

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **203431**

(13) **B1**

(51) Int.Cl.

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 9/26 (2006.01)

A61K 38/28 (2006.01)

A61K 33/06 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

(21) Numer zgłoszenia: **342649**

(22) Data zgłoszenia: **30.11.1998**

(86) Data i numer zgłoszenia międzynarodowego:

30.11.1998, PCT/US98/25386

(87) Data i numer publikacji zgłoszenia międzynarodowego:

10.06.1999, WO99/27944

PCT Gazette nr 23/99

Opis patentowy
przedrukowano ze względu
na zauważone błędy

(54)

Kompozycja farmaceutyczna i zastosowanie środka immunogennego

(30) Pierwszeństwo:

02.12.1997,US,60/067,740

07.04.1998,US,60/080,970

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

18.06.2001 BUP 13/01

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

30.10.2009 WUP 10/09

(73) Uprawniony z patentu:

**ELAN PHARMA INTERNATIONAL LIMITED,
Athlone,IE**

(72) Twórca(y) wynalazku:

Dale B. Schenk,Burlingame,US

(74) Pełnomocnik:

**Zofia Sulima, Rzecznik Patentowy,
Sulima Grabowska Sierzputowska,
Biuro Patentów i Znaków Towarowych sp.j.**

Wynalazek dotyczy kompozycji farmaceutycznej zawierającej immunogeny środek skuteczny w wywoływaniu odpowiedzi immunologicznej obejmującej przeciwciała przeciw A β u pacjenta farmaceutycznie dopuszczalny adiuwant, a także zastosowania immunogennego środka skutecznego w wywoływaniu odpowiedzi immunologicznej obejmującej przeciwciała przeciw A β do leczenia lub profilaktyki choroby charakteryzującej się złoгами amyloidowymi.

PL 203431 B1

Opis wynalazku

Wynalazek dotyczy kompozycji farmaceutycznej i zastosowania immunogennego środka skutecznego w wywoływaniu odpowiedzi immunologicznej obejmującej przeciwciała przeciw A β do wytwarzania leku do leczenia lub profilaktyki choroby charakteryzującej się złoгами amyloidowymi.

Choroba Alzheimerera (AD) jest postępującą chorobą wywołującą otępienie starcze. Patrz ogólnie Selkoe, *TINS* 16, 403-409 (1993); Hardy i inni, WO 92/13069; Selkoe, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 53, 438-447 (1994); Duff i inni, *Nature* 373, 476-477 (1995); Games i inni, *Nature* 373, 523 (1995). Ogólnie chorobę można podzielić na dwie kategorie: o późnym początku, która pojawia się w podeszłym wieku (od 65 roku życia) oraz o wczesnym początku, która rozwija się przed okresem starości, to jest pomiędzy 35 a 60 rokiem życia. W obu typach choroby patologia jest taka sama, ale nieprawidłowości wydają się być znacznie poważniejsze i bardziej rozległe w przypadkach, gdy choroba rozpoczyna się w młodszym wieku. Chorobę charakteryzują dwa typy uszkodzeń w mózgu, płytki starcze oraz kłębki neurofibrylarne. Płytki starcze stanowią obszary zdeorganizowanego neuropilu o szerokości do 150 μ m z zewnątrzkomórkowymi złoгами amyloidowymi występującymi w centrum widocznym przy analizie mikroskopowej przekrojów tkanki mózgowej. Kłębki neurofibrylarne stanowią wewnątrzkomórkowe złogi białka tau składające się z dwóch filamentów owiniętych parami wokół siebie.

Głównym składnikiem płytek jest peptyd nazywany A β lub peptydem β -amyloidowym. Peptyd A β jest wewnętrznym fragmentem 39-43 aminokwasów białka prekursorowego nazywanego białkiem prekursorowym amyloidu (APP). Kilka mutacji białka APP powiązano z występowaniem choroby Alzheimerera. Patrz np. Goate i inni, *Nature* 349, 704 (1991) (walina⁷¹⁷ do izoleucyny); Chartier Harlan i inni, *Nature* 353, 844 (1991) (walina⁷¹⁷ do glicyny); Murrell i inni, *Science* 254, 97 (1991) (walina⁷¹⁷ do fenyloalaniny); Mullan i inni, *Nature Genet.* 1, 345 (1992) (podwójna mutacja zmieniająca lizynę⁵⁹⁵-metioninę⁵⁹⁶ w asparaginę⁵⁹⁵-leucynę⁵⁹⁶). Uważa się, że mutacje te wywołują chorobę Alzheimerera w wyniku zwiększonego lub zmienionego przetwarzania APP w A β , w szczególności przetwarzania APP w zwiększone ilości długich form A β (czyli A β 1-42 i A β 1-43). Uważa się, że mutacje w innych genach, takich jak geny preseniliny, PS1 i PS2, pośrednio wpływają na przetwarzanie APP powodując powstanie zwiększonych ilości długich form A β (patrz Hardy, *TINS* 20, 154 (1997)). Obserwacje te wskazują, że A β , a zwłaszcza jego długa forma, jest elementem przyczynowym w chorobie Alzheimerera.

McMichael, EP 526511, zaproponował podawanie homeopatycznych dawek (mniejszych niż lub równych 10⁻² mg/dzień) A β pacjentom z wcześniej rozwiniętą AD. Oczekuje się, że u typowego człowieka z około 5 litrami osocza nawet wyższa granica tej dawki wytworzy stężenie nie większe niż 2 pg/ml. Normalne stężenie A β w osoczu człowieka wynosi 50 - 200 pg/ml (Seubert i inni, *Nature* 359, 325-327 (1992)). Ze względu na to, że dawka proponowana w EP 526511 w niewielkim stopniu zmienia poziom endogennego A β w krążeniu oraz że EP 526511 nie zaleca stosowania adiuwanta, wydaje się niemożliwym, że wystąpi jakikolwiek skutek leczniczy.

W przeciwieństwie do powyższego wynalazek dotyczy leczenia lub profilaktyki choroby amyloidogennej przez podawanie A β lub innego immunogenu pacjentowi w warunkach wywołujących korzystną odpowiedź immunologiczną u pacjenta.

Przedmiotem wynalazku jest kompozycja farmaceutyczna, charakteryzująca się tym, że zawiera immunogeny środek skuteczny w wywoływaniu odpowiedzi immunologicznej obejmującej przeciwciała przeciw A β u pacjenta oraz farmaceutycznie dopuszczalny adiuwant, przy czym ten środek jest wybrany z grupy obejmującej

- (i) A β ,
- (ii) fragment z co najmniej pięciu przylegających aminokwasów A β 42 i
- (iii) kwas nukleinowy kodujący (i) lub (ii); i

adiuwant jest wybrany z grupy obejmującej alun, wodorotlenek glinu, fosforan glinu, siarczan glinu, 3-de-O-acylowany monofosforylowany lipid A, M-CSF i GM-CSF, emulsje olej w wodzie, takie jak skwalenu lub oleju arachidowego, MF59, SAF, CpG, polimeryczne lub monomeryczne aminokwasy, takie jak poli(kwas glutaminowy) lub polilizyna, peptydy muramylowe (np. N-acetylmuramyl-L-treonylo-D-izoglutamina (thr-MDP), N-acetylonormuramyl-L-alanylo-D-izoglutamina (nor-MDP), N-acetylmuramyl-L-alanylo-D-izoglutaminylo-L-alanino-2-(1'-2'dipalmitoilo-sn-glicero-3-hydroksyfosforyloksy)etyloamina (MTP-PE), N-acetyloglukozaminylo-N-acetylmuramyl-L-A1-D-izoglu-L-Ala-dipalmitoksypropyloamid (DTP-DPP)) oraz inne składniki ścian komórek bakteryjnych, takie jak dimikolnian trehalozy (TDM), szkielet ściany komórkowej (CWS), MPL+CWS, adiuwanty saponinowe (QS21),

ISCOM (kompleksy immunostymulujące), cytokiny, takie jak interleukiny (IL-1, IL-2 i IL-12), czynnik pobudzający tworzenie kolonii makrofagów (M-CSF), czynnik martwicy nowotworu (TNF); oraz A β 42 ma naturalną ludzką sekwencję: 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.

Korzystnie środek jest kapsułkowany w cząstce. Korzystniej cząstkę stanowi cząstka kopolimeru polilaktyd-poliglikolid (PLPG).

W korzystnej postaci A β stanowi A β 43, A β 42, A β 41, A β 40 lub A β 39.

Fragment A β pochodzi korzystnie z N-końcowej połowy A β .

Fragment A β korzystnie zawiera A β 1-5, a korzystniej stanowi A β 1-5. Także korzystniej fragment A β stanowi A β 1-6, lub A β 1-12.

Korzystnie fragment A β jest wybrany z grupy obejmującej A β 1-5, A β 1-6, A β 1-12, A β 13-28, A β 17-28, A β 25-35, A β 33-42, A β 35-40 i A β 35-42.

W korzystnej postaci kompozycja zawiera co najmniej 10 μ g lub co najmniej 20 μ g A β , lub co najmniej 50 μ g A β , lub co najmniej 100 μ g A β lub jego fragmentu.

Przedmiotem wynalazku jest także zastosowanie immunogennego środka skutecznego w wywoływaniu odpowiedzi immunologicznej obejmującej przeciwciała przeciw A β do wytwarzania leku do leczenia lub profilaktyki choroby charakteryzującej się złoгами amyloidowymi u pacjenta, w którym środek zawiera

(i) A β ,

(ii) fragment z co najmniej pięciu przylegających aminokwasów A β 42; lub

(iii) kwas nukleinowy kodujący (i) lub (ii); oraz

A β 42 ma naturalną ludzką sekwencję: 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.

W korzystnym zastosowaniu lek ponadto zawiera farmaceutycznie dopuszczalny adiuwant wybrany z grupy obejmującej alun, wodorotlenek glinu, fosforan glinu, siarczan glinu, 3-de-O-acylowany monofosforylowany lipid A, M-CSF i GM-CSF, emulsje olej w wodzie, takie jak skwalenu lub oleju arachidowego, MF59, SAF, CpG, polimeryczne lub monomeryczne aminokwasy, takie jak poli(kwas glutaminowy) lub polilizyna, peptydy muramyłowe (np. N-acetylomuramylo-L-treonylo-D-izoglutamina (thr-MDP), N-acetylonormuramylo-L-alanylo-D-izoglutamina (nor-MDP), N-acetylomuramylo-L-alanylo-D-izoglutaminylo-L-alanino-2-(1'-2'-di-palmitoilo-sn-glicero-3-hydroksyfosforyloksy)etyloamina (MTP-PE), N-acetyloglukozaminylo-N-acetylomuramylo-L-A1-D-izoglu-L-Ala-dipalmitoksypropyloamid (DTP-DPP)), lub inne składniki ścian komórek bakteryjnych, takie jak dimikolinian trehalozy (TDM), szkielet ściany komórkowej (CWS), MPL+CWS, adiuwanty saponinowe (QS21), ISCOM (kompleksy immunostymulujące), cytokiny, takie jak interleukiny (IL-1, IL-2 i IL-12), czynnik pobudzający tworzenie kolonii makrofagów (M-CSF), czynnik martwicy nowotworu (TNF).

W korzystnym zastosowaniu środek jest kapsułkowany w cząstce, którą korzystniej stanowi cząstka kopolimeru polilaktyd-poliglikolid (PLPG).

W korzystnym zastosowaniu A β stanowi A β 43, A β 42, A β 41, A β 40 lub A β 39.

Korzystnie fragment A β pochodzi z N-końcowej połowy A β .

W korzystnym zastosowaniu fragment A β zawiera A β 1-5.

Korzystniej fragment A β stanowi A β 1-5, lub A β 1-6, lub A β 1-12.

W korzystnym zastosowaniu fragment A β jest wybrany z grupy obejmującej A β 1-5, A β 1-6, A β 1-12, A β 13-28, A β 17-28, A β 25-35, A β 33-42, A β 35-40 i A β 35-42.

W korzystnym zastosowaniu ilość A β lub jego fragmentu wynosi co najmniej 10 μ g, lub co najmniej 20 μ g, lub co najmniej 50 μ g, lub co najmniej 100 μ g.

Korzystnie pacjentem jest człowiek.

W korzystnym zastosowaniu chorobę stanowi choroba Alzheimera. W innym korzystnym zastosowaniu u pacjenta nie występują objawy.

W korzystnym zastosowaniu pacjent ma mniej niż 50 lat. W innym korzystnym zastosowaniu pacjent ma odziedziczone czynniki ryzyka wskazujące podatność na chorobę Alzheimera, a w kolejnym innym korzystnym zastosowaniu pacjent nie ma znanych czynników ryzyka choroby Alzheimera.

W korzystniejszym zastosowaniu A β występuje w postaci zagregowanej.

Korzystnie lek podaje się doustnie, podskórną, domięśniowo, miejscowo lub dożylnie. Korzystniej lek podaje się domięśniowo lub podskórną.

W korzystniejszym zastosowaniu środek stanowi skuteczna dawka kwasu nukleinowego kodującego A β lub fragment z co najmniej pięciu przylegających aminokwasów A β 42, gdzie kwas nukleinowy jest ekspresjonowany w organizmie pacjenta z wytworzeniem A β lub fragmentu z co najmniej pięciu przylegających aminokwasów A β 42 wywołującego odpowiedź immunologiczną.

Korzystnie lek podaje się miejscowo. Korzystnie lek stosuje się miejscowo w postaci plastra.

W korzystniejszym zastosowaniu pacjent jest monitorowany pod względem odpowiedzi immunologicznej.

Sposoby profilaktyki lub leczenia chorób charakteryzujących się odkładaniem amyloidu u pacjenta powodują wywołanie odpowiedzi immunologicznej przeciw peptydowemu składnikowi złogów amyloidowych u pacjenta. Takie wywołanie odpowiedzi może zajść czynnie przez podanie immunogenu, albo biernie przez podanie przeciwciała lub aktywnego fragmentu lub pochodnej przeciwciała. U niektórych pacjentów złogiem amyloidowym jest skupisko peptydu A β i choroba jest chorobą Alzheimera. W niektórych sposobach u pacjenta brak objawów. W niektórych sposobach pacjent ma ponad 50 lat. W niektórych sposobach pacjent odziedziczył czynniki ryzyka wskazujące na podatność na chorobę Alzheimera. Te czynniki ryzyka obejmują zmienne allele genów preseniliny PS1 i PS2 oraz zmienne formy APP. W innych sposobach nie ma znanych czynników ryzyka wystąpienia choroby Alzheimera.

W leczeniu pacjentów cierpiących na chorobę Alzheimera jeden ze sposobów leczenia obejmuje podawanie pacjentowi dawki peptydu A β , aby wywołać odpowiedź immunologiczną. Niekiedy peptyd A β podaje się z adiuwantem wzmacniającym odpowiedź immunologiczną na peptyd A β . Może nim być ałun lub MPL. Dawka peptydu A β podawanego pacjentowi zazwyczaj wynosi co najmniej 1 lub 10 μ g przy podawaniu z adiuwantem, a co najmniej 50 μ g przy podawaniu bez adiuwanta. Może również wynosić co najmniej 100 μ g.

Peptydem A β może też być A β 1-42. Niekiedy peptyd A β jest podawany w postaci zagregowanej lub w postaci zdysocjowanej. Środkiem leczniczym może też być skuteczna dawka kwasu nukleinowego kodującego A β lub jego aktywny fragment lub jego pochodną. Kwas nukleinowy kodujący A β lub jego fragment jest ekspresjonowany u pacjenta z wytworzeniem A β lub jego aktywnego fragmentu wywołującego odpowiedź immunologiczną. Niekiedy kwas nukleinowy podaje się przez skórę, ewentualnie w postaci plastra. Środek leczniczy można znajdować przeszukując bibliotekę związków w celu zidentyfikowania związku oddziałującego z przeciwciałami względem A β oraz podawać związek pacjentowi w celu wywołania odpowiedzi immunologicznej.

Odpowiedź immunologiczna może być skierowana przeciw peptydowi A β w postaci zagregowanej, a nie przeciw peptydowi A β w postaci zdysocjowanej. Przykładowo na odpowiedź immunologiczną mogą składać się przeciwciała wiążące zagregowaną postać peptydu A β , niewiążące zdysocjowanego peptydu A β . Odpowiedź immunologiczna może obejmować komórki T wiążące A β skompleksowany z MCHI lub MCHII na komórkach CD8 lub CD4, lub jest indukowana przez podanie pacjentowi przeciwciała przeciw A β . Odpowiedź immunologiczna może też być indukowana przez pobranie komórek T od pacjenta, poddanie komórek T działaniu peptydu A β w warunkach, w których komórki T są aktywowane, a następnie ponowne umieszczenie komórek T w organizmie pacjenta.

Środek leczniczy zazwyczaj podaje się doustnie, donosowo, śródskórnie, podskórnie, domięśniowo, miejscowo lub dożylnie. Pacjenta po podaniu leku można monitorować w celu określenia odpowiedzi immunologicznej. Jeżeli podczas monitorowania wystąpi obniżenie odpowiedzi immunologicznej w czasie, pacjentowi można podać jedną lub większą liczbę kolejnych dawek leku.

Środki farmaceutyczne mogą zawierać A β oraz zaróbkę odpowiednią do podawania doustnego i innymi drogami, lub też środek skuteczny w wywoływaniu u pacjenta odpowiedzi immunologicznej przeciw A β oraz dopuszczalny farmaceutycznie adiuwant. Środkiem może być niekiedy A β lub jego aktywny fragment. Adiuwant może stanowić ałun, a niekiedy jest to emulsja typu olej w wodzie. A β lub jego aktywny fragment może także być składnikiem kopolimeru polilaktyd-poliglikolid (PLPG) lub innej cząstki. Możliwe jest łączenie A β lub jego aktywnego fragmentu z cząsteczką koniugatową sprzyjającą dostarczaniu A β do krwioobiegu pacjenta i/lub sprzyjającą odpowiedzi immunologicznej przeciw A β . Koniugat może na przykład sprzyjać wywołaniu odpowiedzi immunologicznej przeciw A β i może nim być toksyna cholery, immunoglobulina, atenuowana toksyna błonicy CRM 197 (Gupta, Vaccine 15, 1341-3 (1997)).

Środek farmaceutyczny może zawierać środek skutecznie wywołujący u pacjenta odpowiedź immunologiczną przeciw A β , z tym, że środek nie powinien zawierać kompletnego adiuwantu Freund'a. Środek może także zawierać wektor wirusowy kodujący A β lub jego aktywny fragment skutecznie

wywołujący odpowiedź immunologiczną przeciw A β . Odpowiednimi wektorami wirusowymi mogą być: wirus opryszczki, adenowirus, wirus adenosatelitarny, retrowirus, wirus Sindibs, wirus gorączki Semliki Forest, wirus ospy krowiej lub ospy ptasiej.

W sposobach zapobiegania chorobie Alzheimerera oraz jej leczenia pacjentowi podaje się skuteczną dawkę peptydu A β . Można stosować A β lub przeciwciała skierowane przeciw niemu do wytwarzania leku przeciwdziałającego chorobie Alzheimerera lub leczącego ją.

Można również oceniać skuteczność sposobu leczenia choroby Alzheimerera u pacjenta. Oznacza się w próbkach tkanek pacjenta podstawową ilość przeciwciał specyficznych przeciw A β przed podaniem środka. Ilość przeciwciał specyficznych przeciw peptydowi A β w próbkach tkanek pacjenta po leczeniu środkiem można porównać z podstawową ilością przeciwciał specyficznych przeciw peptydowi A β . Ilość przeciwciał specyficznych przeciw peptydowi A β zmierzona po leczeniu, znacząco większa od ilości podstawowej przeciwciał specyficznych przeciw peptydowi A β , wskazuje na pozytywny wynik leczenia.

W ocenie skuteczności sposobów leczenia choroby Alzheimerera u pacjenta można oznaczać w próbkach tkanek pacjenta podstawową ilość przeciwciał specyficznych przeciw A β przed podaniem środka. Ilość przeciwciał specyficznych przeciw peptydowi A β w próbkach tkanek pacjenta po leczeniu środkiem można porównać z podstawową ilością przeciwciał specyficznych przeciw peptydowi A β . Obniżenie ilości lub brak znaczącej różnicy pomiędzy ilością przeciwciał specyficznych przeciw peptydowi A β zmierzoną po leczeniu a ilością podstawową przeciwciał specyficznych przeciw peptydowi A β wskazuje na negatywny wynik leczenia.

W ocenie innym sposobem skuteczności leczenia choroby Alzheimerera u pacjenta można oznaczać w próbkach tkanek kontrolnej populacji kontrolną ilość przeciwciał specyficznych przeciw A β . Ilość przeciwciał specyficznych przeciw peptydowi A β w próbkach tkanek pacjenta po leczeniu środkiem można porównać z kontrolną ilością przeciwciał specyficznych przeciw peptydowi A β . Ilość przeciwciał specyficznych przeciw peptydowi A β zmierzona po leczeniu, znacząco większa od ilości kontrolnej przeciwciał specyficznych przeciw peptydowi A β , wskazuje na pozytywny wynik leczenia.

W ocenie innym sposobem skuteczności leczenia choroby Alzheimerera u pacjenta można oznaczać w próbkach tkanek kontrolnej populacji kontrolną ilość przeciwciał specyficznych przeciw A β . Ilość przeciwciał specyficznych przeciw peptydowi A β w próbkach tkanek pacjenta po podaniu środka można porównać z kontrolną ilością przeciwciał specyficznych przeciw peptydowi A β . Brak znaczącej różnicy pomiędzy ilością przeciwciał specyficznych przeciw peptydowi A β zmierzoną po rozpoczęciu leczenia a ilością kontrolną przeciwciał specyficznych przeciw peptydowi A β wskazuje na negatywny wynik leczenia.

Inne sposoby monitorowania u pacjenta choroby Alzheimerera lub podatności na tę chorobę mogą obejmować wykrywanie odpowiedzi immunologicznej przeciw peptydowi A β w próbce pobranej od pacjenta. Niekiedy pacjentowi podaje się środek skuteczny w leczeniu choroby Alzheimerera lub jej zapobieganiu, a poziom odpowiedzi określa przyszły tryb leczenia pacjenta.

W ocenie innym sposobem skuteczności leczenia choroby Alzheimerera u pacjenta można oznaczać ilość przeciwciał specyficznych przeciw peptydowi A β w próbce tkanki pacjenta leczonego środkiem. Ilość tę można porównać z kontrolną ilością oznaczoną w populacji pacjentów, u których występuje poprawa lub zanik objawów choroby Alzheimerera pod wpływem leczenia środkiem. Wartość u pacjenta równa co najmniej wartości kontrolnej wskazuje na pozytywną odpowiedź na leczenie.

Zestawy do takich ocen zazwyczaj mogą zawierać odczynnik specyficznie wiążący się z przeciwciałami przeciw A β lub stymulujący proliferację komórek T reaktywnych wobec A β .

Wynalazek stanie się bardziej zrozumiały dzięki załączonym rysunkom, przy czym

Fig. 1: Miano przeciwciał po iniekcji transgenicznym myszom A β 1-42.

Fig. 2: Obciążenie hipokampu amyloidem. Na podstawie wspomaganej komputerowo ilościowej analizy obrazu immunoreaktywnych obszarów mózgu oznaczono procent powierzchni regionu hipokampu zajmowanego przez płytki amyloidowe, określony na podstawie reaktywności z mAb 3D6 specyficznymi dla A β . Wartości dla poszczególnych myszy podano dzieląc je na grupy badawcze. Linia pozioma dla każdej z grup wskazuje wartość mediany rozkładu.

Fig. 3 Dystrofia neurytowa w hipokampie. Na podstawie wspomaganej komputerowo ilościowej analizy obrazu immunoreaktywnych obszarów mózgu oznaczono procent powierzchni regionu hipokampu zajmowany przez zwyrodniałe neuryty, określony przez ich oddziaływanie z ludzkimi mAb 8E5 specyficznymi dla APP. Wartości dla poszczególnych myszy podano dla grupy traktowanej AN1792

oraz grupy kontrolnej traktowanej PBS. Linia pozioma dla każdej z grup wskazuje wartość mediany rozkładu.

Fig. 4 Astrocytoza w korze pozamodzelowatej. Na podstawie wspomaganej komputerowo ilościowej analizy obrazu immunoreaktywnych obszarów mózgu oznaczono procent powierzchni regionu korowego zajmowany przez astrocyty pozytywne pod względem kwaśnego włóknistego białka glejowego (GFAP). Wartości dla poszczególnych myszy podano dzieląc je na grupy badawcze, a wartości mediany dla grup wskazano poziomymi liniami.

Fig. 5 Średnie geometryczne mian przeciwciał przeciw A β 1-42 po immunizacji w zakresie ośmiu dawek AN1792 zawierających 0,14, 0,4, 1,2, 3,7, 11, 33, 100 lub 300 μ g.

Fig. 6 Kinetyka odpowiedzi na przeciwciał po immunizacji AN1792. Miana wyrażono w postaci średnich geometrycznych wartości dla 6 zwierząt w każdej z grup.

Fig. 7 Ilościowa analiza obrazu obciążenia kory amyloidem u myszy poddanych działaniu PBS i AN1792.

Fig. 8 Ilościowa analiza obrazu obciążenia płytkami neurytycznymi u myszy poddanych działaniu PBS i AN1792.

Fig. 9 Ilościowa analiza obrazu procentu kory pozamodzelowatej objętej astrocytozą u myszy poddanych działaniu PBS i AN1792.

Fig. 10 Test proliferacji limfocytów na komórkach śledziony u myszy poddanych działaniu AN1792 (górny wykres) i PBS (dolny wykres).

Fig. 11 Całkowity poziom A β w korze. Wykres rozrzutu poszczególnych profili A β u myszy immunizowanych A β lub pochodnymi APP w połączeniu z adiuwantem Freund.

Fig. 12 Obciążenie kory amyloidem określono na podstawie sterowanej komputerowo ilościowej analizy obrazu immunoreaktywnych obszarów mózgu myszy immunizowanych koniugatami peptydu A β - A β 1-5, A β 1-12, A β 13-28, agregatami AN1792 o pełnej długości A β (A β 1-42) i AN1528 (A β 1-40) oraz poddanej działaniu PBS grupy kontrolnej.

Fig. 13 Średnie geometryczne mian przeciwciał specyficznych dla A β dla grup myszy immunizowanych A β lub pochodnymi APP, w połączeniu z adiuwantem Freund.

Fig. 14 Średnie geometryczne mian przeciwciał specyficznych dla A β dla grup świnek morskich immunizowanych AN1792 lub jego palmitoliowaną pochodną, w połączeniu z różnymi adiuwantami.

Fig. 15 Poziomy A β w korze 12-miesięcznych myszy PDAPP poddanych działaniu AN1792 lub AN1528, z różnymi adiuwantami.

Określenie „zasadniczo identyczne” oznacza, że dwie sekwencje białkowe, najlepiej przyrównywane z zastosowaniem takich programów jak GAP lub BESTFIT, z użyciem domyślnych ważności luk (gap weights), wykazują co najmniej 65 procent identyczności sekwencji, korzystnie co najmniej 80 lub 90 procent identyczności sekwencji, korzystnie co najmniej 95 procent identyczności sekwencji lub więcej (np. 99 procent identyczności sekwencji lub więcej). Korzystnie pozycje reszt, które nie są takie same, różnią się podstawieniem konserwatywnymi aminokwasami.

Przy przyrównywaniu sekwencji zazwyczaj jedną z sekwencji stosuje się jako sekwencję odniesienia, z którą porównuje się badane sekwencje. Z zastosowaniem algorytmu porównującego sekwencje, sekwencję badaną i odniesienia wprowadza się do komputera, jeżeli jest to konieczne określa się współrzędne podsekwencji, a następnie ustala się parametry algorytmu programowego. Następnie algorytm porównujący sekwencje oblicza procent identyczności sekwencji badanej (ych) do sekwencji odniesienia na podstawie ustalonych parametrów programu.

Optymalne przyrównanie porównywanych sekwencji można przeprowadzić, np. z zastosowaniem algorytmu homologii lokalnej Smitha i Watermana, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), algorytmu przyrównującego homologie Needlemana i Wunscha, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), szukając podobieństw metodą Pearsona i Lipmana, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444 (1988), za pomocą skomputeryzowanych wersji tych algorytmów (GAP, BESTFIT, FASTA oraz TFASTA w Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) albo na podstawie oceny wzrokowej (patrz głównie Ausubel i inni, *supra*). Jednym z przykładów algorytmu odpowiedniego do określania procentu podobieństwa i identyczności sekwencji jest algorytm BLAST opisany przez Altschul i inni, *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990). Oprogramowanie do przeprowadzania algorytmu BLAST jest publicznie dostępne przez National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Zazwyczaj domyślne parametry programu można stosować do wykonywania porównania sekwencji, ale można także użyć dostosowanych parametrów. Dla sekwencji aminokwasowych program BLAST używa jako domyślnych długości słowa (wordlength) (W) równej 3,

oczekiwania (expectation) (E) równego 10 oraz macierzy punktującej (scoring matrix) BLOSUM62 (patrz Henikoff i Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10915 (1989)).

Celem klasyfikacji podstawień aminokwasowych konserwatywnych i niekonserwatywnych aminokwasy grupuje się w następujący sposób: Grupa I (hydrofobowe, łańcuchy boczne): norleucyna, met, ala, val, leu, ile; Grupa II (obojętne, hydrofilowe łańcuchy boczne): cys, ser, thr; Grupa III (kwasowe, łańcuchy boczne): asp, glu; Grupa IV (zasadowe, łańcuchy boczne): asn, gln, his, lys, arg; Grupa V (aminokwasy wpływające na orientację łańcucha): gly, pro oraz Grupa VI (aromatyczne łańcuchy boczne): trp, tyr, phe. Konserwatywne podstawienia obejmują podstawienia pomiędzy aminokwasami tej samej klasy. Niekonserwatywne podstawienia obejmują zmiany aminokwasu jednej klasy na aminokwas drugiej klasy.

Środki lecznicze zawarte w kompozycjach według wynalazku zazwyczaj są zasadniczo czyste. Oznacza to, że środek jest zazwyczaj co najmniej w 50% (wagowo) czysty, a ponadto są zasadniczo wolne od przeszkadzających białek lub zanieczyszczeń. Czasem środki są co najmniej w 80% (wagowo), korzystniej w co najmniej 80 lub około 95% (wagowo) czyste. Jednakże za pomocą standardowych technik oczyszczania białek można uzyskać preparaty białek homogenne co najmniej w 99%.

Specyficzne wiązanie dwóch jednostek oznacza powinowactwo co najmniej 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 M^{-1} lub 10^{10} M^{-1} . Korzystne są wartości powinowactwa większe niż 10^8 M^{-1} .

Określenie „przeciwciało” stosowano tutaj w odniesieniu do nienaruszonych przeciwciał jak i ich fragmentów wiążących. Zazwyczaj fragmenty współzawodniczą w wiązaniu antygeny z nienaruszonymi przeciwciałami, od których pochodzą. Ponadto przeciwciała lub ich fragmenty wiążące mogą być chemicznie połączone lub wyekspymowane jako białka fuzyjne z innymi białkami.

APP⁶⁹⁵, APP⁷⁵¹ i APP⁷⁷⁰ dotyczą odpowiednio polipeptydów o długości 695, 751 i 770 aminokwasów kodowanych przez ludzki gen APP. Patrz Kang i inni, *Nature* 325, 773 (1987); Ponte i inni, *Nature* 331, 525 (1988), oraz Kitaguchi i inni, *Nature* 331, 530 (1988). Aminokwasy w obrębie ludzkiego białka prekursorowego amyloidu (APP) mają przypisane numery zgodnie z sekwencją izoformy APP770. Określenia takie jak Aβ39, Aβ40, Aβ41, Aβ42 i Aβ43 oznaczają peptydy Aβ zawierające aminokwasy 1-39, 1-40, 1-41, 1-42 i 1-43.

Określenie „epitop” lub „determinanta antygenowa” oznacza miejsce na antygenie, na które odpowiadają komórki B i/lub T. Epitopy komórek B mogą być utworzone z dwóch przylegających lub nieprzylegających aminokwasów zestawionych obok siebie przez trzeciorzędowe złożenie białka. Epitopy utworzone z przylegających aminokwasów są zazwyczaj zachowane przy działaniu rozpuszczalników denaturujących, podczas gdy epitopy utworzone w wyniku trzeciorzędowego składania znikają po działaniu rozpuszczalnikami denaturującymi. Epitop zazwyczaj obejmuje co najmniej 3, a częściej co najmniej 5 lub 8-10 aminokwasów w unikatowej konformacji przestrzennej. Sposoby określania przestrzennej konformacji epitopów obejmują np. krystalografię rentgenowską i dwuwymiarowy jądrowy rezonans magnetyczny. Patrz np. *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, tom 66, red. Glenn E. Morris (1996). Przeciwciała rozpoznające ten sam epitop można zidentyfikować w prostym teście immunologicznym pokazującym zdolność jednego przeciwciała do blokowania wiązania innego przeciwciała z docelowym antygenem. Komórki T rozpoznają ciągłe epitopy o długości około 9 aminokwasów dla komórek CD8 lub około 13-15 aminokwasów dla komórek CD4. Komórki T rozpoznające epitop można zidentyfikować w testach *in vitro* mierzących zależną od antygeny proliferację, oznaczaną przez inkorporację ³H-tymidyny w uczulonych komórkach T, w odpowiedzi na epitop (Burke i inni, *J. Inf. Dis.* 170, 1110-19 (1994)), zależne od antygeny uśmiercanie (test limfocytów T cytotoksycznych, Tigges i inni, *J. Immunol.* 156, 3901-3910) lub wydzielanie cytokin.

Określenie „immunologiczny” lub odpowiedź „immunologiczna” oznacza rozwój korzystnej odpowiedzi humoralnej (pośredniczonej przez przeciwciała) i/lub komórkowej (pośredniczonej przez specyficzne dla antygeny komórki T lub ich produkty wydzielnicze) skierowanej przeciw peptydowi amyloidowemu u pacjenta biorcy. Taka odpowiedź może być czynną odpowiedzią wywołaną przez podanie immunogenu, albo bierną odpowiedzią wywołaną przez podanie przeciwciał lub uczulonych komórek T. Komórkowa odpowiedź immunologiczna jest wywoływana przez prezentację epitopów polipeptydowych w połączeniu z cząsteczkami MHC Klasy I lub Klasy II w celu aktywowania specyficznych dla antygeny pomocniczych komórek T CD4⁺ i/lub cytotoksycznych komórek T CD8⁺. Odpowiedź może także obejmować aktywację monocytów, makrofagów, komórek NK, bazofili, komórek dendrytycznych, astrocytów, komórek mikrogleju, eozynofili lub innych składników odporności wrodzonej. Wystąpienie pośredniczonej przez komórki odpowiedzi immunologicznej można określić w testach proliferacji (komórek T CD4⁺) lub testach CTL (limfocytów T cytotoksycznych) (patrz Burke,

supra; Tiggers, *supra*). Względne udziały odpowiedzi humoralnej i komórkowej w ochronnym lub leczniczym działaniu immunogenu można rozróżnić oddzielnie izolując IgG i komórki T z immunizowanego syngeneicznego zwierzęcia i mierząc ochronne lub lecznicze działanie u drugiego zwierzęcia.

„Środek immunogeny” lub „immunogen” jest zdolny po podaniu pacjentowi wywołać odpowiedź immunologiczną przeciw sobie samemu, ewentualnie w połączeniu z adiuwantem.

Określenie „nagi polinukleotyd” oznacza polinukleotyd nie skompleksowany z materiałem koloidalnym. Nagie polinukleotydy czasem klonuje się w wektory plazmidowe.

Określenie „adiuwant” oznacza związek, który podany razem z antygenem wzmacnia odpowiedź immunologiczną na antygen, ale podany oddzielnie nie wywołuje odpowiedzi immunologicznej na antygen. Adiuwanty mogą wzmacniać odpowiedź immunologiczną na drodze kilku różnych mechanizmów, włącznie z rekrutacją limfocytów, stymulacją komórek B i/lub T oraz stymulacją makrofagów.

Określenie „pacjent” oznacza człowieka lub innego ssaka poddawanego profilaktyce lub leczeniu.

Zdeintegrowany lub monomeryczny A β oznacza rozpuszczalne, monomeryczne jednostki peptydowe A β . Jednym ze sposobów preparowania monomerycznych A β jest rozpuszczenie liofilizowanego peptydu w czystym DMSO z rozbijaniem ultradźwiękami. Powstały roztwór odwirowuje się w celu usunięcia cząstek nierozpuszczalnych. Zagregowany A β jest mieszaniną oligomerów, w której monomeryczne jednostki są utrzymywane razem wiązaniami niekowalencyjnymi.

Środki lub sposoby „obejmujące” jeden lub większą liczbę wymienionych elementów mogą zawierać inne elementy nie wymienione specyficznie. Przykładowo środek zawierający peptyd A β obejmuje zarówno wyizolowany peptyd A β , jak i peptyd A β jako składnik dłuższej sekwencji polipeptydowej.

Wynalazek dotyczy środków leczniczych oraz sposobów profilaktyki i leczenia chorób charakteryzujących się nagromdzeniem złogów amyloidowych. Złogi amyloidowe zawierają peptydy zagregowane w nierozpuszczalną masę. Natura peptydów różni się w różnych chorobach, ale w większości przypadków agregat ma strukturę β -pofałdowanej kartki i wybarwia się barwnikiem Congo Red. Choroby charakteryzujące się złogami amyloidowymi obejmują chorobę Alzheimera (AD), zarówno o wczesnym jak i późnym początku. W obu chorobach złogi amyloidowe zawierają peptyd nazywany A β , który gromadzi się w mózgu osób chorych. Przykładami innych chorób charakteryzujących się złogami amyloidu są amyloidoza SAA, dziedziczny zespół islandzki, szpiczak mnogi oraz encefalopatie gąbczaste, włącznie z chorobą szalonych krów, chorobą Creutzfeldta Jakoba, encefalopatią owiec oraz encefalopatią gąbczastą norek (patrz Weissmann i inni, *Curr. Opin. Neurobiol.* 7, 695-700 (1997); Smits i inni, *Veterinary Quarterly* 19, 101-105 (1997)), Nathanson i inni, *Am. J. Epidemiol.* 145, 959-969 (1997)). Peptydy tworzące agregaty w tych chorobach, to odpowiednio dla pierwszych trzech surowiczy amyloid A, cystantyna C, lekki łańcuch IgG κ oraz białka prionowe dla pozostałych.

Środki lecznicze zawarte w kompozycjach farmaceutycznych według wynalazku wywołują odpowiedź immunologiczną przeciw peptydowi A β . Środki te obejmują sam peptyd A β oraz jego odmiany, analogi i mimetyki peptydu A β indukujące przeciwciała skierowanymi przeciw peptydowi A β i/lub reagujące z nimi krzyżowo oraz przeciwciała lub komórki T reagujące z peptydem A β . Wywołanie odpowiedzi immunologicznej może być czynne, np. w przypadku podania pacjentowi immunogenu w celu zaindukowania przeciwciał lub komórek T reagujących z A β , albo bierne, np. w przypadku podania pacjentowi przeciwciał, które same wiążą A β .

A β znany także jako peptyd β -amyloidowy lub peptyd A4 (patrz US 4666829; Glenner i Wong, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120, 1131 (1984)), jest peptydem o długości 39-43 aminokwasów, który jest główną składową charakterystycznych płytek w chorobie Alzheimera. A β powstaje w wyniku przetwarzania większego białka APP przez dwa enzymy, nazywane sekretazami β i γ (patrz. Hardy, *TINS* 20, 154 (1997)). Znane mutacje w APP związane z chorobą Alzheimera występują proksymalnie do miejsc β lub γ sekretaz lub w obrębie A β . Przykładowo pozycja 717 leży proksymalnie do miejsca cięcia APP przez sekretazę γ podczas obróbki do A β , a pozycje 670/671 leżą proksymalnie do miejsca cięcia przez sekretazę β . Uważa się, że mutacje powodują chorobę AD przez wpływanie na reakcje cięcia, w wyniku których powstaje A β , tak że zwiększają ilość wytwarzanej 42/43 aminokwasowej formy A β .

A β ma tę niezwykłą zdolność, że może utrzymywać i aktywować zarówno klasyczną, jak i alternatywną kaskadę dopełniacza. W szczególności wiąże się on z C1q i ostatecznie z C3bi. To połączenie ułatwia wiązanie do makrofagów, prowadzące do aktywacji komórek B. Ponadto C3bi dalej rozpada się i wiąże z CR2 na komórkach B w sposób zależny od komórek T, co prowadzi do 10000-krotnego

wzrostu aktywacji tych komórek. Mechanizm ten powoduje, że A β wytwarza większą niż inne antygeny odpowiedź immunologiczną.

Środek leczniczy zawarty w kompozycji farmaceutycznej może być dowolną naturalnie występującą postacią peptydu A β , a zwłaszcza ludzką postacią (to jest A β 39, A β 40, A β 41, A β 42 lub A β 43). Sekwencje tych peptydów i ich pokrewieństwo z prekursorowym APP przedstawiono na fig. 1 w Hardy i inni, *TINS* 20, 155-158 (1997). Przykładowo A β 42 ma sekwencję:

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

A β 41, A β 40 i A β 39 różnią się od A β 42 pominięciem odpowiednio Ala, Ala-Ile i Ala-Ile-Val na C-końcu. A β 43 różni się od A β 42 obecnością reszty treoniny na C-końcu. Środkiem leczniczym może także być aktywny fragment lub analog naturalnego peptydu A β , zawierający epitop indukujący podobną ochronną lub leczniczą odpowiedź immunologiczną po podaniu człowiekowi. Immunogenne fragmenty zazwyczaj mają ciągłą sekwencję co najmniej z 3, 5, 6, 10 lub 20 sąsiednich aminokwasów naturalnego peptydu. Immunogenne fragmenty obejmują A β 1-5, 1-6, 1-12, 13-28, 17-28, 25-25, 35-40 i 35-42. Fragmenty z N-końcowej połowy A β są korzystniejsze w niektórych sposobach. Analogi obejmują odmiany alleliczne, gatunkowe i indukowane. Analogi zazwyczaj różnią się od naturalnie występujących peptydów w jednym lub kilku miejscach, często przez konserwatywne podstawienia. Analogi zazwyczaj wykazują co najmniej 80 lub 90% identyczności sekwencji z naturalnymi peptydami. Niektóre analogi zawierają także nienaturalne aminokwasy lub modyfikacje N- lub C-końcowych aminokwasów. Przykładami nienaturalnych aminokwasów są α,α -dwupodstawione aminokwasy, N-alkiloaminokwasy, kwas mlekowy, 4-hydroksyprolina, γ -karboksylglutaminian, ϵ -N,N,N-trimetylolizyna, ϵ -N-acetylolizyna, O-fosfoseryna, N-acetyloseryna, N-formylometionina, 3-metylohistydyna, 5-hydroksylizyna, ω -N-metyloarginina. Profilaktyczne lub lecznicze działanie fragmentów i analogów można selekcjonować z użyciem zwierzęcych modeli transgeniczných, co opisano poniżej.

A β , jego fragmenty, analogi i inne peptydy amyloidogenne można zsintetyzować drogą syntezy peptydów w fazie stałej lub przez ekspresję rekombinacyjną, albo można je otrzymać z naturalnych źródeł. Automatyczne syntetyzatory białek są dostępne w handlu od wielu dostawców, takich jak Applied Biosystems, Foster City, California. Ekspresję rekombinacyjną można przeprowadzić w bakteriach, takich jak *E. coli*, w drożdżach, komórkach owadźcych lub komórkach ssaczych. Procedury ekspresji rekombinacyjnej opisali Sambrook i inni, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (C.S.H.P. Press, NY 2 wyd., 1989). Niektóre postacie peptydu A β są także dostępne w handlu (np. American Peptides Company, Inc., Sunnyvale, CA i California Peptide Research, Inc. Napa, CA).

Środki lecznicze obejmują także dłuższe polipeptydy obejmujące np. peptyd A β , aktywny fragment lub analog razem z innymi aminokwasami. Przykładowo peptyd A β może być obecny w nieaktywnym białku APP lub jego segmencie, takim jak fragment C-100 zaczynający się na N-końcu A β i biegnący do końca APP. Takie polipeptydy można przebadать pod względem ich działania profilaktycznego lub leczniczego na modelach zwierzęcych w sposób opisany poniżej. Peptyd A β , analog, aktywny fragment lub inny polipeptyd można podać w zasocjowanej postaci (to jest jako peptyd amyloidowy) lub w postaci zdysocjowanej. Środki lecznicze obejmują także multimery monomerycznych środków immunogennych.

W kolejnej odmianie peptyd immunogeny, taki jak A β , może być stosowany jako szczepionka wirusowa lub bakteryjna. Kwas nukleinowy kodujący peptyd immunogeny wprowadza się do genomu lub episomu wirusa lub bakterii. Ewentualnie kwas nukleinowy wprowadza się w taki sposób, że peptyd immunogeny jest ekspresjonowany jako białko wydzielnicze lub białko fuzyjne z białkiem zewnętrznej powierzchni wirusa lub transbłonowym białkiem bakterii, tak że peptyd jest ekspozycyjny. Wirusy lub bakterie użyte w takich metodach powinny być niepatogenne lub atenuowane. Odpowiednie wirusy obejmują adenowirusy, HSV, ospę krowią i ospę drobiu. Fuzja peptydu immunogennego z HBsAg z HBV jest szczególnie odpowiednia. Środki lecznicze obejmują także peptydy i inne związki, które niekoniecznie wykazują znaczące podobieństwo sekwencji z A β , ale tym niemniej działają jako mimityki A β i wywołują podobną odpowiedź immunologiczną. Można np. przebadать pod względem przydatności dowolne peptydy lub białka tworzące β -pofałdowane kartki. Można także stosować przeciwciała przeciw-idiotypowe przeciw przeciwciałom monoklonalnym przeciw A β lub innym peptydom amyloidogennym. Takie przeciwciała przeciw-Id naśladują antygen i wytwarzają odpowiedź immunologiczną na niego (patrz *Essential Immunology* (red. Roit, Blackwell Scientific Publications, Palo Alto, wyd. 6) str. 181).

Można także zbadać pod względem przydatności losowe biblioteki peptydów lub innych związków. Biblioteki kombinatoryjne można wytworzyć dla wielu typów związków, które mogą być syntetyzowane krok-po-kroku. Związki takie obejmują polipeptydy, mimetyki β -skrętu, polisacharydy, fosfolipidy, hormony, prostaglandyny, steroidy, związki aromatyczne, związki heterocykliczne, benzodiazepiny, oligomeryczne N-podstawione glicyny i oligokarbaminiany. Duże biblioteki kombinatoryjne związków można skonstruować metodą kodowanych syntetycznych bibliotek opisaną w Affymax, WO 95/12608, Affymax, WO 93/06121, Columbia University, WO 94/0851, Pharmacopeia, WO 95/35503 i Scripps, WO 95/30642 (z których każdy cytuje się tutaj jako pozycję literaturową do wszystkich zastosowań). Biblioteki peptydowe można także skonstruować metodami ekspozycji fagowej. Patrz np. Devlin, WO 91/18980.

Początkowo biblioteki kombinatoryjne i inne związki bada się pod względem przydatności określając ich zdolność do wiązania się do przeciwciał lub limfocytów (B lub T) znanych jako specyficzne dla A β lub innych peptydów amyloidogennych. Na przykład początkowe przeszukiwania można przeprowadzić stosując jakiegokolwiek surowice poliklonalne lub przeciwciała monoklonalne przeciw A β lub innym peptydom amyloidogennym. Następnie związki zidentyfikowane w tych badaniach dalej analizuje się pod względem ich zdolności do indukowania przeciwciał lub reaktywnych limfocytów przeciw A β lub innym peptydom amyloidogennym. Na przykład można przebadать wielokrotne rozcieńczenia surowicy na płytkach do mikromianowania wcześniej powleczonych peptydem A β i przeprowadzić standardowy test ELISA w celu wykrycia reaktywnych przeciwciał na A β . Następnie związki można zbadać pod względem ich profilaktycznej lub leczniczej skuteczności na zwierzętach transgenicznym predysponowanych do choroby amyloidogennej, co opisano w przykładach. Zwierzęta takie obejmują, np. myszy niosące mutację 717 APP opisane przez Games i innych, *supra*, oraz myszy niosące mutację Swedish APP, takie jak opisane przez McConlogue i innych, US 5612486 i Hsiao i innych, *Science* 274, 99 (1996); Staufenbiela i innych, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13287-13292 (1997); Sturchler-Pierrat i innych, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13287-13292 (1997); Brochlet i innych, *Neuron* 19, 939-945 (1997). To samo podejście badawcze można zastosować w przypadku innych potencjalnych środków, takich jak opisane powyżej fragmenty A β , analogi A β i dłuższe peptydy zawierające A β .

Środki lecznicze zawarte w kompozycjach farmaceutycznych według wynalazku zawierają także przeciwciała specyficznie wiążące A β . Takie przeciwciała mogą być przeciwciałami monoklonalnymi lub poliklonalnymi. Niektóre z takich przeciwciał specyficznie wiążą się z zagregowaną formą A β , nie wiążąc się z formą zdysocjowaną. Niektóre wiążą się z formą zdysocjowaną, nie wiążąc się z formą zagregowaną. Niektóre wiążą się zarówno z formą zagregowaną, jak i zdysocjowaną. Wytwarzanie przeciwciał monoklonalnych nie-człowieczych, np. mysich lub szczurzych, można osiągnąć np. przez immunizację zwierzęcia z użyciem A β . Patrz Harlow i Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (CSHP NY, 1988) (przyczocony tutaj jako pozycja literaturowa do wszystkich zastosowań). Taki immunogen można otrzymać ze źródła naturalnego przez syntezę peptydów lub ekspresję rekombinacyjną.

Humanizowane postacie mysich przeciwciał można tworzyć z zastosowaniem technik rekombinacji DNA łącząc regiony CDR nie-człowieczych przeciwciał ze stałymi regionami ludzkimi. Patrz Queen i inni, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 10029-10033 (1989) i WO 90/07861 (przyczocone tutaj jako pozycje literaturowe do wszystkich zastosowań).

Ludzkie przeciwciała można uzyskać metodami ekspozycji fagowej. Patrz np. Dower i inni, WO 91/17271; McCafferty i inni, WO 92/01047. W tych metodach wytwarza się biblioteki fagowe, których członkowie eksponują różne przeciwciała na swoich powierzchniach zewnętrznych. Przeciwciała zazwyczaj są eksponowane jako fragmenty Fv lub Fab. Fagi eksponujące przeciwciała o wymaganej specyficzności wybiera się przez wzbogacenie powinowactwa do A β lub jego fragmentów. Można także wytworzyć ludzkie przeciwciała przeciw A β z niebędących ludźmi ssaków transgenicznym niosących transgeny kodujące co najmniej segment ludzkiego locus immunoglobulinowego oraz inaktywowane endogenne locus immunoglobulinowe. Patrz Lonberg i inni, WO93/12227 (1993); Kucherlapati, WO 91/10741 (1991) (z których każde jest przyczocone tutaj jako pozycja literaturowa do wszystkich zastosowań). Ludzkie przeciwciała można wybrać w doświadczeniach wiązania kompetycyjnego lub inaczej, jako mające tę samą specyficzność epitopową jak konkretne przeciwciało mysie. Takie przeciwciała szczególnie prawdopodobnie wykazują korzystne funkcjonalne właściwości przeciwciał mysich. Ludzkie przeciwciała poliklonalne także można otrzymać w postaci surowicy od pacjentów immunizowanych środkiem immunogennym. Ponadto takie przeciwciała poliklonalne można zageęścić drogą oczyszczania na zasadzie powinowactwa stosując A β lub inny peptyd amyloidowy jako odczynnik z powinowactwem.

Ludzkie lub humanizowane przeciwciała można tak zaprojektować, żeby miały region stały IgG, IgD, IgA lub IgE oraz jakiegokolwiek izotyp, włącznie z IgG1, IgG2, IgG3 i IgG4. Przeciwciała można eksprimować jako tetramery zawierające dwa łańcuchy lekkie i dwa ciężkie, jako oddzielne łańcuchy ciężkie, łańcuchy lekkie, jako Fab, Fab', F(ab')₂ i Fv lub jako pojedyncze łańcuchy przeciwciał, w których domeny zmienne łańcuchów lekkich i ciężkich są połączone razem przez odstępnik.

Środki lecznicze zawarte w kompozycjach farmaceutycznych według wynalazku obejmują także komórki T wiążące peptyd Aβ. Przykładowo komórki T mogą być aktywowane przeciw peptydowi Aβ przez wyeksymowanie ludzkiego genu MHC klasy I i ludzkiego genu β-2-mikroglobuliny z owadziej linii komórkowej, gdzie pusty kompleks jest tworzony na powierzchni komórek i może wiązać peptyd Aβ. Komórki T, które wystawiono na działanie linii komórkowej, stają się specyficznie zaktywowane przeciw peptydowi. Patrz Peterson i inni, US 5314813. Linie komórek owadzych eksprymujące antygen MHC klasy II można w podobny sposób stosować do aktywacji komórek T CD4.

Wytwarzanie leczniczych środków do leczenia innych chorób amyloidogennych określają te same lub analogiczne zasady. Ogólnie środki wymienione powyżej do zastosowań w leczeniu choroby Alzheimera można także stosować do leczenia choroby Alzheimera o wczesnym początku, związanej z zespołem Downa. W chorobie szalonych krów stosuje się peptyd prionowy, jego aktywne fragmenty lub analogi oraz przeciwciała przeciw peptydowi prionowemu zamiast peptydu Aβ, jego aktywnych fragmentów lub analogów oraz przeciwciał przeciw peptydowi Aβ stosowanych w leczeniu choroby Alzheimera. W leczeniu szpiczaka mnogiego stosuje się lekkie łańcuchy IgG oraz ich analogi i przeciwciała przeciw nim, itd. w przypadku innych chorób.

Niektóre środki wywołujące odpowiedź immunologiczną zawierają odpowiedni epitop do indukowania odpowiedzi immunologicznej przeciw złogom amyloidu, ale są zbyt małe, żeby mogły być immunogenne. W tej sytuacji immunogeny peptyd można połączyć z odpowiednim nośnikiem, aby ułatwić wywołanie odpowiedzi immunologicznej. Odpowiednie nośniki obejmują albuminy surowicze, hemocjaninę z mięczaka z rodzaju *Fisurella* (ang. keyhole limpet), cząsteczki immunoglobulin, tyroglobulinę, albuminę jaja kurzego, toksynę tężca lub toksynę z innych bakterii patogennych, takich jak błonica, *E. coli*, cholera lub *H. pylori* lub atenuowane pochodne toksyn. Inne nośniki do stymulacji lub wzmacniania odpowiedzi immunologicznej obejmują cytokiny, takie jak IL-1, peptydy IL-1 α i β, IL-2, γINF, IL-10, GM-CSF oraz chemokiny, takie jak M1P1α i β oraz RANTES. Środki immunogenne można także połączyć z peptydami polepszającymi transport przez tkanki, co opisano w O'Mahony, WO 97/17613 i WO 97/17614.

Środki immunogenne można połączyć z nośnikami przez sieciowanie chemiczne. Techniki łączenia immunogenu z nośnikiem obejmują tworzenie disulfidowych mostków z użyciem N-sukcynimidylu-3-(2-pirydyliotio)propionianu (SPDP) i 4-(N-maleimidometylo)cykloheksano-1-karboksylanu sukcydimydu (SMCC) (jeżeli w peptydzie nie ma grupy tiolowej, można ją wprowadzić przez dodanie cysteiny). Te reagenty tworzą wiązania disulfidowe między sobą i resztami cysteiny peptydu na jednym białku i wiązanie amidowe przez grupę ε-amidową lizyny lub inną wolną grupę aminową w innych aminokwasach. Wiele z takich środków tworzących mostki disulfidowe/amidowe opisano w *Immun. Rev.* 62, 185 (1982). Inne dwufunkcyjne środki sprzęgające tworzą raczej tioetery niż mostki disulfidowe. Wiele z tych środków tworzących tioetery jest dostępnych w handlu i obejmują one reaktywne estrы kwasu 6-maleimidokapronowego, kwasu 2-bromooctowego, kwasu 2-jodooctowego i kwasu 4-(maleimidometylo)cykloheksano-1-karboksylowego. Grupy karboksylowe można zaktywować łącząc je z imidem kwasu bursztynowego lub solą sodową kwasu 1-hydroksylo-2-nitro-4-sulfonowego.

Peptydy immunogenne można także wyeksymować jako białka fuzyjne z nośnikami. Peptyd immunogeny można połączyć z nośnikiem na N-końcu, C-końcu lub w środku. Ponadto w białku fuzyjnym mogą być obecne wielokrotne powtórzenia peptydu immunogennego.

Odpowiedź immunologiczną skierowaną przeciw złogom amyloidowym można także wywołać podając kwasy nukleinowe kodujące peptyd Aβ lub inne immunogeny peptydowe. Takim kwasem nukleinowym może być DNA lub RNA. Segment kwasu nukleinowego kodujący immunogen jest zazwyczaj połączony z elementami regulatorowymi, takimi jak promotor i wzmacniacz, które umożliwiają ekspresję segmentu DNA w przewidywanych komórkach docelowych pacjenta. Do ekspresji w komórkach krwi, co jest wymagane do wywołania odpowiedzi immunologicznej, do bezpośredniej ekspresji odpowiednie są elementy promotora i wzmacniacza z genów lekkich i ciężkich łańcuchów immunoglobulin lub promotor i wzmacniacz głównego produktu pośredniego CMV. Połączone elementy regulacyjne i sekwencje kodujące często wklonowuje się do wektora.

Dostępnych jest wiele wirusowych układów wektorowych obejmujących układy retrowirusowe (patrz np. Lawrie i Tumin, *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3, 102-109 (1993)), wektory adenowirusowe (patrz np. Bett i inni, *J. Virol.* 67, 5911 (1993)), wektory wirusów adenosatelitarnych (patrz np. Zhou i inni, *J. Exp. Med.* 179, 1867 (1994)), wektory wirusowe z rodziny ospy obejmujące wirus krowianki, wirus ospy ptasiej, wirusowe wektory z rodzaju alfawirus, takie jak wyprowadzone z wirusów Sindibs i gorączki Semliki Forest (patrz np. Dubensky i inni, *J. Virol.* 70, 508-519 (1996)) oraz wirusy brodawek (Ohe i inni, *Human Gene Therapy* 6, 325-333 (1995); Woo i inni, WO 94/12692 i Xiao i Brandsma, *Nucleic Acids. Res.* 24, 2630-2622 1996)).

DNA kodujący immunogen lub zawierający go wektor można umieścić w liposomach. Odpowiednie lipidy i pokrewne analogi opisano w US 5208036, 5264618, 5279833 i 5283185. Wektory i DNA kodujący immunogen mogą być także zaadsorbowane lub związane z odpowiednimi nośnikami w postaci cząstek, takimi jak np. polimetakrylan metylu, polimleczany i poli(mleczano-koglikolidy), patrz np. McGee i inni, *J. Micro Encap.* (1996).

Wektory do terapii genowej lub nagi DNA można dostarczyć *in vivo* podając konkretnemu pacjentowi, zazwyczaj ogólnoustrojowo (np. dożylnie, śródtrzewnowo, donosowo, dożołądkowo, śródskórnio, domięśniowo, podskórnio lub przez wlew wewnątrzczaszkowy) albo miejscowo (patrz np. US 5399346). DNA można także podawać za pomocą działa genowego. Patrz Xiao i Brandsma, *supra*. DNA kodujący immunogen osadza się na powierzchni mikroskopijnych metalowych kulek. Mikropociiski są przyspieszane przez falę szokową lub rozprężany hel i przenikają do tkanek na głębokość kilku warstw komórek. Odpowiednie jest np. urządzenie The Accel™ Gene Delivery Device wytwarzane przez Agacetus, Inc. Middleton WI. Ponadto nagi DNA może przejść przez skórę do krwi, po prostu w wyniku naniesienia DNA na skórę podrażnioną chemicznie lub mechanicznie (patrz, WO 95/05853).

W innej odmianie wektory kodujące immunogeny można dostarczyć do komórek *ex vivo*, takich jak komórki eksplantowane od pojedynczego pacjenta (np. limfocyty, aspirat szpiku kostnego, biopsja tkankowa) albo uniwersalne donorowe hematopoetyczne komórki macierzyste, a następnie reimplantować te komórki pacjentowi, zazwyczaj po selekcji pod względem komórek, które mają włączony wektor.

Pacjenci, których można leczyć, stanowią osoby z ryzykiem choroby, ale u których nie wystąpiły objawy, a także pacjenci, u których wystąpiły objawy. Jeśli chodzi o chorobę Alzheimera, praktycznie u każdego występuje ryzyko choroby Alzheimera jeżeli on lub ona żyją dostatecznie długo. Zatem niniejsze sposoby można stosować profilaktycznie do ogólnej populacji, bez określania ryzyka u danego pacjenta. Niniejsze sposoby są szczególnie użyteczne w przypadku pacjentów ze znanym genetycznym ryzykiem choroby Alzheimera. Pacjenci tacy obejmują osoby mające krewnych, u których wystąpiła ta choroba, a także osoby, u których ryzyko określa się analizując znaczniki genetyczne i biochemiczne. Znaczniki genetyczne ryzyka choroby Alzheimera obejmują mutacje genu APP, w szczególności mutacje w pozycji 717 oraz pozycjach 670 i 671 nazywane odpowiednio mutacjami Hardy'ego i Swedish (patrz Hardy, *TINS*, *supra*). Innymi znacznikami ryzyka są mutacje genów preseniliny, PS1 i PS2 oraz ApoE4, rodzinna historia AD, hipercholesterolemia lub miażdżyca tętnic. Osoby obecnie cierpiące na chorobę Alzheimera można rozpoznać po charakterystycznym otępieniu, a także po obecności opisanych wyżej czynników ryzyka. Ponadto dostępnych jest wiele testów diagnostycznych do identyfikacji osób z AD. Obejmują one pomiary poziomów CSF τ i A β 42. Podniesione poziomy τ i obniżone poziomy A β 42 wskazują na obecność AD. Pacjentów z chorobą Alzheimera można także zdiagnozować pod względem kryteriów MMSE i ADRDA, co opisano niżej w części z przykładami.

U pacjentów, u których nie występują objawy, leczenie można rozpocząć w dowolnym wieku (np. 10, 20, 30). Jednakże zazwyczaj nie jest konieczne rozpoczynanie leczenia zanim pacjent osiągnie 40, 50, 60 lub 70 rok życia. Leczenie zazwyczaj obejmuje podawanie wielu dawek w pewnym okresie czasu. Leczenie można monitorować określając odpowiedzi przeciwciał lub aktywowanych komórek T lub B na środek leczniczy (np. peptyd A β) w czasie. Jeżeli odpowiedź słabnie, wskazana jest wzmocniona dawka. W przypadku pacjentów z potencjalnym zespołem Downa leczenie można rozpocząć przed urodzeniem podając środek leczniczy matce, lub wkrótce po urodzeniu.

W zastosowaniach profilaktycznych środki farmaceutyczne lub leki podaje się pacjentowi, podatnemu na konkretną chorobę lub z ryzykiem konkretnej choroby, w ilości wystarczającej do wyeliminowania lub zmniejszenia ryzyka lub opóźnienia pojawienia się choroby. W zastosowaniach leczniczych środki farmaceutyczne lub leki podaje się pacjentowi, u którego podejrzewa się taką chorobę lub u którego już wystąpiła taka choroba, w ilości wystarczającej do wyleczenia lub co najmniej czę-

ściowego zahamowania objawów choroby i jej powikłań. Ilość odpowiednią do osiągnięcia tego definiuje się jako leczniczo lub profilaktycznie skuteczną dawkę. Zarówno w trybie leczenia, jak i profilaktyki środki zazwyczaj podaje się w kilku dawkach do uzyskania wystarczającej odpowiedzi immunologicznej. Zazwyczaj odpowiedź immunologiczną monitoruje się i kolejne dawki podaje się gdy odpowiedź immunologiczna zaczyna zanikać.

Skuteczne dawki środków według wynalazku do leczenia opisanych powyżej stanów różnią się zależnie od wielu różnych czynników, włącznie z sposobem podawania, docelowym miejscem, stanem fizjologicznym pacjenta, czy pacjent jest człowiekiem czy zwierzęciem, innymi przyjmowanymi lekami, oraz od tego czy leczenie jest profilaktyczne czy terapeutyczne. Zazwyczaj pacjent jest człowiekiem, ale w niektórych chorobach, takich jak choroba szalonych krów, pacjent może być ssakiem nie będącym człowiekiem, takim jak bydło. Dawki lecznicze powinno się mianować w celu zoptymalizowania bezpieczeństwa i skuteczności. Ilość immunogenu zależy od tego, czy również podaje się adiuwant, przy czym przy braku adiuwanta wymagane są wyższe dawki. Ilość immunogenu do podawania czasami wynosi od 1 do 500 μg na pacjenta, a częściej 5 - 500 μg na zastrzyk przy podawaniu ludziom. Czasami stosuje się wyższą dawkę 1 - 2 mg na zastrzyk. Zazwyczaj przy podawaniu ludziom stosuje się 10, 20, 50 lub 100 μg na zastrzyk. Okresy wstrzykiwania mogą się znacząco różnić od jednego raza dziennie do jednego raza na rok, oraz do jednego raza na dekadę. W dowolnym danym dniu, w którym podaje się dawkę immunogenu, dawka jest większa niż 1 μg /pacjenta, a zazwyczaj większa niż 10 μg /ml gdy także podaje się adiuwant oraz większa niż 10 μg /pacjenta, a zazwyczaj 100 μg /pacjenta w przypadku braku adiuwanta. Typowy tryb leczenia obejmuje immunizację, a po niej zastrzyki dawek przypominających z przerwami 6-tygodniowymi. Inny tryb leczenia obejmuje immunizację, a następnie zastrzyki dawek przypominających po 1, 2 i 12 miesiącach. Inny tryb leczenia obejmuje zastrzyki co 2 miesiące przez całe życie. Ponadto zastrzyki przypominające mogą być nieregularne, wykonywane w oparciu o monitorowanie odpowiedzi immunologicznej. Dla biernej immunizacji przeciwciałami dawki wynoszą od 0,0001 do 100 mg/kg, a częściej 0,01 do 5 mg/kg wagi ciała biorcy. Dawki kwasów nukleinowych kodujących immunogeny wynoszą od 10 ng do 1 g, 100 ng do 100 mg, 1 μg do 10 mg lub 30-300 μg DNA na pacjenta. Dawki dla infekcyjnych wektorów wirusowych wynoszą od 10^{-10} - 10^9 lub więcej wirionów na dawkę.

Środki do wywoływania odpowiedzi immunologicznej można podawać pozajelitowo, miejscowo, dożylnie, doustnie, podskórną, dootrzewnowo, donosowo lub domięśniowo przy leczeniu profilaktycznym i/lub terapeutycznym. Najczęstszą drogą podawania jest droga podskórna, ale inne mogą być równie skuteczne. Kolejną najczęstszą drogą są zastrzyki domięśniowe. Ten typ zastrzyków najczęściej wykonuje się w mięśniu ręki lub nogi. Także skuteczne w wytwarzaniu odpowiedzi immunologicznej są zastrzyki dożylne, a także zastrzyki śródtrzewnowe, dotętnicze, wewnątrzczaszkowe lub śródskórne. W niektórych sposobach środki wstrzykuje się bezpośrednio do konkretnej tkanki gdzie nagromadziły się złogi.

Ponadto środki według wynalazku można podawać w połączeniu z innymi środkami, które są co najmniej częściowo skuteczne w leczeniu choroby amyloidogennej. W przypadku choroby Alzheimer'a i zespołu Down'a, gdzie złogi amyloidowe występują w mózgu, środki według wynalazku można podawać w połączeniu z innymi środkami polepszającymi przenikanie środków według wynalazku przez barierę krew-mózg.

Środki immunogenne według wynalazku, takie jak peptydy, czasami podaje się w połączeniu z adiuwantem. Można stosować wiele różnych adiuwantów w połączeniu z peptydem, takim jak A β , aby wywołać odpowiedź immunologiczną. Korzystne adiuwanty wzmacniają wewnętrzną odpowiedź na immunogen nie powodując konformacyjnych zmian immunogenu, które wpływałyby na jakościową postać odpowiedzi. Korzystne adiuwanty obejmują alun, de-O-acylowany monofosforylowany lipid A (MPL) (patrz GB 2220211). QS21 jest glikozydem triterpenu lub saponiną wyizolowaną z kory drzew *Quillaja Saponaria Molina* rosnącego w Południowej Ameryce (patrz Kensil i inni, w *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (red. Powell i Newman, Plenum Press, NY, 1995); opis patentowy Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 5057540). Inne adiuwanty to emulsje olej w wodzie (np. skwalenu lub oleju arachidowego), ewentualnie w połączeniu z immunostymulantami, takimi jak monofosforylowany lipid A (patrz Stoute i inni, *N. Engl. Med.* 336, 86-91 (1997)). Innym adiuwantem jest CpG (*Bioworld Today*, 15 listopada 1998 r.). Ponadto A β może być sprzężony z adiuwantem. Przykładowo lipopeptydową wersję A β można otrzymać przez sprzęganie kwasu palmitynowego lub innych lipidów bezpośrednio z N-końcem A β , jak opisano dla szczepionek antygenem zapalenia wątroby typu B (Livingston, *J. Immunol.* 159, 1383-1392 (1997)). Jednakże takie sprzęganie nie powinno zasadniczo

zmienić konformacji A β tak, że wpłynęłoby to także na naturę odpowiedzi na niego. Adiuwanty można podawać jako składnik środka leczniczego razem ze środkiem czynnym lub osobno, przed podaniem, równocześnie lub po podaniu środka leczniczego.

Korzystną klasą adiuwantów są sole glinu (a λ un), takie jak wodorotlenek glinu, fosforan glinu, siarczan glinu. Takie adiuwanty można stosować z innymi konkretnymi środkami immunostymulującymi albo bez innych konkretnych środków immunostymulujących, takich jak MPL lub 3-DMP, QS21, polimeryczne lub monomeryczne aminokwasy, takie jak polikwas glutaminowy lub polilizyna. Inną klasą adiuwantów są preparaty typu emulsji olej w wodzie. Takie adiuwanty można stosować z innymi konkretnymi środkami immunostymulującymi albo bez innych konkretnych środków immunostymulujących, takich jak peptydy muramylowe (np. N-acetylmuramylo-L-treonylo-D-izoglutamina (thr-MDP), N-acetylonormuramylo-L-alanylo-D-izoglutamina (nor-MDP), N-acetylmuramylo-L-alanylo-D-izoglutaminylo-L-alanino-2-(1'-2'dipalmitoilo-sn-glicero-3-hydroksyfosforyloksy)etyloamina (MTP-PE), N-acetyloglukozaminylo-N-acetylmuramylo-L-Al-D-izoglu-L-Ala-dipalmitoksypropyloamid (DTP-DPP) teramid™) lub inne składniki ścian komórek bakteryjnych. Emulsje olej w wodzie obejmują (a) MF59 (WO 90/14837), zawierający 5% skwalenu, 0,5% Tween 80 i 0,5% Span 85 (ewentualnie zawierające różne ilości MTP-PE) w postaci submikronowych cząstek utworzonych z użyciem mikrofluidyzatora, takiego jak mikrofluidyzator Model 110Y (Microfluidics, Newton MA), (b) SAF, zawierający 10% skwalenu, 0,4% Tween 80, 5% polimeru blokowego Pluronic L121 i thr-MDP, wytworzony w postaci submikronowej emulsji drogą mikrofluidyzacji lub zworteksowane w celu wytworzenia emulsji cząstek o większym rozmiarze oraz (c) układ adiuwantowy Ribi™ (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) zawierający 2% skwalenu, 0,2% Tween 80 i jeden lub większą liczbę składników ścian komórek bakteryjnych z grupy obejmującej monofosforylolid A (MPL), dimikolinian trehalozy (TDM) i szkielet ściany komórkowej (CWS), korzystnie MPL+CWS (Detox™). Inną klasę korzystnych adiuwantów stanowią adiuwanty saponinowe, takie jak Stimulon™ (qs21, Aquila, Worcester, MA) lub wytworzone z niego cząstki, takie jak ISCOM (kompleksy immunostymulujące) i ISCOMATRIX. Inne adiuwanty obejmują kompletny adiuwant Freund'a (CFA) i niekompletny adiuwant Freund'a (IFA). Inne adiuwanty obejmują cytokiny, takie jak interleukiny (IL-1, IL-2 i IL-12), czynnik pobudzający tworzenie kolonii makrofagów (M-CSF), czynnik martwicy nowotworu (TNF).

Adiuwant można podawać z immunogenem w jednym preparacie przed podaniem, równocześnie z podaniem albo po podaniu immunogenu. Immunogen i adiuwant mogą być zapakowane i dostarczane w tej samej fiolce albo mogą być umieszczone w oddzielnych fiolkach i mieszane przed użyciem. Immunogen i adiuwant zazwyczaj pakuje się z etykietką wskazującą zamierzone zastosowanie lecznicze. Jeżeli immunogen i adiuwant są zapakowane osobno, zazwyczaj opakowanie zawiera instrukcje odnośnie mieszania przed użyciem. Wybór adiuwantu i/lub nośnika zależy od trwałości szczepionki zawierającej adiuwant, drogi podawania, harmonogramu dawkowania, skuteczności adiuwantu u szczepionych gatunków oraz u ludzi. Farmaceutycznie dopuszczalnym adiuwantem jest taki, który został dopuszczony lub jest dopuszczalny do podawania ludziom przez stosowne organy ustawodawcze. Na przykład kompletny adiuwant Freund'a nie jest odpowiedni do podawania ludziom. A λ un, MPL i QS21 są korzystne. Ewentualnie można równocześnie stosować jeden lub większą liczbę adiuwantów. Korzystne połączenia obejmują a λ un z MPL, a λ un z QS21, MPL z QS21 oraz a λ un, QS21 i MPL razem. Ponadto można stosować niekompletny adiuwant Freund'a (Chung i inni, *Advanced Drug Delivery Reviews* 32, 173-186 (1998)), ewentualnie w połączeniu z jakimkolwiek składnikiem wybranym spośród a λ unu, QS21 i MPL i wszystkich ich kombinacji.

Środki według wynalazku często podaje się jako środki farmaceutyczne zawierające środek leczniczo czynny i różne farmaceutycznie dopuszczalne składniki. Patrz *Remington's Pharmaceutical Science* (wyd. 15, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1980). Korzystna postać zależy od zamierzonej drogi podawania oraz zastosowania leczniczego. Środki mogą także zawierać, zależnie od wymaganego preparatu, farmaceutycznie dopuszczalne, nietoksyczne nośniki lub rozcieńczalniki, które określa się jako nośniki powszechnie stosowane do formułowania środków farmaceutycznych do podawania ludziom i zwierzętom. Rozcieńczalnik wybiera się tak, żeby nie wpływał na aktywność biologiczną danego środka. Przykładami takich rozcieńczalników są woda destylowana, fizjologiczna sól buforowana fosforanem, płyny Ringera, roztwór dekstrozy oraz płyn Hanka. Ponadto środek farmaceutyczny lub preparat może także zawierać inne nośniki, adiuwanty lub nietoksyczne, nielecznicze, nieimmunogenne stabilizatory itp. Jednakże niektóre odczynniki odpowiednie do podawania zwierzętom, takie jak kompletny adiuwant Freund'a, zazwyczaj nie wchodzi w skład środków dla ludzi.

Środki farmaceutyczne mogą także zawierać duże, wolno metabolizowane makrocząsteczki, takie jak białka, polisacharydy, polikwasy mlekowe, polikwasy glikolowe i kopolimery (takie jak funkcjonalizowana lateksem sefaroza, agaroza, celuloza itp.), polimeryczne aminokwasy, kopolimery aminokwasów i agregaty lipidów (takie jak kropelki oleju lub liposomy). Nośniki te mogą ponadto działać jako środki immunostymulujące (to jest adiuwanty).

Do podawania pozajelitowego środka według wynalazku można podawać jako wstrzykiwane dawki roztworów lub zawiesin substancji w fizjologicznie dopuszczalnym rozcieńczalniku z farmaceutycznym nośnikiem, którym może być jałowa ciecz, taka jak woda, oleje, roztwór soli, gliceryna lub etanol. Ponadto w preparatach mogą być obecne substancje pomocnicze, takie jak środki zwilżające lub emulgujące, powierzchniowo czynne, substancje buforujące pH itp. Innymi składnikami środków farmaceutycznych są środki pochodzące z ropy naftowej, zwierzęce, roślinne lub syntetyczne, np. olej arachidowy, olej sojowy i olej mineralny. Ogólnie glikole, takie jak glikol propylenowy lub glikol polietylenowy, są korzystnymi ciekłymi nośnikami, szczególnie do roztworów do wstrzykiwania.

Zazwyczaj środki wytwarza się jako preparaty do wstrzykiwania, jako płynne roztwory lub zawiesiny; można także wytwarzać stałe postaci odpowiednie do rozpuszczania lub dyspergowania w ciekłych nośnikach przed iniekcją. Preparat może także być zemułgowany lub kapsułkowany w liposomach lub mikrocząstkach, takich jak polilaktyd, poliglikolid lub kopolimer, w celu wzmocnienia działania adiuwanta, co opisano powyżej (patrz Langer, *Science* 249, 1527 (1990) i Hanes, *Advanced Drug Delivery Reviews* 28, 97-119 (1997)). Środki według wynalazku można także podawać jako zastrzyki typu depot lub preparaty w postaci wszczepów, które można wytwarzać w taki sposób, aby umożliwić przedłużone lub pulsacyjne uwalnianie składnika czynnego.

Dodatkowe preparaty odpowiednie do innych sposobów podawania obejmują preparaty doustne, donosowe i dopłucne, czopki i preparaty przezskórne.

W przypadku czopków, substancje wiążące i nośniki obejmują np. glikole polialkilenowe lub triglicerydy; takie czopki można wytwarzać z mieszanin zawierających składnik czynny w ilości od 0,5% do 10%, korzystnie 1%-2%. Doustne preparaty zawierają zaróbki, takie jak mannitol, laktozę, skrobię, stearynian magnezu, sacharynian sodu, celulozę i węglan magnezu jakości farmaceutycznej. Środki te mają postać roztworów, zawiesin, tabletek, pigułek, kapsułek, preparatów o przedłużonym uwalnianiu lub proszków i zawierają 10%-95% składnika czynnego, korzystnie 25%-70%.

Podawanie miejscowe można osiągnąć drogą przezskórną lub śródskórną. Podawaniu miejscowemu może sprzyjać równoczesne podawanie środka z toksyną cholery lub jej detoksykowanymi pochodnymi lub podjednostkami, albo z podobnymi toksynami bakteryjnymi (patrz Glenn i inni, *Nature* 391, 851 (1998)). Równoczesne podawanie można osiągnąć stosując składniki w postaci mieszaniny lub połączone cząsteczki uzyskane przez chemiczne sieciowanie lub ekspresję białka fuzyjnego.

Alternatywnie dostarczanie przezskórne można osiągnąć stosując plastry na skórę lub transferynosomy (Paul i inni, *Eur. J. Immunol.* 25, 3521-24 (1995); Cevc i inni, *Biochem. Biophys. Acta* 1368, 201-15 (1998)).

Możliwe jest wykrywanie odpowiedzi immunologicznej przeciw peptydowi A β u pacjenta cierpiącego na lub podatnego na chorobę Alzheimera. Sposoby takie są szczególnie przydatne do monitorowania przebiegu leczenia stosowanego u pacjenta. Sposoby można stosować do monitorowania zarówno leczenia terapeutycznego u pacjentów, u których wystąpiły objawy, jak i leczenia profilaktycznego u pacjentów, u których nie wystąpiły objawy.

Możliwe jest ustalanie wartości podstawowej odpowiedzi immunologicznej u pacjenta przed podaniem dawki środka i porównanie jej z wartością odpowiedzi immunologicznej po leczeniu. Znaczący wzrost (to jest większy niż typowy margines błędu doświadczalnego w powtarzanych pomiarach tej samej próbki, wyrażony jako jedno odchylenie standardowe od średniej z tych pomiarów) wartości odpowiedzi immunologicznej sygnalizuje pozytywny wynik leczenia (to jest, że podanie środka wywołało lub wzmocniło odpowiedź immunologiczną). Jeżeli wartość odpowiedzi immunologicznej nie zmienia się znacząco lub obniża się, wskazuje to na negatywny wynik leczenia. Ogólnie u pacjentów w początkowym okresie leczenia środkiem oczekuje się wzrostu odpowiedzi immunologicznej po kolejno następujących dawkach, która ewentualnie może osiągnąć plateau. Ogólnie podawanie środka kontynuuje się gdy odpowiedź immunologiczna wzrasta. Osiągnięcie plateau wskazuje, że leczenia można dalej nie kontynuować lub zmniejszyć dawkę albo częstość jej podawania.

Możliwe jest też ustalenie kontrolnej wartości (to jest średniej z odchyleniem standardowym) odpowiedzi immunologicznej dla populacji kontrolnej. Zazwyczaj osoby w populacji kontrolnej nie były wcześniej poddawane leczeniu. Wartości odpowiedzi immunologicznej zmierzone u pacjenta po

podaniu środka leczniczego porównuje się z wartością kontrolną. Znaczący wzrost w porównaniu z wartością kontrolną (to jest większy niż jedno odchylenie standardowe od średniej z tych pomiarów) sygnalizuje pozytywny wynik leczenia. Brak znaczącego wzrostu lub obniżenie sygnalizuje negatywny wynik leczenia. Ogólnie podawanie środka kontynuuje się do czasu gdy odpowiedź immunologiczna zacznie wzrastać w odniesieniu do wartości kontrolnej. Tak jak poprzednio, osiągnięcie plateau w odniesieniu do wartości kontrolnych wskazuje, że leczenia można dalej nie kontynuować lub zmniejszyć dawkę albo częstość jej podawania.

Wartość kontrolną odpowiedzi immunologicznej (np. średnią i odchylenie standardowe) można też ustalać z kontrolnej populacji osobników, którzy przeszli leczenie środkiem leczniczym i których odpowiedzi immunologiczne osiągnęły plateau w odpowiedzi na leczenie. Wartości odpowiedzi immunologicznej zmierzone u pacjenta porównuje się z wartością kontrolną. Jeżeli zmierzony u pacjenta poziom nie różni się znacząco (np. więcej niż jedno odchylenie standardowe) od wartości kontrolnej leczenia można dalej nie kontynuować. Jeżeli poziom u pacjenta jest znacząco niższy od wartości kontrolnej, wskazane jest dalsze podawanie środka. Jeżeli poziom u pacjenta utrzymuje się poniżej wartości kontrolnej wskazana może być zmiana trybu leczenia, np. zastosowanie innego adiuwantu.

Pacjenta, który obecnie nie jest leczony, ale który przeszedł okres leczenia, można też monitorować pod względem odpowiedzi immunologicznej w celu określenia, czy wymagane jest wznowienie leczenia. Wartość odpowiedzi immunologicznej zmierzoną u pacjenta można porównać z wartością odpowiedzi immunologicznej wcześniej osiągniętej u pacjenta podczas okresu leczenia. Znaczące obniżenie w porównaniu z poprzednimi pomiarami (to jest większe niż typowy margines błędu w powtórzonych pomiarach tej samej próbki) wskazuje, że leczenie należy wznowić. Ponadto wartość zmierzoną u pacjenta można porównać z wartością kontrolną (średnia plus odchylenie standardowe) oznaczoną dla populacji pacjentów po przejściu okresu leczenia. Ponadto wartości zmierzone u pacjenta można porównać z wartością kontrolną populacji pacjentów leczonych profilaktycznie, u których nie wystąpiły objawy choroby lub leczonych terapeutycznie, u których wystąpiła poprawa cech charakterystycznych choroby. We wszystkich tych przypadkach znaczące obniżenie w odniesieniu do poziomów kontrolnych (to jest większe niż odchylenie standardowe) wskazuje, że leczenie pacjenta powinno być wznowione.

Tkanką pobieraną od pacjenta do analizy jest zazwyczaj krew, osocze, surowica, śluz lub płyn mózgowo-rdzeniowy. Próbkę analizuje się pod względem wskaźników odpowiedzi immunologicznej na jakąkolwiek postać peptydu A β , zazwyczaj A β ₄₂. Odpowiedź immunologiczną można określić na podstawie obecności, np. przeciwciał lub komórek T, które specyficznie wiążą peptyd A β . Metody ELISA stosowane do wykrywania przeciwciał specyficznie wiążących peptyd A β opisano w części z przykładami. Sposoby wykrywania reaktywnych komórek T opisano powyżej (patrz Definicje).

Można sporządzać zestawy diagnostyczne do realizacji metod diagnostycznych opisanych powyżej. Zazwyczaj takie zestawy zawierają środek specyficznie wiążący przeciwciała przeciw A β lub reagujący z komórkami T specyficznymi dla A β . Zestaw może także zawierać znacznik. Do wykrywania przeciwciał przeciw A β znacznik jest zazwyczaj w postaci znakowanych przeciwciał przeciwidiotypowych. Do wykrywania przeciwciał można dostarczyć środek wcześniej związany z fazą stałą, taką jak studzienki na płytce do mikromianowania. Do wykrywania reaktywnych komórek T znacznik można dostarczyć jako ³H-tymidynę w celu zmierzenia odpowiedzi proliferacyjnej. Zestawy także zazwyczaj zawierają etykiety z wskazówkami jak zastosować zestaw. Etykieta może także zawierać wykres lub inną formę korelującą poziomy zmierzzonego znacznika z przeciwciałami przeciw A β lub komórkami T reaktywnymi z A β . Określenie etykieta odnosi się do jakiegokolwiek pisanego lub nagranego materiału dołączonego do zestawu lub w inny sposób towarzyszącego zestawowi, w dowolnym momencie podczas jego wytwarzania, transportu, sprzedaży i stosowania. Na przykład określenie etykieta obejmuje ulotki reklamujące oraz broszury, materiały opakowaniowe, instrukcje, kasety audio i wideo, dyskietki komputerowe, a także napisy wydrukowane bezpośrednio na zestawach, towarzyszącego zestawowi, w dowolnym momencie podczas jego wytwarzania, transportu, sprzedaży i stosowania. Na przykład określenie etykieta obejmuje ulotki reklamujące oraz broszury, materiały opakowaniowe, instrukcje, kasety audio i wideo, dyskietki komputerowe, a także napisy wydrukowane bezpośrednio na zestawach.

P r z y k ł a d y

I. Skuteczność profilaktyczna A β przeciw AD

W przykładach tych opisano podawanie peptydu A β ₄₂ myszom transgenicznym nadekspresyjującym APP z mutacją w pozycji 717 (APP_{717V→F}) predysponującą je do rozwoju neuropatologii typu

Alzheimera. Wytwarzanie i charakterystykę tych myszy (myszy PDAPP) opisano w Games i inni, *Nature, supra*. U zwierząt tych, w postaci heterozygot, zaczyna odkładać się A β poczynając od wieku 6 miesięcy. W wieku 15 miesięcy wykazują one poziomy złogów A β porównywalne z obserwowanymi w chorobie Alzheimera. Mysiom PDAPP wstrzyknięto zagregowany A β_{42} (zagregowany A β_{42}) lub sól buforowaną fosforanem. Zagregowany A β_{42} wybrano ze względu na jego zdolność indukowania przeciwciał na wielokrotne epitopy A β .

A. Metody

1. Źródło myszy

Trzydzieści heterogenicznych samic myszy PDAPP losowo podzielono na następujące grupy: 10 myszy, którym wstrzykiwano zagregowany A β_{42} (jedna zdechła w transporcie), 5 myszy, którym wstrzykiwano PBS/adiuwant lub PBS oraz 10 myszy kontrolnych, którym nie podawano zastrzyków. Pięciu myszom wstrzyknięto osoczowe białko amyloidu (SAP).

2. Przygotowanie immunogenów

Przygotowanie zagregowanego A β_{42} : 2 mg A β_{42} (US Peptides Inc, partia K-42-12) rozpuszczono w 0,9 ml wody i doprowadzono do 1 ml przez dodanie 0,1 ml 10xPBS. Następnie mieszaninę zworteksowano i inkubowano przez noc w 37°C w warunkach, w których peptyd ulega agregacji. Jakikolwiek nieużywany A β przechowywano w postaci suchego liofilizowanego proszku w -20°C do czasu następnego zastrzyku.

3. Przygotowanie zastrzyków

100 μ g zagregowanego A β_{42} w PBS na mysz zemulgowano w stosunku 1:1 z kompletnym adiuwantem Freund (CFA) w końcowej objętości 400 μ l emulsji do pierwszej immunizacji, a następnie podano przypominającą dawkę tej samej ilości immunogenu w niekompletnym adiuwancie Freund (IFA) po 2 tygodniach. Dwie dodatkowe dawki w IFA podano z przerwami miesięcznymi. Kolejne immunizacje wykonywano z miesięcznymi przerwami w 500 μ l PBS. Zastrzyki wykonywano śródtrzewnowo (i.p.).

Zastrzyki PBS podawano w takim samym porządku i myszom wstrzyknięto mieszaninę 1:1 PBS/adiuwant w objętości 400 μ l na mysz lub 500 μ l PBS na mysz. Zastrzyki z SAP podobnie podawano w tym samym porządku stosując dawki 100 μ g na zastrzyk.

4. Mianowanie krwi mysiej, preparowanie tkanek i immunohistochemia

Powyższe metody opisano poniżej w Ogólnych Materiałach i Metodach.

B. Wyniki

Mysiom PDAPP podano zagregowany A β_{42} (zagregowany A β_{42}), peptydy SAP lub sól buforowaną fosforanem. Jedną grupę myszy traktowano jako kontrolę pozytywną i nie podawano im zastrzyków. Miana z myszy z grupy zagregowanego A β_{42} monitorowano każdego miesiąca od czwartej dawki przypominającej aż myszy osiągnęły rok. Myszy uśmiercono w wieku 13 miesięcy. We wszystkich badanych punktach czasowych 8 z 9 myszy z grupy zagregowanego A β_{42} rozwinęło wysokie miano przeciwciał, które pozostało wysokie przez serię zastrzyków (miana wyższe niż 1/10000). Dziewięć mysz miała niskie, ale mierzalne miano około 1/1000 (fig. 1, tabela 1). Myszy, którym wstrzyknięto SAPP miały miana 1:1000 do 1:30000 wobec tego immunogenu, przy czym tylko u jednej myszy miano przekraczało 1:100000.

U myszy, którym podawano PBS zmierzono miana przeciw zagregowanemu A β_{42} w wieku 6, 10 i 12 miesięcy. Miana przeciw zagregowanemu A β_{42} myszy PBS w rozcieńczeniach 1/100 przekroczyły tylko 4-krotnie wartość podstawową w jednym punkcie danych, a w pozostałych punktach danych wynosiły mniej niż 4-krotna wartość podstawowa (tabela 1). Odpowiedź specyficzna dla SAP była nieistotna dla tych punktów czasowych i wszystkie miana były mniejsze niż 300.

Siedem z dziewięciu myszy z grupy zagregowanego A β_{1-42} nie miało wykrywalnego amyloidu w mózgach. Natomiast tkanka mózgowa z myszy w grupach SAP i PBS zawierała wiele 3D6-dodatnich złogów amyloidowych w hipokampie, a także korach czołowej i obręczowej. Wzór utworzonych złogów był podobny jak u nieleczonych myszy kontrolnych, z charakterystycznym występowaniem wrażliwych na uszkodzenie podregionów, takich jak zewnętrzna cząsteczkowa warstwa hipokampowego zakrętu zębatego. Jedna z myszy z grupy, której podawano A β_{1-42} miała znacznie zmniejszone obciążenie amyloidem, graniczącym z hipokampem. Zidentyfikowano odizolowaną płytkę u innej myszy leczonej A β_{1-42} .

Ilościowa analiza obrazu dla obciążenia amyloidem hipokampu wykazała znaczne zmniejszenie osiągnięte u zwierząt leczonych AN1792 (fig. 2). Wartości mediany obciążenia amyloidem dla grupy PBS (2,22%) i dla nieleczonej grupy kontrolnej (2,65%) były znacznie większe niż dla myszy immuni-

zowanych AN1792 (0,00%, $p=0,0005$). Natomiast wartość mediany dla grupy immunizowanej peptydami SAP (SAPP) wynosiła 5,74%. Tkanka mózgowa nieleczonych myszy kontrolnych zawierała liczne złogi A β , ujawnione za pomocą specyficznych dla A β przeciwciał monoklonalnych (mAb) 3D6, w hipokampie, a także w korze pozamodzelowatej. Podobny wzór złogów amyloidowych obserwowano także u myszy immunizowanych SAPP lub PBS (fig. 2). Ponadto we wszystkich trzech ostatnich grupach obserwowano znaczący udział wrażliwych na uszkodzenie podregionów mózgu klasycznie obserwowanych w AD, takich jak zewnętrzna cząsteczkowa warstwa hipokampowego zakrętu zębatego.

Mózgi, które nie zawierały złogów A β , były także pozbawione płytek neurotycznych zazwyczaj widocznych u myszy PDAPP z ludzkim przeciwciałem przeciw APP 8E5. Wszystkie mózgi z pozostałych grup, (którym wstrzykiwano SAP, PBS lub którym nie podawano zastrzyków) zawierały wiele płytek neurotycznych typowych dla nieleczonych myszy PDAPP. Niewielka liczba płytek neurotycznych była obecna u jednej z myszy leczonych AN1792 oraz pojedyncze skupisko dystroficznych neurotów znaleziono u drugiej myszy leczonej AN1792. Analiza obrazu dla hipokampu, przedstawiona na fig. 3, wykazała faktyczną eliminację dystroficznych neurotów u myszy leczonych AN1792 (mediana 0,00%) w porównaniu z biorcami PBS (mediana 0,28%, $p=0,0005$).

Astrocytoza charakterystyczna dla towarzyszącego płytkom zapalenia także nie występowała w mózgach grupy, której podawano A β 1-42. Mózgi myszy z innych grup zawierały znaczną ilość zgrupowanych GFAP-dodatnich astrocytów typowych dla związanej z płytkami A β glejozy. Część z reagujących z GFAP preparatów histologicznych wybarwiono przeciwnie Tioflawiną S w celu zlokalizowania złogów A β . GFAP-dodatnie astrocyty były związane z płytkami A β u myszy SAP, PBS oraz nieleczonych kontrolnych. Nie stwierdzono takiego związku u płytko-ujemnych myszy leczonych A β 1-42, podczas gdy minimalną glejozę związaną z płytkami obserwowano u jednej z myszy leczonych AN1792.

Analiza obrazu, przedstawiona na fig. 4 dla kory pozamodzelowatej, potwierdziła, że zmniejszenie astrocytozy było znaczące, z wartością mediany 1,56% dla myszy leczonych AN1792 wobec wartości mediany większych niż 6% dla grup immunizowanych peptydami SAP, PBS lub nieleczonymi ($p=0,0017$).

Dane z podzestawu myszy A β 1-42 i PBS wykazały brak związanej z płytkami MHC II immunoreaktywności u myszy A β 1-42, co zgadzało się z brakiem związanej z A β odpowiedzi zapalnej.

Fragmenty mózgów myszy także poddano działaniu mAb specyficznych dla MAC-1, komórkowego białka powierzchniowego. MAC-1 (CD11b) jest członkiem rodziny integryn i występuje w postaci heterodimeru z CD18. Kompleks CD11b/CD18 występuje na monocytach, makrofagach, neutrofilach i komórkach NK (Mak i Simard). Komórka typu MAC-1-reaktywnego występująca w mózgu jest najprawdopodobniej mikroglejem, w oparciu o podobną morfologię fenotypową w MAC-1 immunoreaktywnych fragmentach. Związane z płytkami znakowanie MAC-1 było niższe w mózgach myszy leczonych AN1792 w porównaniu z kontrolną grupą PBS, przy czym obserwacja ta zgadzała się z brakiem związanej z A β odpowiedzi zapalnej.

C. Wnioski

Brak płytek A β i reaktywnych neuronalnych i glejowych zmian w mózgach myszy, którym podano A β 1-42 wskazują, że w ich mózgach amyloid nie odkładał się lub odkładała się jego minimalna ilość oraz, że nie wystąpiły konsekwencje patologiczne, takie jak glejoza i patologia neurotów. Myszy PDAPP leczone A β 1-42 wykazały zasadniczo taki sam brak patologii, co kontrolne myszy nietransgeniczne. Tak więc zastrzyki z A β 1-42 są bardzo skuteczne w zapobieganiu złogom lub w oczyszczeniu tkanki mózgowej z ludzkiej formy A β oraz w eliminacji następujących później neuronalnych lub zapalnych zmian degeneracyjnych. Zatem podawanie peptydu A β przynosi lecznicze korzyści w zapobieganiu AD.

II. Badania odpowiedzi na dawkę

Grupy 5-tygodniowych samic myszy Swiss Webster (N=6 na grupę) immunizowano dootrzewnowo 300, 100, 33, 3,7, 1,2, 0,4 lub 0,13 μ g A β przygotowanymi w CFA/IFA. Podano 3 dawki z dwutygodniowymi przerwami, a następnie czwartą dawkę miesiąc później. Pierwszą dawkę zemułgowano z CFA, a pozostałe dawki zemułgowano z IFA. Od zwierząt pobierano krew do pomiaru miana w 4-7 dni po każdej z immunizacji zaczynając po drugiej dawce. Od zwierząt z zestawu trzech grup, immunizowanych 11, 33 lub 300 μ g antygeny, dodatkowo pobierano krew z około miesięcznymi przerwami przez 4 miesiące po czwartej immunizacji w celu monitorowania zaniku odpowiedzi przeciwciał w różnym zakresie dawek szczepionki. Zwierzętom tym wykonano piątą dodatkową immunizację w 7 miesięcy po rozpoczęciu badania. Zwierzęta uśmiercono tydzień później celem zmierzenia odpowiedzi przeciwciał na AN1792 i przeprowadzenia analizy toksykologicznej.

Przy dawkach od 300 do 3,7 μg obserwowano obniżającą się odpowiedź na dawkę, a przy dwóch niższych dawkach nie obserwowano odpowiedzi. Średnie wartości miana przeciwciał wynosiły około 1:1000 po trzech dawkach i około 1:10000 po czterech dawkach 11-300 μg antygeny (patrz fig. 5).

Miana przeciwciał znacznie wzrastały po trzeciej immunizacji dla wszystkich grup, z wyjątkiem grupy najniższej dawki, ze wzrostem GMT w zakresie od 5 do 25 razy. Niskie odpowiedzi przeciwciał wykryto wtedy nawet u biorców dawek 0,4 μg . Grupy 1,2 i 3,7 μg miały porównywalne miana z GMT około 1000, a cztery najwyższe dawki zgrupowały się razem z GMT około 25000, z wyjątkiem grupy dawki 33 μg z niższą GMT wynoszącą 3000. Po czwartej immunizacji wzrost miana był bardziej umiarkowany dla wszystkich grup. Zaobserwowano wyraźną odpowiedź na dawkę w grupach niższych dawek antygeny od 0,14 μg do 11 μg , wynoszącą od niewykrywalnych przeciwciał dla biorców 0,14 μg do GMT 36000 dla biorców 11 μg . Ponownie miana czterech najwyższych grup od 11 do 300 μg zgrupowały się razem. Zatem przez dwie kolejne immunizacje miano przeciwciał zależało od dawki antygeny w szerokim zakresie od 0,4 do 300 μg . Po trzeciej immunizacji miana z grup najwyższych czterech dawek były porównywalne i pozostały jako plateau po dodatkowej immunizacji.

Miesiąc po czwartej immunizacji miana były 2- do 3-krotnie wyższe w grupie 300 μg niż miana zmierzone w krwi pobranej 5 dni po immunizacji (fig. 6). Obserwacja ta sugeruje, że szczytowa anamnesticzna odpowiedź przeciwciał wystąpiła później niż 5 dni po immunizacji. Mniejszy (50%) wzrost obserwowano w tym czasie dla grupy 33 μg . W grupie dawki 300 μg po dwóch miesiącach od ostatniej dawki GMT obniżyła się stopniowo o około 70%. Po kolejnym miesiącu miano przeciwciał spadało mniej gwałtownie, o 45% (100 μg) i około 14% dla 33 i 11 μg dawek. Zatem szybkość obniżania miana przeciwciał w krążeniu po zaprzestaniu immunizacji jest dwufazowa z gwałtownym spadkiem w pierwszym miesiącu po szczytowej odpowiedzi, po którym następuje łagodniejszy spadek.

Miana przeciwciał i kinetyka odpowiedzi tych myszy Swiss Webster była podobna jak u młodych, heterozygotycznych, transgenicznych myszy PDAPP, immunizowanych w podobny sposób. Dawki skuteczne w wywoływaniu odpowiedzi immunologicznej u ludzi są zazwyczaj podobne do dawek skutecznych u myszy.

III. Poszukiwanie środków skutecznych leczniczo przeciw występującej AD

Test ten zaprojektowano w celu przebadania środków immunogennych pod względem aktywności w zatrzymywaniu lub odwracaniu charakterystyki neuropatologicznej AD u starych myszy. Immunizacje A β o długości 42 aminokwasów (AN1792) zaczęto w punkcie czasowym, w którym płytki amyloidowe były już obecne w mózgach myszy PDAPP.

Z upływem czasu w badaniu u nieleczonych myszy PDAPP rozwinęło się wiele zmian neurodegeneracyjnych przypominających występujące w AD (Games i inni, *supra*, oraz Johnson-Wood i inni, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 1550-1555 (1997)). Odkładanie A β w płytkach amyloidowych jest związane z degeneracyjną odpowiedzią neuronalną, obejmującą niewłaściwe elementy aksonalne i dendrytyczne, nazywane dystroficznymi neurytami. Złogi amyloidowe otoczone przez i zawierające dystroficzne neuryty nazywane są płytkami neurytycznymi. Zarówno u myszy AD, jak i u myszy PDAPP, neuryty dystroficzne mają wyróżniające się struktury globularne, są immunoreaktywne z zespołem przeciwciał rozpoznających APP i składniki cytoszkieletu i wykazują złożone, wewnątrzkomórkowe zmiany degeneracyjne na poziomie ultrastrukturalnym. Charakterystyki te pozwalają na istotne dla choroby, wybiórcze i powtarzalne pomiary tworzenia płytek neurytycznych w mózgach PDAPP. Dystroficzny składnik neuronalny płytek neurytycznych PDAPP łatwo jest uwidocznić przy pomocy przeciwciał specyficznych dla ludzkiego APP (mAb 8E5) i łatwo jest go zmierzyć przy pomocy komputerowo wspomaganą analizy obrazu. Zatem dodatkowo poza pomiarem działania AN1792 na tworzenie płytek amyloidowych monitorowano wpływ tego leczenia na rozwój dystrofii neurytycznej.

Astrocyty i mikroglej stanowią nieneuronalne komórki odpowiadające na i odzwierciedlające stopień uszkodzenia neuronalnego. W AD często obserwuje się astrocyty GFAP-dodatnie i MHC II-dodatni mikroglej, a ich aktywacja zwiększa się z ostrością choroby. Zatem monitorowano także rozwój reaktywnych astrocytów i mikroglejozy u myszy leczonych AN1792.

A. Materiały i metody

Czterdzieści osiem heterozygotycznych samic myszy PDAPP w wieku 11 do 11,5 miesięcy, otrzymanych z Charles River, losowo podzielono na dwie grupy: 24 myszy immunizowano 100 μg AN1792, a 24 immunizowano PBS, w każdym przypadku w połączeniu z adiuwantem Freund'a. Grupy AN1792 i PBS powtórnie podzielono w wieku około 15 miesięcy. W wieku 15 miesięcy zwierzęta z około połowy z każdej z grup AN1792 i PBS uśmiercono (odpowiednio n=10 i 9), a pozostałe nadal otrzymywały immunizacje aż do końca w wieku około 18 miesięcy (odpowiednio n=9 i 12).

W czasie badań zdechło 8 zwierząt (5 AN1792, 3 PBS). Ponadto, poza immunizowanymi zwierzętami, do doświadczenia włączono nieleczone myszy PDAPP jednoroczne ($n=10$), 15-miesięczne ($n=10$) i 18-miesięczne ($n=10$) dla porównania w testach ELISA pomiarów poziomu $A\beta$ i APP w mózgach; dodatkowo zwierzęta jednoroczne włączono do analizy immunohistochemicznej.

Metodologia była taka jak w przykładzie 1, z wyjątkiem przypadków, gdy wskazano inaczej. Do przygotowania antygeny do 6 immunizacji, podawanych przed 15 miesiącem, zastosowano AN1792 z US Peptides seria 12 i California Peptides seria ME0339. Do 3 dodatkowych immunizacji podawanych pomiędzy 15 a 18 miesiącem zastosowano California Peptides serie ME0339 i ME0439.

Do immunizacji zemulgowano 100 μg AN1792 w 200 μl PBS, lub samej PBS, w stosunku 1:1 z kompletnym adiuwantem Freund (CFA) lub niekompletnym adiuwantem Freund (IFA) lub PBS w końcowej objętości 400 μl . Pierwszą immunizację wykonano z CFA jako adiuwantem, następne 4 dawki podano z IFA, a końcowe 4 dawki z samą PBS bez dodatku adiuwantu. Łącznie wykonano 9 immunizacji w okresie 7 miesięcy z dwutygodniowymi przerwami dla pierwszych 3 dawek, a następnie z czterotygodniowymi przerwami dla pozostałych dawek. Grupie leczonej przez 4 miesiące, uśmierconej w wieku 15 miesięcy, wykonano tylko pierwszych 6 immunizacji.

B. Wyniki

Wpływ leczenia AN1792 na obciążenie amyloidem

Wyniki leczenia AN1792 na obciążenie kory amyloidem oznaczone metodą ilościowej analizy obrazu, przedstawiono na fig. 7. Wartość mediany dla obciążenia amyloidem kory wynosiła 0,28% w grupie nieleczonych 12-miesięcznych myszy PDAPP, która to wartość odpowiadała obciążeniu płytkami u myszy na początku badania. W wieku 18 miesięcy obciążenie amyloidem wzrosło ponad 17-krotnie do 4,87% w myszach leczonych PBS, podczas gdy myszy leczone AN1792 miały znacznie obniżone obciążenie amyloidem wynoszące 0,01%, znacząco mniej niż 12-miesięczne nieleczone myszy i grupy 15- i 18-miesięczne leczone PBS. Obciążenie amyloidem było znacznie obniżone u biorców AN1792 zarówno w 15 (96% zmniejszenia, $p=0,003$) i 18 (>99% zmniejszenia, $p=0,0002$) miesiącu.

Zazwyczaj złogi amyloidowe w korze myszy PDAPP zaczynały się w korze czołowej i pozamodzelowej (RSC), postępowały w kierunku brzuszno-bocznym i obejmowały korę skroniową i węchową (EC). Znalaziono niewiele lub wcale nie znalazło amyloidu w EC myszy 12-miesięcznych, tj. w wieku około którego podano pierwszą dawkę AN1792. Po 4 miesiącach leczenia AN1792 złogi amyloidowe znacznie zmalały w RSC, a postępujący udział EC został całkowicie wyeliminowany przez leczenie AN1792. Ostatnia obserwacja pokazała, że AN1792 całkowicie zatrzymał postępowanie amyloidu, który normalnie zaatakowałby korę skroniową i węchową, a także zatrzymał i ewentualnie cofnął odkłanianie w RSC.

Znaczące działanie leczenia AN1792 na rozwój obciążenia kory amyloidem u myszy PDAPP pokazano dla grupy 18-miesięcznej, którą leczono przez 7 miesięcy. Stwierdzono prawie całkowity brak amyloidu w korze u myszy leczonych AN1792, z całkowitym brakiem rozproszonych płytek, a także zmniejszeniem litych złogów.

2. Zmiany komórkowe i morfologiczne towarzyszące leczeniu AN1792.

Populację komórek $A\beta$ -dodatnich znaleziono w regionach mózgu zazwyczaj zawierających złogi amyloidowe. Znaczące było to, że w kilku mózgach biorców AN1792 znaleziono bardzo niewiele korowych płytek amyloidowych lub nie znalazło ich wcale. Większość immunoreaktywności $A\beta$ okazała się być związana z komórkami o dużym, płatkowym lub pozlepianym ciele. Fenotypowo komórki te przypominały aktywowany mikroglej lub monocyty. Były one immunoreaktywne z przeciwciałami rozpoznającymi ligandy ekspresjonowane przez aktywowane monocyty i mikroglej (MHC II i CD11b), a czasami były związane ze ścianą lub światłem naczyń krwionośnych. Porównanie blisko sąsiadujących fragmentów znakowanych przeciwciałami specyficznymi dla $A\beta$ i MHC II ujawniło, że podobne wzory tych komórek były rozpoznawane przez obydwie klasy przeciwciał. Szczegółowe badanie mózgów myszy leczonych AN1792 ujawniło, że MHC II-dodatnie komórki były ograniczone do sąsiedztwa ograniczonego amyloidu pozostającego u tych zwierząt. W zastosowanych warunkach utrwalania komórki nie były immunoreaktywne z przeciwciałami rozpoznającymi ligandy komórek T (CD3, CD3e) lub B (CD45RA, CD45RB) lub zwykły antygen leukocytowy (CD45), ale były reaktywne z przeciwciałami rozpoznającymi leukosialinę (CD43), która reaguje krzyżowo z monocytami. Nie znalazło takich komórek u żadnej z myszy leczonych PBS.

U myszy PDAPP niezmiennie rozwijały się ciężkie złogi amyloidowe w zewnętrznej warstwie cząsteczkowej hipokampowego zakrętu zębatego. Złogi tworzyły wyraźną smugę w obrębie ścieżki

perforacji, regionu zazwyczaj zawierającego płytki amyloidowe w AD. Charakterystyczne występowanie tych złogów u myszy leczonych PBS przypominało wcześniej scharakteryzowane u nieleczonych myszy PDAPP. Złogi amyloidowe składały się z zarówno rozproszonych, jak i z litych płytek w ciągłym paśmie. Natomiast w wielu mózgach myszy leczonych AN1792 wzór ten był znacznie zmieniony. Złogi amyloidowe w hipokampie nie zawierały rozproszonego amyloidu i wzór pasmowy był częściowo zniszczony. Zamiast tego występowało wiele niezwykle struktur nakrapianych, reagujących z przeciwciałami przeciw-A β , z których kilka okazało się komórkami zawierającymi amyloid.

Komórki MHC II-dodatnie często obserwowano w sąsiedztwie amyloidu zewnątrzkomórkowego u zwierząt leczonych AN1792. Wzór związania komórek A β -dodatnich z amyloidem był bardzo podobny w kilku mózgach myszy leczonych AN1792. Rozmieszczenie tych komórek monocytów było ograniczone do sąsiedztwa złogów amyloidowych i było całkowicie nieobecne w innych regionach mózgu pozbawionych płytek A β .

Ilościowa analiza obrazu fragmentów znakowanych MHC II i MAC I wykazała tendencję w kierunku zwiększonej reaktywności w RSC i hipokampie u myszy leczonych AN1792, w porównaniu z grupą PBS, która osiągnęła wartość znaczącą dla pomiarów reaktywności MAC 1 w hipokampie.

Wyniki te wskazują na aktywne, kierowane przez komórki, usuwanie amyloidu w regionach mózgu, w których występują płytki.

3. Działanie AN1792 na poziomy A β : oznaczenia ELISA.

(a) Poziomy korowe

U nieleczonych myszy PDAPP poziom mediany całkowitego A β w korze w wieku 12 miesięcy wynosiła 1600 ng/g, w wieku 15 miesięcy wzrosła do 8700 ng/g (tabela 2). W wieku 18 miesięcy wartość wynosiła 22000 ng/g, co oznacza, że wzrosła ponad 10-krotnie podczas doświadczenia. Zwierzęta leczone PBS miały 8600 ng/g całkowitego A β w wieku 15 miesięcy, która to wartość wzrosła do 19000 ng/g w 18 miesiącu. W porównaniu z tym, zwierzęta leczone AN1792 miały 81% mniej całkowitego A β w wieku 15 miesięcy (1600 ng/g) niż grupa immunizowana PBS. Znacząco mniej ($p=0,0001$) całkowitego A β (5200 ng/g) znaleziono w 18 miesiącu porównując grupy AN1792 i PBS (tabela 2), co odpowiadało 72% zmniejszeniu ilości A β , który by normalnie występował. Podobne wyniki uzyskano porównując korowe poziomy A β 42, gdyż stwierdzono, że grupa leczona AN1792 zawierała znacznie mniej A β 42, ale w tym wypadku różnice pomiędzy grupami AN1792 i PBS były znaczące zarówno w 15 ($p=0,04$), jak i 18 miesiącu ($p=0,0001$, tabela 2).

Tabela 2
Poziomy mediany A β (ng/g) w korze

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

* $p = 0,0412$

** $p = 0,0001$

(b) Poziomy w hipokampie

U nieleczonych myszy PDAPP poziomy mediany w hipokampie całkowitego A β w wieku 12 miesięcy wynosiły 15000 ng/g, która to wartość wzrosła do 51000 ng/g w wieku 15 miesięcy i dalej wzrastała osiągając 81000 ng/g w wieku 18 miesięcy (tabela 3). Podobnie myszy immunizowane PBS miały 40000 ng/g i 65000 ng/g odpowiednio w wieku 15 i 18 miesięcy. U zwierząt leczonych AN1792 stwierdzono mniejszą całkowitą ilość A β , to znaczy 25000 ng/g i 51000 ng/g odpowiednio w wieku 15 i 18 miesięcy. Wartość dla grupy leczonej AN1792 w wieku 18 miesięcy była znacząco niższa niż dla grupy leczonej PBS ($p=0,0105$; tabela 3). Pomiary A β 42 dały ten sam układ wyników, to znaczy poziomy u grupy leczonej AN1792 były znacząco niższe niż u grupy leczonej PBS (odpowiednio 39000 ng/g wobec 57000 ng/g; $p=0,0022$) w wieku 18 miesięcy (tabela 3).

T a b e l a 3
Poziomy mediany A β (ng/g) w hipokampie

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

*p = 0,0105

**p = 0,0022

(c) Poziomy w mózdzku

U 12 miesięcznych nieleczonych myszy PDAPP mediana poziomu całkowitego A β wynosiła 15 ng/g (tabela 4). W wieku 15 miesięcy mediana ta wzrosła do 28 ng/g, a w wieku 18 miesięcy do 35 ng/g. U zwierząt leczonych PBS wartości mediany całkowitego A β wynosiły 21 ng/g w wieku 15 miesięcy i 43 ng/g w wieku 18 miesięcy. U zwierząt leczonych AN1792 znaleziono 22 ng/g całkowitego A β w wieku 15 miesięcy i znacząco mniej (p=0,002) całkowitego A β w wieku 18 miesięcy (25 ng/g), niż w odpowiadającej im grupie PBS (tabela 4).

T a b e l a 4
Średnie poziomy A β (ng/g) w mózdzku

Wiek (miesiące)	Nieleczone		PBS		AN1792	
	Całkowity A β	(n)	Całkowity A β	(n)	Całkowity 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. Wpływ leczenia AN1792 na poziomy APP

APP- α oraz pełnej długości cząsteczka APP zawierają całość lub część sekwencji A β , a zatem może na nie potencjalnie wpływać wytworzenie odpowiedzi immunologicznej kierowanej przez AN1792. W dotychczasowych badaniach stwierdzono niewielki wzrost poziomów APP wraz ze wzrostem neuropatologii u myszy PDAPP. W korze podczas leczenia poziomy zarówno APP- α /FL (pełnej długości), jak i APP- α pozostały zasadniczo bez zmian, z wyjątkiem tego, że poziom APP- α był zmniejszony o 19% u myszy w wieku 18 miesięcy w grupie leczonej AN1792 wobec grupy leczonej PBS. Wartości APP u 18 miesięcznych zwierząt z grupy AN1792 nie różniły się znacząco od tych wartości dla zwierząt 12- i 15-miesięcznych nieleczonych oraz 15-miesięcznych leczonych PBS. We wszystkich przypadkach wartości APP utrzymywały się w zakresie normalnie występującym u myszy PDAPP.

5. Działanie leczenia AN1792 na patologię neurodegeneracyjną i glejową.

Obciążenie płytkami neurytycznymi było znacząco zmniejszone w korze czołowej u myszy leczonych AN1792 w porównaniu z grupą leczoną PBS zarówno w wieku 15 (84%; p=0,03) jak i 18 miesięcy (55%; p=0,01) (fig. 8). Wartości mediany obciążenia płytkami neurytycznymi wzrosły od 0,32% do 0,49% w grupie PBS pomiędzy 15, a 18 miesiącem życia. W odróżnieniu od tego, rozwój płytek neurytycznych w grupie leczonej AN1792 był znacznie zmniejszony, z wartościami mediany obciążenia płytkami neurytycznymi wynoszącymi 0,05% i 0,22% odpowiednio dla wieku 15 i 18 miesięcy.

Immunizacje AN1792 wydawały się być dobrze tolerowane, reaktywna astrocytoza także zmalała znacząco w RSC u myszy leczonych AN1792 w porównaniu z grupą leczoną PBS zarówno w wieku 15 (56%; p=0,011), jak i 18 miesięcy (39%; p=0,028) (fig. 9). Wartości mediany procentu astrocytozy w grupie PBS wzrosły pomiędzy 15 a 18 miesiącem od 4,26% do 5,21%. Leczenie AN1792 przytłumiło rozwój astrocytozy w obu punktach czasowych odpowiednio do 1,89% i 3,2%. Sugeruje to, że neuropil nie był niszczone przez proces klirensu.

6. Odpowiedzi przeciwciał

Jak opisano powyżej, 11-miesięczne, heterozygotyczne myszy PDAPP (n=24) otrzymały serię 5 immunizacji, 100 µg AN1792 zemulgowanymi z adiuwantem Freund, podawanych dootrzewnowo w tygodniach 0, 2, 4, 8 i 12, a szóstą immunizację wykonano samą PBS (bez adiuwanta Freund) w 16 tygodniu. Jako kontrole negatywne przygotowano zestaw dobranych wiekowo 24 myszy, które immunizowano PBS zemulgowaną z tymi samymi adiuwantami i podawano w takim samym harmonogramie. Od zwierząt pobierano krew 3-7 dni po każdej immunizacji zaczynając od drugiej dawki. Odpowiedzi przeciwciał na AN1792 zmierzono metodą ELISA. Średnie geometryczne mian (GMT) dla zwierząt immunizowanych AN1792 wynosiły około 1900, 7600 i 45000 odpowiednio po drugiej, trzeciej i ostatniej (szóstej) dawce. Po szóstej immunizacji nie stwierdzono specyficznych dla Aβ przeciwciał u zwierząt kontrolnych.

Okolo połowę zwierząt leczono przez kolejne 3 miesiące, immunizując je około 20, 24 i 27 tygodnia. Każdą z dawek podawano w podłożu samą PBS, bez adiuwanta Freund. Średnie miana przeciwciał nie zmieniły się przez ten czas. W rzeczywistości miana przeciwciał pozostały stabilne w okresie od czwartego do ósmego pobrania krwi odpowiadającym okresowi od piątej do dziewiątej iniekcji.

Aby stwierdzić, czy przeciwciała specyficzne dla Aβ, wytworzone przez immunizację, które wykryto w surowicy u myszy leczonych AN1792, także były związane z amyloidem odłożonym w mózgu, zestaw preparatów histologicznych z myszy leczonych AN1792 i PBS poddano działaniu przeciwciał specyficznych dla mysich IgG. W odróżnieniu od grupy PBS, płytki Aβ w mózgach myszy leczonych AN1792 były pokryte endogennymi IgG. Tę różnicę pomiędzy oboma grupami zaobserwowano zarówno dla myszy w wieku 15, jak i 18 miesięcy. Szczególnie rażąco był brak znakowania w grupie PBS, pomimo obecności dużego obciążenia amyloidem u tych myszy. Wyniki te pokazują, że immunizacja syntetycznym białkiem Aβ wytwarza przeciwciała rozpoznające i wiążące się *in vivo* z Aβ w płytkach amyloidowych.

7. Komórkowe odpowiedzi immunologiczne

Z dziewięciu myszy immunizowanych AN1792 i 12 immunizowanych PBS myszy PDAPP w wieku 18 miesięcy pobrano śledziony w 7 dni po dziewiątej immunizacji. Wyizolowano limfocyty śledziony i hodowano je przez 72 godziny w obecności Aβ40, Aβ42 lub Aβ40-1 (białko o odwrotnej sekwencji). Mitogen Con A posłużył jako kontrola pozytywna. Optymalne odpowiedzi uzyskano stosując >1,7 µM białko. Komórki ze wszystkich dziewięciu myszy leczonych AN1792 proliferowały w odpowiedzi na białka Aβ1-40 lub Aβ1-42, z równym poziomem inkorporacji obu białek (fig. 10, górny wykres). Nie stwierdzono odpowiedzi na białko o odwrotnej sekwencji Aβ40-1. Komórki ze zwierząt kontrolnych nie odpowiadały na którekolwiek z białek Aβ (fig. 10, dolny wykres).

C. Wnioski

Wyniki tego badania wykazały, że immunizacja AN1792 myszy PDAPP mających złogi amyloidowe spowalnia postępujące odkładanie amyloidu i zapobiega mu, oraz hamuje występujące w konsekwencji zmiany neuropatologiczne w mózgach starych myszy PDAPP. Immunizacje AN1792 znacząco hamują rozwój amyloidu w strukturach, które normalnie ulegają amyloidozie. Zatem podawanie peptydu Aβ ma pozytywne działanie w leczeniu AD.

VI. Poszukiwanie fragmentów Aβ

100 myszy PDAPP w wieku 9-11 miesięcy immunizowano dziewięcioma różnymi regionami APP i Aβ w celu oznaczenia, które epitopy uczestniczą w odpowiedzi. Dziewięć różnych immunogenów oraz jeden kontrolny podano i.p., jak opisano powyżej. Immunogeny zawierały 4 koniugaty ludzkich peptydów Aβ 1-12, 13-28, 32-42, 1-5, wszystkie połączone przez łącznik cysteinowy z owczymi przeciwciałami przeciwmysiej IgG, polipeptyd APP aminokwasy 592-695, zagregowany ludzki Aβ1-40, zagregowany ludzki Aβ25-35 oraz zagregowany Aβ42 z gryzoni. Zagregowany Aβ42 i PBS zastosowano jako kontrole. Na każdą z grup leczniczych przypadało 10 myszy. Miana monitorowano jak wyżej, a myszy uśmiercano na koniec 4-miesięcznych immunizacji. Po śmierci oznaczono histochemię, poziomy Aβ oraz toksykologię.

A. Materiały i metody

1. Przygotowanie immunogenów

Przygotowanie sprzężonych peptydów Aβ: 4 koniugaty ludzkich peptydów Aβ (aminokwasy 1-5, 1-12, 13-28 i 33-42, każdy połączony z owczymi przeciwciałami przeciwmysiej IgG) przygotowano sprzęgając przez cysteinę sztucznie dodaną do peptydu Aβ przy pomocy środka sieciującego sulfo-EMCS. Pochodne peptydu Aβ zsyntetyzowano z następującymi końcowymi sekwencjami aminokwasowymi. W każdym przypadku umiejscowienie wstawionej cysteiny wskazano przez podkreślenie.

Pochodna peptydu A β 13-28 miała również, jak wskazano, dodane dwie glicyny przed C-kończącą cysteiną.

peptyd A β 1-12 NH₂-DAEFRHDSGYEVC COOH

peptyd A β 1-5 NH₂-DAEFRC COOH

peptyd A β 33-42 NH₂-C-kwas aminoheptanowy-GLMVGGVVIA COOH

peptyd A β 13-28 Ac-NH-HHQLVFFAEDVGSNKGGC-COOH

W celu przygotowania do reakcji sprzęgania 10 mg owczych przeciwciał przeciwmysiej IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories) dializowano przez noc wobec 10 mM buforu boranu sodu, pH 8,5. Następnie oddializowane przeciwciała zagęszczono do objętości 2 ml z użyciem rurki Amicon Centriprep. Dziesięć mg sulfo-EMCS [N(ϵ -maleimidokuproiloksy)-sukcynimidu] (Molecular Sciences Co.) rozpuszczono w 1 ml dejonizowanej wody. Czterdziestokrotny cząsteczkowy nadmiar sulfo-EMCS wkropiono w trakcie mieszania do owczego przeciwciała przeciwmysiej IgG, a następnie roztwór mieszano nadal przez kolejnych 10 minut. Aktywowane owcze przeciwciała przeciwmysiej IgG oczyszczono i wymieniono bufor przez przepuszczanie przez 10 ml kolumnę do filtracji żelowej (Pierce Presto Column, uzyskana z Pierce Chemicals) równoważoną 0,1 M NaPO₄, 5 mM EDTA, pH 6,5. Frakcje zawierające przeciwciała, zidentyfikowane przez pomiar absorbancji przy 280 nm, połączono i rozcieńczono do stężenia około 1 mg/ml, z użyciem 1,4 mg na OD jako współczynnik ekstynkcji. Czterdziestokrotny nadmiar cząsteczkowy peptydu A β rozpuszczono w 20 ml 10 mM NaPO₄, pH 8,0, z wyjątkiem peptydu A β 33-42, którego 10 mg najpierw rozpuszczono w 0,5 ml DMSO, a następnie rozcieńczono do 20 ml 10 mM buforem NaPO₄. Każdy z roztworów peptydów dodano do 10 ml aktywowanych owczych przeciwciał przeciwmysiej IgG i kołysano w temperaturze pokojowej przez 4 godziny. Powstałe koniugaty zagęszczono do końcowej objętości poniżej 10 ml z użyciem rurki Amicon Centriprep, a następnie dializowano wobec buforu PBS, aby wymienić bufor i usunąć wolne peptydy. Koniugaty przepuszczono przez filtry o średnicy porów 0,22 μ w celu wyjałowienia, a następnie podzielono na równe frakcje po 1 mg i przechowywano zamrożone w -20°C. Stężenia koniugatów oznaczono z użyciem białkowego testu BSA (Pierce Chemicals) z końską IgG jako krzywą standardową. Sprzężenie zostało potwierdzone przez wzrost masy cząsteczkowej sprzężonych peptydów w porównaniu z aktywowanymi przeciwciałami przeciwmysiej IgG. Preparat koniugatu A β 1-5 z owczym przeciwciałem przeciwmysiej IgG zawierał połączone koniugaty z dwóch reakcji sprzęgania, reszta stanowiła pojedynczy preparat.

2. Przygotowanie zagregowanych peptydów A β

Peptydy ludzki 1-40 (AN1528; California Peptides Inc., seria ME0541), ludzki 1-42 (AN1792; California Peptides Inc., serie ME0339 i ME0439), ludzki 25-35 i z gryzoni 1-42 (California Peptides Inc., seria ME0218) świeżo solubilizowano do przygotowania każdego z zestawu zastrzyków z liofilizowanych proszków, które przechowywano wysuszone w -20°C. W tym celu 2 mg peptydu dodano do 0,9 ml dejonizowanej wody i mieszaninę zworteksowano aby wytworzyć względnie jednorodny roztwór lub zawiesinę. Z czterech peptydów jedynym rozpuszczalnym na tym etapie był AN1528. Następnie dodano równe objętości po 100 μ l 10x PBS (1x PBS: 0,15 NaCl, 0,01 M fosforan sodu, pH 7,5) i wtedy AN1528 zaczął się wytrącać. Zawiesinę ponownie zworteksowano i inkubowano przez noc w 37°C do zastosowania następnego dnia.

Przygotowanie białka pBx6: Plazmid ekspresyjny kodujący pBx6, białko fuzyjne składające się z 100 aminokwasowej N-końcowej sekwencji liderowej z polimerazy bakteriofaga MS-2 oraz aminokwasów 592-695 z APP (β APP) skonstruowano w sposób opisany w Oltersdorf i inni, *J. Biol. Chem.* 265, 4492-4497 (1990). Plazmid transfekowano do *E. coli* i białko wyeksprymowano po indukcji promotora. Bakterie zlizowano w 8M moczniku i pBx6 częściowo oczyszczono metodą preparatywnej SDS PAGE. Frakcje zawierające pBx6 zidentyfikowano metodą Western blot używając króliczych przeciwciał poliklonalnych przeciw pBx6, zebrano, zagęszczono za pomocą rurki Amicon Centriprep i dializowano wobec PBS. Czystość preparatu, oznaczona przez wybarwienie Coomassie Blue SDS PAGE, wynosiła około 5 do 10%.

B. Wyniki i ich omówienie

1. Projekt badań

Sto samic i samców, w wieku od 9 do 11 miesięcy heterozygotycznych transgenicznych myszy PDAPP uzyskano z Charles River Laboratory i Taconic Laboratory. Myszy podzielono na 10 grup do immunizacji różnymi regionami A β lub APP razem z adiuwantem Freund'a. Zwierzęta podzielono tak by dobrać płeć, wiek, rodziców oraz źródło w obrębie grupy tak blisko jak to było możliwe. Immunogeny obejmowały 4 peptydy A β wyprowadzone z ludzkiej sekwencji, 1-5, 1-12, 13-28 i 33-42, każdy

sprzężony z odczynem przeciwciał przeciw mysiej IgG; 4 zagregowane peptydy A β , ludzki 1-40 (AN1528), ludzki 1-42 (AN1792), ludzki 25-35 i z gryzoni 1-42; oraz fuzyjny polipeptyd nazwany pBx6, zawierający aminokwasy APP 592-695. Dziesiątą grupę immunizowano PBS w połączeniu z adiuwantem jako kontrolą.

Do każdej immunizacji zemulgowano 100 μ g każdego z peptydów A β w 200 μ l PBS lub 200 μ g pBx6 pochodnej APP w tej samej objętości PBS, lub samą PBS w stosunku 1:1 (obj.) z kompletnym adiuwantem Freund (CFA) w końcowej objętości 400 μ l do pierwszej immunizacji, po czym stosowano dawki przypominające z tą samą ilością immunogenu w niekompletnym adiuwancie Freund (IFA) w kolejnych czterech dawkach i PBS do końcowej dawki. Immunizacje stosowano śródtrzewnowo w trybie dwutygodniowym przez 3 pierwsze dawki, a następnie w trybie miesięcznym. Od zwierząt pobierano krew w 4-7 dni po każdej immunizacji, zaczynając od drugiej dawki, do pomiarów miana przeciwciał. Zwierzęta uśmiercono około tydzień po końcowej dawce.

2. Poziomy A β i APP w mózgu

Po 4 miesiącach immunizacji różnymi peptydami A β lub pochodną APP ze zwierząt perfundowanych solą usunięto mózgi. Jedną półkulę wypreparowano do analizy immunohistochemicznej, a drugą użyto do oznaczenia poziomów A β i APP. Aby zmierzyć stężenie różnych postaci peptydu β -amyloidowego i białka prekursorowego amyloidu, półkulę pocięto na części i przygotowano homogenaty regionów hipokampu, kory i mózdzka w 5 M guanidynie. Rozcieńczono je i oznaczono poziom amyloidu lub APP, porównując do serii rozcieńczeń wzorców peptydu A β lub APP o znanych stężeniach, w formacie ELISA.

Średnie stężenie całkowitego A β dla grup kontrolnych immunizowanych PBS była 5,8-róża większa w hipokampie niż w korze (mediana 24318 ng/g tkanki hipokampa w porównaniu do 4221 ng/g kory). Poziomy mediany w mózdzku grupy kontrolnej (23,4 ng/g tkanki) był około 1000-róża niższy niż w hipokampie. Poziomy te były podobne do wcześniej opisanych dla heterozygotycznych transgenicznych myszy PDAPP w tym wieku (Johnson-Woods i inni, 1997, *supra*).

Dla kory, zestawy grup leczniczych miały średnie całkowite poziomy A β i A β 1-42 znacznie różniące się od grupy kontrolnej ($p < 0,05$), zwierzęta otrzymujące peptydy AN1792, gryzoni A β 1-42 lub koniugat A β 1-5 przedstawiono na fig. 11. Poziomy mediany całkowitego A β zmniejszyły się odpowiednio o 75%, 79% i 61% w porównaniu z kontrolą dla tych grup leczniczych. Nie stwierdzono dostrzegalnych współzależności pomiędzy mianami przeciwciał specyficznych dla A β i poziomami A β w regionie korowym mózgu dla jakiegokolwiek z tych grup.

W hipokampie średnie zmniejszenie całkowitej ilości A β towarzyszące leczeniu AN1792 (46%, $p = 0,0543$) nie była tak duża jak obserwowana w korze (75%, $p = 0,0021$). Jednakże stopień zmniejszenia był znacznie wyższy w hipokampie niż w korze, zmniejszenie netto wynosiło 11186 ng/g tkanki w hipokampie wobec 3171 ng/g tkanki w korze. Dla grup zwierząt otrzymujących A β 1-42 z gryzoni lub A β 1-5 średnie całkowite poziomy A β zmniejszyły się odpowiednio o 36% i 26%. Jednakże, biorąc pod uwagę fakt, że grupy były małe oraz ze względu na zmienność poziomów peptydu amyloidowego u poszczególnych zwierząt w grupie, zmiany te nie były znaczące. Przy pomiarach A β 1-42 w hipokampie żadna ze zmian wywołanych leczeniem nie była znacząca. Zatem, ze względu na niższe obciążenie A β kory, zmiany w tym regionie są znacznie czulszym wskaźnikiem skutków leczenia. Zmiany poziomów A β zmierzone metodą ELISA w korze były podobne, ale nie takie same, jak wyniki analizy immunohistochemicznej (patrz poniżej).

Całkowity A β zmierzono także w mózdzku, regionie zazwyczaj niedotkniętym w patologii AD. Żadne ze średnich stężeń A β jakiegokolwiek z grup immunizowanych różnymi peptydami A β lub pochodną APP nie różniło się od wartości dla grupy kontrolnej w tym regionie mózgu. Wynik ten sugeruje, że leczenie nie wpływa na niepatologiczne poziomy A β .

Stężenie APP oznaczono także metodą ELISA w korze i mózdzku z leczonych i kontrolnych zwierząt. Zastosowano dwa różne testy APP. Pierwszy, nazwany APP- α /FL, rozpoznaje zarówno APP- α (α , wydzielaną postać APP, która została wzięta w obrębie sekwencji A β), jak i postaci APP pełnej długości (FL), podczas gdy drugi rozpoznaje tylko APP- α . W odróżnieniu od towarzyszącego leczeniu zmniejszenia A β w zestawie grup leczniczych, poziomy APP pozostały bez zmian u wszystkich zwierząt leczonych w porównaniu z kontrolnymi. Wyniki te wskazują, że immunizacje peptydami A β nie usuwają APP, a skutek leczniczy jest raczej specyficzny dla A β .

W podsumowaniu, całkowite poziomy A β i A β 1-42 były znacząco zmniejszone w korze przez leczenie AN1792, gryzonim A β 1-42 lub koniugatem A β 1-5. W hipokampie całkowity A β był znacznie

zmniejszony tylko przez leczenie AN1792. Żadne inne związane z leczeniem zmiany poziomów A β lub APP w regionach hipokampu, kory lub mózdzku nie były znaczące.

2. Analiza histochemiczna

Mózgi z podzestawu sześciu grup przygotowano do analizy immunohistochemicznej, 3 grupy immunizowane koniugatami peptydu A β - A β 1-5, A β 1-12 i A β 13-28; 3 grupy immunizowane agregatami A β pełnej długości - AN1792 i AN1528 oraz grupę kontrolną leczoną PBS. Wyniki analizy obrazu dla obciążenia amyloidem skrawków histologicznych mózgu z tych grup przedstawiono na fig. 12. Stwierdzono znaczące obniżenie obciążenia amyloidem regionów korowych w 3 grupach leczniczych w stosunku do zwierząt kontrolnych. Największe obniżenie obciążenia amyloidem obserwowano w grupach otrzymujących AN1792, gdzie średnia wartość była zmniejszona o 97% ($p=0,001$). Znaczące obniżenie obserwowano także dla zwierząt leczonych AN1528 (95%, $p=0,005$) i koniugatem peptydu A β 1-5 (67%, $p=0,02$).

Wyniki uzyskane przez pomiar całkowitego A β lub A β 1-42 metodą ELISA oraz obciążenia amyloidem metodą analizy obrazu w pewnym stopniu różnią się. Leczenie AN1528 miało znaczący wpływ na poziom obciążenia amyloidem kory w pomiarach metodą ilościowej analizy obrazu, ale nie miało wpływu na stężenie całkowitego A β zmierzone metodą ELISA w tym samym regionie. Różnica pomiędzy tymi dwoma wynikami prawdopodobnie związana jest ze specyfiką testów. Analiza obrazu mierzy tylko nierozpuszczalne A β zagregowane w płytkach. W odróżnieniu od tego ELISA mierzy wszystkie postaci A β , zarówno rozpuszczalne, jak i nierozpuszczalne, monomeryczne i zagregowane. Ponieważ przypuszcza się, że patologia choroby jest związana z nierozpuszczalną formą A β związaną z płytkami, technika analizy obrazu może mieć większą czułość w ocenie skutków leczenia. Jednakże z uwagi na to, że test ELISA jest szybszym i łatwiejszym testem, jest on bardzo użyteczny do celów poszukiwania nowych leków. Ponadto może to oznaczać, że związane z leczeniem zmniejszenie A β jest większe dla związanego z płytkami niż całkowitego A β .

Aby stwierdzić, czy specyficzne dla A β przeciwciała wytworzone przez immunizację u leczonych zwierząt reagowały z odłożonym w mózgu amyloidem, podzestaw skrawków histologicznych ze zwierząt leczonych i kontrolnych poddano działaniu przeciwciał specyficznych dla mysich IgG. W odróżnieniu od grupy PBS, płytki zawierające A β były pokryte endogenną IgG u zwierząt immunizowanych koniugatami peptydów A β - A β 1-5, A β 1-12 i A β 13-28; oraz agregatami pełnej długości A β - AN1792 i AN1528. Mózgów zwierząt immunizowanych innymi peptydami A β lub peptydem APP pBx6 nie analizowano w tym teście.

3. Pomiar mian przeciwciał

Od myszy pobrano krew w 4-7 dni po każdej immunizacji, poczynając od drugiej immunizacji, łącznie 5 razy. Zmierzono miana przeciwciał jako przeciwciała wiążące A β 1-42 metodą kanapkowego ELISA na wielostudzienkowych płytkach z tworzywa sztucznego, powleczonych A β 1-42. Jak pokazano na fig. 13, szczytowe miana przeciwciał były wytworzone po czwartej dawce dla tych 4 szczepionek, które wywoływały najwyższe miana przeciwciał specyficznych dla AN1792: AN1792 (szczytowa GMT: 94647), AN1528 (szczytowa GMT: 88231), koniugat A β 1-12 (szczytowa GMT 47216) i gryzonie A β 1-42 (szczytowa GMT: 10766). Miana dla tych grup obniżyły się w pewnym stopniu po piątej i szóstej dawce. Dla pozostałych pięciu immunogenów szczytowe miana osiągnięto po piątej i szóstej dawce i były one znacznie mniejsze niż uzyskane dla czterech grup najwyższych mian: koniugat A β 1-5 (szczytowa GMT: 2356), pBx6 (szczytowa GMT: 1986), koniugat A β 13-28 (szczytowa GMT: 1183), koniugat A β 33-42 (szczytowa GMT: 658), A β 25-35 (szczytowa GMT: 125). Miana przeciwciał zmierzono także wobec homologicznych peptydów stosując ten sam format kanapkowego ELISA dla podzestawu immunogenów, grup immunizowanych A β 1-5, A β 13-28, A β 25-35, A β 33-42 i gryzonim A β 1-42. Miana te były w przybliżeniu takie same, jak zmierzone względem A β 1-42, z wyjątkiem immunogenu gryzoniowego A β 1-42, dla którego miana przeciwciał względem homologicznego immunogenu były około 2-krotnie wyższe. Wielkość miana przeciwciał specyficznych względem AN1792 u poszczególnych zwierząt lub średnia wartość dla grup leczniczych nie miała związku ze skutecznością zmierzoną jako zmniejszenie A β w korze.

4. Odpowiedzi limfoproliferacyjne

Zależną od A β limfoproliferację zmierzono stosując komórki śledziony zebrane około tydzień po końcowej, szóstej, immunizacji. Świeżo zebrane komórki, 10^5 na studzienkę, hodowano przez 5 dni w obecności A β 1-40 w stężeniu 5 μ M w celu stymulacji. Komórki z podzestawu siedmiu spośród dziesięciu grup także hodowano w obecności peptydu o odwrotnej sekwencji A β 40-1. Jako pozytywną

kontrolę hodowano dodatkowe komórki z mitogenem komórek T, PHA, a jako negatywną kontrolę komórki hodowano bez dodanego peptydu.

Limfocyty z większości zwierząt proliferowały w odpowiedzi na PHA. Nie stwierdzono znaczących odpowiedzi na peptyd o odwrotnej sekwencji A β 40-1. Komórki ze zwierząt immunizowanych większymi zagregowanymi peptydami A β , AN1792, gryzonim A β 1-42 i AN1528 silnie proliferowały po stymulacji A β 1-40 z najwyższymi cmp u biorców AN1792. U jednego ze zwierząt w każdej z grup immunizowanych koniugatami A β 1-12, A β 13-28 i A β 25-35 komórki proliferowały w odpowiedzi na A β 1-40. W pozostałych grupach otrzymujących koniugaty A β 1-5, A β 33-42 oraz pBx6 lub PBS nie było zwierząt z odpowiedzią stymulowaną A β . Wyniki te zestawiono w tabeli 5 poniżej.

T a b e l a 5

Immunogen	Koniugat	Aminokwasy A β	Zwierzęta odpowiadające
A β 1-5	tak	5-mer	0/7
A β 1-12	tak	12-mer	1/8
A β 13-28	tak	16-mer	1/9
A β 25-35		11-mer	1/9
A β 33-42	tak	10-mer	0/10
A β 1-40		40-mer	5/8
A β 1-42		42-mer	9/9
gryzoni A β 1-42		42-mer	8/8
pBx6			0/9
PBS		0-mer	0/8

Wyniki te wskazują, że AN1792 i AN1528 najsilniej stymulują odpowiedzi komórek T, najprawdopodobniej o fenotypie CD4⁺. Brak specyficznej względem A β odpowiedzi komórek T u zwierząt immunizowanych A β 1-5 nie jest zaskakująca, gdyż epitopy peptydowe rozpoznawane przez komórki T CD4⁺ mają zazwyczaj długość 15 aminokwasów, jakkolwiek krótsze peptydy mogą czasem działać z mniejszą skutecznością. Zatem większość epitopów komórek T pomocniczych dla czterech koniugatów peptydów znajduje się w części IgG koniugatu, a nie w regionie A β . Hipotezę tę potwierdza bardzo niska częstość odpowiedzi proliferacyjnych dla zwierząt z każdej z tych grup leczniczych. Z uwagi na to, że koniugat A β 1-5 był skuteczny w znaczącym obniżaniu poziomu A β w mózgu, przy widocznym braku komórek T specyficznych dla A β , kluczową efektorową odpowiedzią immunologiczną wywołaną przez immunizację tym peptydem okazuje się być przeciwciało.

Brak komórek T oraz niska odpowiedź przeciwciał dla białka fuzyjnego pBx6, zawierającego aminokwasy APP 592-695 włącznie ze wszystkimi aminokwasami A β , może być spowodowana słabą immunogennością konkretnego preparatu. Słaba immunogenność agregatu A β 25-35 jest prawdopodobnie spowodowana tym, że peptyd jest za mały, aby było prawdopodobne, że zawiera dobry epitop dla komórek T, aby wspomóc indukcję odpowiedzi przeciwciał. Jeżeli peptyd ten byłby sprzężony z białkiem nośnikowym prawdopodobnie byłby bardziej immunogeny.

V. Przygotowanie przeciwciał poliklonalnych do biernej ochrony

20 nietransgenicznym myszy immunizowanych A β lub innym immunogenem, dodatkowo z adiuwantem, uśmiercono w wieku 4-5 miesięcy. Zebrano krew immunizowanych myszy. Ewentualnie IgG wydzielono z innych składników krwi. Przeciwciała specyficzne dla immunogenu częściowo oczyszczono metodą chromatografii powinowactwa. Otrzymano średnio 0,5-1 mg przeciwciał specyficznych dla immunogenu na mysz, co dało łącznie 5-10 mg.

VI. Bierna immunizacja przeciwciałami na A β

Grupom 7-9 -miesięcznych myszy PDAPP podano 0,5 mg w PBS przeciwciał poliklonalnych przeciw-A β lub specyficznych monoklonalnych przeciw-A β , co pokazano poniżej. Przeciwciała monoklonalne można przygotować przeciw fragmentowi przez wstrzyknięcie myszy fragmentu lub dłuższej formy A β , przygotowanie hybrydom i przeszukiwanie hybrydom pod względem przeciwciała specyficznie wiążącego wymagany fragment A β nie wiążąc przy tym innych niezachodzących fragmentów A β .

Tabela 6

Przeciwciało	Epitop
2H3	A β 1-12
10D5	A β 1-12
266	A β 13-28
21F12	A β 33-42
Mysie poliklonalne przeciwludzkie A β 42	przeciw zagregowanemu A β 42

Zwierzętom podawano przez 4 miesiące śródtrzewnowo preparaty, gdy było to potrzebne, aby utrzymać przeciwciała w krążeniu w stężeniach, mierzonych jako miana ELISA, większych niż 1/1000, oznaczanych w ELISA wobec A β 42 lub innego immunogenu. Miana monitorowano jak wyżej i myszy uśmiercono na koniec 4-miesięcznych wstrzykiwań. Po śmierci wykonano histochemię, oznaczanie poziomów A β i toksykologię. W każdej z grup użyto po 10 myszy.

VII. Porównanie różnych adiuwantów

Przykłady te porównują CFA, ałun, emulsję olej w wodzie i MPL pod względem ich zdolności stymulowania odpowiedzi immunologicznej.

A. Materiały i metody

1. Projekt badań

Sto samic sześciotygodniowych świnek morskich rasy Hartley, otrzymanych z Elm Hill, podzielono na 10 grup do immunizacji AN1792 lub jego palmitoilowaną pochodną, połączonymi z różnymi adiuwantami. Siedem grup immunizowano przez iniekcję AN1792 (33 μ g, z wyjątkiem gdy zaznaczono inaczej) połączonym z a) PBS, b) adiuwantem Freund, c) MPL, d) skwalemem, e) MPL/skwalem, f) niską dawką z ałunem lub g) wysoką dawką z ałunem (300 μ g AN1792). Dwie grupy immunizowano przez iniekcję palmitoilowaną pochodną AN1792 (33 μ g) połączoną z a) PBS lub b) skwalem. Na koniec, dziesiąta grupa otrzymywała samą PBS, bez antygenu i dodatkowego adiuwantu. Dla grupy otrzymującej adiuwant Freund pierwszą dawkę zemułgowano z CFA, a pozostałe 4 dawki z IFA. Antygen podawano w dawce 33 μ g dla wszystkich 11 grup, z wyjątkiem grupy wysokiej dawki z ałunem, która otrzymywała 300 μ g AN1792. Immunizacje wykonywano śródtrzewnowo dla CFA/IFA i domięśniowo do mięśnia czterogłowego tylnej łapy, na zmianę po prawej i lewej stronie dla wszystkich innych grup. Pierwsze trzy dawki podawano w trybie dwutygodniowym, a następnie podano dwie dawki z miesięczną przerwą. Krew pobierano 6-7 dni po każdej immunizacji, zaczynając od drugiej dawki, w celu pomiaru miana przeciwciał.

2. Przygotowanie immunogenów

Dwa mg A β 42 (California Peptide, seria ME0339) dodano do 0,9 ml dejonizowanej wody i mieszaninę zworteksowano, aby utworzyć względnie jednorodną zawiesinę. Dodano 100 μ l 10x PBS (1x PBS, 0,15 M NaCl, 0,01 M fosforan sodu, pH 7,5). Zawiesinę ponownie zworteksowano i inkubowano przez noc w 37°C do zastosowania następnego dnia. Niezużyte A β 1-42 przechowywano w osuszaczem jako liofilizowany proszek w -20°C.

Palmitoilowaną pochodną AN1792 otrzymano przez sprzęganie bezwodnika palmitynowego, zawieszonego w dimetyloformamidzie, z N-końcowym aminokwasem AN1792, przed usunięciem powstającego peptydu z żywicy przez podziałanie kwasem fluorowodorowym.

Aby przygotować dawki szczepionek z kompletnym adiuwantem Freund (CFA) (grupa 2) zemułgowano 33 μ g AN1792 w 200 μ l PBS w stosunku 1:1 (obj.) z CFA w końcowej objętości 400 μ l do pierwszej immunizacji. Do kolejnych immunizacji antygen podobnie zemułgowano z niekompletnym adiuwantem Freund (IFA).

Aby przygotować dawki szczepionek z MPL dla grup 5 i 8 liofilizowany proszek (Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MT) dodano do 0,2% wodnego roztworu trietyloaminy, do końcowego stężenia 1 mg/ml i całość zworteksowano. Mieszaninę podgrzano do 65 do 70°C przez 30 sekund aby wytworzyć lekko nieprzezroczystą jednorodną zawiesinę miceli. Roztwór świeżo przygotowywano do każdego zestawu zastrzyków. Do każdego zastrzyku w grupie 5, zmieszano 33 μ g AN1792 w 16,5 μ l PBS, 50 μ g MPL (50 μ l) i 162 μ l PBS w próbce borokrzemianowej bezpośrednio przed użyciem.

Aby przygotować dawki szczepionek z małą ilością emulsji olej w wodzie, AN1792 w PBS dodano do 5% skwalenu, 0,5% Tween 80, 0,5% Span 85 w PBS, do końcowego stężenia w pojedyn-

czej dawce 33 μg AN1792 w 250 μl (grupa 6). Mieszaninę zemułgowano przepuszczając przez dwukomorowe ręczne urządzenie 15 do 20 razy do momentu otrzymania kropelek emulsji o średnicy zbliżonej do standardowej perełki lateksowej o średnicy 1 μm , przy analizie mikroskopowej. otrzymana zawiesina była opalizująca, mlecznobiała. Emulsje świeżo przygotowywano dla każdej z serii iniekcji. Dla grupy 8 dodano MPL w 0,2% trietyloaminie w stężeniu 50 μg na dawkę do mieszaniny skwalenu w detergencie w celu zemułgowania jak opisano powyżej. Dla pochodnej palmitoilowych (grupa 7), 33 μg na dawkę palmitoil-NH-A β 1-42 dodano do skwalenu i zworteksowano. Następnie dodano Tween 80 i Span 85 i zworteksowano. Mieszaninę tę dodano do PBS, aby osiągnąć końcowe stężenia 5% skwalenu, 0,5% Tween 80, 0,5% Span 85 i mieszaninę zemułgowano jak powyżej.

Aby przygotować dawki szczepionek z ałunem (grupy 9 i 10), AN1792 w PBS dodano do Alhydrogel (żel wodorotlenku glinu, Accurate, Wetsbury, NY) do osiągnięcia stężenia 33 μg (niska dawka, grupa 9) lub 300 μg (wysoka dawka, grupa 10) AN1792 na 5 mg ałunu, w końcowej objętości dawki 250 μl . Zawiesinę delikatnie mieszano przez 4 godziny w temperaturze pokojowej.

3. Pomiar mian przeciwciał

Od świń morskich pobierano krew 6-7 dni po immunizacji, zaczynając po drugiej immunizacji, wykonując to 4 razy. Miana przeciwciał przeciw A β 42 zmierzono metodą ELISA, jak opisano w ogólnych materiałach i metodach.

4. Preparaty tkanek

Po około 14 tygodniach wszystkim świnkom morskim podano CO₂. Zebrano płyn mózgowo-rdzeniowy i usunięto mózgi, po czym wypreparowano 3 regiony mózgowe (hipokamp, korę i mózdzek), które użyto do pomiarów stężenia całkowitego A β metodą ELISA.

B. Wyniki

1. Odpowiedzi przeciwciał

Zaobserwowano szeroki zakres skuteczności różnych adiuwantów mierzonej w testach odpowiedzi przeciwciał na AN1792 po immunizacji. Jak pokazano na fig. 14, gdy AN1792 podawano w PBS, nie wykryto przeciwciał po dwóch lub trzech immunizacjach, a niewielkie odpowiedzi wykryto po czwartej i piątej dawce ze średnią geometryczną mian (GMT) zaledwie około 45. Emulsja olej w wodzie wytworzyła umiarkowane miana po trzeciej dawce (GMT 255), które utrzymywały się po czwartej dawce (GMT 301) i spadły po końcowej dawce (GMT 54). Wystąpiła wyraźna odpowiedź antygenowa na dawkę dla AN1792 związanego z ałunem, przy czym 300 μg było bardziej immunogenne we wszystkich punktach czasowych niż 33 μg . W szczytowej odpowiedzi przeciwciał, po czwartej immunizacji, różnica pomiędzy dwoma dawkami wynosiła 43% z GMT około 1940 (33 μg) i 3400 (300 μg). Odpowiedź przeciwciał na 33 μg AN1792 plus MPL była bardzo podobna do wytworzonej przez prawie 10-krotnie większą dawkę antygeny (300 μg) związanego z ałunem. Dodatek MPL do emulsji olej w wodzie zmniejszył siłę szczepionki w stosunku do szczepionki z MPL, jako jedynym adiuwantem, aż o 75%. Palmitoilowana pochodna AN1792 była całkowicie nieimmunogenna przy podawaniu w PBS i dała średnie miana przy podawaniu w emulsji olej w wodzie z GMT, 340 i 105 dla trzeciego i czwartego pobrania krwi. Najwyższe miana przeciwciał wytworzył adiuwant Freund z szczytem GMT około 87000, która to wartość była prawie 30-krotnie wyższa niż GMT kolejnych najsilniejszych szczepionek, MPL i wysokiej dawki AN1792/ałun.

Najbardziej obiecującymi adiuwantami zidentyfikowanymi w tym badaniu są MPL i ałun. Z tych dwóch MPL wydaje się być korzystny, gdyż 10-krotnie niższa dawka antygeny była niezbędna do wytworzenia tej samej odpowiedzi przeciwciał, co uzyskana dla ałunu. Odpowiedź można wzmocnić przez zwiększenie dawki antygeny i/lub adiuwanta, oraz optymalizację trybu immunizacji. Emulsja olej w wodzie była bardzo słabym adiuwantem dla AN1792, tak że dodanie emulsji olej w wodzie do adiuwanta MPL zmniejszyło wewnętrzną aktywność samego adiuwanta MPL.

2. Poziomy A β w mózgu

W wieku około 14 tygodni świnki morskie głęboko uśpiono, pobrano płyn mózgowo-rdzeniowy (CSF) i usunięto zwierzętom mózgi w podestawie grup immunizowanych adiuwantem Freund (grupa 2), MPL (grupa 5), ałunem z wysoką dawką, 300 μg AN1792 (grupa 10) i z immunizowanej PBS grupy kontrolnej (grupa 3). Aby zmierzyć poziom peptydu A β , jedną półkulę wypreparowano i przygotowano homogenaty regionów hipokampa, kory i mózdzku w 5 M guanidynie. Następnie rozcieńczono je i oznaczono przez porównanie z serią rozcieńczeń standardowego białka A β o znanych stężeniach, w formie ELISA. Poziomy A β w hipokampie, korze i mózdzku były bardzo podobne dla wszystkich grup, pomimo szerokiego zakresu odpowiedzi przeciwciał na A β wywołanej przez te szczepionki.

Zmierzono średnie poziomy A β w tkance, wynoszące około 25 ng/g w hipokampie, 21 ng/g w korze i 12 ng/g w mózdzku. Zatem obecność w krążeniu wysokiego miana przeciwciał przeciw A β przez prawie 3 miesiące u niektórych z tych zwierząt nie zmieniła całkowitych poziomów A β w ich mózgach. Poziomy A β w CFS także były podobne pomiędzy grupami. Brak wyraźnych skutków immunizacji AN1792 na endogenny A β wskazuje, że odpowiedź immunologiczna jest skupiona na patologicznych formach A β .

VIII. Odpowiedź immunologiczna na różne adiuwanty u myszy

Sześciotygodniowe samice myszy Swiss Webster zastosowano do tych badań z 10-13 zwierzętami na grupę. Immunizacje wykonywano śródtrzewnowo w dniach 0, 14, 28, 60, 90 i 20, w dawkach o objętości 200 μ l. Do wszystkich stymulacji jako bufor zastosowano PBS. Od zwierząt pobrano krew w 7 dni po każdej immunizacji, zaczynając po drugiej dawce, do analizy mian przeciwciał w teście ELISA. Tryb leczenia każdej z grup podano w tabeli 7.

T a b e l a 7
Projekt doświadczenia badania Betabloc 010

Grupa	N ^a	Adiuwant ^b	Dawka	Antygen	Dawka (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	AN1528	33
7	10	PBS		AN1792	33
8	10	PBS		-	
9	10	zemulgowany skwalen	5%	AN1792	33
10	10	domieszany skwalen	5%	AN1792	33
11	10	ałun	2 mg	AN1792	33
12	13	MPL+ałun	50 μ g/2 mg	AN1792	33
13	10	QS21	5 μ g	AN1792	33
14	10	QS21	10 μ g	AN1792	33
15	10	QS21	25 μ g	AN1792	33
16	13	QS21	25 μ g	AN1792	150
17	13	QS21	25 μ g	AN1528	33
18	13	QS21+MPL	25 μ g/ 50 μ g	AN1792	33
19	13	QS21+ałun	25 μ g/ 2 mg	AN1792	33

Odnosniki:

^a Liczba myszy w każdej grupie na początku doświadczenia

^b Wskazano adiuwanty. Jako bufor do wszystkich preparatów zastosowano PBS. Grupie 8 nie podano antygenu ani adiuwantu.

Miana ELISA przeciwciał przeciw A β 42 dla każdej grupy przedstawiono w tabeli 8 poniżej.

T a b e l a 8
Geometryczne średnie mian przeciwciał

Tydzień pobierania krwi					
Grupa lecznicza	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

Tabela wykazuje, że najwyższe miana uzyskano dla grup 4, 5 i 18, w których adiuwantami było 125 μ g MPL, 50 μ g MPL oraz QS21 plus MPL.

IX. Lecznicza skuteczność różnych adiuwantów

Badania nad skutecznością leczniczą prowadzono na transgenicznym mysz PDAPP, z zestawem adiuwantów odpowiednich do stosowania u ludzi, aby oznaczyć ich zdolność do wzmocnienia odpowiedzi immunologicznej przeciw A β i wywołać kierowane immunologicznie oczyszczanie złogów amyloidowych z mózgu.

Sto osiemdziesiąt samców i samic, w wieku 7,5 do 8,5 miesięcy, heterozygotycznych transgenicznych myszy PDAPP otrzymano z Charles River Laboratories. Myszy podzielono na 9 grup zawierających po 15 do 23 zwierzęta w grupie, do immunizacji AN1792 i AN1528 w połączeniu z różnymi adiuwantami. Zwierzęta podzielono tak, by dobrać płeć, wiek oraz rodziców zwierząt w obrębie grupy tak blisko jak to tylko było możliwe. Jako adiuwanty zastosowano a α n, MPL i QS21, każdy w połączeniu z dwoma antygenami, oraz adiuwant Freund (FA) połączony tylko z AN1792. Dodatkową grupę immunizowano AN1792 w buforze PBS ze środkiem konserwującym tymerozalem bez adiuwantu. Dziewiątą grupę, jako negatywną kontrolę, immunizowano samą PBS.

Przygotowanie zagregowanych peptydów: peptydy ludzki A β 1-40 (AN1528; California Peptides Inc., Napa, CA; seria ME0541), ludzki A β 1-42 (AN1792; California Peptides Inc., seria ME0439), świeżo solubilizowano do przygotowania każdego z zestawu zastrzyków z liofilizowanych proszków, które przechowywano wysuszone w -20°C. W tym celu 2 mg peptydu dodano do 0,9 ml dejonizowanej wody i mieszaninę zworteksowano, aby wytworzyć względnie jednorodny roztwór lub zawiesinę. AN1528 był rozpuszczalny na tym etapie, w odróżnieniu od AN1792. Następnie dodano równe objętości po 100 μ l

10x PBS (1x PBS: 0,15 NaCl, 0,01 M fosforan sodu, pH 7,5) i wtedy AN1528 zaczął się wytrącać. Zawiesinę ponownie zworteksowano i inkubowano przez noc w 37°C do zastosowania następnego dnia.

Aby przygotować dawki szczepionek z ałunem (grupy 1 i 5), peptyd A β w PBS dodano do Alhydrogelu (2% wodny żel wodorotlenku glinu, Sargeant, Inc., Clifton, NJ), do osiągnięcia stężenia 100 μ g peptydu A β na 1 mg ałunu. Dodano 10x PBS do końcowej objętości dawki wynoszącej 200 μ l w 1x PBS. Zawiesinę delikatnie mieszano przez około 4 godziny w temperaturze pokojowej przed wstrzykiwaniem.

Aby przygotować dawki szczepionek z MPL (grupy 2 i 6) liofilizowany proszek (Ribi Immuno-Chem Research, Inc., Hamilton, MT; seria 67039-E0896B) dodano do 0,2% wodnego roztworu trietyloaminy, do końcowego stężenia 1 mg/ml i zworteksowano. Mieszaninę podgrzano do 65 do 70°C przez 30 s, aby otrzymać lekko nieprzezroczystą jednorodną zawiesinę miceli. Roztwór przechowywano w 4°C. Do każdego zestawu iniekcji zmieszano 100 μ g peptydu na dawkę w 50 μ l PBS, 50 μ g MPL na dawkę (50 μ l) i 100 μ l PBS na dawkę, w probówce borokrzemianowej, bezpośrednio przed użyciem.

Aby przygotować dawki szczepionek z QS21 (grupy 3 i 7) liofilizowany proszek (Aquila, Framingham, MA; seria A7018R) dodano do PBS, pH 6,6-6,7 do końcowego stężenia 1 mg/ml i zworteksowano. Roztwór przechowywano w -20°C. Do każdego zestawu zastrzyków zmieszano 100 μ g peptydu na dawkę w 50 μ l PBS, 25 μ g QS21 na dawkę w 25 μ l PBS i 125 μ l PBS na dawkę w probówce borokrzemianowej bezpośrednio przed użyciem.

Aby przygotować dawki szczepionek z adiuwantem Freund'a (grupa 4) zemułgowano 100 μ g AN1792 w 200 μ l PBS w stosunku 1:1 (obj.) z kompletnym adiuwantem Freund'a (CFA) w końcowej objętości 400 μ l do pierwszej immunizacji. Do kolejnych immunizacji antygen podobnie zemułgowano z niekompletnym adiuwantem Freund'a (IFA). Do szczepionek zawierających adiuwanty ałun, MPL lub QS21, połączono 100 μ g na dawkę AN1792 lub AN1528 z ałunem (1 mg na dawkę) lub MPL (50 μ g na dawkę) lub QS21 (25 μ g na dawkę), w końcowej objętości 200 μ l PBS i podawano szczepiąc podskórnie na boku pomiędzy łopatkami. Dla grupy otrzymującej FA 100 μ g AN1792 zemułgowano w stosunku 1:1 (obj.) z kompletnym adiuwantem Freund'a (CFA) w końcowej objętości 400 μ l i podawano śródtrzewnowo przy pierwszej immunizacji, a następnie podawano dawki przypominające tej samej ilości immunogenu w niekompletnym adiuwancie Freund'a (IFA) przez kolejnych pięć dawek. Dla grupy otrzymującej AN1792 bez adiuwanta 10 μ g AN1792 połączono z 5 μ g tymerozalu w końcowej objętości 50 μ l PBS i podawano podskórnie. Dziewiąta grupa kontrolna otrzymywała tylko 200 μ l PBS w zastrzykach podskórnych. Immunizacje wykonywano w trybie dwutygodniowym przez 3 pierwsze dawki, a następnie w trybie miesięcznym, a zatem w dniach 0, 16, 28, 56, 85 i 112. Od zwierząt pobierano krew w 6-7 dni po każdej immunizacji, zaczynając od drugiej dawki, do pomiarów miana przeciwciał. Zwierzęta uśmiercono około tygodnia po końcowej dawce. Wyniki oznaczono w teście ELISA mierząc poziomy A β i APP w mózgu i na podstawie immunohistochemicznej oceny obecności płytek amyloidowych w skrawkach histologicznych mózgu. Ponadto oznaczono miana specyficznych przeciwciał przeciw A β oraz zależne od A β odpowiedzi, proliferacyjną i cytokin.

Z tabeli 9 wynika, że najwyższe miana przeciwciał przeciw A β 1-42 wytworzył FA z AN1792, miana, które osiągnęły szczyt po czwartej immunizacji (szczytowa GMT: 75386), a następnie spadły o 59% po końcowej, szóstej immunizacji. Szczytowe miano przeciwciał wytworzone przez MPL z AN1792 było o 62% niższe niż wytworzone przez FA (szczytowa GMT: 28867) i także zostało osiągnięte wcześniej podczas immunizacji, po trzech dawkach, a następnie spadło do 28% szczytowej wartości po szóstej immunizacji. Szczytowe miano przeciwciał wytworzone przez QS21 połączony z AN1792 (GMT: 1511) było około 5-krotnie niższe niż uzyskane dla MPL. Ponadto kinetyka odpowiedzi była wolniejsza, gdyż dodatkowa immunizacja była konieczna do uzyskania szczytowej odpowiedzi. Miana wytworzone przez ałun związany z AN1792 były niewiele wyższe niż uzyskane dla QS21, a kinetyka odpowiedzi była szybsza. Dla AN1792 podawanego w PBS z tymerozałem częstość i wielkość mian była niewiele wyższa niż uzyskana dla samej PBS. Szczytowe miana wytworzone przez MPL i AN1528 (szczytowa GMT 3099) były około 9-krotnie niższe niż dla AN1792. AN1528 związany z ałunem był w niewielkim stopniu immunogenny, z niskimi mianami wytworzonymi tylko u paru zwierząt. Nie obserwowano odpowiedzi przeciwciał u zwierząt kontrolnych immunizowanych samą PBS.

T a b e l a 9
Średnie geometryczne mian przeciwciał^a

Tydzień pobierania krwi					
Leczenie	3,3	5,0	9,0	13,0	17,0
Ałun/AN1792	102 (12/21) ^b	1081 (17/20)	2366 (21/21)	1083 (19/21)	572 (18/21)
MPL/AN1792	6241 (21/21)	28867 (21/21)	11242 (21/21)	5665 (20/20)	8204 (20/20)
QS21/AN1792	30 (1/20)	227 (10/19)	327 (10/19)	1511 (17/18)	1188 (14/18)
CFA/AN1792	10076 (15/15)	61279 (15/15)	75386 (15/15)	41628 (15/15)	30574 (15/15)
Ałun/AN1528	25 (0/21)	33 (1/21)	39 (3/20)	37 (1/20)	31 (2/20)
MPL/AN1528	184 (15/21)	2591 (20/21)	1653 (21/21)	1156 (20/20)	3099 (20/20)
QS21/AN1528	29 (1/22)	221 (13/22)	51 (4/22)	820 (20/22)	2994 (21/22)
PBS+tymerozal	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)

Odnosiłki:

^a Średnie geometryczne mian przeciwciał zmierzonych względem A β 1-42.

^b Liczba odpowiadających na grupę.

Wyniki leczenia AN1792 lub AN1592 z różnymi adiuwantami lub tymerozalem na obciążenie ko-
ry amyloidem u 12-miesięcznych myszy oznaczone metodą ELISA przedstawiono na fig. 15. U PBS
kontrolnych myszy PDAPP średni poziom całkowitego A β w korze w wieku 12 miesięcy wynosił
1817 ng/g. Znacznie obniżone poziomy A β obserwowano u myszy leczonych AN1792 plus CFA/IFA,
AN1792 plus ałun, AN1792 plus MPL oraz QS21 plus AN1792. Obniżenie osiągnęło znaczącą staty-
stycznie wartość ($p < 0,05$) tylko dla AN1792 plus CFA/IFA. Jednakże, jak pokazano w przykładach I
i III, działanie immunizacji na obniżenie poziomów A β było znacząco większe u 15 i 18-miesięcznych
myszy. Zatem oczekuje się, że przynajmniej leczenie preparatami AN1792 plus ałun, AN1792 plus
MPL i AN1792 plus QS21 osiągnie znaczenie statystyczne u starszych myszy. W porównaniu z tym,
AN1792 plus środek konserwujący tymerozal wytwarzał średni poziom A β prawie taką samą jak
u myszy leczonych PBS. Podobne wyniki uzyskano porównując korowe poziomy A β 42. Średni poziom
A β 42 w kontrolach PBS wynosił 1624 ng/g. Wyraźne obniżenie średnich poziomów o wartościach 403,
1149, 620 i 714 obserwowano u myszy leczonych odpowiednio preparatami AN1792 plus CFA/IFA,
AN1792 plus ałun, AN1792 plus MPL i AN1792 plus QS21, ze zmniejszeniem osiągającym znaczenie
statystyczne ($p = 0,05$) dla grupy leczonej AN1792 plus CFA/IFA. Wartość średnia w grupie leczonej
AN1792 z tymerozalem wynosiła 1619 ng/g A β 42.

X. Analiza toksyczności

Po zakończeniu badań opisanych w przykładach 2, 3 i 7 zebrano tkanki do oceny histopatolo-
gicznej. Ponadto w końcowych próbkach krwi z przykładów 3 i 7 wykonano analizy hematologiczne
i chemiczne. Oceniono większość głównych organów, włącznie z mózgiem, płucami, tkanką limfatycz-
ną, przewodem żołądkowo-jelitowym, wątrobą, nerkami, nadnerczami i gruczołami płciowymi. Pomi-
mo, że zaobserwowano sporadyczne uszkodzenia u badanych zwierząt, nie stwierdzono żadnych
oczywistych różnic, ani w zaatakowanych tkankach, ani w ostrości uszkodzeń pomiędzy zwierzętami
leczonymi AN1792 a nieleczonymi. Nie stwierdzono unikatowych uszkodzeń histopatologicznych
u myszy immunizowanych AN1782 w porównaniu z myszami leczonymi PBS lub nieleczonymi. Nie
stwierdzono także różnic w profilu analiz chemicznych pomiędzy grupami leczonymi adiuwantem

a zwierzętami leczonymi PBS w przykładzie 7. Jakkolwiek zaobserwowano znaczne wzrosty kilku parametrów hematologicznych pomiędzy zwierzętami leczonymi AN1792 z adiuwantem Freund'a w przykładzie 7 w porównaniu do zwierząt leczonych PBS, ale ten typ działania był oczekiwany z leczenia adiuwantem Freund'a i towarzyszącego mu zapalenia otrzewnej i nie wskazuje na jakiejkolwiek niekorzystne działanie leczenia AN1792. Szczegółowe badania patologii mózgów myszy PDAPP wykonano nie jako część oceny toksykologicznej, ale jako część punktów końcowych badania skuteczności. W żadnym z tych badań nie stwierdzono jakichkolwiek oznak niekorzystnego działania na morfologię mózgu. Wyniki te wskazują, że leczenie AN1792 jest dobrze tolerowane i przynajmniej w znacznym stopniu pozbawione skutków ubocznych.

XI. Profilaktyka i leczenie pacjentów

Przeprowadzono I fazę prób z pojedynczą dawką, aby oznaczyć bezpieczeństwo. Środek leczniczy podawano w wzrastających dawkach różnym pacjentom zaczynając od dawki około 0,01, poziomu o przypuszczalnej skuteczności, i zwiększano ją 3-krotnie do czasu gdy poziom osiągnął 10-krotność skutecznej mysiej dawki.

Badania fazy II prób przeprowadzono, by oznaczyć skuteczność leczniczą. Wybrano pacjentów we wczesnej do średniej fazy choroby Alzheimera, z użyciem kryterium Alzheimer's disease and Related Disorders Association (ADRD) na prawdopodobieństwo AD. Odpowiedni pacjenci lokowali się w zakresie 12-26 w badaniach Mini-Mental State Exam (MMSE). Innymi kryteriami wyboru było to, że pacjenci są w stanie przeżyć czas trwania testu oraz brak komplikujących danych, takich jak równoczesne stosowanie leków, które mogą wpływać na leczenie. Podstawową ocenę funkcjonowania pacjentów wykonano z użyciem klasycznych pomiarów psychometrycznych, takich jak MMSE i ADAS, które stanowią ogólną skalę oceny stanu i działania pacjentów z chorobą Alzheimera. Te skale psychometryczne dostarczają miary postępu stanu choroby Alzheimera. Do monitorowania leczenia można także zastosować odpowiednie skale jakości życia. Postęp choroby można także monitorować metodą MRI. Można także monitorować profile krwi pacjentów, włącznie z testami dla specyficznych dla antygenu odpowiedzi przeciwciał i komórek T.

Po podstawowych pomiarach pacjentów zaczęto poddawać leczeniu. Losowo podzielono ich i leczono środkiem leczniczym lub placebo. Pacjentów monitorowano co najmniej 6 miesięcy. Skuteczność oznaczono jako znaczne zmniejszenie postępu w grupie leczonej względem grupy placebo.

Drugą fazę II próby przeprowadzono w celu oceny przejścia pacjentów z nie-Alzheimerowskiej wczesnej utraty pamięci, czasami nazywanej upośledzeniem pamięci związanym z wiekiem (AAMI), do prawdopodobnej choroby Alzheimera, określanej na podstawie kryterium ADRD. Wybrano pacjentów z wysokim ryzykiem przejścia do choroby Alzheimera z nieklinicznej populacji, przeszukując populację odniesienia pod względem wczesnych oznak utraty pamięci lub innych trudności związanych z przed-Alzheimerowskimi objawami, historii rodzinnej choroby Alzheimera, genetycznych czynników ryzyka, wieku, płci oraz innych cech, które wskazują wysokie ryzyko choroby Alzheimera. Zebrano punkty podstawowe odpowiednich miar włącznie z MMSE i ADAS, razem z innymi miernikami zaprojektowanymi do oceny bardziej normalnej populacji. Populację tych pacjentów podzielono na dwie odpowiednie grupy z porównaniem placebo wobec wariantów dawek środka. Losy pacjentów z tych populacji śledzono z przerwami około sześciomiesięcznymi, a końcowym punktem dla każdego pacjenta było, czy na koniec obserwacji osoba ta przejdzie do fazy prawdopodobnej choroby Alzheimera oznaczonej na podstawie kryterium ADRD.

XII. Ogólne materiały i metody

1. Pomiary miana przeciwciał

Od myszy pobrano krew robiąc niewielkie nakłucie w żyłę ogonowej i zebrano około 200 µl krwi do próbki mikrowirówkowej. Od świnek morskich pobrano krew przez wygolenie najpierw okolicy tylnego golenia, a następnie nakłucie za pomocą igły nr 18 żyły śródstopowej i zebranie krwi do próbek mikrowirówkowych. Krew zostawiono do skrzepnięcia przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej (RT), zwortekowano, a następnie odwirowano przy 14000 x g przez 10 minut, aby oddzielić skrzep od surowicy. Surowicę przeniesiono do czystych próbek mikrowirówkowych i przechowywano w 4°C do czasu oznaczania miana.

Miana przeciwciał zmierzono metodą ELISA. 96-studzienkowe płytki do mikromianowania (płytki Costar EIA) powleczono 100 µl roztworu zawierającego 10 µg/ml Aβ42 lub SAPP albo innych antygenów, jak wskazano w każdym z poszczególnych przypadków, w buforze Well Coating Buffer (0,1 M fosforan sodu, pH 8,5, 0,1% azydek sodu) i trzymano przez noc w RT. Z płytek odessano płyn i dodało surowicę do studzienek, zaczynając od rozcieńczenia 1/100 w Specimen Diluent (0,014 M fosforan

sodu, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 0,6% surowiczej albuminy bydlęcej, 0,05% tymerozalu). Bezpośrednio na płytkach wykonano 7 kolejnych 3-krotnych rozcieńczeń próbek, tak by osiągnąć końcowe rozcieńczenie 1/218700. Rozcieńczone preparaty inkubowano w powleczonych studzienkach na płytce przez 1 godzinę w RT. Następnie płytki przemyto 4-krotnie za pomocą PBS zawierającej 0,05% Tween 20. Następnie dodano do studzienek drugie przeciwciało, kozie przeciwmysiej Ig, sprzężone z peroksydazą chrzanową (otrzymane z Boehringer Mannheim), w ilości 100 μ l rozcieńczenia 1/3000 w Specimen Diluent i inkubowano przez 1 godzinę w RT. Płytki ponownie przemyto 4-krotnie za pomocą PBS, Tween 20. Aby wywołać chromogen do każdej studzienki dodano 100 μ l Slow TMB (3,3',5,5'-tetrametylo-benzidyna otrzymana z Pierce Chemicals) i inkubowano przez 15 minut w RT. Reakcję zatrzymano przez dodanie 25 μ l 2M H₂SO₄. Następnie odczytano intensywność barwy w Molecular Devices Vmax przy 450 nm-650 nm.

Miana zdefiniowano jako odwrotność rozcieńczenia surowicy wywołującego połowę maksymalnego OD. Zazwyczaj maksymalne OD odczytywano z początkowego rozcieńczenia 1/100, z wyjątkiem przypadków bardzo wysokich mian, przy których niezbędne było większe początkowe rozcieńczenie do ustalenia maksymalnej OD. Jeżeli punkt 50% znajdował się pomiędzy dwoma rozcieńczeniami, wykonywano liniową ekstrapolację aby wyznaczyć końcowe miano. Aby policzyć średnią geometryczną mian przeciwciał, miana niższe niż 100 były umownie oznaczane jako wartość miana 25.

2. Test proliferacji limfocytów

Myszy uśpiono izofluranem. Śledzony usunięto i przepłukano dwukrotnie w 5 ml PBS zawierającej 10% inaktywowanej termicznie płodowej surowicy bydlęcej (PBS-FBS), zhomogenizowano w 50 μ l Centricon Unit (Dako A/S, Denmark) w 1,5 ml PBS-FBS przez 10 sekund przy 10 rpm w Medimachine (Dako), a następnie przefiltrowano przez nylonowe sito o średnicy porów 100 μ l. Limfocyty śledzionowe przemyto jeden raz 15 ml PBS-FBS, następnie osadzono przez wirowanie przy 200 x g przez 5 minut. Czerwone krwinki zlizowano zawieszając osad w 5 ml buforu zawierającego 0,15 M NH₄Cl, 1M KHCO₃, 0,1 M NaEDTA, pH 7,4 przez 5 minut w RT. Następnie leukocyty przemyto w sposób opisany powyżej. Świeżo wyizolowane komórki śledzionowe (10⁵ na studzienkę) hodowano w 3 powtórzeniach zestawów w 96-studzienkowych płytkach do mikromianowania, do hodowli tkankowych, o dnie w kształcie litery U (Corning, Cambridge, MA) w pożywce RPMI 1640 (JRH Biosciences, Lenexa, KS) wzbogaconej 2,05 ml L-glutaminy, 1% penicyliną/streptomycyną oraz 10% inaktywowaną termicznie FBS, przez 96 godzin w 37°C. Dodawano także różne peptydy A β , A β 1-16, A β 1-40, A β 1-42 lub o odwrotnej sekwencji aminokwasowej A β 40-1, w dawkach wynoszących od 5 μ M do 0,18 μ M w czterech etapach. Komórki w studzienkach kontrolnych hodowano z konkanawaliną A (Con A) (Sigma, nr katalogowy C-5275, w stężeniu 1 μ g/ml) bez dodawania białka. Do komórek na ostatnie 24 godziny dodano ³H-tymidynę (1 μ Ci/studzienkę uzyskanej z Amersham Corp., Arlington Heights IL). Następnie komórki zebrano na płytce UniFilter i zmierzono radioaktywność licznikiem Top Count Microplate Scintillation Counter (Packard Instruments, Downers Grove, IL). Wyniki wyrażono jako impulsy na minutę (cpm) radioaktywności włączonej do nierozpuszczalnych makrocząsteczek.

4. Preparowanie tkanek mózgowych

Po uśmierceniu zwierząt mózgi usunięto i jedną półkulę przygotowano do analizy immunohistochemicznej, a z drugiej półkuli wypreparowano 3 regiony mózgu (hipokamp, korę i mózdzek) i zastosowano do zmierzenia stężeń różnych białek A β i form APP metodą specyficznych testów ELISA (Johnson-Wood i inni, *supra*).

Tkanki przeznaczone do testów ELISA zhomogenizowano w 10 objętościach lodowatego buforu guanidynowego (5,0 M guanidyna-HCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0). Homogenaty zmieszano przez delikatne wstrząsanie w aparacie Adams Nutator (Fisher) przez 3-4 godziny w RT i przechowywano w -20°C przed oznaczeniem A β i APP. Wcześniejsze doświadczenia wykazały, że preparaty analityczne były stabilne w tych warunkach przechowywania, oraz że syntetyczne białko A β (Bachem) można ilościowo odzyskać po wkluciu homogenatów kontrolnej tkanki mózgowej z miotów mysich (Johnson-Wood i inni, *supra*).

5. Pomiar poziomów A β

Homogenaty mózgu rozcieńczono w stosunku 1:10 lodowatym Casein Diluent (0,25% kazeina, PBS, 0,05% azydek sodu, 20 μ g/ml aprotyny, 5 mM EDTA pH 8,0, 10 μ g/ml leupeptyny), a następnie odwirowano przy 16000 x g przez 20 minut w 4°C. Wzorce syntetycznego peptydu A β (aminokwasy 1-42) i wzorce APP przygotowano tak, by zawierały 0,5 M guanidynę i 0,1% surowiczą albuminę bydlęcą (BSA) w ostatecznym preparacie. W teście kanapkowym ELISA „całkowitego” A β stosowano monoklonalne przeciwciała (mA β) 266, specyficzne dla aminokwasów 13-28 A β (Seubert i inni) jako

przeciwciała wychwytyjące oraz biotynylowane mAb 3D6, specyficzne dla aminokwasów 1-5 A β (Johnson-Wood i inni) jako przeciwciała reporterowe. 3D6 mAb nie rozpoznaje wydzielanej APP ani pełnej długości APP, ale wykrywa tylko A β z N-końcowym kwasem asparaginowym. Test ten ma niższą granicę czułości ~50 μ g/ml (11 μ M) i nie wykazuje reaktywności krzyżowej z endogennym mysim białkiem A β w stężeniach do 1 ng/ml (Johnson-Wood i inni, *supra*).

W specyficznym dla A β 1-42 kanapkowym teście ELISA stosuje się mAb 21F12, specyficzne dla aminokwasów 33-42 A β (Johnson-Wood i inni) jako przeciwciała wychwytyjące. Biotynylowane mAb 3D6 jest także przeciwciałem reporterowym w tym teście, który ma niższą granicę czułości, wynoszącą około 125 μ g/ml (28 μ M, Johnson-Wood i inni). Do testów A β ELISA studzienki 96-studzienkowych płytek do immunotestów (Costar) powlekano 100 μ l mAb 266 (w stężeniu 10 μ g/ml) lub mAb 21F12 (w stężeniu 5 μ g/ml) z inkubowaniem przez noc w RT. Roztwór usunięto przez odessanie i studzienki zablokowano przez dodanie 200 μ l 0,25% surowiczej albuminy ludzkiej w buforze PBS na co najmniej 1 godzinę w RT. Roztwór blokujący usunięto i płytki przechowywano wysuszone w 4°C do czasu zastosowania. Płytki przed użyciem nawodniono buforem Wash Buffer [sól buforowana Tris (0,15 M NaCl, 0,01 M Tris-HCl, pH 7,5), plus 0,05% Tween 20]. Próbkę i wzorce dodano w trzech powtórzeniach równych części po 100 μ l na studzienkę, a następnie inkubowano przez noc w 4°C. Płytki przeemywano co najmniej 3-krotnie buforem Wash Buffer pomiędzy każdym z etapów testu. Dodano biotynylowane mAb 3D6, rozcieńczone do 0,5 μ l/ml w buforze Casein Assay Buffer (0,25% kazeina, PBS, 0,05% Tween 20, pH 7,4) i inkubowano w studzienkach przez 1 godzinę w RT. Koniugat awidyna-peroksydaza chrzanowa (Avidin-HRP uzyskana z Vector, Burlingame, CA) rozcieńczony 1:4000 w Casein Assay Buffer dodano na 1 godzinę w TP. Dodano kolorymetryczny substrat, Slow TMB-ELISA (Pierce) i pozostawiono do reakcji przez 15 minut w RT, po czym reakcję enzymatyczną zatrzymano przez dodanie 25 μ l 2N H₂SO₄. Produkt reakcji oznaczono stosując Molecular Devices Vmax mierzący różnicę absorpcji przy 450 nm i 650 nm.

6. Pomiar poziomów APP

Zastosowano dwa różne testy APP. Pierwszy, nazwany APP- α /FL, rozpoznaje zarówno APP-alfa (α), jak i formy APP pełnej długości (FL). Drugi test rozpoznaje tylko APP- α . Test APP- α /FL rozpoznaje wydzielaną postać APP włącznie z pierwszymi 12 aminokwasami A β . Ponieważ przeciwciała reporterowe (2H3) nie jest specyficzne dla miejsca α -klamerki, występującego pomiędzy 612-613 aminokwasem APP695 (Esch i inni, *Science* 248, 1122-1124 (1990)), test ten rozpoznaje również pełne długości APP (APP-FL). Wstępne doświadczenia z immobilizowanymi przeciwciałami APP przeciw cytoplastycznemu ogonowi APP-FL, w celu usunięcia APP-FL z homogenatów mózgowych zasugerowały, że około 30-40% APP- α /FL APP jest FL (dane nie prezentowane). Przeciwciałem wychwytyjącym w obu testach APP- α /FL i APP- α jest mAb 8E5 wytworzone przeciw aminokwasom 444 do 592 formy APP695 (Games i inni, *supra*). Reporterowym mAb dla testu APP- α /FL jest mAb 2H3, specyficzne dla aminokwasów 597-608 formy APP695 (Johnson-Wood i inni, *supra*), a przeciwciałem reporterowym dla testu APP- α jest biotynylowana pochodna mAb 16H9, wytworzona przeciw aminokwasom 605 do 611 APP. Niższa granica czułości testu APP- α /FL wynosi 11 ng/ml (150 μ M) (Johnson-Wood i inni), a testu specyficznego dla APP- α wynosi 22 ng/ml (0,3 nM). Dla obydwu testów APP studzienki 96-studzienkowych płytek EIA powlekano mAb 8E5, jak opisano powyżej dla mAb 266. Oczyszczone, zrekombinowane wydzielane APP- α zastosowano jako wzorzec do testu APP- α i testu APP- α /FL (Esch i inni, *supra*). Próbkę homogenatu mózgu w 5 M guanidynie rozcieńczono 1:10 w ELISA Specimen Diluent (0,014 M bufor fosforanowy, pH 7,4, 0,6% surowicza albumina bydlęca, 0,05% tymerozal, 0,5 M NaCl, 0,1% NP40). Następnie rozcieńczono je 1:4 w Specimen Diluent zawierającym 0,5 M guanidynę. Rozcieńczone homogenaty odwirowano przy 16000 x g przez 15 sekund w RT. Wzorce APP i próbki dodano do płytek w dwóch powtórzeniach tych samych ilości i inkubowano przez 1,5 godziny w RT. Biotynylowane przeciwciała reporterowe 2H3 i 16H9 inkubowano z próbkami przez 1 godzinę w RT. Streptawidynę-alkaliczną fosfatazę (Boehringer Mannheim) rozcieńczoną 1:1000 w Specimen Diluent inkubowano w studzienkach przez 1 godzinę w RT. Dodano fluorescencyjnego substratu, fosforanu 4-metylo-umbeliferylu i inkubowano 30 minut w RT, a następnie płytki odczytano w fluorymetrze Cytofluor tm 2350 (Millipore) przy 365 nm pobudzenia i 450 nm emisji.

7. Immunohistochemia

Mózgi utrwalano przez 3 dni w 4°C w 4% paraformaldehydzie w PBS, a następnie przechowywano 1-7 dni w 4°C w 1% paraformaldehydzie, PBS przed pocięciem na skrawki. Wieńcowe skrawki histologiczne o grubości 40 mikronów cięto na wibratomie w RT i przechowywano w buforze chroniącym przed zamarznięciem (30% gliceryna, 30% glikol etylenowy w buforze fosforanowym) w -20°C

przed obróbką immunohistochemiczną. Dla każdego mózgu 6 fragmentów na poziomie hipokampu grzbietowego, każdy oddzielony kolejnymi 240 μ m przerwami, inkubowano przez noc z jednym z następujących przeciwciał: (1) biotynylowanym przeciw-A β (mA β , 3D6, specyficznym dla ludzkiego A β) rozcieńczonym do stężenia 2 μ g/ml w PBS i 1% surowicy końskiej; lub (2) biotynylowanym mA β , specyficznym dla ludzkiego APP, 8E5, rozcieńczonym do stężenia 3 μ g/ml w PBS i 1,0% surowicy końskiej; lub (3) mA β specyficznym dla glejowego włókninowego białka kwasowego (GFAP; Sigma Chemical Co.) rozcieńczonym 1:500 w 0,25% Triton X-100 i 1% surowicy końskiej w soli buforowanej Trisem, pH 7,4 (TBS); lub (4) mA β specyficznym dla CD11b, antygenu MAC-1, (Chemicon International) rozcieńczonym w stosunku 1:100 w 0,25% Triton X-100 i 1% króliczej surowicy w TBS; lub (5) mA β specyficznym dla antygenu MHC II, (Pharmingen) rozcieńczonym w stosunku 1:100 w 0,25% Triton X-100 i 1% króliczej surowicy w TBS; lub (6) szczurzym mA β specyficznym dla CD 43, (Pharmingen) rozcieńczonym w stosunku 1:100 z 1% króliczej surowicy w PBS; lub (7) szczurzym mA β specyficznym dla CD 45RA, (Pharmingen) rozcieńczonym w stosunku 1:100 z 1% króliczej surowicy w PBS; lub (8) szczurzym monoklonalnym A β specyficznym dla CD 45RB, (Pharmingen) rozcieńczonym w stosunku 1:100 z 1% króliczej surowicy w PBS; lub (9) szczurzym monoklonalnym A β specyficznym dla CD 45, (Pharmingen) rozcieńczonym w stosunku 1:100 z 1% króliczej surowicy w PBS; lub (10) biotynylowanym chemicznym poliklonalnym A β specyficznym dla CD3e, (Pharmingen) rozcieńczonym w stosunku 1:100 z 1% króliczej surowicy w PBS; lub (11) szczurzym mA β specyficznym dla CD3, (Serotec) rozcieńczonym w stosunku 1:200 z 1% króliczej surowicy w PBS; lub z (12) roztworem PBS nie zawierającym pierwotnych przeciwciał, zawierającym 1% normalną surowicę końską.

Skrawki histologiczne poddane działaniu roztworów przeciwciał wymienionych w 1, 2 i 6-12 powyżej wcześniej traktowano roztworem 1,0% Triton X-100, 0,4% nadtlenu wodoru w PBS przez 20 minut w RT aby zablokować endogenne peroksydazy. Następnie inkubowano je przez noc w 4°C z pierwotnymi przeciwciałami. Skrawki poddane działaniu 3D6 lub 8E5 lub CD3e mA β następnie poddano przez 1 godzinę w RT reakcji z kompleksem peroksydaza chrzanowa-awidyna-biotyna ze składnikami zestawu „A” i „B” rozcieńczonymi 1:75 w PBS (Vector Elite Standard Kit, Vector Labs, Burlingame, CA.). Skrawki poddane działaniu przeciwciał specyficznych dla CD 45RA, CD 45RB, CD 45, CD3 i roztworem PBS pozbawionym pierwotnych przeciwciał inkubowano przez 1 godzinę w RT odpowiednio z biotynylowanymi przeciwciałami przeciw-szczurzym IgG (Vector) rozcieńczonymi 1:75 w PBS lub biotynylowanymi przeciwciałami przeciw-mysim IgG (Vector) rozcieńczonymi 1:75 w PBS. Następnie skrawki przez 1 godzinę w RT reakcji z kompleksem peroksydaza chrzanowa-awidyna-biotyna ze składnikami zestawu „A” i „B” rozcieńczonymi 1:75 w PBS (Vector Elite Standard Kit, Vector Labs, Burlingame, CA.).

Skrawki wywołano w 0,01% nadtlenu wodoru, 0,05% 3,3'-diaminobenzydynie (DAB) w RT. Skrawki przeznaczone do inkubacji z przeciwciałami specyficznymi dla GFAP, MAC-1 i MHC II wcześniej traktowano 0,6% nadtlenu wodoru w RT aby zablokować endogenne peroksydazy, a następnie inkubowano przez noc w 4°C z pierwotnymi przeciwciałami. Skrawki poddane działaniu przeciwciała GFAP inkubowano 1 godzinę w RT z biotynylowanymi przeciwciałami przeciwmysiej IgG, wytworzonymi u koni (Vector Laboratories; zestaw Vectastain Elite ABC Kit) rozcieńczonymi 1:200 w TBS. Następnie skrawki inkubowano przez 1 godzinę z kompleksem peroksydaza-awidyna-biotyna (Vector Laboratories; Vectastain Elite ABC Kit) rozcieńczonym 1:1000 w TBS. Skrawki inkubowane z przeciwciałami mA β specyficznymi dla MAC-1 i MHC II jako pierwotnymi przeciwciałami kolejno poddano reakcji przez 1 godzinę w RT z biotynylowanymi przeciwciałami przeciw-szczurzym IgG wytworzonymi w królikach, rozcieńczonymi 1:200 w TBS, następnie inkubowane przez 1 godzinę z kompleksem peroksydaza chrzanowa-awidyna-biotyna rozcieńczonym 1:1000 w TBS. Skrawki inkubowane z przeciwciałami specyficznymi dla GFAP, MAC-1 i MHC II wywołano inkubując je w RT z 0,05% DAB, 0,01% nadtlenu wodoru, 0,04% chlorkiem niklu, TBS odpowiednio przez 4 i 11 minut.

Wyznakowane immunologicznie skrawki umieszczono na szklanych szkiełkach przedmiotowych (VWR, Superfrost slides), wysuszone na powietrzu przez noc, zanurzone w Propar (Anatech) i nałożono na nie szkiełka nakrywkowe stosując Permout (Fisher) jako środek osadzający.

Aby przeciwnie wybarwić płytki A β podzestaw GFAP-dodatnich skrawków umieszczono na szkiełkach przedmiotowych Superfrost i inkubowano w wodnej 1% Thioflavin S (Sigma) przez 7 minut po obróbce immunohistochemicznej. Następnie skrawki odwodniono i oczyszczono w Propar, po czym nałożono na nie szkiełka nakrywkowe osadzając je z użyciem Permout.

8. Analiza obrazu

Do oceny ilościowej immunoreaktywnych skrawków zastosowano Videometric 150 Image Analysis System (Oncor, Inc. Gaithersburg, MD) sprzężony z mikroskopem Nikon Microphot-FX przez kamerę wideo CCD i monitor Sony Trinitron. Obraz skrawków był przechowywany w buforze wideo i oznaczono próg koloru i nasycenia aby wybrać i policzyć całkowity obszar pikseli zajmowany przez wyznakowane immunologicznie struktury. Dla każdego skrawka hipokamp obrysowano ręcznie i obliczono całkowity obszar pikseli zajmowany przez hipokamp. Procent obciążenia amyloidem zmierzono jako: (frakcja obszaru hipokampu zawierająca złogi A β immunoreaktywne z mA β 3D6) x 100. Podobnie procent obciążenia neurytycznego zmierzono jako: (frakcja obszaru hipokampu zawierająca dystroficzne neuryty reagujące z mA β 8E5) x100. C-Imaging System (Comprix, Inc., Cranberry Township, PA) wykorzystujący program Simple 32 Software Application połączono z mikroskopem Nikon Microphot-FX przez kamerę Optronics i zastosowano do ilościowej oceny procentu kory pozamodzelowej zajętej przez GFAP-dodatnie astrocyty i MAC-1- i MHC II-dodatni mikroglej. Obraz immunoreaktywnych skrawków przechowywano w buforze wideo i wyznaczono próg monochromatyczny, aby wybrać i policzyć całkowity obszar pikseli zajmowany przez wyznakowane immunologicznie komórki. Dla każdego skrawka korę pozamodzelową (RSC) ręcznie obrysowano i obliczono całkowity obszar pikseli zajmowany przez RSC. Procent astrocytozy zdefiniowano jako: (frakcja obszaru RSC zajmowana przez GFAP-reaktywne astrocyty) x 100. Podobnie procent mikroglejozy zdefiniowano jako: (frakcja obszaru RSC zajmowana przez mikroglej reaktywny z MAC-1 i MHC II) x 100. Do wszystkich analiz obrazu 6 skrawków na poziomie hipokampu grzbietowego, każdy oddzielony kolejnymi 240 μ m przerwami, oznaczono ilościowo dla każdego zwierzęcia. We wszystkich przypadkach status leczniczy zwierząt nie był znany obserwatorowi.

Jakkolwiek powyższy wynalazek opisano szczegółowo w celu jego wyjaśnienia i zrozumienia, oczywiste jest, że dokonać można pewnych modyfikacji w ramach zakresu załączonych zastrzeżeń. Wszystkie cytowane publikacje i dokumenty patentowe wprowadza się niniejszym w całości jako odnośniki we wszystkich celach w stopniu, w jakim zostały one wymienione.

Tabela 1
Miana przy 50% O.D.

Myszy, którym wstrzykiwano zagregowany Aß										
Wiek PDAPP	mysz 100	mysz 101	mysz 102	mysz 103	mysz 104	mysz 105	mysz 106	mysz 107	mysz 108	
4	70000	150000	15000	120000	1000	15000	50000	80000	100000	
6	15000	65000	30000	55000	300	15000	15000	50000	60000	
8	20000	55000	50000	50000	400	15000	18000	50000	60000	
10	40000	20000	60000	50000	900	15000	50000	20000	40000	
12	25000	30000	60000	40000	2700	20000	70000	25000	20000	
Myszy, którym wstrzykiwano PBS z dwoma immunogenami w 1/100										
	Wiek PDAPP	mysz 113	mysz 114	mysz 115	mysz 116	mysz 117				
	6	<4x bkg	<4x bkg	<4x bkg	<4x bkg	<4x bkg				
	10	5x bkg	<4x bkg	<4x bkg	<4x bkg	<4x bkg				
	12	<4x bkg	<4x bkg	<4x bkg	<4x bkg	<4x bkg				

Zastrzeżenia patentowe

1. Kompozycja farmaceutyczna, **znamienna tym**, że zawiera immunogeny środek skuteczny w wywoływaniu odpowiedzi immunologicznej obejmującej przeciwciała przeciw A β u pacjenta oraz farmaceutycznie dopuszczalny adiuwant, przy czym ten środek jest wybrany z grupy obejmującej:

- (i) A β
- (ii) fragment z co najmniej pięciu przylegających aminokwasów A β 42; i
- (iii) kwas nukleinowy kodujący (i) lub (ii);

oraz adiuwant jest wybrany z grupy obejmującej ałun, wodorotlenek glinu, fosforan glinu, siarczany glinu, 3-de-O-acylowany monofosforylowany lipid A, M-CSF i GM-CSF, emulsje olej w wodzie, takie jak skwalenu lub oleju arachidowego, MF59, SAF, CpG, polimeryczne lub monomeryczne aminokwasy, takie jak poli(kwas glutaminowy) lub polilizyna, peptydy muramyłowe (np. N-acetylmuramylo-L-treonylo-D-izoglutamina (thr-MDP), N-acetylonor-muramylo-L-alanylo-D-izoglutamina (nor-MDP), N-acetylmuramylo-L-alanylo-D-izoglutaminylo-L-alanino-2-(1'-2'dipalmitoilo-sn-glicero-3-hydroksyfosforyloksy)etyloamina (MTP-PE), N-acetyloglukozaminylo-N-acetylo-muramylo-L-A1-D-izoglu-L-Ala-dipalmitoksypropyloamid (DTP-DPP)) oraz inne składniki ścian komórek bakteryjnych, takie jak dimikolinian trehalozy (TDM), szkielet ściany komórkowej (CWS), MPL+CWS, adiuwanty saponinowe (QS21), ISCOM (kompleksy immunostymulujące), cytokiny, takie jak interleukiny (IL-1, IL-2 i IL-12), czynnik pobudzający tworzenie kolonii makrofagów (M-CSF), czynnik martwicy nowotworu (TNF); oraz

A β 42 ma naturalną ludzką sekwencję: 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.

2. Kompozycja według zastrz. 1, **znamienna tym**, że środek jest kapsułkowany w cząstce.

3. Kompozycja według zastrz. 2, **znamienna tym**, że cząstkę stanowi cząstka kopolimeru polilaktyd-poliglikolid (PLPG).

4. Kompozycja według zastrz. 1, **znamienna tym**, że A β stanowi A β 43, A β 42, A β 41, A β 40 lub A β 39.

5. Kompozycja według zastrz. 1, **znamienna tym**, że fragment A β pochodzi z N-końcowej połowy A β .

6. Kompozycja według zastrz. 1, **znamienna tym**, że fragment A β zawiera A β 1-5.

7. Kompozycja według zastrz. 5, **znamienna tym**, że fragment A β stanowi A β 1-5.

8. Kompozycja według zastrz. 5, **znamienna tym**, że fragment A β stanowi A β 1-6.

9. Kompozycja według zastrz. 5, **znamienna tym**, że fragment A β stanowi A β 1-12.

10. Kompozycja według zastrz. 1, **znamienna tym**, że fragment A β jest wybrany z grupy obejmującej A β 1-5, A β 1-6, A β 1-12, A β 13-28, A β 17-28, A β 25-35, A β 33-42, A β 35-40 i A β 35-42.

11. Kompozycja według zastrz. 1-10, **znamienna tym**, że zawiera co najmniej 10 μ g A β lub jego fragmentu.

12. Kompozycja według zastrz. 1-10, **znamienna tym**, że zawiera co najmniej 20 μ g A β lub jego fragmentu.

13. Kompozycja według zastrz. 1-10, **znamienna tym**, że zawiera co najmniej 50 μ g A β lub jego fragmentu.

14. Kompozycja według zastrz. 1-10, **znamienna tym**, że zawiera co najmniej 100 μ g A β lub jego fragmentu.

15. Zastosowanie immunogennego środka skutecznego w wywoływaniu odpowiedzi immunologicznej obejmującej przeciwciała przeciw A β do wytwarzania leku do leczenia lub profilaktyki choroby charakteryzującej się złoгами amyloidowymi u pacjenta, **znamiennie tym**, że ten środek zawiera:

- (i) A β
- (ii) fragment z co najmniej pięciu przylegających aminokwasów A β 42; lub
- (iii) kwas nukleinowy kodujący (i) lub (ii); oraz

A β 42 ma naturalną ludzką sekwencję: 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.

16. Zastosowanie według zastrz. 15, w którym lek ponadto zawiera farmaceutycznie dopuszczalny adiuwant wybrany z grupy obejmującej ałun, wodorotlenek glinu, fosforan glinu, siarczany glinu, 3-de-O-acylowany monofosforylowany lipid A, M-CSF i GM-CSF, emulsje olej w wodzie, takie jak skwalenu lub oleju arachidowego, MF59, SAF, CpG, polimeryczne lub monomeryczne aminokwasy,

takie jak poli(kwas glutaminowy) lub polilizyna, peptydy muramyłowe (np. N-acetylmuramylo-L-treonylo-D-izoglutamina (thr-MDP), N-acetylonormuramylo-L-alanylo-D-izoglutamina (nor-MDP), N-acetylmuramylo-L-alanylo-D-izoglutaminylo-L-alanino-2-(1'-2'-di-palmitoilo-sn-glicero-3-hydroksyfosforyloksy)etyloamina (MTP-PE), N-acetylglukozaminylo-N-acetylmuramylo-L-A1-D-izoglu-L-Ala-di-palmitoksypropyloamid (DTP-DPP)), lub inne składniki ścian komórek bakteryjnych, takie jak dimikolian trehalozy (TDM), szkielet ściany komórkowej (CWS), MPL+CWS, adiuwanty saponinowe (QS21), ISCOM (kompleksy immunostymulujące), cytokiny, takie jak interleukiny (IL-1, IL-2 i IL-12), czynnik pobudzający tworzenie kolonii makrofagów (M-CSF), czynnik martwicy nowotworu (TNF).

17. Zastosowanie według zastrz. 15, w którym środek jest kapsułkowany w cząstce.
18. Zastosowanie według zastrz. 16, w którym środek jest kapsułkowany w cząstce.
19. Zastosowanie według zastrz. 17, w którym cząstkę stanowi cząstka kopolimeru polilaktyd-poliglikolid (PLPG).
20. Zastosowanie według zastrz. 18, w którym cząstkę stanowi cząstka kopolimeru polilaktyd-poliglikolid (PLPG).
21. Zastosowanie według zastrz. 15, w którym A β stanowi A β 43, A β 42, A β 41, A β 40 lub A β 39.
22. Zastosowanie według zastrz. 15, w którym fragment A β pochodzi z N-końcowej połowy A β .
23. Zastosowanie według zastrz. 15, w którym fragment A β zawiera A β 1-5.
24. Zastosowanie według zastrz. 22, w którym fragment A β stanowi A β 1-5.
25. Zastosowanie według zastrz. 22, w którym fragment A β stanowi A β 1-6.
26. Zastosowanie według zastrz. 22, w którym fragment A β stanowi A β 1-12.
27. Zastosowanie według zastrz. 15, w którym fragment A β jest wybrany z grupy obejmującej A β 1-5, A β 1-6, A β 1-12, A β 13-28, A β 17-28, A β 25-35, A β 33-42, A β 35-40 i A β 35-42.
28. Zastosowanie według zastrz. 15-27, gdzie ilość A β lub jego fragmentu wynosi co najmniej 10 μ g.
29. Zastosowanie według zastrz. 15-27, gdzie ilość A β lub jego fragmentu wynosi co najmniej 20 μ g.
30. Zastosowanie według zastrz. 15-27, gdzie ilość A β lub jego fragmentu wynosi co najmniej 50 μ g.
31. Zastosowanie według zastrz. 15-27, gdzie ilość A β lub jego fragmentu wynosi co najmniej 100 μ g.
32. Zastosowanie według zastrz. 15-27, w którym pacjentem jest człowiek.
33. Zastosowanie według zastrz. 28, w którym pacjentem jest człowiek.
34. Zastosowanie według zastrz. 29, w którym pacjentem jest człowiek.
35. Zastosowanie według zastrz. 30, w którym pacjentem jest człowiek.
36. Zastosowanie według zastrz. 31, w którym pacjentem jest człowiek.
37. Zastosowanie według zastrz. 15-27, w którym chorobę stanowi choroba Alzheimera.
38. Zastosowanie według zastrz. 28, w którym chorobę stanowi choroba Alzheimera.
39. Zastosowanie według zastrz. 29, w którym chorobę stanowi choroba Alzheimera.
40. Zastosowanie według zastrz. 30, w którym chorobę stanowi choroba Alzheimera.
41. Zastosowanie według zastrz. 31, w którym chorobę stanowi choroba Alzheimera.
42. Zastosowanie według zastrz. 15-27, w którym u pacjenta nie występują objawy.
43. Zastosowanie według zastrz. 28, w którym u pacjenta nie występują objawy.
44. Zastosowanie według zastrz. 29, w którym u pacjenta nie występują objawy.
45. Zastosowanie według zastrz. 30, w którym u pacjenta nie występują objawy.
46. Zastosowanie według zastrz. 31, w którym u pacjenta nie występują objawy.
47. Zastosowanie według zastrz. 15-27, w którym pacjent ma mniej niż 50 lat.
48. Zastosowanie według zastrz. 28, w którym pacjent ma mniej niż 50 lat.
49. Zastosowanie według zastrz. 29, w którym pacjent ma mniej niż 50 lat.
50. Zastosowanie według zastrz. 30, w którym pacjent ma mniej niż 50 lat.
51. Zastosowanie według zastrz. 31, w którym pacjent ma mniej niż 50 lat.
52. Zastosowanie według zastrz. 15-27, w którym pacjent ma odziedziczone czynniki ryzyka wskazujące podatność na chorobę Alzheimera.
53. Zastosowanie według zastrz. 28, w którym pacjent ma odziedziczone czynniki ryzyka wskazujące podatność na chorobę Alzheimera.
54. Zastosowanie według zastrz. 29, w którym pacjent ma odziedziczone czynniki ryzyka wskazujące podatność na chorobę Alzheimera.

55. Zastosowanie według zastrz. 30, w którym pacjent ma odziedziczone czynniki ryzyka wskazujące podatność na chorobę Alzheimera.

56. Zastosowanie według zastrz. 31, w którym pacjent ma odziedziczone czynniki ryzyka wskazujące podatność na chorobę Alzheimera.

57. Zastosowanie według zastrz. 15-27, w którym pacjent nie ma znanych czynników ryzyka choroby Alzheimera.

58. Zastosowanie według zastrz. 28, w którym pacjent nie ma znanych czynników ryzyka choroby Alzheimera.

59. Zastosowanie według zastrz. 29, w którym pacjent nie ma znanych czynników ryzyka choroby Alzheimera.

60. Zastosowanie według zastrz. 30, w którym pacjent nie ma znanych czynników ryzyka choroby Alzheimera.

61. Zastosowanie według zastrz. 31, w którym pacjent nie ma znanych czynników ryzyka choroby Alzheimera.

62. Zastosowanie według zastrz. 21, w którym A β występuje w postaci zagregowanej.

63. Zastosowanie według zastrz. 15-27, w którym lek podaje się doustnie, podskórnie, domięśniowo, miejscowo lub dożylnie.

64. Zastosowanie według zastrz. 28, w którym lek podaje się doustnie, podskórnie, domięśniowo, miejscowo lub dożylnie.

65. Zastosowanie według zastrz. 29, w którym lek podaje się doustnie, podskórnie, domięśniowo, miejscowo lub dożylnie.

66. Zastosowanie według zastrz. 30, w którym lek podaje się doustnie, podskórnie, domięśniowo, miejscowo lub dożylnie.

67. Zastosowanie według zastrz. 31, w którym lek podaje się doustnie, podskórnie, domięśniowo, miejscowo lub dożylnie.

68. Zastosowanie według zastrz. 63, w którym lek podaje się domięśniowo lub podskórnie.

69. Zastosowanie według zastrz. 64-67, w którym lek podaje się domięśniowo lub podskórnie.

70. Zastosowanie według zastrz. 15-20, w którym środek stanowi skuteczna dawka kwasu nukleinowego kodującego A β lub fragment z co najmniej pięciu przylegających aminokwasów A β 42, w którym kwas nukleinowy jest ekspymowany w organizmie pacjenta z wytworzeniem A β lub fragmentu z co najmniej pięciu przylegających aminokwasów A β 42 wywołującego odpowiedź immunologiczną.

71. Zastosowanie według zastrz. 70, w którym lek podaje się miejscowo.

72. Zastosowanie według zastrz. 71, w którym lek stosuje się miejscowo w postaci plastra.

73. Zastosowanie według zastrz. 15-27, w którym pacjent jest monitorowany pod względem odpowiedzi immunologicznej.

74. Zastosowanie według zastrz. 28, w którym pacjent jest monitorowany pod względem odpowiedzi immunologicznej.

75. Zastosowanie według zastrz. 29, w którym pacjent jest monitorowany pod względem odpowiedzi immunologicznej.

76. Zastosowanie według zastrz. 30, w którym pacjent jest monitorowany pod względem odpowiedzi immunologicznej.

77. Zastosowanie według zastrz. 31, w którym pacjent jest monitorowany pod względem odpowiedzi immunologicznej.

Rysunki

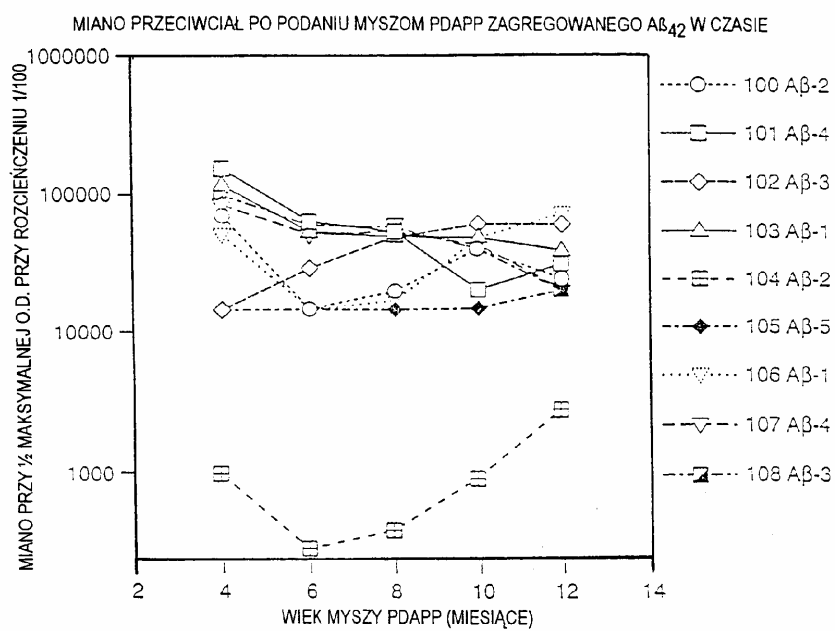


FIG. 1

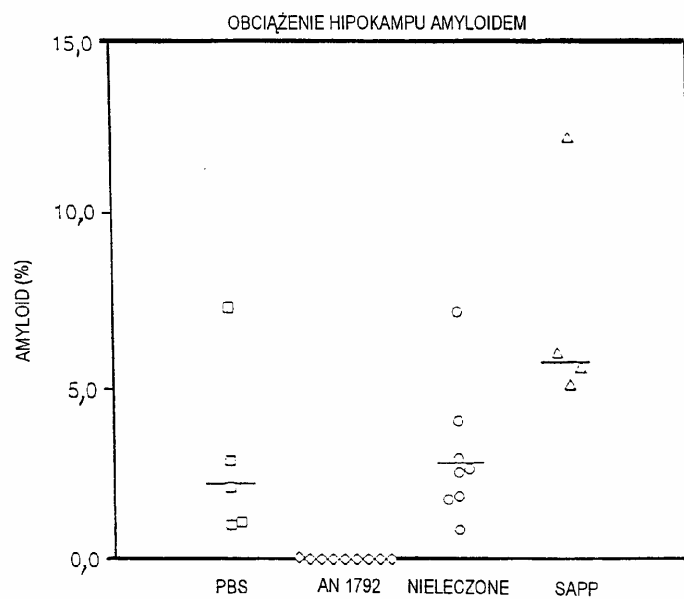
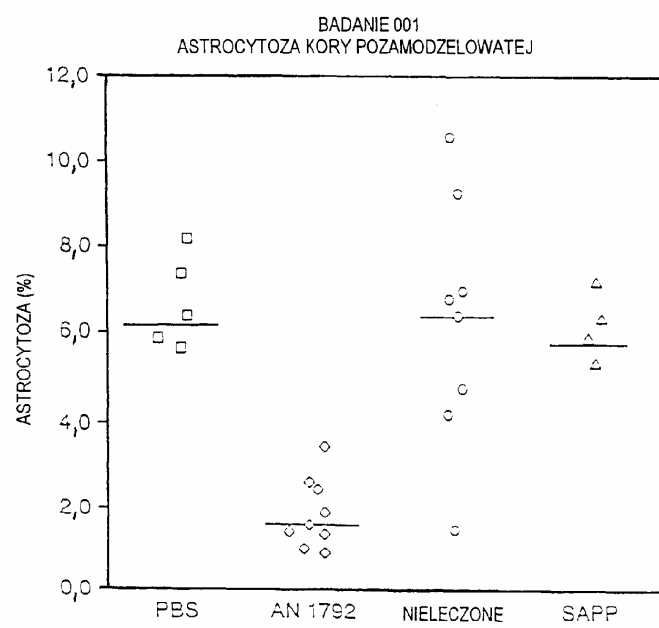
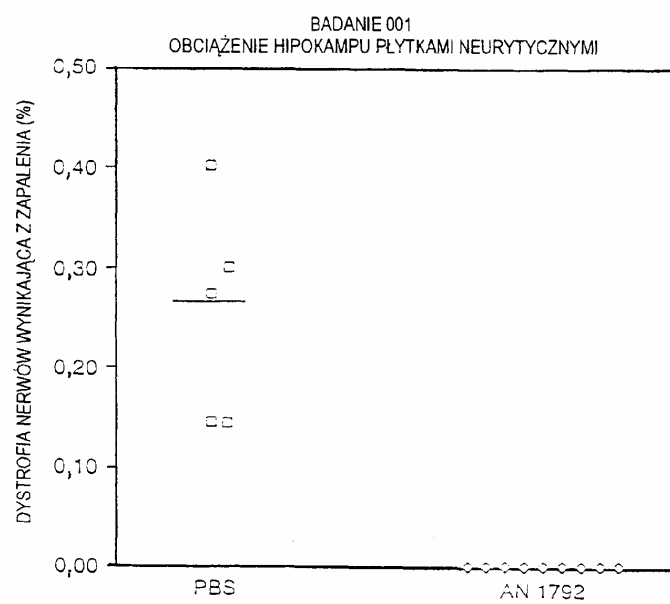


FIG. 2



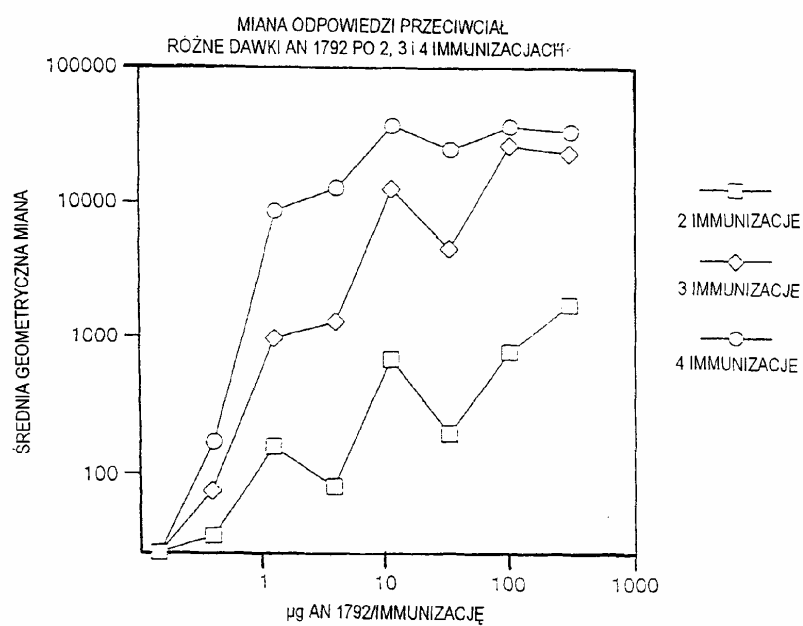


FIG. 5

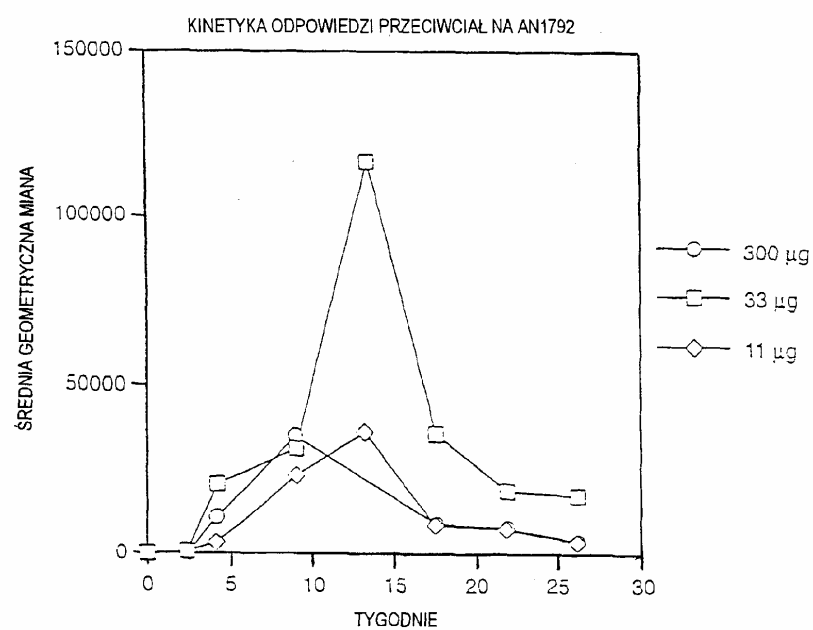


FIG. 6

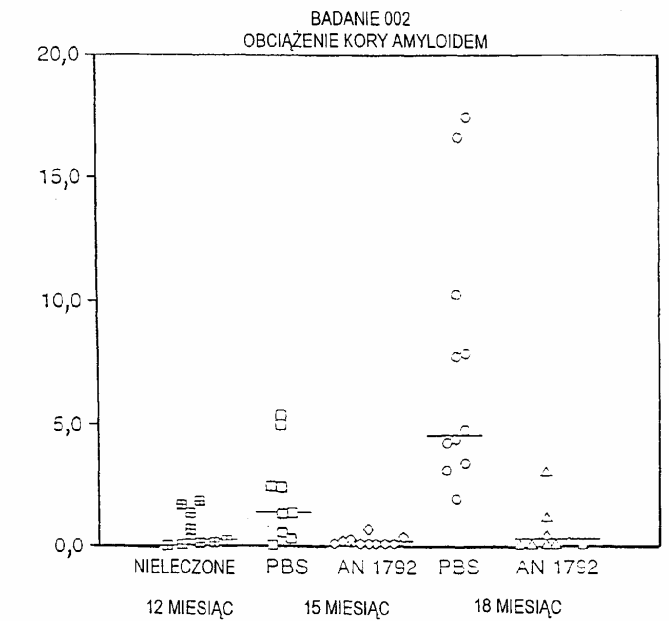


FIG. 7

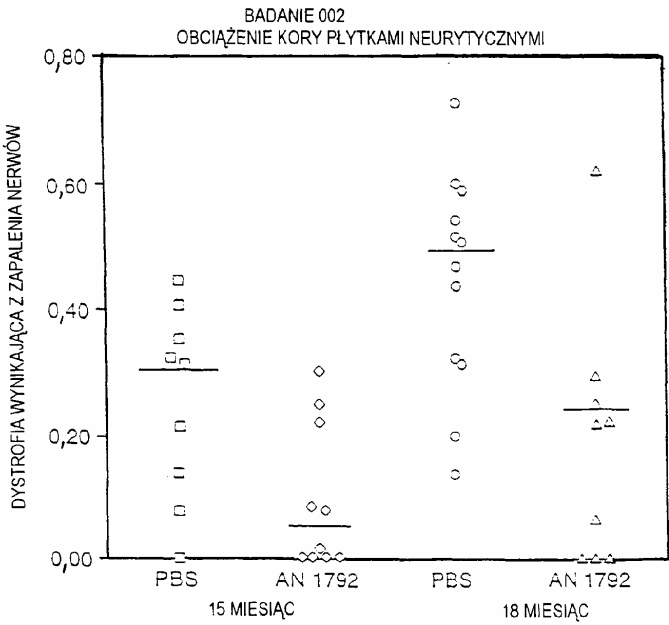


FIG. 8

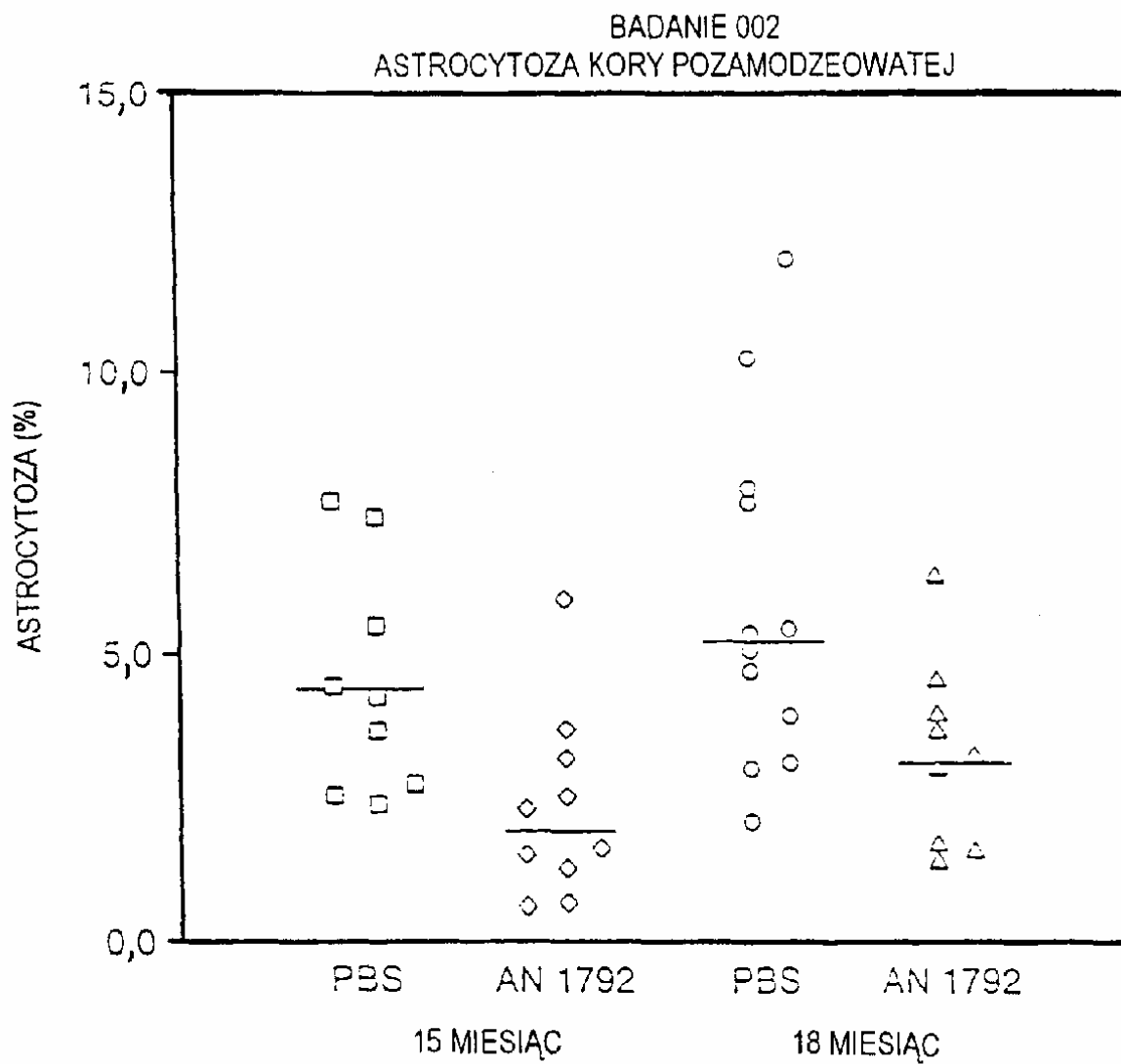


FIG. 9

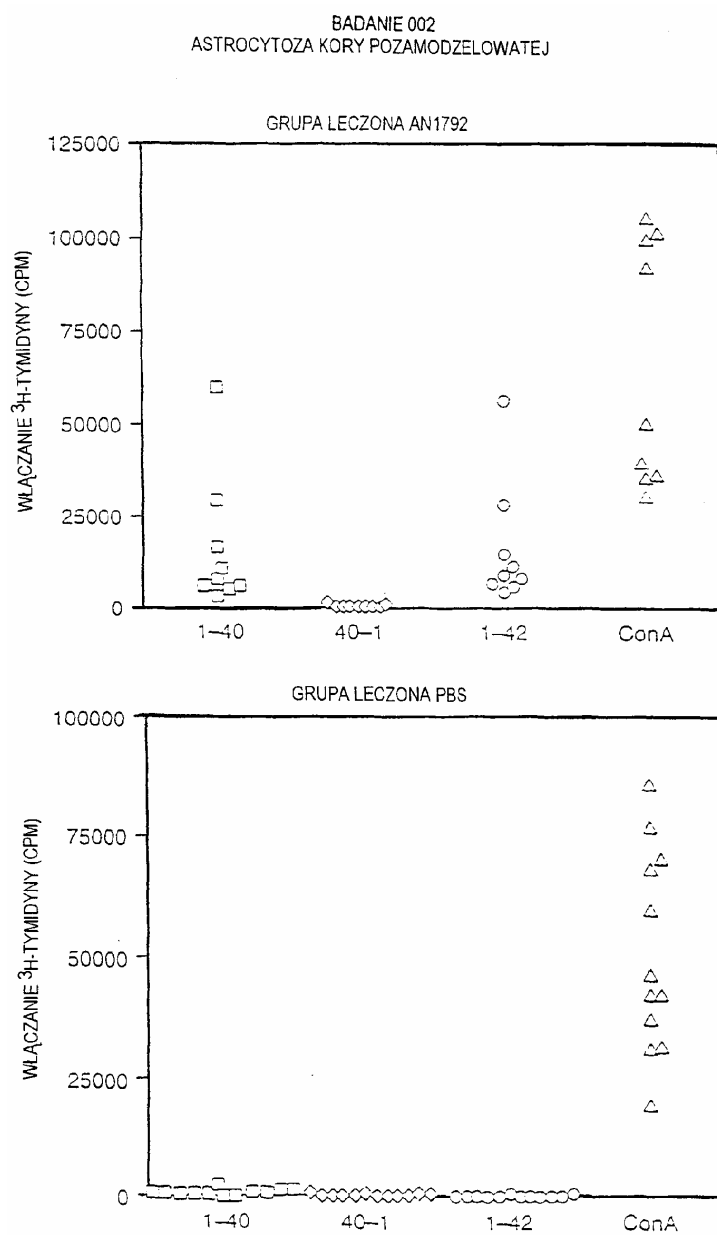


FIG. 10

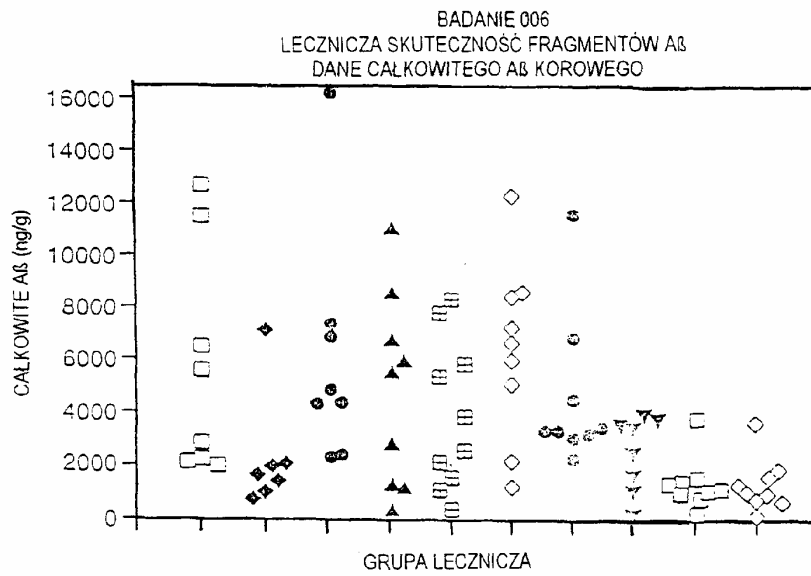


FIG. 11

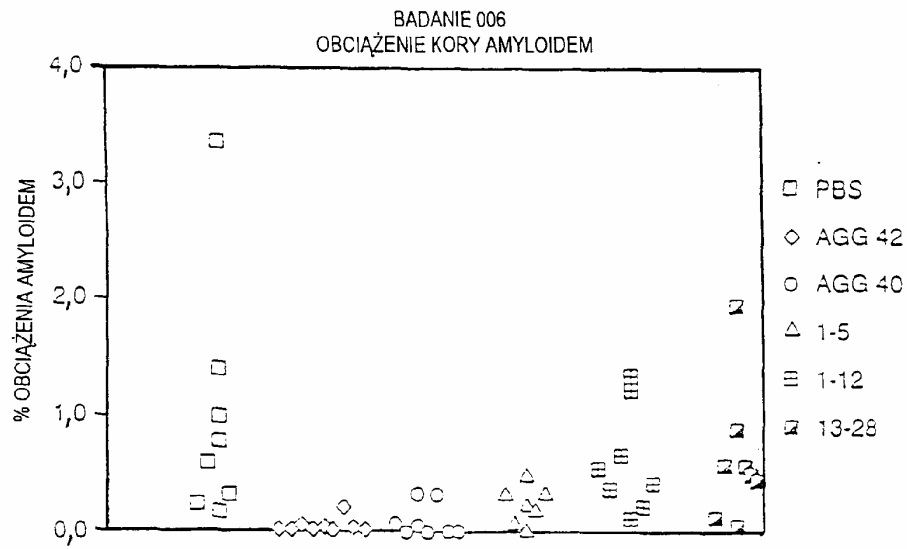
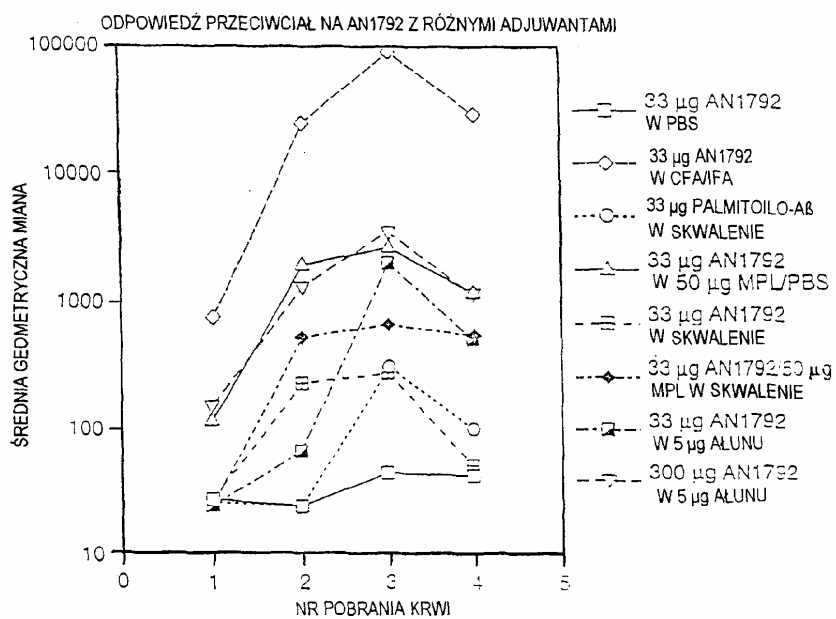
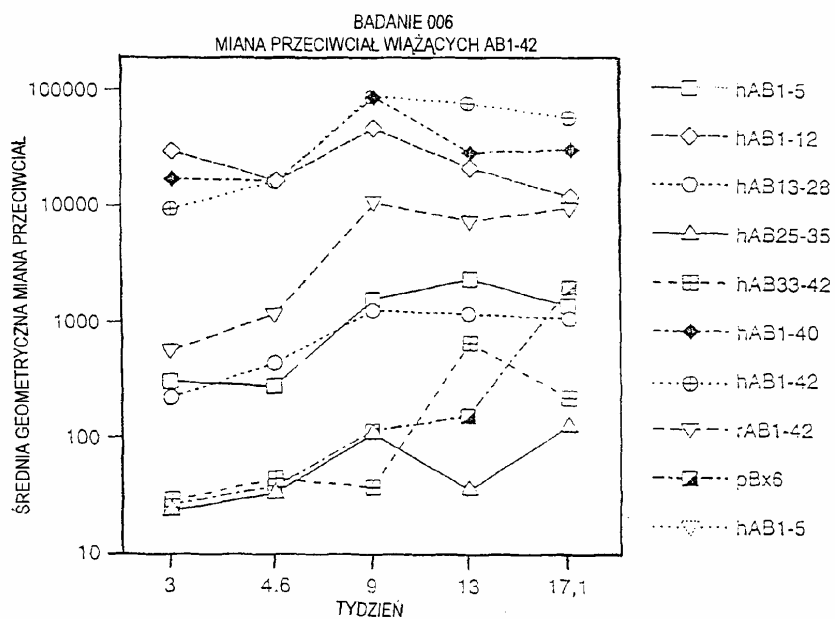


FIG. 12



KORA

KONTROLA PBS		NIELECZONA KONTROLA	
624-165	272	764-181	3470
625-166	1802	765-182	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		
MEDIANA WARTOŚĆ p (M-W)	1817	MEDIANA WARTOŚĆ p (M-W)	1153
ŚREDNIA ODCHYLENIE STANDARDOWE % CV (współczynnik wariancji) WARTOŚĆ p (TEST t)	1931 1718 39 n=16	ŚREDNIA ODCHYLENIE STANDARDOWE % CV (współczynnik wariancji) WARTOŚĆ p (TEST t)	1325 1769 97 n=15

FIG. 15A

KORA

2 mg ALUN 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
MEDIANA WARTOŚĆ p (M-W)	2051	MEDIANA WARTOŚĆ p (M-W)	1741
ŚREDNIA ODCHYLENIE STANDARDOWE % CV (współczynnik wariancji) WARTOŚĆ p (TEST t)	2407 1913 79 n=20	ŚREDNIA ODCHYLENIE STANDARDOWE % CV (współczynnik wariancji) WARTOŚĆ p (TEST t)	2140 1659 78 n=21

FIG. 15B

KORA

25 μ g QS21 100 μ g AN1528		CEA/IFA 100 μ g 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		
MEDIANA WARTOŚĆ p (M-W)	1199	MEDIANA WARTOŚĆ p (M-W)	475 0.0481
SREDNIA ODCHYLENIE STANDARDOWE % CV (współczynnik wariancji) WARTOŚĆ p (TEST t)	1552 1364 83 n=21	SREDNIA ODCHYLENIE STANDARDOWE % CV (współczynnik wariancji) WARTOŚĆ p (TEST t)	637 655 103 0.0106 n=15

FIG. 15C

KORA

5 µg TYMEROZAL/PBS 10 µg AN1792		2 µg ALUN 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	15
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	786-016	285
		787-017	3102
		788-018	1617
		789-019	1474
		815-020	424
		816-021	1375
		817-022	2323
MEDIANA WARTOŚĆ p (M-W)	1687	MEDIANA WARTOŚĆ p (M-W)	1375 0.5000
ŚREDNIA ODCHYLENIE STANDARDOWE % CV (współczynnik wariancji) WARTOŚĆ p (TEST t)	2718 2635 99 n=15	ŚREDNIA ODCHYLENIE STANDARDOWE % CV (współczynnik wariancji) WARTOŚĆ p (TEST t)	1394 1166 84 0.2650 n=21

FIG. 15D

KORA

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		
MEDIANA	774	MEDIANA	950
WARTOŚĆ p (M-W)	0.1710	WARTOŚĆ p (M-W)	0.4076
SREDNIA	1192	SREDNIA	2199
ODCHYLENIE STANDARDOWE	1299	ODCHYLENIE STANDARDOWE	4187
% CV (współczynnik wariancji)	109	% CV (współczynnik wariancji)	190
WARTOŚĆ p (TEST t)	0.1506	WARTOŚĆ p (TEST t)	0.8131
	n=21		n=18

FIG. 15E

