempelse av sykdommer som er kjennetegnet ved amyloid avleiring. Fremgangsmåtene angår generelt immunisering mot amyloid forløperprotein (APP) eller betaamyloid (AP). Immunisering utføres fortrinnsvis ved administrering av analoger av autologe APP eller AP, nevnte analoger er i stand til å indusere antistoffremstilling mot de autologe amyloidogene polypeptidene. Spesielt foretrukket som et immunogen er autolog AP som har blitt modifisert ved å introdusere et enkelt eller noen få fremmede, immunodominante og promiskuose T-celleepitoper. Det beskrives også nukleinsyrevaksinering mot APP eller AP og i tillegg vaksinering ved anvendelse av levende vaksiner så vel som fremgangsmåter og midler som er anvendelige for vaksineringen. Slike fremgangsmåter og midler inkluderer fremgangsmåter for fremstilling av analoger og farmasøytiske preparater så vel som nukleinsyrefragmenter, vektorer, transformerte celler, polypeptider og farmasøytiske preparater.

OPPFINNELSENS OMRÅDE

Den foreliggende oppfinnelsen angår forbedringer i terapi og forebygging av Alzheimers sykdom (AD) og andre sykdommer som er kjennetegnet ved amyloid avleiring, for eksempel karakterisert gjennom amyloide avleiringer i det sentrale nervesystemet (CNS). Nærmere bestemt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen farmasøytisk sammensetning egnet for nedregulering av (uønsket) amyloide avleiringer ved å muliggjøre fremstillingen av antistoffer mot et relevant protein (APP eller A β) eller komponenter derav i individer som lider av eller som står i fare for å lide av sykdommer med en patologi som involverer amyloide avleiringer. Oppfinnelsen angår også en polyaminsyre eller konjugat utledet fra APP eller A β , samt en immunogen sammensetning omfattende nevnte polyaminsyre eller konjugat. Oppfinnelsen angår videre nukleinsyrefragmenter som koder for de modifiserte polypeptidene så vel som vektorer for inkorporering av disse nukleinsyrefragmentene og vertscellene og cellelinjene transformert dermed.

BAKGRUNN FOR OPPFINNELSEN

Amyloidose er de ekstracellulære avleiringene av uløselige proteinfibriller som medfører vevsskade og sykdom (Pepys, 1996; Tan et al., 1995; Kelly, 1996). Fibrillene dannes når normalt løselige proteiner og peptider assosierer med seg selv på en unormal måte (Kelly, 1997).

Amyloid er assosiert med alvorlige sykdommer inkludert systemisk amyloidose, AD, inntreden av voksen diabetes, Parkinsons sykdom, Huntingtons sykdom, frontotemporal demens og de prionrelaterte overførbare spongiforme encefalopatiene (kuru og Creutzfeldt-Jacobs sykdom i mennesker og skrapesyke og BSE i henholdsvis sau og kyr) og den amyloide plakkdannelsen i for eksempel Alzheimers synes å være nært assosiert med utviklingen av sykdom i mennesker. I dyremodeller har overekspresjon eller ekspresjon av modifiserte former av proteiner funnet i avleiringer, slik som det β -amyloide proteinet, vist å indusere en rekke forskjellige sykdomssymptomer, for eksempel symptomer som ligner på Alzheimers. Det finnes ingen spesifikk behandling for amyloid avleiring, og disse sykdommene er vanligvis dødelige.

Underenhetene av amyloide fibriller kan være villtype, variant eller forkortede proteiner, og lignende fibriller kan dannes in vitro fra oligopeptider og denaturerte proteiner (Bradbury et al., 1960; Filshie et al., 1964; Burke & Rougvie, 1972). Egenskapen til polypeptidkomponenten i fibrillene definerer egenskapen til amyloidosen. Til tross for store forskjeller i størrelse, naturlig struktur og funksjon av amyloide proteiner, er alle amyloide fibriller av ubestemmelig lengde, uforgrenet, 70 til 120 Å i diameter og viser karakteristisk farging med kongorødt

(Pepys, 1996). De er karakteristiske for en kryss- β -struktur (Pauling & Corey, 1951), hvori polypeptidkjeden er organisert i β -plater. Selv om de amyloide proteinene har svært forskjellige forløperstrukturer, kan de også gjennomgå en strukturell omdanning, kanskje langs en lignende reaksjonsvei, til en feilfoldet form som er byggesteinene i β -plate spiral protofilamentet.

De karakteristiske fibermønstrene førte til at amyloidosen kalles β -fibrillose (Glennner, 1980a, b) og fibrilproteinene til AD ble kalt β -protein før dets sekundære struktur var kjent (Glennner & Wong, 1984). Det karakteristiske kryss- β -diffraksjonsmønsteret sammen med fibrillutseende og fargeegenskaper, er nå de aksepterte diagnostiske kjennetegnene på amyloid, og foreslår at fibrillene, selv om disse er dannet fra ganske forskjellige proteinforløpere, deler en grad av strukturell likhet og omfatter en strukturell superfamilie, uavhengig av egenskapen til deres forløperproteiner (Sunde M, Serpell LC, Bartlam M, Fraser PE, Pepys MB, Blake CCFJ Mol Biol 1997 Oct 31; 273(3): 729-739).

En av de mest utbredte og velkjente sykdommene hvor amyloide avleiringer i sentralnervesystemet er foreslått å ha en sentral rolle i utviklingen av sykdom, er AD.

AD

Alzheimers sykdom (AD) er en irreversibel, progressiv hjernetilstand som opptrer gradvis og resulterer i hukommelsestap, atferds- og personlighetsforandringer, og en svekkelse av mentale evner. Disse tapene er relatert til hjernecelledød og nedbrytningen av forbindelsene mellom dem. Sykdomsforløpet varierer fra person til person og det gjør også hastigheten for tilbakegang. Gjennomsnittlig lever AD-pasienter i 8-10 år etter diagnosen, selv om sykdommen kan vare i inntil 20 år.

AD utvikler seg i stadier, fra tidlig, mild glemsomhet til alvorlig tap av mental funksjon. Dette tapet er kjent som demens. Hos de fleste mennesker med AD opptrer symptomene først etter 60 års alderen, men tidligere inntreden er ikke sjelden. De tidligste symptomene inkluderer ofte tap av korttidsminnet, feilaktig bedømmelsesevne og personlighetsforandringer. Mennesker med tidlige stadier av AD tenker ofte mindre klart og glemmer navn på familiemedlemmer og kjente objekter. Senere i sykdommen kan de glemme hvordan de skal utføre selv de enkleste oppgaver. Eventuelt taper mennesker med AD all resonnerende evne blir avhengige av andre mennesker for daglig omsorg. Til slutt blir sykdommen så svekkende at pasientene er sengeliggende og sannsynligvis utvikler andre lidelser og infeksjoner. Vanligvis dør mennesker med AD av lungebetennelse.

Selv om risikoen for å utvikle AD øker med alderen, er ikke AD og demenssymptomer en del av normal aldring. AD og andre demenstilstander er forårsaket av sykdommer som påvirker hjernen. I normal aldring tapes ikke

nerveceller i hjernen i større antall. I kontrast til dette, ødelegger AD tre nøkkelprosesser: Nervecellekommunikasjon, metabolisme og reparasjon. Denne ødeleggelsen forårsaker til slutt at mange nerveceller slutter å fungere, mister forbindelsen med andre nerveceller og dør.

- 5 Først ødelegger AD nevroner i deler av hjernen som kontrollerer hukommelsen, spesielt i hippocampus og beslektede strukturer. Ettersom nerveceller i hippocampus slutter å fungere tilstrekkelig, svikter korttidshukommelsen og ofte reduseres en persons evne til å utføre enkle og kjente oppgaver. AD angriper også den cerebrale cortex, spesielt området som er ansvarlig for språk og resonnering.
- 10 Omsider involveres mange andre områder av hjernen, alle disse hjerneområdene svinner (krymper), og AD-pasienten blir sengeliggende, inkontinent, totalt hjelpeløs og passiv i forhold til omverdenen (kilde: National Institute on Aging Progress Report on Alzheimer's Disease, 1999).

Virkingen av AD

- 15 AD er den vanligste årsaken til demens blant mennesker i alderen 65 år eller eldre. Den er et stort helseproblem på grunn av dens enorme påvirkning på individer, familier, helse- og omsorgssystemet og samfunnet som helhet. Forskere anslår at opp til 4 millioner mennesker lider for tiden av sykdommen, og den alminnelige utbredelsen dobles hvert 5. år etter 65 års alder. Det er også anslått at
- 20 tilnæringsvis 360000 nye tilfeller (forekomster) vil opptre hvert år, selv om dette antallet vil øke ettersom populasjonen eldes (Brookmeyer *et al.*, 1998).

- AD påfører samfunnet en tung økonomisk byrde. En nyere studie i USA beregnet den årlige kostnaden for omsorg av en AD-pasient til \$18400 for en pasient med mild AD, \$30096 for en pasient med moderat AD og \$36132 for en pasient med
- 25 alvorlig AD. De årlige nasjonale kostnadene for AD-pasientomsorg i USA er beregnet til litt over 50 milliarder dollar (Leon *et al.*, 1998).

- Tilnæringsvis 4 millioner amerikanere er 85 år eller eldre, og i de fleste industrialiserte land er denne aldersgruppen en av de raskest voksende segmenter av populasjonen. Det er anslått at denne gruppen vil være nær 8,5 millioner i år 2030 i
- 30 USA; enkelte eksperter som studerer populasjonstrender antar at antallet kan bli enda større. Ettersom flere og flere mennesker lever lengre, vil antallet mennesker som rammes av aldrings sykdommer, inkludert AD, fortsette å vokse. For eksempel viser enkelte studier at nær halvparten av alle mennesker som er 85 år eller eldre har en eller annen form for demens. (National Institute on Aging Progress Report on
- 35 Alzheimer's Disease, 1999).

De viktigste kjennetegnene ved AD

To unormale strukturer i hjernen er kjennetegnende for AD: Amyloide plakk og neurofibrillære floker ("neurofibrillary tangles", NFT). Plakk er tette, store uløselige avleiringer av protein og cellulært materiale på utsiden av og rundt

hjernens nevroner. Floker er uløselige sammenflettede fibre som bygges opp på innsiden av nevroner.

Det finnes to typer av AD: Familiær AD (FAD) som følger et visst arvelighetsmønster, og sporadisk AD hvor det ikke kan ses noe åpenbart arvelig mønster. På grunn av forskjeller i alderen ved inntreden, beskrives AD videre som

5 tidlig inntredende (opptrer i mennesker yngre enn 65 år gamle) eller sent inntredende (opptrer i de som er 65 år eller eldre). Tidlig inntredende AD er sjelden (omtrent 10% av tilfellene) og vanligvis påvirkes mennesker i fra 30 til 60-års alder. Noen former for tidlig inntredende AD er arvelig og opptrer i familier. Tidlig

10 inntredende AD utvikles ofte raskere enn den mer vanlige sent inntredende formen.

Alle FAD som er kjent så langt har en tidlig inntreden, og så mange som 50% av FAD-tilfellene er nå kjent å være forårsaket av defekter i tre gener som er lokalisert på tre forskjellige kromosomer. Disse er mutasjoner i APP-genet på kromosom 21; mutasjoner i et gen på kromosom 14, kalt presenilin 1; og mutasjoner i et gen på

15 kromosom 1, kalt presenilin 2. Det er imidlertid ennå ingen bevis for at noen av disse mutasjonene spiller en viktig rolle i den mer vanlige, sporadiske eller ikke-familiære formen av sent inntredende AD. (National Institute on Aging Progress Report on Alzheimer's Disease, 1999).

Amyloide plakk

20 I AD utvikles amyloide plakk først i områder av hjernen som anvendes for hukommelse og andre kognitive funksjoner. De består av store uløselige avleiringer av beta-amyloid (heretter kalt A β) - et proteinformet av et større protein kalt amyloid forløperprotein (APP, hvis aminosyresekvens er beskrevet i SEKV.ID. NR. 2) - blandet med deler av nevroner og med ikke-nerveceller slik som mikroglia og

25 astrocytter. Det er ikke kjent hvorvidt amyloide plakk i seg selv utgjør hovedårsaken til AD eller hvorvidt de er et biprodukt av AD-prosessen. Endringer i APP-proteinet kan virkelig forårsake AD som vist i den arvelige formen av AD forårsaket av mutasjoner i APP-genet og A β plakkdannelse synes å være nært assosiert med utviklingen av den humane sykdommen (Lippa C.F. *et al.*, 1998).

APP

APP er ett av flere proteiner som er assosiert med cellemembraner. Etter at det er fremstilt, blir APP forankret i nervecellenes membran, delvis på innsiden og delvis på utsiden av cellen. Nyere studier som anvender transgene mus viser at APP synes å spille en viktig rolle i veksten og overlevelsen av nevroner. Visse former og

35 mengder av APP kan for eksempel beskytte nevroner mot både kort- og langtidsskade og kan gjøre skadde nevroner bedre i stand til å reparere seg selv og hjelpe deler av nevronenes vekst etter hjerneskade.

Mens APP er forankret i cellemembranen, virker proteaser på spesifikke APP-seter og kløyver disse til proteinfragmenter. En protease kløyver APP og danner A β , og en annen protease kløyver APP på midten av det amyloide fragmentet slik at A β ikke dannes. Det dannede A β er av to forskjellige lengder, en kortere 40 (eller 41) aminosyrer A β som er relativt løselig og aggregerer langsomt, og en noe lengre, 42 aminosyrer "klebrig" A β , som raskt danner uløselige klumper. Mens A β dannes, er det ennå ikke kjent nøyaktig hvordan den beveges gjennom og rundt nerveceller. Det endelige stadiet av denne prosessen aggregerer det "klebrige" A β til lange filamenter på utsiden av cellen og, sammen med fragmenter av døde og døende nevroner og mikroglia og astrocytter, dannes plakk som er karakteristisk for AD i hjernevev.

Det eksisterer noe bevis for at mutasjonene i APP gjør det mer sannsynlig at A β vil bli klippet ut av APP-forløperen, og følgelig forårsake at det dannes mer av enten totalt A β eller forholdsvis mer av den "klebrige" formen. Det synes også som om mutasjoner i presenilingenene kan bidra til nedbrytningen av nevroner på i det minste to måter: Ved å modifisere A β -produksjonen eller ved å utløse celledøden mer direkte. Andre forskere foreslår at mutert presenilin 1 og 2 kan være involvert i økningen av hastigheten for apoptose.

Det forventes også at mer og mer plakk dannes og fyller mer og mer av hjernen ettersom sykdommen utvikler seg. Studier antyder at det kan være at A β aggregerer og disaggregerer samtidig, i en slags dynamisk likevekt. Dette gir et håp om at det kan være mulig å bryte ned plakk selv etter at de er annet. (National Institute on Aging Progress Report on Alzheimer's Disease, 1999).

Det er antatt at A β er toksisk for nevroner. I vevskulturstudier har forskere observert en økning i død av hippocampale nevronceller fremstilt for å overuttrykke muterte former av humant APP sammenlignet med nevroner som overuttrykker normalt humant APP (Luo *et al.*, 1999).

Videre har overekspresjon eller ekspresjonen av modifiserte former av A β -proteinet i dyremodeller vist å indusere Alzheimerslignende symptomer (Hsiao K. *et al.*, 1998).

Gitt at økt A β -dannelse, dets aggregering til plakk og resulterende nevrotoksisitet kan føre til AD, er det av terapeutisk interesse å undersøke betingelser hvorunder A β -aggregering til plakk kan gjøres tregere og til og med blokkeres.

Preseniliner

Mutasjoner i presenilin-1 (S-180) står for nesten 50% av alle tilfeller av tidlig inntredende familiær AD (FAD). Rundt 30 mutasjoner er blitt identifisert som gir opphav til AD. Inntreden av AD varierer med mutasjonene. Mutasjoner i presenilin-

2 står for en mye mindre del av FAD-tilfellene, men er fortsatt en signifikant faktor. Det er ikke kjent hvorvidt presenilinet er involvert i sporadisk ikke-familiær AD. Funksjonen av presenilin er ikke kjent, men de synes å være involvert i prosesseringen av APP, noe som gir A β -42 (den lengre og mer klebrige formen av peptidet, SEKV.ID. NR. 2, restene 673-714), ettersom AD-pasienter med presenilinmutasjoner har økte nivåer av dette peptidet. Det er uklart hvorvidt presenilinene også spiller en rolle i å forårsake dannelse av NFT'er. Noen foreslår at preseniliner også kan ha en mer direkte rolle i nedbrytningen av nevroner og nervedød. Presenilin-1 er lokalisert ved kromosom 14, mens presenilin-2 er bundet til kromosom 1. Dersom en person bærer en mutert versjon av kun ett av disse genene, vil han eller hun nesten helt sikkert utvikle tidlig inntredende AD.

Det er noe usikkert hvorvidt presenilin-1 er identisk med den hypotetiske gammasekretasen som er involvert i prosesseringen av APP (Naruse et al., 1998).

Apolipoprotein E

15 Apolipoprotein E er vanligvis assosiert med kolesterol, men finnes også i plakk og floker i AD-hjerner. Mens allelene 1-3 ikke synes å være involvert i AD, er det en signifikant korrelasjon mellom nærværet av APOE- ϵ 4-allelet og utviklingen av sen AD (Strittmatter et al., 1993). Det er imidlertid en risikofaktor og ikke en direkte årsak, hvilket er tilfellet for presenilinet og APP-mutasjonene og det er ikke begrenset til familiær AD.

Måtene som APOE ϵ 4-proteinet øker sannsynligheten for å utvikle AD er ikke med sikkerhet kjent, men en mulig teori er at det letter A β -oppbygging og at dette bidrar til å senke alderen for inntreden av AD, eller nærværet eller fraværet av spesifikke APOE-alleler kan påvirke den måten som nevronene reagerer på skaden på (Buttini et al., 1999).

Apo A1 har også blitt kjent for å være amyloidogent. Intakt apo A1 kan i seg selv danne amyloidlignende fibriller *in vitro* som er kongorødt-positive (Am J Pathol 147 (2): 238-244 (Aug 1995), Wisniewski T, Golabek AA, Kida E, Wisniewski KE, Frangione B).

30 Det synes å være enkelte motstridende resultater som indikerer at det er en positiv virkning av APOE- ϵ 4-allelet i reduksjonen av symptomer på mentalt tap sammenlignet med andre alleler (Stern, Brandt, 1997, Annals of Neurology 41).

Nevrofibrillære floker

35 Det andre kjennetegnet på AD består av unormale samlinger av tvunnede tråder funnet på innsiden av nerveceller. Hovedkomponenten er floker i form av et protein kalt tau (τ). I sentralnervesystemet er tauproteiner best kjent for sin evne til å binde og hjelpe til med å stabilisere mikrotubuler som en bestanddel av cellenes indre støttestruktur eller skjelett. Imidlertid endres tau i AD kjemisk og dette endrede tau

kan ikke lenger stabilisere mikrotubuler og forårsaker at de brytes ned. Denne kollapsen av transportsystemet kan først resultere i dårlig fungerende kommunikasjon mellom nerveceller og kan senere føre til nervedød.

5 I AD tvinner kjemisk endret tau seg til parede spiralformede filamenter - to tråder av tau som er tvunnet rundt hverandre. Disse filamentene er hovedsubstansen funnet i nevrofibrillære floker. I en nyere studie fant forskere nevrofibrillære endringer i færre enn 6% av nervene i en spesifikk del av hippocampus i friske hjerner, i mer enn 43% av disse nervene hos mennesker som døde med alvorlig AD. Når tapet av nerver ble studert, ble en lignende progresjon funnet. Bevis av denne typen støtter 10 tanken om at dannelsen av floker og tapet av nevroner utvikles sammen i løpet av AD-forløpet. (National Institute on Aging Progress Report on Alzheimer's Disease, 1999).

Tauopatier og floker

15 Flere neurodegenererende sykdommer, ved siden av AD, er kjennetegnet ved aggregeringen av tau i uløselige filamenter i nevroner og glia, noe som fører til funksjonssvikt og død. Svært nylig fant flere forskergrupper som studerte familier med flere arvelige demenser andre enn AD, den første mutasjonen i taugenet på kromosom 17 (Clark *et al.*, 1998; Hutton *et al.*, 1998; Poorkaj *et al.*, 1998; Spillantini *et al.*, 1998). I disse familiene forårsaket mutasjoner i taugenet 20 nervecelledød og demens. Disse lidelsene som deler noen av kjennetegnene med AD, men som er forskjellige i flere viktige aspekter, kalles samlet for "frontotemporal demens og parkinsonisme bundet til kromosom 17" (FTDP-17). Disse er sykdommer slik som Parkinsons sykdom, enkelte former for amyotrof lateral sklerose (ALS), kortikobasal degenerering, progressiv supranukleær 25 lammelse ("palsy") og Picks sykdom og alle er kjennetegnet ved unormal aggregering av tau-protein.

Andre AD-lignende neurologiske sykdommer.

30 Det finnes viktige paralleller mellom AD og andre neurologiske sykdommer inkludert prionsykdommer (slik som kuru, Creutzfeld-Jacob sykdom og storfe spongiform encefalitt), Parkinsons sykdom, Huntingtons sykdom og frontotemporal demens. Alle involverer avleiring av unormale proteiner i hjernen. AD og prionsykdommer forårsaker demens og død og begge er assosiert med dannelsen av uløselige amyloide fibriller, men fra membranproteiner som er forskjellige fra hverandre.

35 Forskere som studerer Parkinsons sykdom, den andre mest kjente neurodegenererende sykdommen etter AD, oppdaget det første genet forbundet med sykdommen. Dette genet koder for et protein som kalles synuklein som interessant nok er funnet i de amyloide plakkene i AD-pasienters hjerner (Lavedan C, 1998, Genome Res. 8(9): 871-80). Forskere har også oppdaget at genetiske defekter i

Huntingtons sykdom, andre progressive nevrodegenererende sykdommer som forårsaker demens, forårsaker at Huntingtonproteinet dannes i uløselige fibriller som ligner veldig A β -fibrillene i AD og proteinfibrillene i prionsykdom (Scherzinger E, *et al.*, 1999, PNAS U.S.A. 96(8): 4604-9).

- 5 Forskere har også oppdaget et nytt gen som, når det er mutert, er ansvarlig for familiær britisk demens (FBD), en sjelden arvelig sykdom som forårsaker alvorlige bevegelseslidelser og progressiv demens tilsvarende den som kan ses i AD. I en biokjemisk analyse av de amyloide fibrillene funnet i FBD-plakk, ble et unikt peptid kalt ABri funnet (Vidal *et al.*, 1999). En mutasjon ved et spesifikt punkt langs dette
10 genet resulterte i fremstillingen av et lengre enn normalt Bri-protein. ABri-peptidet som klippes fra den muterte enden av Bri-proteinet, avleires som amyloide fibriller. Disse plakkene er antatt å føre til den nervedysfunksjon og demens som kjennetegner FBD.

Immunisering med A β .

- 15 Immunsystemet vil normalt ta del i fjerningen av fremmed protein og proteinaktige partikler i organismen, men avleiringen som er assosiert med de ovenfor nevnte sykdommene består hovedsakelig av egen-proteiner, og gjør derfor immunsystemets rolle i kontrollen av disse sykdommene mindre åpenbar. Videre er avleiringene lokalisert i et område (CNS) som normalt er atskilt fra immunsystemet, og begge
20 faktum antyder at enhver vaksine eller immunterapeutisk tilnærming ikke vil være vellykket.

- Ikke desto mindre har forskere nylig forsøkt å immunisere mus med en vaksine som er sammensatt av heterologt humant A β og en forbindelse som er kjent for å stimulere immunsystemet (Schenk *et al.*, 1999 og WO 99/27944). Vaksinen ble
25 testet i en spesifikk transgen musemodell av AD med et humant mutert gen av APP innsatt i musens DNA. Musen fremstilte det modifiserte APP-proteinet og utviklet amyloide plakk ettersom de ble eldre. Denne musemodellen ble anvendt for å teste hvorvidt vaksinerings mot det modifiserte transgenet humane APP hadde en virkning på oppbygging av plakk. I et første eksperiment ble en gruppe transgene mus gitt
30 månedlige injeksjoner av vaksinen, som startet ved 6 ukers alder og sluttet ved 11 måneders alder. En andre gruppe transgene mus mottok ingen injeksjoner og tjente som en kontrollgruppe. Ved 13 måneders alder hadde musene i kontrollgruppen plakk som dekket 2-6% av hjernene deres. I motsetning til dette, hadde de immuniserte musene så å si ikke noe plakk.

- 35 I et andre eksperiment begynte forskerne injeksjonene ved 11 måneders alder når noe plakk allerede var utviklet. I løpet av en 7 måneders periode hadde de transgene kontrollmusene en 17 gangers økning i mengden av plakk i hjernene, mens de som mottok vaksinen hadde en 99% reduksjon sammenlignet med 18 måneder gamle transgene kontrollmus. I enkelte mus, synes noen av de på forhånd eksisterende

plakkavleiringene å ha blitt fjernet ved hjelp av behandlingen. Det ble også funnet at annen plakkassosiert skade slik som betennelse og unormale nervecelleprosesser avtok som et resultat av immuniseringen.

5 De ovenfor angitte resultatene er således en preliminær studie i mus og forskere trenger for eksempel å finne ut hvorvidt vaksinerte mus forblir friske i forhold til andre aspekter og hvorvidt hukommelsen til de vaksinerte musene forblir normal. Fordi musemodellen ikke er en fullstendig representasjon av AD (dyrene utvikler ikke nevrofibrillære floker, ei heller dør mange av deres nerver), er ytterligere studier nødvendig for videre å bestemme hvorvidt mennesker har lignende eller
10 forskjellig reaksjoner i forhold til mus. Et annet aspekt som betraktes er at fremgangsmåten kanskje kan "helbrede" amyloid avleiring, men ikke stopper utviklingen av demens.

Tekniske aspekter kan også tilveiebringe store utfordringer. For eksempel er det usannsynlig at det i det hele tatt er mulig å anvende denne teknologien og danne en
15 vaksine som gjør det mulig at mennesker frembringer antistoffer mot sine egne proteiner. Flere sikkerhets- og effektivitetsaspekter må derfor løses før noen tester på mennesker kan vurderes.

Arbeidet til Schenk *et al.* viser følgelig at dersom det var mulig å danne en sterk immunrespons mot sine egne proteiner i proteinaktige avleiringer i
20 sentralnervesystemet slik som plakkene dannet i AD, er det mulig å både forebygge dannelsen av avleiringene og også mulig å fjerne allerede dannede plakk.

Kliniske studier som anvender de ovenfor nevnte A β -vaksinene har nylig blitt avsluttet som følge av bivirkninger. Et antall vaksinerte individer utviklet kronisk encefalitt som kan skyldes en ukontrollert autoimmunitet mot A β i
25 sentralnervesystemet.

I den internasjonale patentsøknaden WO93/15760 beskrives et todelt immunogent bærerkonstrukt som er angitt å forsterke virkningen av aktiv immunisering i dyr og mennesker. Nærmere bestemt beskrives et todelt immunogent konstrukt omfattende i det minste en primærbærer omfattende et molekyl som har en molekylvekt større
30 enn 70 KD, og i det minste en sekundær bærer som omfatter et T-avhengig antigen konjugert til den primære bærer. Som eksempler på den primære bærere angis dekstran, fikoll, polyacrylamid, mikrobielle polysakkarider, og kombinasjoner derav. Som eksempel på sekundær bærer angis proteiner av virale, bakterielle, parasitt-, animalske og fungale proteiner.

35 I den internasjonale patentsøknaden WO93/23076 beskrives anvendelsen av konjugater anvendelig for induksjon av immunsystemet for produksjon av immunglobuliner som kan fungere som alternative reseptorer for en bestemt ligand, der konjugatet har en molekylvekt på minst 100 000 D og omfatter minst 20

antigene epitoper. Det er angitt at liganden f eks kan være et opiat, et benzodiazepin, et fencyclidin, kokain eller nicotin, et hormon, eller en vekstfaktor.

FORMÅL VED OPPFINNELSEN

5 Formålet ved den foreliggende oppfinnelsen er å tilveiebringe nye terapier mot tilstander som er kjennetegnet ved avleiring av amyloid slik som AD. Et ytterligere formål er å utvikle en autovaksine mot amyloid for å oppnå en ny behandling for AD og for andre patologiske tilstander som involverer amyloid avleiring.

SAMMENDRAG AV OPPFINNELSEN

10 Beskrevet heri er anvendelsen av en autovaksinerings-teknologi for å danne sterke immunresponser mot ellers ikke-immunogent APP og A β . Det beskrives også fremstillingen av slike vaksiner for forebyggingen, mulig helbredelse eller lindring av symptomene på slike sykdommer som er assosiert med amyloide avleiringer.

15 I dens bredeste og mest generelle betydning angår følgelig den foreliggende oppfinnelsen en farmasøytisk sammensetning inneholdende et immunogen som inducerer produksjon av antistoff mot dyrets autologe APP eller A β , hvori immunogenet inkorporerer

a) en polyaminosyre som består av en polyaminosyre valgt fra gruppen bestående av:

20 - aminosyrerester 1-12, som er en subsekvens av rester 672-714 av SEKV.ID. NR. 2, A β , etterfulgt av aminosyrerestene til tetanustoksoid-P30-epitopen, etterfulgt av aminosyrerestene til tetanustoksoid-P2-epitopen, etterfulgt av aminosyrerester 13-28, som er en subsekvens av rester 672-714 av SEKV.ID. NR. 2 A β ,

25 - aminosyrerester 1-12, som er en subsekvens av rester 672-714 av SEKV.ID. NR. 2, A β , etterfulgt av aminosyrerestene til tetanustoksoid-P30-epitopen, etterfulgt av aminosyrerester 1-12, som er en subsekvens av rester 672-714 av SEKV.ID. NR. 2, A β , etterfulgt av aminosyrerestene til tetanustoksoid-P2-epitopen, etterfulgt av aminosyrerester 1-12, som er en subsekvens av rester 672-714 av SEKV.ID. NR. 2, A β ,

30 - aminosyrerester 13-28, som er en subsekvens av rester 672-714 av SEKV.ID. NR. 2, A β , etterfulgt av aminosyrerestene til tetanustoksoid-P30-epitopen, etterfulgt av aminosyrerester 13-28, som er en subsekvens av rester 672-714 av SEKV.ID. NR. 2, A β , etterfulgt av aminosyrerestene til tetanustoksoid-P2-epitopen, etterfulgt av aminosyrerester 13-28, som er en subsekvens av rester
35 672-714 av SEKV.ID. NR. 2, A β ,

hvori alle aminosyresekvensene er angitt i retning fra N- til C-terminale ende, eller

- b) er et konjugat som omfatter en polyhydroksypolymerryggrad hvortil det separat er bundet en polyaminosyre som definert i a); eller
- c) er en nukleinsyre som koder for polyaminosyren som definert i a); eller
- 5 d) er en ikke-patogen mikroorganisme eller virus som bærer et nukleinsyrefragment som koder for og uttrykker polyaminosyren som definert i a),

for anvendelse i behandling, forebygging eller lindring av Alzheimers sykdom eller andre sykdommer kjennetegnet ved amyloid avleiring.

- 10 De foreliggende søkerne har tidligere innlevert en internasjonal patentsøknad rettet mot sikre vaksineringsstrategier mot amyloidogene polypeptider slik som APP og A β , jfr. WO 01/62284. Denne søknaden inneholder ikke detaljer angående de ovenfor nevnte anvendelige analogene av APP og A β .

- 15 Oppfinnelsen angår også analoger av APP og A β så vel som nukleinsyrefragmenter som koder for et undersett av disse. Også immunogene sammensetninger som omfatter analogene eller nukleinsyrefragmentene er en del av oppfinnelsen.

FIGURER

- Figur 1: Skjematisk bilde av Autovac-varianter utledet fra det amyloide forløperproteinet med det formål å danne antistoffresponser mot A β -proteinet A β -43 (eller C-100). APP er vist skjematisk ved toppen av figuren og de gjenværende skjematiske konstruktene viser at modellepitopene P2 og P30 er substituert eller innsatt i forskjellige trunkeringer av APP. I figuren indikerer det svarte mønsteret APP-signalsekvensen, toveis kryssmønster er den ekstracellulære delen av APP, mørkt vertikalt mønster er det transmembrane domenet av APP, lyse vertikale mønstre er det intracellulære domenet av APP, grovt kryssmønster indikerer P30-epitopen og fint kryssmønster indikerer P2-epitopen. Fullengdeboksen indikerer A β -42/43 og fullinjeboksen og boksen med stiplet linje indikerer til sammen C-100. "Abeta" angir A β .
- 20
- 25

- Figur 2: Skjematisk bilde av en utførelsesform av syntesen av generelt anvendelige immunogene konjugater. Peptid A (enhver antigensekvens, for eksempel en A β -sekvens beskrevet heri) og peptid B (en aminosyresekvens inkludert en fremmed T-hjelpeepitop) syntetiseres og blandes. Etter at de er brakt i kontakt med en egnet aktivert polyhydroksypolymer, bindes peptidene A og B via aktiveringsgruppen i et forhold som tilsvarer det innledende forholdet mellom disse to forbindelsene i peptidblandingen. Kfr eksempel 4 for detaljer.
- 30
- 35

DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

Definisjoner

I det følgende vil et antall uttrykk anvendt i den foreliggende beskrivelsen og krav defineres og forklares i detalj for å klargjøre grensene av oppfinnelsen.

- 5 Uttrykkene "amyloid" og "amyloid protein" som anvendes om hverandre heri, betegner en klasse av proteinaktige uforgrenede fibriller av ubestemmelig lengde. Amyloide fibriller viser karakteristisk farging med kongorødt og deler kryss- β -struktur hvori polypeptidkjeden er organisert i β -plater. Amyloid er generelt utledet fra amyloidogene proteiner som har svært forskjellige forløperstrukturer, men som
10 alle kan gjennomgå en strukturell omdanning til en galt foldet form som er byggesteinen i β -plate spiralprotofilamentet. Normalt varierer diameteren til de amyloide fibrillene mellom omtrent 70 til omtrent 120 Å.

- Uttrykket "amyloidogent protein" er ment å betegne et polypeptid som er involvert i dannelsen av amyloide avleiringer, enten som en del av avleiringene som sådan
15 eller ved å være en del av den biosyntetiske reaksjonsveien som fører til dannelsen av avleiringene. Eksempler på amyloidogene proteiner er derfor APP og A β , men også proteiner som er involvert i metabolismen til disse kan være amyloidogene proteiner.

- Et "amyloid polypeptid" er heri ment å betegne polypeptider som omfatter
20 aminosyresekvensen til de ovenfor diskuterte amyloidogene proteinene utledet fra mennesker eller fra andre pattedyr (eller forkortede varianter derav som deler en vesentlig mengde av B-celleepitoper med et intakt amyloidogent protein) - et amyloidogent polypeptid kan derfor for eksempel omfatte vesentlige deler av en forløper for det amyloidogene polypeptidet (i tilfellet av A β kan et mulig amyloid
25 polypeptid være APP-utledet). Også uglykosylerte former av amyloidogene polypeptider som er fremstilt i prokaryote systemer er inkludert innenfor rammene av uttrykket, og det er også former med ulike glykosyleringsmønstre som følge av for eksempel anvendelsen av gjær eller andre eukaryote ekspresjonssystemer som ikke stammer fra pattedyr. Det bør imidlertid bemerkes at når uttrykket "et
30 amyloidogent polypeptid" anvendes, er det ment at det aktuelle polypeptidet normalt er ikke-immunogent når det presenteres for dyret som behandles. Med andre ord er det amyloidogene polypeptidet et eget protein eller en analog av et slikt eget protein som normalt ikke gir opphav til en immunrespons mot det aktuelle amyloidogene polypeptidet i dyret.

- 35 En "analog" er et APP- eller A β -utledet molekyl som inkorporerer en eller flere endringer i sin molekylære struktur. En slik endring kan for eksempel være i form av en fusjon av APP- eller A β -polyaminsyrer til en egnet fusjonspartner (det vil si en endring i den primære strukturen som eksklusivt involverer C- og/eller N-

endetilsetninger av aminosyrerester) og/eller det kan være i form av innsettinger og/eller delesjoner og/eller substitusjoner i polypeptidets aminosyresekvens. Også

5 omfattet av uttrykket er derivatiserte APP- og A β -utledede molekyler, jfr. diskusjonen nedenfor vedrørende modifikasjoner av APP eller A β . I noen tilfeller kan analogen konstrueres slik at den i mindre grad er i stand til, eller til og med ikke kan, fremkalle antistoffer mot det eller de normale forløperproteinene av amyloidet, og dermed unngå uønsket innblanding med (fysiologisk normal) ikke-aggregert form av polypeptidet som er en forløper til det amyloide proteinet.

10 Det bør bemerkes at anvendelsen som en vaksine i et menneske av en xeno-analog (for eksempel en kanin- eller griseanalog) av et humant APP eller A β , kan tenkes å fremstille den ønskede immuniteten mot APP eller A β . Slik anvendelse av en xeno-analog for immunisering betraktes også som en del av oppfinnelsen.

15 Uttrykket "polypeptid" er i den foreliggende sammenhengen ment å bety både korte peptider med fra 2 til 10 aminosyrerester, oligopeptider med fra 11 til 100 aminosyrerester og polypeptider med mer enn 100 aminosyrerester. Videre er uttrykket også ment å inkludere proteiner, for eksempel funksjonelle biomolekyler som omfatter i det minste ett polypeptid; når det omfatter i det minste to polypeptider kan disse danne komplekser, være kovalent bundet eller kan være ikke-kovalent bundet. Polypeptidet eller polypeptidene i et protein kan være 20 glykosylerte og/eller lipiderte og/eller kan omfatte prostetiske grupper. Uttrykket "polyaminosyre" er også en ekvivalent til uttrykket "polypeptid".

25 Uttrykkene "T-lymfocytt" og "T-celle" anvendes om hverandre for lymfocytter av tymusopprinnelse som er ansvarlige for en rekke cellemedierte immunresponser så vel som for helperaktivitet i den humorale immunresponsen. På samme måte vil uttrykkene "B-lymfocytt" og "B-celle" anvendes om hverandre for antistoffproduserende lymfocytter.

30 Uttrykket "undersekvens" betyr enhver sammenhengende strekning av i det minste 3 aminosyrer eller, når det er relevant, av i det minste 3 nukleotider, utledet direkte fra henholdsvis en naturlig forekommende amyloid aminosyresekvens eller nukleinsyresekvens.

35 Uttrykket "dyr" er i den foreliggende sammenhengen generelt ment å betegne en dyreart (fortrinnsvis pattedyr) slik som *Homo sapiens*, *Canis domesticus* osv og ikke bare ett enkelt dyr. Imidlertid betyr uttrykket også en populasjon av en slik dyreart, ettersom det er viktig at alle individene som er immunisert i henhold til fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen alle bærer i alt vesentlig det samme APP eller A β som tillater immunisering av dyrene med det eller de samme immunogenene. Det vil være klart for fagfolk på området at et dyr i den foreliggende sammenhengen

er et levende vesen som har et immunsystem. Det er foretrukket at dyret er et virveldyr slik som et pattedyr.

Med uttrykket "*in vivo* nedregulering av APP eller A β " er det heri ment reduksjonen i den levende organismen av den totale mengden av avleiret amyloid protein (eller amyloid som sådan) av den relevante typen. Nedreguleringen kan oppnås ved hjelp av flere mekanismer: Av disse er den enkle innvirkningen med amyloid av antistoff som binder seg for så å forhindre feilaggregering den enkleste. Imidlertid er det også innenfor rammen av den foreliggende oppfinnelsen at antistoffbindingen resulterer i fjerningen av amyloid ved hjelp av "reoveringsceller" (slik som makrofager eller andre fagocytiske celler) og at antistoffene virker sammen med andre amyloidogene polypeptider som fører til amyloid dannelse. En ytterligere mulighet er at antistoffer binder A β på utsiden av CNS og dermed effektivt fjerner A β fra CNS via et enkelt massevirkningsprinsipp.

Uttrykket "påvirke presentasjonen ... for immunsystemet" er ment å betegne at dyrets immunsystem utsettes for en immunogen utfordring på en kontrollert måte. Som det tydelig vil fremgå av beskrivelsen nedenfor, kan en slik utfordring av immunsystemet effektueres på en rekke forskjellige måter, hvorav den viktigste er vaksinerings med polypeptid som inneholder "farmasiner" (det vil si en vaksine som administreres for å behandle eller lindre pågående sykdom) eller nukleinsyre-"farmasin"-vaksinerings. Det viktige resultatet som skal oppnås er at immunkompetente celler i dyret konfronteres med antigenet på en immunologisk effektiv måte, mens den nøyaktige måten for å oppnå dette resultatet er av mindre viktighet for den oppfinneriske idéen bak oppfinnelsen.

Uttrykket "immunogen effektiv mengde" har sin vanlige betydning i teknikken stand, det vil si en mengde av et immunogen som er i stand til å indusere en immunrespons som signifikant igangsetter patogene midler som deler immunologiske trekk med immunogenet.

Når uttrykket at APP eller A β har blitt "modifisert" som anvendt heri, menes det at en kjemisk modifikasjon av polypeptidet er blitt utført på APP eller A β . En slik modifikasjon kan for eksempel være derivatisering (for eksempel alkylering) av visse aminosyrerester i sekvensen, men som det tydelig vil fremgå av beskrivelsen nedenfor, omfatter de foretrukne modifikasjonene endringer av den primære strukturen til aminosyresekvensen.

Når "autotoleranse mot APP eller A β " diskuteres, skal det forstås at ettersom polypeptidet er et eget-protein i populasjonen som skal vaksineres, vil ikke normale individer i populasjonen fremkalle en immunrespons mot polypeptidet; det kan ikke ekskluderes selv om tilfeldige individer i en dyrepopulasjon kan være i stand til å fremstille antistoffer mot det naturlige polypeptidet, for eksempel som en del av en

autoimmun sykdom. Ved enhver hastighet vil et dyr normalt kun være autotolerant mot sitt eget APP eller A β , men det kan ikke utelukkes at analoger utledet fra andre dyrearter eller fra en populasjon med en ulik fenotype også vil kunne tolereres av nevnte dyr.

5 En "fremmed T-celleepitop" (eller: "fremmed T-lymfocyttepitop") er et peptid som er i stand til å binde seg til et MHC-molekyl og som stimulerer T-celler i en pattedyrart. Foretrukne fremmede T-celleepitoper ifølge oppfinnelsen er promiskuøse epitoper, det vil si epitoper som binder seg til en vesentlig fraksjon av en spesifikk klasse av MHC-molekyler i en dyreart eller populasjon. Kun et svært
10 begrenset antall av slike promiskuøse T-celleepitoper er kjent, og de vil bli diskutert i mer detalj nedenfor. Promiskuøse T-celleepitoper er også betegnet "universelle" T-celleepitoper. Det er å bemerke at for at immunogenene som anvendes ifølge den foreliggende oppfinnelsen skal være effektive i en så stor del av dyrepopulasjonen som mulig, kan det være nødvendig å 1) sette inn flere fremmede T-celleepitoper i
15 den samme analogen eller 2) fremstille flere analoger hvori hver analog har en forskjellig promiskuøs epitop satt inn. Det bør også bemerkes at konseptet med fremmede T-celleepitoper også omfatter anvendelsen av kryptiske T-celleepitoper, det vil si epitoper som er utledet fra et eget-protein og som kun fremkaller immunogen oppførsel når det eksisterer i isolert form uten å være en del av det
20 spesifikke eget-proteinet.

En "fremmed T-hjelpelymfocyttepitop" (en fremmed T_H-epitop) er en fremmed T-celleepitop som binder et MHC klasse II-molekyl som kan presenteres på overflaten av en antigenpresenterende celle (APC) bundet til MHC klasse II-molekylet.

En "funksjonell del" av et (bio)molekyl er i den foreliggende sammenhengen ment å
25 bety den delen av molekylet som er ansvarlig for i det minste en av de biokjemiske eller fysiologiske virkningene utøvet av molekylet. Det er velkjent for fagfolk at mange enzymer og andre effektormolekyler har et aktivt sete som er ansvarlig for virkningene utøvet av det aktuelle molekylet. Andre deler av molekylet kan tjene som et stabiliserende eller oppløselighetsforsterkende formål og kan derfor settes til
30 side dersom disse formålene ikke er relevante i sammenheng med en spesifikk utførelsesform av den foreliggende oppfinnelsen. For eksempel er det mulig å anvende visse cytokiner som en modifierende enhet i APP eller A β (jfr. den detaljerte beskrivelsen nedenfor), og i et slikt tilfelle kan stabilitetsaspektet være irrelevant ettersom koblingen til APP eller A β kan tilveiebringe den nødvendige
35 stabiliteten.

Uttrykket "adjuvans" har sin vanlige betydning i faget vaksineteknologi, det vil si en forbindelse eller en sammensetning som er 1) ikke i seg selv i stand til å fremkalle en spesifikk immunrespons mot immunogenet i vaksinen, men som er 2) ikke desto mindre i stand til å forsterke immunresponsen mot immunogenet. Eller

med andre ord, vaksinerings med adjuvansen alene tilveiebringer ikke en immunrespons mot immunogenet, vaksinerings med immunogenet kan eller behøver ikke gi opphav til en immunrespons mot immunogenet, men den kombinerte vaksinerings med immunogen og adjuvans induserer en immunrespons mot immunogenet som er sterkere enn den indusert av immunogenet alene.

"Målretting" av et molekyl er i den foreliggende sammenhengen ment å betegne den situasjonen hvor et molekyl ved introduksjon i dyret fortrinnsvis vil opptre i visse vev eller fortrinnsvis vil være assosiert med visse celler eller celletyper. Virkningen kan oppnås på flere måter, inkludert dannelsen av molekylet i sammensetning som letter målretting eller ved å introdusere grupper i molekylet som letter målretting. Dette emnet vil diskuteres i nærmere detalj nedenfor.

"Stimulering av immunsystemet" betyr at en forbindelse eller sammensetning utøver en generell ikke-spesifikk immunstimulerende virkning. En rekke adjuvanser og antatte adjuvanser (slik som visse cytokiner) deler evnen til å stimulere immunsystemet. Resultatet av å anvende et immunstimulerende middel er en økt "våkenhet" i immunsystemet, noe som betyr at samtidig eller påfølgende immunisering med et immunogen induserer en signifikant mer effektiv immunrespons sammenlignet med isolert anvendelse av immunogenet.

"Produktiv binding" betyr binding av et peptid til et MHC-molekyl (klasse I eller II) slik at det er i stand til å stimulere T-celler som kobles til en celle som presenterer peptidet som er bundet til MHC-molekylet. For eksempel sies det at et peptid som er bundet et MHC klasse II-molekyl på overflaten av en APC er produktivt bundet dersom denne APC vil stimulere en T_H-celle som binder seg til det presenterte peptid-MHC klasse II-komplekset.

25 Foretrukne utførelsesformer av amyloid nedregulering

Analogen som anvendes som et immunogen i anvendelsen av oppfinnelsen er et modifisert APP- eller A β -molekyl, hvori i det minste én endring er tilstede i aminosyresekvensen til APP eller A β , ettersom endringene for å oppnå den viktige brytingen av autotoleransen i stor grad lettes på denne måten - dette er for eksempel tydelig fra resultatene presentert i sammenlikningseksempel 2 heri, hvor immunisering med villtype A β er sammenlignet med immunisering med et A β -variantmolekyl. Det er blitt vist (i Dalum I *et al.*, 1996, J. Immunol. **157**: 4796-4804) at potensielt selvreaktive B-lymfocytter som gjenkjenner egen-proteiner er fysiologisk tilstede i normale individer. For at disse B-lymfocytene imidlertid skal induseres for faktisk å produsere antistoffer som er reaktive med de relevante egen-proteinene, trengs det assistanse fra cytokinproduserende T-hjelpelymfocytter (T_H-celler eller T_H-lymfocytter). Normalt tilveiebringes ikke denne hjelpen fordi T-lymfocytter generelt ikke gjenkjenner T-cellepitoper som er utledet fra egen-

proteiner når disse presenteres på antigenpresenterende celler (APC). Ved å tilveiebringe et element av "fremmedhet" i et eget-protein (det vil si ved å introdusere en immunologisk signifikant modifikasjon), vil imidlertid T-celler som gjenkjenner det fremmede elementet aktiveres ved å gjenkjenne den fremmede epitopen på et APC (slik som initialt en mononukleær celle). Polyklonale B-lymfocytter (som også er APC) som er i stand til å gjenkjenne egen-epitoper på det modifiserte egen-proteinet, internaliserer også antigenet og presenterer deretter den eller de fremmede T-celleepitopene derav, og de aktiverte T-lymfocytterne tilveiebringer deretter cytokinhjelp til disse selvreaktive polyklonale B-lymfocytterne. Ettersom antistoffene fremstilt av disse polyklonale B-lymfocytterne er reaktive med forskjellige epitoper på det modifiserte polypeptidet, inkludert de som også er tilstede i det naturlige polypeptidet, induseres et antistoff som er kryssreaktivt med det ikke-modifiserte egen-proteinet. For å sammenfatte dette, kan T-lymfocytterne ledes til å virke som om populasjonen av polyklonale B-lymfocytter har gjenkjent et totalt fremmed antigen, mens faktisk kun den eller de innskutte epitopene er fremmede for verten. På denne måten induseres antistoffer som er i stand til å kryssreagere med ikke-modifiserte egen-antigener.

Flere modifiseringsmåter for et peptid eget-antigen for å oppnå og bryte autotoleransen er kjent i teknikkens stand. Det er ikke desto mindre foretrukket at analogen i henhold til den foreliggende oppfinnelsen inkluderer

- i det minste en første enhet introduseres som gir målretting av det modifiserte molekylet mot en antigenpresenterende celle (APC), og/eller
- i det minste en andre enhet introduseres som stimulerer immunsystemet, og/eller
- i det minste en tredje enhet introduseres som optimaliserer presentasjonen av analogen for immunsystemet.

Alle disse modifikasjonene bør imidlertid utføres mens det opprettholdes en vesentlig del av de originale B-lymfocyttepitopene i APP eller A β , ettersom B-lymfocyttegjenkjenningen av det naturlige molekylet derved forsterkes.

I en foretrukket utførelsesform er sidegrupper (i form av fremmede T-celleepitoper eller de ovenfor nevnte første, andre og tredje enhetene) kovalent eller ikke-kovalent introdusert. Dette betyr at strekk av aminosyrerester utledet fra APP eller A β derivatiseres uten å endre den primære aminosyresekvensen, eller i det minste uten å introdusere endringer i peptidbindingene mellom de individuelle aminosyrene i kjeden.

En alternativ og foretrukket utførelsesform utnytter aminosyresubstitusjon og/eller delesjon og/eller innsetting og/eller tilsetning (som kan utføres ved rekombinante midler eller ved hjelp av peptidsyntese; modifikasjoner som involverer lengre strekk

av aminosyrer kan gi opphav til fusjonspolypeptider). En spesielt foretrukket versjon av denne utførelsesformen er teknikken beskrevet i WO 95/05849 som beskriver en fremgangsmåte for nedregulering av egen-proteiner ved immunisering med analoger av egen-proteinene, hvori et antall aminosyresekvenser er blitt

5 substituert med et korresponderende antall aminosyresekvenser som hver omfatter en fremmed immunodominant T-celleepitop mens samtidig den totale tertiære strukturen av egen-proteinet i analogen opprettholdes. For formålet i den foreliggende oppfinnelsen, er det imidlertid tilstrekkelig dersom modifikasjonen (det være seg en innsetting, tilsetting, delesjon eller substitusjon) gir opphav til en

10 fremmed T-celleepitop og samtidig bevarer et vesentlig antall av B-celleepitopene i APP eller A β . For å oppnå maksimal virkning av immunresponsen som induseres, er det imidlertid foretrukket at den totale tertiære strukturen til APP eller A β opprettholdes i det modifiserte molekylet.

I enkelte tilfeller er det foretrukket at APP eller A β eller fragmenter derav muteres.

15 Spesielt foretrukket er substitusjonsvarianter hvor metionin i posisjon 35 i A β -43 er blitt substituert, fortrinnsvis med leukin eller isoleukin eller ganske enkelt er deletert. Spesielt foretrukne analoger inneholder et enkelt metionin som er lokalisert i C-enden, enten fordi den er naturlig forekommende i det amyloidogene polypeptidet eller den fremmede T_H-epitopen, eller fordi den er satt inn eller tilsatt.

20 Følgelig er det også foretrukket at den delen av analogen som inkluderer den fremmede T_H-epitopen er fri for metionin, bortsett fra den mulige C-terminale plasseringen av et metionin.

Hovedgrunnen til å fjerne alle bortsett fra ett metionin, er at det blir mulig å rekombinant fremstille multimere analoger som deretter kan kløyves ved hjelp av

25 cyanogenbromid og etterlate den enkle analogen. Fordelen er at rekombinant fremstilling lettes på denne måten.

Faktisk er det vanligvis foretrukket at alle analoger av APP eller A β som anvendes deler kjennetegnet å kun inkludere ett enkelt metionin som er posisjonert som den C-terminale aminosyren i analogen og at andre metioniner i enten det amyloidogene

30 polypeptidet eller i den fremmede T_H-epitopen deleteres eller substitueres med en annen aminosyre.

En ytterligere interessant mutasjon er en delesjon eller substitusjon av fenylalaninet i posisjon 19 i A β -43, og det er spesielt foretrukket at mutasjonen er en substitusjon av denne fenylalaninresten med et prolin.

35 Andre interessante polyamino-syrer som kan anvendes i analogen er forkortede deler av A β -43-proteiner. Disse kan også anvendes i immunogene analoger i henhold til den foreliggende oppfinnelsen. Spesielt foretrukket er forkortingene A β (1-42), A β (1-40), A β (1-39), A β (1-35), A β (1-34), A β (1-34), A β (1-28), A β (1-12), A β (1-5),

A β (13-28), A β (13-35), A β (17-28), A β (25-35), A β (35-40), A β (36-42) og A β (35-42) (hvor antallet i parentesene indikerer aminosyrestrekkene av A β -43 som utgjør det relevante fragmentet - A β (35-40) er for eksempel identisk med aminosyrene 706-711 i SEKV.ID. NR. 2). Alle disse variantene med forkortede deler av A β -43 kan fremstilles med A β -fragmentene beskrevet heri, spesielt med variantene 9, 10, 11, 12 og 13 som nevnt i eksempel 1.

Den følgende formelen beskriver de molekylære konstruktene som generelt er dekket av oppfinnelsen:

$$(\text{MOD}_1)_{s_1}(\text{amyloid}_{e_1})_{n_1}(\text{MOD}_2)_{s_2}(\text{amyloid}_{e_2})_{n_2} \dots (\text{MOD}_x)_{s_x}(\text{amyloid}_{e_x})_{n_x} \quad (\text{I})$$

- hvor amyloid_{e1}-amyloid_{ex} er x B-cellepitoper som inneholder undersekvenser av APP eller A β som uavhengig av hverandre er identiske eller ikke-identiske og som kan inneholde eller kan ikke inneholde fremmede sidegrupper, x er et helt tall ≥ 3 , n₁-n_x er x tall ≥ 0 (minst en er ≥ 1), MOD₁-MOD_x er x modifikasjoner introdusert mellom de bevarte B-cellepitopene, og s₁-s_x er x hele tall ≥ 0 (minst en er ≥ 1 dersom ingen sidegrupper introduseres i amyloid_{ex}-sekvensene). Gitt den generelle funksjonelle bundethet av immunogenisiteten av konstruktene, tillater følgende oppfinnelsen alle typer av permutasjoner i den opprinnelige sekvensen til APP eller A β , og alle typer av modifikasjoner deri. Inkludert i oppfinnelsen er følgende modifisert APP eller A β oppnådd ved utelatelse av deler av sekvensen som for eksempel utviser bivirkninger *in vivo* eller utelater deler som normalt er intracellulære og som følgerlig kan gi opphav til uønskede immunologiske reaksjoner.

En foretrukket versjon av konstruktene angitt ovenfor er, når de er anvendelig, de hvor B-cellepitopen som inneholder undersekvenser av et amyloid protein ikke er ekstracellulært eksponert i forløperpolypeptidet hvorfra amyloidet er utledet. Ved å gjøre et slikt valg av epitoper, sikres det at det ikke dannes antistoffer som ville kunne være reaktive med cellene som fremstiller forløperen og derved begrense den dannede immunresponsen til en immunrespons mot de uønskede amyloide avleiringene. I dette tilfellet vil det for eksempel være nyttig å indusere immunitet mot epitoper i APP eller A β som kun er eksponert på den ekstracellulære fasen når de er fri fra enhver kobling til cellene som de er fremstilt fra.

Opprettholdelse av en vesentlig del av B-cellepitopene eller til og med den totale tertiære strukturen til et protein som utsettes for modifikasjon som beskrevet heri, kan oppnås på flere måter. En måte er ganske enkelt å fremstille et polyklont antiserum rettet mot polypeptidet av interesse (for eksempel et antiserum fremstilt i en kanin) og deretter anvende dette antiserumet som en testreagens (for eksempel i en kompetitiv ELISA) mot de modifiserte proteinene som fremstilles. Modifiserte versjoner (analoger) som reagerer i samme utstrekning med antiserumet som APP

eller A β , må betraktes å ha den samme totale tertiære strukturen som APP eller A β , mens analoger som har en begrenset (men fortsatt signifikant og spesifikk) reaktivitet med et slikt antiserum, betraktes å ha opprettholdt en vesentlig fraksjon av de originale B-celleepitopene.

- 5 Alternativt kan en seleksjon av monoklonale antistoffer som er reaktive med distinkte epitoper på APP eller A β fremstilles og anvendes i et testpanel. Denne tilnærmingen har den fordel at den tillater 1) en epitopkartlegging av APP eller A β og 2) en kartlegging av epitopene som opprettholdes i de fremstilte analogene.

- Selvfølgelig vil en tredje tilnærming være å oppløse den tredimensjonale strukturen til APP eller A β eller til et biologisk aktivt trunkat derav (se ovenfor) og sammenligne dette med den oppløste tredimensjonale strukturen til de fremstilte analogene. Tredimensjonal struktur kan oppløses ved hjelp av røntgendiffraksjonsstudier og NMR-spektroskopi. Ytterligere informasjon relatert til den tertiære strukturen kan i noen grad oppnås fra sirkulære dikroismestudier som har den fordel at kun polypeptidet i ren form er nødvendig (mens røntgendiffraksjon krever anskaffelsen av krystallisert polypeptid og NMR krever anskaffelse av isotope varianter av polypeptidet) for å tilveiebringe anvendelig informasjon om den tertiære strukturen i et gitt molekyl. Endelig er røntgendiffraksjon og/eller NMR imidlertid nødvendig for å oppnå endelige data, ettersom sirkulær dikroisme kun kan tilveiebringe indirekte bevis for korrekt tredimensjonal struktur via informasjon om sekundære strukturelementer.

- En foretrukket utførelsesform ifølge oppfinnelsen utnytter multiple presentasjoner av B-lymfocyttepitoper i APP eller A β (det vil si formel I hvori minst én B-celleepitop er tilstede i to posisjoner). Denne effekten kan oppnås på en rekke forskjellige måter, for eksempel ved ganske enkelt å fremstille fusjonspolypeptider som omfatter strukturen (APP eller A β utledet polypeptid)_m hvor m er et helt tall ≥ 2 og deretter introdusere modifikasjonene beskrevet heri i minst én av APP- eller A β -sekvensene. Det er foretrukket at de introduserte modifikasjonene inkluderer minst én duplikasjon av en B-lymfocyttepitop og/eller introduksjon av et hapten.
- 30 Disse utførelsesformene, inkludert multiple presentasjoner av utvalgte epitoper, er spesielt foretrukket i situasjoner hvor kun mindre deler av APP eller A β er anvendelige som bestanddeler i et vaksinemiddel.

- Som nevnt ovenfor, kan introduksjonen av en fremmed T-celleepitop oppnås ved å introdusere i det minste én aminosyreinnsetting, tilsetting, delesjon eller substitusjon. Selvfølgelig vil den normale situasjonen være introduksjonen av flere enn én endring i aminosyresekvensen (for eksempel innsetting eller substitusjon av en fullstendig T-celleepitop), men det viktige målet å nå er at analogen, når denne er fremstilt ved hjelp av en antigenpresenterende celle (APC) vil gi opphav til en slik fremmed immundominant T-celleepitop som presenteres i betydningen av et

MHC klasse II-molekyl på overflaten av APC. Dersom aminosyresekvensen av APP eller A β i passende posisjoner omfatter et antall aminosyrerester som også kan finnes i en fremmed T_H-epitop, kan følgelig introduksjonen av en fremmed T_H-epitop deretter oppnås ved å tilveiebringe de gjenværende aminosyrene av den fremmede epitopen ved hjelp av aminosyreinnsetting, tilsetning, delesjon og substitusjon. Med andre ord er det ikke nødvendig å introdusere en fullstendig T_H-epitop ved innsetting eller substitusjon for å tilfredsstille formålet ifølge den foreliggende oppfinnelsen.

Det er foretrukket at antallet aminosyreinnsetting, delesjoner, substitusjoner eller tilsetninger i det minste er 2, slik som 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 og 25 innsettinger, substitusjoner, tilsetninger eller delesjoner. Det er videre foretrukket at antallet aminosyreinnsettinger, substitusjoner, tilsetninger eller delesjoner ikke overskrider 150, slik som ikke flere enn 100, ikke flere enn 90, ikke flere enn 80 og ikke flere enn 70. Det er spesielt foretrukket at antallet substitusjoner, innsettinger, delesjoner og addisjoner ikke overskrider 60 og spesielt bør antallet ikke overskride 50 eller til og med 40. Mest foretrukket er et antall på ikke mer enn 30. Med hensyn til aminosyreaddisjoner, bør det bemerkes at disse, når det resulterende konstruktet er i form av et fusjonspolypeptid, ofte er betydelig høyere enn 150.

Foretrukne utførelsesformer ifølge oppfinnelsen inkluderer modifikasjoner ved introduksjon av i det minste én fremmed immunodominant T-celleepitop. Det skal forstås at spørsmålet om immunodominans av en T-celleepitop avhenger av dyrearten det gjelder. Som anvendt heri, henviser uttrykket "immunodominans" simpelthen til epitoper som i det vaksinerte individet/populasjonen gir opphav til en signifikant immunrespons, men det er et velkjent faktum at en T-celleepitop som er immunodominant i et individ/populasjon ikke nødvendigvis er immunodominant i et annet individ av den samme arten, selv om den er i stand til å binde MHC-II-molekyler i det sistnevnte individet. For formålet til den foreliggende oppfinnelsen, er følgelig en immunodominant T-celleepitop en T-celleepitop som effektivt vil tilveiebringe T-cellehjelp når det presenteres i et antigen. Typisk vil immundominante T-celleepitoper ha som et iboende trekk at de i alt vesentlig alltid vil bli presentert bundet til et MHC klasse II-molekyl, uavhengig av det polypeptidet som det opptrer i.

Et annet viktig punkt er aspektet ved MHC-restriksjon av T-celleepitoper. Generelt er naturlig forekommende T-celleepitoper MHC-begrensede, det vil si at visse peptider som utgjør en T-celleepitop vil kun effektivt binde seg til et undersett av MHC klasse II-molekyler. Dette igjen har den virkningen at i de fleste tilfellene vil anvendelsen av en spesifikk T-celleepitop resultere i en vaksinekomponent som bare er effektiv i en del av populasjonen, og avhengig av størrelsen av fraksjonen, kan det være nødvendig å inkludere flere T-celleepitoper i det samme molekylet,

eller alternativt fremstille en multikomponentvaksine hvori komponentene er varianter av APP eller A β som er forskjellige fra hverandre gjennom egenskapen til den introduserte T-cellepitopen.

- 5 Dersom MHC-restriksjon av T-cellene som anvendes er fullstendig ukjent (for eksempel i en situasjon hvor det vaksinerte dyret har en dårlig definert MHC-sammensetning), kan delen av populasjonen som dekkes av et spesifikt vaksinesammensetning være tilnærmet ved hjelp av den følgende formelen

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

- 10 hvor p_i er frekvensen i populasjonen av respondere hvor den i fremmede T-cellepitoper er tilstede i vaksinesammensetningen, og n er det totale antallet fremmede T-cellepitoper i vaksinesammensetningen. En vaksinesammensetning som inneholder 3 fremmede T-cellepitoper som har responsfrekvenser i populasjonen på henholdsvis 0,8, 0,7 og 0,6, vil følgelig gi

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

- 15 det vil si at 97,6 av populasjonen vil statistisk få en MHC-II-mediert respons på vaksinen.

- Den ovenfor angitte formelen gjelder ikke i situasjoner hvor en eller flere mindre nøyaktige MHC-restrisjonsmønstre av peptidene som anvendes er kjent. Dersom for eksempel et visst polypeptid kun binder de humane MHC-II-molekylene kodet for av HLA-DR-allelene DR1, DR3, DR5 og DR7, vil da anvendelsen av dette peptidet sammen med et annet peptid som binder de gjenværende MHC-II-molekylene kodet for av HLA-DR-allelene gi 100% dekning i populasjonen av interesse. På samme måte, dersom det andre peptidet kun binder DR3 og DR5, vil tilførselen av dette peptidet ikke øke dekningen i det hele tatt. Dersom man baserer
- 20 populasjonsresponsberegningene kun på MHC-restriksjon av T-cellepitoper i vaksinen, kan minimumsfraksjonen av populasjonen som dekkes av en spesifikk vaksinesammensetning bestemmes ved hjelp av den følgende formelen:

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

- 30 hvori φ_j er summen av frekvenser i populasjonen av alleliske haplotyper som koder for MHC-molekyler som binder et hvilket som helst av T-cellepitopene i vaksinen og som tilhører j av de 3 kjente HLA-loci (DP, DR og DQ); i praksis bestemmes det først hvilke MHC-molekyler som vil gjenkjenne hver T-cellepitop i vaksinen og deretter angis disse gjennom type (DP, DR og DQ) - deretter angis de individuelle

frekvensene av de forskjellige angitte alleliske haplotypene sammenfattet for hver type, og gir derved φ_1 , φ_2 og φ_3 .

Det kan skje at verdien p_i i formelen II overskrider den korresponderende teoretiske verdien π_i :

$$5 \quad n_i = 1 - \prod_{j=1}^3 (1 - \nu_j)^2 \quad (\text{IV})$$

10 hvori ν_j er summen av frekvensene i populasjonen av allelisk haplotype som koder for MHC-molekyler som binder i T-celleepitopen i vaksinen og som tilhører j av de 3 kjente HLA-loci (DP, DR og DQ). Dette betyr at $1 - \pi_i$ av populasjonen er en frekvens av respondere av $f_{\text{rest}_i} = (p_i - \pi_i) / (1 - \pi_i)$. Derfor kan formel III justeres slik at den gir formel V:

$$f_{\text{populasjon}} = 1 - \prod_{j=1}^3 (1 - \varphi_j)^2 + \left(1 - \prod_{i=1}^n (1 - f_{\text{rest}_i}) \right) \quad (\text{V})$$

hvor uttrykket $1 - f_{\text{rest}_i}$ settes til null dersom den er negativ. Det bør bemerkes at formel V krever at alle epitoper er haplotypkartlagt mot identiske sett av haplotyper.

15 Ved valg av T-celleepitoper som skal introduseres i analogen, er det derfor viktig å inkludere all kunnskap om epitopene som er tilgjengelig: 1) Frekvensen av respondere i populasjonen til hver epitop, 2) MHC-restriksjonsdata og 3) frekvens i populasjonen mot de relevante haplotypene.

20 Det finnes en rekke naturlig forekommende "promiskuøse" T-celleepitoper som er aktive i en større del av individene i en dyreart eller en dyrepopulasjon og disse introduseres fortrinnsvis i vaksinen for derved å redusere behovet for et svært stort antall forskjellige analoger i den samme vaksinen.

25 Den promiskuøse epitopen kan i henhold til oppfinnelsen være en naturlig forekommende human T-celleepitop slik som epitoper fra tetanus toksoid (for eksempel P2- og P30-epitopene), difteritoksoid, influensavirushemagglutinin (HA) og *P. falciparum* CS-antigen.

30 Opp gjennom årene er en rekke andre promiskuøse T-celleepitoper blitt identifisert. Spesielt har peptider som er i stand til å binde en større del av HLA-DR-molekyler som er kodet for av de ulike HLA-DR-allelene blitt identifisert, og disse er alle mulige T-celleepitoper som kan introduseres i analogene anvendt i henhold til den foreliggende oppfinnelsen. Jfr også epitopene diskutert i de følgende referanser: WO 98/23635 (Frazer IH *et al.*, tilegnet The University of Queensland); Southwood S. *et al.*, 1998, J. Immunol. **160**: 3363-3373; Sinigaglia F *et al.*, 1988, Nature **336**: 778-780; Chicz RM *et al.*, 1993, J. Exp. Med **178**: 27-47; Hammer J *et al.*, 1993,

Cell 74: 197-203; og Falk K *et al.*, 1994, Immunogenetics 39: 230-242. Den sistnevnte referansen angår også HLA-DQ og -DP-ligander. Alle epitoper som er angitt i disse 5 referansene er relevante som naturlige kandidatepitoper som kan anvendes i den foreliggende oppfinnelsen, så er også epitoper som deler felles motiver med disse.

Alternativt kan epitopen være en hvilken som helst kunstig T-celleepitop som er i stand til å binde en større del av MHC klasse II-molekyler. I denne sammenhengen er pan DR-epitoppeptidene ("PADRE") beskrevet i WO 95/07707 og i den korresponderende artikkelen Alexander J *et al.*, 1994, Immunity 1: 751-761 interessante kandidater som epitoper for anvendelse i henhold til den foreliggende oppfinnelsen. Det bør bemerkes at de mest effektive PADRE-peptidene beskrevet i disse publikasjonene bærer D-aminosyrer i C- og N-endene for å forbedre stabiliteten ved administrering. Imidlertid søker den foreliggende oppfinnelsen primært inkorporering av de relevante epitopene som del av analogen som deretter bør brytes ned enzymatisk på innsiden av de lysosomale delene av APC for å tillate påfølgende presentering i betydningen av et MHC-II-molekyl og er derfor ikke forventet å inkorporere D-aminosyrer i epitopene anvendt i den foreliggende oppfinnelsen.

Et spesielt foretrukket PADRE-peptid er det med aminosyresekvensen AKFVAAWTLKAAA (SEKV.ID. NR. 17) eller en immunologisk effektiv undersekvens derav. Denne og andre epitoper med den samme mangelen på MHC-restriksjon er foretrukne T-celleepitoper som bør være tilstede i analogen anvendt i den oppfinneriske fremgangsmåten. Slike superpromiskuøse epitoper vil tillate de enkleste utførelsesformene av oppfinnelsen hvori kun en enkelt analog er tilstede i det vaksinerte dyrets immunsystem.

Som nevnt ovenfor, kan modifikasjonen av APP og A β også inkludere introduksjon av en første enhet som målretter det modifiserte amyloidogene polypeptidet til en APC eller en B-lymfocyt. For eksempel kan den første enheten være en spesifikk bindingspartner for et B-lymfocyttspesifikt overflateantigen eller for et APC-spesifikt overflateantigen. Mange slike spesifikke overflateantigener er kjent i teknikkens stand. For eksempel kan enheten være et karbohydrat som det finnes en reseptor for på B-lymfocytten eller APC (for eksempel mannan eller mannose). Alternativt kan den andre enheten være et haptent. Et antistoffragment som spesifikt gjenkjenner et overflatemolekyl på APC eller lymfocytter kan også anvendes som en første enhet (overflatemolekylet kan for eksempel være en FC γ -reseptor for makrofager og monocytter, slik som FC γ RI eller alternativt enhver annen spesifikk overflatemarkør slik som CD40 eller CTLA-4). Det bør bemerkes at alle disse eksempelvis målrettingsmolekylene også kan anvendes som en del av en adjuvans, se nedenfor.

Som et alternativ eller supplement til målretting av analogen til en viss celletype for å oppnå en forsterket immunrespons, er det mulig å øke responsivitetensnivået til immunsystemet ved å inkludere den ovenfor nevnte andre enheten som stimulerer immunsystemet. Typiske eksempler på slike andre enheter er cytokiner og varmesjokkproteiner eller molekyllære chaperoner, så vel som effektive deler derav.

Egnede cytokiner som kan anvendes i henhold til oppfinnelsen er de som normalt også fungerer som adjuvanser i en vaksinesammensetning, det vil si for eksempel interferon- γ (IFN- γ), interleukin-1 (IL-1), interleukin-2 (IL-2), interleukin-4 (IL-4), interleukin-6 (IL-6), interleukin-12 (IL-12), interleukin-13 (IL-13), interleukin-15 (IL-15) og granulocyttnakrocyttstimulerende faktor (GM-CSF); alternativt kan den funksjonelle delen av cytokinmolekylet være tilstrekkelig som den andre enheten. Med hensyn til anvendelsen av slike cytokiner som adjuvanssubstanser, se diskusjonen nedenfor.

I henhold til oppfinnelsen, kan egnede varmesjokkproteiner eller molekyllære chaperoner anvendt som den andre enheten være HSP70, HSP90, HSC70, GRP94 (også kjent som gp96, kfr Wearsch PA *et al.*, 1998, *Biochemistry* **37**: 5709-19) og CRT (kalretikulin).

Alternativt kan den andre enheten være et toksin slik som listeriolysin (LLO), lipid A og varmelabilt enterotoksin. En rekke mykobakterielle derivater slik som MDP (muramyldipeptid), CFA (Freunds fullstendige adjuvans) og trehalosediestrene TDM og TDE kan også være interessante muligheter.

Muligheten for å introdusere en tredje enhet som forsterker presenteringen av analogen for immunsystemet er også en viktig utførelsesform av oppfinnelsen. Den kjente teknikken har vist flere eksempler på dette prinsippet. For eksempel er det kjent at palmitoyl lipideringsankeret i *Borrelia burgdorferi* protein OspA kan utnyttes for så å tilveiebringe selvadjuvanspolypeptider (kfr for eksempel WO 96/40718) - det synes som om de lipiderte proteinene danner micellelignende strukturer med en kjerne bestående av lipideringsankerdelen til polypeptidene og de gjenværende delene av molekylet som står ut av disse, og resulterer i flere presentasjoner av de antigene determinantene. Anvendelsen av disse og beslektede tilnærminger ved anvendelse av forskjellige lipideringsankere (for eksempel en myristylgruppe, en farnesylgruppe, en geranyl-geranylgruppe, et GPI-anker og en N-acyldiglyseridgruppe) er også foretrukne utførelsesformer av oppfinnelsen, spesielt ettersom anskaffelsen av et slikt lipideringsanker i et rekombinant fremstilt protein er ganske enkel og kun krever anvendelsen av en naturlig forekommende signalsekvens som en fusjonspartner for analogen. En annen mulighet er anvendelsen av C3d-fragmentet til komplementfaktor C3 eller C3 i seg selv (kfr Dempsey *et al.*, 1996, *Science* **271**, 348-350 og Lou & Kohler, 1998, *Nature Biotechnology* **16**, 458-462).

En alternativ utførelsesform av den foreliggende oppfinnelsen som også resulterer i den foretrukne presenteringen av flere (for eksempel minst 2) kopier av de viktigste epitopregionene til APP eller A β for immunsystemet, er den kovalente koblingen av analogen til visse molekyler, det vil si variantene d og e nevnt ovenfor. For

5 eksempel kan polymerer anvendes, for eksempel karbohydrater slik som dekstran, kfr for eksempel Lees A et al., 1994, Vaccine 12: 1160-1166; Lees A et al., 1990 J Immunol. 145: 3594-3600, men også mannose og mannan er anvendelige alternativer. Integrerte membranproteiner fra for eksempel E. coli og andre bakterier er også anvendelige konjugeringspartnere. De tradisjonelle bærer-molekylene slik

10 som "keyhole limpet" hemocyanin (KLH), tetanus toksoid, difteritoksoid og storfe serumalbumin (BSA) er også foretrukne og anvendelige konjugeringspartnere.

Foretrukne utførelsesformer av kovalent kobling av APP- eller A β -utledet materiale til polyhydroksypolymerer slik som karbohydrater, involverer anvendelsen av i det minste ett APP- eller A β -utledet peptid og i det minste én fremmed T-hjelpeepitop

15 som kobles separat til polyhydroksypolymeren (det vil si at den fremmede T-hjelpeepitopen og APP- og A β -utledet aminosyresekvens ikke er kondensert med hverandre, men er heller bundet til polyhydroksypolymeren som sådan tjener som en bærerryggrad). Igjen er en slik utførelsesform mest foretrukket når den egnede B-celleepitopen som bærer regioner av de APP- eller A β -utledede peptidene er

20 sammensatt av korte peptidstrekk - dette er fordi denne tilnærmingen er en svært egnet måte for å oppnå flere presentasjoner av valgte epitoper i det resulterende immunogene middelet. Det er imidlertid også mulig å enkelt koble analoger som allerede er beskrevet heri til polyhydroksypolymerryggraden, det vil si at det APP- eller A β -utledede materialet ikke er bundet til ryggraden separat fra de fremmede

25 T_H-epitopene.

Det er spesielt foretrukket at koblingen av den fremmede T-hjelpeepitopen og det APP- eller A β -utledede (poly)peptidet oppnås ved hjelp av en amidbinding som kan kløyves med en peptidase. Denne strategien har den virkningen av APC vil være i stand til å ta opp konjugatet og samtidig være i stand til å bearbeide konjugatet og

30 deretter presentere den fremmede T-celleepitopen i en MHC klasse II-sammenheng.

En måte for å oppnå kobling av peptider (både det APP- eller A β -utledede peptidet av interesse så vel som den fremmede epitopen), er å aktivere en egnet polyhydroksypolymer med tresyl (trifluoretylsulfonyl) grupper eller andre egnede aktiveringsgrupper slik som maleimid, p-nitrofenylklorformat (for aktivering av

35 OH-grupper og dannelse av en peptidbinding mellom peptid og polyhydroksypolymer), og tosyl (p-toluensulfonyl). Det er for eksempel mulig å fremstille aktiverte polysakkarider som beskrevet i WO 00/05316 og US 5,874,469 og koble disse til APP- eller A β -utledede peptider eller polyaminosyrer så vel som til T-celleepitopene fremstilt ved hjelp av konvensjonelle fast- eller flytende fase

- peptidsynteseteknikker. Det resulterende produktet består av en polyhydroksypolymerryggrad (for eksempel en dekstranryggrad) som har, bundet dertil ved hjelp av sin N-ende eller ved hjelp av andre tilgjengelige nitrogenenheter, polyaminsyrer utledet fra APP eller A β og fra fremmede T-celleepitoper. Om
- 5 ønskelig er det mulig å syntetisere APP- eller A β -peptidene slik at alle tilgjengelige aminogrupeer bortsett fra den enheten ved N-enden beskyttes, deretter koble de resulterende beskyttede peptidene til den tresylerte dekstranenheten og til slutt avbeskytte det resulterende konjugatet. Et spesifikt eksempel på denne tilnærmingen er beskrevet i eksemplene nedenfor.
- 10 I stedet for å anvende de vannløselige polysakkaridmolekylene som beskrevet i WO 00/05316 og i US 5,874,469, er det tilsvarende mulig å utnytte kryssbundne polysakkaridmolekyler og derved oppnå et spesifikt konjugat mellom polypeptider og polysakkarid - dette er antatt å føre til en forbedret presentering for
- 15 immunsystemet av polypeptidene, ettersom to mål nås, nemlig å oppnå en lokal avleiringsvirkning når konjugatet injiseres og for å oppnå partikler som er attraktive mål for APC. Tilnærmingen for anvendelse av slike spesifikke systemer er også beskrevet i detalj i eksemplene.

- Vurderinger som ligger til grunn for valgte områder for å introdusere modifikasjoner i APP eller A β er a) bevaring av kjente og antatte B-celleepitoper,
- 20 b) bevaring av tertiær struktur, c) unngåelse av B-celleepitoper tilstede på "produsentceller" osv. Ved enhver hastighet som diskutert ovenfor, er det ganske enkelt å analysere et sett av analoger som alle har blitt utsatt for introduksjon av en T-celleepitop på forskjellige steder.

- Ettersom de mest foretrukne utførelsesformene av den foreliggende oppfinnelsen
- 25 involverer nedregulering av humant A β , er det følgelig foretrukket at APP- eller A β -polypeptidet diskutert ovenfor er et humant A β -polypeptid. I denne utførelsesformen er det spesielt foretrukket at APP- eller A β -polypeptidet har blitt modifisert ved substituering av minst én aminosyresekvens i SEKV.ID. NR. 2 med i det minste én aminosyresekvens med lik eller forskjellig lengde og som inneholder
- 30 en fremmed T_H-epitop. Foretrukne eksempler på modifisert amyloidogent APP og A β er vist skjematisk i figur 1 ved anvendelse av P2- og P30-epitopene som eksempler. Den logiske forklaringen bak slike konstrukter er beskrevet i detalj i eksemplene.

- Mer spesifikt kan en T_H-inneholdende (eller fullstendig) aminosyresekvens som
- 35 introduseres i SEKV.ID. NR. 2 introduseres ved enhver aminosyre i SEKV.ID. NR. 2. Det vil si at introduksjonen er mulig etter enhver av aminosyrene 1-770, men fortrinnsvis etter enhver av aminosyrene 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712,

713 og 714 i SEKV.ID. NR. 2. Dette kan kombineres med delesjon av enhver eller alle av aminosyrene 1-671, eller enhver av alle av aminosyrene 715-770. Ved utnyttelse av substitusjonsteknikken, kan hver av aminosyrene 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 5 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713 og 714 i SEKV.ID. NR. 2 deleteres i kombinasjon med introduksjonen.

I følge den foreliggende oppfinnelsen er inkludert analogen ikke noen undersekvens av SEKV.ID. NR. 2 som binder seg produktivt til MHC klasse II- 10 molekyler og initierer en T-cellerespons.

Den logiske forklaringen bak en slik strategi for å konstruere immunogenet som setter i gang immunsystemet og induserer for eksempel en anti-A β -immunrespons, er følgende: Det har blitt oppdaget at når mengder av autologe proteiner immuniseres formulert i en adjuvans som er tilstrekkelig sterk til å bryte kroppens 15 toleranse overfor det autologe proteinet, er det en fare for at immunresponsen i enkelt vaksinerte individer ikke opphører ved bare å bryte immuniseringen. Dette er fordi den induserte immunresponsen i slike individer sannsynligvis drives av en naturlig T_H-epitop i det autologe proteinet, og dette har den bivirkningen av de vaksinerte individenes eget protein vil være i stand til å fungere som et 20 immuniseringsmiddel mot sine egne rette: En autoimmun tilstand har følgelig blitt etablert.

Anvendelsen av fremmede T_H-epitoper, har etter oppfinnernes kunnskaper aldri blitt observert å frembringe denne virkningen fordi anti-selvimmunresponsen er drevet av en fremmed T_H-epitop, og det har gjentatt blitt demonstrert av oppfinnerne at den 25 induserte immunresponsen fremkalt av den foretrukne teknologien faktisk synker etter avbryting av immuniseringen. Teoretisk burde det imidlertid skje i et fåtall individer at immunresponsen også vil drives ved hjelp av en autolog T_H-epitop (av det relevante selv-proteinet man immuniseres mot) - dette er spesielt relevant når man betrakter egen-proteiner som det rikelig av, slik som A β , mens andre 30 terapeutisk relevante egen-proteiner kun er tilstede lokalt eller i så lave mengder i kroppen at en "selvimmuniseringsvirkning" ikke er mulig. En svært enkel måte å unngå dette på, er følgelig å fullstendig unngå å inkludere peptidsekvenser i immunogenet som kunne tjene som T_H-epitoper (og ettersom peptider som er kortere enn omtrent 9 aminosyrer ikke kan tjene som T_H-epitoper, er anvendelsen av 35 kortere fragmenter en enkel og gjennomførbar tilnærming). Denne utførelsesformen av oppfinnelsen tjener derfor også til å sikre at immunogenet ikke inkluderer peptidsekvenser av målet APP eller A β som kunne tjenes som "selvstimulerende T_H-epitoper" inkludert sekvenser som kun inneholder konservative substitusjoner i en sekvens av målproteinet som ellers kan fungere som en T_H-epitop.

Foretrukne utførelsesformer av immunsystempresenteringen av analogene av APP eller A β involverer anvendelsen av et kimært peptid som omfatter i det minste ett APP- eller A β -utledet peptid som ikke produktivt binder seg til MHC klasse II-molekyler, og i det minste én fremmed T-hjelpeepitop. Det er spesielt fordelaktig dersom den immunogene analogen er en hvor aminosyresekvensene som omfatter en eller flere B-cellepitoper er representert enten som en kontinuerlig sekvens eller som en sekvens som inkluderer innskudd, hvori innskuddet omfatter fremmede T-hjelpepitoper.

Igjen er en slik utførelsesform mest foretrukket når den egnede B-cellepitopen som bærer regioner av APP eller A β består av korte peptidstrekk som ikke på noen måte ville være i stand til å binde seg produktivt til et MHC klasse II-molekyl. Den valgte B-cellepitopen eller -epitopene av det amyloidogene polypeptidet bør derfor omfatte i det minste 9 sammenhengende aminosyrer av SEKV.ID. NR. 2. Kortere peptider er fortrinnsvis slik som de som har minst 8, 7, 6, 5, 4 eller 3 sammenhengende aminosyrer fra det amyloidogene polypeptidets aminosyresekvens.

Det er foretrukket at analogen omfatter minst én undersekvens av SEKV.ID. NR. 2 slik at hver slik minst ene undersekvens består av aminosyrestrekk fra APP eller A β som er valgt fra gruppen bestående av 9 sammenhengende aminosyrer, 8 sammenhengende aminosyrer, 7 sammenhengende aminosyrer, 6 sammenhengende aminosyrer, 5 sammenhengende aminosyrer, 4 sammenhengende aminosyrer og 3 sammenhengende aminosyrer.

Det er spesielt foretrukket at de sammenhengende aminosyrene begynner ved en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av restene 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713 og 714 av SEKV.ID. NR. 2.

Protein/peptidvaksiner; formulering og administrering av analogene

Ved fremkallingen av presentering av analogen for et dyrs immunsystem ved hjelp av administrering av denne til dyret, følger formuleringen av polypeptidet de generelle prinsippene i kjent teknikk.

Fremstilling av vaksiner som inneholder peptidsekvenser som aktive ingredienser er generelt godt forstått i teknikkens stand som eksemplifisert gjennom U.S. patentene 4,608,251; 4,601,903; 4,599,231; 4,599,230; 4,596,792; og 4,578,770,. Slike vaksiner fremstilles vanligvis som injiserbare vaksiner, enten som flytende løsninger eller suspensjoner; faste former som er egnet for løsning i eller suspensjon i væske forut for injeksjon kan også fremstilles. Fremstillingen kan også være emulgert. Den aktive immunogene ingrediensen er ofte blandet med eksipienter som

er farmasøytisk akseptable og kompatible med den aktive ingrediensen. Egnede
 eksipienter er for eksempel vann, saltoppløsning, dekstrose, glyserol, etanol eller
 lignende og kombinasjoner derav. Om ønskelig kan vaksinen i tillegg inneholde
 mindre mengder av hjelpeforbindelser så som fuktemidler eller emulgeringsmidler,
 5 pH-buffermidler eller adjuvanser som øker effektiviteten til vaksinene; kfr den
 detaljerte beskrivelsen av adjuvanser nedenfor.

Vaksinene administreres vanligvis parenteralt ved hjelp av injeksjon, for eksempel
 enten subkutant, intrakutant eller intramuskulært. Ytterligere formuleringer som er
 egnet for andre administreringsmåter inkluderer stikkpiller og i noen tilfeller orale,
 10 bukale, sublinguale, intraperitoneale, intravaginale, anale, epidurale, spinale og
 intrakraniale formuleringer. For stikkpiller kan tradisjonelle bindemidler og bærere
 inkludere for eksempel polyalkalenglykoler eller triglyserider; slike stikkpiller kan
 dannes fra blandinger som inneholder den aktive ingrediensen i et område på 0,5%
 til 10%, fortrinnsvis 1-2%. Orale formuleringer inkluderer slike normalt anvendte
 15 eksipienter som for eksempel farmasøytiske kvaliteter av mannitol, laktose, stivelse,
 magnesiumstearat, natriumsakkarin, cellulose, magnesiumkarbonat og lignende.
 Disse sammensetningene tar form av løsninger, suspensjoner, tabletter, piller,
 kapsler, forsinket frigjøringsformuleringer eller pulvere og inneholder 10-95% av
 aktiv ingrediens, fortrinnsvis 25-70%. For orale formuleringer er koleratoksin en
 20 interessant formuleringspartner (og også en mulig konjugeringspartner).

Polypeptidene kan formuleres inn i vaksinen som nøytrale eller salte former.
 Farmasøytisk akseptable salter inkluderer syreaddisjonssalter (dannet med de frie
 aminogruppene i peptidet) og som dannes med uorganiske syrer som for eksempel
 saltsyre eller fosforsyre, eller slike organiske syrer som eddiksyre, oksalsyre,
 25 tartarsyre, mandelsyre og lignende. Salter dannet med de frie karboksylgruppene
 kan også utledes fra uorganiske baser slik som for eksempel natrium, kalium,
 ammonium, kalsium eller jernhydroksider, og slike organiske baser som
 isopropylamin, trimetylamin, 2-etylaminoetanol, histidin, prokain og lignende.

Vaksinene administreres på en måte som er kompatibel med doseringsformuleringen
 30 og i en slik mengde at den vil være terapeutisk effektiv og immunogen. Mengden
 som administreres avhenger av individet som behandles, inkludert for eksempel
 kapasiteten til individets immunsystem til å fremkalle en immunrespons og graden
 av beskyttelse som ønskes. Egnede doseringsområder er i størrelsesorden på flere
 hundre mikrogram av aktiv ingrediens pr vaksineringsdose med et foretrukket område fra
 35 omtrent 0,1 µg til 2000 µg (selv om enda høyere mengder i et område på 1-10 mg er
 omfattet), slik som i området fra omtrent 0,5 µg til 1000 µg, fortrinnsvis i området
 fra 1 µg til 500 µg og spesielt i området fra 10 µg til 100 µg. Egnede regimer for
 innledende administrering og påfølgende administrering varierer også, men et typisk
 eksempel er en innledende administrering fulgt av påfølgende inokuleringer og
 40 andre administreringer.

Anvendelsesmåten kan variere sterkt. Enhver av de konvensjonelle fremgangsmåtene for administrering av en vaksine er akseptable. Disse inkluderer oral applikasjon på en fast fysiologisk akseptabel base eller i en fysiologisk akseptabel dispersjon, parenteralt, ved injeksjon eller lignende. Doseringen av vaksinen vil avhenge av administreringsruten og vil variere i henhold til alderen til personen som skal vaksineres og formuleringen av antigenet.

Noen av polypeptidene i vaksinen er tilstrekkelig immunogene i en vaksine, men for noen av de andre vil immunresponsen forsterkes dersom vaksinen ytterligere omfatter en adjuvansforbindelse.

Ulike fremgangsmåter for å oppnå adjuvansvirkning for vaksinen er kjent. Generelle prinsipper og fremgangsmåter er detaljert beskrevet i "The Theory and Practical Application of Adjuvants", 1995, Duncan E.S. Stewart-Tull (red.), John Wiley & Sons Ltd, ISBN 0-471-95170-6, og også i "Vaccines: New Generation Immunological Adjuvants", 1995, Gregoriadis G *et al.* (red.), Plenum Press, New York, ISBN 0-306-45283-9.

Det er spesielt foretrukket å anvende en adjuvans som kan vises å lette brytingen av autotoleransen mot autoantigener; faktisk er dette essensielt i tilfeller hvor umodifisert amyloidogent polypeptid anvendes som den aktive ingrediensen i autovaksinen. Ikke-begrensede eksempler på egnede adjuvanser er valgt fra gruppen som består av en immunmålrettet adjuvans; en immunmodulerende adjuvans slik som et toksin, et cytokin og et mykobakterielt derivat; en oljeformulering; en polymer; en micelledannende adjuvans; et saponin; en immunstimulerende kompleksmatrise (ISCOM-matrise); en partikkel; DDA; aluminiumsadjuvanser; DNA-adjuvanser; γ -insulin; og et innkapslingsadjuvans. Generelt bør det bemerkes at beskrivelsene ovenfor som angår forbindelser og midler som er anvendelige som første, andre og tredje enheter i analogene også henviser *mutatis mutandis* til deres anvendelse i adjuvansen av en vaksine ifølge oppfinnelsen.

Applikasjonen av adjuvanser inkluderer anvendelse av midler slik som aluminiumhydroksid eller fosfat (alum), vanligvis anvendt som 0,05 til 0,1% løsning i bufret saltopløsning, blandet med syntetiske polymerer av sukker (for eksempel Carbopol®) anvendt som 0,25% løsning, aggregering av proteinet i vaksinen ved varmebehandling med temperaturer i området mellom 70°C og 110°C i henholdsvis 30 sekunders til 2 minutters perioder og også aggregering ved hjelp av kryssbindingsmidler er mulig. Aggregering ved reaktivering med pepsinbehandlede antistoffer (Fab-fragmenter) til albumin, blanding med bakterielle celler slik som *C. parvum* eller endotoksiner eller lipopolysakkaridkomponenter av gramnegative bakterier, emulsjon i fysiologisk akseptabel oljebærer slik som mannidmonooleat (Aracel A) eller emulsjon med 20% løsning av en perfluorkarbon (Fluosol-DA)

anvendt som et blokkeringssubstitut kan også anvendes. Blanding med oljer slik som skvalen og IFA er også foretrukket.

I henhold til oppfinnelsen er DDA (dimetyldioktadecylammoniumbromid) en interessant kandidat som en adjuvans slik som DNA og γ -inulin, men også Friends
 5 fullstendige og ufullstendige adjuvans så vel som *quillaja*-saponiner slik som QuilA og QS21 så vel som RIBI, er interessante. Ytterligere muligheter er monofosforyllipid A (MPL), det ovenfor nevnte C3 og C3d og muramyldipeptid (MDP).

10 Liposomformuleringer er også kjent å omfatte adjuvanseffekter, og liposomadjuvanser er derfor foretrukne i henhold til oppfinnelsen.

Også immunstimulerende kompleksmatrise type (ISCOM[®]-matrise) adjuvanser er foretrukne valg ifølge oppfinnelsen, spesielt ettersom det er blitt vist at denne typen av adjuvanser er i stand til å oppregulere en MHC klasse II-ekspressjon gjennom APC. En ISCOM[®]-matrise består av (eventuelt fraksjonert) saponiner
 15 (triterpenoider) fra *Quillaja saponaria*, kolesterol og fosfolipid. Ved blanding med det immunogene proteinet, blir den resulterende partikkelformuleringen det som er kjent som en ISCOM-partikkel hvor saponinet utgjør 60-70% vekt/vekt, kolesterol og fosfolipid 10-15% vekt/vekt og proteinet 10-15% vekt/vekt. Detaljer som omhandler sammensetningen og anvendelse av immunstimulerende komplekser kan
 20 for eksempel finnes i de ovenfor nevnte lærebøkene som omhandler adjuvanser, men også i Morein B *et al.*, 1995, Clin. Immunother. 3: 461-475 så vel som i Barr IG og Mitchell GF, 1996, Immunol. and Cell Biol. 74: 8-25 tilveiebringer anvendelige instruksjoner for fremstillingen av fullstendige immunstimulerende komplekser.

25 En annen svært interessant (og følgelig foretrukket) mulighet for å oppnå adjuvansvirkning er å anvende teknikken beskrevet i Gosselin *et al.*, 1992. Kort fortalt kan presenteringen av et relevant antigen slik som et antigen ifølge den foreliggende oppfinnelsen forsterkes ved konjugering av antigenet til antistoffer (eller antigenbindende antistoffragmenter) mot Fc γ -reseptorene på
 30 monocytter/makrofager. Spesielt konjugater mellom antigen og anti-Fc γ RI har blitt vist å forsterke immunogenisiteten for vaksineringsformål.

Andre muligheter involverer anvendelsen av målrettede og immunmodulerende forbindelser (blant annet cytokiner) nevnt ovenfor som kandidater for den første og den andre enheten i de modifiserte versjonene av amyloidogene polypeptider. I
 35 denne sammenhengen er også syntetiske induserende forbindelser av cytokiner slik som poly I:C også mulige.

Egnede mykobakterielle derivater er valgt fra gruppen bestående av muramyldipeptid, Freund's fullstendige adjuvans, RIBI og en diester av trehalose slik som TDM og TDE.

5 Egnede immunmålrettende adjuvanser er valgt fra gruppen bestående av CD40-ligand og CD40-antistoffer eller spesifikke bindende fragmenter derav (kfr diskusjonen ovenfor), mannose, et Fab-fragment og CTLA-4.

Egnede polymeradjuvanser er valgt fra gruppen bestående av karbohydrat så som dekstran, PEG, stivelse, mannan og mannose; en plastisk polymer slik som *; og lateks slik som latekskuler.

10 Enda en annen interessant måte å modulere en immunrespons på er å inkludere immunogenet (eventuelt sammen med adjuvanser og farmasøytisk akseptable bærere og vehikler) i en "kunstig lymfeknute" (VLN) (en merkevarebeskyttet anordning utviklet av ImmunoTherapy, Inc., 360 Lexington Avenue, New York, NY 10017-6501). VLN (en tynn røranordning) etterligner strukturen og funksjonen til
15 en lymfeknute. Innsetting av en VLN under huden danner et sete for steril inflammasjon med en økning av cytokiner og kjemokiner. T- og B-celler såvel som APC responderer raskt på faresignalene, kommer til betennelsessetet og akkumuleres på innsiden av den porøse matrisen til VLN. Det har blitt vist at den
20 nødvendige antigendosen som kreves for å fremkalle en immunrespons mot et antigen reduseres ved anvendelse av VLN og at immunbeskyttelse oppnådd ved vaksinerings ved anvendelse av VLN overgår konvensjonell immunisering ved anvendelse av Ribi som en adjuvans. Teknologien er blant annet kort beskrevet i Gelber C *et al.*, 1998, "Elicitation of Robust Cellular and Humoral Immune Responses to Small Amounts of Immunogens Using a Novel Medical Device Designated the Virtual Lymph Node", i: "From the Laboratory to the Clinic, Book of Abstracts, 12.-15. oktober 1998, Seascape Resort, Aptos, California".
25

Mikropartikkelformuleringer av vaksiner har i mange tilfeller blitt vist å øke immunogenisiteten til proteinantigener og er derfor en annen foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen. Mikropartikler dannes enten som samformuleringer
30 av antigen med en polymer, et lipid, et karbohydrat eller andre molekyler som er egnet for å danne partiklene, eller mikropartiklene kan være homogene partikler som kun består av antigenet i seg selv.

Eksempler på polymerbaserte mikropartikler er PLGA- og PVP-baserte partikler (Gupta, R.K. et al., 1998) hvor polymeren og antigenet kondenseres til en fast partikkel. Lipidbaserte partikler kan dannes som miceller av lipidet (såkalte liposomer) som fanger antigenet inne i micellen (Pietrobon, P.J. 1995).
35

Karbohydratbaserte partikler lages typisk av et egnet nedbrytbart karbohydrat slik som stivelse eller chitosan. Karbohydratet og antigenet blandes og kondenseres til

partikler i en prosess som ligner prosessen anvendt for polymerpartikler (Kas, H.S. et al. 1997).

Partikler som kun består av antigenet kan fremstilles ved hjelp av forskjellige spraye- og frysetørketeknikker. Spesielt egnet for formålet til den foreliggende oppfinnelsen, er den superkritiske væsketeknologien som anvendes for å fremstille svært enhetlige partikler med kontrollert størrelse (York, P. 1999 & Shekunov, B. et al. 1999).

Det er forventet at vaksinen bør administreres 1-6 ganger pr år, slik som 1, 2, 3, 4, 5 eller 6 ganger pr år til et individ med behov derav. Det har tidligere blitt vist at hukommelsesimmuniteten induisert ved anvendelse av de foretrukne autovaksinene i henhold til den foreliggende oppfinnelsen ikke er permanent, og immunsystemet trenger derfor periodisk utfordring med det amyloidogene polypeptidet eller de modifiserte amyloidogene polypeptidene.

Som følge av genetisk variasjon kan forskjellige individer reagere med immunresponser av varierende styrke mot det samme polypeptidet. Vaksinen ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan derfor omfatte flere forskjellige polypeptider for å øke immunresponsen, kfr også diskusjonen ovenfor om valget av fremmed T-celleepitopintroduksjoner. Vaksinen kan omfatte to eller flere polypeptider hvor alle polypeptidene er som definert ovenfor.

Vaksinen kan følgelig omfatte 3-20 forskjellige modifiserte eller umodifiserte polypeptider, slik som 3-10 forskjellige polypeptider.

Nukleinsyrevaksinering

Som et alternativ til klassisk administrering av en peptidbasert vaksine, tilbyr nukleinsyrevaksineringsteknologien (også kjent som "nukleinsyreimmunisering", "genetisk immunisering" og "genimmunisering") en rekke attraktive egenskaper.

For det første, i motsetning til den tradisjonelle vaksinetilnærmingen, krever nukleinsyrevaksinering ikke ressurskrevende storskala produksjon av det immunogene middelet (for eksempel i form av industriskala fermentering av mikroorganismer som produserer modifiserte amyloidogene polypeptider). Videre er det ikke noe behov for anordningsrensing og refoldingsskjemaer for immunogenet. Til slutt, ettersom nukleinsyrevaksinering avhenger av det biokjemiske apparatet til det vaksinerte individet for å fremstille det uttrykte produktet av nukleinsyren som er introdusert, forventes det at den optimale posttranslasjonelle bearbeidingen av ekspresjonsproduktet opptrer; dette er spesielt viktig i tilfellet av autovaksinering, ettersom, som nevnt ovenfor, en signifikant del av det originale B-celleepitopene bør bevares i det modifiserte molekylet, og ettersom B-celleepitopene i prinsippet kan utgjøres av deler av ethvert (bio)molekyl (for eksempel karbohydrat, lipid, protein osv). Naturlige glykosylerings- og

lipideringsmønstre i immunogenet kan derfor like godt være viktig for den totale immunogenisiteten og dette sikres best ved at verten produserer immunogenet.

En foretrukket utførelsesform av oppfinnelsens varianter a-c omfatter følgelig å
 5 effektuere presentasjon av analogen for immunsystemet ved å introdusere
 nukleinsyre(r) som koder for analogen i dyrets celler og derved oppnå *in vivo*
 ekspresjon ved hjelp av cellene der nukleinsyren eller nukleinsyrene er introdusert.

I denne utførelsesformen er den introduserte nukleinsyren fortrinnsvis DNA som
 kan være i form av nakent DNA, DNA formulert med ladete eller uladete lipider,
 DNA formulert i liposomer, DNA inkludert i en virusvektor, DNA formulert med et
 10 transfeksjonslettende protein eller polypeptid, DNA formulert med et målprotein
 eller polypeptid, DNA formulert med kalsiumutfellende midler, DNA koblet til et
 inert bæreremolekyl, DNA innkapslet i en polymer, for eksempel i PLGA (jfr.
 mikroinnkapslingsteknologien beskrevet i WO 98/31398) eller i kitin eller chitosan
 og DNA formulert med en adjuvans. I denne betydningen bemerkes det at praktisk
 15 talt alle betraktninger vedrørende anvendelsen av adjuvanser i tradisjonelle
 vaksineformuleringer gjelder for formuleringen av DNA-vaksiner. Beskrivelsene
 heri som angår anvendelsen av adjuvanser i betydningen av polypeptidbaserte
 vaksiner, gjelder følgelig *mutatis mutandis* for deres anvendelse i
 nukleinsyrevaksinerings teknologi.

20 Som for administreringsruter og administreringsskjemaer for polypeptidbaserte
 vaksiner som har blitt beskrevet i detalj ovenfor, er disse også anvendelige for
 nukleinsyrevaksiner ifølge oppfinnelsen og alle diskusjoner ovenfor vedrørende
 administreringsruter og administreringsskjemaer for polypeptider gjelder *mutatis*
mutandis for nukleinsyrer. Til dette bør det legges til at nukleinsyrevaksiner
 25 passende kan administreres intravenøst og intraarterielt. Videre er det velkjent for
 fagfolk på området at nukleinsyrevaksiner kan administreres ved anvendelse av
 såkalt "gengevær", og følgelig er også denne og tilsvarende administreringsmåter
 regnet som en del av den foreliggende oppfinnelsen. Til slutt har også anvendelsen
 av en VLN i administreringen av nukleinsyrer blitt rapportert å gi gode resultater og
 30 er derfor en spesielt foretrukket administreringsmåte.

Videre kan nukleinsyren eller nukleinsyrene anvendt som et immuniseringsmiddel
 inneholde regioner som koder for den første, andre og/eller tredje enheten, for
 eksempel i form av den immunmodulerende forbindelsen beskrevet ovenfor slik
 som cytokinene diskutert som anvendelige adjuvanser. En foretrukket versjon av
 35 denne utførelsesformen omfatter å ha den kodende regionen for analogen og den
 kodende regionen for immunomodulatoren i forskjellige leserammer eller i det
 minste under kontrollen av forskjellige promotorer. Derved unngås det at analogen
 eller epitopen fremstilles som en fusjonspartner til immunomodulatoren. Alternativt
 kan to atskilte nukleotidfragmenter anvendes, men dette er mindre foretrukket på

grunn av fordelene som sikrer samekspresjon når begge de kodende regionene er inkludert i det samme molekylet.

Oppfinnelsen angår følgelig også en sammensetning for å inducere fremstilling av antistoffer mot APP eller A β , hvor sammensetningen omfatter

- 5 - et nukleinsyrefragment eller en vektor ifølge oppfinnelsen (jfr. diskusjonen av vektorer nedenfor), og
- en farmasøytisk og immunologisk akseptabel vehikkel og/eller bærer og/eller adjuvans som beskrevet ovenfor.

10 Under normale forhold introduseres den variantkodende nukleinsyren i form av en vektor hvori ekspresjonen er under kontroll av en viruspromotor. For mer detaljert beskrivelse av vektorer i henhold til oppfinnelsen, se diskusjonen nedenfor.

Detaljerte beskrivelser angående formuleringen og anvendelsen av nukleinsyrevaksiner er også tilgjengelig, jfr. Donnelly JJ *et al.*, 1997, *Annu. Rev. Immunol.* **15**: 617-648 og Donnelly JJ *et al.*, 1997, *Life Sciences* **60**: 163-172.

15 Begge disse referansene er inkorporert ved referanse heri.

Levende vaksiner

Et tredje alternativ for å effektivere presentasjon av analogene som disse er definert i variantene a-c for immunsystemet, er anvendelsen av levende vaksineteknologi. I levende vaksiner er presentasjonen for immunsystemet ved

20 administrering til dyret en ikke-patogen mikroorganisme som er blitt transformert med et nukleinsyrefragment som koder for en analog eller med en vektor som inkorporerer et slikt nukleinsyrefragment. Den ikke-patogene mikroorganismen kan være enhver egnet svekket bakteriestamme (svekket ved hjelp av gjentatte

passeringer eller ved å fjerne patogene ekspresjonsprodukter ved rekombinant

25 DNA-teknologi), for eksempel *Mycobacterium bovis* BCG., ikke-patogen *Streptococcus* spp., *E. coli*, *Salmonella* spp., *Vibrio cholerae*, *Shigella* osv. Oversikter som angår fremstillingen av levende vaksiner i teknikkens stand i dag kan for eksempel finnes i Saliou P, 1995, *Rev. Prat.* **45**: 1492-1496 og Walker PD, 1992, *Vaccine* **10**: 977-990, begge inkorporert ved referanse heri.

30 For detaljer om nukleinsyrefragmenter og vektorer anvendt i slike levende vaksiner, se diskusjon nedenfor.

Som et alternativ til bakterielle levende vaksiner, kan nukleinsyrefragmentet ifølge oppfinnelsen som diskutert nedenfor inkorporeres i en ikke-virulent virusvaksinevektor slik en vacciniastamme eller ethvert annet egnet koppevirus.

35 Normalt administreres den ikke-patogene mikroorganismen eller virus kun en gang til dyret, men i visse tilfeller kan det være nødvendig å administrere mikroorganismen mer enn en gang i løpet av livet for å opprettholde beskyttende

immunitet. Det er til og med forventet at immuniseringskjemaene som de beskrevet ovenfor for polypeptidvaksinering vil være anvendelig ved anvendelse av levende eller virusvaksiner.

5 Alternativt kombineres levende eller virusvaksinering med tidligere eller påfølgende polypeptid- og/eller nukleinsyrevaksinering. For eksempel er det mulig å påvirke primær immunisering med en levende eller virusvaksine etterfulgt av påfølgende reimmunisering ved anvendelse av polypeptid- eller nukleinsyretilnærmingen.

10 Mikroorganismen eller viruset kan transformeres med nukleinsyren eller nukleinsyrene som inneholder regioner som koder for den første, andre og/eller tredje enheten, for eksempel i form av de immunmodulerende forbindelsene beskrevet ovenfor slik som cytokinene som er beskrevet som anvendelige adjuvaner. En foretrukket versjon av denne utførelsesformen omfatter å ha den kodende regionen for analogen og den kodende regionen for immunomodulatoren i 15 forskjellige leserammer eller i det minste under kontroll av forskjellige promotorer. Derved unngås det at analogen eller epitopene fremstilles som fusjonspartnere til immunomodulatoren. Alternativt kan to atskilte nukleotidfragmenter anvendes som transformasjonsmidler. Selvfølgelig kan man ved å ha den første og/eller andre og/eller tredje enheten i samme leseramme tilveiebringe som et ekspresjonsprodukt 20 en analog ifølge oppfinnelsen, og en slik utførelsesform er spesielt foretrukket ifølge den foreliggende oppfinnelsen.

Anvendelse av oppfinnelsen i sykdomsbehandling

Som det vil være tydelig fra beskrivelsen ovenfor, tillater tilveiebringelsen av oppfinnelsen kontroll av sykdommer som er kjennetegnet av amyloide avleiringer. I 25 denne sammenhengen er AD hovedmålet for den oppfinneriske fremgangsmåten, men også andre sykdommer som er kjennetegnet ved A β -innholdende amyloide avleiringer er mulige mål. En viktig mål for oppfinnelsen er følgelig å behandle og/eller forebytte og/eller lindre AD eller andre sykdommer som er kjennetegnet ved amyloid avleiring, omfattende nedregulering av APP eller A β i en slik grad at 30 mengden av amyloid signifikant reduseres.

Det er spesielt foretrukket at reduksjonen i amyloid resulterer i en inversjon i balansen mellom amyloid dannelse og amyloid nedbrytning/fjerning, det vil si at hastigheten av amyloid nedbrytning/fjerning bringes slik at den overstiger hastigheten for amyloid dannelse. Ved forsiktig å kontrollere antallet og 35 immunologisk påvirkning av immuniseringen i individet med behov for slik behandling, vil det være mulig å oppnå en balanse over tid som resulterer i en netto reduksjon av amyloide avleiringer uten overdrevne bivirkninger.

Alternativt, dersom det i et individ ikke er mulig å fjerne eller redusere eksisterende amyloide avleiringer, muliggjør oppfinnelsen en klinisk signifikant reduksjon i dannelsen av ny amyloid og derved signifikant forlenge det tidsrommet hvor sykdomstilstanden ikke er utarmende. Det bør være mulig å overvåke

5 avleiringshastigheten til amyloid ved enten å måle serumkonsentrasjonen av amyloid (som er antatt å være i likevekt med avleiret materiale) eller ved å anvende positron-emisjonstomografi (PET) skanning, jfr. Small GW, *et al.*, 1996, Ann N Y Acad Sci 802: 70-78.

Andre sykdommer og tilstander hvor de foreliggende midler og anvendelser kan

10 anvendes i behandling eller lindring på en lignende måte, er blitt nevnt ovenfor i "bakgrunn for oppfinnelsen" eller er angitt nedenfor i avsnittet "andre amyloidogene sykdommer og proteiner assosiert dermed".

Peptider, polypeptider og sammensetninger ifølge oppfinnelsen

Som det vil være tydelig fra beskrivelsen ovenfor, er den foreliggende oppfinnelsen

15 basert på konseptet å immunisere individer mot APP- eller A β -antigen for å oppnå en redusert mengde av patologirelaterte amyloide avleiringer. Den foretrukne måten å oppnå en slik immunisering på, er å anvende analogene beskrevet heri og derved tilveiebringe molekyler som ikke tidligere er blitt beskrevet i teknikkens stand.

Det er antatt at analogene diskutert heri er oppfinneriske i seg selv, og en viktig del

20 av oppfinnelsen gjelder derfor en analog som beskrevet ovenfor. Enhver beskrivelse presentert heri vedrører følgelig modifisert APP eller A β som er relevant for formålet å beskrive de amyloidogene analogene ifølge oppfinnelsen og enhver slik beskrivelse gjelder *mutatis mutandis* beskrivelsen av disse analogene.

Det bør bemerkes at foretrukne modifiserte APP- eller A β -molekyler omfatter

25 modifikasjoner som resulterer i et polypeptid med en sekvensidentitet på minst 70% med APP eller A β , eller med en undersekvens derav som er minst 10 aminosyrer lang. Høyere sekvensidentiteter er foretrukket, for eksempel minst 75% eller til og med minst 80, 85, 90 eller 95%. Sekvensidentiteten for proteinene og nukleinsyrene kan beregnes som $(N_{ref} - N_{dif}) \cdot 100 / N_{ref}$, hvor N_{dif} er det totale antallet ikke-identiske rester i det to sekvensene når disse er sammenstilt og hvori N_{ref} er antallet rester i en av sekvensene. DNA-sekvensen AGTCAGTC vil følgelig ha en sekvensidentitet på

30 75% med sekvensen AATCAATC ($N_{dif} = 2$ og $N_{ref} = 8$).

Oppfinnelsen omfatter også sammensetninger som er anvendelige for å utøve fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen. Følgelig angår oppfinnelsen også

35 immunogent sammensetning som omfatter en immunogen effektiv mengde av en analog som beskrevet ovenfor, nevnte sammensetning omfatter ytterligere et farmasøytisk og immunogent akseptabelt fortynningsmiddel og/eller vehikkel og/eller bærer og/eller eksipient og eventuelt en adjuvans. Med andre ord angår

denne delen av oppfinnelsen formuleringer av analoger, hovedsakelig som beskrevet ovenfor. Valget av adjuvanser, bærere og vehikler er i henhold til det som er beskrevet ovenfor ved henvisning til formulering av modifisert og umodifisert amyloidogent polypeptid for anvendelse i den oppfinneriske fremgangsmåten for nedregulering av APP eller A β .

Polypeptidene er fremstilt i henhold til fremgangsmåter som er velkjente for fagfolk. Lengre polypeptider fremstilles normalt ved hjelp av rekombinant genteknologi, inkludert å introdusere en nukleinsyresekvens som koder for analogen i en egnet vektor, transformering av en egnet vertscelle med vektoren, ekspresjon av nukleinsyresekvensen ved hjelp av vertscellen, gjenvinning av det uttrykte produktet fra vertscellene og deres kultursupernatant og påfølgende rensing og eventuelt ytterligere modifikasjon, for eksempel refolding eller derivatisering.

Andre peptider fremstilles fortrinnsvis ved hjelp av velkjente teknikker for fast- eller flytende fase peptidsyntese. Nyere fremskritt i denne teknologien har imidlertid gjort det mulig å fremstille fullengde polypeptider og proteiner ved hjelp av disse midlene, og disse er derfor også innenfor rammen av den foreliggende oppfinnelsen for fremstilling av lengre konstrukter ved hjelp av syntetiske midler.

Nukleinsyrefragmenter og vektorer ifølge oppfinnelsen

Det skal forstås fra den ovennevnte diskusjonen av polyaminoesyreanaloger kan fremstilles ved hjelp av rekombinant genteknologi, men også ved hjelp av kjemisk syntese eller semisyntese; sistnevnte to alternativer er spesielt relevant når modifikasjonen består av kobling av to proteinbærere (slik som KLH, difteritoksoid, tetanustoksoid og BSA) og ikke-proteinaktige molekyler slik som karbohydratpolymerer og selvfølgelig også når modifikasjonen omfatter tilsetning av sidekjeder eller sidegrupper på en APP- eller A β -utledet peptidkjede.

For formålet av rekombinant genteknologi og selvfølgelig også for formålet av nukleinsyreimmunisering, er nukleinsyrefragmenter som koder for analoger viktige kjemiske produkter. En viktig del av oppfinnelsen vedrører følgende et nukleinsyrefragment som koder for en analog ifølge oppfinnelsen, det vil si et APP- eller A β -utledet polypeptid som enten omfatter den naturlige sekvensen hvortil det er blitt tilsatt eller innsatt en fusjonspartner eller fortrinnsvis et APP- eller A β -utledet polypeptid hvori det er blitt innsatt en fremmed T-cellepitop ved hjelp av innsetting og/eller tilsetning, fortrinnsvis ved hjelp av substitusjon og/eller delesjon. Nukleinsyrefragmentene ifølge oppfinnelsen er enten DNA- eller RNA-fragmenter.

Nukleinsyrefragmentene ifølge oppfinnelsen vil normalt settes inn i egnede vektorer for å danne klonings- eller ekspresjonsvektorer som bærer nukleinsyrefragmentene ifølge oppfinnelsen; slike nye vektorer er også en del av oppfinnelsen. Detaljer angående konstruksjonen av disse vektorene ifølge oppfinnelsen vil bli diskutert i

sammenheng med transformerte celler og mikroorganismer nedenfor. Vektoren kan, avhengig av formålet og typen applikasjon, være i form av plasmider, fag, kosmider, minikromosomer eller virus, men også nakent DNA som kun forbigående uttrykkes i celler som en viktig vektor. Foretrukne klonings- og ekspresjonsvektorer ifølge oppfinnelsen er i stand til å replikere autonomt og derved muliggjøre høye kopiantall for høynivåekspresjons- eller høynivåreplikasjonsformål for påfølgende kloning.

Den generelle konturen til en vektor ifølge oppfinnelsen omfatter de følgende trekk i 5'→3'-retningen og er operativt bundet til: En promotor for å drive ekspresjon av nukleinsyrefragmentet ifølge oppfinnelsen, eventuelt en nukleinsyresekvens som koder for et lederpeptid som muliggjør sekresjon (til den ekstracellulære fasen eller, når det er anvendelig, inn i periplasma) eller integrering av polypeptidfragmentet inn i membranen, nukleinsyrefragmentet ifølge oppfinnelsen og eventuelt en nukleinsyresekvens som koder for et termineringssignal. Når man opererer med ekspresjonsvektorer i produksjonsstammer eller cellelinjer, er det foretrukket for formålet av genetisk stabilitet i de transformerte cellene at vektoren når den introduseres i en vertscelle, integreres i vertscellens genom. I motsetning til dette, er det av sikkerhetsgrunner foretrukket at vektoren er i stand til å bli integrert i vertscellens genom når man arbeider med vektorer som skal effektuere *in vivo* ekspresjon i et dyr (det vil si når vektoren anvendes i DNA-vaksinering); typisk anvendes nakent DNA eller ikke-integrerende virusvektorer, og hvor valgene er velkjente for fagfolk på området.

Vektorene ifølge oppfinnelsen anvendes for å transformere vertsceller for å fremstille analogen ifølge oppfinnelsen. Slike transformerte celler som også er en del av oppfinnelsen, kan være dyrkede celler eller cellelinjer anvendt for oppformering av nukleinsyrefragmentene og vektorene ifølge oppfinnelsen, eller kan anvendes for rekombinant fremstilling av analogene ifølge oppfinnelsen. Alternativt kan de transformerte cellene være egnede levende vaksinstammer hvori nukleinsyrefragmentet (en enkelt eller flere kopier) har blitt satt inn slik at sekresjon eller integrasjon av analogen i bakteriemembranen eller celleveggen effektueres.

Foretrukne transformerte celler ifølge oppfinnelsen er mikroorganismer slik som bakterier (slik som artene *Escherichia* (for eksempel *E. coli*), *Bacillus* (for eksempel *Bacillus subtilis*), *Salmonella* eller *Mycobacterium* (fortrinnsvis ikke-patogene, for eksempel *M. bovis* BCG), gjær (slik som *Saccharomyces cerevisiae*) og protozoaner. Alternativt er de transformerte cellene utledet fra en multicellulær organisme slik som sopp, en insektcelle, en plantecelle eller en pattedyrceelle. Mer foretrukket er cellene utledet fra et menneske, jfr. diskusjonen om cellelinjer og vektorer nedenfor. Nyere resultater gir håp om anvendelsen av en kommersielt tilgjengelig *Drosophila melanogaster*-cellelinje (Schneider 2 (S₂) cellelinjen og

vektorsystemet tilgjengelig fra Invitrogen) for den rekombinante fremstillingen av polypeptidene i oppfinnernes laboratorium og dette ekspresjonssystemet er derfor spesielt foretrukket.

5 For klonings- og/eller optimalisert ekspresjonsformål, er det foretrukket at den transformerte cellen er i stand til å replikere nukleinsyrefragmentet ifølge oppfinnelsen. Celler som uttrykker nukleinsyrefragmentet er foretrukne anvendelige utførelsesformer ifølge oppfinnelsen; de kan anvendes for småskala og storskala fremstilling av analogen ifølge oppfinnelsen eller, i tilfellet av ikke-patogene bakterier, som vaksinebestanddel i en levende vaksine.

10 Når analogen ifølge oppfinnelsen fremstilles ved hjelp av transformerte celler, er det passende selv om det langt fra er essensielt, at ekspresjonsproduktet enten eksporteres ut i kulturmediet eller bæres på overflaten av den transformerte cellen.

15 Når en effektiv produksjonscelle er blitt identifisert, er det foretrukket på grunnlag derav, å etablere en stabil cellelinje som bærer vektoren ifølge oppfinnelsen og som uttrykker nukleinsyrefragmentet som koder for det modifiserte amyloidogene polypeptidet. Fortrinnsvis utskiller eller bærer cellelinjen analogen ifølge oppfinnelsen, for derved å lette rensingen derav.

20 Generelt anvendes plasmidvektorer som inneholder replikasjonsorigo og kontrollsekvenser som er utledet fra arter som er kompatible med vertscellene i sammenheng med vertene. Vektoren bærer vanligvis et replikasjonssete så vel som markørsekvenser som er i stand til å tilveiebringe fenotypisk seleksjon i transformerte celler. For eksempel er *E. coli* vanligvis transformert ved anvendelse av pBR322, et plasmid utledet fra en *E. coli*-art (se for eksempel Bolivar *et al.*, 1977). pBR322-plasmidet inneholder gener for ampicillin- og tetrasyklinresistens og tilveiebringer følgelig enkle midler for å identifisere transformerte celler. pBR-
25 plasmidet eller andre mikrobielle plasmider eller fag må også inneholde eller være modifisert slik at de inneholder promotorer som kan anvendes av den prokaryote mikroorganismen for ekspresjon.

30 Disse promotorene som vanligvis er anvendt i rekombinant DNA-konstruksjon inkluderer B-laktamase (penicillinase) og laktosepromotorsystemene (Chang *et al.*, 1978; Itakura *et al.*, 1977; Goeddel *et al.*, 1979) og et tryptofan-(trp)-promotorsystem (Goeddel *et al.*, 1979; EP-A-0 036 776). Mens disse er de mest brukte, har andre mikrobielle promotorer blitt oppdaget og utnyttet og detaljer angående deres nukleotidsekvenser er blitt publisert, noe som muliggjør at fagfolk
35 kan ligere dem funksjonelt med plasmidvektorer (Siebwenlist *et al.*, 1980). Visse gener fra prokaryoter kan uttrykkes effektivt i *E. coli* fra sine egne promotorsekvenser, hvilket utelukker behovet for tilførsel av andre promotorer ved kunstige midler.

I tillegg til prokaryoter kan eukaryote mikrober slik som gjærkulturer også anvendes, og her bør promotoren være i stand til å drive ekspresjon. *Saccharomyces cerevisiae* eller vanlig bakegjær er den mest vanlig anvendte blant eukaryote mikroorganismer, selv om en rekke andre stammer er allment tilgjengelige. For ekspresjon i *Saccharomyces*, er plasmidet YRp7 for eksempel vanlig anvendt (Stinchcomb *et al.*, 1979; Kingsman *et al.*, 1979; Tschemper *et al.*, 1980). Dette plasmidet inneholder allerede *trp1*-genet som tilveiebringer en seleksjonsmarkør for en mutant stamme av gjær som mangler evnen til å vokse i tryptofan for eksempel ATCC nr. 44076 eller PEP4-1 (Jones, 1977). Nærværet av *trp1*-skaden som en egenskap ved gjærvertscellegenomet, tilveiebringer derved et effektivt miljø for å påvise transformasjon ved vekst i fraværet av tryptofan.

Egnede promotorsekvenser i gjærvektorer inkluderer promotoren for 3-fosfoglyseratkinase (Hitzman *et al.*, 1980) eller andre glykolytiske enzymer (Hess *et al.*, 1968; Holland *et al.*, 1978) slik som enolase, glyseraldehyd-3-fosfatdehydrogenase, heksokinase, pyruvatdekarboksylase, fosfofruktokinase, glukose-6-fosfataserase, 3-fosfoglyseratmutase, pyruvatkinase, triosefosfataserase, fosfoglukoseisomerase og glukokinase. Ved konstruksjon av egnede ekspresjonsplasmider ligeres også termineringssekvensen assosiert med disse genene inn i ekspresjonsvektorens 3'-ende av sekvensen ønsket for ekspresjon for å tilveiebringe polyadenylering av mRNA og terminering.

Andre promotorer som har den ytterligere fordel å være transkripsjonskontrollert ved hjelp av vekstbetingelser, er promotorregionen til alkoholdehydrogenase 2, isocytokrom C, syrefosfatase, degraderende enzymer assosiert med nitrogenmetabolisme og den tidligere nevnte glyseraldehyd-3-fosfatdehydrogenase, og enzymer som er ansvarlige for maltose- og galaktoseutnyttelse. Enhver plasmidvektor som inneholder en gjærkompatibel promotor, replikasjonsorigo og termineringssekvenser er egnede.

I tillegg til mikroorganismer kan kulturer av celler utledet fra flercellulære organismer også anvendes som verter. I prinsippet er enhver slik cellekultur anvendelig, uavhengig av om det er fra virveldyr eller fra ikke virveldyrkultur. Interessen har imidlertid vært størst for virveldyrceller og oppformeringen av virveldyr i kultur (vevskultur) har blitt en rutinemessig prosedyre i de senere år (Tissue Culture, 1973). Eksempler på slike anvendelige vertscellelinjer er VERO- og HeLa-celler, kinesiske hamstereggstokk (CHO) cellelinjer og W138-, BHK-, COS-7-, 293-, *Spodoptera frugiperda* (SF) celler (kommersielt tilgjengelige som fullstendige ekspresjonssystemer fra blant annet Protein Sciences, 1000 Research Parkway, Meriden, CT 06450, U.S.A. og fra Invitrogen), og MDCK-cellelinjer. I den foreliggende oppfinnelsen er en spesielt foretrukket cellelinje S₂ som er tilgjengelig fra Invitrogen, postboks 2312, 9704 CH Groningen, Nederland.

Ekspresjonsvektorer for slike celler inkluderer vanligvis (hvis nødvendig) et replikasjonsorigo, en promotor lokalisert foran genet som skal uttrykkes sammen med alle nødvendige ribosombindings seter, RNA-spleiseseter, polyadenyleringsseter og transkripsjonstermineringssekvenser.

5 For anvendelse i pattedyrceller, er kontrollfunksjonene på ekspresjonsvektorene ofte tilveiebrakt gjennom virusmateriale. For eksempel er vanlig anvendte promotorer utledet fra polyoma, adenovirus 2 og oftest simian virus 40 (SV40). Tidlige og sene promotorer fra SV40-virus er spesielt anvendelige fordi begge oppnås enkelt fra viruset som et fragment som også inneholder SV40-virusreplikasjonsorigo (Fiers *et*
10 *al.*, 1978). Mindre og større SV40-fragmenter kan også anvendes, forutsatt at de inkluderer den tilnæringsvis 250 bp sekvensen som går fra *HindIII*-setet mot *BglII*-setet lokalisert i det virale replikasjonsorigo. Videre er det også mulig og ofte ønskelig å utnytte promotor- eller kontrollsekvenser som normalt er assosiert med den ønskede gensekvensen, forutsatt at slike kontrollsekvenser er kompatible med
15 vertscellesystemene.

Et replikasjonsorigo kan tilveiebringes enten ved konstruksjon av vektoren slik at den inkluderer et eksogent origo slik som kan være utledet fra SV40 eller andre virus (for eksempel polyoma, adeno, VSV, BPV) eller kan tilveiebringes gjennom den vertscelle kromosomale replikasjonsmekanismen. Dersom vektoren er integrert
20 i vertscellekromosomet, er sistnevnte som oftest tilstrekkelig.

Identifisering av anvendelige analoger

Det vil være klart for fagfolk på området at ikke alle mulige varianter eller modifikasjoner av naturlig forekommende APP eller A β vil ha evnen til å fremkalle antistoffer i et dyr som er kryssreaktivt med den naturlige forme. Det er imidlertid
25 ikke vanskelig å sette opp en effektiv standardanalyse for modifiserte amyloidogene molekyler som oppfyller minimumskravene for immunologisk reaktivitet som beskrevet heri. Følgelig er det mulig å utnytte en fremgangsmåte for å identifisere et modifisert amyloidogent polypeptid som er i stand til å inducere antistoffer mot umodifisert amyloidogent polypeptid i en dyreart hvor det umodifiserte
30 amyloidogene polypeptidet er et (ikke-immunogent) eget-protein, karakterisert ved at fremgangsmåten omfatter

- fremstilling ved hjelp av peptidsyntese- eller genteknologiteknikker et sett av innbyrdes forskjellige analoger ifølge oppfinnelsen, hvori aminosyrer har blitt tilsatt, satt inn i, deletert fra eller substituert inn i aminosyresekvensen til et APP
35 eller A β til en dyreart og som derved gir opphav til aminosyresekvenser i settet som omfatter T-celleepitoper som er fremmede for dyreartene, eller fremstille et sett av nukleinsyrefragmenter som koder for settet av gjensidig forskjellige analoger,

- teste medlemmer av settet av analoger eller nukleinsyrefragmenter for deres evne til å indusere fremstilling av antistoffer av dyreartene mot det umodifiserte APP eller A β , og
- identifisere og eventuelt isolere medlemmene av sette av analoger som
5 signifikant induserer antistoffproduksjon mot umodifisert APP eller A β i arten eller å identifisere og eventuelt isolere polypeptidkspresjonsproduktet som er kodet av medlemmene av settet av nukleinsyrefragmenter som signifikant induserer antistoffproduksjon mot umodifisert APP eller A β i dyreartene.

10 I denne sammenhengen er "sett av gjensidig forskjellige modifiserte amyloidogene polypeptider" en samling av ikke-identiske analoger som for eksempel er blitt valgt på grunn av kriteriene diskutert ovenfor (for eksempel i kombinasjon med studier av sirkulær dikroisme, NMR-spektra og/eller røntgendiffraksjonsmønstre). Settet kan bestå av kun noen få medlemmer, men det skal forstås at sette kan inneholde flere hundre medlemmer.

15 Testen av settets medlemmer kan endelig utføres *in vivo*, men et antall *in vitro* tester kan anvendes for å snevre inn antallet modifiserte molekyler som vil tjene formålet ifølge oppfinnelsen.

Ettersom målet å introdusere de fremmede T-celleepitopene er for å støtte B-celleresponsen ved hjelp av T-cellehjelp, er det et forbehold om at T-celleproliferasjon induseres ved hjelp av analogen. T-celleproliferasjon kan testes ved hjelp av standardiserte prolifereringsanalyser *in vitro*. Kort fortalt oppnås en prøve som er beriket med T-celler fra et individ og oppbevares deretter i kultur. De dyrkede T-cellene bringes i kontakt med APC fra individet som tidligere har tatt opp det modifiserte molekylet og bearbeidet det for å presentere dets T-celleepitoper. Proliferasjonen av T-cellene overvåkes og sammenlignes med en egnet kontroll (for eksempel T-celler i kultur brakt i kontakt med APC som har bearbeidet intakt, naturlig amyloidogent polypeptid). Alternativt kan proliferasjon måles ved å bestemme konsentrasjonen av relevante cytokiner som frigjøres av T-cellene som respons på deres gjenkjennelse av fremmede T-celler.

30 Siden det er svært sannsynlig at minst én analog av hver type av settet er i stand til å indusere antistoffproduksjon mot APP eller A β , er det mulig å fremstille et immunogent sammensetning som omfatter i det minste én analog som er i stand til å indusere antistoffer mot umodifisert APP eller A β i en dyreart hvor det umodifiserte APP eller A β er et eget-protein, hvor fremgangsmåten omfatter blanding av
35 medlemmene av settet som signifikant induserer fremstilling av antistoffer i dyreartene som er reaktive med APP eller A β med en farmasøytisk og immunogen akseptabel bærer og/eller vehikkel og/eller fortynningsmiddel og/eller eksipient,

eventuelt i kombinasjon med i det minste én farmasøytisk og immunogent akseptabel adjuvans.

De ovenfor nevnte testene av polypeptidsettene utføres passende ved å initielt fremstille et antall gjensidig distinkte nukleinsyresekvenser eller vektorer ifølge oppfinnelsen, sette disse inn i passende ekspresjonsvektorer, transformere egnede vertsceller (eller vertsdyr) med vektorene og effektuere ekspresjon av nukleinsyresekvensene ifølge oppfinnelsen. Disse trinnene kan etterfølges av å isolere ekspresjonsproduktene. Det er foretrukket at nukleinsyresekvensene og/eller vektorene fremstilles ved hjelp av fremgangsmåter som omfatter anvendelse av en molekylær oppformeringssteknikk slik som PCR eller ved hjelp av nukleinsyresyntese.

Spesifikke amyloidogene mål

I tillegg til proteinene som oftest er assosiert med Alzheimers, APP, ApoE4 og Tau, er det en lang liste av andre proteiner som på en eller annen måte er blitt forbundet med AD, enten gjennom deres direkte nærvær i plakk eller floker i AD-hjerner eller ved deres tydelige genetiske assosiasjon med økt risiko for utvikling av AD. De fleste, om ikke alle, av disse antigene er sammen med de ovenfor diskuterte A β , APP, presenilin og ApoE4 mulige målproteiner i visse utførelsesformer av den foreliggende oppfinnelsen. Disse mulige målene er allerede grundig diskutert i WO 01/62284. Disse mulige målene vil derfor kun nevnes kort her, mens en mer nøye bakgrunnsdiskusjon finnes i WO 01/62282 som herved er inkorporert ved referanse heri:

Alfa1-antichymotrypsin (ACT); alfa2-makroglobulin; ABAD (A β -peptidbindende alkoholdehydrogenase); APLP1 og -2 (amyloid forløper som protein 1 og -2); AMY117; Bax; Bcl-1; bleomycinhydrolase; BRI/ABRI; kromogranin A, klusterin/apoJ; CRF (kortikotropinfrigjørende faktor) bindingsprotein; EDTF (endotelisk utledet toksinfaktor); heparansulfatproteoglykaner; human kollapsinresponsmediator protein-2; huntingtin (Huntingtons sykdom-protein); ICAM-I; IL-6; lysosomassosiert antigen CD68; P21 ras; PLC-delta 1 (fosfolipase C isoenzym delta 1); serum amyloid P-komponent (SAP); synaptofysin; synuklein (alfa-synuklein eller NACP); og TGF-b1 (transformerende vekstfaktor b1).

De nylig beskrevne midlene og fremgangsmåtene for nedregulering av APP eller A β , kan kombineres med terapier, for eksempel aktiv spesifikk immunterapi mot ethvert av disse andre amyloidogene polypeptidene.

Bortsett fra Alzheimers sykdom, er også cerebral amyloid angiopati en sykdom som ville være et egnet mål for den heri beskrevne teknologien.

Det er antatt at de fleste fremgangsmåter for immunisering mot APP eller A β bør begrenses til immunisering som gir opphav til antistoffer som er kryssreaktive med

polyhydroksypolymeren ved lav pH, for eksempel pH 4-5, og tillates å bli likt distribuert i "gelen" ved passiv diffusjon. Deretter kan pH økes til pH 9-10 for å starte omsetning av de primære aminogruppene på peptidene og merkene til tresylgruppene på polyhydroksypolymeren. Etter kobling av peptidene og for eksempel immunstimulerende elementer, males gelen for å danne partikler med 5 egnet størrelse for immunisering.

Et slikt immunogen omfatter derfor

- a) i det minste en første aminosyresekvens utledet fra APP eller A β , som angitt over, og
- 10 b) minst en andre aminosyresekvens som inkluderer en fremmed T-hjelpecelleepitop,

hvori hver av den i det minste første og den i det minste andre aminosyresekvensen er koblet til en farmasøytisk akseptabel aktivert polyhydroksypolymerbærer.

For at aminosyresekvensen skal kobles til polyhydroksypolymeren, er det normalt 15 nødvendig å "aktivere" polyhydroksypolymeren med en egnet reaktiv gruppe som kan danne den nødvendige bindingen til aminosyresekvensen.

Uttrykket "polyhydroksypolymer" er ment å ha den samme betydningen som i WO 00/05316, det vil si at polyhydroksypolymeren kan ha nøyaktig de samme 20 egenskapene som spesifikt læres i den søknaden. Polyhydroksypolymeren kan følgelig være vannløselig eller uløselig (og derved kreve ulike syntesetrinn i løpet av fremstillingen av immunogenet). Polyhydroksypolymeren kan velges fra naturlig forekommende polyhydroksyforbindelser og syntetiske polyhydroksyforbindelser.

Spesifikke og foretrukne polyhydroksypolymerer er polysakkarider valgt fra acetan, amylopektin, agar-agar-gummi, agarose, alginater, gummi arabikum, carageenan, 25 cellulose, syklodekstriner, dekstran, furcellaran, galaktomannan, gelatin, ghatti, glukose, glykogen, guar, karaya, konjak/A, frøgummi fra johannesbrødtre, mannan, pektin, psyllium, pullulan, stivelse, tamarin, tragakant, xantan, xylan og xyloglukan. Dekstran er spesielt foretrukket.

Imidlertid kan også polyhydroksypolymeren velges fra svært forgrenede 30 poly(etylenimin) (PEI), tetratietylenvinylet, kevlar (lange kjeder av polyparafenylytereftalamid), poly(uretaner), poly(siloksaner), polydimetylsiloksan, silikon, poly(metylmetakrylat) (PMMA), poly(vinylalkohol), poly(N-vinylpyrrolidon), poly(2-hydroksyetylmetakrylat), poly(N-vinylpyrrolidon), poly(vinylalkohol), poly(akrylsyre), polytetrafluoretylen (PTFE), polyakrylamid, 35 poly(etylen-co-vinylacetat), poly(etylen glykol) og derivater, poly(metakrylsyre), polymelkesyrer (PLA), polyglykolider (PGA), poly(melke-co-glykolider) (PLGA), polyanhydrider og polyortoestere.

Den gjennomsnittlige molekylvekten til polyhydroksypolymeren av interesse (det vil si før aktivering) er vanligvis i det minste 1000, slik som i det minste 2000, fortrinnsvis i området 2500-200000, mer foretrukket i området 3000-1000000, spesielt i området 5000-500000. Det har blitt vist i eksemplene at

5 polyhydroksypolymerer med en gjennomsnittlig molekylvekt i området 10000-200000 er spesielt fordelaktige.

Polyhydroksypolymeren er fortrinnsvis vannløselig i en grad på i det minste 10 mg/ml, fortrinnsvis i det minste 25 mg/ml, slik som i det minste 50 mg/ml, spesielt i det minste 100 mg/ml, slik som i det minste 150 mg/ml ved romtemperatur. Det er

10 kjent at dekstran, selv når det er aktivert som beskrevet heri, tilfredsstiller kravene med hensyn til vannløselighet.

For noen av de mest interessante polyhydroksypolymerene er forholdet mellom C- (karbonatomer) og OH-grupper (hydroksygrupper) av de uaktiverede polyhydroksypolymerene (det vil si de naturlige polyhydroksypolymerene før

15 aktivering) i området 1,3 til 2,5, slik som 1,4-2,3, fortrinnsvis 1,6-2,1, spesielt 1,85-2,05. Uten å være bundet av noen spesifikk teori, er det antatt at et slik C/OH-forhold av de uaktiverede polyhydroksypolymerene representerer et svært fordelaktig nivå av hydrofilisitet. Polyvinylalkohol og polysakkarider er eksempler på polyhydroksypolymerer som tilfredsstiller dette kravet. Det er antatt at det ovenfor

20 nevnte forholdet bør være omtrent det samme for den aktiverte polyhydroksypolymeren, ettersom aktiveringsforholdet bør være heller lavt.

Uttrykket "polyhydroksypolymerbærer" er ment å angi den delen av immunogenet som bærer aminosyresekvensene. Som en generell regel har polyhydroksypolymerbæreren en ytre grense hvor aminosyresekvensene kan

25 kløyves ved hjelp av en peptidase, for eksempel i en antigenpresenterende celle som bearbeider immunogenet. Polyhydroksypolymerbæreren kan følgelig være polyhydroksypolymeren med en aktiveringsgruppe hvor bindingen mellom aktiveringsgruppen og aminosyresekvensen kan kløyves ved hjelp av en peptidase i en APC, eller polyhydroksypolymerbæreren kan være en polyhydroksypolymer med

30 aktiveringsgruppe og for eksempel en linker slik som en enkel L-aminosyre eller et antall D-aminosyrer, hvor den siste delen av linkeren kan bindes til aminosyresekvensen og kløyves av en peptidase i en APC.

Som nevnt ovenfor, bærer polyhydroksypolymerene funksjonelle grupper (aktiveringsgrupper) som letter forankringen av peptidene til bæreren. Flere mulige funksjonelle grupper er kjent i teknikkens stand, for eksempel tresyl

35 (trifluoretylsulfonyl), maleimid, p-nitrofenylklorformat, cyanogenbromid, tosyl (p-toluensulfonyl), triflyl (trifluormetansulfonyl), pentafluorbenzensulfonyl og vinylsulfongrupper. Foretrukne eksempler på funksjonelle grupper innenfor den foreliggende oppfinnelsen er tresyl, maleimid, tosyl, triflyl,

pentafluorbenzensulfonyl, p-nitrofenylklorformat og vinylsulfongrupper, hvor blant disse er tresyl, maleimid og tosylgrupper spesielt relevante.

5 Tresylaktiverte polyhydroksypolymerer kan fremstilles ved anvendelse av tresylklorid som beskrevet for aktivering av dekstran i eksempel 1 i WO 00/05316 eller som beskrevet i Gregorius et al., J. Immunol. Meth. 181 (1995) 65-73.

10 Maleimidaktiverte polyhydroksypolymerer kan fremstilles ved anvendelse av *p*-maleimidfenylisocyanat som beskrevet for aktivering av dekstran i eksempel 3 i WO 00/05316. Alternativt kan maleimidgrupper introduseres til en polyhydroksypolymer slik som dekstran ved hjelp av derivatisering av en tresylaktivert polyhydroksypolymer (slik som tresylaktivert dekstran (TAD)) med en diaminforbindelse (generelt $H_2N-C_nH_{2n}-NH_2$, hvor *n* er 1-20, fortrinnsvis 1-8), for eksempel 1,3-diaminopropan, i overskudd og deretter omsette aminogruppene introdusert i TAD med reagenser slik som succinimidyl-4-(*N*-maleimidometyl)sykloheksan-1-karboksylat (SMCC), sulfo-succinimidyl 4-(*N*-maleimidometyl)sykloheksan-1-karboksylat (sulfo-SMCC), succinimidyl 4-(*p*-maleimidofenyl)butyrat (SMPB), sulfo-succinimidyl 4-(*p*-maleimidofenyl)butyrat (sulfo-SMPB), *N*- γ -maleimidobutyryloksysuccinimidester (GMBS) eller *N*- γ -maleimidobutyryloksysulfosuccinimidester. Selv om de forskjellige reagensene og rutene for aktivering formelt resulterer i noe forskjellige maleimidaktiverte produkter med hensyn til bindingen mellom maleimidfunksjonaliteten og den gjenværende delen av foreldrehydroksygruppen hvorpå aktiveringen utføres, betraktes alle som en som "maleimidaktiverte polyhydroksypolymerer".

25 Tosylaktiverte polyhydroksypolymerer kan fremstilles ved anvendelse av tosylklorid som beskrevet for aktivering av dekstran i eksempel 2i WO 00/05316. Triflyl- og pentafluorbenzensulfonylaktiverte polyhydroksypolymerer fremstilles som tosyl- eller tresylaktiverte analoger, for eksempel ved anvendelse av de korresponderende syrekloridene.

30 Cyanogenbromidaktiverte polyhydroksypolymerer kan fremstilles ved å omsette polyhydroksypolymeren med cyanogenbromid ved anvendelse av konvensjonelle fremgangsmåter. De resulterende funksjonelle gruppene er normalt cyanatestere med to hydroksygrupper på polyhydroksypolymeren.

35 Aktivierungsgraden kan uttrykkes som forholdet mellom de frie hydroksygruppene og aktivierungsgruppene (det vil si funksjonaliserte hydroksygrupper). Det er antatt at et forhold mellom de frie hydroksygruppene til polyhydroksypolymeren og de aktiverte gruppene bør være mellom 250:1 og 4:1 for å oppnå en fordelaktig balanse mellom hydrofilisiteten og reaktiviteten til polyhydroksypolymeren. Fortrinnsvis er forholdet mellom 11:1 og 6:1, mer foretrukket mellom 60:1 og 8:1, spesielt mellom 40:1 og 10:1.

Spesielt interessante aktiverte polyhydroksypolymerer for anvendelse i fremgangsmåten for fremstilling av det generelt anvendelige immunogenet i henhold til oppfinnelsen, er tresyl-, tosyl- og maleimidaktiverte polysakkarider, spesielt tresylaktivert dekstran (TAD), tosylaktivert dekstran (TosAD) og
5 maleimidaktivert dekstran (MAD).

Det er foretrukket at bindingen mellom polyhydroksypolymerbæreren og aminosyresekvensene bundet dertil kløyves ved hjelp av en peptidase, for eksempel en peptidase som er aktiv i bearbeidingen av antigener i en APC. Det er derfor foretrukket at den i det minste første og den i det minste andre aminosyresekvensen er koblet til den aktiverte polyhydroksypolymerbæreren via en amidbinding eller
10 peptidbinding. Det er spesielt foretrukket at den i det minste første og den i det minste andre aminosyresekvensen hver tilveiebringer nitrogenenheten til deres respektive amidbinding.

Polyhydroksypolymerbæreren kan være i alt vesentlig fri for aminosyrerester, hvilke nødvendiggjør at aktiveringsgruppen tilveiebringer del av en peptidasekløyvende binding, men som nevnt ovenfor, kan bæreren også enkelt inkludere et avstandsstykke ("spacer") som inkluderer minst en L-aminosyre. Ikke desto mindre er i det minste første og den i det minste andre aminosyresekvensen normalt bundet til den aktiverte versjonen av polyhydroksypolymeren via nitrogenet
20 ved N-enden til aminosyresekvensen.

Det ovenfor nevnte generelt anvendte immunogenet ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan anvendes i immuniseringsfremgangsmåter i alt vesentlig som beskrevet heri for polypeptidvaksiner. Det vil si at alle beskrivelsene angående doseringer, administreringsmåter og formulering av polypeptidvaksiner for nedregulering av amyloidogene polypeptider beskrevet heri, gjelder *mutatis mutandis* de generelt anvendelige immunogenene.
25

GENERELT ANVENDELIG SIKKER VAKSINERINGSTEKNOLOGI

Som diskutert ovenfor, omfatter en foretrukket utførelsesform av den foreliggende oppfinnelsen anvendelsen av varianter av amyloidogene polypeptider som ikke er i stand til å tilveiebringe egenutledede T_H-epitoper som kan drive en immunrespons mot det amyloidogene polypeptidet.
30

Imidlertid tror de foreliggende oppfinnerne at denne strategien for å utforme anti-egenvaksiner og for å effektivere anti-egenimmunitet er en generelt anvendelig teknologi som er oppfinnerisk i seg selv. Den bør være spesielt egnet i tilfeller hvor egen-antigenet som det søkes å nedregulere er tilstede i tilstrekkelige mengder i kroppen slik at det er mulig at egenstimuleringen av en immunrespons skjer. Alle beskrivelser ovenfor av denne utførelsesformen hva gjelder anskaffelsen av en anti-egenimmunrespons mot APP eller A β gjelder følgelig *mutatis mutandis* for
35

immunisering mot andre egen-polypeptider, spesielt de som er tilstede i tilstrekkelige mengder til at de opprettholder immunresponsen i form av en ukontrollert autoimmun tilstand på grunn av autologe T_H-epitoper av det relevante egen-polypeptidet som deriver immunresponsen.*

5 SAMMENLIKNINGSEKSEMPEL 1

Autovaksineringsstilnærming for immunisering mot AD

Det faktum at A β -protein "knock out"-mus ikke viser noen unormaliteter eller bivirkninger, antyder at fjerning eller senking av A β -mengdene er sikker, Zheng H. (1996).

- 10 Publiserte eksperimenter hvor transgene dyr immuniseres mot det transgene humane A β -proteinet antyder at dersom det var mulig å bryte egentoleransen, kunne nedreguleringen av A β oppnås ved hjelp av autoreaktive antistoffer. Disse eksperimenterne foreslår videre at en slik nedregulering av A β potensielt både ville forebygge dannelsen av plakk og til og med fjerne dannede A β -plakk fra hjernen, 15 jfr. Schenk et al. (1999). Tradisjonelt er det imidlertid ikke mulig å fremkalle antistoffer mot egenproteiner.

- De publiserte dataene tilveiebringer følgelig ikke midlene for nedbrytning av sann egentoleranse mot sanne egen-proteiner. Ei heller tilveiebringer dataene informasjon om hvordan man skal sikre at immunreaksjonen utelukkende eller 20 hovedsakelig er rettet mot A β -avleiringer og ikke mot cellemembranbundne det A β -forløperprotein (APP) dersom dette synes å være nødvendig. En immunrespons som er dannet ved anvendelse av eksisterende teknologi ville antageligvis danne en immunrespons mot egen-proteiner på en uregulert måte slik at uønskede og overdrevet autoreaktivitet mot deler av A β -protein kan dannes. Følgelig vil 25 anvendelsen av eksisterende immuniseringsstrategier sannsynligvis ikke være i stand til å danne sterke immunresponser mot egen-proteiner og vil videre være usikre som følge av mulig sterk kryssreaktivitet mot membranbundet APP som er tilstede på et større antall av cellene i CNS.

- Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer midlene for effektiv dannelse av en 30 sterkt regulert immunrespons mot sanne egen-proteiner som muligens kunne danne plakk og forårsake alvorlig sykdom i CNS eller i andre deler av kroppen. En sikker og effektiv human A β -protein terapeutisk vaksine vil bli utviklet ved anvendelse av denne teknologien for behandling av AD.

- I lys av dette, er det mulig å regne med at AD, en sykdom som er antatt å ødelegge 35 helsevesenet i det neste århundret kan kureres, eller at slike beskrevne vaksiner i det minste utgjør en effektiv terapeutisk tilnærming for behandling av symptomene og utviklingen av denne sykdommen. Denne teknikken representerer en helt ny

immunologisk tilnærming for å blokkere amyloid avleiring i AD, så vel som andre nevrologiske sykdommer.

5 I den følgende tabellen er 35 betraktede konstrukter angitt. Alle posisjonene gitt i tabellen er i forhold til metioninstarten i APP (første aminosyre i SEKV.ID. NR. 2) og inkluderer både start- og sluttaminosyre, for eksempel 672-714-fragmentet inkluderer både aminosyrene 672 og 714. Start- og sluttposisjonene for P2 og P30 indikerer at epitopen substituerer en del av APP-fragmentet ved indikerte posisjonene (begge posisjonene er inkludert i substitusjonen) - i de fleste konstruksjonene substituerer den introduserte epitopen et fragment av lengden til 10 epitopen. Stjernene i tabellen har den følgende betydningen:

- *) Kun én posisjon for P2 og P30 indikerer at epitopen er blitt satt inn i APP-derivatet ved den angitte posisjonen (epitopen begynner ved aminosyren C-terminalt rett ved siden av den gitte posisjonen).
- 15 **) Konstruksjon 34 inneholder tre identiske APP-fragmenter som er separert av henholdsvis P30 og P2.
- ***) Konstruksjon 35 inneholder ni identiske APP-fragmenter som er separert ved å endre P30- og P2-epitopene.

APP Auto Vac-konstruksjoner

Variant nr.	APP-segmentstart i forhold til aa l i APP	APP-segmentslutt i forhold til aa l i APP	P2-epitopposisjon i forhold til aa l i APP	P30-epitopposisjon i forhold til aa l i APP	Molekyl lengde
1	630	770	656 - 670	635 - 655	141
2	630	714	656 - 670	635 - 655	85
3	672	770	735 - 749	714 - 728	99
4	672	770	714 - 728	714 - 728	99
5	672	770	723*	723*	99
6	672	770	723*	723*	135
7	672	770	723*	723*	120
8	672	714	723*	672*	114
9	672	714		714	64
10	672	714			64
11	672	714	672*		58
12	672	714	714*		58
13	672	714	714*	672*	79
14	672	714	680 - 694		43
14	672	714	685 - 799		43
16	672	714	690 - 704		43
17	672	714	695 - 709		43
18	672	714		675 - 695	43
19	672	714		680 - 700	43
20	672	714		685 - 705	43
21	672	714		690 - 710	43
22	672	714	680*	680*	79
23	672	714	690*	690*	79
24	672	714	700*	700*	79
25	672	714	710*	710*	79
26	672	714		680*	64
27	672	714		690*	64
28	672	714		700*	64
29	672	714		710*	64
30	672	714	680*		58
31	672	714	690*		58
32	672	714	700*		58
33	672	714	710*		58
34	672	714	Etter rep. 1**	Etter rep. 2**	165
34	672	714	34 x 3*	34 x 3***	165

Den delen av APP som det er mest interessant å danne en respons mot, er det 43 aminosyrer lange A β -kjernepeptidet (A β -43 som tilsvarer SEKV.ID. NR. 2, restene 672-714) som er hovedbestanddelen i amyloide plakk i AD-hjerner. Dette APP-fragmentet er en del av alle de angitte konstruksjonene ovenfor.

5 Variantene 1 og 2 omfatter en del av APP oppstrøms for A β -43 hvor modellepitopene P2 og P30 er blitt plassert. Variantene 1 og 3-8 omfatter alle C-100-fragmentet som er blitt vist å være nevrotoksisk - C-100-fragmentet tilsvarer aminosyrerestene 714-770 i SEKV.ID. NR. 2. I variantene 3-5 substituerer epitopene en del av C-100-fragmentet, mens epitopen i variantene 6-8 har blitt satt
10 inn i C-100.

Variantene 9-35 inneholder kun A β -43-kjerneproteinet. I variantene 9-13 er P2 og P30 kondensert til enten A β -43-enden; i 14-21 substituerer P2 og P30 deler av A β -43; i 22-33 er P2 og P30 satt inn i A β -43; 34 inneholder tre identiske A β -43-fragmenter atskilt med henholdsvis P30 og P2; 35 inneholder 9 A β -43-repeterende
15 deler ved alternerende P2- og P30-epitoper.

Trunkerte deler av det ovenfor nevnte A β -43-proteinet kan også anvendes i immunogene analoger i henhold til den foreliggende oppfinnelsen. Spesielt foretrukket er trunkeringene A β (1-42), A β (1-40), A β (1-39), A β (1-35), A β (1-34),
20 A β (1-28), A β (1-12), A β (1-5), A β (13-28), A β (13-35), A β (17-28), A β (25-35), A β (35-40), A β (36-42), og A β (35-42) (hvor antallet i parentes indikerer den aminosyrestrekkene til A β -43 som utgjør det relevante fragmentet - A β (35-40) er for eksempel identisk med aminosyrene 706-711 i SEKV.ID. NR. 2). Alle disse variantene med forkortede deler av A β -43 kan fremstilles med A β -fragmentene beskrevet heri, spesielt med variantene 9, 10, 11, 12 og 13.

25 I enkelte tilfeller er det foretrukket at A β -43 eller fragmenter derav er muterte. Spesielt foretrukket er substitusjonsvarianter hvor metioninposisjonen 35 i A β -43 er substituert, fortrinnsvis med leukin eller isoleukin, eller ganske enkelt deletert. Spesielt foretrukne analoger inneholder et enkelt metionin som er lokalisert i C-enden, enten fordi den er naturlig forekommende i det amyloidogene polypeptidet
30 eller den fremmede T_H-epitopen, eller fordi den er satt inn eller tilført. Følgelig er det også foretrukket at den delen av analogen som inkluderer den fremmede T_H-epitopen er fri for metionin, bortsett fra den mulige C-terminale lokaliseringen av et metionin.

Faktisk er det vanligvis foretrukket at alle analogene av APP eller A β som anvendes
35 ifølge den foreliggende oppfinnelsen har det fellestrekket at de kun inkluderer ett enkelt metionin som er posisjonert som den C-terminale aminosyren i analogen og at andre metioniner i enten det amyloidogene polypeptidet eller den fremmede T_H-epitopen er deletert eller substituert med en annen aminosyre.

En ytterligere interessant mutasjon er en delesjon eller substitusjon av fenylyalaninet i posisjon 19 i A β -43, og det er spesielt foretrukket at mutasjonen er en substitusjon av denne fenylyalaninresten med et prolin.

5 Den følgende tabellen viser en gruppe av spesielt foretrukne konstrukter som opererer med trunkeringer eller mutasjoner i A β -43:

Variant nr.	A β -segment i molekylet i forhold til aa 1 i A β (1-42/43)	Posisjon til A β -segment i forhold til molekylets aa 1	P2-epitopens posisjon relativ til aa 1 til molekylet	P30-epitopens posisjon relativ til aa 1 til molekylet	Molekylets totale lengde (aa)
36	1-28	22-49	50-64	1-21	64
37	1-12 (a) + 13-28 (b)	1-12 (a) + 49-64 (b)	34-48	13-33	64
38	1-13 (x 3)	1-12, 34-45, 61-72	46-60	13-33	72
39	13-28 (x 3)	1-16, 38-53, 69-84	54-68	17-37	84
40	1-12 (a) + 13-35 (b) + 36-42 (c)	1-12 (a) + 34-56 (b) + 72-78 (c)	57-71	13-33	78
41	1-28 (x 3)	1-28, 50-77, 93-120	78-92	29-49	120
42	1-43 (F19P/M35K)	1-43	65-79	44-64	79

I denne tabellen er det anvendte A β -segmentet i molekylet indikert ved aminosyreantall i forhold til aa 1 i A β (1-42/43)-molekylet, det vil si at 1-28 betyr at fragment 1-28 av A β (1-42/43) anvendes i molekylet. Dersom to eller flere forskjellige segmenter anvendes, er begge indikert i tabellen, det vil si at 1-12 (a) + 13-28 (b) betyr at både fragment 1-12 og fragment 13-28 av A β (1-42/43) anvendes i molekylet.

Dersom det samme segmentet er tilstede i mer enn en kopi i konstruksjonen, er det også indikert i tabellen, det vil si at 1-13 (x3) viser at fragmentet 1-12 av A β (1-42/43) er tilstede i tre kopier i konstruksjonen.

Posisjonen til A β -segmentet i molekylet er videre vist ved aminosyreposisjonene i forhold til den første aminosyren til molekylet, det vil si at 22-49 viser at A β -fragmentet det er spørsmål om er posisjonert fra aminosyre 22 til aminosyre 49 i molekylet hvor begge posisjonene er inkludert. P2- og P30-epitopposisjonene er indikert på samme måte. Dersom to eller flere ulike A β -fragmenter anvendes i molekylet, er alle deres posisjoner vist, det vil si at 1-12 (a) + 49-64 (b) betyr at fragment (a) er posisjonert fra aa 1-12 i molekylet og fragment (b) fra aa 49-64.

Dersom mer enn en kopi av det samme fragmentet er tilstede i molekylet, er videre posisjonene for alle kopiene vist, det vil si at 1-12, 34-45, 61-72 viser at de tre kopiene av A β -fragmentet er plassert fra henholdsvis posisjon 1-12, 34-45 og 61-72 i molekylet.

- 5 Endelig inkluderer den totale lengdeangivelsen for hvert molekyl både A β -fragmentet eller -fragmentene og P2- og P30-epitopene.

Variant 42 inneholder to aminosyresubstitusjoner ved posisjonene 19 (phe til pro) og 35 (met til lys) som det er angitt i kolonnen som viser A β -fragmentene.

- 10 Se figur 1 og tabellene ovenfor for detaljer om spesifikke punkter for introduksjon av de fremmede T-celleepitopene.

- En ytterligere type konstrukt er spesielt foretrukket. Ettersom ett mål ved den foreliggende oppfinnelsen er å unngå ødeleggelse av cellene som fremstiller APP mens fjerning av A β er ønsket, synes det praktisk å fremstille autovaksinekonstrukt som omfatter kun A β -deler som ikke er eksponert for den ekstracellulære fasen når den er presentert i APP. Slike konstrukt vil følgelig ha behov for å inneholde minst én B-celleepitop utledet fra aminosyrefragmentet definert ved aminosyrene 700-714 i SEKV.ID. NR. 2. Ettersom et slikt kort polypeptidfragment er antatt å kun være svakt immunogent, er det foretrukket at et slikt autovaksinekonstrukt inneholder flere kopier av B-celleepitopen, for eksempel i form av et konstrukt som har strukturen som vist i formel I i den detaljerte beskrivelsen av den foreliggende oppfinnelsen, se ovenfor. I denne versjonen av formel I, er uttrykkene amyloid_{e1}-amyloid_{ex} x B-celleepitopinneholdende aminosyresekvenser utledet fra aminosyrene 700-714 av SEKV.ID. NR. 2. Et foretrukket alternativ er den ovenfor beskrevne muligheten for å koble det amyloidogene (poly)peptidet og den valgte fremmede T-hjelpeepitopen via en amidbinding til et polysakkarid bærermolekyl - på denne måten muliggjøres multiple presentasjoner av den "svake" epitopen som utgjøres av aminosyrene 700-714 i SEKV.ID. NR. 2, og det blir også mulig å velge et optimalt forhold mellom B-celle- og T-celleepitoper.

- 30 SAMMENLIKNINGSEKSEMPEL 2

- Immunisering av transgene mus med A β og modifiserte proteiner* **Konstruksjon av hAB43+-34-kodende DNA.** hAB43+-34-genet ble konstruert i flere trinn. Først ble et PCR-fragment dannet med primerne ME#801 (SEKV.ID. NR. 10) og ME#802 (SEKV.ID. NR. 11) ved anvendelse ME#800 (SEKV.ID. NR. 9) som templat. 35 ME#800 koder for det humane abeta-43-fragmentet med E. coli-optimaliserte kodoner. ME#801 og -802 tilfører passende restriksjons seter til fragmentet.

PCR-fragmentet ble renset, fordøyd med *NcoI* og *HindIII*, renset igjen og klonet inn i *NcoI-HindIII*-fordøyd og renset pET28b+ *E. coli* ekspresjonsvektor. Det resulterende plasmidet som koder for villtype humant A β -43 kalles pAB1.

I det neste trinnet tilføres T-hjelpeepitopen, P2, til C-enden til molekylet. Primer ME#806 (SEKV.ID. NR. 12) inneholder sekvensen som koder for P2-epitopen og
5 følgerlig ble en fusjon av P2 og A β -43 utført ved hjelp av PCR-reaksjonen.

Kloningen ble utført ved å lage et PCR-fragment med primerne ME#178 (SEKV.ID. NR. 8) og ME#806 ved anvendelse av pAB1 som templat. Fragmentet ble renset, fordøyd med *NcoI* og *HindIII*, renset igjen og klonet inn i en *NcoI-HindIII*-fordøyd
10 og renset pET28b+-vektor. Det resulterende plasmidet ble kalt pAB2.

På en lignende måte ble et annet plasmid laget som bærer den A β -43-kodende sekvensen med en annen T-hjelpeepitop, P30, tilført til N-enden. Dette ble gjort ved å danne et PCR-fragment med primerne ME#105 (SEKV.ID. NR. 7) og ME#807 (SEKV.ID. NR. 13) ved anvendelse av pAB1 som templat.

15 Fragmentet ble renset, fordøyd med *NcoI* og *HindIII*, renset igjen og klonet inn i en *NcoI-HindIII*-fordøyd og renset pET28b+-vektor. Det resulterende plasmidet ble kalt pAB3.

I det tredje trinnet ble en andre A β -43-repeterende del tilført C-terminalt til P2-epitopen i plasmid pAB2 ved hjelp av primer ME#809 (SEKV.ID. NR. 14).
20 ME#809 danner samtidig et *BamHI*-sete umiddelbart etter den A β -43-repeterende enheten. Et PCR-fragment ble deretter dannet med primerne ME#178 og ME#809 ved anvendelse av pAB2 som templat. Fragmentet ble renset, fordøyd med *NcoI* og *HindIII*, renset igjen og klonet inn i en *NcoI-HindIII*-fordøyd og renset pET28b+-vektor. Det resulterende plasmidet ble kalt pAB4.

25 Endelig ble P30-epitopen - A β -43-repeterende sekvens fra pAB3 klonet inn i pAB4-plasmid. Dette ble gjort ved å lage et PCR-fragment med primerne ME#811 (SEKV.ID. NR. 16) og ME#105 ved anvendelse av pAB3 som templat. Fragmentet ble renset og anvendt som primer i en påfølgende PCR med ME#810 (SEKV.ID. NR. 15) ved anvendelse av pAB3 som templat. Det resulterende fragmentet ble
30 renset, fordøyd med *BamHI* og *HindIII*, renset igjen og klonet inn i en *BamHI-HindIII*-fordøyd og renset pAB4-plasmid. Det resulterende plasmidet, pAB5, koder for hAB43+-34-molekylet.

Alle PCR- og kloningsprosedyrer ble utført i alt vesentlig som beskrevet av Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989 "Molecular cloning: a laboratory
35 manual". 2. utgave. Red. Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.

For alle kloningsprosedyrene ble *E. coli* K-12-celler, stamme topp-10 F' (Stratagene, USA) anvendt. pET28b+-vektoren ble kjøpt fra Novagen, USA. Alle primere ble syntetisert ved DNA Technology, Danmark.

5 **Ekspressjon og rensing av hAB43+-34.** hAB43+-34-proteinet som er kodet for av pAB5, ble uttrykt i BL21-Gold (Novagen) *E. coli*-celler som beskrevet av forhandleren av pET28b+-systemet (Novagen).

10 Det uttrykte hAB43+-34-proteinet ble rensset til mer enn 85% renhet ved vasking av inklusjonslegemer etterfulgt av kationbyttekromatografi ved anvendelse av BioCad rensarbeidsstasjon (PerSeptive Biosystems, USA) i nærværet av 6 M urea. Ureaen ble deretter fjernet ved trinnvis dialyse mot en løsning som inneholdt synkende mengder av urea. Den endelige bufferen var 10 mM Tris, pH 8,5.

15 **Immuniseringsstudie.** Mus som var transgene for humant APP (Alzheimers forløperprotein) ble anvendt i studien. Disse musene, kalt TgRND8+, uttrykker en mutert form av APP som resulterer i høye konsentrasjoner av A β -40 og A β -42 i musenes hjerner (Janus, C. *et al.*).

20 Musene (8-10 mus pr gruppe) ble immunisert med enten A β -42 (SEKV.ID. NR. 2, restene 673-714, syntetisert ved hjelp av en standard Fmoc-strategi) eller hAB43+-34-varianten (konstrukt 34 i tabellen i eksempel 1, rekombinant fremstilt) fire ganger med 2 ukers intervaller. Dosene var enten 100 mg for A β eller 50 mg for hAB43+-34. Det ble tatt blodprøver av musene ved dag 43 (etter tre injeksjoner) og etter 52 (etter fire injeksjoner) og sera ble anvendt for å bestemme nivået av anti-A β 42-spesifikke titere ved anvendelse av en direkte A β -42 ELISA.

Den følgende tabellen viser gjennomsnittlige relative anti-A β -42-titere.

Immunogen	Dag 43 (etter 3 immuniseringer)	Dag 52 (etter 4 immuniseringer)
A β -42	4000	3000
hAB43+-34	16000	23000

25 Det er tydelig at antistofftitere oppnådd ved immunisering med hAB43+-34 A β -varianten er tilnæringsvis 4 ganger og 7,5 ganger høyere etter henholdsvis 3 og 4 immuniseringer enn titerne oppnådd ved anvendelse av den uendrede villtype A β -42 som et immunogen. Dette faktum settes i et videre perspektiv når man tar i betraktning at mengden av anvendt variant for immunisering kun var 50% av
30 mengden anvendt av villtypesekvensen for immunisering.

SAMMENLIKNINGSEKSEMPEL 3

Syntese av en A β -peptid sampolymervaksine ved anvendelse av aktivert polyhydroksypolymer som kryssbindingsmiddel.

- Introduksjon.** En tradisjonell konjugatvaksine består av et (poly)peptid kovalent koblet til et bærerprotein. Peptidet inneholder B-celleepitopen(e) og bærerproteinet tilveiebringer T-hjelpepitoper. Imidlertid vil de fleste av bærerproteinene normalt være irrelevante som en kilde for T-hjelpepitoper, ettersom kun en mindre del av den totale sekvensen inneholder de relevante T-hjelpepitopene. Slike epitoper kan defineres og syntetiseres som peptider av for eksempel 12-15 aminosyrer. Dersom disse peptidene bindes kovalent til peptidene som inneholder B-celleepitopene, for eksempel via en multivalent aktivert polyhydroksypolymer, kan et vaksinemolekyl som kun inneholder de relevante delene oppnås. Det er videre mulig å tilveiebringe et vaksinekonjugat som inneholder et optimalt forhold mellom B-celle- og T-celleepitoper.
- Syntese av den aktiverte polyhydroksypolymeren.** Polyhydroksypolymerer slik som dekstran, stivelse, agarose osv. kan aktiveres med 2,2,2-trifluoretansulfonylklorid (tresylklorid), enten ved hjelp av en homogen syntese (dekstran) løst i N-metylpyrrolidinon (NMP) eller ved hjelp av en heterogen syntese (stivelse, agarose, kryssbundet dekstran) i for eksempel aceton.
- 225 ml tørr N-metylpyrrolidon (NMP) tilsettes under tørre betingelser til frysetørket, vannløselig dekstran (4,5 g, 83 mmol, klinisk kvalitet, molekylvekt (gjennomsnitt) 78000) i en 500 rundbunnet kolbe tilsatt en magnet for røring. Kolben plasseres i et 60°C oljebad med magnetisk røring. Temperaturen ble økt til 92°C over et tidsrom på 20 minutter. Når dekstranen ble løst, ble kolben umiddelbart fjernet fra oljebadet og temperaturen i badet ble senket til 40°C. Kolben ble igjen plassert i oljebadet, fortsatt med magnetisk røring, og tresylklorid (2,764 ml, 25 mmol) ble dråpevis tilsatt. Etter 15 minutter ble tørr pyridin (vannfri, 2,020 ml, 25 mmol) tilsatt dråpevis. Kolben ble fjernet fra oljebadet og rørt i 1 time ved romtemperatur. Produktet (tresylaktivert dekstran, TAD) ble utfelt i 1200 ml kald etanol (99,9%). Supernatanten ble helt av og bunnfallet ble høstet i 50 ml polypropylenrør i en sentrifuge ved 2000 rpm. Bunnfallet ble løst i 50 ml 0,5% eddiksyre, dialysert 2 ganger mot 5000 ml 0,5% eddiksyre og frysetørket. TAD kan lagres som et frysetørket produkt ved -20°C.
- En uløselig polyhydroksypolymer slik som agarose eller kryssbundet dekstran kan tresylaktiveres ved å danne en suspensjon av polyhydroksypolymeren i for eksempel aceton og utføre syntesen som en fast fasesyntese. Den aktiverte polyhydroksypolymeren kan høstes ved hjelp av filtrering. Egnede fremgangsmåter er rapportert i for eksempel Nilsson K og Mosbach K (1987), Methods in

Enzymology **135**, side 67 og i Hermansson GT *et al.* (1992), i "Immobilized Affinity Ligand Techniques", Academic Press, Inc., side 87.

Syntese av A β -peptid sampolymervaksiner. TAD (10 mg) ble løst i 100 μ l H₂O og 1000 μ l karbonatbuffer, pH 9,6, inneholdende 5 mg A β -42 (SEKV.ID. NR. 2, restene 673-714), 2,5 mg P2 (SEKV.ID. NR. 4) og 2,5 mg P30 (SEKV.ID. NR. 6) ble tilsatt. A β -42- og P2- og P30-peptidene inneholdt alle beskyttede lysingrupper; disse var i form av 1-(4,4-dimetyl-2,6-dioksosykloheks-1-yliden)etyl (Dde) beskyttede lysingrupper. Peptidene ble fremstilt ved hjelp av en standard Fmoc-strategi hvor den konvensjonelle Fmoc-Lys(Boc)-OH ble substituert med Fmoc-Lys(Dde)-OH (anskaffet fra Novabiochem, katalog nr. 04-12-11121), det vil si at ϵ -aminosyregruppen i lysin er beskyttet med Dde i stedet for Boc.

pH-verdien ble målt og justert til 9,6 ved anvendelse av 1 M HCl. Etter 2,5 timer ved romtemperatur, ble hydrazin fra en 80% løsning tilsatt til en endelig hydrazinkonsentrasjon på 8% og løsningen ble innkubert i ytterligere 30 minutter ved romtemperatur og frysetørket umiddelbart deretter. Det frysetørkede produktet ble løst i H₂O og dialysert grundig mot H₂O før den endelige frysetørkingen.

Forholdet mellom B-celleepitopene (A β) og T-hjelpeepitopene (P2 og P30) i det endelige produktet kan varieres ved å anvende forskjellige konsentrasjoner av disse peptidene i syntesetrinnet. Det endelige produktet kan merkes med for eksempel mannose (for så å rette konjugatet mot APC) ved å tilføre aminert mannose til karbonatbufferen i syntesetrinnet.

Dersom en uløselig aktivert polyhydroksypolymer anvendes for å kombinere peptidene som inneholder B-celleepitopen og T-hjelpeepitopene, kan koblingen av polymeren utføres som en fast fasesyntese og sluttproduktet høstes og renses ved hjelp av vasking og filtrering.

Som nevnt i den generelle beskrivelsen, kan den foreliggende beskrevne tilnærmingen for fremstilling av en peptidbasert vaksine anvendes på ethvert annet polypeptidantigen hvor det er formålstjenlig å fremstille en ren syntetisk peptidvaksine og hvor polypeptidantigenet av interesse tilveiebringer en tilstrekkelig immunogenisitet i et enkelt peptid.

SAMMENLIKNINGSEKSEMPEL 4

Syntese av peptid sampolymervaksiner

TAD (10 mg) ble løst i 100 μ l H₂O og 1000 μ l karbonatbuffer, pH 9,6, inneholdende 1-5 mg peptid A (ethvert immunogent peptid av interesse!), 1-5 mg P2 (difteritoksoid P2-epitop) og 1-5 mg P30 (difteritoksoid P30-epitop) ble tilsatt. pH-verdien ble målt og justert til 9,6 ved anvendelse av 0,1 M HCl.

Etter 2,5 timer ved romtemperatur, ble løsningen frysetørket umiddelbart deretter. Det frysetørkede produktet ble løst i H₂O og grundig dialysert mot H₂O eller avsaltet på en gelfiltreringskolonne før den endelige frysetørkingen. I tilfeller hvor peptidene har lysin i sekvensen, bør ε-aminet i lysinsidekjeden beskyttes ved hjelp av Dde ved anvendelse av Fmoc-Lys(Dde)-OH-derivat i syntesen (Gregorius og Theisen 2001, innlevert). Etter kobling ble hydrazin fra en 80% løsning tilsatt til en endelig hydrazinkonsentrasjon på mellom 1 og 20% og løsningen ble innkubert i ytterligere 30 minutter ved romtemperatur, frysetørket umiddelbart deretter og dialysert grundig mot H₂O eller avsaltet på en gelfiltreringskolonne før den endelige frysetørkingen. Prinsippet er beskrevet skjematisk i figur 2.

Slike immunogener har blitt utnyttet av oppfinnerne med et kort C-terminalt fragment av *Borrelia burgdorferi*-protein OspC som "peptid A" og en difteritoksoidepitop (P2 eller P30) som et peptid B. Resultatene av immuniseringsstudiene med dette antigenet avslørte at kun immunogenet ifølge oppfinnelsen inkludert OspC-fragmentet og en fremmed difteriepitop som passer til MHC-haplotypen i de vaksinerte musene, var i stand til å indusere antistoffer som var reaktive med OspC i disse musene. I kontrast til dette, var et molekyl som inneholdt kun OspC ikke i stand til å indusere antistoffproduksjon og det samme var tilfellet for en blanding av to immunogener hvor det ene inneholdt OspC og det andre inneholdt epitopen. Det konkluderes derfor med at innsettingen i den samme polyhydroksypolymerbæreren er overlegen, om ikke essensiell, for å indusere antistoffproduksjon mot et kortere peptidhaptent som OspC.

REFERANSELISTE

- Brookmeyer, R.; Gray, S.; Kawas, C. (1998). Projections of Alzheimer's Disease in the United States and the Public Health Impact of Delaying Disease Onset. *American Journal of Public Health*, 88(9), 1337-1342.
- 5 Buttini, M.; Orth, M.; Bellosta, S.; Akeefe, H.; Pitas, R.E.; Wyss-Coray, T.; Mucke, L.; Mahley, R.W. (1999). Expression of Human Apolipoprotein E3 or E4 in the Brains of Apoe^{-/-} Mice: Isoform-Specific Effects on Neurodegeneration. *Journal of Neuroscience*, 19, 4867-4880.
- 10 Clark, L.N.; Poorkaj, P.; Wszolek, Z.; Geschwind, D.H.; Nasreddine, Z.S.; Miller, B.; Li, D.; Payami, H.; Awert, F.; Markopoulou, K.; Andreadis, A.; D'Souza, I.; Lee, V.M.; Reed, L.; Trojanowski, J.Q.; Zhukareva, V.; Bird, T.; Schellenberg, G.; Wilhelmsen, K.C. (1998). Pathogenic Implications of Mutations in the Tau Gene in Pallido-Ponto-Nigral Degeneration and Related Neurodegenerative Disorders Linked to Chromosome 17. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 95(22), 13103-13107.
- 15 Gupta, R.K. *et al.* (1998), *Dev Biol Stand.* 92: 63-78.
- Hsiao K. *et al.* (1998) "Transgenic mice expressing Alzheimer amyloid precursor proteins", *Exp. Gerontol.* 33 (7-8), 883-889.
- 20 Hutton, M.; Lendon, C.L.; Rizzu, P.; Baker, M.; Froelich, S.; Houlden, H.; Pickering-Brown, S.; Chakraverty, S.; Isaacs, A.; Grover, A.; Hackett, J.; Adamson J.; Lincoln, S.; Dickson, D.; Davies, P.; Petersen, R.C.; Stevens, M.; de Graaff, E.; Wauters, E.; van Baren, J.; Hillebrand, M.; Joosse, M.; Kwon, J.M.; Nowotny, P.; Che, L.K.; Norton, J.; Morris, J.C.; Reed, L.E.; Trojanowski, J.; Basun, H.; Lannfelt, L.; Neystat, M.; Fahn, S.; Dark, F.; Tannenberg, T.; Dodd, P.; Hayward, N.; Kwok, J.B.J.; Schofield, P.R.; Andreadis, A.; Snowden, J.; Craufurd, D.; Neary, D.; Owen, F.; Oostra, B.A.; Hardy, J.; Goate, A.; van Swieten, J.; Mann, D.; Lynch, T.; Heutink, P. (1998). Association of Missense and 5'-Splice-Site Mutations in Tau with the Inherited Dementia FTDP-17. *Nature*, 393, 702-705.
- 25 Janus, C. *et al.* (2000), *Nature* 408: 979-982.
- 30 Kas, H.S. (1997) *J Microencapsul* 14: 689-711.
- Leon, J.; Cheng, C.K.; Neumann, P.J. (1998). Alzheimer's Disease Care: Costs and Potential Savings. *Health Affairs*, 17(6), 206-216.
- Lippa, C.F. *et al.* (1998) Ab-42 deposition precedes other changes in PS-1 Alzheimer's disease. *Lancet* 352, 1117-1118.
- 35 Luo, J.-J.; Wallace, W.; Riccioni, T.; Ingram, D.K.; Roth, G.S.; Kusiak, J.W. (1999). Death of PC12 Cells and Hippocampal Neurons Induced by Adeno-viral-

- Mediated FAD Human Amyloid Precursor Protein Gene Expression. *Journal of Neuroscience Research*, 55(5), 629-642.
- Naruse, S.; Thinakaran, G.; Luo, J.-J.; Kusiak, J.W.; Tomita, T.; Iwatsubo, T.; Qian, X.; Gitny, D.D.; Price, D.L.; Borchelt, D.R.; Wong, P.C.; Sisodia, S.S. (1998).
 5 Effects of PS1 Deficiency on Membrane Protein Trafficking in Neurons. *Neuron*, 21(5), 1213-1231.
- National Institute on Aging Progress Report on Alzheimer's Disease, 1999, NIH Publication No. 99-4664.
- Pietrobon, P.J. (1995), *Pharm Biotechnol.* 6: 347-61.
- 10 Poorkaj, P.; Bird, T.D.; Wijsman, E.; Nemens, E.; Garruto, R.M.; Anderson, L.; Andreadis, A.; Wiederhold, W.C.; Raskind, M.; Schellenberg, G.D. (1998). Taus Is a Candidate Gene for Chromosome 17 Frontotemporal Dementis. *Annals of Neurology*, 43, 815-825.
- 15 Schenk, D.; Barbour, R.; Dunn, W.; Gordon, G.; Grajeda, H.; Guido, T.; Hu, K.; Huang, J.; Johnson-Wood, K.; Khan, K.; Kholodenko, D.; Lee, M.; Liao, Z.; Lieberburg, I.; Motter, R.; Mutter, L.; Soriano, F.; Shopp, G.; Vasquez, N.; Vandeventer, C.; Walker, S.; Wogulis, M.; Yednock, T.; Games, D.; Seubert, P. (1999). Immunization with A-beta Attenuates Alzheimer's Disease-Like Pathology in the PDAPP Mouse. *Nature*, 400(6740), 173-177.
- 20 Shekunov, B. *et al.* (1999), *J. Crystal Growth* 198/199: 1345-1351.
- Spillantini, M.G.; Murrell, J.R.; Goedert, M.; Farlow, M.R.; Klug, A.; Ghetti, B. (1998). Mutation in the Tau Gene in Familial Multiple System Tauopathy with Presenile Dementia. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 95(13), 7737-7741.
- 25 Strittmatter, W.J.; Saunders, A.M.; Schmechel, D.; Pericak-Vance, M.; Enghild, J.; Salvesen, G.S.; Roses, A.D. (1993). Apolipoprotein E: High-Avidity Binding to A β and Increased Frequency of Type 4 Allele in Late-Onset Familial Alzheimer Disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 90, 1977-1981.
- 30 Vidal, R.; Frangione, B.; Rostagno, A.; Mead, S.; Revesz, T.; Plant, G.; Ghiso, J. (1999). A Stop-Codon Mutation in the BRI Gene Associated with Familial British Dementia. *Nature*, 399: 776-781.
- Zheng, H. (1996) "Mice deficient for the amyloid precursor protein gene." *Ann. N Y Acad. Sci.*, 777, 421-426.
- York, P. (1999), *PSTT* 11: 430-440.

PATENTKRAV

1. Farmasøytisk sammensetning inneholdende et immunogen som induserer produksjon av antistoff mot dyrets autologe APP eller A β , hvori immunogenet inkorporerer

5 a) en polyamino­syre som består av en polyamino­syre valgt fra gruppen bestående av:

- aminosyrerester 1-12, som er en subsekvens av rester 672-714 av SEKV.ID. NR. 2, A β , etterfulgt av aminosyrerestene til tetanustoksoid-P30-epitopen, etterfulgt av aminosyrerestene til tetanustoksoid-P2-epitopen, etterfulgt av aminosyrerester 13-28, som er en subsekvens av rester 672-714 av SEKV.ID. NR. 2 A β ,

- aminosyrerester 1-12, som er en subsekvens av rester 672-714 av SEKV.ID. NR. 2, A β , etterfulgt av aminosyrerestene til tetanustoksoid-P30-epitopen, etterfulgt av aminosyrerester 1-12, som er en subsekvens av rester 672-714 av SEKV.ID. NR. 2, A β , etterfulgt av aminosyrerestene til tetanustoksoid-P2-epitopen, etterfulgt av aminosyrerester 1-12, som er en subsekvens av rester 672-714 av SEKV.ID. NR. 2, A β ,

- aminosyrerester 13-28, som er en subsekvens av rester 672-714 av SEKV.ID. NR. 2, A β , etterfulgt av aminosyrerestene til tetanustoksoid-P30-epitopen, etterfulgt av aminosyrerester 13-28, som er en subsekvens av rester 672-714 av SEKV.ID. NR. 2, A β , etterfulgt av aminosyrerestene til tetanustoksoid-P2-epitopen, etterfulgt av aminosyrerester 13-28, som er en subsekvens av rester 672-714 av SEKV.ID. NR. 2, A β ,

hvori alle aminosyresekvensene er angitt i retning fra N- til C-terminale ende, eller

25 b) er et konjugat som omfatter en polyhydroksypolymerryggrad hvortil det separat er bundet en polyamino­syre som definert i a); eller

c) er en nukleinsyre som koder for polyamino­syren som definert i a); eller

d) er en ikke-patogen mikroorganisme eller virus som bærer et nukleinsyrefragment som koder for og uttrykker polyamino­syren som definert i a),

for anvendelse i behandling, forebygging eller lindring av Alzheimers sykdom eller andre sykdommer kjennetegnet ved amyloid avleiring.

2. Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 1, hvori i det minste to kopier av polyamino­syren eller konjugatet er kovalent eller ikke-kovalent bundet til et

bærermolekyl som er i stand til å effektivere presentering av flere kopier av antigene determinanter.

3. Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 1 eller 2, variant b), hvori polyaminosyren er bundet til polyhydroksypolymeren ved hjelp av en amidbinding.
- 5 4. Farmasøytisk sammensetning ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, variant b), hvori polyhydroksypolymeren er et polysakkarid.
- 5 5. Farmasøytisk sammensetning ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvori polyaminosyren eller konjugatet er formulert med en adjuvant som letter brytingen av autotoleranse mot autoantigener.
- 10 6. Farmasøytisk sammensetning ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvori det farmasøytiske sammensetning er tilpasset administrering av en effektiv mengde av polyaminosyren eller konjugatet til dyret via en rute valgt fra den parenterale ruten slik som den intrakutane, den subkutane og den intramuskulære ruten; den peritoneale ruten; den orale ruten; den bukale ruten; den sublinguale ruten; den epidurale ruten; den spinale ruten; den anale ruten; og den intrakraniale ruten.
- 15 7. Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 6, hvori den effektive mengden er mellom 0,5 µg og 2000 µg av polyaminosyren eller konjugatet.
- 20 8. Farmasøytisk sammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 1-7, variant c) tilpasset for introduksjon av nukleinsyren eller nukleinsyrene som koder for polyaminosyren eller konjugatet i dyrets celler og derved oppnå *in vivo* ekspresjon av den eller de introduserte nukleinsyrene ved hjelp av cellene.
- 25 9. Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 8, hvori den eller de introduserte nukleinsyrene er valgt fra nakent DNA, DNA formulert med ladde eller ikke ladde lipider, DNA formulert i liposomer, DNA inkludert i en virusvektor, DNA formulert med et transfeksjonslettende protein eller polypeptid, DNA formulert med et målrettet protein eller polypeptid, DNA formulert med kalsiumutfellingsmidler, DNA koblet til et inert bærermolekyl, DNA innkapslet i kitin eller kitosan, og DNA formulert med en adjuvant.
- 30 10. Farmasøytisk sammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 6-9, hvori sammensetningen er tilpasset for i det minste én administrering/introduksjon pr år, slik som i det minste 2, i det minste 3, i det minste 4, i det minste 6 og i det minste 12 administrasjoner/ introduksjoner.
- 35 11. Farmasøytisk sammensetning ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvori det farmasøytisk sammensetning nedregulerer APP eller Aβ i en slik

grad at den totale mengden av amyloid er redusert eller at hastigheten til amyloid dannelse er redusert med klinisk signifikans.

- 5 12. Polyaminyose eller konjugat som er utledet fra et APP eller A β fra dyr, hvori det i polyaminyosen eller konjugatet er introdusert en modifikasjon som har som resultat at immuniseringen av dyret med polyaminyosen eller konjugatet inducerer fremstilling av antistoffer mot dyrets autologe APP eller A β , og hvori polyaminyosen er som definert i et hvilket som helst av kravene 1-4.
- 10 13. Immunogen sammensetning som omfatter en immunogen effektiv mengde av en polyaminyose eller konjugat ifølge krav 12, hvori sammensetningen ytterligere omfatter en farmasøytisk og immunologisk akseptabel bærer og/eller vehikkel og eventuelt en adjuvant, hvori adjuvanten kan være alun.
14. Nukleinsyrefragment, hvori det koder for en polyaminyose ifølge krav 12.
15. Vektor som omfatter nukleinsyrefragmentet ifølge krav 14, slik som vektor som kan replikeres autonomt.
- 15 16. Vektor ifølge krav 15, hvori den er valgt fra en gruppe som består av et plasmid, en fag, et kosmid, et minikromosom og et virus.
- 20 17. Vektor ifølge krav 15 eller 16, hvori den omfatter, i 5'→3'-retningen og operativt bundet, en promotor for å drive ekspresjonen av nukleinsyrefragmentet ifølge krav 14, eventuelt en nukleinsyresekvens som koder for et lederpeptid som er i stand til å utskille polypeptidfragmentet eller å integrere polypeptidfragmentet i membranen, nukleinsyrefragmentet ifølge krav 14, og eventuelt en terminator.
- 25 18. Vektor ifølge et hvilket som helst av kravene 15-17, som når den introduseres i en vertscelle er i stand til eller ikke er i stand til å integreres i vertscellens genom.
19. Vektor ifølge krav 17 eller 18, hvori promotoren driver ekspresjonen i en eukaryot celle og/eller i en prokaryot celle.
20. Transformert celle, hvori den omfatter vektoren ifølge et hvilket som helst av kravene 15-19, slik som en transformert celle som er i stand til å replikere nukleinsyrefragmentet ifølge krav 14.
- 30 21. Transformert celle ifølge krav 20, hvori mikroorganismen er valgt fra en bakterie, en gjær, et protozoan eller en celle utledet fra en multicellulær organisme valgt fra en sopp, en insektcelle så som en S₂- eller en SF-celle, en plantecelle og en pattedyrceelle.
- 35 22. Transformert celle ifølge krav 20 eller 21, hvori cellen uttrykker nukleinsyrefragmentet ifølge krav 14, slik som en transformert celle som skiller ut eller bærer analogen ifølge krav 12 på sin overflate.

23. Farmasøytisk sammensetning i følge krav 1, variant d), hvori immunogenet er tilpasset for administrering av en ikke-patogen mikroorganisme eller virus som bærer et nukleinsyrefragment som koder for og uttrykker polyaminosyren.

5 24. Sammensetning for å indusere fremstilling av antistoffer mot amyloid, hvori sammensetningen omfatter

- et nukleinsyrefragment ifølge krav 14 eller en vektor ifølge et hvilket som helst av kravene 15-19, og
- en farmasøytisk og immunologisk akseptabel bærer og/eller vehikkel og/eller adjuvant.

1/2

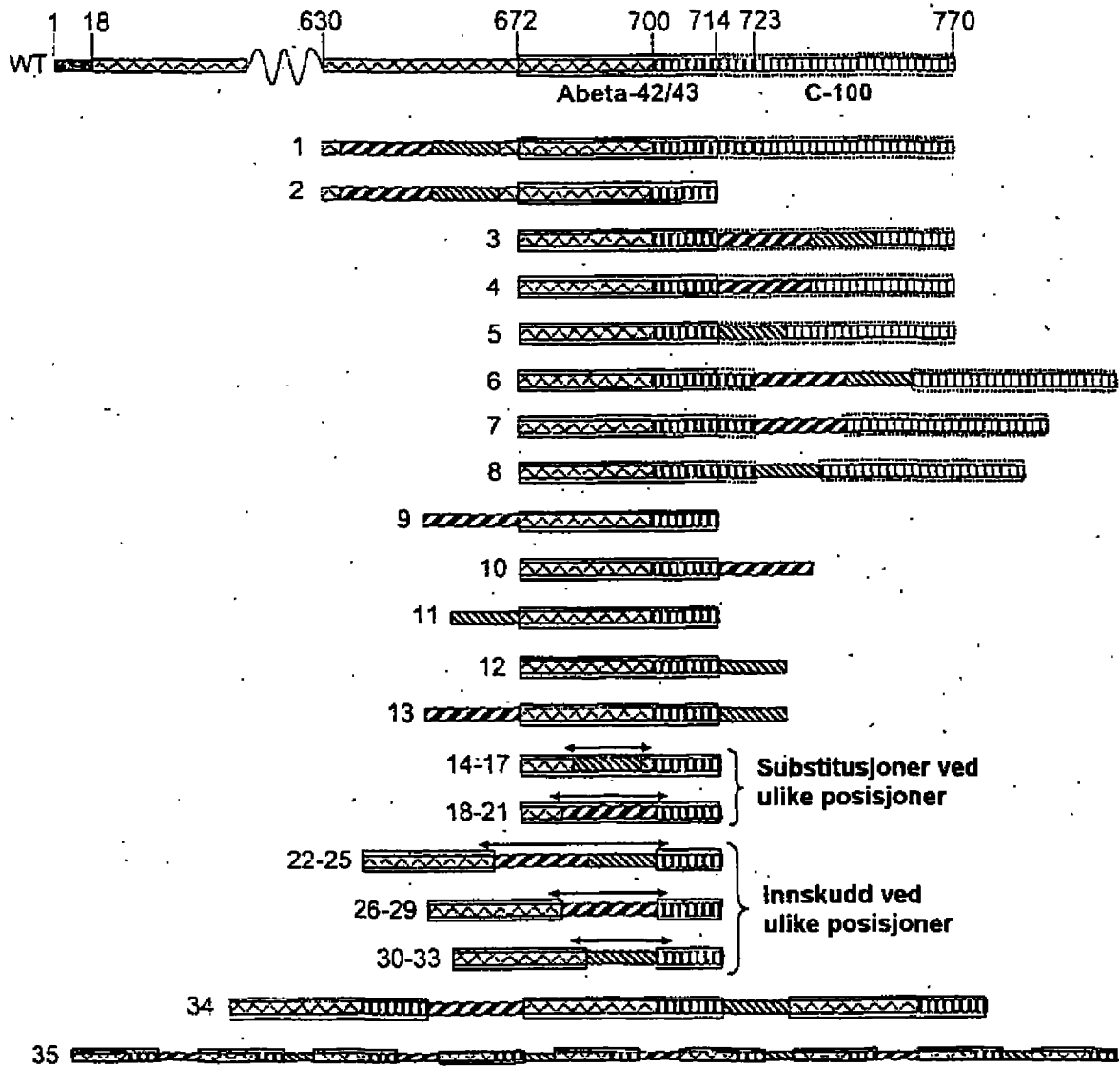


Fig. 1

PEPCO VAC SYNTSESE

2/2

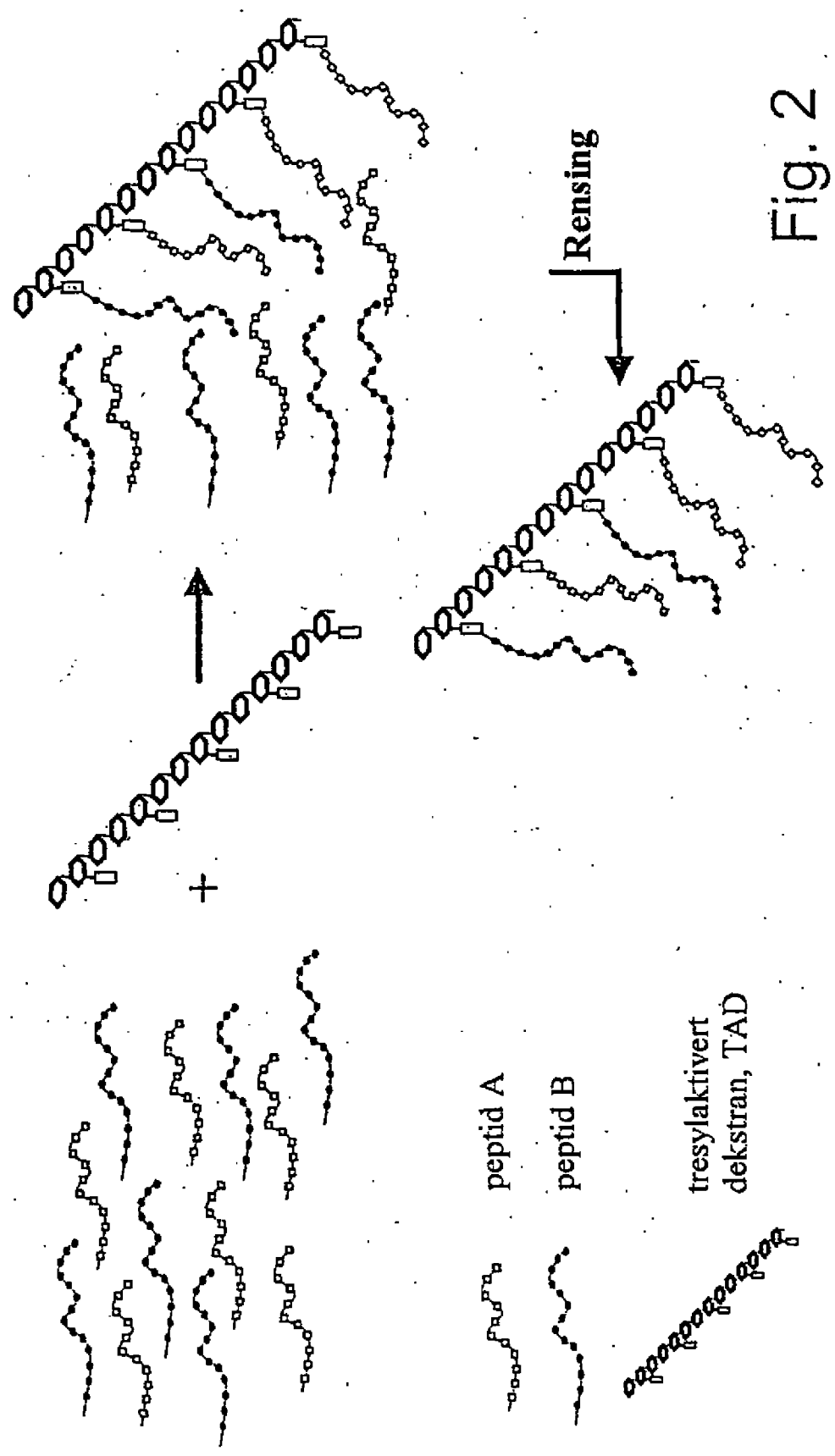


Fig. 2