



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **328865**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

A61K 38/17 (2006.01)
A61K 9/26 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)
A61K 47/24 (2006.01)
A61K 47/34 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20002784	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1998.11.30 PCT/US98/25386
(22)	Inng.dag	2000.05.31	(85)	Videreføringsdag	2000.05.31
(24)	Løpedag	1998.11.30	(30)	Prioritet	1997.12.02, US, 67740 1998.04.07, US, 80970
(41)	Alm.tilgj	2000.07.31			
(45)	Meddelt	2010.06.07			
(73)	Innehaver	Elan Pharma International Ltd, Monksland, IE- ATHLONE, COUNTY WESTMEATH , Irland			
(72)	Oppfinner	Dale B Schenk, Burlingame, CA, US-, USA			
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge			

(54)	Benevnelse	Farmasøytisk sammensetning og immunogent middel samt anvendelse derav		
(56)	Anførte publikasjoner	EP 526511 B1, EP 683234 A1		
(57)	Sammendrag			

Det er beskrevet sammensetninger og fremgangsmåter for behandling av amyloidogene sykdommer. Slike fremgangsmåter innbefatter administrering av et middel som induserer en fordelaktig immunrespons overfor en amyloid deponering i pasienten. Fremgangsmåtene er spesielt nyttige for profylaktisk og terapeutisk behandling av Alzheimers sykdom, I slike metoder utgjør et egnet middel Ap-peptid eller et antistoff derav.

Foreliggende oppfinnelse vedrører det tekniske området immunologi og medisin og omfatter farmasøytisk sammensetning og immunogent middel samt anvendelse derav.

- 5 Alzheimers sykdom (AD) er en progressiv sykdom som resulterer i senil demens. Se generelt Selkoe, TINS 16, 403-409 (1993); Hardy et al., WO 92/13069; Selkoe, J. Neuropathol. Exp. Neurol. 53, 438-447 (1994); Duff et al., Nature 373, 476-477 (1995); Games et al., Nature 373, 523 (1995). Sykdommen faller hovedsakelig inn i to kategorier: sen begynnelse, som
- 10 oppstår ved høy alder (65+ år) og tidlig begynnelse, som utvikles mye før senilperioden, dvs. mellom 35 og 60 år. I begge sykdomstyper er patologien den samme, men unormale tilstander pleier å være mer alvorlige og omfattende i tilfeller begynnende med tidligere alder. Sykdommen er kjennetegnet ved to typer av lesjoner i hjerne, senile plakk, neurofibrilære sammenfiltringer. Senile
- 15 plakk er områder med uorganisert neuropil opptil 150 μm med ekstracellulære amyloiddeponeringer i midten synlige ved mikroskopisk analysing av snitt av hjernevev. Neurofibrilære sammenfiltringer er intracellulære deponeringer av tau-protein bestående av to filamenter tvunnet rundt hverandre i par.
- 20 Hovedbestanddelen av plakkene er et peptid betegnet A β eller β -amyloidpeptid. A β -peptid er et indre fragment med 39-43 aminosyrer av et forløperprotein betegnet amyloid forløperprotein (APP). Flere mutasjoner i APP-proteinet er blitt korrelert med tilstedeværelse av Alzheimers sykdom. Se for eksempel Goate et al., Nature 349, 704 (1991) (valin⁷¹⁷ til isoleucin): Chartier Harlan et al. Nature
- 25 353, 844 (1991)) (valin⁷¹⁷ til glycin); Murrell et al., Science 254, 97 (1991) (valin⁷¹⁷ til fenylalanin); Mullan et al., Nature Genet. 1, 345 (1992) (en dobbel mutasjon som forandrer lysin⁵⁹⁵-methionin⁵⁹⁶ til asparagin⁵⁹⁵-leucin⁵⁹⁶). Slike mutasjoner antas å forårsake Alzheimers sykdom ved å øke eller endre prosessering av APP til A β , spesielt prosessering av APP til forøkte mengder av
- 30 den lange formen av A β (dvs. A β 1-42 og A β 1-43). Mutasjoner i andre gener, så som presenilgener, PS1, og PS2, antas indirekte å påvirke prosessering av APP for å danne økte mengder av A β lang form (se Hardy, TINS 20, 154

(1997)). Disse observasjonene indikerer at A β , og spesielt den lange formen, er et forårsakende element i Alzheimers sykdom.

5 EP 526511 B1 beskriver administrering av lave doser av A β til pasienter med Alzheimers sykdom i en bærer av uspesifisert sammensetning. Administrering av A β i kombinasjon med en adjuvant som definert i foreliggende søknad beskrives ikke.

10 EP 683234 A1 beskriver anvendelse av A β og forskjellige fragmenter derav i kombinasjon med Freunds fullstendige eller ufullstendige adjuvant for dannelsen av antistoffer mot A β .

McMichael, EP 526,511 foreslår administrering av homeopatiske doseringer (mindre enn eller lik 10^{-2} mg/dag) av A β til pasienter med foretablert AD. I et vanlig menneske med omtrent 5 liter plasma vil til og med den øvre grensen av denne doseringen være ventet å danne en konsentrasjon på ikke mer enn 2 pg/ml. Den normale konsentrasjonen av A β i humant plasma er vanligvis i området 50-200 pg/ml (Seubert et al., Nature 359, 325-227 (1992)). På grunn av at EP 526,511 foreslått dosering omtrent ikke vil endre nivået av endogent sirkulerende A β og på grunn av at EP 526,511 ikke anbefaler anvendelse av en adjuvant, synes det ikke å være sannsynlig at noen terapeutisk fordel vil fremkomme.

25 Foreliggende oppfinnelse vedrører en farmasøytisk sammensetning for anvendelse for behandling eller forebygging av sykdom omfattende et immunogent middel som er effektivt for å indusere en immunogen respons mot A β i en pasient, og en farmasøytisk akseptabel adjuvant, hvori middelet er A β eller et immunogent fragment av A β .

30 Foreliggende oppfinnelse vedrører videre et immunogent middel, hvor middelet er A β eller et immunogent av A β for forebygging eller behandling av en sykdom assosiert med amyloide deponeringer av A β i hjernen til en pasient, hvor middelet er tilpasset for ytterligere administrering av en adjuvant som forøker

immunresponsen til A β peptidet, hvori adjuvanten og middelet blir eventuelt administrert sammen i form av en sammensetning.

Det er videre beskrevet anvendelse av et immunogent middel, hvor middelet er
5 A β eller et immunogent fragment av A β , for fremstilling av et medikament for forebygging eller behandling av en sykdom assosiert med amyloide deponeringer av A β i hjernen til en pasient, hvor medikamentet er tilpasset for ytterligere administrering av en adjuvant som for $\ddot{u}$ ker immunresponsen til A β peptidet; idet medikamentet er eventuelt i form av en sammensetning hvor
10 adjuvanten og middelet kan bli administrert sammen.

Det er f $\ddot{o}$ lgelig mulig $\ddot{a}$ forhindre eller behandle en sykdom kjennetegnet ved amyloid deponering i en pasient. Dette kan gj $\ddot{o}$ res ved $\ddot{a}$ indusere en immunrespons mot en peptidkomponent av en amyloid deponering i pasienten.
15 En slik induksjon kan v $\ddot{a}$ re aktiv ved administrering av et immunogen eller passivt ved administrering av et antistoff eller et aktivt fragment eller derivat av antistoff. I noen pasienter er amyloiddeponeringen aggregert A β -peptid og sykdommen er Alzheimers sykdom. I noen metoder er pasienten asymptotisk. I noen metoder er pasienten under 50 $\ddot{a}$ r. I noen metoder har
20 pasienten iboende risikofaktorer som indikerer mottagelighet for Alzheimers sykdom. Slike risikofaktorer innbefatter variant alleler i presenil gen PS1 eller PS2 og variantformer av APP. I andre metoder har pasienten ingen kjente risikofaktorer for Alzheimers sykdom.

25 For behandling av pasienter som lider av Alzheimers sykdom omfatter et behandlingsregime administrering av en dose av A β -peptid til pasienten for $\ddot{a}$ indusere immunresponsen. I noen metoder blir A β -peptidet administrert med en adjuvant som forsterker immunresponsen til A β -peptidet. I noen metoder er adjuvanten alun. I noen metoder er adjuvanten MPL. Dosen av administrert A β -
30 peptid til pasienten er vanligvis minst 1 eller 10 μ g, hvis administrert med adjuvant, og minst 50 μ g hvis administrert uten adjuvant. I noen metoder er dosen minst 100 μ g.

I noen metoder er A β -peptidet A β 1-42. I noen metoder blir A β -peptidet administrert i aggregert form. I andre metoder blir A β -peptidet administrert i dissosiert form. I noen metoder er det terapeutiske middelet en effektiv dose av en nukleinsyre kodende for A β eller et aktivt fragment eller derivat derav.

- 5 Nukleinsyren som koder for A β eller fragmentet derav blir uttrykt i pasienten for å produsere A β eller det aktive fragmentet derav, som induserer immunresponsen. I noen metoder administreres nukleinsyren gjennom huden, eventuelt via et plaster. I noen metoder blir et terapeutisk middel identifisert ved screening av et bibliotek av forbindelser for å identifisere en forbindelse som
- 10 reaktiv med antistoffer mot A β og administrering av forbindelsen til pasienten for å indusere immunresponsen.

- I noen metoder er immunresponsen rettet mot aggregert A β -peptid uten å være rettet mot dissosiert A β -peptid. For eksempel kan immunresponsen omfatte
- 15 antistoffer som blir bundet til aggregert A β -peptid uten binding til dissosiert A β -peptid. I noen metoder omfatter immunresponsen T-celler som bindes A β kompleksbundet med MCH1 eller MHCII på CD8 eller CD4 celler. I andre metoder blir immunresponsen indusert ved administrering av et antistoff mot A β til pasienten. I noen metoder er immunresponsen indusert ved fjerning av T-
- 20 celler fra pasienten, kontakting av T-cellene med A β -peptid under betingelser hvor T-cellene blir primet, og erstatning av T-cellene i pasienten.

- Det terapeutiske middelet blir vanligvis administrert oralt, intranasalt, intradermalt, subkutant, intramuskulært, topisk eller intravenøst. I noen metoder
- 25 blir pasienten registrert etter administrering for å vurdere immunresponsen. Dersom registreringen indikerer en reduksjon av immunresponsen over tid kan pasienten bli gitt en eller flere ytterligere doser av middelet.

- I et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen farmasøytisk sammensetning ifølge
- 30 krav 1, et middel ifølge krav 2 eller anvendelse ifølge krav 3, hvor nevnte forebygging eller behandling blir registrert ved analysing av antistoffresponsene overfor det immunogene middelet over tid.

Oppfinnelsen tilveiebringer også farmasøytisk sammensetning, middel eller anvendelse ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvor A β er

- i. A β 43;
- 5 ii. A β 42;
- iii. A β 41;
- iv. A β 40; eller
- v. A β 39.

10 Oppfinnelsen tilveiebringer videre sammensetning, middel eller anvendelse ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvor det immunogene A β fragmentet er fra den N-terminale halvdelen av A β .

Oppfinnelsen tilveiebringer også farmasøytisk sammensetning, middel eller
15 anvendelse ifølge krav 6, hvor det immunogene A β fragmentet er A β 1-5 eller A β 1-6.

Oppfinnelsen tilveiebringer videre farmasøytisk sammensetning, middel eller anvendelse ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvor det
20 immunogene middelet inkluderer multimerer av det monomere immunogene middelet angitt i hvilke som helst av kravene 5-7.

I et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen farmasøytisk sammensetning, middel eller anvendelse ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene,
25 omfattende en dose som er høyere enn 10 μ g av det immunogene middelet.

Foreliggende oppfinnelse vedrører også farmasøytisk sammensetning, middel eller anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1-9, hvor adjuvanten
omfatter alum.

30

Det er videre beskrevet farmasøytisk sammensetning, middel eller anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1-9, hvor adjuvanten omfatter 3 De-O-acylert monofosforyl lipid A (MPLTM).

Oppfinnelsen beskriver videre farmasøytisk sammensetning, middel eller anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1-9, hvori adjuvanten omfatter StimulonTM QS-21.

- 5 Foreliggende oppfinnelse vedrører også farmasøytisk sammensetning, middel eller anvendelse ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvori middelet er en komponent av en partikkel.

- 10 Det er også beskrevet farmasøytisk sammensetning, middel eller anvendelse ifølge krav 13, hvor partikkelen er et liposom eller en mikropartikkel og middelet er emulgert eller innkapslet i liposomet eller mikropartikkelen.

- 15 Foreliggende oppfinnelse vedrører også farmasøytisk sammensetning, middel eller anvendelse ifølge krav 14, hvor partikkelen eller mikropartikkelen er en polylaktid polyglykolid kopolymer (PLGP) partikkel eller mikropartikkel.

- Det er også beskrevet farmasøytisk sammensetning, middel eller anvendelse ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvor sykdommen er Alzheimers sykdom.

20

Oppfinnelsen beskriver videre farmasøytisk sammensetning, middel eller anvendelse ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvor pasienten er:

- 25 a. asymptomatisk; og/eller
 b. under 50; og/eller
 i. har arvelige risikofaktorer som indikerer mottakelighet for Alzheimers sykdom; eller
 ii. har ingen kjente risikofaktorer for Alzheimers sykdom.

30

KORT BESKRIVELSE AV FIGURENE

Fig. 1: antistofftiter etter injeksjon av transgene mus med A β 1-42

Fig. 2: amyloid belastning i hippocampus. Prosentandel av arealet til hippocampal regionen okkupert av amyloide plakk, definert ved reaktiviteten med A β -spesifikk mAb 3D6, ble bestemt ved data-assistert kvantitativ billeddannende analyse av immunreagerte hjernesnitt. Verdier for individuelle mus er vist inndelt i behandlingsgruppe. Den horisontale linjen for hver gruppering indikerer middelsdistribusjonsverdi.

Fig. 3: analytisk dystrofi i hippocampus. Prosentandel av arealet til hippocampalregionen okkupert av dystrofiske neuritter, definert ved deres reaktivitet med human APP-spesifikk mAb 8E5, ble bestemt ved kvantitativ data-assistert billeddannende analyse av immunreagerte hjernesnitt. Verdier for individuelle mus er vist AN1792-behandlet gruppe og PBS-behandlet kontrollgruppe. Den horisontale linjen til hver gruppering indikerer middels distribusjonsverdi.

Fig. 4: astrocytose i retrosplenial korteks. Prosentandel av arealet til kortikal regionen okkupert av glial fibrilært syreprotein (GFAP)-positive astrocyter ble bestemt ved kvantitativ data-assistert billeddannende analyse av immunreagerte hjernesnitt. Verdier for individuelle mus er vist inndelt i behandlingsgruppe og middels gruppeverdier er indikert med horisontale linjer.

Fig. 5: geometriske gjennomsnittlige antistofftitere til A β 1-42 etter immunisering med et område omfattende 8 doser av AN1792 inneholdende 0,14, 0,4, 1,2 3,7, 11, 33, 100 eller 300 μ .

Fig. 6: kinetikk til antistoffrespons mot AN1792 immunisering. Titere blir uttrykt som geometriske gjennomsnitt av verdier for 6 dyr i hver gruppe.

Fig. 7: kvantitativ billedanalyse av kortikal amyloidbelastning i PBS- og AN1792-behandlede mus.

Fig. 8: kvantitativ billedanalyse av neurittisk plakkebelastning i PBS- og AN1792-behandlede mus.

Fig. 9: kvantitativ billedanalyse av prosent av retrosplenial korteks okkupert av astrocytoser i PBS- og AN1792-behandlede mus.

Fig. 10: lymfocytt proliferasjonsanalyse på miltceller fra AN1792-behandlede (øvre panel) eller PBS-behandlede (lavere panel).

Fig. 11: totale A β -nivåer i korteks. Et spredningsplott av individuelle A β -profiler i mus immunisert med A β eller APP-derivater kombinert med Freund's adjuvant.

Fig. 12: amyloid belastning i korteks ble bestemt ved kvantitative billedanalyser av immunreagerte hjernesnitt for mus immunisert med A β -peptidkonjugatene A β 1-5, A β 1-12 og A β 13-28; full lengde A β -aggregatene AN1792 (A β 1-42) og AN1528 (A β 1-40) og PBS-behandlet kontrollgruppe.

Fig. 13: geometriske gjennomsnittstiter av A β -spesifikt antistoff for grupper av mus immunisert med A β eller APP-derivater kombinert med Freund's adjuvant.

Fig. 14: geometriske gjennomsnittstiter av A β -spesifikt antistoff for grupper av marsvin immunisert med AN1792, eller et palmitoylert derivat derav, kombinert med forskjellige adjuvants.

Fig. 15: A β -nivåer i korteks til 12 måneder gamle PDAPP mus behandlet med AN1792 eller AN1528 med forskjellige adjuvants.

DEFINISJONER

Betegnelsen "vesentlig identitet" betyr at to peptidskevnser, når optimalt oppstilt, så som ved programmene GAP eller BESTFIT ved anvendelse av standard gap-vektorer, har til felles minst 65 prosent sekvensidentitet, fortrinnsvis minst 80 eller 90% sekvensidentitet, mer foretrukket minst 95% sekvensidentitet eller mer (for eksempel 99% sekvensidentitet eller høyere). Residueposisjoner som ikke er identiske er forskjellige ved konservative aminosyresubstitusjoner.

For sekvenssammenligning virker vanligvis en sekvens som en referansesekvens som testsekvenser blir sammenlignet med. Ved anvendelse av en sekvenssammenligningsalgoritme blir test og referansesekvenser matet inn i en datamaskin, subsekvens koordinater blir angitt, om nødvendig, og

5 sekvensalgoritmeprogramparametere blir konstruert. Sekvenssammenligningsalgoritmen beregner deretter prosent sekvensidentitet til testsekvensen i forhold til referansesekvensen, basert på angitte programparametere.

Optimal oppstilling av sekvenser for sammenligning kan bli utført, for eksempel

10 ved lokal homologi algoritme til Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), ved homologioppstillingsalgoritmen ifølge Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970) ved søk etter likhetsmetoden til Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988) ved dataassisterte

15 implementeringer av disse algoritmene (GAP, BESTFIT, FASTA, og TFASTA i Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), eller ved visuell inspeksjon (se generelt Ausubel et al., supra). Et eksempel på algoritme som er egnet for å bestemme prosent sekvensidentitet og sekvenslikhet er BLAST algoritmen som er beskrevet i

20 Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990). Programvare for å utføre BLAST analyser er offentlig tilgjengelig fra National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Standardprogramparametere kan bli anvendt for å utføre sekvenssammenligning til tross for at tilpassede

25 parametere også kan bli anvendt. For aminosyresekvenser anvender BLASTP programmet som standard en ordlengde (W) på 3, en forventning (E) på 10 og BLOSUM62 scoringsmatriks (se Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10915 (1989)).

For å klassifisere aminosyresubstitusjoner som konservative eller ikke-konservative er aminosyrer gruppert som følger: gruppe I (hydrofobe

30 sidekjeder): norleucin, met, ala, val, leu, ile; gruppe II (nøytrale hydrofile sidekjeder): cys, ser, thr; gruppe III (sure sidekjeder): asp, glu; gruppe IV (basiske sidekjeder): asn, gln, his, lys, arg; gruppe V (residuer som innvirker på kjedeorientering): gly, pro; og gruppe VI (aromatiske sidekjeder), trp, tyr, phe. Konservative substitusjoner som innbefatter substitusjoner mellom aminosyrene

i samme klasse. Ikke-konservative substitusjoner utgjør utveksling av et medlem fra en av disse klassene med et medlem fra en annen.

Terapeutiske midler ifølge oppfinnelsen er typisk vesentlig rene. Dette betyr at
 5 et middel har vanligvis en renhet på minst omtrent 50% v/v (vekt/vekt), i tillegg at det er vesentlig fri for interfererende proteiner og kontaminanter. Noen ganger har midlene en renhet på minst på omtrent 80% v/v og fortrinnsvis minst 90 eller omtrent 95% v/v. Ved anvendelse av konvensjonelle proteinrensningsteknikker kan homogene peptider med minst 99% v/v bli
 10 oppnådd.

Spesifikk binding mellom to grupper betyr en affinitet på minst 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 M^{-1} , eller $10^{10} M^{-1}$. Affiniteter høyere enn $10^8 M^{-1}$ er foretrukket.

15 Betegnelsen "antistoff" blir anvendt for å innbefatte intakte antistoffer og bindingsfragmenter derav. Vanligvis konkurrerer fragmenter med det intakte antistoffet som de er avledet fra for spesifikk binding til et antigen. Eventuelt kan antistoffer eller bindingsfragmenter derav bli kjemisk konjugert til, eller uttrykt som, fusjonsproteiner med andre proteiner.

20 APP⁶⁹⁵, APP⁷⁵¹ og APP⁷⁷⁰ refererer henholdsvis til 695, 751 og 770 aminosyreresidie lange polypeptider som blir kodet av humant APP-gen. Se Kang et al., Nature 325, 773 (1987); Ponte et al., Nature 331, 525 (1988); og Kitaguchi et al., Nature 331, 530 (1988). Aminosyrer innenfor humant amyloid
 25 forløperprotein (APP) er tildelt tall ifølge sekvensen til APP770 isoformen. Betegnelsen så som A β 39, A β 40, A β 41, A β 42 og A β 43 refererer til et A β -peptid inneholdende aminosyreresidier 1-39, 1-40, 1-41, 1-42 og 1-43.

Betegnelsen "epitope" eller "antigen determinant" refererer til et sete på et
 30 antigen som B og/eller T-celler reagerer på. B-celleepitoper kan bli dannet både fra tilgrensende aminosyrer eller ikke-tilgrensende aminosyrer ved siden av liggende ved tertiær folding av et protein. Epitoper dannet fra tilgrensende aminosyrer blir vanligvis beholdt ved eksponering for denaturerende løsningsmidler, mens epitoper dannet ved tertiær folding vanligvis går tapt ved

behandling med denaturerende løsningsmidler. En epitope innbefatter vanligvis minst 3, og ytterligere mer vanlig, minst 5 eller 8-10 aminosyrer i en unik romlig konformasjon. Fremgangsmåte for å bestemme romlig konformasjon til epitopene innbefatter, for eksempel, røntgen krystallografi og 2-dimensjonal nukleær magnetisk resonans. Se for eksempel Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66. Glenn E. Morris, Ed. (1996). Antistoffer som gjenkjenner den samme epitopen kan bli identifisert i en enkel immunanalyse som viser evnen som et antistoff har til å blokkere bindingen av et annet antistoff til et målantigen. T-celler gjenkjenner kontinuerlig epitoper på omtrent 9 aminosyrer for CD8 celler eller omtrent 13-15 aminosyrer for CD4 celler. T-celler som gjenkjenner epitopen kan bli identifisert ved in vitro analyser som måler antigen-avhengig proliferasjon, som bestemt ved ^3H -thymidin innkorporering av primede T-celler i respons til en epitope (Bruke et al., J. Inf. Dis. 170, 1110-19 (1994)), ved antigen-avhengig dreping (cytotoksisk T lymfocyt analyse, Tigges et al., J. Immunol. 156, 3901-3910) eller ved cytokin sekresjon.

Betegnelsen "immunologisk" eller "immun"-respons" er utviklingen av en fordelaktig humoral (antistoff mediert) og/eller en cellulær (mediert av antigen-spesifikke T-celler eller deres sekresjonsprodukter) respons direkte mot et amyloidpeptid i en mottagerpasient. En slik respons kan være en aktiv respons indusert ved administrering av immunogenet eller en passiv respons indusert ved administrering av antistoff eller primede T-celler. En cellulær immunrespons blir utløst ved presentasjon av polypeptidepitoper i assosiasjon med klasse I eller klasse II MHC-molekyler for å aktivere antigen-spesifikke CD4^+ T-hjelpeceller og/eller CD8^+ cytotoxiske T-celler. Responsen kan innbefatte aktivering av monocyter, makrofager, NK-celler, basofiler, dentrittiske celler, astrocyter, mikrogliale celler, eosinofiler eller andre komponenter av iboende immunitet. Tilstedeværelse av en celle-mediert immunologisk respons kan bli bestemt ved proliferasjonsanalyser (CD4^+ T-celler) eller CTL (cytotoksisk T-lymfocytanalyse (se Burke, supra; Tigges, supra). De relative bidragene til humorale og cellulære responser overfor beskyttende eller terapeutisk effekt til en immunogen kan bli skjelnet ved å separat isolere IgG og T-celler fra et

immunisert syngenisisk dyr og måling av beskyttende eller terapeutisk effekt i et andre individ.

Et "immunogent middel" eller "immunogen" har evnen til å indusere en
5 immunologisk respons mot seg selv ved administrering til en pasient, eventuelt sammen med en adjuvant.

Betegnelsen "nakent" polypeptid refererer til et polynukleotid ikke kompleksbundet med koloidale materialer. Nakne polynukleotider blir noen
10 ganger klonet i en plasmidvektor.

Betegnelsen "adjuvat" refererer til en forbindelse som når administrert sammen med et antigen øker immunresponsen til antigenet, men når administrert alene danner det ikke en immunrespons overfor antigenet. Adjuvants kan øke en
15 immunrespons ved flere mekanismer som innbefatter lymfocytt rekruttering, stimulering av B og/eller T-celler og stimulering av makrofager.

Betegnelsen "pasient" innbefatter menneske eller andre pattedyrindivider som mottar enten profylaktisk eller terapeutisk behandling.

20

Dissaggregert eller monomeriske A β betyr oppløselige, monomere peptidenheter av A β . En metode for å danne monomere A β er å oppløse lyofilisert peptid i kun DMSO med sonikering. Den resulterende løsningen blir sentrifugert for å fjerne eventuelle ikke-oppløselige partikler. Aggregert A β er en
25 blanding av oligomerer hvor de monomere enhetene blir holdt sammen av ikke-kovalente bindinger.

Sammensetninger eller fremgangsmåter "omfattende" en eller flere angitte elementer kan innbefatte andre elementer som ikke er spesifikt angitt. For
30 eksempel kan en sammensetning som omfatter A β -peptid omfatte både et isolert A β -peptid og A β -peptid som en komponent av en større polypeptidsekvens.

I. Generelt

Oppfinnelsen tilveiebringer farmasøytiske sammensetninger og fremgangsmåter for profylaktisk og terapeutisk behandling av sykdommer kjennetegnet ved akkumulering av alyloide deponeringer. Amyloide deponeringer omfatter et peptid aggregert til en uoppløselig masse. Naturen til peptidet varierer i forskjellige sykdommer, men i de fleste tilfellene har aggregatet en β -foldet arkstruktur og farves med Congo rødt farvestoff. Sykdommer kjennetegnet med amyloid-deponeringer innbefatter Alzheimers sykdom (AD) både sene og tidlige forløp. I begge sykdommene omfatter amyloid-deponeringen et peptid betegnet A β som akkumulerer i hjernen til påvirkede individer. Eksempler på noen andre sykdommer kjennetegnet ved amyloid-deponeringer er SAA amyloidose, arvelig islandsk syndrom, multippel myelom og spongiform encefalopatier, inkludert kugalskap, Creutzfeldt Jakob sykdom, skrapesyke og mink spongiform encefalopati (se Weissmann et al., Curr. Opin. Neurobiol. 7, 695-700 (1997); Nathanson et al., Am. J. Epidemiol. 145, 959-969 (1997)). Peptider som danner aggregatene i disse sykdommene er serum amyloid A, cystatin C, IgG kappa lettkjede, henholdsvis for de første tre og prionprotein i de andre.

II. Terapeutiske midler

1. Alzheimers sykdom

Terapeutiske midler for anvendelse i foreliggende oppfinnelse induserer en immunrespons mot A β -peptid. Disse midlene innbefatter selve A β -peptidet og varianter derav, analoger og mimetikker av A β -peptid som induserer og/eller kryssreagerer med antistoffer mot A β -peptid, og antistoffer eller T-celler reaktive med A β -peptid. Induksjon av en immunrespons kan være aktiv som når et immunogen blir administrert for å indusere antistoffer eller T-celler reaktive med A β i en pasient, eller passive, som når et antistoff blir administrert som i seg selv bindes til A β i pasienten.

A β , også kjent som β -amyloidpeptid, eller A4-peptid (se US-PS 4.666.829; Glenner & Wong, Biochem, Biophys, Res. Commun. 120, 1131 (1984)), er et peptid med 39-43 aminosyrer som er hovedkomponenten i karakteristiske plakk i Alzheimers sykdom. A β blir dannet ved prosessering av et større protein APP

av to enzymer, betegnet β og γ sekretaser (se Hardy, TINS, 20, 154 (1997)). Kjente mutasjoner i APP assosiert med Alzheimers sykdom oppstår proksimat for sete til β eller γ sekretase, eller innenfor A β . For eksempel er posisjonen 717 proksimat for setet til γ -sekretase spaltning av APP ved prosessering til A β , og posisjonene 670/671 er proksimate for setet til β -sekretase spaltning. Det antas at mutasjoner forårsaker AD-sykdom ved å reagere med spaltningsreaksjoner hvorved A β blir dannet for å øke mengden av 42/43 aminosyreformen til A β som blir dannet.

- 10 A β har den uvanlige egenskapen at det kan fikse og aktivere både klassiske og alternative komplementkaskader. Det bindes spesielt til C1q og til slutt til C3bi. Denne assosiasjonen letter binding til makrofager som fører til aktivering av β -celler. I tillegg brytes C3bi ytterligere ned og bindes deretter til CR2 på B-celler på en T-celle avhengig måte som fører til en 10.000 ganger økning i 15 aktivering av disse cellene. Denne mekanismen forårsaker at A β danner en immunrespons som er større enn den til andre antigener.

Det terapeutiske middelet anvendt i de krevde metodene kan være hvilke som helst av de naturlige forekommende formene av A β -peptid, og spesielt de humane formene (dvs. A β 39, A β 40, A β 41, A β 42 eller A β 43). Sekvenser av disse peptidene og deres forhold til APP forløperen er illustrert i fig. 1 til Hardy et al., TINS 20, 155-158 (1997). For eksempel har A β 42 sekvensen:

25 H₂N-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His
Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-
Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala-OH.

A β 41, A β 40 og A β 39 er forskjellige fra A β 42 ved utelatelse av Ala, Ala-Ile, og Ala-Ile-Val fra den C-terminale enden. A β 43 er forskjellig fra A β 42 ved tilstedeværelse av et treonin residie med C-terminus. Det terapeutiske middelet 30 kan også være et aktivt fragment eller en analog av et naturlig A β -peptid som inneholder en epitope som induserer en lignende beskyttende eller terapeutisk immunrespons ved administrering til et menneske. Immunogene fragmenter har vanligvis en sekvens på minst 3, 5, 6, 10 eller 20 tilstøtende aminosyrer fra et

naturlig peptid. Immunogene fragmenter innbefatter A β 1-5, 1-6, 1-12, 13-28, 17-28, 25-25, 35-40 og 35-42. Fragmenter fra den N-terminale halvdel av A β er foretrukket i noen metoder. Analoge innbefatter alleliske, arter og induserte varianter. Analoge avviker vanligvis fra naturlig forekommende peptider ved en eller noen få posisjoner, ofte i kraft av konservative substitusjoner. Analoge utviser vanligvis minst 80 eller 90% sekvensidentitet med naturlige peptider. Noen analoge innbefatter også unaturlige aminosyrer eller modifikasjoner i N eller C-terminale aminosyrer. Eksempler på unaturlige aminosyrer er α,α -disubstituerte aminosyrer, N-alkylaminosyrer, melkesyre, 4-hydroksyprolin, γ -karboksylglutamat, ϵ -N,N,N-trimetyllysin, ϵ -N-acetyllysin, O-fosfoserin, N-acetylserin, N-formylmetionin, 3-metylhistidin, 5-hydroksyllysin, ω -N-metylarginin. Fragmenter og analoge kan bli screenet for profylaktisk eller terapeutisk effektivitet i transgene dyremodeller som beskrevet nedenfor.

A β , dets fragmenter, analoge og andre amyloidogene peptider kan bli syntetisert ved fast fase peptidsyntese eller rekombinant ekspresjon, eller kan bli oppnådd fra naturlige kilder. Automatisk peptidsyntesemaskiner er kommersielt tilgjengelige fra en mengde forhandlere, så som Applied Biosystems, Foster City, California. Rekombinant ekspresjon kan være i bakterier, så som E. coli, gjær, insektceller eller pattedyrceller. Prosedyrer for rekombinant ekspresjon er beskrevet av Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (C.S.H.P. Press, NY 2d ed., 1989). Noen former av A β -peptidet er også tilgjengelig kommersielt (for eksempel American Peptides Company, Inc., Sunnyvale, CA og California Peptide Research, Inc. Napa, CA).

Terapeutiske midler innbefatter også lengre polypeptider som innbefatter for eksempel et A β -peptid, aktivt fragment eller analog sammen med andre aminosyrer. For eksempel kan A β -peptidet være tilstede som intakt APP-protein eller et segment derav, så som C-100 fragmentet som begynner ved den N-terminale enden av A β og som fortsetter til enden av APP. Slike polypeptider kan bli screenet for profylaktisk eller terapeutisk effektivitet i dyremodeller som beskrevet nedenfor. A β -peptid, analog, aktivt fragment eller annet polypeptid kan bli administrert i assosiert form (dvs. som et amyloid peptid) eller i dissosiert

form. Terapeutiske midler innbefatter også multimerer av monomere immunogene midler.

I en ytterligere variasjon kan et immunogent peptid, så som A β bli presentert
 5 som en viral eller bakteriell vaksine. En nukleinsyre kodende for det immunogene peptidet blir innkorporert inn i et genom eller episom av viruset eller bakterien. Eventuelt blir nukleinsyren innkorporert på en slik måte at det immunogene peptidet blir uttrykt som et utskilt protein eller som et fusjonsprotein med et ytreoverflateprotein fra et virus eller et transmembrant
 10 protein til en bakterie slik at peptidet blir fremvist. Viruser eller bakterier anvendt i slike metoder bør være ikke-patogene eller attenuerte. Egnede viruser innbefatter adenovirus, HSV, vaksinia og fowl pox. Fusjon av et immunogent peptid til HbsAg av HBV er spesielt egnet. Terapeutiske midler innbefatter også peptider og andre forbindelser som ikke nødvendigvis har en signifikant
 15 aminosyresekvenslikhet med A β , men som til tross for dette virker som etterligninger av A β og induserer en lignende immunrespons. For eksempel kan et hvilket som helst peptid eller protein som danner β -foldede ark bli screenet hvis egnet. Anti-idiotypiske antistoffer mot monoklonale antistoffer til A β eller andre amyloidogene peptider kan også bli anvendt. Slike anti-Id antistoffer
 20 etterligner antigenet og danner en immunrespons mot denne (se Essential Immunology (Roit ed., Blackwell Scientific Publications, Palo Alto, 6th ed.), s. 181).

Tilfeldige bibliotek av peptider eller andre forbindelser kan også bli screenet
 25 hvis hensiktsmessig. Kombinatoriske bibliotek kan bli dannet for mange typer av forbindelser som kan bli syntetisert på en trinn-ved-trinn måte. Slike forbindelser innbefatter peptider, beta-turn mimetics, polysakkarider, fosfolipider, hormoner, prostaglandiner, steroider, aromatiske forbindelser, heterocykliske forbindelser, benzodiazepiner, oligomere N-substituerte glyciner og oligokarbamater. Store
 30 kombinatoriske bibliotek av forbindelsene kan bli konstruert av kodede syntetiske bibliotek (ESL) metoden beskrevet i Affymax, WO95/12608, Affymax, WO93/06121, Columbia University, WO 94/08051, Pharmacopeia, WO

95/35503 og Scripps, WO 95/30642. Peptidbibliotek kan også bli dannet ifølge fagdisplaymetoder. Se for eksempel Devlin, WO 91/18980.

Kombinatoriske bibliotek og andre forbindelser blir innledningsvis screenet ved
 5 å bestemme deres evne til å bli bundet til antistoffer eller lymfocytter (B eller T)
 kjent for å være spesifikke for A β eller andre amyloidogene peptider. For
 eksempel kan innledende screeninger bli utført med et hvilket som helst
 polyklonalt sera eller monoklonalt antistoff mot A β eller annet amyloidogent
 peptid. Forbindelser identifisert ved slike screeninger blir deretter ytterligere
 10 analysert for deres evne til å indusere antistoffer eller reaktive lymfocytter mot
 A β eller annet amyloidogent peptid. For eksempel kan multiple fortyninger av
 sera bli behandlet på mikrotiterskåler som er blitt forbelagt med A β -peptid og en
 standard ELISA kan bli utført for å teste for reaktive antistoffer mot A β .
 Forbindelsene kan deretter bli testet for profylaktisk og terapeutisk effektivitet i
 15 transgene dyr på forhånd disponert for en amyloidogen sykdom, som beskrevet
 i eksemplene. Slike dyr innbefatter for eksempel mus som bærer en 717
 mutasjon i APP beskrevet av Games et al., supra og mus som bærer en svens
 mutasjon av APP som beskrevet av McConlounge et al., US 5,612,486 og Hsiao
 et al., Science 274, 99 (1996); Staufenbiel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94,
 20 13287-13292 (1997); Sturchler-Pierrat et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94,
 13287-13292 (1997); Borchelt et al., Neuron 19, 939-945 (1997)). Samme
 screeningsmetode kan bli anvendt på andre potensielle midler så som
 fragmenter av A β , analoger av A β og lengre peptider som innbefatter A β ,
 beskrevet ovenfor.

25

2. Andre sykdommer

Det samme eller analoge prinsipper bestemmer produksjon av terapeutiske
 midler for behandling av andre amyloidogene sykdommer. Generelt kan midler
 angitt ovenfor for anvendelse ved behandling av Alzheimers sykdom også bli
 30 anvendt for behandling av tidlig forløp av Alzheimers sykdom assosiert med
 Downs syndrom. I kugalskap blir prionpeptid, aktive fragmenter og analoger, og
 antistoffer mot prionpeptidet anvendt istedenfor A β -peptidet, aktiverte
 fragmenter, analoger og antistoffer mot A β -peptidet for behandling av

Alzheimers sykdom. Ved behandling av multipel myelom blir IgG lett kjede og analoger og antistoffer dertil anvendt osv. i andre sykdommer.

3. Bærerproteiner

- 5 Noen midler for indusering av en immunrespons inneholder den hensiktsmessige epitopen for indusering av en immunrespons mot amyloid deponeringer, men er for små til å være immunogene. I denne situasjonen kan et peptidimmunogen bli koblet til en egnet bærer for å hjelpe og utløse en immunrespons. Egnede bærere innbefatter serumalbuminer, høyhole limpet
- 10 hemocyanin, immunoglobulinmolekyler, thyroglobulin, ovalbumin, tetanus toksoid eller et toksoid fra en annen patogen bakterie, så som diphteria, E. coli, cholera, eller H. Pylori, eller et attenuert toksinderivat. Andre bærere for stimulering eller fremming av en immunrespons innbefatter cytokiner så som IL-1, IL-1 α og β peptider, IL-2, γ INF, IL-10, GM-CSF og kjemokiner, så som
- 15 M1P1 α og β og RANTES. Immunogene midler kan også bli koblet til peptider som forsterker transporten over vev, som beskrevet i O'Mahony, WO 97/17613 og WO 97/17614.

Immunogene midler kan bli koblet til bærere ved kjemisk kryssbinding.

- 20 Teknikker for binding av et immunogen til en bærer innbefatter dannelsen av disulfidbindinger ved anvendelse av N-suksinimidyl-3-(2-pyridyl-tio)propionat (SPDP) og suksinimidyl 4-(N-maleimidometyl)cykloheksan-1-karboksylat (SMCC) (dersom peptidet mangler en sulfonylgruppe kan dette bli tilveiebrakt ved tilsetning av et cysteinresidie). Disse reagensene danner en disulfidbinding
- 25 mellom seg selv og peptidcysteinresidier på et protein og en amidbinding gjennom ϵ -amino på et lysin, eller en annen fri aminogruppe i andre aminosyrer. En mengde av slike disulfid/amid-dannende midler er beskrevet av Immun. Rev. 62, 185 (1982). Andre bifunksjonelle koblingsmidler danner en tioeter istedenfor en disulfidbinding. Mange av disse tio-eter-dannende midlene er kommersielt
- 30 tilgjengelige og innbefatter reaktive estere av 6-maleimidokaproinsyre, 2-bromeddiksyre og 2-iodeddiksyre, 4-(N-maleimido-metyl)cykloheksan-1-karboksylsyre. Karboksylgruppene kan bli aktivert ved kombinerings av disse med suksinimid eller 1-hydroksyl-1-nitro-4-sulfonsyre, natriumsalt.

Immunogene peptider kan også bli uttrykt som fusjonsproteiner med bærere. Det immunogene peptidet kan bli koblet ved aminoternale enden, karboksylterminale enden eller i det indre til bæreren. Eventuelt kan multiple gjentakelser av immunogent peptid bli presentert i fusjonsproteinet.

5

4. Nukleinsyrekodende immunogener

Immunresponser mot amyloide deponeringer kan også bli indusert ved administrering av nukleinsyrer kodende for A β -peptid eller andre peptidimmunogener. Slike nukleinsyrer kan være DNA eller RNA. Et
 10 nukleinsyresegment kodende for immunogenet blir vanligvis koblet til regulatoriske elementer, så som en promoter og en enhancer, som muliggjør ekspresjon av DNA-segmentet i antatt målceller til en pasient. For ekspresjon i blodcellene, som ønskelig for induksjon av en immunrespons, er promoter- og enhancer-elementer fra lette eller tungkjedede immunoglobuliner eller CMV
 15 major intermediate early promoter og enhancer egnede for å lede ekspresjonen. Koblede regulatoriske elementer og kodede sekvenser blir ofte klonet inn i en vektor.

En rekke virale vektorsystemer er tilgjengelige inkludert retrovirale systemer (se
 20 for eksempel Lawrie and Tumin, Cur. Opin. Genet. Develop. 3, 102-109 (1993)); adenovirale vektors (se for eksempel Bett et al., J. Virol. 67, 5911 (1993)); adenoassosierte virusvektorer (se for eksempel Zhou et al., J. Exp. Med. 179, 1867 (1994)), virale vektorer fra pox familien inkludert vaksiniavirus og avian pox viruser, virale vektorer fra alfavirusslekten så som de som er
 25 avledet fra Sindbis and Semliki Forest Viruses (se for eksempel Dubensky et al., J. Virol. 70, 508-519 (1996)), og papillomaviruser (Ohe et al., Human Gene Therapy 6, 325-333 (1995); Woo et al., WO 94/12629 og Xiao & Brandsma, Nucleic Acids. Res. 24, 2630-2622 (1996)).

30 DNA kodende for et immunogen, eller en vektor inneholdende det samme, kan bli pakket i liposomer. Egnede lipider og beslektede analoger er beskrevet i US-PS 5.208.036, 5.264.618, 5.279.833 og 5.283.185. Vektorer og DNA kodende for et immunogen kan også bli adsorbent til eller assosiert med partikkelformige bærere, og eksempler innbefatter polymetylmethakrylatpolymerer og

polylaktider og poly(laktid-ko-glykolider), se for eksempel McGee et al., J. Micro Encap. (1996).

Genterapivektorer eller nakent DNA kan bli levert in vivo ved administrering til
5 en individuell pasient, vanligvis ved systemisk administrering (for eksempel
intravenøst, intraperitonealt, nasalt, gastrisk, interdermalt, intramuskulært,
subdermalt eller intrakranial infusjon) eller topisk applikasjon (se for eksempel
US-PS 5.399.346). DNA kan også bli administrert ved anvendelse av en
genpistol. Se Xiao & Brandsma, supra. DNA kodende for et immunogen blir
10 presipitert på overflaten av mikroskopiske metallkuler. Mikroprosjektiler blir
akselerert med en sjokkbølge eller ekspanderende heliumgass, og
penetrerende vev til en dybde på flere cellelag. Accel™ Gene Delivery Device
fremstilt av Agacetus, Inc. Middleton WI er for eksempel egnet. Alternativt kan
nakent DNA passere gjennom huden inn i blodstrømmen ved å applisere DNA
15 på huden med kjemiske eller mekanisk irritasjon (se WO 95/05853).

I en ytterligere variasjon kan vektorer kodende for immunogener bli levert til
celler eks vivo, så som celler eksplantert fra en individuell pasient (for eksempel
lymfocytter, benmarg utsug, vevsbiopsy) eller universale donorhematopoetiske
20 stamceller, etterfulgt av reimplantering av cellene inn i en pasient, vanligvis etter
seleksjon for celler som har innkorporert vektoren.

III. Pasienter mottagelige for behandling

Pasienter mottagelige for behandling innbefatter individer med risiko for
25 sykdom, men som ikke viser symptomer, samt pasienter som for tiden viser
symptomer. Når det gjelder Alzheimers sykdom har nesten enhver risiko for å
lide av Alzheimers sykdom dersom han eller hun lever lenge nok. Foreliggende
metoder kan følgelig bli administrert profylaktisk til den generelle populasjonen
uten noen vurdering av risiko til gjeldende pasient. Foreliggende metoder er
30 spesielt nyttige for individer som har en kjent risiko for Alzheimers sykdom.
Slike individer innbefatter de som har slekt som har hatt denne sykdommen og
de hvor risikoen er blitt bestemt ved analysering av genetiske eller biokjemiske
markører. Genetiske markører for risiko overfor Alzheimers sykdom innbefatter
mutasjoner i APP genet, spesielt mutasjoner i posisjon 717 og posisjonene 670

og 671 referert til som Hardy og svenske mutasjoner (se hardy, TINS, supra).

Andre markører for risiko er mutasjoner i presenilin genene, PS1 og PS2 og ApoE4, familiær bakgrunn med AD, hyperkolesterolemi eller aterosklerose.

Individer som for tiden lider av Alzheimers sykdom kan bli gjenkjent fra

5 karakteristisk demens, samt tilstedeværelse av risikofaktorene beskrevet ovenfor. I tillegg er et antall diagnostiske tester tilgjengelige for identifisering av individer med AD. Disse innbefatter måling av CSF tau og A β 42 nivåer.

Forhøyet tau og reduserte A β 42 nivåer på tilstedeværelse av AD. Individer som lider av Alzheimers sykdom kan også bli diagnostisert ved MMSE eller ADRDA
10 kriterier som diskutert i eksempeldelen.

I asymptomatiske pasienter kan behandlingen begynne ved en hvilken som helst alder (for eksempel 10, 20, 30). Vanligvis er det derimot ikke nødvendig å begynne behandlingen før en pasient når 40, 50, 60 eller 70. Behandlingen
15 innbefatter vanligvis multiple doseringer over en tidsperiode. Behandlingen kan bli registrert ved analysing av antistoff, eller aktivert T-celle eller B-celle responser overfor terapeutisk middel (for eksempel A β -peptid) over tid. Dersom responsen faller blir en booster-dosering indikert. Når det gjelder potensielle Downs syndrom pasienter kan behandlingen begynne før fødselen ved
20 administrering av det terapeutiske middelet til moren eller kort etter fødselen.

IV. Behandlingsregimer

I profylaktiske applikasjoner blir farmasøytiske sammensetninger eller legemidler administrert til en pasient mottagelig for, eller som har risiko for en
25 bestemt sykdom i en mengde som er tilstrekkelig for å eliminere eller redusere risikoen eller forsinke forløpet av sykdommen. I terapeutiske applikasjoner blir sammensetninger eller medikamenter administrert til en pasient som antas å eller som allerede lider av en slik sykdom i en mengde som er tilstrekkelig for å lege, eller i det minste delvis hemme, symptomer på sykdom og komplikasjoner
30 derav. En mengde som er tilstrekkelig for å oppnå dette er definert som en terapeutisk- eller farmasøytisk-effektiv dose. I både profylaktiske og terapeutiske regimer blir midler vanligvis administrert i flere doseringer helt til en

tilstrekkelig immunrespons er blitt oppnådd. Vanligvis blir immunresponsen registrert og gjentatte doseringer gitt dersom immunresponsen begynner å avta.

Effektive doser av sammensetningene ifølge oppfinnelsen for behandling av
5 ovennevnte tilstander varierer avhengig av mange forskjellige faktorer, inkludert
administrasjonsmåter, målsete, fysiologisk tilstand til pasienten, om pasienten
er menneske eller dyr, andre legemidler som blir administrert, og om
behandlingen er profylaktisk eller terapeutisk. Vanligvis er pasienten et
menneske, men i noen sykdommer, så som kugalskap kan pasienten være et
10 ikke-humant pattedyr, så som en ku. Behandlingsdoseringer som er
nødvendige må bli titrert for å optimalisere trygghet og effektivitet. Mengde av
immunogen avhenger av om adjuvant også blir administrert, i det høyere
doseringer er nødvendig i fravær av adjuvant. Mengden av et immunogen for
administrering varierer noen ganger fra 1 µg-500 µg pr pasient og vanligvis fra
15 5-500 µg pr injeksjon for human administrering. Av og til blir en høyere dose på
1-2 mg pr injeksjon anvendt. Vanligvis blir omtrent 10, 20, 50 eller 100 µg
anvendt for hver human injeksjon. Tidspunkt for injeksjoner kan variere
betydelig fra en gang pr dag til en gang pr år, til en gang pr tiår. På en hvilken
som helst gitt dag som en dosering av immunogenet blir gitt er doseringen
20 høyere enn 1 µg/pasient og vanligvis høyere enn 10 µg/pasient dersom
adjuvanten også administreres, og er høyere enn 10 µg/pasient og vanligvis
høyere enn 100 µg/pasient i fravær av adjuvant. Et typisk regime består av en
immunisering etterfulgt av boosterinjeksjoner med 6 ukers intervaller. Et annet
regime består av en immunisering etterfulgt av boosterinjeksjoner 1, 2 og 12
25 måneder senere. Et annet regime innbefatter en injeksjon hver annen måned
hele livet. Alternativt kan boosterinjeksjoner være på en irregulært basis som
vist ved registrering av immunresponsen. For passiv immunisering med et
antistoff varierer doseringen fra omtrent 0,0001 til 100 mg/kg, og mer vanlig
0,01 til 5 mg/kg av vertens kroppsvekt. Doser for nukleinsyrer kodende for
30 immunogener varierer fra omtrent 10 ng til 1 g, 100 ng til 100 mg, 1 µg til 10 mg
eller 30-300 µg DNA pr pasient. Doser for infeksjøs virale vektorer varierer fra
10⁻¹⁰, eller mer, virus pr dose.

Midler for indusering av en immunrespons kan bli administrert ved parenterale, topiske, intravenøse, orale, subkutane, interperitoneale, intranasale eller intramuskulære midler for profylaktisk og/eller terapeutisk behandling. Den mest typiske administrasjonsveien er subkutan til tross for at andre kan være like effektive. Den nest mest vanlige er intramolekylær injeksjon. Denne injeksjonstypen blir vanligvis utført i arm- eller leggmusklene. Intravenøse injeksjoner samt intraperitoneale injeksjoner, intraarteriell, intrakranial eller intradermale injeksjoner er også effektive å danne en immunrespons. I noen metoder blir midlene injisert direkte inn i et bestemt vev hvor deponeringene har akkumulert.

Midler ifølge oppfinnelsen kan eventuelt bli administrert i en kombinasjon med andre midler som er minst delvis effektive for behandling av amyloidogen sykdom. Når det gjelder Alzheimers og Down syndrom, hvor amyloiddeponeringer oppstår i hjernen, kan midler ifølge oppfinnelsen også bli administrert sammen med andre midler som øker passering av midlene ifølge oppfinnelsen over blod-hjerne barrieren.

Immunogene midler ifølge oppfinnelsen, så som peptider, blir noen ganger administrert i kombinasjon med en adjuvant. En mengde adjuvants kan bli anvendt i kombinasjon med et peptid, så som A β , for å utløse en immunrespons. Foretrukne adjuvants øker den intrinsiske responsen til et immunogen uten å forårsake konformasjonsmessige forandringer i immunogenet som tilveiebringer den kvalitative formen til responsen. Foretrukne adjuvants innbefatter alun, 3 De-O-acylert monofosforyl lipid A (MPL) (se GB 2220211). QS21 er et triterpen glykosid eller saponin isolert fra barken til Quillaja Saponaria Molina treet tilstede i Syd-Amerika (se Kensil et al., i Vaccine Design: The subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); US-PS 5.057.540). Andre adjuvants er olje i vann emulsjoner (så som squalene eller peanøttolje), eventuelt i kombinasjon med immunstimuleringsmidler, så som monofosforyllipid A (se Stoute et al., N. Engl. J. Med. 336, 86-91 (1997)). En annen adjuvant er CpG (Bioworld Today, Nov. 15, 1998). Alternativt kan A β bli koblet til en adjuvant. For eksempel kan en

- lipopeptidversjon av A β bli dannet ved kobling av palmitinsyre eller andre lipider direkte til den N-terminale enden til A β som beskrevet for hepatitt B antigenvaksinering (Livingston, J. Immunol. 159, 1383-1392 (1997)). Slik kobling bør ikke i vesentlig grad forandre konformasjonen til A β for å påvirke naturen til immunresponsen. Adjuvants kan bli administrert som en komponent av en terapeutisk sammensetning med et aktivt middel eller kan bli administrert separat, før, samtidig med eller etter administrering av det terapeutiske middelet.
- En foretrukket klasse av adjuvants er aluminiumsalter (alun), så som aluminiumhydroksid, aluminiumfosfat, aluminiumsulfat. Slike adjuvants kan bli anvendt med eller uten andre spesifikke immunstimulerende midler så som MPL eller 3-DMP, QS21, polymere eller monomere aminosyrer så som polyglutaminsyre eller polylysin. En annen klasse adjuvants er olje-i-vann emulsjonsformuleringer. Slike adjuvants kan bli anvendt med eller uten andre spesifikke immunstimulerende midler så som muramylpeptider (for eksempel N-acetylmuramyl-L-treonyl-D-isoglutamin (thr-MDP), N-acetyl-normuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin (nor-MDP), N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanin-2-(1'-2'dipalmitoyl-sn-glycero-3-hydroksyfosforyloksy)-etylamin (MTP-PE), N-acetylgluksaminyl-N-acetylmuramyl-L-Al-D-isoglu-L-Ala-dipalmitoksypropylamid (DTP-DPP) theramidTM), eller andre bakterielle celleveggkomponenter. Olje-i-vann emulsjoner innbefatter (a) MF59 (WO 90/14837), inneholdende 5% Squalen, 0,5% Tween 80, og 0,5% Span 85 (eventuelt inneholdende forskjellige mengder MTP-PE) formulert til submikronpartikler ved anvendelse av et mikrofluidiserende middel så som Model 110Y microfluidizer (Microfluidics, Newton MA), (b) SAF, inneholdende 10% Squalen, 0,4% Tween 80, 5% pluronisk-blokk polymer L121 og thr-MDP, enten mikrofluidisert inn i en submikronemulsjon eller vorteks behandlet for å danne en emulsjon med større partikkelstørrelse, og (c) RibiTM adjuvantssystem (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) inneholdende 2% Squalen, 0,2% Tween 80 og en eller flere bakterielle celleveggkomponenter fra gruppen bestående av monofosforyllipid A (MPL), trehalose dimykolat (TDM) og cellevegg skjelett (CWS) fortrinnsvis MPL+CWS (DetoxTM). En klasse av

foretrukne adjuvants er saponin adjuvants, så som Stimulon™ (QS21, Aquila, Worcester, MA) eller partikler dannet derfra så som ISCOM (immunstimulerende komplekser og ISCOMATRIX. Andre adjuvants innbefatter fullstendig Freund's adjuvant (CFA) og ufullstendig Freund's adjuvant (IFA).

- 5 Andre adjuvants innbefatter cytokiner, så som interleukiner (IL-1, IL-2 og IL-12), makrofagkolonistimulerende faktor (M-CSF), tumornekrosefaktor (TNF).

En adjuvant kan bli administrert med et immunogen som en enkelt sammensetning eller kan bli administrert før, samtidig med eller etter

10 administrering av immunogenet. Immunogen og adjuvant kan bli pakket og tilført i samme beholder eller kan bli pakket i separate beholdere og blandet før bruk. Immunogen og adjuvant blir vanligvis pakket med en markør som indikerer antatt terapeutisk applikasjon. Dersom immunogenet og adjuvant blir pakket separat innbefatter forpakningen vanligvis instruksjoner for blanding før

15 bruk. Valg av en adjuvant og/eller bærer avhenger av stabiliteten til vaksinen som inneholder adjuvant, administrasjonsvei og doseringsskjema, effektiviteten til adjuvant for artene som blir vaksinert og, i mennesker, en farmasøytisk akseptabel adjuvant er en som er blitt godkjent eller kan godkjennes for human administrering ved gjeldende regulatoriske legemer. For eksempel er fullstendig

20 Freund's adjuvant ikke egnet for human administrering. Alun, MPL og QS21 er foretrukket. Eventuelt kan to eller flere forskjellige adjuvants bli anvendt samtidig. Foretrukne kombinasjoner innbefatter alun med MPL, alun med QS21, MPL med QS21 og alun, QS21 og MPL sammen. Videre kan ufullstendig Freund's adjuvant bli anvendt (Chang et al., Advanced Drug Delivery Reviews

25 32, 173-186 (1998)), eventuelt i kombinasjon med et hvilket som helst av alun, QS21 og MPL og alle kombinasjoner derav.

Midlene ifølge oppfinnelsen blir ofte administrert som farmasøytiske sammensetninger omfattende et aktivt terapeutisk middel, dvs. og en mengde

30 andre farmasøytisk akseptable komponenter. Se Remington's Pharmaceutical Science (15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1980). Den foretrukne formen avhenger av den antatte administrasjonsmåten og terapeutisk applikasjon. Sammensetninger kan også innbefatte, avhengig av formulering som er ønskelig, farmasøytisk akseptable, ikke-toksiske bærere

eller fortynningsmidler, som er definert som bærere som vanligvis blir anvendt for å formulere farmasøytiske sammensetninger for administrering til dyr eller mennesker. Fortynningsmiddelet blir valgt for ikke å påvirke den biologiske aktiviteten til kombinasjonen. Eksempler på slike fortynningsmidler er destillert vann, fysiologisk fosfat-buffret saltvann, Ringers løsninger, dekstroseløsning og Hanks løsning. I tillegg kan den farmasøytiske sammensetningen eller formuleringen også innbefatte andre bærere, adjuvants eller ikke-toksiske, ikke-terapeutiske, ikke-immunogene stabiliseringsmidler og lignende. Noen reagenser egnede for administrering til dyr så som fullstendig Freund's adjuvant blir derimot ikke vanligvis inkludert i sammensetningene for human bruk.

Farmasøytiske sammensetninger kan også innbefatte store, sakte metaboliserte makromolekyler så som proteiner, polysakkarider, polymelkesyrer, polyglykolsyrer og kopolymerer (så som lateks funksjonalisert sepharose, agarose, cellulose og lignende), polymere aminosyrer, aminosyrekopolymerer og lipidaggregater (så som oljedråper eller liposomer). I tillegg kan disse bærerene virke som immunstimulerende midler (dvs. adjuvants).

For parenteral administrering kan midlene ifølge oppfinnelsen bli administrert som injiserbare doseringer av en løsning eller suspensjon av forbindelsen i et fysiologisk akseptabelt fortynningsmiddel med en farmasøytisk bærer som kan være en steril væske så som vannoljer, saltvann, glycerol eller etanol. I tillegg kan hjelpeforbindelser, så som fukt eller emulgeringsmidler, overflateaktive midler, pH-buffrende forbindelse og lignende være tilstede i sammensetningene. Andre komponenter av de farmasøytiske sammensetningene er de fra olje, dyr, grønnsaker eller har syntetisk opprinnelse, for eksempel peanøttolje, soyabønneolje og mineralolje. Generelt er glykoler så som propylenglykol eller polyetylen glykol foretrukne flytende bærere, spesielt for injiserbare løsninger.

Vanligvis blir sammensetningene preparert som injiserbare stoffer, enten som flytende løsninger eller suspensjoner; faste former egnede for oppløsning i, eller suspensjon i, flytende bærere før injeksjon kan også bli preparert.

Prepareringen kan også bli emulgert eller innkapslet i liposomer eller mikropartikler så som polylaktid, polyglykolid eller kopolymer for å fremme adjuvnateffekten, som diskutert ovenfor (se Langer, Science 249, 1527 (1990) og Hanes, Advanced Drug Delivery Reviews 28, 97-119 (1997). Midlene ifølge
 5 oppfinnelsen kan bli administrert i form av en depotinjeksjon eller implantatpreparering som kan bli formulert på en slik måte at den muliggjør en vedvarende eller pulserende frigjøring av det aktive ingredienset.

I tillegg innbefatter formuleringer egnede for andre administrasjonsmåter oral,
 10 intranasal og lungeformuleringer, suppositorier og transdermale applikasjoner.

For suppositorier innbefatter bindemidler og bærere for eksempel polyalkylenglykoler eller triglycerider; og slike suppositorier kan bli dannet fra blandinger inneholdende det aktive ingredienset i et område på 0,5% til 10%,
 15 fortrinnsvis 1%-2%. Orale formuleringer innbefatter eksipienter, så som farmasøytisk kvalitet av mannitol, laktose, stivelse, magnesiumstearat, natriumsakkarid, cellulose og magnesiumkarbonat. Disse sammensetningene er i form av løsninger, suspensjoner, tabletter, piller, kapsler, formuleringer med vedvarende frigjøring eller pulvere og inneholder 10%-95% av aktivt ingrediens,
 20 fortrinnsvis 25%-70%.

Topisk applikasjon kan resultere i transdermal eller intradermal levering. Topisk administrasjon kan bli lettet ved koadministrering av middelet med koleratoksin eller detoksifiserte derivater eller subenheter derav eller andre lignende
 25 bakterielle toksiner (se Glenn et al., Nature 391, 851 (1998)). Koadministrering kan bli oppnådd ved anvendelse av komponentene som en blanding eller som koblede molekyler oppnådd ved kjemisk kryssbinding eller ekspresjon som et fusjonsprotein.

30 Alternativt kan transdermal levering bli oppnådd ved anvendelse av et hudstykke eller ved anvendelse av transferosomer (Paul et al., Eur. J. Immunol. 25, 3521-24 (1995); Cevc et al., Biochem. Biophys. Acta 1368, 201-15 (1998)).

V. Fremgangsmåter for diagnostikk

Det eksisterer fremgangsmåter for detektering av en immunrespons mot A β -peptid i en pasient som lider av eller er mottagelig for Alzheimers sykdom. Fremgangsmåtene er spesielt nyttige for registrering av et behandlingsforløp som blir administrert til en pasient. Fremgangsmåtene kan bli anvendt for å

5 registrere både terapeutisk behandling på symptomatiske pasienter og profylaktisk behandling på asymptomatiske pasienter.

Noen fremgangsmåter innbefatter bestemmelse av en grunnlinje verdi til en immunrespons i en pasient før administrering av en dosering av middelet, og

10 sammenligning av dette med en verdi for immunresponsen etter behandling. En betydelig økning (dvs. mer enn den typiske marginen for eksperimentelle avvik i gjentatte målinger av samme prøve, uttrykt som et standardavvik fra gjennomsnittet til slike målinger) i verdi av immunresponsen som signaliserer et positivt behandlingsresultat (dvs. at administrering av middelet har oppnådd

15 eller forøket en immunrespons). Dersom verdien for immunresponsen ikke forandres i betydelig grad, eller reduseres, blir det indikert et negativt behandlingsresultat. Pasienter som gjennomgår et innledende behandlingsforløp med et middel er ventet å vise en økning i immunrespons med suksessive doseringer, som til slutt når et platå. Administrering av middelet

20 blir generelt fortsatt mens immunresponsen er økende. Opprettholdelse av platået er en indikator på at behandlingen kan bli avsluttet eller redusert i dosering eller frekvens.

I andre metoder blir en kontrollverdi (dvs. et gjennomsnitt og standardavvik) av

25 immunresponsen bestemt for en kontrollpopulasjon. Vanligvis har individene i kontrollpopulasjonen ikke mottatt noe før behandling. Målte verdier av immunrespons i en pasient etter administrering av et terapeutisk middel blir deretter sammenlignet med kontrollverdien. En betydelig økning i forhold til kontrollverdien (for eksempel høyere enn et standardavvik fra gjennomsnittet)

30 signaliserer et positivt behandlingsresultat. En mangel på signifikant økning eller reduksjon signaliserer et negativt behandlingsresultat.

Administrering av middelet blir generelt fortsatt mens immunresponsen er økende i forhold til kontrollverdien. Som før er oppnåelse av et platå i forhold til

kontrollverdiene en indikator på at administrering ved behandling kan bli avsluttet eller redusert i dosering eller frekvens.

I andre metoder blir en kontrollverdi av immunrespons (for eksempel et
5 gjennomsnitt og standardavvik) bestemt ut fra en kontrollpopulasjon av individer
som har gjennomgått behandling med et terapeutisk middel og hvor
immunresponsene har nådd plataået i responsen til behandling. Målte verdier av
immunrespons i en pasient blir sammenlignet med kontrollverdien. Dersom det
målte nivået i en pasient ikke er betydelig forskjellig (for eksempel mer enn et
10 standardavvik) fra kontrollverdien kan behandlingen bli avsluttet. Dersom nivået
i en pasient er betydelig under kontrollverdien er fortsatt administrering av
middelet nødvendig. Dersom nivået i pasienten vedvarer under kontrollverdien
kan en forandring i behandlingsregimet, for eksempel, anvendelse av et annet
adjuvant bli indikert.

15 I andre metoder blir en pasient som ikke for tiden mottar behandling, men som
har gjennomgått tidligere behandlingsforløp, registrert for immunrespons for å
bestemme om gjenopptagelse av behandling er nødvendig. Den målte verdien
til immunresponsen i pasienten kan bli sammenlignet med en verdi av
20 immunresponsen tidligere oppnådd i pasienten etter tidligere behandlingsforløp.
En betydelig reduksjon i forhold til tidligere måling (dvs. høyere enn en typisk
feilmargin i gjentatte målinger av samme prøve) er en indikasjon på at
behandlingen kan bli gjenopptatt. Alternativt kan verdien målt i pasienten bli
sammenlignet med en kontrollverdi (gjennomsnitt pluss standardavvik) spesielt i
25 populasjonen av pasienter etter at de gjennomgår et behandlingsforløp.
Alternativt kan den målte verdien i en pasient bli sammenlignet med en
kontrollverdi i populasjoner av profylaktisk behandlede pasienter som forblir
symptomfri, eller populasjoner med terapeutisk behandlede pasienter som viser
lindring av sykdomskaraktertrekk. I alle disse tilfellene er det en betydelig
30 reduksjon i forhold til kontrollnivået (dvs. mer enn et standardavvik) en indikator
på at behandlingen bør bli gjenopptatt i en pasient.

Vevsprøven for analysering er vanligvis blod, plasma, serum, slimhinne eller
cerebral spinalfluid fra pasienten. Prøven blir analysert for induksjon på en

immunrespons overfor en hvilken som helst form av A β -peptid, vanligvis A β -42. Immunresponsen kan bli bestemt ut fra tilstedeværelse av for eksempel antistoffer eller T-celler som spesifikt bindes til A β -peptid. ELISA metoder for detektering av antistoffer spesifikke for A β er beskrevet i eksempeldelen.

- 5 Metoder for å detektere reaktive T-celler er blitt beskrevet ovenfor (se definisjoner).

I. Profylaktisk effektivitet til A β mot AD

- Disse eksemplene beskriver administrering av A β 42-peptidet til transgene mus som overuttrykker APP med en mutasjon i posisjon 717 (APP_{717V→F}) som predisponerer dem for utvikling av Alzheimers lignende neuropatologi. Produksjon og karaktertrekkene til disse musene (PDAPP mus) er beskrevet i Games et al., Nature, supra. Disse dyrene begynner i deres heterozygote form å deponere A β fra 6 måneders alderen og oppover. Innen 15 måneders alder utviser de nivåer av A β deponering som tilsvarer det som sees ved Alzheimers sykdom. PDAPP mus ble injisert med aggregert A β 42 (aggregert A β ₄₂) eller fosfatbuffret saltvann. Aggregert A β 42 ble valgt på grunn av dets evne til å indusere antistoffer mot multiple epitoper av A β .

20 A. Fremgangsmåter

1. Musekilde

- 30 PDAPP heterogene hunnmus ble tilfeldig delt inn i følgende grupper: 10 mus ble injisert med aggregert med A β 42 (en døde i transitt), 5 mus injisert med PBS/adjuvant eller PBS og 10 uninjerte kontroller. 5 mus ble injisert med serumamyloidprotein (SAP).

1. Preparering av immunogener

- Preparering av aggregert A β 42: 2 milligram A β 42 (US Peptides Inc. Lot K-42-12) ble løst opp i 0,9 ml vann og tilsatt 0,1 ml 10 x PBS til en 1 ml. Dette ble vortex-behandlet og inkubert over natt ved 37°C under hvilke betingelser peptidet aggregerte. Eventuell ubrukt A β ble lagret som et tørt lyofilisert pulver ved -20°C ved helt til neste injeksjon.

1. Preparering av injeksjoner

100 µg av aggregert Aβ₄₂ i PBS pr mus ble emulgert 1:1 med fullstendig
 Freund's adjuvant (CFA) i et sluttvolum på 400 µl emulsjon for første
 immunisering, etterfulgt av en boost med samme mengde av immunogen i
 5 ufullstendig Freund's adjuvant (IFA) etter 2 uker. To ytterligere doser i IFA ble
 gitt i månedlige intervaller. Påfølgende immuniseringer ble utført månedlig i 500
 µl PBS. Injeksjonene ble levert intraperitonealt (i.p.).

PBS-injeksjoner fulgte samme skjema og mus ble injisert med en 1:1 blanding
 10 av PBS/adjuvant med 400 µl pr mus, eller 500 µl PBS pr mus. SAP-injeksjoner
 fulgte likeledes samme skjema ved anvendelse av en dose 100 µg pr injeksjon.

4. Titrering av museblod, vevspreparering og immunohistokjemi

Ovennevnte metoder er beskrevet nedenfor i generelle materialer og metoder.

B. Resultater

PDAPP mus ble injisert med enten aggregert Aβ₄₂ (aggregert Aβ₄₂), SAP-
 peptider eller fosfatbuffret saltvann.

20 En gruppe PDAPP-mus ble også latt være som uninjiserde, positive kontroller.
 Titre av mus til aggregert Aβ₄₂ ble registrert annenhver måned fra fjerde
 booster helt til musene var ett år gamle. Musene ble ofret ved 13 måneder. Ved
 alle tidspunkter ble undersøkt utviklet 8 av de 9 aggregerte Aβ₄₂-musene et
 høyt antistofftiter som forble høyt i løpet av injeksjonsseriene (titre høyere enn
 25 1/10000). Niende mus hadde et lavt, men målbart titer på omtrent 1/1000 (figur
 1, tabell 1). SAP-injiserte mus hadde titre på 1:1000 til 1:30000 for dette
 immunogenet og bare en enkelt mus mottok 1:10000.

PBS-behandlede mus ble titret mot aggregert Aβ₄₂ etter 6, 10 og 12 måneder.

Ved en 1/100 fortykning ble PBS-musene titret mot aggregert Aβ₄₂ som bare
 30 overskrider 4 ganger bakgrunnen ved et datapunkt, men var ellers mindre enn 4
 ganger bakgrunnen ved alle tidspunktene (tabell 1). Den SAP-spesifikke
 responsen var neglisjerbar ved disse tidspunktene med alle titre mindre enn
 300.

7 av 9 mus i aggregert A β 1-42 gruppen hadde ikke detekterbar amyloid i deres hjerner. I kontrast til dette inneholdt hjernevev fra mus i SAP og PBS-gruppene en mengde 3D6-positive amyloid-deponeringer i hippocampus samt i frontal og singulat cortices. Deponeringsmønsteret lignet det til ubehandlede kontroller, med karakteristisk innbefatning av sårbare subregioner så som det ytre molekylære laget til hippocampal dentate gyrus. En mus fra A β 1-42-injisert gruppe hadde en meget redusert amyloidbelastning hørende til hippocampus. Et isolert plakk ble identifisert i en annen A β 1-42-behandlet mus.

Kvantitative billedanalyser av amyloidbelastningen i hippocampus verifiserte den dramatiske reduksjonen oppnådd i AN1792-behandlede dyr (fig. 2). Middelverdiene til amyloidbelastningen for PBS-gruppen (2,22%) og for ubehandlet kontrollgruppe (2,65%) var betydelig høyere enn for de som ble immunisert med AN1792 (0,00%, $p=0,0005$). I kontrast var middelverdien for gruppen immunisert med SAP-peptider (SAPP) 5,74%. Hjernevev fra ubehandlede kontrollmus inneholdt en mengde A β -amyloiddeponeringer visualisert med A β -spesifikt monoklonalt antistoff (mAb) 3D6 i hippocampus, samt i retrosplenialkortex. Et lignende mønster på amyloiddeponering fremkom også i mus immunisert med SAPP eller PBS (fig. 2). I disse sistnevnte 3 gruppene var det i tillegg en karakteristisk involvering av sårbare subregioner i hjernen som vanligvis sees i AD, så som det ytre molekylære laget av hippocampal dentate gyrus, i alle tre av disse gruppene.

Hjernene som ikke inneholdt A β -deponeringer manglet også nitrittiske plakk som vanligvis blir visualisert i PDAPP-mus med humant APP antistoff 8E5. Alle hjernene fra gjenværende grupper (SAP-injiserte, PBS og uninjiserte mus) hadde en mengde neurittiske plakk typiske for ubehandlede PDAPP-mus. Et lite antall neurittiske plakk var tilstede i en mus behandlet med AN1792, og en enkel sammenhopning av dystrofiske neuritter var tilstede i en andre mus behandlet med AN1792. En billedanalyse av hippocampus, og vist i fig. 3, demonstrerte eliminering av dystrofiske neuritter i AN1792-behandlede mus (midtre 0,00%) sammenlignet med PBS-mottagere (midtre 0,28%, $p = 0,0005$).

Astrocytose karakteristisk for plakk-assosiert betennelse var også fraværende i hjernene i A β 1-42 injisert gruppe. Hjerner fra mus i de andre gruppene inneholdt en mengde og sammenfildrede GFAP-positive astrocytter typisk for A β plakk-assosiert gliosis. En undergruppe av GFAP-reagerte objektglass ble mot-

5 farvet med Thioflavin S for å lokalisere A β deponeringene. GFAP-positive astrocytter var assosiert med A β plakk i SAP, PBS og ubehandlede kontroller. Ingen slik assosiasjon var tilstede i plakk-negative A β 1-42 behandlede mus, mens minimal plakk-assosiert gliosis var identifisert i en mus behandlet med AN1792.

10 Billedanalyser, vist i fig. 4 for retrosplenialkortex, verifiserte at reduksjonen i astrocytose var betydelig med en middelsverdi på 1,56% for de som var behandlet med AN1792 mot middelsverdier høyere enn 6% for grupper immunisert med SAP-peptider, PBS eller ubehandlede ($p=0,0017$).

15 Bevis fra en undergruppe av A β 1-42- og PBS-injiserte mus indikerte plakk-assosiert MHC II immunreaktivitet var fraværende i A β 1-42 injiserte mus og var i samsvar med mangel på en A β -relatert inflammatorisk respons.

20 Snitt av musehjerner ble også reagert med et mA β spesifikt for MAC-1, et celleoverflateprotein. MAC-1 (CD11b) er et integrin familiemedlem og eksisterer som en heterodimer med CD18. CD11b/CD18 komplekset er tilstede på monocyter, makrofager, neutrofiler og naturlige drepeceller (Mak og Simard). Resistente MAC-1 reaktiv celletype i hjernen er sannsynligvis mikroglial basert

25 på lignende fenotypisk morfologi i MAC-1 immunreagerte snitt. Plakk-assosiert MAC-1 merking var lavere i hjernene til mus behandlet med AN1792 sammenlignet med PBS kontrollgruppen og er et funn i samsvar med mangel på en A β -indusert inflammatorisk respons.

30 C. Konklusjon

Mangel på A β plakk og reaktive neuronale og gliotiske forandringer i hjernene til A β 1-42-injiserte mus indikerte at intet eller ekstremt lite amyloid var deponert i deres hjerner, og patologiske konsekvenser, så som gliosis og neurittisk

patologi, var fraværende. PDAPP-mus behandlet med A β 1-42 viser vesentlig samme mangel på patologi som kontroll ikke-transgene mus. A β 1-42 injeksjoner er derfor meget effektive for forhindring av deponering eller fjerning av human A β fra hjernevev, og eliminering av påfølgende neuronale og inflammatoriske degenerative forandringer. Administrering av A β peptid har

5 følgerlig terapeutisk fordel ved forhindring av AD.

II. Doserresponsstudie

Grupper med 5 uker gamle, hunn Swiss Webster mus (N=6 pr gruppe) ble

10 immunisert med 300, 100, 33, 11, 3,7, 1,2, 0,4 eller 0,13 μ g A β formulert i CFA/IFA administrert intraperitonealt. Tre doser ble gitt i intervaller på to ganger pr uke etterfulgt av en fjerde dose en måned senere. Den første dosen ble emulgert med CFA og gjenværende doser ble emulgert med IFA. Dyrene ble blodtappet 4-7 dager etter hver immunisering begynnende etter andre dose for

15 måling av antistofftitere. Dyrene i en undergruppe av tre grupper, de immunisert med 11, 33 eller 300 μ g av antigen ble i tillegg blodtappet ved omtrent månedlige intervaller i 4 måneder etter den fjerde immuniseringen for å registrere reduksjon av antistoffrespons over et område av vaksinedosene. Disse dyrene mottok en endelig femte immunisering i syvende måned etter

20 begynnende studie. De ble ofret en uke senere for å måle antistoffresponser mot AN1792 og for å utføre toksikologiske analyser.

En redusert doserespons ble observert fra 300 til 3,7 μ g uten respons ved de to laveste dosene. Gjennomsnittlige antistofftitere var omtrent 1:1000 etter 3 doser

25 og omtrent 1:10000 etter 4 doser med 11-300 μ g antigen (se fig. 5).

Antistofftitrene økte dramatisk i alle unntatt lavest dosegruppe etter den tredje immuniseringen med økninger i GMT varierende fra 5- til 25 ganger. Lave antistoffresponser var da detekterbar for til og med 0,4 μ g mottagere. 1,2 og 3,7

30 μ g grupper hadde sammenlignbare titere med GMT på omtrent 1000 og de høyeste 4 dosene filtrert sammen med GMT på omtrent 25000, med unntagelse av 33 μ g dosegruppe med en lavere GMT på 3000. Etter den fjerde immuniseringen var titerøkningen mer moderat i de fleste gruppene. Det var en

klar doserespons i lavere antigendosegrupper fra 0,14 µg til 11 µg varierende fra ikke-detekterbart antistoff for mottagere av 0,14 µg til en GMT på 36000 for mottagere av 11 µg. Titere for de 4 høyeste dosegruppene med 11 til 300 µg var sammenfiltret. Etter to immuniseringer var antistofftitere avhengig av
 5 antigendosen over det brede området fra 0,7 til 300 µg. I den tredje immunisering var titrene til de høyeste 4 dosene alle sammenlignbare og de forble på et platå etter en ytterligere immunisering.

En måned etter fjerde immunisering var titrene 2- til 3-ganger høyere i 300 µg
 10 gruppen enn de som ble målt fra blod tappet 5 dager etter immunisering (fig. 6). Denne observasjonen tyder på at topp anamnestic antistoffrespons oppsto senere enn 5 dager etter immunisering. En mer moderat (50%) økning fremkom ved dette tidspunktet i 33 µg gruppen. I 300 µg dosegruppen ved 2 måneder etter siste dose ble GMT redusert kraftig med omtrent 70%. Etter en ytterligere
 15 måned var reduksjonen mindre bratt ved 45% (100 µg) og omtrent 14% for 33 og 11 µg doser. Reduksjonsraten i sirkulerende antistofftitere etter avslutning av immunisering ser ut til å være bifasisk med en bratt reduksjon den første måneden etter topprespons, etterfulgt av en mer moderat reduksjonsrate deretter.

20 Antistofftitrene og kinetikken til responsen av disse Swiss Webster musene er lik de til unge heterozygote PDAPP transgene mus immunisert på en parallell måte. Doseringer effektive for å indusere en immunrespons i mennesker er vanligvis lik doseringer effektive i mus.

25 III. Screening for terapeutisk effektivitet overfor etablert AD

Denne analysen er konsentrert for å teste immunogene midler for aktivitet når det gjelder å stoppe eller reversere neuropatologiske karaktertrekk ved AD i eldre dyr. Immunisering med 42 aminosyre lang Aβ (AN1792) ble begynt ved et
 30 tidspunkt når amyloidplakkene allerede var tilstede i hjernene til PDAPP mus.

I løpet av tidsforløpet anvendt i denne studien utviklet ubehandlede PDAPP mus et antall neurodegenerative forandringer som ligner de som er tilstede i AD

(Games et al., supra og Johnson-Wood et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 1550-1555 (1997)). Deponering av A β i amyloid plakk er assosiert med en degenerativ neuronal respons bestående av avvikende aksonale og dentrittiske elementer, betegnet dystrofiske neuritter. Amyloide deponeringer som er omgitt av og som inneholder dystrofiske neuritter betegnes neurittiske plakk. I både AD og PDAPP mus har dystrofiske neuritter en bestemt globulær struktur, er immunreaktive med et panel av antistoffer som gjenkjenner APP og cytoskjelett komponenter, og utviser komplekse subcellulære degenerative forandringer på ultrastrukturelt nivå. Disse karaktertrekkene muliggjør for sykdom-relevante, selektive og reproduerbare målinger av dannelse av neurittiske plakk i PDAPP hjerner. Dystrofisk neuronal komponent av PDAPP neurittiske plakk blir lett visualisert med et antistoff spesifikt for humant APP (mA β 8E5), og er lett målbar ved data-assistert billedanalyse. I tillegg til måling av effektene av AN1792 på dannelse av amyloide plakk registrerte vi effektene av denne behandlingen på utvikling av neurittisk dystrofi.

Astrocytter og mikroglia er ikke-neuronale celler som reagerer på og som reflekterer grad av neuronal skade. GFAP-positive astrocytter og MHC II-positive mikroglia blir vanligvis observert i AD og deres aktivering øker med alvorligheten til sykdommen. Vi har derfor også registrert utvikling av reaktive astrocytose og mikrogliose i AN1792-behandlede mus.

A. Materialer og metoder

48, heterozygote hunn PDAPP mus, 11 til 11,5 måneder av alder, oppnådd fra Charles River, ble tilfeldig delt inn i to grupper: 24 mus skulle bli immunisert med 100 μ g AN1792 og 24 mus immunisert med PBS, hver kombinert med Friends adjuvant. AN1792 og PBS gruppene ble på ny delt inn når de nådde en alder på ca 15 måneder. Etter 15 måneders alder ble omtrent halvparten av hver gruppe av AN1792- og PBS-behandlede dyr avlivet (henholdsvis n=10 og 9), og gjenværende fortsatte å motta immuniseringer helt til avslutning etter ca 18 måneder (henholdsvis n=9 og 12). Totalt 8 dyr (5 AN1792, 3 PBS) døde i løpet av studien. I tillegg til de immuniserte dyrene var ett år gamle (n=10), 15-måneder gamle (n=10) og 18-måneder gamle (n=10) ubehandlede PDAPP mus

inkludert for sammenligning i ELISA for å måle A β og APP-nivåene i hjernen; og ett år gamle dyr ble også innbefattet i de immunhistokjemiske analysene.

Metodologien var som i eksempel 1 dersom ikke annet er angitt. US peptidene lot 12 og California peptidene lot ME0339 av AN1792 ble anvendt for å danne antigenet for seks immuniseringer administrert før 15-måneder tidspunktet. California peptidene lot ME0339 og ME0439 ble anvendt i tre ytterligere immuniseringer administrert mellom 15 og 18 måneder.

For immuniseringene 100 μ g AN1792 i 200 μ l PBS eller PBS ble alene emulgeret 1:1 (vol:vol) med fullstendig Freund's adjuvant (CFA) eller ufullstendig Freund's adjuvant (IFA) eller PBS i et sluttvolum på 400 μ l. Den første immuniseringen ble levert med CFA som adjuvant, de neste fire dosene ble gitt med IFA og de endelige fire dosene med kun PBS uten tilsatt adjuvant. Totalt 9 immuniseringer ble gitt i løpet av 7 måneder perioden ifølge et 2-uker skjema for de første tre dosene etterfulgt av et 4-uker intervall for de gjenværende injeksjonene. 4-måneder behandlingsgruppen, avlivet i 15 måneders alderen mottok bare de første 6 immuniseringene.

B. Resultater

1. Effekter av AN1792 behandling på amyloid belastning

Resultater av AN1792 behandling på kortikal amyloid belastning bestemt ved kvantitative billedanalyser er vist i fig. 7. Middelsverdien til kortikal amyloidbelastning var 0,28% i en gruppe av ubehandlede 12 måneder gamle PDAPP mus, en verdi som er representativ for plakkbelastningen i mus ved begynnelse av studien. Etter 18 måneder økte den amyloide belastningen over 17-ganger til 4,87% i PBS-behandlede mus, mens AN1792-behandlede mus hadde en svært redusert amyloidbelastning på bare 0,01%, spesielt mindre enn 12 måneder ubehandlet og både 15- og 18-måneder PBS-behandlede grupper. Amyloidbelastningen var betydelig redusert i AN1792 mottagerene ved både 15 (96% reduksjon; $p=0,003$) og 18 (>99% reduksjon; $p=0,0002$) måneder.

Kortikal amyloiddeponering i PDAPP mus initierte vanligvis i frontal og retrosplenial kortekser (RSC) og forløper i en ventral-lateral retning for å innbefatte temporale og entorinal kortekser (EC). Lite eller ikke noe amyloid ble funnet i EC til 12 måneder gamle mus som har den omtrentlige alderen hvor AN1792 først blir administrert. Etter 4 måneder med AN1792 behandling ble amyloiddeponeringen sterkt redusert i RCS, og den progressive innbefatningen av EC ble totalt eliminert av AN1792 behandlingen. Sistnevnte observasjon viste at AN1792 fullstendig reduserte progressjonen av amyloid som normalt ville invadere temporal og ventral kortekser, samt stoppet eller muligens reversert deponering i RSC.

Betydelige effekter av AN1792 behandling på utvikling av kortikal amyloidbelastning i PDAPP mus er ytterligere demonstrert i 18-måneders gruppen som var blitt behandlet i 7 måneder. Et nærmest fullstendig fravær av kortikal amyloid var tilstede i AN1792-behandlede mus med total mangel på diffuse plakk, samt en reduksjon i komprimerte deponeringer.

2. AN1792 behandlings-assosierte cellulære og morfologiske forandringer

En populasjon av A β -positive celler ble funnet i hjerneregionene som vanligvis inneholdt amyloid deponeringer. I flere hjerner fra AN1792 mottakere ble meget få eller ingen ekstracellulære kortikal amyloidplakk funnet. Det meste av A β immunreaktiviteten så ut til å være innbefattet i celler med stor populær eller klumpet soma. Fenotypisk ligner disse cellene aktiverte mikroglia eller monocyter. De var immunreaktive med antistoffer som gjenkjenner ligander som blir uttrykt av aktiverte monocyter og mikroglia (MHC II og CD11b) og var av og til assosiert med veggen eller hulrommet til blodårene. Sammenligning av nære-ved siden av liggende snitt merket med A β og MHC II-spesifikke antistoffer viste at lignende mønstre til disse cellene ble gjenkjent av begge antistoffklassene. Detaljert undersøkelse av AN1792-behandlede hjerner viste at MHC II-positive celler var begrenset til nærheten av begrenset amyloid som var igjen i disse dyrene. Under anvendte fikseringsbetingelser var cellene ikke immunreaktive med antistoffer som gjenkjenner T-celle (CD3, CVD3e) eller B celle (CD45RA, CD45RB) ligander eller leukocyt fellesantigen (CD45), men var

reaktive med et antistoff som gjenkjenner leukosialin (CD43) som kryss-reagerer med monocytter. Ingen slike celler ble funnet i noen av de PBS-behandlede musene.

- 5 PDAPP mus utviklet tung amyloid deponering i ytre molekulære lag til hippocampal dentate gyrus. Deponeringen danner en bestemt rekke innenfor perforantveien, en subregion som klassisk inneholder amyloide plakk i AD. Det karakteristiske utseendet til disse deponeringene i PBS-behandlede mus lignet de som tidligere ble karakterisert i ubehandlede PDAPP mus. Amyloid
- 10 deponeringen besto av både diffuse og kompakte plakk i et kontinuerlig bånd. I kontrast til dette var det i et antall hjerner fra AN1792-behandlede mus dette mønsteret drastisk endret. Hippocampal amyloid deponering inneholdt ikke lenger diffus amyloid, og båndmønsteret var fullstendig ødelagt. Derimot var et antall uvanlige punkterte strukturer tilstede som er reaktive med anti-A β -
- 15 antistoffer og flere så ut til å være amyloid-inneholdende celler.

MHC II-positive celler ble ofte observert i nærheten av ekstracellulært amyloid i AN1792-behandlede dyr. Assosiasjonsmønsteret til A β -positive celler med amyloid var meget like i flere hjerner fra AN1792-behandlede mus.

- 20 Distribusjonen til disse monocytiske cellene var begrenset til nærheten av deponert amyloid og var helt fraværende fra andre hjerneregioner som manglet A β -plakk.

- Kvantitativ billedanalyse av MHC II og MAC I-merkede snitt viste en trend mot
- 25 øket immunreaktivitet i RSC og hippocampus til AN1792-behandlede mus sammenlignet med PBS gruppen som nådde signifikans med mål på MAC 1 reaktivitet i hippocampus.

- Disse resultatene indikerer aktiv, celle-mediert fjerning av amyloid i plakk-bærende hjerneregioner.
- 30

3. AN1792 effekter på A β nivåer: ELISA bestemmelser

(a) kortikale nivåer

I ubehandlede PDAPP mus var middelsnivået til total A β i korteks etter 12 måneder 1,600 ng/g, som økte til 8,700 ng/g innen 15 måneder (tabell 2). Etter 18 måneder var verdien 22000 ng/g, en økning på over 10-ganger av eksperimentet. PBS-behandlede dyr hadde 8600 ng/g total A β etter 15 måneder som økte til 19000 ng/g etter 18 måneder. I kontrast til dette hadde AN1792-behandlede dyr 81% mindre total A β etter 15 måneder (1600 ng/g) enn den PBS-immuniserte gruppen. Betydelig mindre ($p=0,0001$) totalt A β (5200 ng/g) ble funnet etter 18 måneder når AN1792 og PBS gruppene ble sammenlignet (tabell 2), som representerer en 72% reduksjon i A β som ellers ville være tilstede. Lignende resultater ble oppnådd når kortikalnivåene til A β 42 ble sammenlignet, dvs. AN1792-behandlet gruppe inneholdt mye mindre A β 42, men i dette tilfellet var forskjellene mellom AN1792 og PBS gruppene signifikant etter både 15 måneder ($p=0,04$) og 18 måneder ($p=0,001$, tabell 2).

TABELL 2: Middels A β nivåer (ng/g) i korteks

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

* $P=0,0412$

** $p=0,0001$

(b) Hippocampalnivåer

I ubehandlede PDAPP mus var middels hippocampalnivåer av total A β ved 12 måneders alderen 15.000 ng/g som økte til 51.000 ng/g etter 15 måneder og ytterligere til 81.000 ng/g etter 18 måneder (tabell 3). Likeledes viste PBS immuniserte mus verdier på 40.000 ng/g og 65.000 ng/g etter 15 måneder og 18 måneder. AN1792 immuniserte dyr utviste mindre total A β , spesielt 25.000 ng/g og 51.000 ng/g ved henholdsvis 15 måneder og 18 måneders tidspunkter. 18 måneder AN1792-behandlet gruppeverdi var betydelig lavere enn den til

PBS-behandlet gruppe ($p=0,0105$; tabell 3). Måling av A β 42 ga samme resultatmønster, dvs. at nivåene i AN1792-behandlet gruppe var betydelig lavere enn i PBS-gruppen (39.000 ng/g vs. 57.000 ng/g; henholdsvis $p=0,0022$) ved 18-måneder vurderingen (tabell 3).

5

Tabell 3: Middels A β -nivåer (ng/g) i Hippocampus

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

* $P=0,0105$

10 ** $p=0,0022$

(c) Cerebellarnivåer

I 12-måneder ubehandlede PDAPP mus var median cerebellarnivået av total A β 15 ng/g (tabell 4). Etter 15 måneder økte denne median til 28 ng/g og etter 18 måneder var den økt til 35 ng/g. PBS-behandlede mus utviste median total A β verdier på 21 ng/g etter 15 måneder og 43 ng/g etter 18 måneder. AN1792-behandlede dyr ble funnet å ha 22 ng/g total A β etter 15 måneder og betydelig mindre ($p=0,002$) total A β etter 18 måneder (25 ng/g) enn tilsvarende PBS gruppe (tabell 4).

20

Tabell 4: Median A β nivåer (ng/g) i Cerebellum

	Ubehandlet		PBS		AN1792	
Alder (måneder)	Total A β	(n)	Total A β	(n)	Total A β	(n)
12	15,6	(10)				
15	27,7	(10)	20,8	(9)	21,7	(10)
18	35,0	(10)	43,1	(12)	24,8*	(9)

* $p=0,0018$

4. Effekter av AN1792 behandling på APP-nivåer

APP- α og full-lengde APP-molekylet både inneholder hele eller del av A β sekvensen og kan følgelig bli potensielt innbefattet ved dannelse av en AN1792-rettet immunrespons. I studier opptil nå er en viss økning i APP-nivåer
 5 blitt registrert som neuropatologiske økninger i PDAPP mus. I korteks var nivåer av enten APP- α /FL (full-lengde) eller APP- α vesentlig uforandret ved behandling med unntakelsen av at APP- α ble redusert med 19% ved 18-måneders tidspunktet i AN1792-behandlet vs. PBS-behandlet gruppe. 18-måneder AN1792-behandlede APP-verdier var ikke synlig forskjellig fra verdier
 10 til 12-måneder og 15-måneder ubehandlede og 15-måneder PBS-gruppe. I alle tilfellene var APP-verdiene innenfor områdene som normalt finnes i PDAPP mus.

5. Effekter av AN1792 behandling på neurodegenerativ og gliotisk patologi

15 Neurittisk plakkbelastning var betydelig redusert i frontal korteks til AN1792-behandlede mus sammenlignet med PBS-gruppen etter både 15 (84%; $p=0,03$) og 18 (55%; $p=0,01$) måneders alder (fig. 8). Middelsverdien til neurittisk plakkbelastning økte fra 0,32% til 0,49% i PBS-gruppen mellom 15 og 18 måneders alder. Dette sto i kontrast til den sterkt reduserte utviklingen av
 20 neurittiske plakker i AN1792 gruppen med median neurittisk plakkbelastningsverdier på 0,05% og 0,22% i henholdsvis 15 og 18 måneders gruppene.

Immuniseringen med AN1792 så ut til å være godt tolerert og reaktiv
 25 astrocytose var også betydelig redusert i RSC til AN1792-behandlede mus sammenlignet med PBS gruppen etter både 15 (56%; $p=0,011$) og 18 (39%; $p=0,028$) måneders alder (fig. 9). Medianverdier av prosent astrocytose i PBS gruppen økte mellom 15 og 18 måneder fra 4,26% til 5,21%. AN1792-behandling undertrykte utviklingen av astrocytose ved begge tidspunkter til
 30 henholdsvis 1,89% og 3,2%. Dette tyder på at neutropil ikke var blitt skadet ved fjerningsprosessen.

6. Antistoffresponser

Som beskrevet ovenfor mottok 11 måneder gamle, heterozygote PDAPP mus (n=24) en serie på 5 immuniseringer av 100 µg AN1792 emulgert med Freund's adjuvant og administrert intraperitonealt i ukene 0, 2, 4, 8 og 12, og en sjette immunisering med kun PBS (uten Freund's adjuvant) i uke 16. Som en negativ kontroll mottok et parallelt sett av 24 alder-tilpassede transgene mus immuniseringer av PBS emulgert med samme adjuvants og levert etter samme skjema. Dyrene ble blodtappet i løpet av 3 til 7 dager etter hver immunisering begynnende etter andre dose. Antistoffresponser mot AN1792 ble målt ved ELISA. Geometriske gjennomsnittstitere (GMT) for dyrene som ble immunisert med AN1792 var omtrent 1.900, 7.600 og 45.000 etter andre, tredje og siste (sjette) doser. Aβ-spesifikt antistoff ble ikke målt i kontrolldyrene etter sjette immunisering.

Omtrent halvparten av dyrene ble behandlet i ytterligere 3 måneder og mottok immuniseringer etter omtrent 20, 24 og 27 uker. Hver av disse dosene ble levert i kun PBS bærer uten Freund's adjuvant. Gjennomsnittlige antistofftitere forble uforandret i løpet av denne tidsperioden. Antistofftitrene forble stabile fra fjerde til åttende blodtapping som er i samsvar med en periode som omfatter femte til niende injeksjoner.

For å bestemme om Aβ-spesifikke antistoffer utløst ved immunisering som ble detektert i sera til AN1792-behandlede mus var også assosiert med deponert hjerneamyloid, en undergruppe av snitt fra AN1792- og PBS-behandlede mus ble omsatt med et antistoff spesifikt for muse IgG. I kontrast til PBS-gruppen ble Aβ plakk i AN1792-behandlede hjerner belagt med endogen IgG. Denne forskjellen mellom to grupper fremkom både i 15- og 18-måneders gruppene. Spesielt påfallende var mangel på merking i PBS-gruppen til tross for tilstedeværelse av en tung amyloidbelastning i disse mus. Disse resultatene viser at immunisering med et syntetisk Aβ-protein danner antistoffer som gjenkjenner og bindes in vivo til Aβ i amyloide plakk.

7. Cellulær-medierte immunresponser

Milten ble fjernet fra ni AN1792-immuniserte og 12 PBS-immuniserte 18-måneders gamle PDAPP mus 7 dager etter niende immunisering. Splenocytter ble isolert og dyrket i 72 timer i nærvær av A β 40, A β 42 eller A β 40-1 (revers rekkefølge protein). Mitogen Con A virket som en positiv kontroll. Optimale responser ble oppnådd med >1,7 μ m protein. Celler fra alle AN1792-behandlede dyr prolifererte i respons til enten A β 1-40 eller A β 1-42 protein, med like nivåer av innkorporering for begge proteinene (fig. 10) øvre panel. Det var ingen respons fra A β 40-1 reversprotein. Celler fra kontroll dyr reagerte ikke overfor noen av A β -proteinene (fig. 10, nedre panel).

C. Konklusjon

Resultater av denne studien viser at AN1792 immunisering av PDAPP mus med eksisterende amyloiddeponeringer reduserer og forhindrer progressiv amyloiddeponering og hemmer følgende neuropatologiske forandringer i eldet PDAPP musehjerne. Immunisering med AN1792 reduserte vesentlig amyloid utviklingen i strukturer som normalt vil være mottagelige for amyloidose. Administrering av A β -peptid har terapeutisk fordel ved behandling av AD.

IV. Screening av A β fragmenter

100 PDAPP mus i alder 9-11 måneder blir immunisert med 9 forskjellige regioner av APP og A β for å bestemme hvilke epitoper som leder responsen. 9 forskjellige immunogener og en kontroll blir injisert i.p. som beskrevet ovenfor. Immunogenene innbefatter fire humane A β -peptidkonjugater 1-12, 13-28, 32-42, 1-5, og alle er koblet til sau anti-muse IgG via en cystein link; et APP polypeptid aa 592-695, aggregert human A β 1-40 og aggregert human A β 25-35 og aggregert gnager A β 42. Aggregerte A β 42 og PBS blir anvendt som kontroller. 10 mus blir anvendt pr behandlingsgruppe. Titrene blir registrert som ovenfor og mus blir avlivet i slutten av 4 måneder injeksjonene. Histokjemi, A β -nivåer og toksikologi blir bestemt post mortem.

A. Materialer og metoder

1. Preparering av immunogener

Preparering av koblede A β -peptider: fire humane A β -peptid konjugater (aminosyreresidene 1-5, 1-12, 13-28 og 33-42, hver konjugert til saue anti-muse IgG) ble preparert ved kobling gjennom et kunstig cystein tilsatt til A β -peptidet ved anvendelse av kryssbindende reagens sulfo-EMCS. A β -peptidderivatene ble syntetisert med følgende endelig aminosyresekvenser. I hvert tilfelle er beliggenheten av innskutt cysteinresidie indikert ved understrekning. A β 13-28 peptidderivatet hadde også to glycinresidier tilsatt før karboksylterminal cysteinet som indikert.

10	A β 1-12 peptid	NH ₂ -DAEFRHDSGYEV <u>C</u> COOH
	A β 1-5 peptid	NH ₂ -DAEFR <u>C</u> COOH
	A β 33-42 peptid	NH ₂ - <u>C-amino-heptanoisk syre</u> -GLMVGGVVIA COOH
	A β 13-28 peptid	Ac-NH-HHQLVFFAEDVGSNK <u>GGC</u> -COOH

- 15 For å forberede koblingsreaksjonen ble 10 mg saue anti-muse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories) dialysert over natt mot 10 mM natriumboratbuffer, pH 8,5. Dialysert antistoff ble deretter konsentrert til et volum på 2 ml ved anvendelse av et Amicon Centriprepør. 10 mg sulfo-EMCS [N (ϵ -maleimidocaproyloksy)suksinimid] (Molecular Sciences Co.) ble løst opp i
- 20 1 ml deionisert vann. Et 40-ganger molart overskudd av sulfo-EMCS ble dråpevis tilsatt med omrøring til saue anti-muse IgG og deretter ble løsningen omrørt i ytterligere 10 min. Aktivert saue anti-muse IgG ble rensert og buffer utvekslet ved føring over en 10 ml gelfiltreringskolonne (Pierce Presto Column, oppnådd fra Pierce Chemicals) ekvilibret med 0,1 M NaPO₄,
- 25 antistoffinnholdende fraksjoner, identifisert ved absorbanse ved 280nm, ble slått sammen og fortynnet til en konsentrasjon på omtrent 1 mg/ml ved anvendelse av 1,4 mg pr OD som ekstinksjonskoeffisient. Et 40-ganger molart overskudd av A β -peptid ble løst opp i 20 ml 10 med mer NaPO₄, pH 8,0 med unntagelse av A β 33-42 peptidet hvor 10 mg ble først oppløst i 0,5 ml DMSO og
- 30 deretter fortynnet til 20 ml med 10 med mer NaPO₄ buffer. Peptidløsningene ble hver tilsatt til 10 ml aktivert saue anti-muse IgG og ristet ved romtemperatur i 4 timer. Resulterende konjugater ble konsentrert til et sluttvolum på mindre enn 10 ml ved anvendelse av et Amicon Cetriprepør og deretter dialysert mot PBS

for å utveksle bufferen og fjerne fritt peptid. Konjugater ble sendt gjennom 0,22 μ -porestørrelsefilteret for sterilisering og deretter alikvotet til fraksjoner på 1 mg og lagret i frossen tilstand ved -20°C. Konsentrasjoner av konjugatene ble bestemt ved anvendelse av BCA proteinanalysen (Pierce Chemicals) med heste IgG for standardkurven. Konjugasjon ble dokumentert ved molekylvektøkningen til konjugerte peptider i forhold til den til aktivert saue anti-muse IgG. A β 1-5 saue anti-musekonjugatet var en blanding av to konjugasjoner og resten var fra en enkelt preparering.

10 2. Preparering av aggregerte A β -peptider

Human 1-40 (AN1528; California Peptides Inc., Lot ME0541), human 1-42 (AN1792; California Peptides Inc., Lots ME0339 og ME0439), human 25-35, og gnager 1-42 (California Peptides Inc., Lot ME0218) peptider ble friskt solubilisert for preparering av hvert sett av injeksjoner fra lyofiliserte pulvere som var blitt lagret desikkert ved -20°C. For dette formålet ble 2 mg peptid tilsatt til 0,9 ml deionisert vann og blandingen ble vortexbehandlet for å danne en relativ jevn løsning eller suspensjon. Av fire var AN1528 det eneste peptidet som var oppløselig ved dette tidspunktet. En 100 μ l alikvot av 10X PBS (1X PBS: 0,15 M NaCl, 0,01 M natriumfosfat, pH 7,5) ble deretter tilsatt hvorpå AN1528 begynte å presipitere. Suspensjonen ble på ny vortexbehandlet og inkubert over natt ved 37°C for anvendelse neste dag.

Preparering av pBx6 protein: et ekspresjonsplasmid kodende for pBx6, et fusjonsprotein bestående av 100-aminosyre bakteriofag MS-2 polymerase N-terminal ledersekvens etterfulgt av aminosyrene 592-695 til APP (β APP) ble konstruert som beskrevet av Oltersdorf et al., J. Biol. Chem. 265, 4492-4497 (1990). Plasmidet ble transfektert inn i E. coli og proteinet ble uttrykt etter induksjon av promoteren. Bakteriene ble lysert i 8M urea og pBx6 ble delvis rensset ved preparativ SDS PAGE. Fraksjoner inneholdende pBx6 ble identifisert ved Western blot ved anvendelse av et kanin anti-pBx6 polyklonalt antistoff, sått sammen, konsentrert ved anvendelse av en Amicon Centriprepør og dialysert mot PBS. Renheten av preparatet, estimert ved Coomassie blå farvet SDS PAGE, var omtrent 5 til 10%.

B. Resultater og diskusjon

1. Studiekonstruksjon

100 hann og hunn, ni- til elleve-måneder gamle heterozygote PDAPP transgene mus ble oppnådd fra Charles River Laboratory og Taconic Laboratory. Musene
 5 ble sortert i 10 grupper for å bli immunisert med forskjellige regioner av A β eller APP kombinert med Freund's adjuvant. Dyrene ble fordelt for å passe til kjønn, alder, opphav og kilde av dyr innenfor grupper så nært som mulig. Immunogenene innbefatter fire A β peptider avledet fra den humane sekvensen 1-5, 1-12, 13-28 og 33-42, hver konjugert til saue anti-muse IgG; fire aggregerte
 10 A β peptider, human 1-40 (AN1528), human 1-42 (AN1792), human 25-35 og gnager 1-42; og et fusjonspolypeptid, betegnet pBx6, inneholdende APP aminosyreresidene 592-695. En tiende gruppe ble immunisert med PBS kombinert med adjuvant som en kontroll.

15 For hver immunisering ble 100 μ g av hvert A β peptid i 200 μ l PBS eller 200 μ g APP derivat pBx6 i samme volum av PBS eller PBS alene elugert 1:1 (vol:vol) med Freund's fullstendige adjuvant (CFA) i et sluttvolum på 400 μ l for første immunisering, etterfulgt av en booster med samme mengde immunogen i ufullstendig Freund's adjuvant (IFA) i de påfølgende fire dosene og med en PBS
 20 i den endelige dosen. Immuniseringene ble levert intraperitonealt ifølge to ganger pr uke skjema for de første tre dosene og deretter hver måned. Dyrene ble blodtappet i 4-7 dager etter hver immunisering begynnende etter den andre dosen for måling av antistofftitrene. Dyrene ble avlivet omtrent 1 uke etter den endelige dosen.

25

2. A β og APP nivåer i hjernen

Etter omtrent 4 måneders immunisering med forskjellige A β peptider eller APP derivat ble hjernene fjernet fra saltvann-perfuserte dyr. En hemisfære ble dannet for immunohistokjemisk analyse og den andre ble anvendt for
 30 kvantifisering av A β og APP nivåer. For å måle konsentrasjonene til de forskjellige formene A β amyloidpeptid og amyloidforløperprotein ble hemisfæren dissekert og homogenater av hippocampal, cortical og cerebellar regioner ble dannet i 5 M guanidin. Disse ble fortynnet og nivået av amyloid

eller APP ble kvantifisert ved sammenlignet med en serie fortyndninger av standarder av A β peptid eller APP til kjente konsentrasjoner i et ELISA format.

Middelskonsentrasjonen av total A β for kontrollgruppen immunisert med PBS var 5,8-ganger høyere i hippocampus enn i cortex (middel av 24,318 ng/g vev) sammenlignet med 4,221 ng/g for cortex). Middelsnivået i cerebellum til kontrollgruppen (23,4 ng/g vev) var omtrent 1000-ganger lavere enn i hippocampus. Disse nivåene er lik de som vi tidligere har rapportert for heterozygote PDAPP transgene mus med denne alderen (Johnson-Woods et al., 1997, supra).

For cortex hadde en undergruppe av behandlingsgrupper middels ("median") totale A β og A β 1-42 nivåer som var betydelig forskjellige fra de til kontrollgruppen ($p < 0,05$), og disse dyrene mottok AN1792, gnager A β 1-42 eller A β 1-5 peptidkonjugat som vist i fig. 11. Middelsnivåene av total A β ble redusert med henholdsvis 75%, 79% og 61%, sammenlignet med kontrollen til disse behandlingsgruppene. Det var ingen betydelige korrelasjoner mellom A β -spesifikke antistofftitere og A β -nivåene i kortikal regionen til hjernen for noen av gruppene.

I hippocampus var median reduksjonen til total A β assosiert med AN1792 behandling (46%, $p = 0,0543$) ikke så høy som den som ble observert i korteks (75%, $p = 0,0021$). Størrelsen på reduksjonen var derimot mye høyere i hippocampus enn i korteks og en netto reduksjon på 11,186 ng/g vev i hippocampus mot 3,171 ng/g vev i korteks. For dyregrupper som mottok gnager A β 1-42 eller A β 1-5 ble mediantotale A β nivåer redusert med henholdsvis 36% og 26%. Med de små gruppestørrelsene og høye variabilitet til amyloidpeptid-nivåer fra dyr til dyr innenfor begge gruppene var disse reduksjonene ikke signifikante. Når nivåene av A β 1-42 ble målt i hippocampus hadde ingen av de behandlings-induserte reduksjonene signifikans. På grunn av den mindre A β belastningen i korteks er forandringer i denne regionen en mer sensitiv indikator på behandlingseffektene. Forandringer i A β nivåer målt ved ELISA i korteks er

lignende, men ikke identiske, med resultater fra immunohistokjemiske analyser (se nedenfor).

5 Total A β ble også målt i cerebellum, en region som vanligvis er upåvirket i AD patologien. Ingen av median A β konsentrasjonene til noen av gruppene immunisert med forskjellige A β peptider eller APP derivat er forskjellige fra de til kontrollgruppen i denne regionen av hjernen. Dette resultatet tyder på at ikke-patologiske nivåer av A β er upåvirket av behandlingen.

10 APP-konsentrasjonen ble også bestemt ved ELISA i korteks og cerebellum fra behandlede og kontrollmus. To forskjellige APP analyser ble anvendt. Den første, betegnet APP- α /FL, gjenkjenner både APP-alfa (α , utskilt for av APP som blitt spaltet innenfor A β -sekvensen) og full-lengde formene (FL) til APP, mens den andre bare gjenkjenner APP- α . I kontrast til behandlings-assosiert
15 reduksjon av A β i en undergruppe av behandlingsgruppene var nivåer av APP uforandret i alle de behandlede sammenlignet med kontrolldyrene. Disse resultatene indikerer at immuniseringer med A β -peptider ikke tapper APP, men behandlingseffekten er spesifikk for A β .

20 Totale A β og A β 1-42 nivåer ble betydelig redusert i korteks ved behandling med AN1792, gnager A β 1-42 eller A β 1-5 konjugat. I hippocampus var totale A β betydelig redusert bare ved AN1792 behandling. Ingen andre behandlings-assosierte forandringer i A β eller APP nivåer i hippocampus, kortikal eller cerebellar regioner var signifikant.

25

2. Histokjemiske analyser

Hjerner fra en undergruppe av seks grupper ble preparert for immunhistokjemisk analyse, tre grupper immunisert med A β -peptidkonjugatene A β 1-5, A β 1-12 og A β 13-28; to grupper immunisert med full-lengde A β -
30 aggregatene AN1792 og AN1528 og PBS-behandlet kontrollgruppe. Resultatene av billedanalysene til amyloidbelastningen i hjernesnitt fra disse gruppene er vist i fig. 12. Det var betydelige reduksjoner i amyloidbelastning i kontrollregionene til tre av behandlingsgruppene i forhold til kontrolldyrene.

Størst reduksjon av amyloidbelastning ble observert i gruppen som mottok AN1792 hvor gjennomsnittsverdien ble redusert med 97% ($p=0,001$). Betydelige reduksjoner ble også observert for dyr behandlet med AN1528 (95%, $p=0,005$) og A β 1-5 peptidkonjugatet (67%, $p = 0,02$).

5

Resultater oppnådd ved kvantifisering av total A β eller A β 1-42 ved ELISA og amyloidbelastning ved billeddannende analyser er i en viss grad forskjellig. Behandling med AN1528 har en betydelig innvirkning på nivået av kortikal amyloidbelastningen når målt ved kvantitativ billedanalyse, men ikke på konsentrasjonen av total A β i samme region når målt ved ELISA. Forskjellen mellom disse to resultatene skyldes sannsynligvis spesifisitetene ved analysene. Billedannende analyser måler bare uoppløselige A β aggregert i plakk. I kontrast til dette måler ELISA alle formene av A β , både oppløselige og uoppløselige, monomere og aggregerte. På grunn av at sykdomspatologien antas å være assosiert med uoppløselig plakk-assosiert form av A β kan billedanalyseteknikken ha mer sensitivitet for å utvise behandlingseffektene. På grunn av at ELISA er en hurtigere og lettere analyse er den veldig nyttig for screeningsformål. Det kan derimot vise at behandlings-assosiert reduksjon av A β er høyere for plakk-assosiert enn total A β .

20

For å bestemme om A β -spesifikke antistoffer utløst ved immunisering i behandlede dyr reagerte med deponert hjerneamyloid ble en undergruppe av snitt fra behandlede dyr og kontrollmus reagert med antistoff spesifikt for muse IgG. I kontrast til PBS gruppen ble A β -innholdende plakk belagt med endogen IgG for dyr immunisert med A β -peptidkonjugatene A β 1-5, A β 1-12 og A β 13-28; og full-lengde A β -aggregatene AN1792 og AN1528. Hjernen fra dyr immunisert med andre A β -peptider eller APP-peptid pBx6 ble ikke analysert i denne analysen.

30

3. Måling av antistoff titere

Mus ble blodtappet 4-7 dager etter hver immunisering begynnende etter den andre immuniseringen, totalt 5 tappinger. Antistofftitrene ble målt som A β 1-42-bindende antistoff ved anvendelse av en sandwich ELISA med plast multi-brønn

skåler belagt med A β 1-42. Som vist i fig. 13, ble topp antistofftitere utløst etter den fjerde dosen for de fire vaksinene som utløste høyeste titere av AN1792-spesifikke antistoffer: AN1792 (topp GMT: 94,647), AN1528 (topp GMT: 88,231), A β 1-12 konjugat (topp GMT: 47,216) og gnager A β 1-42 (topp GMT: 10,766). Titere for disse gruppene ble noe redusert etter femte og sjette dose. For gjenværende 5 immunogener ble topptitert etter femte til sjette dose og disse hadde mye lavere størrelse enn de til de fire høyeste titergruppene: A β 1-5 konjugat (topp GMT: 2,356), pBx6 (topp GMT: 1,986), A β 13-28 konjugat (topp GMT: 1,183), A β 33-42 konjugat (topp GMT: 658), A β 25-35 (topp GMT: 125). Antistofftitrene ble også målt mot de homologe peptidene ved anvendelse av samme ELISA sandwichformat for en undergruppe av immunogener hvor de gruppene som var immunisert med A β 1-5, A β 13-28, A β 25-35, A β 33-42 eller gnager A β 1-42. Disse titrene var omtrent de samme som de som ble målt mot A β 1-42 med unntagelse av gnager A β 1-42 immunogen i hvilke tilfelle antistofftitere mot det homologe immunogenet var omtrent 2-ganger høyere. Størrelsen til AN1792-spesifikt antistofftiter til individuelle dyr eller gjennomsnittsverdier av behandlingsgrupper korrelerte ikke med effektiviteten målt som reduksjon av A β i korteks.

20 4. Lymfoproliferative responser

A β -hengig lymfoprolifisering ble målt ved anvendelse av miltceller høstet omtrent 1 uke etter den endelige, sjette, immuniseringen. Friskt høstede celler, 10^5 pr brønn, ble dyrket i 5 dager i nærvær av A β 1-40 ved en konsentrasjon på 5 μ M for stimulering. Celler fra en undergruppe av 7 av de 10 gruppene ble også dyrket i nærvær av revers peptid, A β 40-1. Som en positiv kontroll ble ytterligere celler dyrket med T-celle mitogen, PHA, og, som en negativ kontroll, ble cellene dyrket uten tilsatt peptid.

Lymfocytter fra de fleste dyrene prolifererte i respons til PHA. Det var ingen signifikante responser overfor A β 40-1 reverspeptid. Cellene fra dyr immunisert med større aggregerte A β -peptider, AN1792, gnager A β 1-42 og AN1528 prolifererte sterkt når stimulert med A β 1-40 med høyest cpm i mottakerene til AN1792. Et dyr i hver av gruppene immunisert med A β 1-12 konjugatet, A β 13-

28 konjugat og A β 25-35 prolifererte i respons til A β 1-40. Gjenværende grupper mottok A β 1-5 konjugat, A β 33-42 konjugat pBx6 eller PBS hadde ingen dyr med en A β -stimulert respons. Disse resultatene er oppsummert i tabell 5 nedenfor.

5

Tabell 5			
Immunogen	Konjugat	A β aminosyrer	Respondere
A β 1-5	Ja	5-mer	0/7
A β 1-12	Ja	12-mer	1/8
A β 13-28	Ja	16-mer	1/9
A β 25-35		11-mer	1/9
A β 33-42	Ja	10-mer	0/10
A β 1-40		40-mer	5/8
A β 1-42		42-mer	9/9
r A β 1-42		42-mer	8/8
PBx6			0/8
PBS		0-mer	0/8

Disse resultatene viser at AN1792 og AN1528 stimulerer sterk T-celle responser, sannsynligvis CD4⁺ fenotypen. Fravær av en A β -spesifikk T-cellerespons i dyr immunisert med A β 1-5 er ikke overraskende på grunn av at peptidepitoper gjenkjent av CD4⁺ T-celler har vanligvis omtrent 15 aminosyrer i lengde, til tross for at kortere peptider noen ganger kan virke med mindre effektivitet. De fleste hjelper T-cellepitopene for de fire konjugatpeptidene ligger sannsynligvis i IgG konjugatpartneren, ikke i A β -regionen. Denne hypotesen er understøttet av den meget lave forekomsten av proliferative responser for dyr i hver av disse behandlingsgruppene. På grunn av at A β 1-5 konjugatet var effektivt på en betydelig reduksjon av nivået av A β i hjernen, i tilsynelatende fravær av A β -spesifikke T-celler, synes nøkkeleffektor immunresponsen induert ved immunisering med dette peptidet ut til å være antistoff.

Mangel på T-celle og lav antistoffrespons fra fusjonspeptid pBx6, omfattende APP aminosyrene 592-695 inkludert alle A β residiene kan være forårsaket av dårlig immunogenisitet ved dette bestemte preparatet. Dårlig immunogenisitet til A β 25-35 aggregatet skyldes sannsynligvis at peptidet er for lite for at det er sannsynlig at det inneholder en god T-celle epitope for å hjelpe til med induksjon av en antistoffrespons. Dersom dette peptidet ble konjugert til et bærerprotein vil det sannsynligvis være mer immunogent.

V. Preparering av polyklonale antistoffer for passiv beskyttelse

20 ikke-transgene mus ble immunisert med A β eller annet immunogen, eventuelt pluss adjuvant, og blir avlivet etter 4-5 måneder. Blod blir tappet fra immuniserte mus. IgG blir eventuelt separert fra andre blodkomponenter. Antistoff spesifikt for immunogenet kan bli delvis rensset ved affinitetskromatografi. Et gjennomsnitt på omtrent 0,5-1 mg av immunogen-spesifikt antistoff blir oppnådd pr mus og gir totalt 5-10 mg.

VI. Passiv immunisering med antistoffer mot A β

Grupper på 7-9 måneder gamle PDAPP mus blir hver injisert med 0,5 mg i PBS av polyklonale anti-A β eller spesifikke anti-A β monoklonaler som vist nedenfor.

Alle antistoffpreparatene blir rensset slik at de har lave endotoksinnivåer. Monoklonalene kan bli dannet mot et fragment ved injisering av fragmentet eller lengre former av A β inn i en mus, preparering av hybridomer og screening av hybridomene for et antistoff som spesifikt bindes til et ønsket fragment av A β uten å bli bundet til andre ikke-overlappende fragmenter av A β .

TABELL 6

Antistoff	Epitope
2H3	A β 1-12
10D5	A β 1-12
266	A β 13-28
21F12	A β 33-42
Muse polyklonalt anti-humant A β 42	Anti-aggregert A β 42

Musene blir injisert ip etter behov over en fire måneder lang periode for å opprettholde en sirkulerende antistoffkonsentrasjon målt ved ELISA-titer som er høyere enn 1/1000 definert ved ELISA til A β 42 eller annet immunogen. Titere blir registrert som ovenfor og mus blir avlivet 4 måneder etter injeksjonene. Histokjemi, A β -nivåer og toksikologi blir utført post mortem. 10 mus blir anvendt pr gruppe.

VII. Sammenligning av forskjellige adjuvants

Dette eksempelet sammenligner CFA, alun, en olje-i vann emulsjon og MPL for kapasiteten til å stimulere en immunrespons.

A. Materialer og metoder

1. Studiekonstruksjon

100 hunn Hartley stamme seks-uker gamle marsvin oppnådd fra Elm Hill ble sortert i 10 grupper for å bli immunisert med AN1792 eller et palmitoylert derivat derav kombinert med forskjellige adjuvants. 7 grupper mottok injeksjoner av AN1792 (33 μ g dersom ikke annet er angitt) kombinert med a) PBS, b) Freund's adjuvant, c) MPL, d) squalen, e) MPL/Squalen f) lav dose alun eller g) høydose alun (300 μ g AN1792). To grupper mottok injeksjoner av et palmitoylert derivat av AN1792 (33 μ g) kombinert med a) PBS eller b) squalen. Den siste, tiende gruppen godtok kun PBS uten antigen eller ytterligere adjuvant. For gruppen som mottar Freund's adjuvant ble den første dosen emulgert med CFA og gjenværende 4 doser med IFA. Antigen ble administrert i doser på 33 μ g for alle grupper med unntagelse av høy dose alungruppen som mottok 300 μ g AN1792. Injeksjonene ble administrert intraperitonealt for CFA/IFA og intramuskulært i bakken quadriceps alternerende på høyre og venstre side for alle andre grupper. De første tre dosene ble gitt i en til to ganger ukentlig skjema etterfulgt av to doser i månedlige intervaller). Blod ble tappet 6 til 7 dager etter hver immunisering begynnende etter den andre dosen for måling av antistofftitrene.

2. Preparering av immunogener

2 mg A β 42 (California Peptide, Lot ME0339) ble tilsatt til 0,9 ml av deionisert vann og blandingen ble vortex behandlet for å danne en relativ jevn suspensjon. En 100 μ l alikvot av 10X PBS (1X PBS, 0,15 M NaCl, 0,01 M natriumfosfat, pH 7,5) ble tilsatt. Suspensjonen ble vortex behandlet på ny og inkubert over natt
5 ved 37°C for anvendelse neste dag. Ubrukt A β 1-42 ble lagret med desikkant som et lyofilisert pulver ved -20°C.

Et palmitoylert derivat av AN1792 ble dannet ved kobling av palmitinsyreanhydrid, oppløst i dimetylformamid, til den aminoterminalen resten
10 av AN1792 før fjerning av nakent peptid fra harpiksen ved behandling med hydrofluorsyre.

For å danne vaksinedoser med fullstendig Freund's adjuvant (CFA) (gruppe 2) ble 33 μ g AN1792 i 200 μ l PBS emulgert 1:1 (vol:vol) med CFA i et sluttvolum
15 på 400 μ l for første immunisering. For påfølgende immuniseringer ble antigenet likeledes emulgert med ufullstendig Freund's adjuvant (IFA).

For å preparere vaksinedoser med MPL for gruppene 5 og 8 ble lyofilisert pulver (Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MT) tilsatt til 0,2% vandig
20 trietylamin til en sluttkonsentrasjon på 1 mg/ml og vortexbehandlet. Blandingene ble oppvarmet til 65-70°C i 30 sek. for å danne en noe opak jevn suspensjon av miceller. Løsningen ble nydannet for hvert sett av injeksjoner. For hver injeksjon i gruppen 5 ble 33 μ g AN1792 i 16,5 μ l PBS, 50 μ g MPL (50 μ l) og 162 μ l PBS blandet i et borsilikat rør rett før bruk.

25

For å danne vaksinedoser med lav olje-is-vann emulsjon ble AN1792 i PBS tilsatt til 5% squalen, 0,5% Tween 80, 0,5% Span 85 i PBS for å nå en endelig
enkeltdose konsentrasjon på 33 μ g AN1792 i 250 μ l (gruppe 6). Blandingene ble emulgert ved å bli sendt gjennom en to-rom hånd-holdt innretning 15 til 20
30 ganger helt til emulsjonsdråpene så ut til å ha lik diameter som en 1,0 μ m diameter standardlatekskule når undersøkt under et mikroskop. Resulterende suspensjon sløret, melkehvitt. Emulsjonene ble nydannet for hver serie av injeksjoner. For gruppe 8 ble MPL i 0,2% trietylamin tilsatt ved en konsentrasjon

på 50 µg pr dose til squalen og detergentblandingen for emulgering som angitt ovenfor. For palmitoylderivatet (gruppe 7) ble 33 µg pr dose palmitoyl-NH-Aβ1-42 tilsatt til squalen og vortexbehandlet. Tween 80 og Span 85 ble deretter tilsatt en vortexbehandling. Denne blandingen ble tilsatt til PBS for å oppnå
 5 sluttkonsentrasjoner av 5% squalen, 0,5% Tween 80, 0,5% Span 85 og blandingen ble emulgert som angitt ovenfor.

For å preparere vaksinedoser ved alun (gruppene 9 og 10) ble AN1792 i PBS tilsatt til Alhydrogel (aluminium hydroxide gel, Accurate, Westbury, NY) for å nå
 10 konsentrasjoner på 33 µg (lav dose, gruppe 9) eller 300 µg (høy dose, gruppe 10) AN1792 pr 5 mg alun i et endelige dosevolum på 250 µl. Suspensjonen ble forsiktig blandet i 4 timer ved RT.

3. Måling av antistofftitere

15 Marsvin ble blodtappet 6-7 dager etter immunisering begynnende etter andre immunisering ved totalt 4 blodtappinger. Antistofftitere mot Aβ42 ble målt ved ELISA som beskrevet i generelle materialer og metoder.

4. Vevspreparering

20 Etter 14 uker ble alle marsvinene administrert CO₂. Cerebrospinalfluidet ble samlet og hjernene ble fjernet og tre hjerneregioner (hippocampus, korteks og cerebellum) ble dissekert og anvendt for å måle konsentrasjon av total Aβ-protein ved anvendelse av ELISA.

25 B. Resultater

1. Antistoffresponser

Det var et stort område i potens til forskjellige adjuvants når målt som antistoffrespons mot AN1792 etter immunisering. Som vist i fig. 14 ble ikke antistoff detektert etter to eller tre immuniseringer og neglisjerbare responser
 30 ble detektert etter fjerde og femte doser med geometriske gjennomsnittstitere (GMT) på bare 45 når AN1792 ble administrert i PBS. o/w emulsjonen induserte moderate titere etter tredje dose (GMT 255) som ble opprettholdt etter fjerde dose (GMT 301) og falt med den endelige dosen (GMT 54). Det var en klar

antigendoserepons for AN1792 bundet til alun med 300 µg som var mer immunogene ved alle tidspunkter enn 33 µg. Ved toppen av antistoffresponser, etter fjerde immunisering, var forskjellen mellom de to dosene 43% ved GMT på omtrent 1940 (33 µg) og 3400 (300 µg). Antistoffresponser til 33 µg AN1792 pluss MPL var meget lik den som ble dannet med nesten en 10-ganger høyere dose av antigen (300 µg) bundet til alun. Tilsetning av MPL til en o/w emulsjon reduserte potensen av vaksinen i forhold til den med MPL som eneste adjuvant med så mye som 75%. Et palmitoylert derivat av AN1792 var fullstendig ikke-immunogen når administrert i PBS og ga moderate titere når presentert i en o/w emulsjon med GMT på 340 og 105 for å tredje og fjerde blodtappinger. Høyest antistofftitere ble dannet med Freund's adjuvant med en topp GMT på omtrent 87.000, en verdi som er nesten 30-ganger høyere enn GMT til de neste to mest potente vaksiner, MPL og høy dose AN1792/alun.

De mest lovende adjuvants identifisert i denne studien er MPL og alun. Av disse to fremstår MPL som foretrukket på grunn av en 10-ganger lavere antidose var nødvendig for å danne samme antistoffrespons som oppnådd med alun. Responsen kan bli øket ved øking av dosen av antigen og/eller adjuvant og ved optimalisering av immuniseringsskjemaet. o/w emulsjonen var en meget svak adjuvant for AN1792 og tilsetning av en o/w emulsjon til MPL adjuvant reduserte den intrinsiske adjuvantaktiviteten til MPL alene.

2. Aβ nivåer i hjernen

Ved omtrent 14 uker ble marsvinene dypt bedøvet, cerebrospinalfluid (CSF) ble tappet og hjernene ble tatt ut fra dyr i en undergruppe av gruppene, de som ble immunisert med Freund's adjuvant (gruppe 2), MPL (gruppe 5), alun med en høy dose 300 µgm AN1792 (gruppe 10) og PBS immunisert kontrollgruppe (gruppe 3). For å måle nivået av Aβ peptid ble en hemisfære dissekert og homogenater av hippocampal, kortikal og cerebellar regioner ble dannet i 5 M guanidin. Disse ble fortynnet og kvantifisert ved sammenligning med en serie fortynninger av Aβ standardprotein av kjente konsentrasjoner i et ELISA format. Nivåer av Aβ protein i hippocampus, korteks og cerebellum var meget lik i alle fire gruppene til tross for det store området av antistoffresponser mot Aβ utløst

av disse vaksinene. Gjennomsnittlige A β nivåer til omtrent 25 ng/g vev ble målt i hippocampus, 21 ng/g i korteks og 12 ng/g i cerebellum. Tilstedeværelse av et høyt sirkulerende antistofftiter til A β i nesten 3 måneder i noen av disse dyrene endret ikke de totale A β nivåene i hjernene. Nivåer i A β i CSF var også meget lik mellom gruppene. Mangel på stor effekt ved AN1792 immunisering på endogen A β indikerer at immunresponsen er fokusert på patologiske dannelser av A β .

VIII. Immunrespons mot forskjellige adjuvants i mus

- Seks-uker gamle Swiss Webster mus ble anvendt i denne studien med 10-13 dyr pr gruppe. Immuniseringene ble gitt på dagene 0, 14, 28, 60, 90 og 20 administrert subkutan i et dosevolum på 200 μ l. PBS ble anvendt som buffer i alle formuleringene. Dyrene ble blodtappet syv dager etter hver immunisering begynnende etter andre dose for analyse av antistofftiter ved ELISA.
- Behandlingsregimet til hver gruppe er oppsummert i tabell 7.

TABELL 7

Eksperimentell konstruksjon av betablokkstudie 010					
Gruppe	N ^a	Adjuvant ^b	Dose	Antigen	Dose (μ g)
1	10	MPL	12,5 μ g	AN1792	33
2	10	MPL	25 μ g	AN1792	33
3	10	MPL	50 μ g	AN1792	33
4	13	MPL	125 μ g	AN1792	33
5	13	MPL	50 μ g	AN1792	150
6	13	MPL	50 μ g	AN1792	33
7	10	PBS		AN1792	33
8	10	PBS		Ingen	
9	10	emulgert squalen	5%	AN1792	33
10	10	Squalen blandet	5%	AN1792	33

		sammen			
11	10	Alun	2 mg	AN1792	33
12	13	MPL + alun	50 µg/2 mg	AN1792	33
13	10	QS21	5 µg	AN1792	33
14	10	QS21	10 µg	AN1792	33
15	10	QS21	25 µg	AN1792	33
16	13	QS21	25 µg	AN1792	150
17	13	QS21	25 µg	AN1528	33
18	13	QS21+MPL	25 µg/50µg	AN1792	33
19	13	QS21+alun	25 µg/2 mg	AN1792	33

Fotnoter:

^a Antall dyr i hver gruppe ved initiering av eksperiment.

^b Adjuvants er angitt. Bufferen i alle disse formuleringene var PBS. For gruppe 8 var det ingen adjuvant og ingen antigen.

5

ELISA titere til antistoffer mot Aβ42 i hver gruppe er vist i tabell 8 nedenfor.

TABELL 8

Geometriske gjennomsnittlige antistofftitere					
Uke med blodtapping					
Behandling Gruppe	2,9	5,0	8,7	12,9	16,7
1	248	1797	2577	6180	4177
2	598	3114	3984	5287	6878
3	1372	5000	7159	12333	12781
4	1278	20791	14368	20097	25631
5	3288	26242	13229	9315	23742
6	61	2536	2301	1442	4504
7	37	395	484	972	2149
8	25	25	25	25	25
9	25	183	744	952	1823

10	25	89	311	513	817
11	29	708	2618	2165	3666
12	198	1458	1079	612	797
13	38	433	566	1080	626
14	104	541	3247	1609	838
15	212	2630	2472	1224	1496
16	183	2616	6680	2085	1631
17	28	201	375	222	1540
18	31699	15544	23095	6412	9059
19	63	243	554	299	441

Tabellen viser at de høyeste titrene ble anvendt for gruppene 4, 5 og 18, hvor adjuvantene var 125 µg MPL, 50 µg MPL og QS21 pluss MPL.

5 IX. Terapeutisk effektivitet til forskjellige adjuvants

En terapeutisk effektivitetsstudie ble utført i PDAPP transgene mus med et sett av adjuvants egnet for anvendelse i mennesker for å bestemme deres evne til å potensiere immunresponser mot Aβ og å indusere immun-mediert fjerning av amyloiddeponeringer i hjernen.

10

180 hann og hunn, 7,5- til 8,5-måneder gamle heterozygote PDAPP transgene mus ble oppnådd fra Charles River Laboratories. Musene ble sortert i ni grupper inneholdende 15-23 dyr pr gruppe som skulle bli immunisert med AN1792 og AN1528 kombinert med forskjellige adjuvants. Dyrene ble fordelt for å tilpasse

15

kjønn, alder og opphav til dyrene innenfor grupper så nært som mulig. Adjuvants innbefattet alun, MPL og QS21, hver kombinert med begge antigenene, og Freund's adjuvant (FA) kombinert med bare AN1792. En ytterligere gruppe ble immunisert med AN1792 formulert i PBS buffer pluss

20

preserveringsmiddelet timerosal uten adjuvant. En niende gruppe ble immunisert med PBS alene som en negativ kontroll.

Preparering av aggregerte Aβ-peptider: human Aβ1-40 (AN1528; California Peptides Inc., Napa, CA; Lot ME0541) og human Aβ1-42 (AN1792; California

- Peptides, Inc., Lot ME0439) peptider ble friskt oppløst for preparering av hvert sett av injeksjoner for lyofiliserte pulvere som var blitt lagret dessikert ved -20°C. For dette formålet ble 2 mg av peptidet tilsatt til 0,9 ml deionisert vann og blandingen ble vortexbehandlet for å danne en relativ jevn oppløsning eller suspensjon. AN1528 var oppløselig i dette trinnet, i en kontrast til AN1792. En 100 µl alikvot av 10X PBS (1X PBS: 0,15M NaCl, 0,01 M natriumfosfat, pH 7,5) ble deretter tilsatt hvorpå AN1528 begynte å presipitere. Suspensjonene ble på ny vortexbehandlet og inkubert over natt ved 37°C for anvendelse neste dag.
- 10 For å preparere vaksinedoser med alun (gruppene 1 og 5) ble Aβ peptid i PBS tilsatt til Alhydrogel (to prosent vandig aluminiumhydroksidgel, Sargeant, Inc., Clifton, NK) for å nå konsentrasjoner på 100 µg Aβ peptid pr 1 mg alun. 10X PBS ble tilsatt til et slutt-dosevolum på 200 µl i 1X PBS. Suspensjonen ble deretter forsiktig blandingen i omtrent 4 timer ved RT før injeksjon.
- 15 For å preparere vaksinedoser med MPL (gruppene 2 og 6) ble lyofilisert pulver (Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MT; Lot 67039-E0896B) tilsatt til 0,2% vandig trietylamin til en slutt-konsentrasjon på 1 mg/ml og vortexbehandlet. Blandingen ble oppvarmet til 65 til 70°C i 30 sek. for å danne en noe opaque jevn suspensjon av miceller. Løsningen ble lagret ved 4°C. For hvert sett av injeksjonene ble 100 µg peptid pr dose i 50 µl PBS, 50 µg MPL pr dose (50 µl) og 100 µl PBS pr dose blandet i et borosilikatrør rett før bruk.
- 20 For å preparere vaksinedoser med QS21 (gruppe 3 og 7) ble lyofilisert pulver (Aquila, Framingham, MA; Lot A7018R) tilsatt til PBS, pH 6,6-6,7 til en slutt-konsentrasjon på 1 mg/ml og vortexbehandlet. Løsningen ble lagret ved -20°C. For hvert sett av injeksjoner ble 100 µg peptid pr dose i 50 µl PBS, 25 µg QS21 pr dose i 25 µl PBS og 125 µl PBS pr dose blandet i et borosilikatrør rett før bruk.
- 30 For å preparere vaksinedoser med Freund's adjuvant (gruppe 4) ble 100 µg AN1792 i 200 µl PBS emulgert 1:1 (vol:vol) med komplett Freund's adjuvant (CFA) i et sluttvolum på 400 µl for første immunisering. For påfølgende

immuniseringer ble antigen likeledes emulgert med ufullstendig Freund's adjuvant (IFA). For vaksiner inneholdende adjuvants ble alun, MPL eller QS21, 100 µg pr dose AN1792 eller AN1528 kombinert med alun (1 mg pr dose) eller MPL (50 µg pr dose) eller QS21 (25 µg pr dose) i et sluttvolum på 200 µl PBS og levert ved subkutan inokulering på ryggen mellom skulderbladene. For gruppen som mottok FA ble 100 µg AN1792 emulgert 1:1 (vol:vol) med fullstendig Freund's adjuvant (CFA) i et sluttvolum på 400 µl og levert intraperitonealt for første immunisering, etterfulgt av en booster av samme mengde immunogen i ufullstendig Freund's adjuvant (IFA) for påfølgende 5 doser. For gruppen som mottok AN1792 uten adjuvant ble 10 µg AN1792 kombinert med 5 µg thimerosal i et sluttvolum på 50 µl PBS og levert subkutan. Den niende kontrollgruppen mottok bare 200 µl PBS levert subkutan. Immuniseringene ble gitt i et skjema to ganger ukentlig for de første tre dosene og deretter i et månedlig skjema deretter på dagene 0, 16, 28, 56, 85 og 112. Dyrene ble blodtappet 6-7 dager etter hver immunisering begynnende etter den andre dosen for måling av antistofftitere. Dyrene ble avlivet omtrent en uke etter den endelige dosen. Resultatene ble målt ved ELISA analyse av Aβ og APP nivåer i hjernen og ved immunhistokjemisk vurdering av tilstedeværelse av amyloidplakk i hjernesnitt. I tillegg ble Aβ-spesifikke antistofftitere og Aβ-avhengige proliferative og cytokinresponser bestemt.

Tabell 9 viser at høyeste antistofftitere mot Aβ1-42 ble utløst med FA og AN1792, titrene som var topp etter fjerde immunisering (topp GMT: 75.386) og deretter ble redusert med 59% etter den endelige sjette immuniseringen. Topp gjennomsnittstiter utløst av MPL med AN1792 var 62% lavere enn den som ble dannet med FA (topp GMT: 28.867) og ble også nådd tidlig i immuniseringsskjemaet, etter tre doser, etterfulgt av en reduksjon til 28% av toppverdien etter sjette immunisering. Topp gjennomsnittstiter dannet med QS21 kombinert med MPL og AN1528 (topp GMT 3099) var omtrent 5-ganger lavere enn den som ble oppnådd med MPL. I tillegg var kinetikken til responsen saktere på grunn av at en ytterligere immunisering var nødvendig for å nå topprespons. Titer dannet ved alun-bundet AN1792 ble marginalt høyere enn de som ble oppnådd med QS21 og responskinetikken var hurtigere. For

- AN1792 levert i PBS med thimerosal var frekvensen og størrelsen på titrene så vidt høyere enn de for PBS alene. Topptitrene dannet med MPL og AN1528 (topp GMT 3099) var omtrent 9-ganger lavere enn de med AN1792. Alun-bundet AN1528 var dårlig immunogent med lave titere dannet i bare noen av dyrene. Ingen antistoffresponser ble observert i kontrolldyr immunisert med kun PBS.

TABELL 9

Geometriske gjennomsnittlige antistofftitere ^a					
Uke for blodtapping					
Behandling	3,3	5,0	9,0	13,0	17,0
Alun/ 1792	102 (12/21) ^b	1,081 (17/20)	2,366 (21/21)	1,083 (19/21)	572 (18/21)
MPL/ AN1792	6241 (21/21)	28,867 (21/21)	1,1242 (21/21)	5,665 (20/20)	8,204 (20/20)
QS21/ AN1792	30 (1/20)	227 (10/19)	327 (10/19)	1,511 (17/18)	1,188 (14/18)
CFA/ AN1792	10,076 (15/15)	61,279 (15/15)	75,386 (15/15)	41,628 (15/15)	30,574 (15/15)
Alun/ AN1528	25 (0/21)	33 (1/21)	39 (3/20)	37 (1/20)	31 (2/20)
MPL/ AN1528	184 (15/21)	2,591 (20/21)	1,653 (21/21)	1,156 (20/20)	3,099 (20/20)
QS21/ AN1528	29 (1/22)	221 (13/22)	51 (4/22)	820 (20/22)	2,994 (21/22)
PBS pluss Thimerosal	25 (0/16)	33 (2/16)	39 (4/16)	37 (3/16)	47 (4/16)
PBS	25 (0/16)	25 (0/16)	25 (0/15)	25 (0/12)	25 (0/16)

10

Fotnoter:

^a Geomtrisk gjennomsnittlige antistofftitere mål mot Aβ1-42

^b Antall respondere pr gruppe

Resultater av AN1792 eller AN1592 behandling med forskjellige adjuvants eller thimerosal på kortikal amyloidbelastning i 12-måneder gamle mus bestemt ved ELISA er vist i fig. 15. I PBS kontroll PDAPP mus var gjennomsnittlig nivå av total A β i korteks ved 12 måneder 1,817 ng/g. Reduserte nivåer av A β ble observert i mus behandlet med AN1792 pluss CFA/IFA, AN1792 pluss alun, AN1792 pluss MPL og QS21 pluss AN1792. Reduksjonen nådde statistisk signifikant ($p < 0,05$) bare for AN1792 pluss CFA/IFA. Som vist i eksemplene I og III ble effekter av immunisering i reduserende A β nivåer vesentlig høyere i måneder og 18 måneder gamle mus. Det er følgelig ventet at minst AN1792 pluss alun, AN1792 pluss QS21 blandinger vil oppnå statistisk signifikans ved behandling av eldre mus. I kontrast til dette viste AN1792 pluss preserveringsmiddelthimerosal et middelsnivå på A β på omtrent det samme som i PBS behandlede mus. Lignende resultater ble oppnådd når kortikalinivåer av A β 42 ble sammenlignet. Middelsnivået av A β 42 i PBS-kontrollene var 1624 ng/g. Betydelig reduserte middelsnivåer på 403, 1149, 620 og 714 ble observert i mus behandlet med AN1792 pluss CFA/IFA, AN1792 pluss alun, AN1792 pluss MPL og AN1792 pluss QS21, med reduksjonen som oppnådde statistisk signifikans ($p = 0,05$) for AN1792 CFA/IFA behandlingsgruppen. Middelsnivået i AN1792 thimerosal behandlede mus var 1619 ng/g A β 42.

X. Toksisitetsanalyser

Vev ble samlet for histopatologisk undersøkelse av avslutning av studier beskrevet i eksemplene 2, 3 og 7. I tillegg ble hematologisk og klinisk kjemi utført på terminale blodprøver fra eksemplene 3 og 7. Det meste av hovedorganene ble vurdert, inkludert hjerne, lunge, lymfoid, mavetarm, lever, nyre, adrenal og gonader. Til tross for at sporadiske lesjoner ble observert i undersøkelsesdyrene, var det ingen innlysende forskjeller, enten i vev som var blitt påvirket eller alvorlighet av lesjon, mellom AN1792 behandlede og ubehandlede dyr. Det var ingen unike histopatologiske lesjoner angitt i AN-1782-immuniserte dyr sammenlignet med PBS-behandlede eller ubehandlede dyr. Det var heller ingen forskjeller i klinisk kjemiprofil mellom adjuvantgruppene

og PBS-behandlede dyr i eksempel 7. Til tross for at det var betydelige økninger i nivået av hematologiske parametere mellom dyr behandlet med AN1792 og Freund's adjuvant i eksempel 7 i forhold til PBS behandlede dyr er disse effekttypene ventet ut fra Freund's adjuvant behandling og ledsagende peritonitt og indikerer ikke noen negative effekter fra AN1792 behandlingen. Uten å være del av den toksologiske vurderingen ble PDAPP musehjernepatologien omfattende undersøkt som del av sluttpunkter for effektivitet. Ingen tegn på behandling relatert til negativ effekt på hjernemorfologien ble notert i noen av studiene. Disse resultatene indikerer at AN1792 behandlingen tolereres godt og vesentlig fri for bivirkninger.

XI. Forhindring og behandling av individer

Et enkelt-dose fase I forsøk blir utført for å bestemme trygghet. Et terapeutisk middel blir administrert i økende doseringer til forskjellige pasienter begynnende fra omtrent 0,01 av nivået med antatt effektivitet og økende med en faktor på 3 helt til et nivå på omtrent 10 ganger av effektiv musedosering blir oppnådd.

Et fase II forsøk blir utført for å bestemme terapeutisk effektivitet. Pasienter med tidlig til midt Alzheimers sykdom definert ved anvendelse av Alzheimer's disease and Related Disorders Association (ADDA) kriterier for sannsynlig for AD ble valgt. Egnede pasienter scorer i 12-26 området på "Mini-Mental State Exam (MMSE)". Andre seleksjonskriterier er at pasienter overlever sannsynligvis varigheten av studien og mangler kompliserende vev så som anvendelse av samtidige medisiner som kan interferere. Grunnlinjevurderingene av pasientfunksjonen blir dannet ved anvendelse av klassiske psykometriske mål, så som MMSE og ADAS, som er en komprehensiv skala for vurdering av pasienter med Alzheimers sykdomsstatus og funksjon. Disse psykometriske skalaene tilveiebringer et mål på progressjon av Alzheimers tilstand. Egnede kvalitative livsskalaer kan også bli anvendt for å registrere behandling. Sykdomsprogressjon kan også bli registrert ved MRI. Blodprofiler til pasienter kan også bli registrert som innbefatter analysing av immunogen-spesifikke antistoffer og T-celleresponser.

Etter grunnlinjemålinger begynner pasienten å få behandling. De blir randomisert og behandlet med enten terapeutisk middel eller placebo i en blind-type. Pasienter blir registrert i det minste hver sjette måned. Effektiviteten blir bestemt ved en signifikant reduksjon i progressjon av en behandlingsgruppe i forhold til en placebogruppe.

En andre fase II forsøk blir utført for å vurdere omdanning av pasienter fra ikke-Alzheimers sykdom tidlig hukommelsestap, noen ganger til referert til som alder-assosiert hukommelsesreduksjon (AAMI), til sannsynlig Alzheimers sykdom som definert ved ADRDA-kriterier. Pasienter med høy risiko for omdanning til Alzheimers sykdom blir valgt fra en ikke-klinisk populasjon med screening av referansepopulasjoner for tidlige tegn på hukommelsestap eller andre vanskeligheter assosiert med pre-Alzheimers symptomatologi, en familiehistorie med Alzheimers sykdom, genetiske risikofaktorer, alder, kjønn og andre trekk som finnes for å anta høy-risiko for Alzheimers sykdom. Grunnlinje score på egnede målinger innbefatter MMSE og ADAS sammen med andre mål konstruert for å vurdere en mer normal populasjon blir samlet. Disse pasientpopulasjonene blir delt inn i egnede grupper med placebosammenligning mot doseringsalternativer med middelet. Disse pasientpopulasjonene blir fulgt i intervallet på omtrent 5 måneder, og slutt punktet for hver pasient er om hun eller han omdannes til sannsynlig Alzheimers sykdom som definert ved ADRDA kriterier etter endt observasjon.

XII. Generelle materialer og metoder

1. Måling av antistofftitere

Mus ble blodtappet ved å danne et lite snitt i halevenen og samling av omtrent 200 µl blod inn i et mikrosentrifugerør. Marsvin ble blodtappet ved først å barbere bakhaseområdet og deretter anvendelse av en 18 gauge nål for å stikke metatarsalvenen og samling av blod inn i mikrosentrifugerør. Blod ble samlet for å koagulere 1 time ved romtemperatur (RT), vorteks behandlet, deretter sentrifugert ved 14.000 x g i 10 min. for å separere koagler fra serumet. Serumet ble deretter overført til etter endt sentrifugerør og lagret ved 4°C til titrering.

Antistofftitrene ble målt ved ELISA. 96-brønn mikrotiterskåler (Costar EIA skåler) ble belagt med 100 µl av en løsning inneholdende enten 10 µg/ml enten Aβ42 eller SAPP eller antigener som angitt i hver av de individuelle rapportene i Well Coating buffer (0,1 M natriumfosfat, pH 8,5, 0,1% natriumazid) og oppbevart over natt ved RT. Brønnene ble utsugd og sera ble tilsatt til brønnene begynnende med en 1/100 fortynning i Specimen fortynningsmiddel (0,014 M natriumfosfat, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 0,6% bovint serumalbumin, 0,05% thimerosal). 7 seriefortynninger av prøvene ble dannet direkte i skålene i 3-ganger trinn for å nå en endelig fortynning på 1/218.700. Fortynningene ble inkubert i brønner til belagt skål i 1 time ved RT. Skålene ble deretter vasket 4 ganger med PBS inneholdende 0,05% Tween 20. Andre antistoff, et geite anti-muse IgG konjugert til pepperrotperoksidase (oppnådd fra Boehringer Mannheim), ble tilsatt til brønnene som 100 µl av en 1/3000 fortynning i Specimen fortynningsmiddel og inkubert i 1 time ved RT. Skålene ble på ny vasket 4 ganger i PBS, Tween 20. For å utvikle kromogenet ble 100 µl Slow TMB (3,3',5,5'-tetrametylbenzidin oppnådd fra Pierce Chemicals) tilsatt til hver brønn og inkubert i 15 min. ved RT. Reaksjonen ble stoppet ved tilsetning av 25 µl 2M H₂SO₄. Farveintensiteten ble deretter avlest på en molekyllær innretning Vmax ved 450 nm – 650 nm.

Titrene ble definert som reciprok av fortynning av serum som gir halvparten av maksimal OD. Maksimal OD ble generelt tatt fra en innledende 1/100 fortynning, med unntagelse i tilfeller med meget høye titere, i hvilket tilfelle en høyere opprinnelig fortynning var nødvendig for å etablere maksimal OD. Dersom 50% punktet falt mellom to fortynninger ble en lineær ekstrapolasjon dannet for å beregne det endelige titeret. For å beregne geometrisk gjennomsnittlige antistofftitere ble titere som var mindre enn 100 tilfeldig tildelt en titerverdi på 25.

30 2. Lymfocytproliferasjonsanalyse

Mus ble bedøvd med isofluran. Miltene ble fjernet og skylt to ganger med 5 ml PBS inneholdende 10% varme-inaktivert føtalt bovint serum (PBS-FBS) og deretter homogenisert i en 50 µl Centricon enhet (Dako A/S, Danmark) i 1,5 ml

PBS-FBS i 10 sek. ved rpm i en Medimachine (Dako) etterfulgt av filtrering gjennom 100 μ porestørrelse nylonmesh. Splenocyter ble vasket en gang med 15 ml PBS-FBS, deretter pelletert ved sentrifugering ved 200 x g i 5 min. Røde blodceller ble lysert ved resuspending av pelleten i 5 ml buffer inneholdende 0,15 M NH_4Cl , 1 M KHCO_3 , 0,1 M NaEDTA, pH 7,4 i 5 min. ved RT. Leukocyter ble deretter vasket som ovenfor. Friske isolerte miltceller (10^5 celler pr brønn) ble dyrket i triplikate sett i 96-brønn U-bundede vevskultur-behandlede mikrotiterskåler (Corning, Cambridge, MA) i RPMI 1640 medium (JRH Biosciences, Lenexa, KS) supplementert med 2,05 med mer L glutamin, 1% penicillin/streptomycin og 10% varme-inaktivert FBS, i 96 t. Ved 37°C. Forskjellige A β -peptider, A β 1-16, A β 1-40, A β 1-42 eller A β 40-1 revers sekvensprotein ble også tilsatt i doser varierende fra 5 μM til 0,18 μM i fire trinn. Cellene i kontrollbrønnene ble dyrket med Concanavalin A (Con A) (Sigma, kat. #C-5275, ved 1 $\mu\text{g/ml}$) uten tilsatt protein. Cellene ble pulset i de siste 24 timer med ^3H -thymidin brønn oppnådd fra Amersham Corp., Arlington Heights IL). Cellene ble deretter høstet på UniFilterskåler og opptelt i en Top Count Microplate scintillasjons teller (Packard Instruments, Downers Grove, IL). Resultatene blir uttrykt som tellinger pr minutt (cpm) av radioaktivitet innkorporert i uopløselige makromolekyler.

20

4. Preparering av hjernevev

Etter avlivning ble hjernene fjernet og en hemisfære ble dannet for immunhistokjemiske analyser, mens tre hjerneregioner (hippocampus, korteks og cerebellum) ble dissekert fra den andre emisfæren og anvendt for å måle konsentrasjonen av forskjellige A β -proteiner og APP-former ved anvendelse av spesifikk ELISA (Johnson-Wood et al., supra).

Vev ment for ELISA ble homogenisert i 10 volum 10-kald guanidinbuffer (5,0 M guanidin-HCl, 50 med mer Tris-HCl, pH 8,0). Homogenatene ble blandet ved forsiktig agitering ved anvendelse av en Adams Nutator (Fisher) i tre til fire t. Ved RT, deretter lagret ved -20°C før kvantifisering av A β og APP. Tidligere eksperimenter hadde vist at analyttene var stabile under denne lagringsbetingelsen og at syntetisk A β -protein (Bachem) kunne bli kvantitativt

30

isolert når tilført i homogenater til kontrollhjernevev fra museavkom (Johnson-Wood et al., supra).

5. Måling av A β -nivåer

- 5 Hjernehomogenater ble fortynnet 1:10 med iskald Caseinfortynningsmiddel (0,25% casein, PBS, 0,05% natriumazid, 20 μ g/ml aprotinin, 5 med mer EDTA pH 8,0, 10 μ g/ml leupeptin) og deretter sentrifugert ved 16.000 x g i 20 min. ved 4°C. Syntetiske A β -proteinstandarder (1-42 aminosyrer) og APP standarder ble dannet for å innbefatte 0,5 M guanidin og 0,1% bovint serumalbumin (BSA) i
- 10 sluttsammensetningen. "Total" A β sandwich ELISA anvender monoklonalt antistoff (mA β) 266, spesifikt for aminosyrene 13-28 A β (Seubert et al.), som oppfangingsantistoff, og biotinyllert mA β 3D6, spesifikt for aminosyrene 1-5 A β (Johnson-Wood, et al.), som reporter antistoff. 3D6 mA β gjenkjenner ikke utskilt APP eller full-lengde APP, men detekterer bare A β former med en amino-
- 15 terminal asparaginsyre. Denne analysen har en lavere grense for sensitivitet på ~50 pg/ml (11 pM) og viser ingen kryss-reaktivitet med endogent murint A β -protein ved konsentrasjoner opp til 1 ng/ml (Johnson-Wood et al., supra).

- A β 1-42 spesifikk sandwich ELISA anvender mA β 21F12, spesifikk for
- 20 aminosyrene 33-42 til A β (Johnson-Wood, et al.), som oppfangingsantistoff. Biotinyllert mA β 3D6 er også reporterantistoffet i denne analysen som har en lavere grense for sensitivitet på omtrent 125 pg/ml (28 pM, Johnson-Wood et al.). For A β ELISA ble 100 μ l av enten mA β 266 (med 10 μ g/ml) eller mA β 21F12 ved (5 μ g/ml) belagt i brønner av 96-brønn immunoanalyseplater
- 25 (Costar) ved over natt inkubasjon ved RT. Løsningen ble fjernet ved utsuging og brønnene ble blokkert ved tilsetning av 200 μ l 0,25% humant serumalbumin i PBS buffer i minst 1 t. ved RT. Blokkeringsløsningen ble fjernet og skålene ble lagret dessikert ved 4°C helt til bruk. Skålene ble rehydrert med vaskebuffer (tris-buffret saltvann (0,15 M NaCl, 0,01 M tris-HCl, pH 7,5), pluss 0,05% Tween
- 30 20) før bruk. Prøver og standarder ble tilsatt i triplikate alikvoter med 100 μ l år brønn og deretter inkubert over natt ved 4°C. Skålene ble vasket minst tre ganger med vaskebuffer mellom hvert trinn av analysen. Biotinyllert mA β 3D6,

fortynnet til 0,5 µg/ml i casein analysebuffer (0,25% casein, PBS, 0,05% Tween 20m pH 7,4), ble tilsatt og inkubert i brønnene i 1 time ved RT. Et avidin-pepperrotperoksidasekonjugat (Avidin-HRP oppnådd fra Vector, Burlingame, CA), fortynnet 1:4000 i casien analysebuffer, ble tilsatt til brønnene i 1 time ved
 5 RT. Kolorimetrisk substrat, slow TMB-ELISA (Pierce), ble tilsatt og den enzymatiske reaksjonen ble stoppet ved tilsetning av 25 µl 2 N H₂SO₄. Reaksjonsproduktet ble kvantifisert ved anvendelse av en molekyler innretning Vmax som måler forskjellen i absorbanse ved 450 nm og 650 nm.

10 6. Måling av APP-nivåer

To forskjellige APP-analyser ble anvendt. Den første, betegnet APP-α/FL, gjenkjenner både APP-alfa (α) og full-lengde (FL) former av APP. Den andre analysen er spesifikk for APP-α. APP-α/FL analysen gjenkjenner utskilt APP inkludert de første 12 aminosyrene til Aβ. På grunn av at reporter antistoffet
 15 (2H3) ikke er spesifikt for α-klipp-sete, som oppstår mellom aminosyrene 612-613 til APP695 (Esch et al., Science 248, 1122-1124 (1990); gjenkjenner denne analysen også full-lengde APP (APP-FL). Preliminære eksperimenter ved anvendelse av immobilisert APP antistoffer til cytoplasmisk hale av APP-FL for å tappe hjernehomogenater av APP-FL tyder på omtrent 30-40% av APP-α/FL
 20 APP er FL (data ikke vist). Oppfangingsantistoffet for både APP-α/FL og APP-α analysene er mAb 8E5, dannet mot aminosyrene 444 til 592 av APP695-formen (Games et al., supra). Reporter mAb for APP/αFL analysen er mAb 2H3, spesifikt for aminosyrene 597-608 til APP695 (Johnson-Wood et al., supra) og reporterantistoffet for APP-α analysen er et biotinyleret derivat av mAb16H9,
 25 dannet mot aminosyrene 605 til 611 av APP. Den lavere sensitivitetssgrensen til APP-α/FL analysen er omtrent 11 ng/ml (150 pM) (Johnson-Wood et al.) og den til APP-α spesifikk analyse er 22 ng/ml (0,3 nM). For begge APP-analysene ble mAb 8E5 belagt på brønner av 96-brønn EIA skåler som beskrevet ovenfor for mAb 266. Renset, rekombinant utskilt APP-α ble anvendt som
 30 referansestandard for APP-α analysen og APP-α/FL analysen (Esch et al.,supra). Hjernehomogenatprøver i 5 M guanidin ble fortynnet 1:10 i ELISA prøvefortynningsmiddel (0,014 M fosfatbuffet, pH 7,4, 0,6% bovin serumalbumin, 0,05% thimerosal, 0,5 M NaCl, 0,1% NP40). De ble deretter

fortynnet i Specimen fortynningsmiddel inneholdende 0,5 M guanidin.

Fortynnete homogenater ble deretter sentrifugert ved 16.000 x g i 15 sekunder ved RT. APP-standarder og prøver ble tilsatt til skålen i duplikate aliquoter og inkubert i 1,5 t. ved RT. Biotinylert reporterantistoff 2H3 eller 16H9 ble inkubert med prøver i 1 t. ved RT. Streptavidin-alkalisk fosfatase (Boehringer Mannheim), fortynnet 1:1000 i prøvefortynningsmiddel, ble inkubert i brønnene i 1 t. ved RT. Fluorescenssubstratet 4-metyl-umbelliferyl-fosfat ble tilsatt for en 30 min. RT inkubasjon og skålene ble avleset på et cytofluor tm 2350 fluorimeter (Millipore) ved 365 nm eksitasjon og 450 nm emissjon.

7. Immunhistokjemi

Hjerner ble fiksert i 3 dager ved 4°C i 4% paraformaldehyd i PBS og deretter lagret i 1-7 dager ved 4°C i 1% paraformaldehyd, PBS helt til oppdeling. 40 mikron-tykke koronalsnitt ble kuttet på et vibratom med RT og lagret i kryobeskyttelsesmiddel (30% glycerol, 30% etylenglykol i fosfatbuffer) ved -20°C før immunohistokjemisk prosessering. For hver hjerne ble 6 snitt på nivå av dosal hippocampus, hver separert med påfølgende 240 µm intervaller, ble inkubert over natt med en av følgende antistoffer: (1) et biotinylert anti-Aβ (mAβ, 3D6, spesifikk for human Aβ) fortynnet til en konsentrasjon på 2 µg/ml i PBS og 1% hesteserum; eller (2) et biotinylert mAβ spesifikt for human APP, 8E5, fortynnet til en konsentrasjon på 3 µg/ml i PBS og 1,0% hesteserum; eller (3) et mAβ spesifikt for glialfibrillært surt protein (GFAP; Sigma Chemical Co.) fortynnet 1:500 med 0,25% Triton X-100 og 1% hesteserum, i tris-buffret saltvann, pH 7,4 (TBS); eller (4) et mAβ spesifikt for CD11b, MAC-1 antigen, (Chemicon International) fortynnet 1:100 med 0,25% Triton X-100 og 1% kaninserum i TBS; eller (5) et mAβ spesifikt for MHC II antigen, (Pharmingen) fortynnet 1:100 med 0,25% Triton X-100 og 1% kaninserum i TBS; eller (6) et rotte mAβ spesifikt for CD 43 (Pharmingen) fortynnet 1:100 med 1% kaninserum i PBS eller (7) et rotte mAβ spesifikt for CD 45RA (Pharmingen) fortynnet 1:100 med 1% kaninserum i PBS; eller (8) et rotte monoklonalt Aβ spesifikt for CD 45RB (Pharmingen) fortynnet 1:100 med 1% kaninserum i PBS; eller (9) et rotte monoklonalt Aβ spesifikt for CD 45 (Pharmingen) fortynnet 1:100 med 1% kaninserum i PBS; eller (10) et biotinylert polyklonalt hamster Aβ

spesifikt for CD3e (Pharmingen) fortynnet 1:100 med 1% kaninserum i PBS eller (11) et rotte mAb spesifikt for CD3 (Serotec) fortynnet 1:200 med 1% kaninserum i PBS; eller med (12) en løsning av PBS som mangler et primært antistoff inneholdende 1% normalt hesteserum.

5

Snitt reagert med antistoffløsninger oppført i 1,2 og 6-12 ovenfor ble forbehandlet med 1,0% Triton X-100, 0,4% hydrogenperoksid i PBS i 20 min. ved RT for å blokkere endogen peroksidase. De ble deretter inkubert over natt ved 4°C med primært antistoff. Snitt reagerte med 3D6 eller 8E5 eller CD3e

10 mAb og ble deretter reagert i 1 time ved RT med et pepperrotperoksidase-avidin-biotin-kompleks med sett komponentene "A" og "B" fortynnet 1:75 i PBS (Vector Elite Standard Kit, Vector Labs, Burlingame, CA). Snitt reagert med antistoffer spesifikke for CD 45RA, CD 45RB, CD45, CD3 og PBS-løsning uten primært antistoff ble inkubert i 1 time ved RT med biotinyleret anti-rotte IgG
15 (vektor) fortynnet 1:75 i PBS eller biotinyleret anti-muse IgG (vektor) fortynnet 1:75 i PBS. Snittene ble deretter omsatt i 1 time ved RT med et pepperrotperoksidase-avidin-biotinkompleks med settkomponentene "A" og "B" fortynnet 1:75 i PBS (Vector Elite Standard Kit, Vector Labs, Burlingame, CA.).

20 Snitt ble utviklet i 0,01% hydrogenperoksid, 0,05% 3,3'-diaminobenzidin (DAB) ved RT. Snittene ment for inkubasjon med GFAP-, MAC-1 og MHC II-spesifikke antistoff ble forbehandlet med 0,6% hydrogenperoksid ved RT for å blokkere endogen peroksidase og deretter inkubert over natt med primært antistoff ved 4°C. Snitt reagert med GFAP-antistoff ble inkubert i 1 time ved RT med
25 biotinyleret anti-muse IgG dannet i hest (Vector Laboratories; Vectastain Elite ABC Kit) fortynnet 1:200 med TBS. Snittene ble deretter reagert i 1 time med et avidin-biotin-peroksidasekompleks (Vector Laboratories; Vectastatin Elite ABC Kit) fortynnet 1:1000 med TBS. Snitt inkubert med MAC-1-eller MHC II-spesifikt mAb som primært antistoff ble deretter reagert i 1 time ved RT med biotinyleret
30 anti-rotte IgG dannet i kanin fortynnet 1:200 med TBS, etterfulgt av inkubasjon i 1 time med avidin-biotin-peroksidasekompleks fortynnet 1:1000 med TBS. Snitt inkubert med GFAP-, MAC-1- og MHC II-spesifikke antistoff ble deretter

visualisert ved behandling ved RT med 0,05% DAB, 0,01% hydrogenperoksid, 0,04% nikkellorid, TBS i henholdsvis 4 og 11 min.

Immunmerkede snitt ble plassert på objektglass (VWR, Superfrost objektglass),
5 lufttørket over natt, dyppet i Propar (Anatech) og belagt med dekkglass ved
anvendelse av Permout (Fisher) som plasseringsmedium.

For å motfarve A β -plakk ble en undergruppe av GFAP-positive snitt plassert på
Superfrost objektglass og inkubert i vandig 1% Thioflavin S (Sigma) i 7 min.
10 etter immunhistokjemiks bearbeidning. Snittene ble deretter dehydrert og
klargjort i Propar, deretter belagt med dekkglass plassert med Permout.

8. Billeddannende analyser

Et Videometric 150 Image Analysis System (Oncor, Inc., Gaithersburg, MD)
15 koblet til et Nikon Microphot-FX mikroskop gjennom et CCD videokamera og
ved en Sony Trinitron monitor ble anvendt for kvantifisering av immunreaktive
objektglass. Bilde av snittet ble lagret i videobuffer og en farve- og metnings-
basert terskel ble bestemt for å velge og beregne totalt pikselareal okkupert av
immunmerkede strukturer. For hvert snitt ble hippocampus manuelt beskrevet
20 og total pikselareal okkupert av hippocampus ble beregnet. Prosent
amyloidbelastning ble målt som: (fraksjon av hippocampal areal inneholdende
A β deponeringen immunreaktive med mA β 3D6) x 100. Likeledes ble prosent
neurittisk belastning målt som: (fraksjon av hippocampal areal inneholdende
dystrofiske neuritter reaktive med mA β 8E5). C-billeddannende system
25 (Compix, Inc., Cranberry Township, PA) som driver Simple 32 Software
Application Program ble koblet til et Nikon Microphot-FX mikroskop gjennom et
Optronik kamera og anvendt for å kvantifisere prosentandel av
retrosplenialkorteks okkupert av GFAP-positive astrocyter og MAC-1 og MHC II-
positive mikrogliia. Bilde av det immunreagerte snittet ble lagret i en videobuffer
30 og en monokrom-basert terskel ble bestemt for å velge og beregne totalt piksel-
areal okkupert av immunmerkede celler. For hvert snitt ble retrosplenialkorteks
(RSC) manuelt beskrevet og total pikselareal okkupert av RSC ble beregnet.
Prosent astrocytose ble definert som: (fraksjon av RSC okkupert av GFAP-

reaktive astrocyter) X 100. Likeledes ble prosent mikrogliose definert som:
(fraksjon av RSC okkupert av MAC-1- eller MHC II-reaktive mikroglia) X 100.

For alle bildeanalysene ble seks snitt på nivå med dosal hippocampus, hvert separert av påfølgende 240 µm intervaller, kvantifisert for hvert dyr. I alle

- 5 tilfellene var behandlingsstatusen til dyrene ukjent for observatøren.

Tabell 1									
Titer ved 50% maksimal O.D.									
Aggregerte Aβ injiserte mus									
Alder til PDAPP	Mus 100	Mus 101	Mus 102	Mus 103	Mus 104	Mus105	Mus 106	Mus 107	Mus 108
4	7000	150000	15000	120000	1000	15000	50000	80000	100000
6	15000	65000	30000	55000	300	15000	15000	50000	60000
8	20000	55000	50000	50000	400	15000	18000	50000	60000
10	40000	20000	60000	50000	900	15000	50000	20000	40000
12	25000	30000	60000	40000	2700	20000	70000	25000	20000
			PBS injiserte mus på begge immunogener						
			Ved 1/100						
		Alder til PDAPP	Mus 113	Mus 114	Mus 115	Mus 116	Mus 117		
		6	< 4x bkg	<4x bkg	<4 bkg	<4x bkg	<4x bkg		
		10	5 x bkg	<4x bkg	<4x bkg	<4x bkg	<4x bkg		
		12	< 4x bkg	<4x bkg	<4x bkg	<4x bkg	< 4x bkg		

PATENTKRAV

1. Farmasøytisk sammensetning for anvendelse for behandling eller forebygging av sykdom omfattende et immunogent middel som er effektivt for å
5 indusere en immunogen respons mot A β i en pasient, og en farmasøytisk akseptabel adjuvant, hvori middelet er A β eller et immunogent fragment av A β .
2. Immunogent middel, hvor middelet er A β eller et immunogent av A β for forebygging eller behandling av en sykdom assosiert med amyloide
10 deponeringer av A β i hjernen til en pasient, hvor middelet er tilpasset for ytterligere administrering av en adjuvant som forøker immunresponsen til A β peptidet, hvori adjuvanten og middelet blir eventuelt administrert sammen i form av en sammensetning.
- 15 3. Anvendelse av et immunogent middel, hvor middelet er A β eller et immunogent fragment av A β , for fremstilling av et medikament for forebygging eller behandling av en sykdom assosiert med amyloide deponeringer av A β i hjernen til en pasient, hvor medikamentet er tilpasset for ytterligere administrering av en adjuvant som forøker immunresponsen til A β peptidet; idet
20 medikamentet er eventuelt i form av en sammensetning hvor adjuvanten og middelet kan bli administrert sammen.
4. Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 1, et middel ifølge krav 2 eller anvendelse ifølge krav 3, hvor nevnte forebygging eller behandling blir registrert
25 ved analysering av antistoffresponsene overfor det immunogene middelet over tid.
5. Farmasøytisk sammensetning, middel eller anvendelse ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvor A β er
30
 - i. A β 43;
 - ii. A β 42;
 - iii. A β 41;
 - iv. A β 40; eller

v. A β 39.

6. Farmasøytisk sammensetning, middel eller anvendelse ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvor det immunogene A β fragmentet er
5 fra den N-terminale halvdelen av A β .
7. Farmasøytisk sammensetning, middel eller anvendelse ifølge krav 6, hvor det immunogene A β fragmentet er A β 1-5 eller A β 1-6.
- 10 8. Farmasøytisk sammensetning, middel eller anvendelse ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvor det immunogene middelet inkluderer multimerer av det monomere immunogene middelet angitt i hvilke som helst av kravene 5-7.
- 15 9. Farmasøytisk sammensetning, middel eller anvendelse ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, omfattende en dose som er høyere enn 10 μ g av det immunogene middelet.
- 20 10. Farmasøytisk sammensetning, middel eller anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1-9, hvor adjuvanten omfatter alum.
11. Farmasøytisk sammensetning, middel eller anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1-9, hvor adjuvanten omfatter 3 De-O-acylert monofosforyl lipid A (MPL TM).
25
12. Farmasøytisk sammensetning, middel eller anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1-9, hvori adjuvanten omfatter StimulonTM QS-21.
- 30 13. Farmasøytisk sammensetning, middel eller anvendelse ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvori middelet er en komponent av en partikkel.

14. Farmasøytisk sammensetning, middel eller anvendelse ifølge krav 13, hvor partikkelen er et liposom eller en mikropartikkel og middelet er emulgert eller innkapslet i liposomet eller mikropartikkelen.
- 5 15. Farmasøytisk sammensetning, middel eller anvendelse ifølge krav 14, hvor partikkelen eller mikropartikkelen er en polylaktid polyglykolid kopolymer (PLGP) partikkel eller mikropartikkel.
- 10 16. Farmasøytisk sammensetning, middel eller anvendelse ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvor sykdommen er Alzheimers sykdom.
17. Farmasøytisk sammensetning, middel eller anvendelse ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvor pasienten er:
- 15 a. asymptomatisk; og/eller
- b. under 50; og/eller
- i. har arvelige risikofaktorer som indikerer mottakelighet for Alzheimers sykdom; eller
- ii. har ingen kjente risikofaktorer for Alzheimers sykdom.

1/13

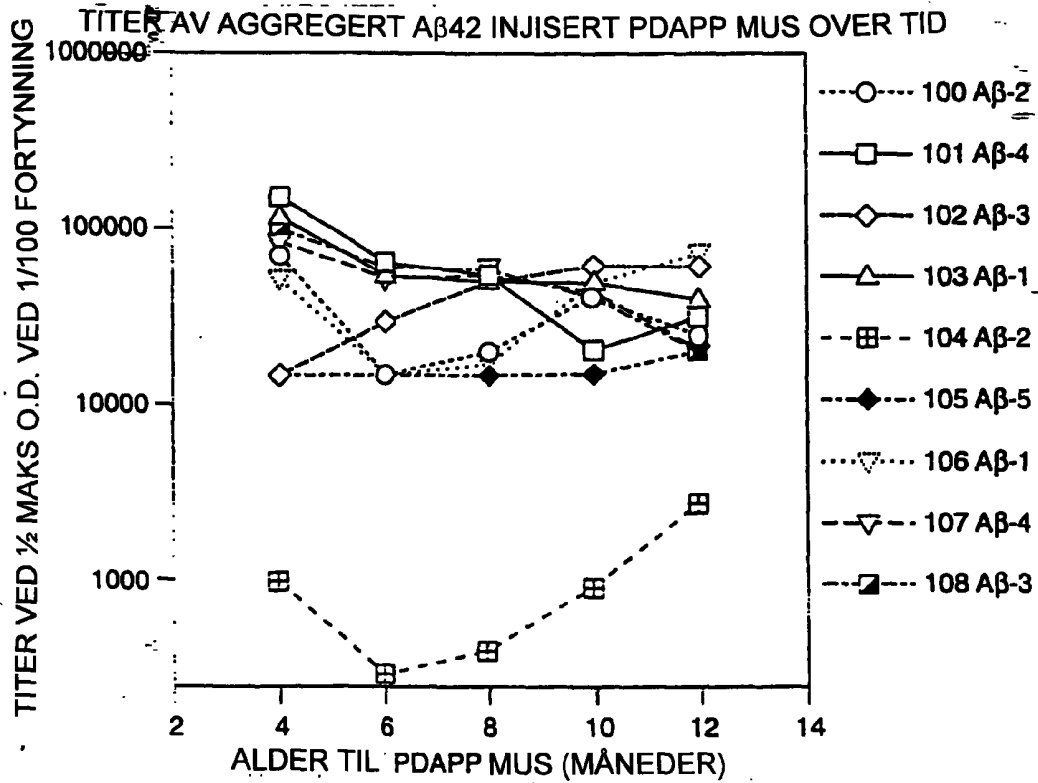


FIG. 1

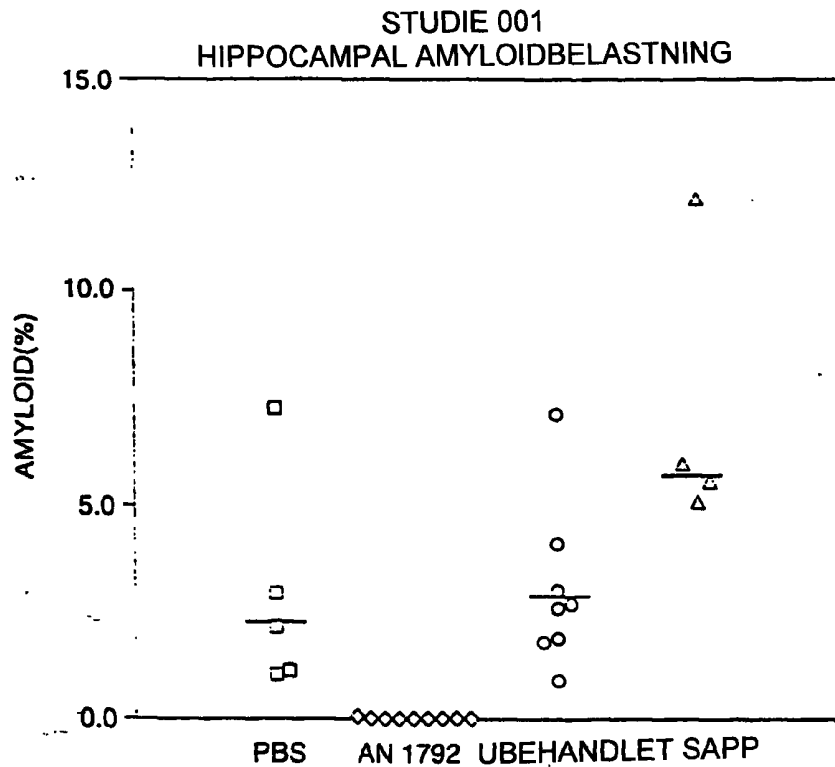


FIG. 2

2/13

STUDIE 001

HIPPOCAMPAL NEURITTISK PLAKKBELASTNING

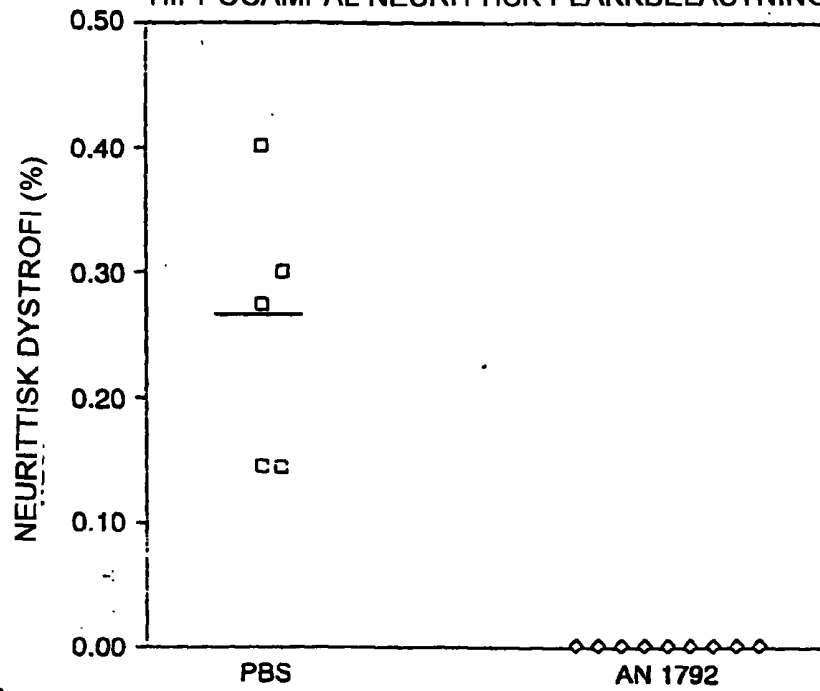


FIG. 3

STUDIE 001

RETROSPLENIAL KORTIKALASTROCYTOSE

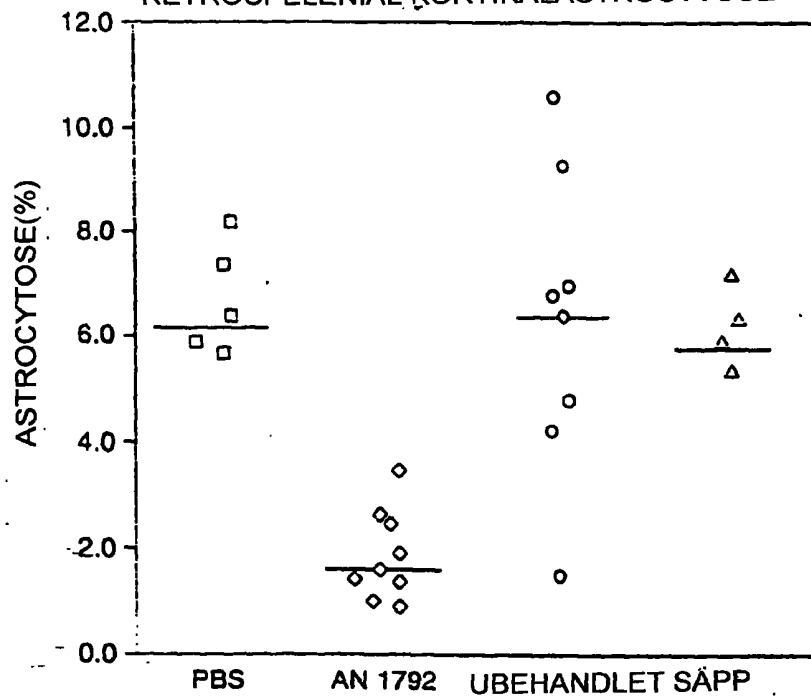


FIG. 4

3/13

ANTISTOFFTITERRESPONS TIL FORSKJELLIGE DOSER
AV AN1792 ETTER 2, 3 OG 4 IMMUNISERINGER

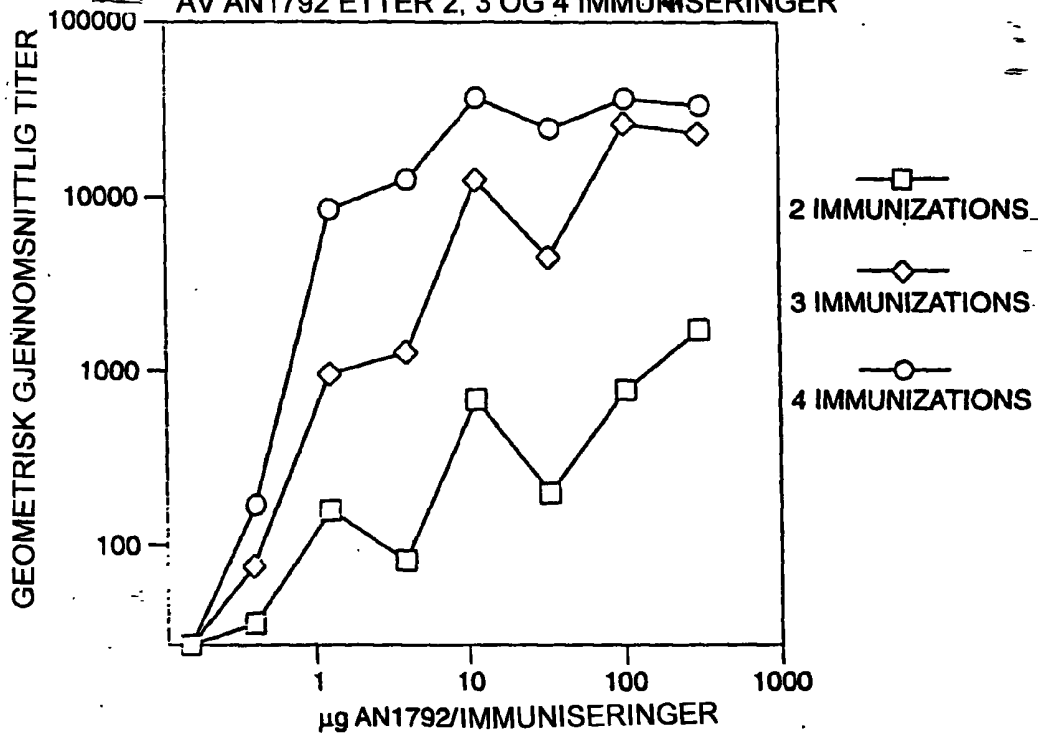


FIG. 5

KINETIKK TIL ANTISTOFFRESPONS TIL AN1792

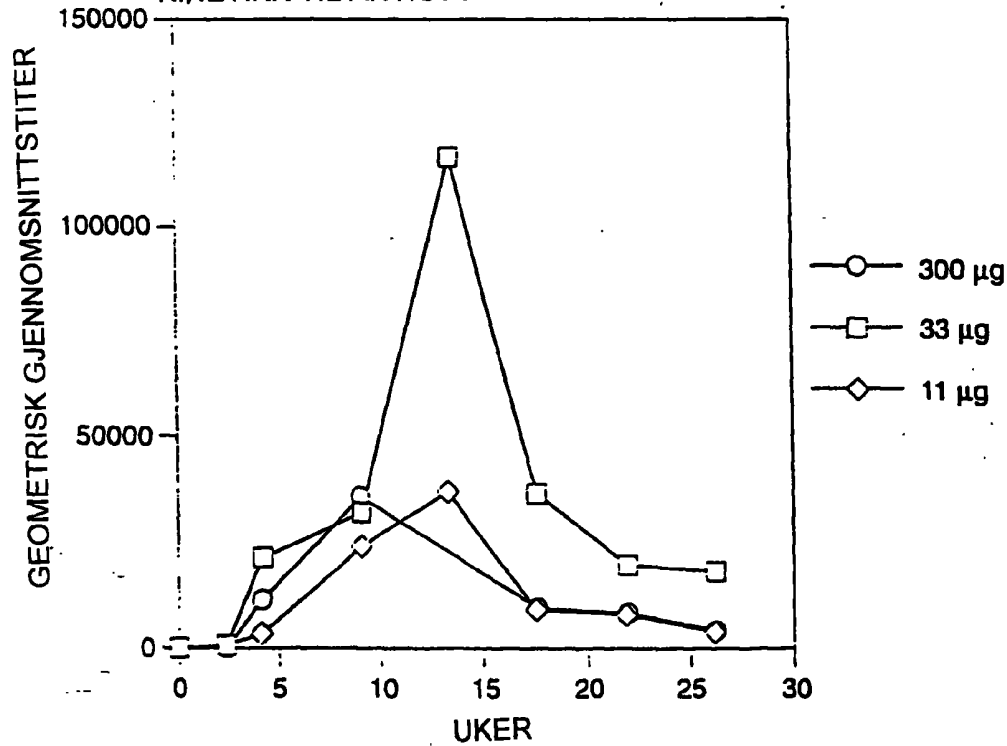


FIG. 6

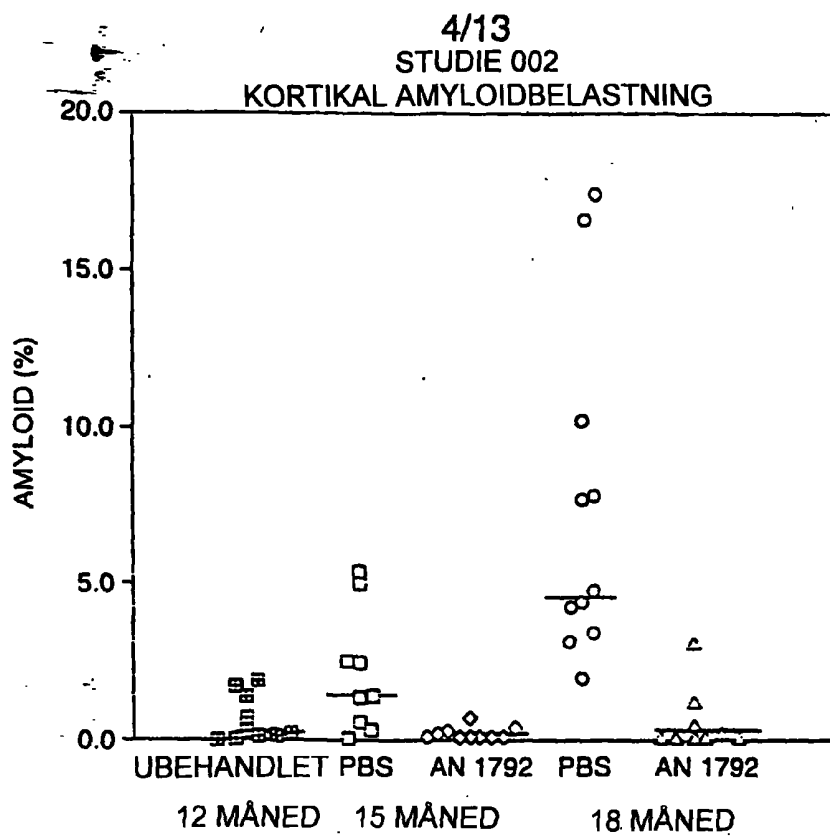


FIG. 7

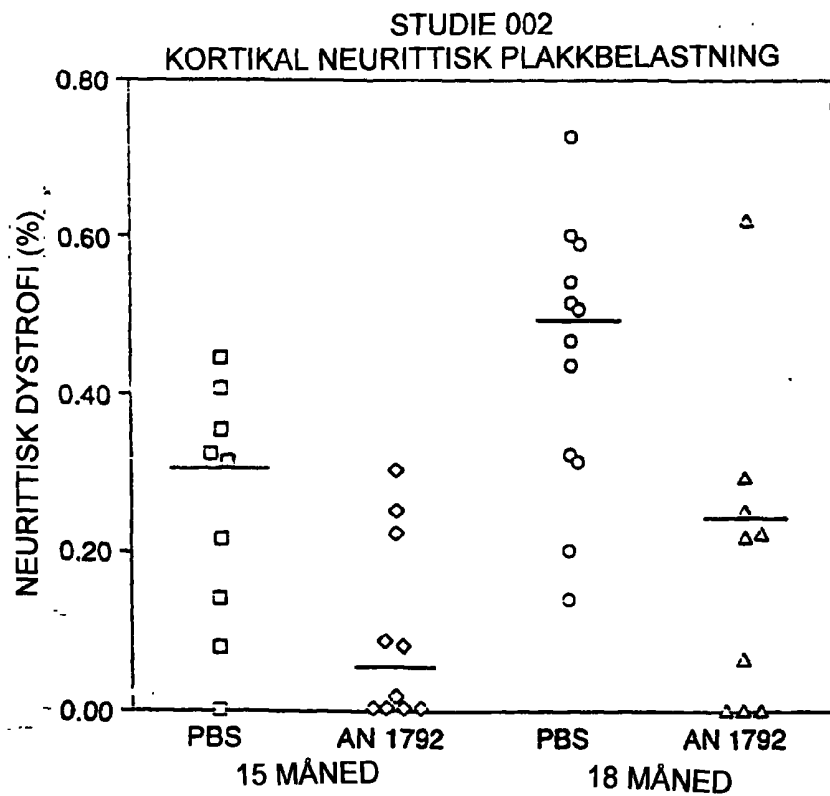


FIG. 8

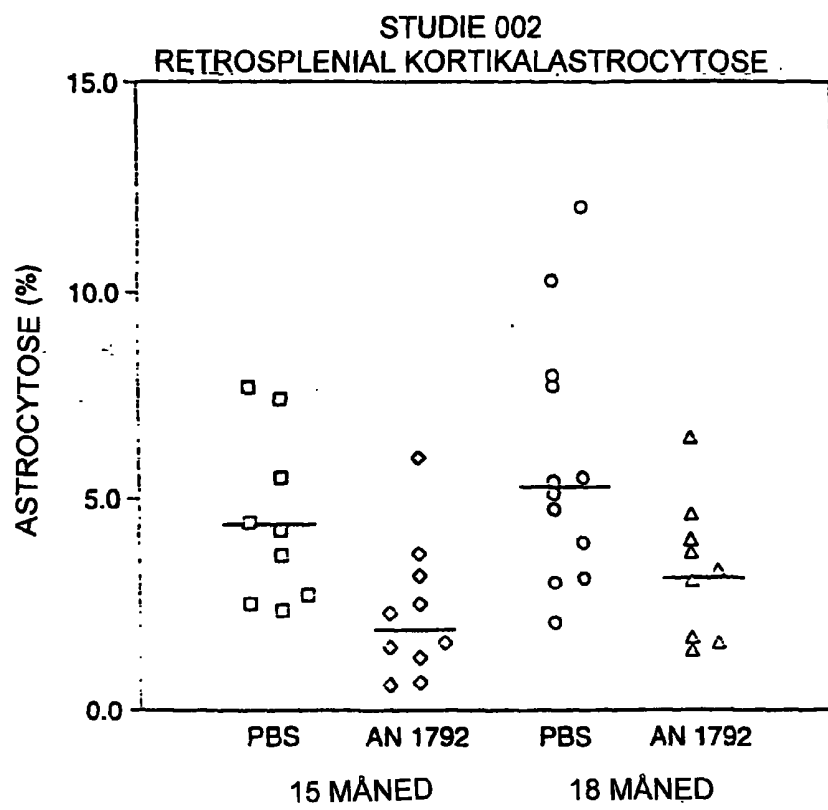
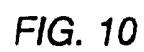


FIG. 9

STUDIE 002

RETROSPLENIAL KORTIKAL ASTROCYTOSE



7/13

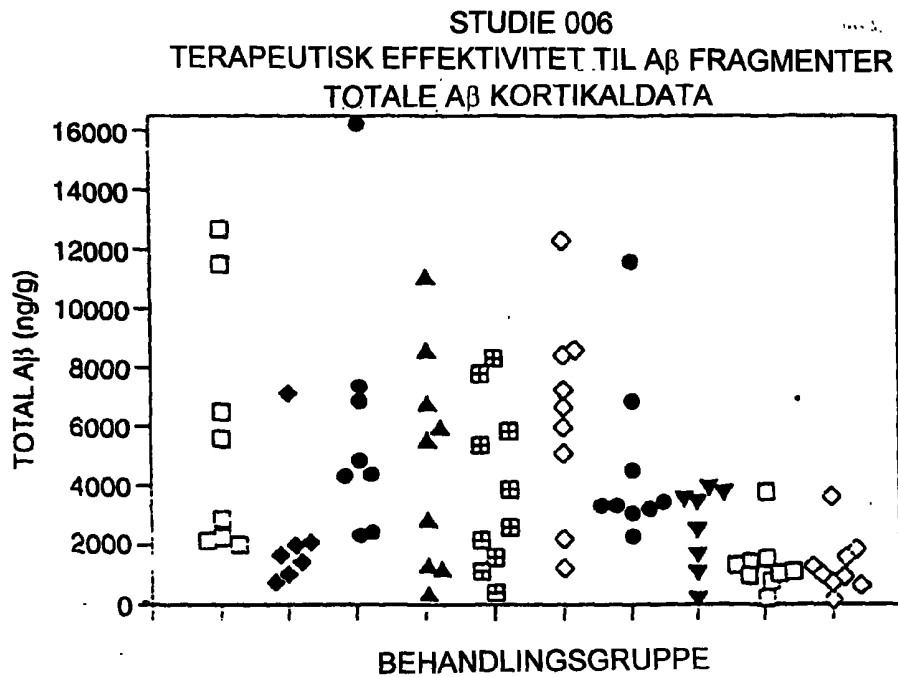


FIG. 11

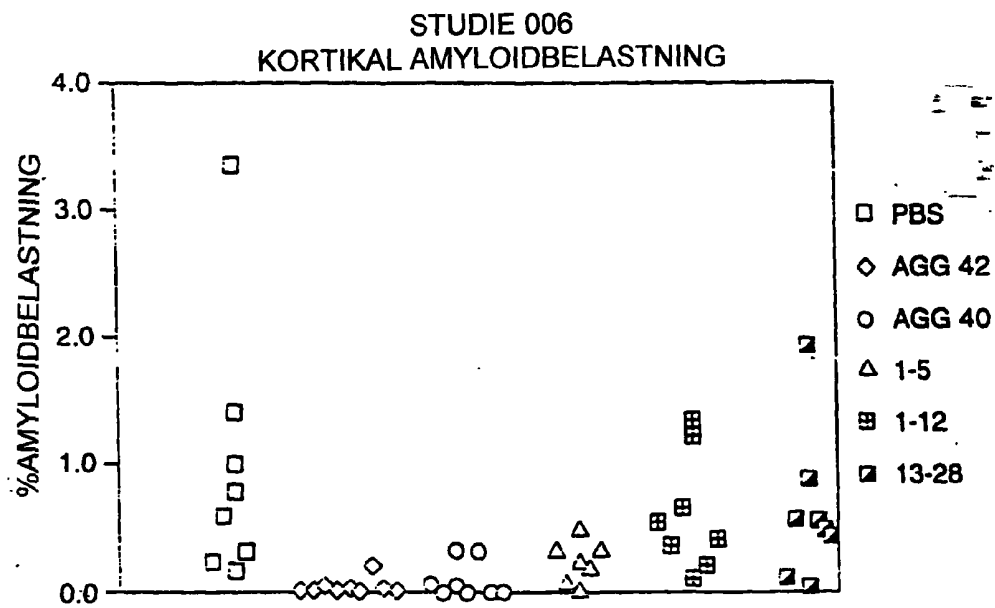


FIG. 12

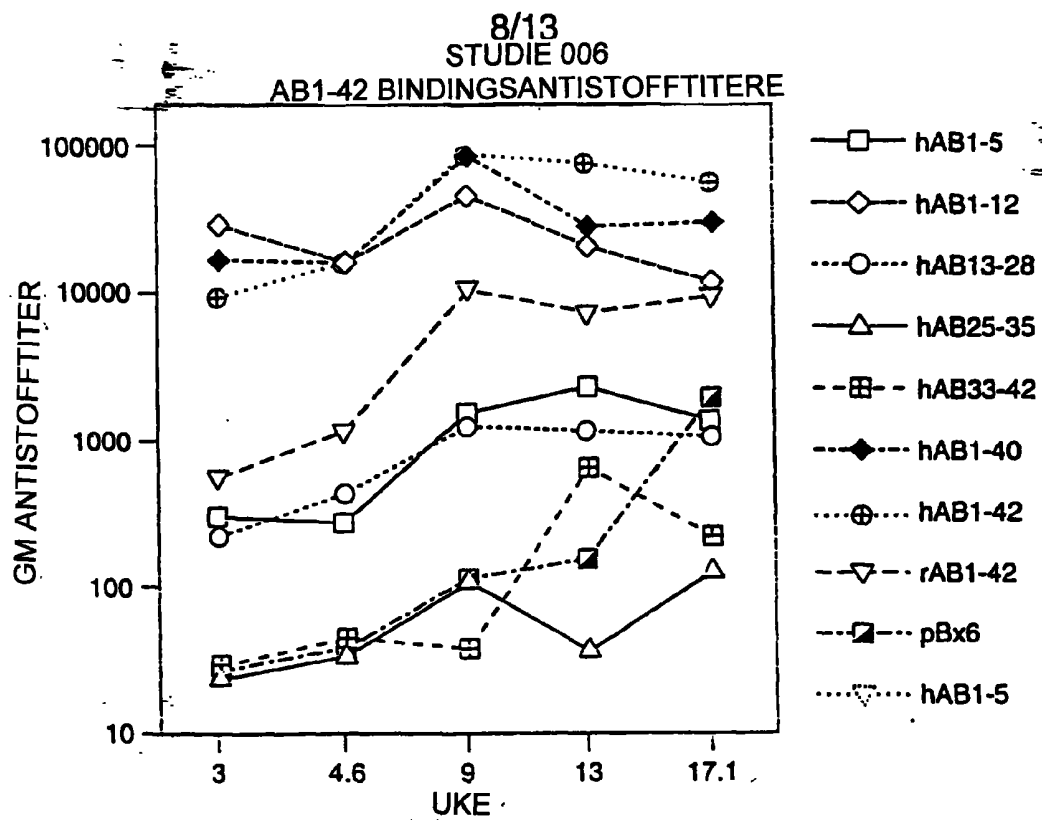


FIG. 13

ANTISTOFFRESPONSER MOT AN1792 MED FORSKJELLIGE ADJUVANTS

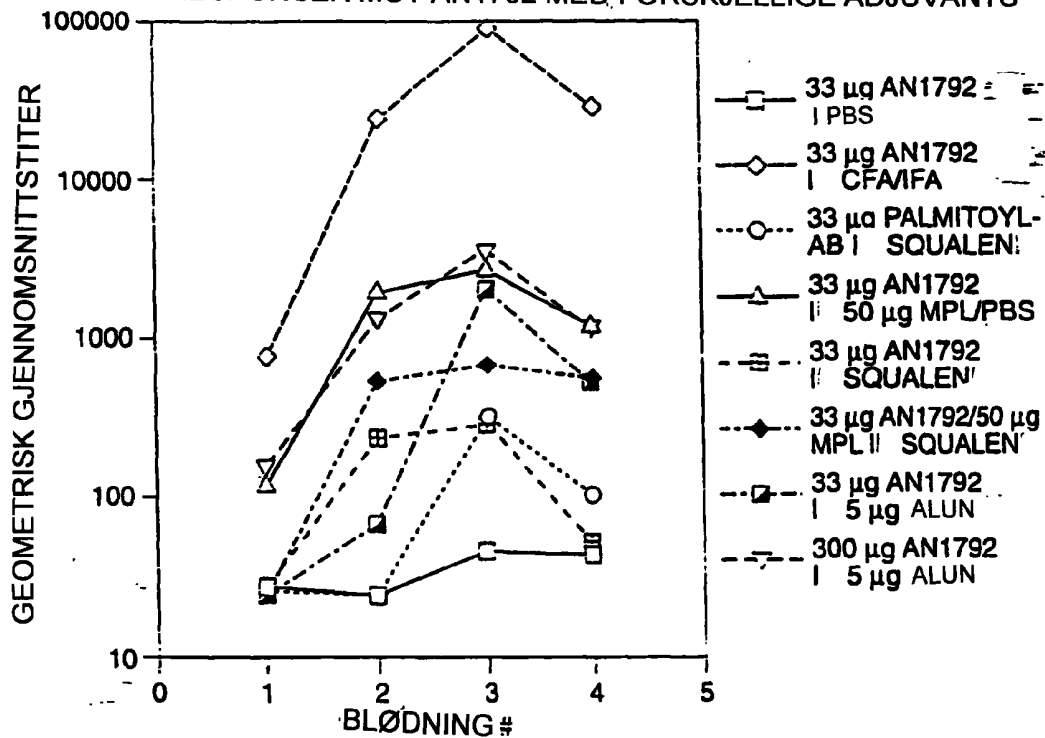


FIG. 14

9/13

CORTEX

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

FIG. 15A

CORTEX

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

FIG. 15B

CORTEX

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

FIG. 15C

12/13

CORTEX

5 µg THIMEROSAL/PBS 10 µg AN1792		2 µg ALUM 100 µg AN1792	
635-149	1337	610-001	432
669-150	4644	611-002	1012
670-151	6335	612-003	3607
673-152	3700	613-004	508
674-153	2750	620-005	465
676-154	1687	621-006	16
681-156	185	622-007	28
682-157	8031	623-008	217
683-158	3450	708-009	2738
754-159	157	709-010	927
755-160	6857	710-011	1609
756-161	482	716-012	1608
805-162	524	784-014	3890
806-163	397	785-015	1614
807-164	234	786-018	285
		787-017	3102
		788-018	1617
		789-019	1474
		815-020	424
		816-021	1375
		817-022	2323
MEDIAN p MALUE (M-W)	1687	MEDIAN p MALUE (M-W)	1375 0.5000
MIDDELS ST. DEV. % CV p VERDI (t TEST)	2718 2685 99 n=15	MIDDELS ST. DEV. % CV p VERDI (t TEST)	1394 1166 84 0.2650 n=21

FIG. 15D

CORTEX

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

FIG. 15E