

非放射性担体量：一回に投与できる投与量は、動物実験で確認された無毒性量（単回投与）の1,000分の1未満、且つ、10 µg 以下とする。FACTの無毒性量は雌雄マウスで1 mg/kg であるから、その1,000分の1の量は1 µg/kg となる。通常、検査対象となる成人の体重は40 kg 以上であるから、本注射液は、非放射性担体量が10 µg (= 27 nmol) 以下となる範囲で投与できる。

最大量の10 µg を投与した場合、分布容積を42 L (0.7 L/kg x 60 kg) とすれば非放射性担体の生体内濃度は 2.38×10^{-10} g/mL となる。このとき、生体内濃度はFACTの変異原性試験(Ames test) で有意な変異が認められた最小濃度 30.0×10^{-6} g/mL の100,000分の1以下となることから、本注射液の変異原性に対する安全性に問題はないと考えられる。

ポリソルベート 80 投与量：ポリソルベート 80 に対する安全性を確保するために、一回に投与できるポリソルベート 80 の量は、医療用医薬品（注射剤）として認可されているポリソルベート 80 含有医薬品を医薬品添付文書の用法に従って投与した場合に投与されるポリソルベート 80 の最大量を超えないものとする。本注射液を投与する場合においては、一回に投与できる量を50 mg 以下とする。（ ^{11}C BF-227 注射液の基準書を参照のこと）

被曝線量

正常 ICR マウスにおける ^{18}F FACT の体内分布実験の結果*1 から、検査後（投与 60 分後）に排尿することを前提として MIRD 法により各臓器の推定被曝線量を推定した場合、以下の表に示す値となる*2。

臓器	線量 (µGy/MBq)	臓器	線量 (µGy/MBq)
脳	2.37	上方大腸壁	30.5
甲状腺	3.51	下方大腸壁	15.9
胸腺	4.07	副腎	8.34
乳房	3.80	腎臓	15.8
心臓壁	6.03	精巣	4.63
肺	6.12	卵巣	21.3
肝臓	50.9	子宮	20.4
脾臓	9.00	膀胱壁	43.4
脾臓	6.17	骨	6.77
胃壁	8.52	骨髄	7.76
小腸壁	231	筋肉	5.57

全身（体重 57 kg で推定）の実効線量当量は13.9 µSv/MBq（男）、17.0 µSv/MBq（女）である。1回の投与量を5 mCi とすれば全身の実効線量は2.57 mSv（男）、3.15 mSv（女）である。

*1 マウスにおける¹⁸F]FACTの体内分布は以下の通りである。

経過時間(分)	平均%ID/g (n=4)					標準偏差				
	2	10	30	60	120	2	10	30	60	120
血液	3.65	2.54	1.19	0.64	0.44	0.66	0.35	0.49	0.13	0.08
心臓	5.84	2.25	0.88	0.55	0.39	0.54	0.20	0.12	0.07	0.12
肺	6.99	3.36	1.66	1.06	0.60	0.37	0.11	0.26	0.07	0.11
肝臓	9.38	10.9	11.3	14.06	11.7	0.43	0.55	1.32	0.55	1.77
脾臓	3.49	2.15	0.84	0.52	0.34	0.73	0.29	0.26	0.09	0.08
小腸	4.19	8.09	10.1	13.9	15.9	0.73	0.82	0.43	3.01	3.20
腎臓	10.2	6.00	4.17	3.25	2.47	1.05	0.52	0.44	0.27	0.55
膀胱	2.77	4.31	17.9	7.70	5.42	0.61	2.16	21.78	3.10	8.81
脳	4.64	1.66	0.53	0.28	0.22	0.55	0.16	0.11	0.04	0.05
骨	1.84	1.32	0.88	1.38	1.55	0.18	0.07	0.07	0.46	0.22
筋肉	3.44	1.45	0.66	0.55	0.27	0.31	0.15	0.10	0.24	0.04
皮膚	1.76	1.84	1.19	0.84	0.46	0.20	0.10	0.19	0.31	0.11

*2 放射線医学総合研究所において使用されているMIRDOS Eソフトウェア(Mac Ver.1, MIRS)を用いて算出した。本ソフトウェアでは計算に用いる成人体重は57kgと設定されている。独立行政法人産業技術総合研究所化学物質リスク管理センターが公開している暴露係数ハンドブック(<http://unit.aist.go.jp/crm/exposurefactors/>)では、日本人成人体重の代表値は男性で64.0kg、女性で52.7kgとしており、平均をとれば58.3kgとなる。従って、推定被曝線量の計算に用いる成人体重57kgという値は、日本人成人平均体重の代表値ときわめて近く、且つ若干低い値であることから、被曝線量の基準値(最大値)を定める計算において使用するのには妥当であり問題はないと考えられる。

文献

1. Furumoto S, et al, "Recent advances in the development of amyloid imaging agents.", *Curr Top Med Chem* (2007); 7, 1773-1789.
2. Klunk WE, et al, "Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B.", *Ann Neurol* (2004); 55, 306-319.
3. Kudo Y, et al, "2-(2-[2-Dimethylaminothiazol-5-yl]ethenyl)-6-(2-fluoro-ethoxy) benzoxazole: a novel PET agent for in vivo detection of dense amyloid plaques in Alzheimer's disease patients." *J Nucl Med* (2007); 48, 553-561.

PET 診断用放射性薬剤製造記録・手順書

製造担当者: _____、_____。

- ◆ 薬 剤 名 : [¹⁸F]FACT
- ◆ 製 造 日 : 平成_____年_____月_____日
- ◆ 製 造 番 号 : FACT-_____
- ◆ 合 成 方 法 : [¹⁸F]フッ素イオンを用いる自動合成
- ◆ 製 造 装 置 : HM12 サイクロトロン、[¹⁸F]FACT 標識合成装置、リガンド合成装置

1. [¹⁸F]FACT 合成・検定結果

- ・ 照 射 開 始 時 間 : _____ (照射時間: _____ 分 (通常 30 分))
- ・ 合 成 開 始 時 間 : _____ 回収 ¹⁸F 値 _____
- ・ 検 定 時 間 : _____ 合成収量 _____ mCi
- ・ 供 給 放 射 能 量 : _____ mCi
- ・ 放 射 化 学 的 純 度 : _____ % (HPLC 分析による)
- ・ 比 放 射 能 : _____ Ci/μmol
- ・ pH : _____ (万能試験紙による)
- ・ ポリソルベイト 80 : _____ mg

2. コメント: _____

3. 使用する試薬・ディスプレイ部品・滅菌容器

名称	メーカー	規格	指図書	確認	用途
THK-762 (M.W.515.6)	(注 1)		5 mg (9.7 μmol)		出発原料
DMSO	Sigma-Aldrich	無水	1 mL		反応溶媒
Kryptofix 222 (M.W. 376.5)	Merck	特級	20 mg (53.1 μmol)		反応触媒
K ₂ CO ₃ (M.W.138.2) 水溶液	和光純薬	86.4 mM	0.2 mL (K ⁺ : 34.6 μmol)		¹⁸ F-溶離
K ₂ CO ₃ (M.W.138.2) 水溶液	和光純薬	0.5 M	10 mL		QMA 調整
Sep-Pak Accell QMA	Waters	(注 2)	1 個		陰イオン交換
Sep-Pak Plus tC18	Waters	(注 3)	2 個		固相抽出
アセトニトリル	同仁化学	有機合成用	0.7 mL		¹⁸ F-溶離
アセトニトリル	同仁化学	有機合成用	3 mL		共沸
注射用蒸留水	大塚製薬	日本薬局方	20 mL		洗浄
生理食塩液	大塚製薬	日本薬局方	7 mL		注射液調製
20mM NaH ₂ PO ₄ /MeCN=70/30	和光純薬/ 関東化学	(注 4)	10 mL (2 mL)		洗浄・溶出液
20mM NaH ₂ PO ₄ /MeCN=60/35	和光純薬/ 関東化学	特級/ HPLC 級	1 L		HPLC 溶離液
エタノール	和光純薬	特級 99.5%	20 mL		洗浄・溶出液

日本薬局方アスコルビン酸注射液 ビタミンC「ヒシヤマ」25%	ニプロファーマ	25% (注 5)	1.2 mL		安定化剤
5%ポリソルベイト 80/EtOH		(注 6)	0.5 mL		溶解補助剤
丸底バイアル	Wheaton	10 mL	1 個		反応容器
Teflon-rubber septum	Wheaton	-	1 枚		シール
滅菌用フィルター (滅菌済)	ミリポア	Milex-GV	1 個		滅菌
褐色バイアル (滅菌済)	日電理化硝子	15 mL	1 個		薬剤供給
蒸発乾固器具シリンジ式	トップ				試料採取・乾固

注 1) 委託合成品 (MW=515.6, 1.93 μmol/mg)。5 mg (9.7 μmol) を使用する。

注 2) 0.5 M-K₂CO₃ 水溶液 5 mL で洗浄し炭酸イオン形とし、蒸留水 5 mL で洗浄し、空気を十分に送り水分を除去する (¹⁸O-ターゲット水の回収時における濃縮度低下を防止)。

注 3) 特級 EtOH (99.5%) 5 mL で洗って活性化し、ついで注射用蒸留水 5 mL で洗い流す。

注 4) 20 mM 溶液の調製。NaH₂PO₄·2H₂O (M.W. 156.0) 7.8 g を注射用蒸留水で 1 L に (メスシリンダーで) メスアップする。

この溶液 70 mL を取り、特級アセトニトリル 30 mL を加えて 100 mL (70/30) とする。

20 mM NaH₂PO₄ を 600 mL 取り、HPLC 級アセトニトリル 350 mL を加えて 950 mL (60/35) の溶離液を調製する。ミリポアフィルターで吸引し脱気処理後に密閉保存する。

注 5) 使用直前に冷蔵庫から取り出し、アンプル開封後すぐに使用する。HPLC 分取液リザーバー内の蒸留水 (30 mL) に 1 mL を添加し、固相抽出時の放射線分解を防止する。また、0.2 mL を蒸発乾固のエバポレータフラスコに加える (ロータリエバポレータに装着時に、容器の底に注入する)。

注 6) 特級 polyoxyethylene(20) sorbitan monooleate (和光 164-15741、5 g) と日本薬局方エタノールから自家調製 (冷蔵保存) する。

4. 照射・合成開始前の確認事項

照射関連 (Clean room)

- 圧縮空気供給バルブ (開) 加圧確認。コンプレッサー始動中確認。Air 圧力 5 Bar (5 kg/cm²)
- 高純度 He ボンベバルブ (開) ターゲット加圧用。ボンベ 2 次圧は 1.2 MPa (12 kg/cm²)
- ターゲット移送用。ライン圧は 0.5 MPa (5 kg/cm²)、流量調整バルブは、流速 150 mL/min。
- ホットセル A、B の OUTLET ボタンを押し、ホットセルに電源を供給する。
- 液晶ディスプレイ電源、モニター切り換え器 (18F-ポジション)、ビデオモニター電源、ビデオカメラ表示を確認。
- PC (制御卓下: Cupid 制御用) を起動。
- 制御 PC ディスクトップ上にある 18F-FACT アイコンをクリックし、Cupid を起動させる。
- Cupid プログラムの 18O-Water Supply を起動させる。Target Supply のプログラムを実行し、ターゲットにターゲット水を供給する。(事前にターゲット室内の ¹⁸O-ターゲット水の残量を確認しておく)

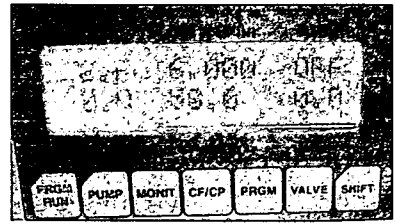
合成関連 (Clean room)

- 専用ノート PC を起動し、インターフェイス BOX の電源を入れた後 PC と USB 接続する。
- HUB 電源、ビデオモニター電源、ビデオカメラ表示を確認する。
- 高純度 He ボンベバルブ (開) の圧力を確認する。ボンベ 2 次圧は 0.28 MPa (2.8 kg/cm²) であること (1.6 kg/cm² 未満は使用不可)。
- ホットセル A 内の、合成装置近くにあるレギュレーターの圧力が 0.08 MPa (0.8 kg/cm²) になっていることを確認する。
- HPLC 溶媒廃液ビンが一杯になっていない。(エバポレータ設置の遮蔽 BOX 内)
- ホットセル B 下段の、冷却トラップ内の廃液はバルブを開けて抜き、閉めておく。

- 滅菌バイアル（褐色）と薬剤回収装置の生食入りシリンジを組み立てセットする。

5. HPLC 分取カラムの調整

- 分取溶媒（20mM NaH₂PO₄/MeCN=60/35）を 300 mL 以上用意する。
- [¹⁸F]FACT 専用 HPLC カラム（Inertsil ODS-3、250 × 10 mm ID）に上記溶媒を 50 mL 以上流して調整する。圧力が 9.3 MPa 程度になれば、ポンプを停止しておく。
- [¹⁸F]フッ素化反応終了 4 分前ぐらいに再度ポンプを動作させる。



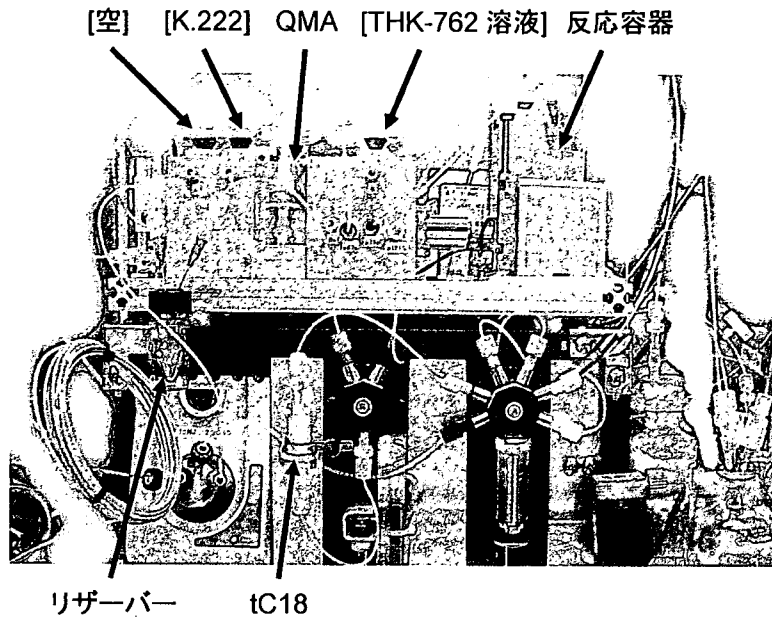
6. 合成準備

[¹⁸F]FACT 標識合成装置（洗浄プロセスは終了しているものとして記述している。）

- 専用ノート PC で[¹⁸F]-FACT 合成プログラムを起動する。インターフェース BOX の AD/DA と DO の緑 LED 点灯確認する。（PSD4 ユニットのイニシャライズ動作が起こらない時にはプログラムの Options タブを選択、選択されている RS-232c リソース名とデバイスマネージャで実際の COM 番号を確認。リソース名入力後、合成プログラムを QUIT して停止し、次にメニューの再実行ボタンで再度実行する。OS の仕様により USB コネクタの接続場所を変更すると再度ドライバーがインストールされる）
- 分取用の UV 検出器の電源を入れ、波長を 400 nm に設定する。HPLC ポンプを作動させ、最初 3.0 mL/min の流速で 50 mL 以上流して分取カラムを置換し、次に流速を分取時の 6.0 mL/min まで上昇させ UV 吸収の表示が安定してから AUTO ZERO ボタンを押してゼロにする。フッ素化反応終了 4 分前までポンプを停止しておいてよい。
- Wheaton 丸底バイアル（反応容器）を用意し、針穴あきの専用 PEEK 蓋にテフロンラバーセパタム（赤色）光沢面が見えるようにはめ込み、反応容器にねじ込む。これを合成装置加熱部にセットする。蓋の穴の中心部に 22G のカテラン針（黒色長針）を刺し、ルアー部分を駆動部に引っ掛ける。残りの周りの穴に 25G（水色）の針（Waste ライン）、22G 針（黒色）の針 2 本（¹⁸F-フッ素イオン導入ライン、原料導入ライン）は針を途中で曲げて刺す（針先が蓋を突き抜けるくらいに留める）。
- Sep-pak tC18 を特級 EtOH 99.5% 5 mL、次いで注射用蒸留水 5 mL で洗い活性化した後、装置に接続する。
- Accell QMA に 0.5 M K₂CO₃ 水溶液 5 mL、次いで蒸留水 5 mL を流して炭酸イオン形に調製し、空気を十分に通して水分を切ってから装置に装着する。（前回使用した QMA は長半減期の放射能が数 kBq 程度残っているので専用容器に別途回収する）
- Waste ライン（施設 Waste ライン、MiniWaste ライン、PSDWaste ライン）を廃液ボトルにさす。
- HPLC インジェクターループ注入用リザーバー（V バイアル）に、予め蒸留水 0.7 mL を入れ装置にセットする。インジェクターバルブ側の 22G のカテラン針（黒色長針）を V バイアルの底まで刺す。電動 Y バルブ側の 22G のカテラン針（黒色長針）は V バイアルの底まで数ミリを残して刺す。
- 合成ブロックのリザーバーに各試薬を入れ、ポリ蓋をする。蓋 OPEN 防止ロック用の透明アクリルパネルを蓋上部までスライドする。リザーバー内容は向かって左端より
 - 左：カラ（¹⁸F/H₂¹⁸O 回収用）
 - 中：20mg K.222/0.7 mL MeCN と 33 mM K₂CO₃（0.2 mL）の混合液



- 右 : 5 mg THK-762/1 mL DMSO 溶液
- PSD/4 用の試薬溶液を用意する。
 - EtOH (99.5%)、約 20 mL
 - 水、約 20 mL
 - 20 mM NaH₂PO₄/MeCN (7/3)、約 10 mL



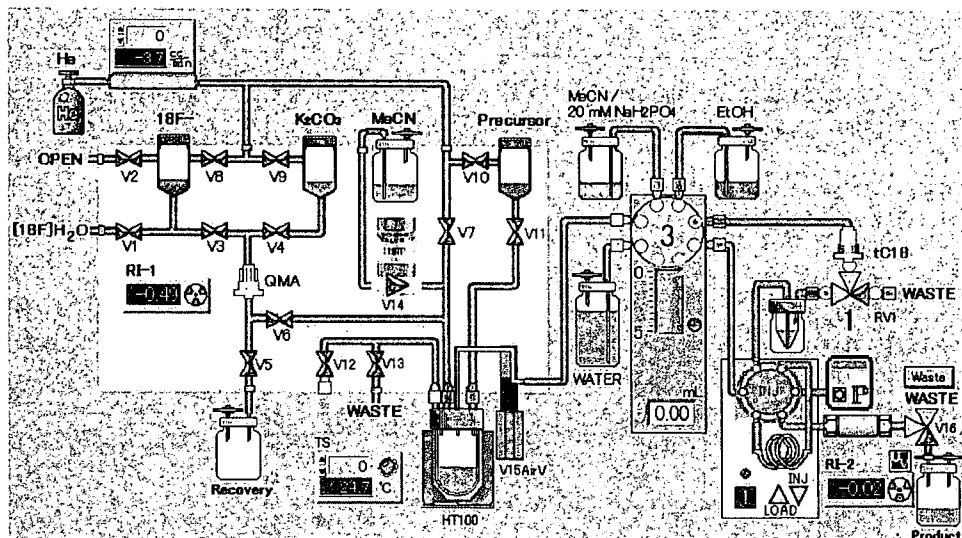
リガンド合成装置

- 注射用蒸留水と EtOH を準備する。(液の残量を確認する)
- 混合槽に注射用蒸留水 30 mL とアスコルビン酸 1 mL を入れ、装置にセットする。
- 活性化した Sep-Pak tC18 を装置に接続する。

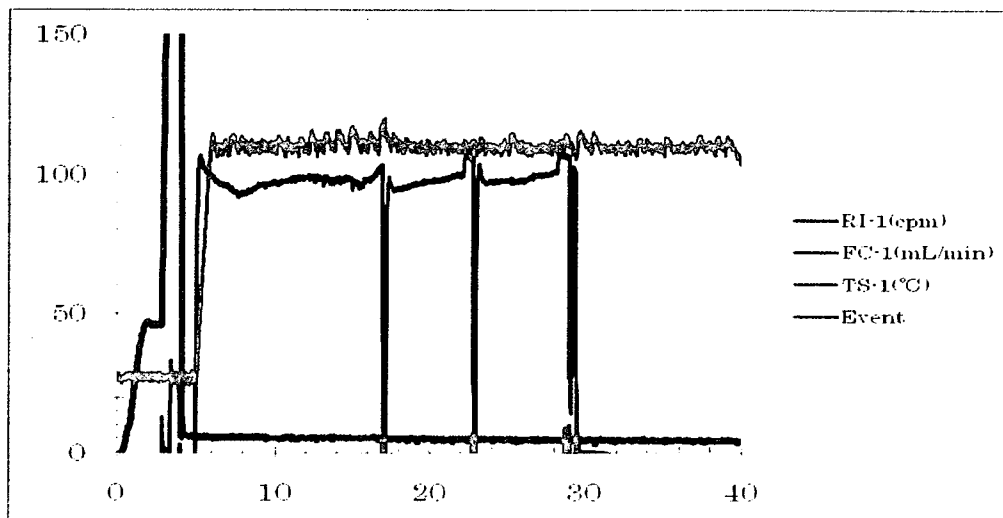
ロータリエバポレータ、回収装置

- エバポレータフラスコにポリソルベイト 80 を 0.5 mL とアスコルビン酸 0.2 mL を入れ、装置にセットする。
- 回収装置に生理食塩液水入りのシリンジ、三方活栓、フィルター付の滅菌バイアルをセットする。

7. 合成手順



1. ¹⁸F 製造の照射を終了したら、合成装置の「Recovery」プログラムを実行した後、Cupid の Recovery プログラムを実行する。
2. ¹⁸F-フッ素イオンが合成装置に移送され、RI センサー値が一定になれば、Cupid の確認ボタンを押した後、合成装置側の確認ボタンを押して次のステップに進む。
3. ¹⁸F-フッ素イオンが QMA に移送されるので、RI センサーの値が一定になれば、確認ボタンを押して、次のステップに進む。
4. He 流量を確認しつつドライアップの過程を終える。

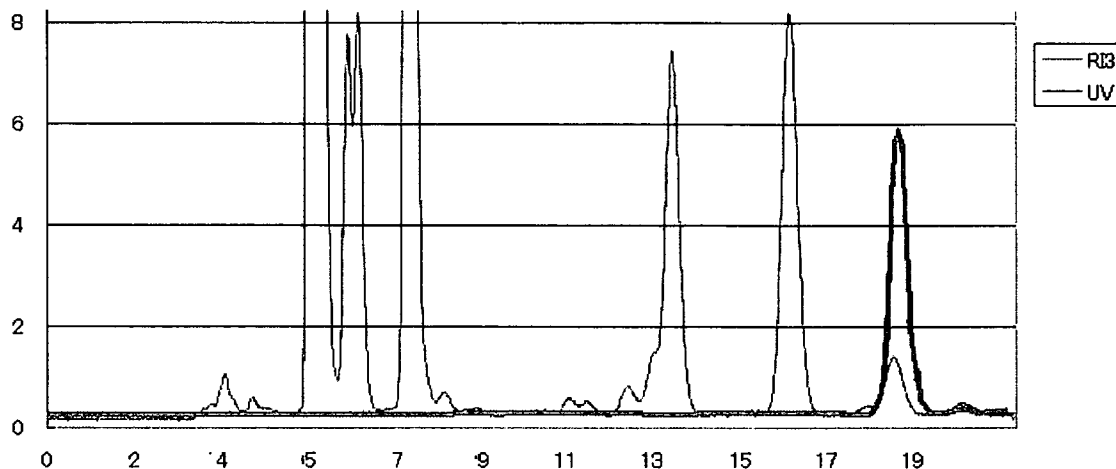


5. HPLC 分取カラムに注入する溶液がリザーバーに移送され、ループに引き込まれる。
6. Inject?と聞かれてくるので、Cupid のトレンドグラフに記しをつける準備をし、Inject を実行する。
7. リガンド合成装置の「分取」プログラムを実行する。Collect?とポップアップがでるので、約 17 分過ぎに目的物が溶出し始めたら、ボタンを押して分取を開始する。
8. 約 1 分程度で溶出放射能が減少するので、UV 検出器の値が増加して不純物が溶出する前に Collected? はいを押して分取を終了する。

カラム Inertsil ODS Φ10*450

溶離液 20mM NaH₂PO₄/MeCN=60/35

071011A 分取クロマト



9. 真空ポンプを作動させ溶媒留去を行う。乾固し過ぎると分解の恐れがあるので、鉛ガラス越しにフラスコ内の溶液残量を注意深く監視する。
10. 留去後、生食による回収操作を行う。

注意：合成中はホットセル内の電気を消し、できるだけ遮光する。

8. 合成終了後の処置

1. HPLC 溶媒を MeCN に換え、流速 4.0 mL/min で 100 mL 以上カラムを洗う。
2. 合成装置の試薬リザーバー（一番左を除く）に MeCN を入れ、He で押し出しリザーバー内を洗浄する。
3. シリンジポンプ、移送ラインに EtOH、水をそれぞれ流し十分に洗浄する。
4. 必要であれば、PC 上のトレンドグラフに表示されているデータで必要部分を保存した後これを終了する。
5. コントローラー、ホットセルなどの電源を切る。
6. He ボンベ、圧縮空気のバルブを閉じる。

Version 3 Feb. 18, 2008

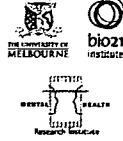
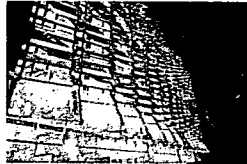
Version 2 Dec. 14, 2007

Version 1 Nov. 13, 2007

資料 2

Molecular determinants of amyloid peptide toxicity in Alzheimer's disease.

Roberto Cappai
Department of Pathology,
The University of Melbourne, AUSTRALIA



Japan Association for the Advancement of Medical Equipment (JAAME FELLOWSHIP)

Alzheimer's disease

- Most common cause of dementia
- Described by Alois Alzheimer on Nov 4, 1906 at the 37th Conference of South-West German Psychiatrists in Tübingen
- 1st patient was Auguste D (see Maurer, Lancet Vol 349, 1997)
- admitted Nov 25, 1901 to a Frankfurt hospital aged 51
- died April 8, 1906
- forgets her name, her husband's name, the name of common objects and had a transformed personality (jealousy towards her husband)
- autopsy showed deposits around her brain cells, as well as twisted fiber bands within the cells



Alzheimer's Disease

- Prevalence: 5% of individuals aged 65 years, 20–30% of 85-year olds
- With life expectancy increasing across the world, AD poses an increasing medical and socio-economic problem
- Treatment strategies are likely to be most effective if administered early
- No method of definitive early diagnosis, or predictive whether a person is likely to develop AD
 - Mild cognitive impairment (MCI): 40–60% develop AD

Pathological hallmarks of Alzheimer's disease



Neurofibrillary Tangles

Intracellular

Hyperphosphorylated tau

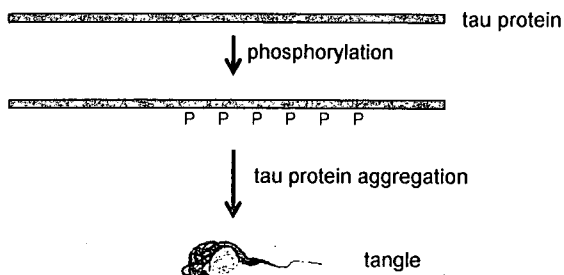


Amyloid Plaque

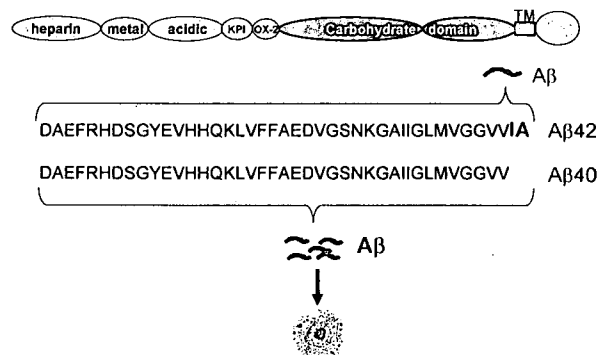
Extracellular

Aβ peptide

Tau protein in Alzheimer's disease

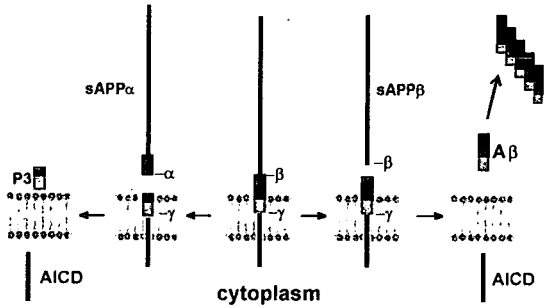


Amyloid Precursor Protein (APP)

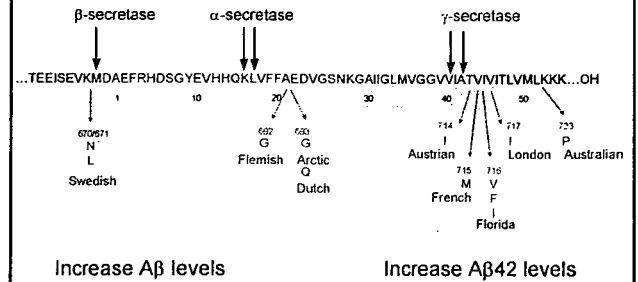


Processing of APP into Aβ by the secretases

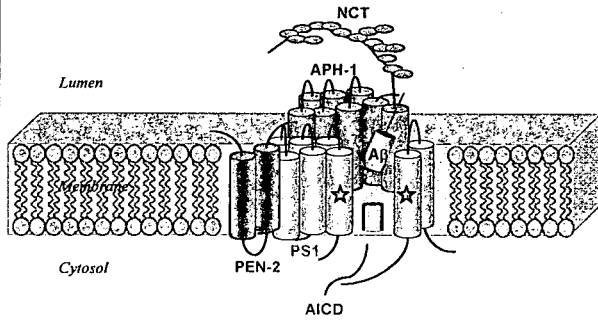
α = α-secretase, β = β-secretase, γ = γ-secretase



Inherited AD APP mutations occur at, or are near, the secretase cleavage sites



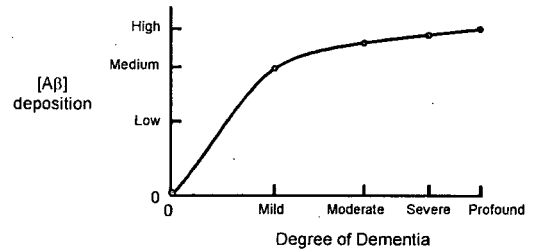
γ-secretase



PS1 = presenilin-1; NCT = Nicastrin, APH-1 = anterior pharynx-defective phenotype 1, PEN-2, presenilin enhancer 2

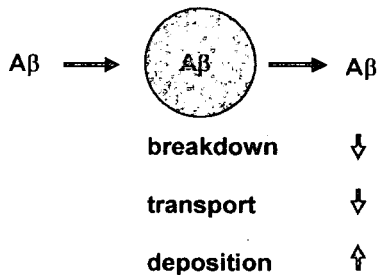
Aβ is the toxic species

Sporadic AD - increase in Aβ levels as disease progresses

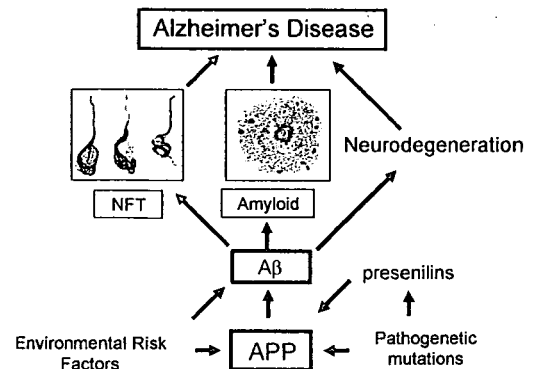


Sporadic AD - The Aβ Balance Sheet

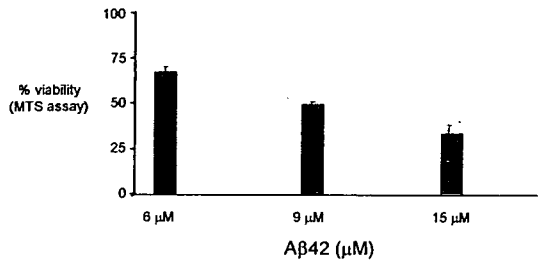
synthesis - clearance = load



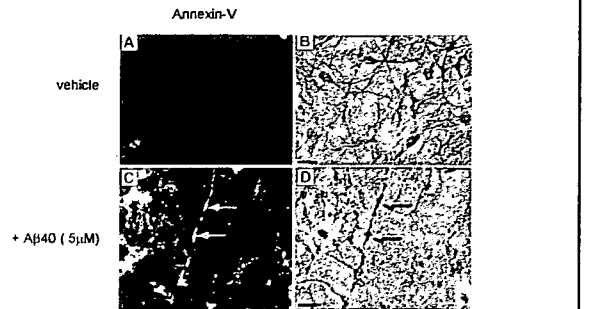
Aβ is a central determinant in AD



Aβ is neurotoxic to primary cortical neurons



Aβ toxicity - activation of apoptosis in cultured primary cortical neurons



White et al Neurobiol Disease 2001

Alzheimer's disease correlates with soluble Aβ

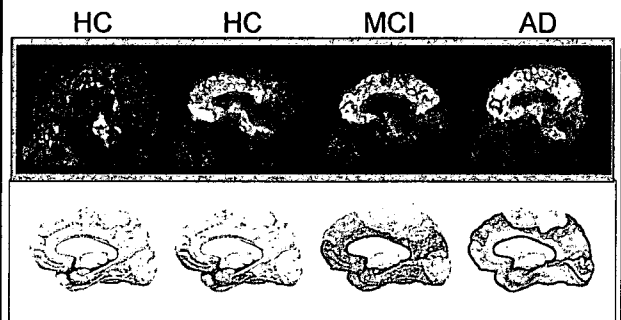
	Mean levels of Aβ (μg/g) in frontal cortex		
	Soluble Aβ (μg/g)	Insoluble Aβ (μg/g)	Proportion soluble (%)
Controls (n=18)	0.013±0.012	3.7±4.1	0.3
AD (n=18)	0.24±0.23*	34.41±35.34**	0.7
Fold increase	18	9	

McLean et. al. Annals Neurol (1999)

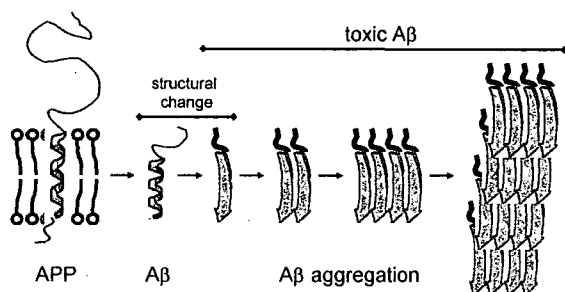
- toxic species is a soluble oligomer
- ADDLs (Aβ-derived diffusible ligands), amylopheroïd, Aβ*56
- dimer to dodecamer (12-mer), 5 -15 nm

Aβ burden and plaque deposition

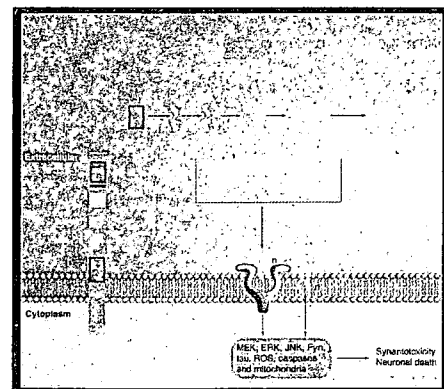
PIB binding matches histopathology of Aβ



A change in shape/structure produces toxic Aβ



Mechanisms of Aβ toxicity



Modulators of A β toxicity
- the role of copper and cell binding

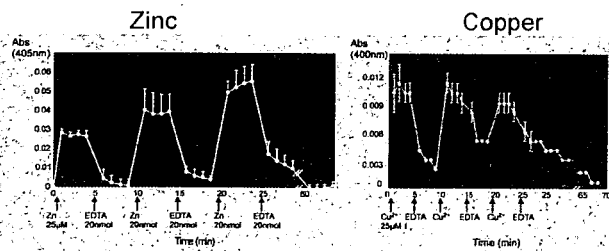
Metals and Alzheimer's disease

	Copper (ug/g)	Iron (ug/g)	Zinc (ug/g)
Control neuropil (n= 5)	4.4 \pm 1.5	18.9 \pm 5.3	22.6 \pm 2.8
AD neuropil (n= 9)	19.3 \pm 6.3	38.8 \pm 9.4	51.4 \pm 11.0
senile plaques	25.0 \pm 7.8**	52.5 \pm 13.7*	69.0 \pm 18.4*

* $P < 0.05$, ** $P < 0.08$

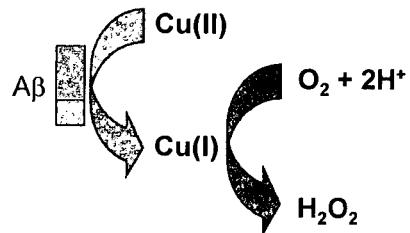
Lovell et al. (1998) J Neurological Sciences

Zn and Cu precipitate A β rapidly and reversibly

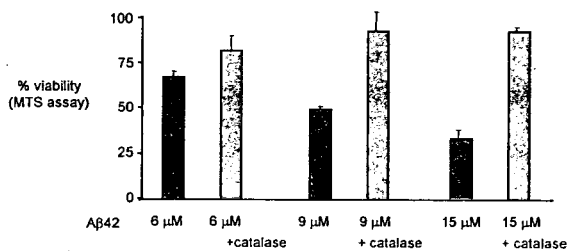


Bush et al., Science, 265, 1464 (1994)
Bush et al., J. Biol. Chem. 269, 12152 (1994)
Huang et al., J. Biol. Chem. 272, 26464 (1997)

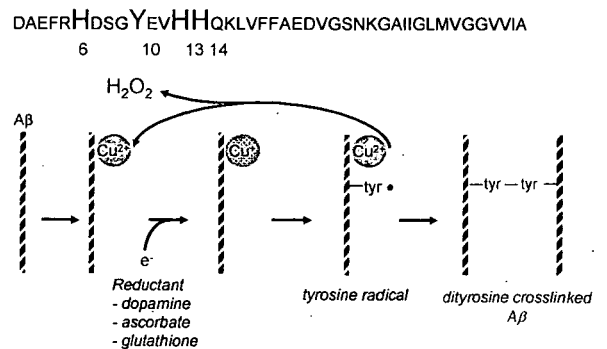
A β binds copper and generates hydrogen peroxide



A β neurotoxicity is H₂O₂ mediated
- inhibition by catalase



The A β :Cu reaction scheme

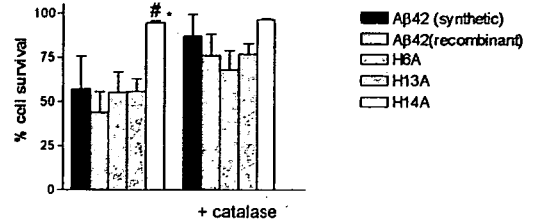


Barnham et al FASEB J 2004

Testing the role of the histidines in Aβ toxicity - alanine substitution mutants

DAEFRADSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
 DAEFRHDSGYEVAHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
 DAEFRHDSGYEVHAQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA

Neurotoxicity of Aβ histidine:alanine mutants

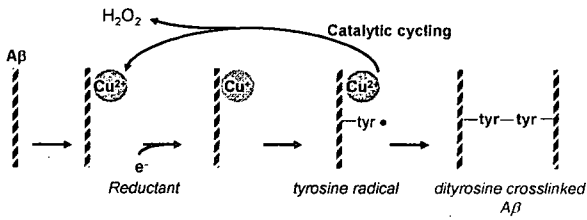


DAEFRADSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA

The H14A substitution mutant is *not* toxic

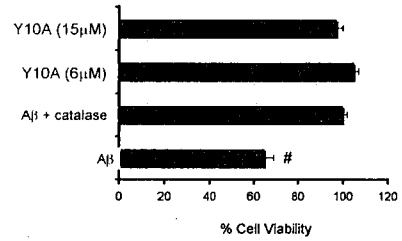
(Smith unpublished data)

The role of tyrosine in Aβ toxicity



DAEFRHDSG**Y**EVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
 6 10 13 14

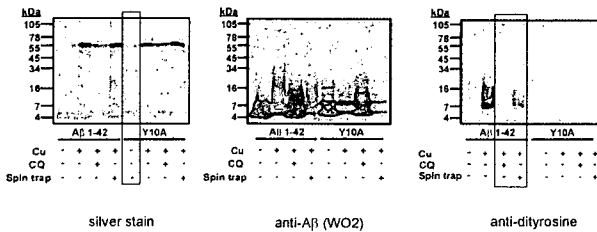
Tyrosine 10 is critical for Aβ toxicity



Barnham *et al* FASEB J 2004

Aβ Y10A can form oligomers but is not toxic.

Barnham *et al* FASEB J 2004

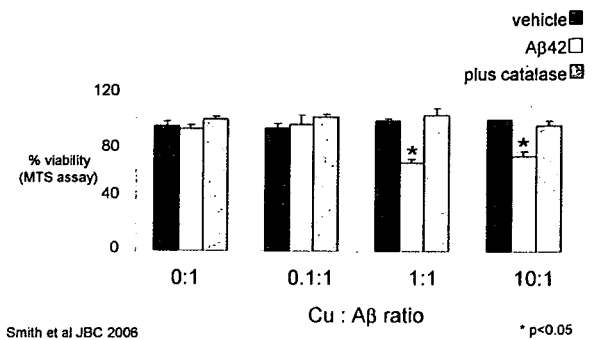


Aβ toxicity correlates with di-tyrosine formation

	Cu Binding	Redox Activity	Di-tyrosine Formation	Fibril Formation
Toxic Aβ				
Aβ (WT)	+	+	+	+
H8A, H13A	+	+	+	+
Non-toxic Aβ				
Y10A	+	+	-	+
H14A	+	+	-	+

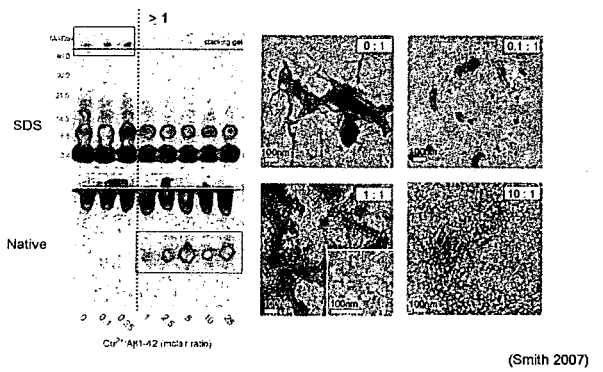
Does the copper:A β ratio modulate A β toxicity?

The copper:A β ratio modulates A β toxicity



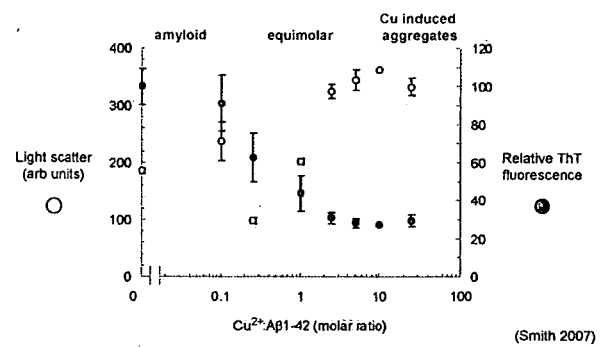
How does the copper:A β ratio modulate A β toxicity?
- effects on A β aggregation

The copper:A β ratio modulates A β aggregation



Are Cu induced aggregates on the amyloid forming pathway?

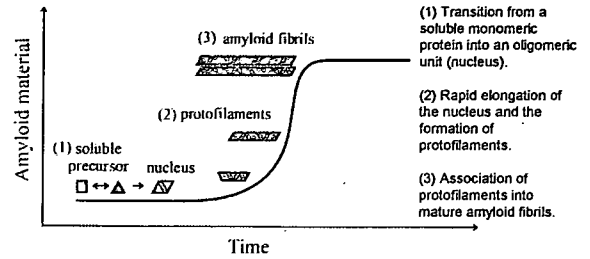
The copper:A β ratio affects A β amyloid formation



Are Cu induced aggregates on the amyloid forming pathway?

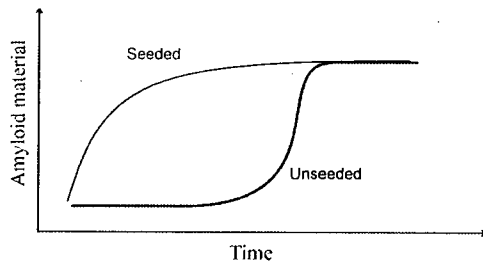
- ability to seeding amyloid formation

Lag-dependent amyloid fibril growth

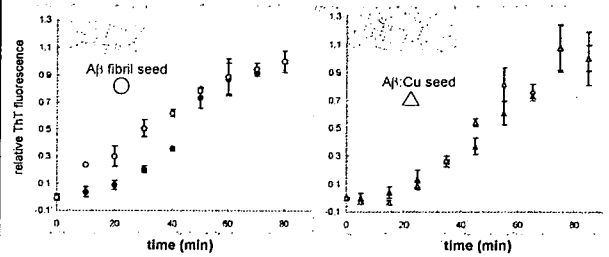


Seeding abolishes the lag phase

Seeding the reaction with preformed amyloid material results in the loss of the lag phase.

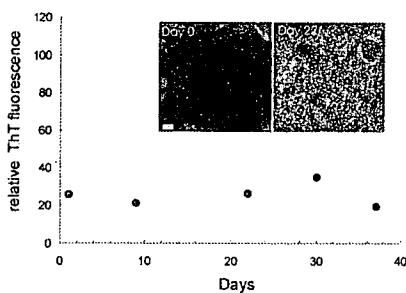


Cu induced aggregates are off the amyloid pathway



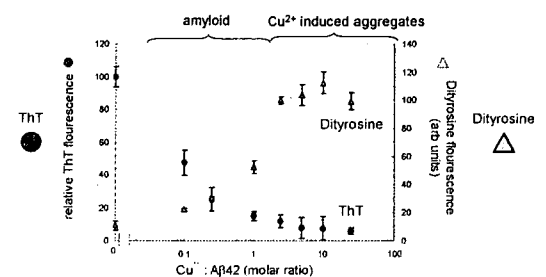
The Aβ:Cu aggregate has no seeding activity. (Smith 2007)

Supra-stoichiometric Cu:Aβ ratio remains amyloid negative for a long time



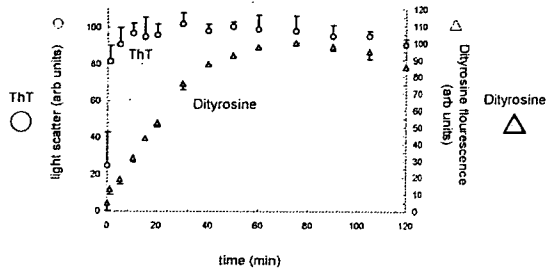
Long term growth of 10 μM Aβ42 at Cu(II) : peptide molar ratio of 2.5:1

Dityrosine generation is dependent upon Cu aggregate formation



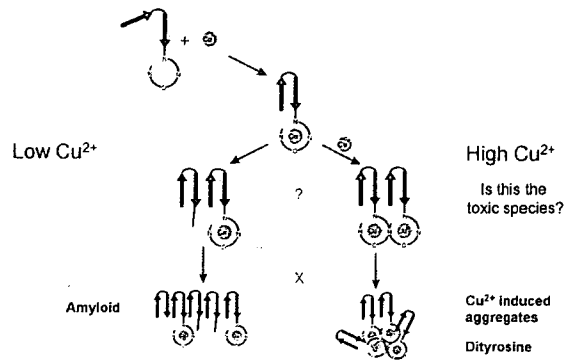
• Equimolar Cu:Aβ ratio and above leads to increased levels of dityrosine.

Dityrosine formation is a consequence of oligomer formation and does not drive aggregate formation

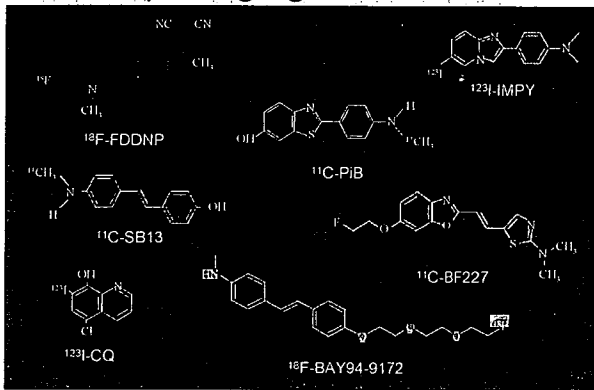


Dityrosine formation and aggregate formation monitored at Cu:Aβ ratios of 2.5 : 1

Model of Cu²⁺ induced Aβ aggregation

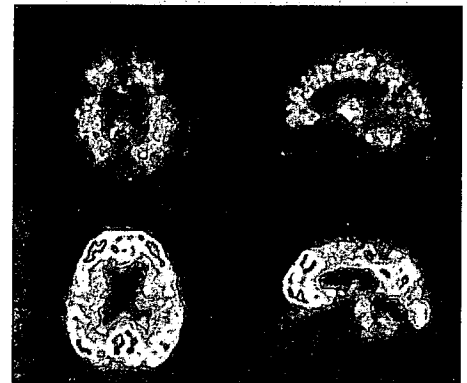


Aβ imaging in humans



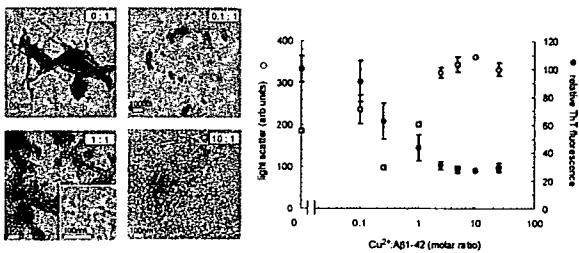
¹¹C-PIB

DVR



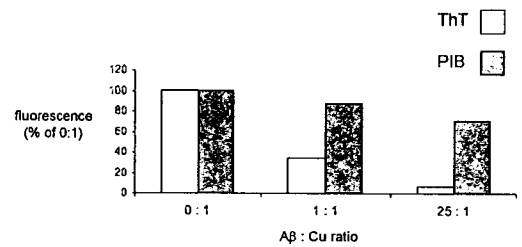
Villemagne/Rowe

The copper:Aβ ratio modulates Aβ aggregation



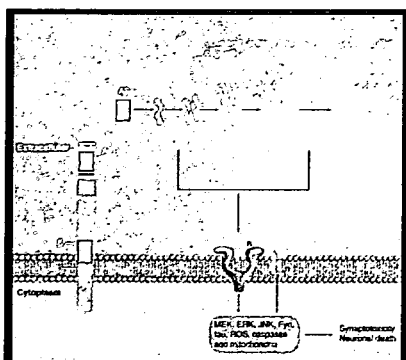
Smith 2007

Differential recognition of Cu-induced Aβ-aggregates by PIB and ThT

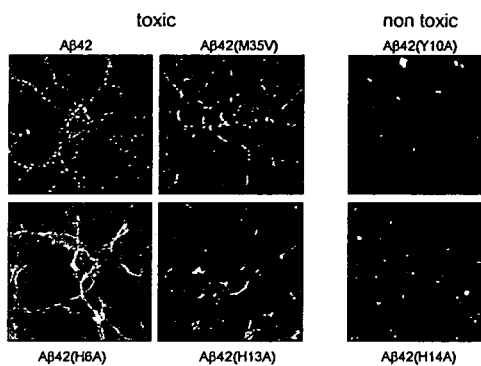


(Fodero-Tavoletti)

Mechanisms of Aβ toxicity - role of cell binding



Aβ toxicity correlates with cell membrane binding

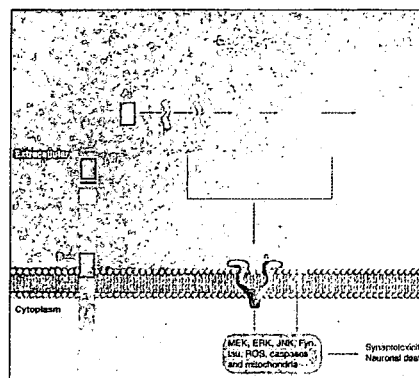


unpublished

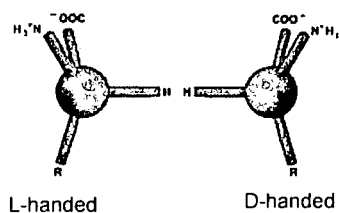
Aβ toxicity correlates with cell membrane binding and di-tyrosine formation

	Cu Binding	Redox Activity	Di-tyrosine Formation	Fibril Formation	Membrane Association
Toxic Aβ					
Aβ (WT)	+	+	+	+	+
H6A, H13A	+	+	+	+	+
Non-toxic Aβ					
Y10A	+	+	-	+	-
H14A	+	+	-	+	-

Aβ toxicity - receptor vs membrane

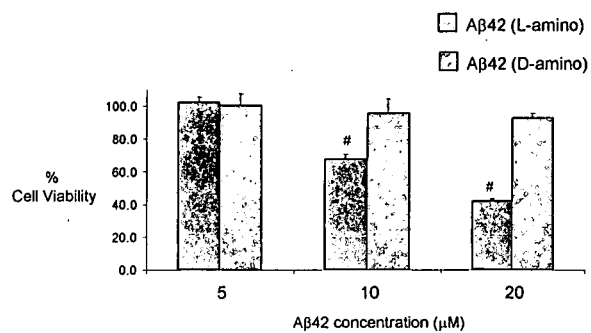


L-handed vs D-handed

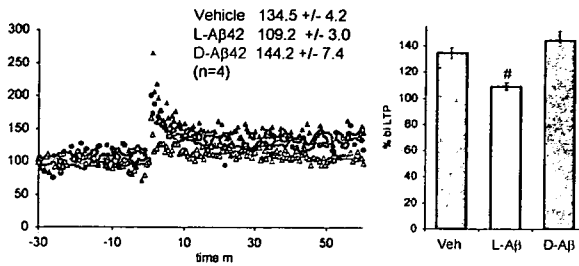


- Stereoisomers only bind to their homologous counterpart
- D-handed Aβ should not bind to a protein Aβ receptor

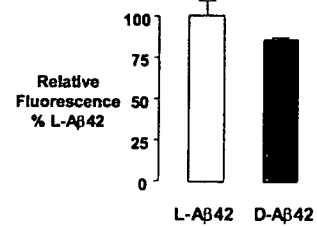
D-handed Aβ42 is not toxic



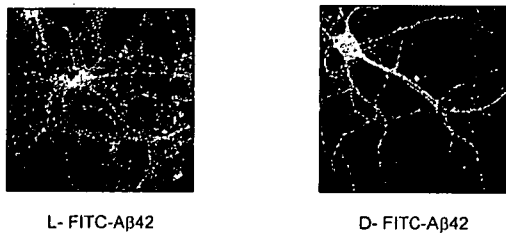
D-handed A β 42 does not inhibit LTP



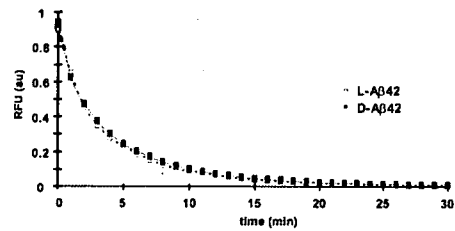
D-handed A β 42 generates dityrosine



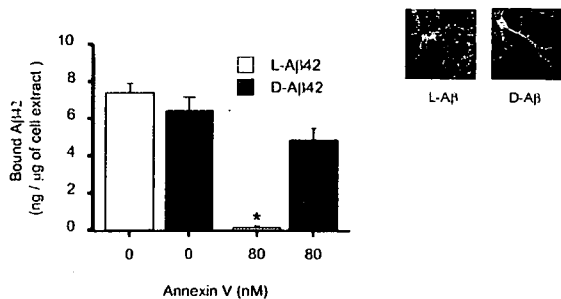
D-A β binds to primary cortical neurons



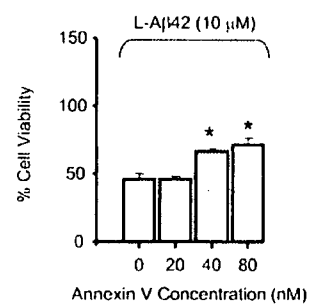
L- A β and D-A β bind to synthetic phosphatidylserine lipids



Annexin V inhibits L-A β , but not D-A β , cell binding



L-A β toxicity is inhibited by Annexin V



A β toxicity correlates with Annexin V inhibitable cell binding

	Cu binding	Redox Active	Fibril Formation	Dl-tyrosine Formation	Cell Binding	Annexin V Inhibited
Toxic A β A β (WT)	+	+	+	+	+	+
H6A, H13A	+	+	+	+	+	nd
Non-toxic A β Y10A	+	+	+	-	-	nd
H14A	+	+	+	-	-	nd
D-hand	+	+	+	+	+	-

Summary

- The A β toxic species correlates with a soluble cross-linked oligomer, with dl-tyrosine crosslinked A β as a likely candidate.
- A β 's neurotoxic and anti-LTP activity is mediated via a stereospecific cell binding interaction.
- A β 's neurotoxic activity is inhibited by Annexin V, presumably via inhibition of A β :phosphatidylserine binding.

A β oligomers, *per se*, do not necessarily correlate with toxicity

Cell binding, *per se*, does not necessarily correlate with toxicity

Current working model of A β toxicity

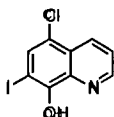
- Zn-induced oligomerization leads to amyloid fibrils (plaques) in Zn-enriched areas (Bush)
- Cu-induced dimers are linked initially by histidine cross-bridges, accelerated in the presence of PS, and also induces β -sheet soluble species (Tew 2008), with higher affinity for lipid (Lau 2005, Hung 2008), only partially penetrating lipid bilayer (Lau 2007)
- Cu:peptide ratio is important : at sub-equimolar form amyloid fibrils; at supra-equimolar soluble oligomers form first then with dityrosine cross-linkages (Smith 2007)
- Toxicity correlates with metal-induced dimers and trimers, blocked by annexin-V, specific for L-handed forms interacting with PS (Ciccotosto 2008)

Does interfering with A β : metal interactions have therapeutic value?

Interfering with A β metal interactions via Metal Protein Attenuating Compounds (MPACs).

CLIOQUINOL (iodochlorhydroxyquin, 5-chloro-7-iodo-8-hydroxyquinoline, CQ)

- USP drug used as an oral antiamebic antibiotic
- Chelates Zn²⁺ and Cu²⁺
- Crosses the blood brain barrier



Clioquinol inhibits A β toxicity

