



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 465**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/47** (2006.01)  
**C12N 15/62** (2006.01)  
**A61P 25/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09168110 .6**  
96 Fecha de presentación : **02.04.2002**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2123671**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.11.2009**

54 Título: **Composición de péptido inmunogénico para la prevención y el tratamiento de la enfermedad de alzheimer.**

30 Prioridad: **25.05.2001 US 865294**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**06.06.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**06.06.2011**

73 Titular/es: **UNITED BIOMEDICAL, Inc.**  
**25 Davids Drive**  
**Hauppauge, New York 11788, US**

72 Inventor/es: **Wang, Chang Yi**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 360 465 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Composición de péptido inmunogénico para la prevención y el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer.

## Campo de la invención

5 La presente invención se relaciona con una composición que comprende un inmunógeno del péptido útil para la prevención y el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer. Más particularmente, el inmunógeno del péptido comprende un sitio regulador/funcional principal, un fragmento N-terminal del péptido  $\beta$ (A $\beta$ ) Amiloide unido a un epitope de la célula T auxiliar (Th) que tiene múltiples motivos de enlace de MHC de clase II. El inmunógeno del péptido induce una respuesta inmune de sitio-dirigido contra el sitio regulador/funcional principal del péptido A $\beta$  y genera anticuerpos, que son altamente reactivos en cruz con el péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub> soluble y las placas amiloides formadas en el cerebro de los pacientes con la Enfermedad de Alzheimer. Los anticuerpos inducidos que son reactivos en cruz con el péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub> soluble, promueven la desagregación fibrilar e inhiben la agregación fibrilar conduciendo a la inmunoneutralización de las "toxinas derivadas de A $\beta$  soluble"; y que son reactivas en cruz con las placas amiloides, aceleran la liquidación de estas placas a partir del cerebro. De esta manera, la composición de la invención que comprende el inmunógeno del péptido es útil para la prevención y el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer.

## Antecedentes de la invención

20 La Enfermedad de Alzheimer (AD) es un trastorno crónico, neurodegenerativo caracterizado por una pérdida de la capacidad cognitiva y graves anormalidades del comportamiento en un paciente lo que conduce a la eventual muerte del paciente. En este momento existen 2.5 a 4.0 millones de pacientes con AD en los EE.UU. y 17 a 25 millones en todo el mundo. Es la cuarta causa que conduce a la muerte en las culturas Occidentales, precedida solamente por las enfermedades del corazón, cáncer, y accidente cerebro vascular. ARICEPT®, un inhibidor de la acetilcolinesterasa ha sido aprobado por la FDA, desacelerando la velocidad de descenso de los pacientes con Alzheimer. Sin embargo, es efectivo solamente por un periodo de tiempo limitado y en algunos pacientes. Hasta el momento no existe tratamiento o cura definitiva para esta devastadora enfermedad.

25 Dos depósitos microscópicos, i.e., ovillos neurofibrilares (NFT) y placas amiloides seniles, fueron identificados por Alois Alzheimer como las características patológicas de la enfermedad. Los ovillos neurofibrilares consisten de dos filamentos de 10nm de ancho trenzados uno alrededor del otro, conocidos como filamentos helicoidales apareados (PHFs), del cual un importante componente es tau fosforilada. La fosforilación de la serina en el aminoácido 262 de la proteína tau representa una etapa crucial que conduce a la disfunción fisiológica de tau. Los PHFs son intracelulares y se encuentran en muchos de los procesos dendríticos y axonales anormales, o neuritas que forman la periferia de las placas amiloides seniles. Las placas amiloides seniles consisten de filamentos neurófilos desorganizados en una zona de hasta 150  $\mu$ m de sección transversal con un núcleo extra-celular del depósito de amiloide. Las placas amiloides cerebrales son ultraestructuralmente distintos a partir de los PHFs y consisten de filamentos de 4-8 nm de ancho que no se enrollan juntos en pares. El núcleo de la placa consiste de agregados de un péptido, inicialmente conocido como A4, con una masa molecular relativa (*M*) de aproximadamente 4,000 (Masters et al., Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82:4245-4249).

30 Una secuencia de aminoácidos parcial de A4, que ahora se llama péptido  $\beta$  amiloide (o A $\beta$ <sub>1-42</sub>), muestra que es similar a la proteína  $\beta$  amiloide aislada a partir de vasos sanguíneos cerebrales de pacientes con la enfermedad de Alzheimer o el síndrome de Down (Glenner and Wong, Biochem Biophys Res Comm, 1984; 120:885-890; 122:1131-1135).

35 Se ha formulado la hipótesis que A $\beta$ <sub>1-42</sub> se relaciona con AD por un número de razones. En primer lugar, en la amiloidosis periférica, por ejemplo, la enfermedad de cadena ligera primaria o amiloidosis AA secundaria, de gran carga amiloide se correlaciona fuertemente con la disfunción de órganos y tejidos. En segundo lugar, la densidad de la placa amiloide se correlaciona positivamente con las puntuaciones de demencia pre-morten en AD. En tercer lugar, la deposición del A $\beta$ <sub>1-42</sub> es el marcador neuropatológico precoz en AD y de los trastornos relacionados tales como síndrome de Down, donde este puede preceder la formación de NFT por 2-3 décadas. En cuarto lugar, la  $\beta$ -amiloidosis es relativamente específica para AD y los trastornos relacionados. En quinto lugar, A $\beta$ <sub>1-42</sub> es tóxico para las neuronas (Yankner et al., Science, 1990; 250:279-282). Por último, mutaciones de aminoácidos en el gen de la proteína precursora amiloide estructural (APP) causan inicio precoz de AD familiar (Goate et al., Nature, 1991; 349: 704-706; Mullan et al., Nature Genetics, 1992; 1:345-347). Notablemente, una mutación causa una dramática sobreproducción de A $\beta$ <sub>1-42</sub> (Citron et al., Nature, 1992; 360:672-674).

40 En 1987, Kang et al. (Nature, 1987; 325:733-737) y otros tres grupos (ver 1987 status reports by Anderton, Nature, 1987; 325:658-659 and Barnes, Science, 1987; 235:846-847) independientemente clonados del gen a partir del cual A $\beta$ <sub>1-42</sub> se deriva. Este gen, ahora conocido como la proteína precursora amiloide (APP), codifica una proteína de 695 residuos de aminoácidos con un MW de aproximadamente 79,000 que se expresa en virtualmente todos los tejidos.

Existen al menos cinco variantes de corte y empalme de APP, cuatro de las cuales contienen la secuencia del péptido  $\beta$ -amiloide.

Cuatro genes han sido implicados en formas familiares de AD. Tres de los genes,  $\beta$ APP, *presenilin 1*, y *presenilin 2*, cuando mutan, causan formas iniciales dominantes autosomales de AD. El cuarto gen, Apolipoproteína E, tiene una forma polimórfica que ocurre naturalmente, ApoE4, que representa un principal factor de riesgo genético para el desarrollo de la enfermedad. El concepto de que las alteraciones en varios genes distintos pueden conducir a un desequilibrio crónico entre la producción de  $A\beta_{1-42}$  y su liquidación, con la agregación resultante de los primeros 42-residuos y luego los 40-residuos peptídicos en placas citotóxicas, se soporta por la evidencia disponible. La evidencia sugiere que los defectos en cada uno de estos cuatro genes predispuestos el fenotipo AD por (1) aumento de la producción y/o la deposición de péptidos  $A\beta_{1-42}$  o (2) por disminución de la liquidación de ApoE4 a partir del tejido (Selkoe, J Biol Chem, 1996; 271:18295-18298).

A partir de los datos disponibles, parece que los agregados, pero no los péptidos  $A\beta_{1-42}$  monoméricos pueden inducir la disfunción y muerte celular *in vitro* mediante un rango de mecanismos interrelacionados presumiblemente. Estos incluyen lesión oxidativa (Thomas et al., Nature, 1996; 380:168-171; Behl et al., Cell, 1994; 77:817-827), alteraciones en homeostasis de calcio intracelular (Arispe et al., Proc Natl Acad Sci USA, 1993; 90:567-571), y reorganización del citoesqueleto (Busciglio et al., Neuron, 1995; 14: 879-888). El conocimiento suficiente de algunas de las principales etapas en la cascada inducida del amiloide ha surgido, incluso aunque la hipótesis de la cascada es muy refutada.

Las metodologías farmacológicas, para identificar pequeñas moléculas que podrían inhibir una u otra etapa de la cascada inducida del amiloide ahora están en curso. De particular interés son dos metodologías: ensayos para interferir con la agregación de péptidos  $A\beta_{1-42}$  por disminución de la secreción de péptidos  $A\beta_{1-42}$  a partir de células gliales y neuronas o inhibir la toxicidad que estos agregados extracelulares producidos en las células gliales y neuronas y sus procesos. Un tercer ensayo de metodología para controlar la respuesta inflamatoria especializada que parece ser desencadenada por  $A\beta_{1-42}$  agregado (incluyendo estimulación microglial, activación de la cascada complemento clásica, liberación de citoquinas, y astrocitosis reactiva) puede probar que es de beneficio para pacientes con Alzheimer.

A parte de las metodologías farmacológicas mencionadas anteriormente para la intervención de AD, las intervenciones inmunológicas también se han intentado. Soloman et al. (Proc Natl Acad. Sci, 1996; 93:452-455; Proc Natl Aca. Sci, 1997; 94: 4109-4112) mostró que tres anticuerpos monoclonales específicos, dirigidos hacia un sitio en la región N-terminal del péptido  $A\beta_{1-42}$  humano, se unen en diversos grados a las fibrillas preformadas que conducen a su desagregación e inhibición de su efecto neurotóxico. También se encontró que los anticuerpos previenen la formación de  $A\beta_{1-42}$  fibrilar. Solomon et al. (WO01/18169) también intentó preparar un expresión en fago de un epítipo del péptido  $A\beta_{1-42}$  y la administración de la expresión en epítipo de una expresión en fago o péptido que contiene el epítipo intraperitonealmente a ratones que inducen anticuerpos para el péptido  $A\beta_{1-42}$ . La prueba *in vitro* con fenocrocitoma de rata mostró que una dilución 1:5 de los antisueros previene la neurotoxicidad de  $A\beta_{1-42}$ . También se demostró que el antisuero a una dilución de 1:5 y 1:20 desestabiliza la estructura fibrilar de  $A\beta$  *in vitro* con el deterioro extensivo de la morfología fibrilar. Sin embargo, el adyuvante utilizado para la primera inyección fue el Adyuvante de Freund completo con el Adyuvante de Freund incompleto para la segunda inyección. Los adyuvantes utilizados son totalmente inapropiados para uso en humanos. Además, los niveles de anticuerpos generados fueron muy bajos para ser efectivos a pesar del uso de estos adyuvantes irritantes.

Posteriormente, Schenk et al. (Nature, 1999; 400:173-177) mostró que la inmunización con el péptido  $A\beta_{1-42}$  inhibe la formación de placas amiloides y las neuritas distróficas asociadas en un modelo de ratón con AD. Sin embargo, debido a la baja inmunogenicidad del péptido  $A\beta_{1-42}$ , el método empleado necesita administraciones repetidas del antígeno con un adyuvante de formación de lesión irritante, para obtener los niveles superiores de anticuerpos de placa anti-  $A\beta_{1-42}$  necesario para afectar la formación de placas. Además, se advirtió que la inmunización con  $A\beta_{1-42}$  podría inducir más acumulación del amiloide tóxico por sí mismo (Araujo, DM & Cotman, CW, Brain Res, 1992; 569, 141-145).

A pesar de estas críticas, estudios adicionales en modelos de ratones transgénicos con AD a través de inmunización activa similar, han dado credibilidad a las metodologías de inmunoprofilaxis e inmunoterapéuticas para AD. Janus et al. (Nature, 2000; 408:979-982) describe la inmunización del péptido  $A\beta_{1-42}$  en un modelo de ratón para AD que reduce el deterioro del comportamiento y las placas. Morgan et al. (Nature, 2000; 408:982-985) describe la vacunación con el péptido  $A\beta_{1-42}$  para prevenir la pérdida de memoria en el modelo de ratón.

El soporte directo a la efectividad de terapia inmune se origina de la observación que la administración periférica de anticuerpos, monoclonales o policlonales, contra el péptido- $A\beta$  redujo la carga amiloide (WO 99/27944; Bard et al., Nature Medicine, 2000; 6:916-919). A pesar de los niveles séricos relativamente moderados, estos anticuerpos administrados pasivamente, monoclonales 3D6 (anti- $A\beta_{1-5}$ ) y 10D5 (anti- $A\beta_{1-12}$ ) o policlonales anti-  $A\beta_{1-42}$ , fueron capaces de entrar al sistema nervioso central. Allí, los anticuerpos se unen a las placas e inducen la liquidación de las placas amiloides pre-existentes. Bard *et al.*, reportaron que cuando se examinaron en un ensayo *ex vivo* con secciones de cerebro de ratones PDAPP (i.e., ratones transgénicos para un minigen APP impulsado por un promotor

del factor de crecimiento derivado de plaquetas) o tejido de cerebro de paciente con AD, anticuerpos contra células microgliales activadas con el péptido A $\beta$ , para desbloquear las placas a través de fagocitosis mediada por el receptor del Fc y la posterior degradación del péptido. Este estudio demostró que los anticuerpos administrados pasivamente contra el péptido A $\beta_{1-42}$  y la región N-terminal A $\beta_{1-42}$  redujeron el grado de deposición de las placas en un modelo de ratón de AD; y que los anticuerpos monoclonales o anticuerpos policlonales inducidos por las vacunas de sitio-dirigido son capaces de entrar al CNS, a niveles terapéuticamente relevantes.

A pesar de los prometedores hallazgos de intervención inmunológica en el modelo de ratones para AD, una vacuna contra AD apropiada para seres humanos sigue estando muy lejos (Chapman, *Nature*, 2000; 408:915-916). Los obstáculos principales residen en el amplio trabajo, necesario para diseñar y formular una composición inmunogénica que sea útil en seres humanos antes de que una vacuna factible para AD se pueda lograr. Algunos de estos temas que se basan en los datos experimentales de orientación son: (1) Cual es el sitio diana específico para el reconocimiento del anticuerpo dentro del A $\beta$ ? (2) En qué forma debería estar presente el inmunógeno? (3) Cuales otros sitios necesitan estar incluidos antes de que se logre que un inmunógeno provoque un nivel terapéutico del anticuerpo? (4) Cuál es un sistema de administración efectivo de una vacuna, empleando un adyuvante clínicamente aceptable para seres humanos?.

Una importante brecha existe entre lo que se ha divulgado en la literatura y lo que queda por hacer. Cuál es el apropiado sitio diana específico (i.e., la placa polimerizada de A $\beta_{1-42}$  o el péptido A $\beta_{1-42}$  soluble monomérico) y cómo se debe diseñar el sitio específico para la intervención inmunológica. A pesar de unas 5,000 publicaciones sobre A $\beta_{1-42}$  durante la última década, la hipótesis de la cascada del amiloide es objeto de acalorados debates y el la cuestión: la forma en la cual A $\beta_{1-42}$  se debería utilizar para la intervención permanece contenciosa. En el centro del problema, argumentado por Terry and colleagues, está la débil correlación entre la carga amiloide fibrilar y las mediciones de la disfunción neurológica (*The Neuropathology of Alzheimer Disease and the Structure Basis of its Alterations*, Ed. by Terry et al., *Alzheimer Disease*, p187-206, Lippincott Williams and Wilkins, 1999).

En pacientes con AD, los depósitos amiloides con frecuencia se forman a una distancia del sitio del daño neuronal. La mejor correlación con la demencia patológica es la pérdida de terminales sinápticos. Sin embargo, la pérdida de terminales sinápticos se correlaciona mal con la carga amiloide. Si las manifestaciones de la enfermedad se correlaciona débilmente con la carga amiloide, entonces cuál es el papel de A $\beta$ ? El artículo de Klein et al, titulado "Targeting small A $\beta_{1-42}$  oligomers: the solution to an enfermedad de Alzheimer conundrum?" (*Trends in Neurosciences*, 2001; 24:219-224) sugiere que las fibrillas no son la única forma tóxica de A $\beta$ , y posiblemente no la neurotoxina que es la más relevante para AD. Pequeños oligómeros y protofibrillas, también se llaman como ligandos difusibles derivados de A $\beta_{1-42}$  (ADDLs), también pueden tener potente actividad neurológica tóxica.

Una vacuna contra AD para la exitosa intervención inmunológica necesitará un inmunógeno diseñado para inducir los anticuerpos de alta afinidad de sitio-dirigido que se une a las placas seniles en el tejido de cerebro para acelerar la liquidación de la placa por las células gliales, e inmunoneutralizar las toxinas derivadas de A $\beta$  soluble.

El problema de aumentar los anticuerpos de sitio-dirigido de alta afinidad contra los péptidos de sitio-específico muy poco inmunogénicos se ha conocido por décadas. Los inmunólogos y vacunólogos con frecuencia recurren a la metodología de la proteína portadora [péptido] hapteno clásica conjugada como se demuestra en WO 99/27944. Para el desarrollo de una vacuna de sitio-dirigida contra AD, Frenkel et al., ensayaron la inmunización contra placas de A $\beta_{1-42}$  a través de administración fago-"EFRH" (*Proc Natl Acad. Sci* 2000; 97:11455-11459, WO 01/18169) como se menciona anteriormente.

Las metodologías: utilizando agregados del péptido A $\beta_{1-42}$  o conjugados del fragmento del péptido A $\beta_{1-42}$ -proteína portadora (WO99/27944) y utilizando la expresión in fago de filamentos "péptido EFRH" como los agentes para inducir las respuestas inmunes contra un depósito de amiloide en un paciente, son engorrosos e ineficientes. Por ejemplo, después de la cuarta inmunización de la expresión de fagos 1011 del epitope EFRH, >95% de los anticuerpos en el suero inmune de conejillo de Indias son contra los fagos. Solo una pequeña población (<5%) de los anticuerpos es contra el péptido A $\beta_{1-42}$  soluble (Frenkel et al., *Vaccine* 2001, 19:2615-2619, WO 01/18169).

Los métodos menos complicados fueron descritos en EP 526,511 y WO 99/27944, que revelan la administración del péptido A $\beta_{1-42}$  para tratar pacientes con AD pre-establecido y la administración de A $\beta_{1-42}$  u otros inmunógenos a un paciente bajo condiciones que generan una respuesta inmune "benéfica" en el paciente con AD. Sin embargo, una revisión de WO99/27944 muestra que existen grandes deficiencias en el diseño de la vacuna revelada en este.

En particular, el problema radica en la falta de un sistema de administración de la vacuna efectivo y farmacéuticamente aceptable. WO99/27 revela A $\beta_{1-42}$  o fragmentos activos de conjugados de A $\beta_{1-42}$  con una molécula portadora tal como toxina de cólera como el componente de la vacuna activo. Ver página 4 de WO 99/27944. Aunque la página 5 enseña que una composición farmacéutica que comprende el inmunógeno debería ser libre del Adyuvante de Freund completo [CFA], los únicos ejemplos que muestran la eficacia de la vacuna de A $\beta_{1-42}$  para el tratamiento de AD en ratones transgénicos empleando grandes dosis del péptido A $\beta_{42}$  agregado en CFA. A pesar del recital repetitivo de adyuvantes preferidos que se van a utilizar con los agentes inmunogénicos

revelados para mejorar la respuesta inmune, los datos experimentales mostraron que solamente las formulaciones empleando CFA/ICFA proporcionaron un título de anticuerpos suficientemente alto. Ver, página 25 de WO 99/27944. En el ejemplo 1, la eficacia profiláctica de A $\beta$ <sub>1-42</sub> contra AD se demostró en ratones PDAPP. Sin embargo, las formulaciones administradas consisten de una dosis de 100ug por ratón de A $\beta$ <sub>42</sub> agregado emulsificado en Adyuvante de Freund completo [CFA] (p34 de WO 99/27944) después de múltiples dosis de refuerzo del mismo péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub> emulsificado en Adyuvante de Freund Incompleto. En el Ejemplo IX, las respuestas inmunes en ratones para diferentes adyuvantes fueron estudiados. Cuando los adyuvantes: MPL, Alum, QS21, y CFA/ICFA fueron utilizados con el supuestamente potente inmunógeno AN1792 (i.e., A $\beta$ <sub>42</sub> humano agregado), el nivel de anticuerpos para A $\beta$ <sub>1-4</sub> fueron reducidos en un nivel estadísticamente significativo en comparación con los ratones que recibieron las vacunas CFA/ICFA. Ver, Tabla 9, y páginas 59-64 de WO 99/27944.

En el caso donde los fragmentos del péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub> fueron utilizados (péptidos A $\beta$ <sub>1-42</sub> humanos de aminoácidos 1-5, 1-12, 13-28, y 33-42), cada fragmento fue conjugado con IgG anti-ratón de oveja como en portador de la proteína. En una última divulgación, la eficacia de los anticuerpos con fragmentos del péptido A $\beta$  solo podría ser mostrada por inmunización pasiva con anticuerpos monoclonales (Bard et al., Nature Medicine 2000; 6:916-919). La eficacia de estos fragmentos conjugados con IgG anti-ratón de oveja no fue mostrado. Por lo tanto, el único inmunógeno que mostró que era efectivo fue el péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub> agregado en CFA/ICFA.

WO 00/72880 A2 inter alia se relaciona con métodos para prevenir o tratar una enfermedad asociada con depósitos de amiloide de A $\beta$  en el cerebro de un paciente por ejemplo la enfermedad de Alzheimer o síndrome de Down o deterioro cognitivo. Dichos métodos implican la administración de fragmentos de A $\beta$  o análogos de estos mientras que el segmento N-terminal de A $\beta$  se puede unir a su C-terminal a un polipéptido heterólogo. Los fragmentos empiezan en los residuos 1 - 3 de A $\beta$  y terminan en los residuos 7 - 11 de A $\beta$ , sin embargo, los fragmentos que son más largos que los residuos 1 - 12 son menos preferidos debido a que su actividad en la limpieza o prevención de depósitos amiloides no está clara.

Hasta el momento, todas las formulaciones de las vacunas mostraron que eran efectivas empleando CFA/IFA como el adyuvante. Los inmunógenos del péptido que dirigen A $\beta$ <sub>1-42</sub> hasta ahora han sido preparados por la conjugación de los diferentes fragmentos de A $\beta$ <sub>1-42</sub> con inmunoglobulina anti-ratón de oveja, conjugación de Ap13-28 sintético vía *m*-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida éster con el anticuerpo anti-CD3, o péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub> agregado solo. Estos inmunógenos, i.e., péptido A $\beta$ <sub>42</sub> solo o conjugados del péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub>-proteína portadora, fueron emulsificados con adyuvante de Freund completo para la primera inmunización, después de posteriores refuerzos en adyuvante de Freund incompleto (Johnson-Wood et al., Proc Natl Acad Sci USA, 1997; 94:1550-1555; Seubert et al., Nature, 1992; 359:325-327; Schenk et al., Nature, 1999; 400: 173-177; Janus et al., Nature 2000; 408:979-982; and Morgan et al., Nature, 2000; 408:982-985). Las formulaciones reveladas en WO 99/27944 u otras utilizando CFA y ICFA como adyuvantes causan lesiones y son demasiado irritantes para uso en seres humanos. De esta manera, ninguna de las composiciones de vacunas para AD descritas en el oficio previo es apropiada para su uso en seres humanos.

En resumen, a pesar de las declaraciones que sugieren el potencial del péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub> para el tratamiento de AD en vista de las divulgaciones anteriores de Kline (EP 526,511), las formulaciones de la vacuna que resuelven el problema, realmente no se ofrecieron en WO99/27944, para hacer frente a este problema clave.

Otra desventaja con los conjugados péptido-proteína portadora y agregados A $\beta$ <sub>1-42</sub>, es que estas moléculas son altamente complejas y son difíciles de caracterizar y es difícil desarrollar procedimientos de control de calidad efectivos para los procesos de fabricación. Otra desventaja es que, el péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub> o sus fragmentos son moléculas individuales cuando se administran a humanos. Por lo tanto, son menos inmunogénicos o no-inmunogénicos en seres humanos. Es, por tanto, necesario desarrollar formulaciones clínicamente aceptables de las vacunas para la administración en humanos.

Se sabe que los epitopes Th promiscuos pueden ser empleados para evocar la célula auxiliar T eficiente y se puede combinar con epitopes de célula B muy poco inmunogénicos para proporcionar inmunógenos potentes. Se ha demostrado que los péptidos quiméricos de epitopes promiscuos de la célula B/Th bien diseñados, son útiles en la obtención de respuestas de Th y respuestas del anticuerpo resultante en la mayoría de los miembros de una población genéticamente diversa que expresa haplotipos MHC diversos. Th promiscuos a partir de un número de patógenos, tales como proteína F del virus del sarampión y antígeno de la superficie del virus de la hepatitis B, se conocen. Las Tablas 1 y 2 enumeran muchos de los Th promiscuos conocidos que se ha demostrado que eran efectivos en la potenciación de un péptido corto muy poco inmunogénico, la hormona deca péptido LHRH (US 5,759,551, y 6,025,468).

Los epitopes Th potentes oscilan en tamaño a partir de aproximadamente 15-40 residuos de aminoácidos en longitud, con frecuencia comparten características estructurales comunes, y pueden contener secuencias de referencia específicas. Por ejemplo, una característica común de un Th es que contiene hélices anfipáticas, estructuras alfa-helicoidales con residuos de aminoácidos hidrofóbicos que dominan una cara de la hélice y con residuos cargados y polares que dominan las caras circundantes (Cease et al., Proc Natl Acad Sci USA, 1987; 84: 4249-4253). Los epitopes Th frecuentemente contienen patrones adicionales de aminoácidos primarios tales como

un residuo Gly o cargados después de dos a tres residuos hidrofóbicos, seguido a su vez por un residuo polar o cargado. Este patrón define las que se denominan secuencias Rothbard. Los epitopes Th con frecuencia obedecen la regla 1, 4, 5, 8, donde un residuo cargado positivamente está después de los residuos hidrofóbicos en la cuarta, quinta y octava posición después del residuo cargado. Dado que todas estas estructuras se componen de aminoácidos polares, cargados e hidrofóbicos comunes, cada estructura puede existir simultáneamente dentro de un único epitope Th (Partidos et al., J Gen Virol, 1991; 72:1293). La mayoría, si no todos, los epitopes promiscuos de la célula T adaptan al menos una de las periodicidades descritas anteriormente. Estas características se pueden incorporar en los diseños de sitios Th artificiales idealizados, incluyendo los epitopes Th combinatorios. Con respecto al diseño de sitios Th combinatorios, listas de aminoácidos preferidos y posición variable están disponibles para motivos de enlace de MHC (Meister et al., Vacuna, 1995; 13:581-591). Adicionalmente, un método para producir Th combinatorio se ha revelado para librerías combinatorias de péptidos denominada librería de antígeno sintético estructurado (Wang et al., WO 95/11998). De esta manera, la regla 1, 4, 5, 8 se puede aplicar junto con conocidas fracciones de enlace MHC combinatorias para asignar la posición invariante y degenerada en un sitio combinatorio Th, y para seleccionar los residuos para los sitios degenerados para aumentar enormemente el rango de sensibilidad inmune de un Th artificial. Ver, Tabla 2, WO 99/66957, y WO 95/11998.

Wang et al. (US 5,759,551) sugirió el uso de elementos inmunoestimulatorios para suministrar la auto-proteína Amilina inmunogénica. Wang *et al.* sugirieron la administración de péptidos de amilina sintéticos inmunogénicos como vacunas para el tratamiento de diabetes mellitus no-insulino dependiente (NIDDM), una enfermedad amiloidogénica causada por la sobreproducción de Amilina (columna 19, líneas 9-39, US 5,759,551 ). La amilina es una hormona del péptido de 37 residuos de aminoácidos producido por las células  $\beta$  en los islotes de Langerhans. La sobreproducción de Amilina dará lugar a la deposición de amiloide insoluble que conduce a una enfermedad amiloidogénica en el páncreas. Similar a la sobreproducción de Amilina, la sobreproducción del péptido  $A\beta_{1-42}$  dará lugar a la deposición del amiloide insoluble en el cerebro de pacientes con AD. Sin embargo, existe una homología de secuencia limitada entre la Amilina y el péptido  $A\beta_{1-42}$ . Solo un pequeño tramo de residuos de aminoácidos, VGSN, de la Amilina<sub>32-35</sub> corresponde a  $A\beta_{24-27}$ . Los anticuerpos producidos contra el péptido de la Amilina no se espera que tengan reactividad cruzada con los péptidos  $A\beta_{1-42}$  solubles ni aceleren la liquidación de placas amiloides en el cerebro en vista de los estudios de Soloman *et al.* and Schenk *et al.*, que demostraron que la secuencia EFRH es crítica.

Es el objeto de la invención desarrollar un inmunógeno que permitirá la generación de altos niveles de anticuerpos de alta afinidad contra el sitio funcional N-terminal del péptido  $A\beta_{1-42}$  con alta reactividad cruzada con las placas seniles en el cerebro de pacientes con AD. Los anticuerpos generados por el enlace con el péptido  $A\beta_{1-42}$  y las placas seniles se espera que aceleren la liquidación de estas placas a partir del cerebro, que promuevan la desagregación fibrilar, inhiban la agregación fibrilar, y la inmunoneutralización de las "toxinas derivadas de  $A\beta$  soluble" [también denominadas como ligandos difusibles derivados de  $A\beta$  o ADDLs].

Otro objetivo de la presente invención es desarrollar un vehículo de administración de una vacuna que sea apropiado para uso humano o veterinario para la profilaxis y el tratamiento de Enfermedad de Alzheimer.

#### Breve descripción de la invención

La presente invención se relaciona con una composición inmunogénica, que comprende péptidos sintéticos capaces de inducir los anticuerpos contra el sitio regulador/funcional principal del péptido  $A\beta$  con alta reactividad cruzada tanto con el péptido  $A\beta_{1-42}$  soluble como con las placas en el cerebro de pacientes con Enfermedad de Alzheimer (AD). Se espera que, cuando la composición inmunogénica, se administre a un paciente con AD o a una persona predispuesta a AD, se acelere la liquidación de placas amiloides y la inmunoneutralización de las toxinas derivadas de  $A\beta$  solubles en el cerebro para prevenir y tratar AD. En particular, un inmunógeno del péptido de esta invención comprende el epitope Th de SEQ ID NO: 51 unido a un fragmento del péptido  $A\beta_{1-42}$  N-terminal pequeño que comprende EFRH del péptido  $A\beta_{1-42}$ , SEQ ID NO:65. El fragmento del péptido  $A\beta_{1-42}$  es SEQ ID NO: 67. Opcionalmente, se pueden incluir espaciadores de aminoácidos para separar los dominios inmunogénicos. Los elementos del dominio inmunogénico separados por espaciadores se pueden unir covalentemente en cualquier orden con la condición de que cualquiera de la inmunoreactividad del hapteno del péptido se preserve sustancialmente o que la inmunoreactividad con el fragmento del péptido  $A\beta$  N-terminal, péptido  $A\beta_{1-42}$  soluble, y las placas se genere.

La presente invención además proporciona una composición inmunogénica que comprende una cantidad inmunológicamente efectiva de una composición de péptidos en una formulación de vacuna farmacéuticamente aceptable que comprende un adyuvante o emulsificante seleccionado del grupo que consiste de liposina, saponina, escualeno, L121, emulsigen monofosfíril lípido A (MPL), polisorbato 80, QS21, Montanide ISA51, ISA35, ISA206 y ISA 720 así como otros adyuvantes y emulsificantes eficaces.

La presente invención además proporciona un medicamento útil para la inducción de liquidación acelerada de placas amiloides y la inmunoneutralización de las toxinas derivadas de  $A\beta$  soluble en el cerebro, para prevenir y tratar la Enfermedad de Alzheimer en un mamífero, mediante la administración de uno o más de los péptidos inmunogénicos

al mamífero por un tiempo y bajo condiciones suficientes para inducir los anticuerpos dirigidos contra el sitio regulador/funcional del péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub>. Un ejemplo típico de una vacuna de la presente invención es una composición de péptidos que comprende 5-1000 mg del inmunógeno del péptido en una vacuna formulada como una emulsión agua en aceite en un adyuvante y/o portador farmacéuticamente aceptable. Un típico método de la administración de la vacuna es inyectar vía intramuscular la formulación de la vacuna a dosis de 0.5-2mL en un cronograma de inmunización de intervalos de 0, 4, y 8 semanas.

Un importante factor que afecta la inmunogenicidad de un péptido sintético por un inmunógeno fragmento N-terminal de A $\beta$ <sub>1-42</sub>, es su presentación con el sistema inmune por los epitopes de la célula auxiliar T (Th). Tal Th es la más fiable suministrada al inmunógeno del péptido por epitopes Th foráneos colocados en un elemento de dominio del péptido Th separado, que son extrínsecos con el péptido A $\beta$  diana. Tales inmunógenos del péptido se pueden producir como polipéptidos híbridos por expresión de ADN recombinante. También puede ser más simple y menos costoso que sean suministrados como un inmunógeno del péptido sintético que comprende el sitio de la célula B del hapteno diana a partir del péptido A $\beta$  y los epitopes de la T auxiliar (Th) apropiados para el huésped. Tales péptidos reaccionan con los receptores de la célula T auxiliar y las moléculas MHC de clase II, además con sitios de enlace del anticuerpo (Babbitt et al., Nature, 1985; 317:359) y de esta manera estimular una justa respuesta de anticuerpo de sitio específico con el sitio de enlace del anticuerpo diana. Previamente tal Th fue suministrado para los inmunógenos viables del péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub> por el Th intrínseco al péptido A $\beta$  de longitud completa agregado (WO 99/66957; WO 1999/27944; Janus et al., 2000, Morgan et al., 2000) y puede ser suministrado por la proteína portadora. Un inmunógeno del péptido completamente sintético goza de la siguientes ventajas sobre los agregados del péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub>, polipéptidos recombinantes y conjugados del portador en que el producto se define químicamente para un fácil control de calidad. El inmunógeno del péptido sintético es estable. No realizar un tratamiento adicional ni una instalación de fabricación elaborada es necesario. La respuesta inmune es de sitio específico y centrado en el A $\beta$  diana y no en el portador. De esta manera, se evitan las respuestas indeseables tales como supresión epitópica.

La inmunogenicidad de inmunógenos del péptido A $\beta$  sintético de sitio-dirigido funcional N-terminal, se puede optimizar por (1) combinación del fragmento del péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub> N-terminal con sitios Th promiscuos foráneos seleccionados con los cual la mayoría de una población es sensible; y (2) combinación del fragmento del péptido A $\beta$  con Th cuyo repertorio se amplía a través de química combinatoria, y por lo tanto se adapta a la sensibilidad inmune variable de una población genéticamente diversa.

Se ha encontrado que la composición de los péptidos de la presente invención es efectiva para estimular la producción de anticuerpos contra el sitio regulador/funcional principal de the péptido A $\beta$ , con reactividades cruzadas con el A $\beta$ <sub>1-42</sub> soluble y las placas en los cerebros de pacientes con AD. Basándose en los datos de inmunogenicidad obtenidos en conejillos de indias y babuinos, y los datos obtenidos a partir de la tinción de la inmunoperoxidasa de las placas amiloides presentes en secciones de cerebro humano con AD, mediante los sueros inmunes específicos obtenidos, se espera que los inmunógenos del péptido de la presente invención, formulados apropiadamente sean efectivos en humanos. Cabe señalar que los datos obtenidos en babuinos son particularmente significantes en que esta es una especie cuya respuesta inmune se parece mucho a la de los humanos.

#### Descripción detallada de la invención

Esta invención se dirige a una novedosa composición del péptido para la generación de anticuerpos policlonales de alto título con especificidad para el sitio regulador/funcional principal del péptido A $\beta$ , con reactividades cruzadas con el A $\beta$ <sub>1-42</sub> soluble y las placas en el cerebro de pacientes con la Enfermedad de Alzheimer (AD). Los anticuerpos generados por la composición del péptido son de sitio altamente específico y se unen con los péptidos A $\beta$  y con las placas amiloides en el cerebro. De esta manera, la presente invención proporciona un método efectivo para acelerar la liquidación de placas amiloides y la inmunoneutralización de toxinas derivadas de A $\beta$  solubles en el cerebro para la prevención y el tratamiento de AD.

Los fragmentos N-terminal del péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub> seleccionado del grupo que consiste de 10 a 28 aminoácidos en donde cada fragmento comprende EFRH del péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub> (SEQ ID NO:65), son péptidos lineales pequeños que, por ellos mismos no son inmunogénicos. Los fragmentos pequeños del péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub> pueden ser inmuno-potenciados por acoplamiento químico con una proteína portadora, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana (KLH) o por fusión con un polipéptido portador a través de la expresión de ADN recombinante, por ejemplo, antígeno superficial de hepatitis B. La deficiencia de tales vacunas "péptido A $\beta$ (s)-proteína portadora" es que una principal porción de los anticuerpos generados son anticuerpos no-funcionales dirigidos contra la proteína portadora.

Los inmunógenos de la presente invención son inmunógenos del péptido completamente sintéticos que comprenden un fragmento N-terminal del péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub> de SEQ ID NO: 67 que comprende EFRH del péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub> covalentemente unido al epitope Th promiscuo de SEQ ID NO: 51. Los inmunógenos de la invención inducen la producción de anticuerpos de sitio-específico que se unen con el péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub> y sus agregados y tienen reactividad cruzada con las placas amiloides en el cerebro para proporcionar la liquidación acelerada de placas amiloides y la inmunoneutralización de las toxinas derivadas de A $\beta$  soluble en el cerebro. De esta manera, el inmunógeno de la presente invención es útil en la prevención y el tratamiento de AD.

Los resultados de anti-sueros de animales inmunizados con los péptidos inmunogénicos de la presente invención demuestran que potentes anticuerpos reactivos del péptido A $\beta$  de sitio-dirigido se generan, en una población huésped, diversa genéticamente.

El péptido inmunogénico sintético de la presente invención comprende:

5 (i) el epitope de la célula T auxiliar (Th) de SEQ ID No: 51j

(ii) el fragmento N-terminal del péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub> de SEQ ID NO:67

comprende EFRH del péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub>; y

(iii) opcionalmente un espaciador para separar los dominios inmunogénicos.

10 El péptido de Th se une covalentemente a cualquiera el N- o C-terminal del fragmento N-terminal diana del péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub> opcionalmente con un espaciador (por ejemplo, Gly-Gly,  $\epsilon$ -N Lys).

El inmunógeno del péptido de esta invención se representa por una de las siguientes fórmulas:

(A)<sub>n</sub>-(fragmento N-terminal del péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub>)-(B)<sub>o</sub>-(Th)<sub>m</sub>-X; o

(A)<sub>n</sub>-(Th)<sub>m</sub>-(B)<sub>o</sub>-(fragmento N-terminal del péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub>)-X;

en donde

15 cada A es independientemente un aminoácido;

cada B es un grupo de enlace seleccionado del grupo que consiste de gly-gly, ( $\alpha$ ,  $\epsilon$ -N)lys, Pro-Pro-Xaa-Pro-Xaa-Pro (SEQ ID NO:77);

Este el epitope de la célula T auxiliar de SEQ ID NO:51 (fragmento N-terminal del péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub>) es el péptido SEQ ID NO:67;

20 X es un  $\alpha$ -COOH o  $\alpha$ -CONH<sub>2</sub> de un aminoácido;

n es de 0 a aproximadamente 10;

m es de 1 a aproximadamente 4; y

o es de 0 a aproximadamente 10.

25 Cuando A es un aminoácido, es un aminoácido que no ocurre naturalmente o que ocurre naturalmente. Los aminoácidos que no ocurren naturalmente incluyen, pero no se limitan a,  $\epsilon$ -N lisina,  $\beta$ -alanina, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, tiroxina, ácido  $\gamma$ -amino butírico, homoserina, citrulina y similares. Los aminoácidos que ocurren naturalmente incluyen alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina. Cuando m es mayor que uno, y dos o más de A son aminoácidos, entonces cada aminoácido  
30 independientemente puede ser igual o diferente. (A)<sub>n</sub> puede incluir un espaciador, por ejemplo, Gly-Gly,  $\epsilon$ -N Lys.

B es un espaciador. Cada B es independientemente igual o diferente. B proporciona un espaciador, por ejemplo, Gly-Gly,  $\epsilon$ -Lys, o lisina entre el epitope Th promiscuo y el fragmento N-terminal del péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub> (SEQ ID NO:67). Además, mediante la separación física el epitope Th a partir del epitope de la célula B, i.e., el fragmento N-terminal del péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub>, el espaciador Gly-Gly o  $\epsilon$ -Lys puede desestabilizar cualquiera de las estructuras secundarias  
35 artefacto creadas por la unión del epitope Th con un fragmento N-terminal del péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub> y por consiguiente eliminan la interferencia entre las respuestas de la célula Th y/o B. Los aminoácidos de B, también pueden formar un espaciador que actúa como una bisagra flexible que mejora la separación de Th y los fragmentos N-terminal del péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub>. Ejemplos de las secuencias que codifican las bisagras flexibles se encuentran en la región bisagra de la cadena pesada de la inmunoglobulina. Las secuencias de la bisagra flexible son con frecuencia ricas en prolina.

40 Una bisagra flexible particularmente útil se proporciona por la secuencia Pro-Pro-Xaa-Pro-Xaa-Pro (SEQ ID NO:77), donde Xaa es cualquier aminoácido, y preferiblemente el ácido aspártico. La separación de conformación proporcionada por B permite más interacciones eficientes entre el inmunógeno del péptido presente y las



apropiadas células Th y las células B para mejorar las respuestas inmunes con el epítope Th y el epítope que provoca el anticuerpo o sus análogos inmunológicamente funcionales.

5 Th es una secuencia de aminoácidos (aminoácidos naturales o no-naturales) que comprende un epítope Th. Un epítope Th puede ser un epítope continuo o discontinuo. En un epítope discontinuo Th, no cada aminoácido de Th es necesario. Un epítope Th es capaz de aumentar o estimular una respuesta inmune al fragmento N-terminal del péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub>. Los epítopes Th que son inmunodominantes y promiscuos tienen poblaciones humanas y de animales de alta y amplia reactividad cruzada con tipos de MHC ampliamente divergentes (Partidos et al., 1991;US5,759,551).Un segmento Th comprende una porción contigua de un epítope Th, que es suficiente para mejorar o estimular una respuesta inmune al fragmento N-terminal del péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub>.

10 El epítope Th de la presente invención es un Th artificial idealizado, SEQ ID No 51. Los péptidos que comprenden Th combinatorios se producen simultáneamente en una única síntesis de péptidos de fase sólida en tándem con el fragmento N-terminal del péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub>, A y B.

En los péptidos sintéticos de esta invención, el epítope Th se une covalentemente a través de un espaciador B a cualquiera el N-terminal o C-terminal del fragmento N-terminal del péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub>.

15 Los inmunógenos del péptido de esta invención se pueden preparar mediante métodos de síntesis química que son bien conocidos por el experto en la materia. Ver, por ejemplo, Fields et al., Chapter 3 en Synthetic Peptides: A User's Guide, ed. Grant, W. H. Freeman & Co., New York, NY, 1992, p. 77. Por lo tanto, los péptidos pueden ser sintetizados utilizando las técnicas Merrifield automatizadas de síntesis de fase sólida con la  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> protegida por cualquiera química t- Boc o F-moc utilizando aminoácidos protegidos de cadena lateral en, por ejemplo, un Applied Biosystems Péptido Synthesizer Model 430A o 431. La preparación de las construcciones de péptidos que comprenden péptidos de bibliotecas combinatorias para los epítopes Th, se pueden lograr proporcionando una mezcla de aminoácidos alternativos para el acoplamiento en una posición variable dada. Después del ensamblaje completo del inmunógeno del péptido deseado, la resina se trata de acuerdo con procedimientos estándar para dividir el péptido a partir de la resina y desbloquear los grupos funcionales sobre las cadenas laterales del aminoácido. El péptido libre se purifica por HPLC y se caracteriza bioquímicamente, por ejemplo, por análisis de aminoácidos o por secuenciación. Los métodos de purificación y caracterización de péptidos, son bien conocidos por alguien de habilidad en el oficio.

20 El inmunógeno de la presente invención también se puede preparar como un polímero ramificado mediante la síntesis de la construcción del péptido deseado directamente sobre una resina de núcleo poly-lysyl ramificada (Wang, et al., Science, 1991; 254:285-288).

35 Por otra parte, los inmunógenos del péptido sintético grande se pueden sintetizar por técnicas de ADN recombinante bien conocidas. Tales técnicas se proporcionan en manuales estándar bien conocidos con protocolos detallados. Para construir un gen que codifica un péptido de esta invención, la secuencia de aminoácidos se traduce inversa para obtener una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos, preferiblemente con codones que son óptimos para el organismo en el cual el gen se debe expresar. A continuación, un gen sintético se hace, por lo general mediante la síntesis de oligonucleótidos que codifican el péptido y cualquiera de los elementos reguladores, si es necesario. El gen sintético se inserta en un vector de clonación apropiado y se transfecta en una célula huésped. El péptido luego se expresa bajo condiciones adecuadas, apropiadas para el sistema de expresión seleccionado y huésped. El péptido se purifica y caracteriza por métodos estándar.

40 La eficacia de la composición del péptido de la presente invención se puede lograr, inyectando un animal, por ejemplo, conejillos de indias, con una composición inmunogénica que comprende los péptidos de la invención. Ver, Tabla 4, SEQ ID NOS:70-75. La respuesta inmune humoral al fragmento N-terminal del péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub> y el péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub> soluble se monitorea. Una descripción detallada de los procedimientos utilizados se proporciona en los Ejemplos a continuación.

45 Otro aspecto de esta invención, proporciona una composición del péptido que comprende una cantidad inmunológicamente efectiva de uno o más de los inmunógenos del péptido de esta invención en un sistema de administración farmacéuticamente aceptable. Por consiguiente, la composición del péptido sujeto, se puede formular como una vacuna utilizando adyuvantes, portadores u otros ingredientes farmacéuticamente aceptables rutinariamente empleados en la formulación de vacunas. Entre los ingredientes que se pueden utilizar en esta invención son adyuvantes o emulsificantes incluyendo alum, liposina, saponina, escualeno, L121, emulsigen monofosfíril lípido A (MPL), polisorbato 80, QS21, Montanide ISA51, ISA35, ISA206 y ISA 720 así como otros adyuvantes y emulsificantes eficaces. La composición se puede formular para liberación inmediata o liberación controlada. La composición también se puede formular por inducción de la inmunidad sistémica, por ejemplo, por compresión o coadministración con micropartículas. Tales formulaciones son fácilmente disponibles por alguien de habilidad en el oficio.

Los inmunógenos de la presente invención se pueden administrar vía cualquier ruta convencional, tal como vía subcutánea, oral, intramuscular, parenteral o enteral. Los inmunógenos se pueden administrar en una dosis única o en dosis múltiples. Un apropiado cronograma de inmunización se determina fácilmente y está disponible por alguien de habilidad en el oficio.

5 La composición del péptido de la presente invención comprende una cantidad efectiva de uno o más de los inmunógenos del péptido de la presente invención y un portador farmacéuticamente aceptable. Dicha composición en una forma de unidad de dosificación apropiada generalmente contiene aproximadamente 0.25 mg a aproximadamente 500 mg del inmunógeno por kg de peso corporal. Cuando se entrega en dosis múltiples, la cantidad efectiva se puede dividir convenientemente por unidad de dosificación. Por ejemplo, una dosis inicial, por ejemplo 0.0025-0.5 mg por kg de peso corporal; preferiblemente 1-50 mg por kg de peso corporal del inmunógeno del péptido se debe administrar por inyección, preferiblemente vía intramuscular, después de una dosis repetida (refuerzo) de una cantidad similar. La dosificación dependerá de la edad, peso y salud general del sujeto, como es bien conocido en los oficios de vacunas y terapéuticos.

15 La respuesta inmune de inmunógenos del péptido sintético A $\beta$ <sub>1-42</sub> se puede mejorar por la entrega a través de atrapamiento en o sobre micropartículas biodegradables del tipo descrito por O'Hagan et al. (Vacuna, 1991; 9: 768-771). Los inmunógenos se pueden encapsular con o sin un adyuvante en micropartículas biodegradables, para potenciar las respuestas inmunes, y para proporcionar la liberación de tiempo controlado para respuestas controladas o periódicas, y para la administración oral, (O'Hagan *et al.*, 1991; and, Eldridge *et al.*, 1991; 28: 287-294).

20 Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar la invención. El alcance de la invención no se limita a los inmunógenos del péptido específico y las composiciones proporcionadas. Los ejemplos demuestran que los inmunógenos del péptido de la presente invención son útiles para provocar anticuerpos de sitio-dirigido para ambos fragmentos de A $\beta$ <sub>1-10</sub> y A $\beta$ <sub>1-14</sub> así como anticuerpos de reactividad cruzada con los péptidos A $\beta$ <sub>1-42</sub> solubles a partir de 4 semanas después de la inmunización inicial.

## 25 EJEMPLO 1

### MÉTODOS TÍPICOS PARA SINTETIZAR INMUNÓGENOS DEL PÉPTIDO A $\beta$ DE LA PRESENTE INVENCIÓN

Los inmunógenos de péptidos enumerados en la Tabla 4 (SEQ ID NOS:70-76 mientras que SEQ ID NOS: 70,71, 72, 74, 75, y 76 no caen dentro del alcance de la presente invención y son sólo de referencia) fueron sintetizados individualmente mediante la técnica de síntesis de fase sólida Merrifield en Applied Biosystems automated péptido synthesizers (Modelos 430, 431 y 433A) utilizando la química Fmoc. La preparación de los inmunógenos del péptido que comprenden un Th a partir de la librería combinatoria, i.e., sitio Th artificial idealizado tal como MvF derivado Th1-8 (SEQ ID NOS:38-40), se puede lograr proporcionando una mezcla de los aminoácidos deseados para el acoplamiento químico en una posición dada como se especifica en el diseño. Después del ensamblaje completo del péptido deseado, la resina se trató de acuerdo con el procedimiento estándar utilizando ácido trifluoroacético para dividir el péptido de la resina y desbloquear los grupos protectores sobre las cadenas laterales del aminoácido. Los péptidos transformados, extraídos y lavados se purificaron por HPLC y se caracterizaron por espectrometría de masas y HPLC de fase reversa.

## EJEMPLO 2

### EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD DE LOS INMUNÓGENOS DEL PÉPTIDO A $\beta$ DE LA PRESENTE INVENCIÓN

Los inmunógenos del péptido derivado de A $\beta$ , fueron evaluados en grupos de conejillos de indias como se especifica por el protocolo de inmunización experimental descrito a continuación y mediante pruebas serológicas para la determinación de la inmunogenicidad.

Diseño Experimental Estándar:

45 Inmunógenos:

(1) inmunógeno del péptido individual; o

(2) una mezcla de inmunógenos del péptido molar igual como se especifica en cada ejemplo.

Dosis: 100  $\mu$ g en 0.5 mL por inmunización a menos que se especifique de otra manera

Ruta: intramuscular a menos que se especifique de otra manera

Adyuvantes: Adyuvante de Freund completo (CFA)/ Adyuvante Incompleto (IFA); o emulsiones agua en aceite a menos que se especifique de otra manera. Los grupos CFA/IFA recibieron CFA en la semana 0, IFA en las semanas posteriores.

5 Programa de Dosis: 0, 3, y 6 semanas o especificados de otra manera.

Cronograma de Sangrado: semanas 0, 5, 8 o especificadas de otra manera

Especie: conejillos de indias Duncan-Hartley o especificados de otra manera

10 Ensayo: ELISAs específicos para cada actividad anti-péptido de suero inmune. El sustrato de fase Sólida fue el fragmento del péptido A $\beta$  por ejemplo A $\beta_{1-14}$  o A $\beta_{1-42}$  de longitud completa (SEQ ID NOs: 67 y 65 sólo de referencia). La sangre se recolectó y procesó en suero, y se almacenó antes del ELISA con los péptidos diana.

15 Las inmunoreactividades de los anticuerpos inducidos contra los péptidos A $\beta$  y contra los péptidos A $\beta_{1-42}$  solubles fueron determinadas por ELISAs (ensayos inmunoabsorbentes de enzima ligada) utilizando placas de microtitulación de fondo plano de 96 pozos que fueron cubiertas con los fragmentos del péptido A $\beta_{1-42}$ , SEQ ID NOs: 67 o 65 sólo de referencia como el inmunosorbente. Las alícuotas (100  $\mu$ L) de la solución del inmunógeno del péptido a una concentración de 5  $\mu$ g/mL fueron incubadas durante 1 hora a 37°C. Las placas fueron bloqueadas por otra incubación a 37°C durante 1 hora con una solución de gelatina/PBS al 3%. A continuación, las placas bloqueadas se secaron y utilizaron para el ensayo. Las alícuotas (100  $\mu$ L) de los sueros inmunes de prueba, iniciando con una dilución 1:100 en una solución reguladora de dilución de muestra y diluciones en serie de diez veces en lo sucesivo, fueron adicionadas a las placas recubiertas del péptido. Las placas fueron incubadas durante 1 hora a 37°C.

20 Las placas se lavaron seis veces con solución reguladora de PBS/Tween® al 0.05%. 100  $\mu$ L del anticuerpo específico anti-especie-cabra marcado con peroxidasa de rábano picante, fueron adicionados a apropiadas diluciones en solución reguladora de dilución conjugada (Solución reguladora de fosfato que contiene NaCl 0.5M, y suero de cabra normal). Las placas fueron incubadas durante 1 hora a 37°C antes de ser lavadas como arriba. Las alícuotas (100  $\mu$ L) de solución de sustrato o-fenilendiamina luego fueron adicionadas. El color se dejó desarrollar durante 5-15 minutos antes de que la reacción de color enzimático fuera detenida, por la adición de 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. La A<sub>492nm</sub> de los contenidos de cada pozo se leyó en un lector de placa. Los títulos de ELISA fueron calculados basados en el análisis de regresión lineal de las absorbancias, con un corte A<sub>492nm</sub> ajustado a 0.5. El valor de corte seleccionado fue riguroso con los valores para muestras control normales diluidas que era menos de 0.15.

### EJEMPLO 3

30 CARACTERIZACIÓN DE LAS INMUNOGENICIDADES RELATIVAS DE A $\beta_{1-42}$  Y SUS FRAGMENTOS N-TERMINALES PARA LA OPTIMIZACIÓN DEL DISEÑO PARA VACUNA SINTÉTICA BASADA EN PÉPTIDO A $\beta$  DE SITIO-DIRIGIDO (solo A $\beta_{1-14}$  cae dentro del alcance de la invención)

35 Para diseñar una vacuna sintética total que genera un alto nivel de anticuerpos de alta afinidad contra los péptidos A $\beta$  con alta reactividad cruzada a los péptidos A $\beta_{1-42}$  solubles y las placas en el cerebro de pacientes con AD, las inmunogenicidades relativas de A $\beta_{1-42}$  y sus fragmentos N-terminal fueron caracterizados inicialmente. Con el fin de determinar las propiedades inmunológicas relativas de las diferentes regiones dentro del péptido A $\beta_{1-42}$ , un adyuvante suave apropiado para uso humano, alum fue empleado en el primer estudio. Las inmunogenicidades relativas del péptido A $\beta_{1-42}$  y un fragmento N-terminal de estos, A $\beta_{1-28}$  se compararon. La evaluación de inmunogenicidad se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 2. Inesperadamente, se encontró que A $\beta_{1-28}$  era más inmunogénico que el péptido A $\beta_{1-42}$ , indicando que existe inmunosupresión dentro del fragmento C-terminal A $\beta_{29-42}$  (Tabla 5).

40 Posteriormente, las inmunogenicidades de A $\beta_{1-28}$  se compararon con A $\beta_{1-14}$ , un fragmento N-terminal pequeño de A $\beta_{1-42}$ . Un adyuvante más potente apropiado para uso humano (Montanide ISA51, Seppic, Paris, FR) fue empleado para la preparación de una emulsión agua-en-aceite para formular la vacuna. Basándose en los datos obtenidos como se muestra en la Tabla 6, las inmunogenicidades relativas para los tres péptidos A $\beta$  (i.e. A $\beta_{1-14}$ , A $\beta_{1-28}$  y A $\beta_{1-42}$ ) fueron clasificados A $\beta_{1-28}$  > A $\beta_{1-42}$  > A $\beta_{1-14}$ . Sorprendentemente, la pérdida del C-terminal 14mer de A $\beta_{1-42}$ , mejora en lugar de reducir la inmunogenicidad. La respuesta de anticuerpo contra A $\beta$  se dirige en primer lugar a la región N-terminal, de manera particular el fragmento N-terminal A $\beta_{1-14}$  como se muestra por los datos de ELISA (Tabla 6). Sin embargo, una reducción adicional del fragmento A $\beta_{1-28}$  a partir del C-terminal para formar el fragmento A $\beta_{1-14}$  resultó en una pérdida de inmunogenicidad.

50 El fragmento A $\beta_{1-14}$  pequeño contiene el sitio regulador/funcional principal, EFRH, localizado en la posición 3-6 del péptido A $\beta_{1-42}$  como se reporta por Solomon *et al.* El bloqueo de este epítope por los anticuerpos modula las

5 dinámicas de agregación como también la resolubilización de los agregados ya formados (Soloman et al., Proc Natl Acad. Sci, 1996; 93:452-455; Proc Natl Aca. Sci, 1997; 94:4109-4112). La mayoría de los anticuerpos anti-  $A\beta_{1-28}$  y  $A\beta_{1-42}$  se dirigen contra el fragmento N-terminal del péptido  $A\beta_{1-42}$  que contiene este epítotope (Tabla 6). Sin embargo, el fragmento  $A\beta_{1-14}$  por si mismo fue muy poco inmunogénico. Los resultados de este experimento sugieren la presencia de un epítotope Th intrínseco dentro del segmento  $A\beta_{15-28}$ . Este epítotope Th intrínseco cuenta para las moderadas inmunogenicidades de los péptidos  $A\beta_{1-28}$  y  $A\beta_{1-42}$  en conejillos de indias.

10 La presencia de un epítotope Th en el fragmento  $A\beta_{15-28}$  es deseable. Sin embargo, es deseable que sea capaz de diseñar un inmunoógeno más potente para una vacuna humana exitosa cuando se enfrenta con la limitación de una molécula MHC humana restringida, el número de dosis apropiada y el tipo de adyuvante permitido para uso humano. Por lo tanto, se ensayaron el enlace de un Th foráneo o extrínseco tal como aquel que se deriva del Th HBV (SEQ ID NO: 1) con el C-terminal del péptido  $A\beta_{1-28}$  (SEQ ID NO:66). El epítotope Th extrínseco mejora significativamente la inmunogenicidad del fragmento  $A\beta_{1-28}$  como se muestra en la Tabla 6. La respuesta del anticuerpo con el inmunoógeno de ingeniería con el fragmento  $A\beta_{1-28}$  permaneció dirigido al fragmento N-terminal funcional del inmunoógeno del péptido (SEQ ID NO: 70) haciendo está construcción un inmunoógeno mejor que el fragmento  $A\beta_{1-28}$  o fragmento  $A\beta_{1-42}$  solo. Este inmunoógeno del péptido (SEQ ID NO: 70) representa un inmunoógeno del péptido con the fórmula:

(A)<sub>n</sub> (fragmento N-terminal del péptido  $A\beta$ )-(B)<sub>o</sub>-(Th)<sub>m</sub> en donde:

A es  $\alpha NH_2$ , con  $A\beta_{1-28}$  que es un fragmento N-terminal de  $A\beta_{1-42}$ ;

B es glicina;

20 Th es un epítotope de la célula T auxiliar derivada a partir de un patógeno foráneo, HBsAg Th (SEQ ID NO: 1), y en donde n es 1,

m es 1 y o es 2.

#### EJEMPLO 4

25 LIMITE INFERIOR DEL FRAGMENTO N-TERMINAL DE  $A\beta$  PARA EL DESARROLLO DE VACUNA SINTÉTICA BASADA EN  $A\beta$  PARA AD (solo  $A\beta_{1-14}$  cae dentro del alcance de la presente invención)

Dado que el sitio regulador/funcional principal que comprende los residuos EFRH se localiza en la posición 3-6 del péptido  $A\beta_{1-42}$  (Soloman et al. Proc Natl Acad. Sci, 1996; 93:452-455; Proc Natl Aca. Sci, 1997; 94:4109-4112), fue útil para explorar el fragmento N-terminal más pequeño del péptido  $A\beta_{1-42}$  como un sitio diana óptimo de la célula B sobre  $A\beta$  para la incorporación en el inmunoógeno sintético de la presente invención.

30 Cada uno de los diferentes fragmentos N-terminal no-inmunogénicos pequeños de  $A\beta$ ,  $A\beta_{1-10}$ ,  $A\beta_{1-12}$ ,  $A\beta_{1-14}$  junto con  $A\beta_{1-28}$  fue incorporado en inmunoógenos diseñados con un representativo Th artificial idealizado (SEQ ID NO:51). El enlace fue a través de un espaciador  $\alpha N$ -Lys. Las construcciones de ingeniería fueron formuladas con adyuvantes fuertes debido a la baja inmunogenicidad esperada de los fragmentos pequeños  $A\beta$ . Las tres construcciones sintéticas fueron formuladas en adyuvante de Freund incompleto y completo y probadas para sus inmunogenicidades basándose en procedimientos como se describe en el Ejemplo 2. Como se muestra en la Tabla 7, todos los cuatro inmunoógenos del péptido fueron altamente inmunogénicos con títulos de ELISA  $\log_{10}$  en el rango de 4.3 a 5.6 [i.e.  $10^{4.3}$  a  $10^{5.6}$ ] con muy altas reactividades cruzadas con el péptido  $A\beta_{1-42}$  de longitud completa después de solamente cuatro semanas a partir de la inmunización inicial. Más considerablemente, los fragmentos tan pequeños como  $A\beta_{1-10}$ ,  $A\beta_{1-12}$  y  $A\beta_{1-14}$  cada uno unido al Th artificial idealizado (SEQ ID NO:51) se encontraron que eran altamente inmunogénicos después del enlace con un epítotope Th artificial revelado (Tabla 7). Estos inmunoógenos del péptido fueron diseñados de acuerdo con la fórmula:

(A)<sub>n</sub>-(fragmento N-terminal del péptido  $A\beta$ )-(B)<sub>o</sub>-(Th)<sub>m</sub> en donde:

A es  $\alpha NH_2$ , en donde el fragmento N-terminal es  $A\beta_{1-10}$ ,  $A\beta_{1-12}$ ,  $A\beta_{1-14}$  o  $A\beta_{1-28}$ ;

B es  $\epsilon$ -N Lisina, un espaciador unido a través de su grupo amino épsilon con el siguiente aminoácido;

45 Th es un epítotope de la célula T auxiliar derivado de un Th artificial idealizado, MVF Th1-16(SEQ ID NO:51), en donde n es 1, m es 1 y o es 1.

Se encontró que otra reducción en la longitud del fragmento N-terminal de  $A\beta$  con menos de un 10mer daría por resultado una más limitada, por lo tanto indeseable, inmunogenicidad. Parece que los péptidos más pequeños de 10

aminoácidos son problemáticos para el reconocimiento del receptor por las moléculas MHC de clase II (Immunology, Fifth edition, ed. Roitt et al., 1998, Mosby International Ltd., London, pp88-89).

Basándose en este estudio de A $\beta$ , el sitio de la célula B útil derivado de A $\beta$ <sub>1-42</sub> debería estar en el rango de tamaño de aproximadamente 10 a aproximadamente 28 residuos.

## 5 EJEMPLO 5

### INMUNOREACTIVIDAD DE SITIO-DIRIGIDO, DIRIGIDA POR EL INMUNÓGENO DEL PÉPTIDO SINTÉTICO LIGADO AL EPITOPE Th ARTIFICIAL

El fragmento N-terminal no-inmunogénico tal como A $\beta$ <sub>1-14</sub> del péptido A $\beta$  se unió ya sea a través de un espaciador  $\epsilon$ N-lisina a un péptido Th artificial designado como MVF Th 1-16 (SEQ ID NO:51), o a través de un procedimiento de acoplamiento químico estándar a una proteína portadora convencional KLH. Las dos construcciones inmunogénicas fueron evaluadas en conejillos de indias por sus inmunogenicidades de "sitio-dirigido" relativas con el péptido A $\beta$  y la reactividad respectiva resultante de los anticuerpos hacia sus portadores respectivos, el epítipo Th artificial o la proteína portadora KLH, de acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 2. El péptido A $\beta$ <sub>1-14</sub> pequeño solo como un inmunógeno control, y las dos construcciones inmunogénicas fueron formulados en una emulsión agua-en-aceite que contiene el adyuvante ISA51, una formulación que es apropiada para uso humano. Como se muestra en la Tabla 8, el fragmento N-terminal de A $\beta$ <sub>1-14</sub> por sí mismo no es inmunogénico como se esperaba. El inmunógeno sintético que comprende el fragmento de A $\beta$ <sub>1-14</sub> y Th artificial (SEQ ID NO: 73) sólo de referencia, se encontró que era altamente inmunogénico en la producción de anticuerpos dirigidos del sitio con A $\beta$ <sub>1-14</sub>. También se encontró que los anticuerpos tienen alta reactividad cruzada con el péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub> soluble a partir de 4 semanas después de la inmunización inicial (títulos de Log<sub>10</sub> de 4.094 y 4.126 para 4 y 6 semanas después de la inmunización inicial respectivamente). Cuando estos sueros inmunes de título de alta reactividad de A $\beta$  se probaron con ELISA sobre la placa recubierta con el péptido MVF Th1-16 (SEQ ID NO 51), se encontró que eran negativos (títulos de Log<sub>10</sub> de 0.038 y 0.064 por 4 y 6 semanas después de la inmunización inicial respectivamente) mostrando que no se produjeron anticuerpos irrelevantes. Los datos obtenidos como se muestra en la Tabla 8 demostraron claramente la característica de sitio-dirigido altamente específico del inmunógeno del péptido de la presente invención.

Se encontró que los inmunógenos con la proteína portadora KLH, eran altamente inmunoreactivos con el convencional conjugado péptido-proteína portadora (por ejemplo títulos de Log<sub>10</sub> de 4.903 y 5.018 para 4 y 6 semanas después de la inmunización inicial respectivamente). Sin embargo, los anticuerpos inducidos tuvieron solo moderada reactividad cruzada con el péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub> soluble (por ejemplo con títulos de Log<sub>10</sub> de 3.342 y 2.736 para 4 y 6 semanas después de la inmunización inicial respectivamente). Esto es aproximadamente 10X a 100X menos que la SEQ ID NO:73. Inesperadamente, los inmunógenos del péptido de la presente invención fueron altamente dirigidos del sitio y centrados. Los anticuerpos importantes solo funcionalmente hacia los sitios anti-agregación y desagregación en el fragmento N-terminal del péptido A $\beta$  se generaron en lugar de hacia sitios portadores irrelevantes.

## 35 EJEMPLO 6

### EVALUACIÓN DEL INMUNÓGENO DEL PÉPTIDO A $\beta$ MEDIANTE REACTIVIDADES CRUZADAS PARA LAS PLACAS SENILES (solo A $\beta$ <sub>1-14</sub> cae dentro del alcance de la presente invención)

Los cerebros de pacientes con AD con placas y ovillos neurofibrilares y vasos sanguíneos positivos a la tioflavina S (TSBV) que contienen placas amiloides fueron utilizados para la evaluación de reactividades cruzadas a placas seniles poliméricas de los sueros inmunes construidos en conejillos de indias y babuinos contra inmunógenos del péptido A $\beta$ . Las reactividades en placas y TSBV se detectaron por tinción de la inmunoperoxidasa utilizando método Complejo de Anticuerpo Avidina-Biotinilado (ABC) o por tinción de inmunofluorescencia utilizando fragmento Fab conjugado con rodamina de anti-IgG específico de la especie. Todos los sueros de conejillo de india fueron probados a una dilución de 1:100 con títulos de punto final determinados por algunas de las muestras. Todos los sueros de babuinos fueron probados a una dilución de 1:50. La evaluación de los sueros inmunes y preinmunes fueron realizados suavemente bajo el código por Dr. Gaskin según se describe (Gaskin et al., J. Exp Med. 165:245, 1987).

El suero normal preinmune y los sueros inmunes de conejillos de indias recolectados a 6 semanas después de la inmunización inicial se probaron con tinción de inmunoperoxidasa sobre secciones de criostato a partir del cortex temporal de AD rico en placas y ovillos de neurofilamentos (NFT). Los sueros inmunes utilizados en el primer estudio fueron obtenidos a partir de animales inmunizados con A $\beta$ <sub>1-28</sub> - $\epsilon$ K-MvF Th1-16 (SEQ ID NO:74) preparados en emulsión agua-en-aceite ISA51. Los resultados muestran enlace significativo con ambas placas seniles y placas amiloides en los vasos sanguíneos positivos a la tioflavina S (TSBV). Inesperadamente, en contraste con los resultados obtenidos con la vacuna formulada con ISA51, enlace preferencial con las placas A $\beta$ <sub>1-28</sub> en los vasos sanguíneos (TSBV) fueron observados para los sueros construidos contra la vacuna CFA/ICFA. Esto significa que los anticuerpos inducidos por la vacuna formulada con ISA51 se distinguen de los anticuerpos construidos por la

vacuna formulada en CFA/ICFA. Además, los anticuerpos generados por las vacunas formuladas de acuerdo con la presente invención proporcionaron anticuerpos que tienen la deseada mayor reactividad cruzada a las placas seniles en el tejido de cerebro. El suero preinmune no dio la tinción en secciones en serie correspondientes.

5 Los sueros obtenidos de los animales inmunizados con A $\beta$ <sub>1-28</sub>- $\epsilon$ -K-MVF Th 1-16 (Seq ID NO:74) preparados en emulsión agua-en-aceite ISA 51 tiñeron fuertemente las placas que forman un patrón de núcleos. Una vez más, sorprendentemente, la tinción con sueros inmunes preparados contra la formulación CFA/ICFA correspondiente dio un patrón de tinción diferente en el que las reactividades con placas fueron predominantemente en los vasos sanguíneos diferentes que con las placas en el tejido de cerebro. El suero preinmune no tiñó las secciones. Los sueros hiperinmunes generados por la inmunización con el péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub> solo en CFA/ICFA, a pesar de sus fuertes reactividades con A $\beta$ <sub>1-28</sub> por ELISA, dieron un patrón de tinción sorprendentemente débil.

10 La inmunotinción similar del tejido de cerebro AD se desarrolló con 11 sueros inmunes y preinmunes mezclados obtenidos de conejillos de indias inmunizados con las diferentes formulaciones de las vacunas descritas en los Ejemplos 3, 4 y 5. Estos sueros también fueron evaluados por sus reactividades de los anticuerpos con el sitio funcional mediante un ELISA de A $\beta$ <sub>1-14</sub>, y con el A $\beta$ <sub>1-42</sub> soluble mediante el ELISA A $\beta$ <sub>1-42</sub> (Tabla 9). En general, se encontraron tendencias paralelas con sueros probados en los tres ensayos. Como se muestra en la Tabla 9, las reactividades anti-péptido del suero pre-inmune y los sueros construidos contra el péptido A $\beta$ <sub>1-14</sub> pequeño solo formulados en emulsión agua-en-aceite ISA51 por el ELISA fueron bajas y las reactividades cruzadas a las placas fueron insignificantes. Las reactividades moderadas se encontraron con sueros a partir de animales vacunados con péptido A $\beta$ <sub>1-28</sub> solo formulado en Alum y en ISA51, y A $\beta$ <sub>1-14</sub> conjugado con KLH y formulado en ISA51. Dado que, reactividades de sitio-dirigido significantes con el sitio funcional de A $\beta$ <sub>1-14</sub>, con A $\beta$  soluble, y con las placas y TSBV en secciones de tejido de cerebro de paciente con AD se encontraron con sueros de animales inmunizados con inmunógenos A $\beta$ /Th sintéticos de la presente invención. Los resultados obtenidos a partir de estos estudios, por consiguiente, demuestran excelente y útil inmunogenicidad de los inmunógenos del péptido que comprenden el fragmento N-terminal de A $\beta$ <sub>1-42</sub> que tienen aminoácidos de 1-28 a aproximadamente 1-10, unidos a epitopes Th foráneos. Además, los resultados mostraron que la presencia de un epitope Th foráneo mejora la inmunogenicidad de los inmunógenos del péptido de la presente invención a un grado sorprendente. Los inmunógenos del péptido de la presente invención en formulaciones clínicamente aceptables de las vacunas aceptables para su uso en humanos, generaron anticuerpos que tienen la deseada reactividad cruzada con las placas seniles en los tejidos de cerebro de pacientes con AD.

### 30 EJEMPLO 7

LA INMUNOGENICIDAD DE VACUNAS DEL PÉPTIDO A $\beta$  REPRESENTATIVAS EN BABUINOS COMO PREDICTOR DE LA EFICACIA INMUNOTERAPÉUTICA PARA AD (solo A $\beta$ <sub>1-14</sub> cae dentro del alcance de la presente invención)

35 Un inmunógeno sintético representativo, A $\beta$ <sub>1-28</sub>- $\epsilon$ -K-MvF Th1-16 (SEQ ID NO:74), formulado en emulsión agua-en-aceite ISA51 a niveles de dosis de 25ug/0.5mL, 100ug/0.5mL y 400ug/0.5mL fueron administrados a tres babuinos Y299, X398, X1198 en un cronograma de 0,3 y 6 semanas a partir de la inmunización inicial. Pre-sueros inmunes y sueros a 5 semanas y 8 semanas después de la inmunización inicial (wpi) fueron recolectados. Por comparación, un cuarto babuino X798 fue administrado con una dosis de 100ug/0.5mL de una mezcla equimolar de péptidos libres A $\beta$ <sub>1-28</sub> y A $\beta$ <sub>1-42</sub> formulada en alum, el adyuvante estándar aprobado para uso humano. Sueros preinmunes fueron utilizados como el control negativo.

40 Los sueros de los cuatro animales inmunizados fueron recolectados y evaluados por sus reactividades de los anticuerpos con el sitio funcional mediante el ELISA de A $\beta$ <sub>1-14</sub>, y por reactividades con A $\beta$ <sub>1-42</sub> soluble mediante el ELISA de A $\beta$ <sub>1-42</sub> (para sueros recolectados a 0,5 y 8 wpi). Las reactividades cruzadas de los anti-sueros (8wpi solamente) con las placas seniles y las placas en vasos sanguíneos positivos a la tioflavina S fueron evaluados por inmunotinción como se describe en el Ejemplo 6. En lugar de utilizar Ig anti-babuino, el detector del anticuerpo utilizado es un fragmento Fab a partir de un IgG anti-humano que reconoce todos los isotipos humanos y tiene reacción cruzada con IgG babuino.

45 Tendencias paralelas de nuevo se encontraron con sueros probados en los tres ensayos. Como se muestra en la Tabla 10, pre-sueros inmunes fueron negativos. Reactividades moderadas de ELISA se encontraron con suero a partir de animal X798 vacunado con A $\beta$ <sub>1-28</sub> y A $\beta$ <sub>1-42</sub> formulado en Alum. Sin embargo, la reactividad de este suero fue débil para el reconocimiento de placas seniles. En contraste, las reactividades de sitio-dirigido significantes para el sitio funcional de A $\beta$ <sub>1-14</sub>, para A $\beta$ <sub>1-42</sub> soluble, y para las placas y TSBV en secciones de cerebro de paciente con AD se encontraron con sueros recolectados a 8 semanas después de la inmunización inicial a partir de animales inmunizados con la composición representativa de la invención (SEQ ID NO:74) en ambas la dosis de 100ug/0.5mL y de 400ug/0.5mL formuladas con ISA51. Los resultados obtenidos a partir de este estudio de babuino, por consiguiente, demostraron la utilidad del inmunógeno de la presente invención en una formulación de la vacuna apropiada para humanos. La mejora en inmunogenicidad (10 a 100X aumenta en títulos de anticuerpo específicos

para el sitio funcional de A $\beta$ ) es muy significativa en comparación con la vacuna del péptido del oficio previo con la sensibilidad inmune en babuinos muy parecida a la de los humanos.

- 5 Del mismo modo, una mezcla que contiene dos a tres inmunógenos sintéticos de la presente invención se pueden utilizar para la formulación en vacunas de aproximadamente 25 a 1000 ug por dosis para inducir anticuerpos anti-A $\beta$ <sub>1-14</sub> funcionales en poblaciones humanas genéticamente diversas para la prevención y el tratamiento de AD. Una amplia inmunogenicidad en humanos se espera debido a la presencia de un epítipo Th promiscuo en el inmunógeno del péptido de la invención que se proporciona para lograr un amplio reconocimiento de MHC.

Tabla 1 (sólo de referencia)

Epitopes Promiscuos de la Célula Auxiliar T (Th) derivados de Patógenos		
Descripción de Th	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO
HBs Tha	FFLLTRILTIPQSLD	1
PT <sub>1</sub> Th <sup>a</sup>	KKLRRLLYMIYMSGLAVRVHVSKEEQYYDY	2
TT <sub>1</sub> Th <sup>a</sup>	KKQYIKANSKFIGITEL	3
TT <sub>2</sub> Th <sup>a</sup>	KKFNNFTVSFWLRVPKVSASHL	4
PT <sub>IA</sub> Th <sup>a</sup>	YMSGLAVRVHVSKEE	5
TT <sub>3</sub> Th <sup>a</sup>	YDPNYLRTDSDKDRFLQTMVKLFNRIK	6
PT <sub>2</sub> Th <sup>a</sup>	GAYARCPNGTRALTVAELRGNAEL	7
MVF <sub>1</sub> Th <sup>a</sup>	LSEIKGVIVHRLEGV	8
MVF <sub>2</sub> Th <sup>a</sup>	GILES RGI KARITHVDTESY	9
TT <sub>4</sub> Th <sup>e</sup>	WVRDIIDDFTNESSQKT	10
TT <sub>5</sub> Th <sup>a</sup>	DVSTIVPYIGPALNHV	11
CT Th <sup>a</sup>	ALNIWDRFDVFCTLGATTGYLKGNS	12
DT <sub>1</sub> Th <sup>a</sup>	DSETADNLEKTVAALSILPGHGC	13
DT <sub>2</sub> Th <sup>a</sup>	EEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGELVDIGFAATNFVESC	14
PF Th <sup>a</sup>	DHEKKHAKMEKASSVFNWNS	15
SM Th <sup>a</sup>	KWFKTNAPNGVDEKHRH	16
TraT <sub>1</sub> Th <sup>a</sup>	GLQGKHADAVKAKG	17
TraT <sub>2</sub> Th <sup>a</sup>	GLAAGLVGMAADAMVEDVN	18
TraT <sub>3</sub> Th <sup>a</sup>	STETGNQHYYQTRVVSANK	19
HB <sub>c50-69</sub> <sup>b</sup>	SDFFPSVRDLLDTASALYRE	20
CTP <sub>11</sub> Th <sup>c</sup>	TINKPKGYVGKE	21
<sup>a</sup> US 5,759,551		

<sup>b</sup> Ferrari et al., J Clin Invest, 1991; 88:214

<sup>c</sup> Stagg et al., Immunology, 1993; 71:1

Tabla 2

Th Idealizado Artificial y Biblioteca Combinatoria de Th Idealizado Artificial		
a. Epitopes de Th y MVF Th derivado de estos		
Identificador de Th	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO
MVF Th1	LSEIKGVIVHRLEGV	22
SSAL1 Th1 *	DLSDLK <u>GLL</u> LHKLDGL	23
	<b>EI EIR III RIE I</b>	24
	<b>V V VVV V V</b>	25
	<b>F F FFF F F</b>	26
MVF Th1-1*	ISEIKGVIVHKIEGI	27
	<b>MT RT TRM TM</b>	28
	<b>L L V</b>	29
MVF Th1-2 *	<b>ISEIKGVIVHKIEGI</b>	30
	<b>T RT TR T</b>	31
MVF Th1-3 *	MSEIKGVIVHKLEGM	32
	LT MRT TRM TV	33
MVF Th1-4 *	ISEIKGVIVHKIEGI	34
MVF Th1-5 *	ITEIRTVIVTRIEI	35
MVF Th1-6 *	MSEMKGIVVHKMEGM	36
MVF	LTEIRTVIVTRLETV	37
Th1-7 * MVF Th1-8 *	ISISEIKGVIVHKIEGILF	38
	<b>MT RT TRM TM</b>	39
	<b>L L V</b>	40
MVF Th1-9 *	ISISEIKGVIVHKIEGILF	41
	T RT TR T	42
MVF Th1-10 *	<b>ISLSEIKGVIVHKLEGMLF</b>	43
	<b>MT MRT TRM TV</b>	44



MVF Th1-11 *	<b>ISLTEIRTVIVTRLETVLF</b>	45
	<b>I I I</b>	46
MVF Th1-12 *	ISISEIKGVIVHKIEGILF	47
MVF Th1-130 *	ISITEIRTVIVTRLETILF	48
MVF Th1-14 *	ISMSEMKGIVIVHKMEGMLF	49
MVF Th1-15 *	ISLTEIRTVIVTRLETVLF	50
MVF Th1-16	ISITEIKGVIVHRIETILF	51
b. HBsAg Th, Prototipo y Derivados (sólo de referencia)		
<b>Identificador de Th</b>	<b>Secuencia de Aminoácidos</b>	<b>SEQ ID NO</b>
HbsAg-Th1	FFLLTRILTIPQSLD	52
HbsAg-Th1-1	KKKFFLLTRILTIPQSLD	53
HbsAg-Th1-2	FFLLTRILTIPQSL	54
SSAL2 Th2	<b>KKKLE<u>LL</u>TK<u>LL</u>TL<u>PQSLD</u></b>	55
	<b>RRRIK<u>I</u> <u>R</u>I <u>I</u> L IR</b>	56
	<b>VR<u>V</u> <u>V</u>V V I V</b>	57
	<b>F <u>FF</u> <u>FF</u> F V F</b>	58
	<b>F</b>	59
HbsAg Th1-3	KKKIITIRIITIITID	60
HbsAg Th1-4	KKKIITIRIITIITI	61
HbsAg Th1-5	KKKMMTMTRMITMITID	62
HbsAg Th1-6	FITMDTKFLLASTHIL	63
HbsAg Th1-7	KKKFITMDTKFLLASTHIL	64
* no dentro del alcance de la invención		

Tabla 3

Secuencias de Aminoácidos de Péptidos A $\beta$ <sub>1-42</sub> y sus Fragmentos N-terminal		
SEQ ID NO		Secuencia de Aminoácidos
SEQ ID NO:65*	A $\beta$ <sub>1-42</sub>	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
SEQ ID NO:66*	A $\beta$ <sub>1-28</sub>	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK
SEQ ID NO:67 A $\beta$ <sub>1-14</sub>	A $\beta$ <sub>1-14</sub>	DAEFRHDSGYEVHH

SEQ ID NO:68*	Aβ <sub>1-12</sub>	DAEFRHDSGYEV
SEQ ID NO:69 *	Aβ <sub>1-10</sub>	DAEFRHDSGY
* no dentro del alcance de la invención		

Tabla 4

Inmunógeno	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO
Aβ <sub>1-28</sub> -GG-HBV Th	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK-GG-FFLLTRILTIPQSLD	70 *
Aβ <sub>1-10</sub> -εK-IS-MVF Th1-16	DAEFRHDSGY-EK-ISITEIKGVIVHRIETILF	71 *
Aβ <sub>1-12</sub> -εK-IS-MVF Th1-16	DAEFRHDSGYEV-εK-ISITEIKGVIVHRIETILF	72 *
Aβ <sub>1-14</sub> -εEK-IS-MVF Th1-16	DAEFRHDSGYEVHH-EK-ISITEIKGVIVHRIETILF	73
Aβ <sub>1-28</sub> -εEK-IS-MVF Th1-16	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK-εKISITEIKGVIVHRIETILF	74 *
Aβ <sub>1-14</sub> -εK-MVF Th1-9	<b>DAEFRHDSGYEVHH-εK-ISISEIKGVIVHKIEGILF</b>	75 *
	<b>T RT TR T</b>	76 *
* no dentro del alcance de la invención		

Tabla 5 (sólo de referencia)

Inmunógeno	Adyuvante	GP ID #	Título de ELISA (Log <sub>10</sub> )							
			4 WPI				6 WPI			
			Aβ <sub>1-14</sub>	Media	Aβ <sub>1-42</sub>	Media	Aβ <sub>1-14</sub>	Media	Aβ <sub>1-42</sub>	Media
Aβ <sub>1-28</sub> (SEQ ID NO:66)	Alum	1630	1.244	2.326	2.401	0.878	0.888	1.966	1.202	2.405
		1631	3.408		3.924		3.044		3.608	
Aβ <sub>1-42</sub> (SEQ ID NO:65)	Alum	1634	0.773	1.124	0.680	1.461	1.062	1.784	1.203	1.807
		1635	1.474		2.242		2.505		2.510	

5

Tabla 6

Inmunógeno	Adyuvante	GP ID #	Título de ELISA (Log <sub>10</sub> )							
			4 WPI				6 WPI			
			Aβ <sub>1-14</sub>	Media	Aβ <sub>1-42</sub>	Media	Aβ <sub>1-14</sub>	Media	Aβ <sub>1-42</sub>	Media
AP1-14 (SEQ ID NO: 67)	ISA51	1658	1.168	1.129	1.229	0.975	1.100	1.271	1.285	1.080

ES 2 360 465 T3

		1659	1.090		0.720		1.441		0.874	
A $\beta$ <sub>1-28</sub> (SEQID NO:66)*	ISA51	1632	2.341	2.291	3.656	3.382	2.276	2.715	3.359	3.455
		1633	2.241		3.107		3.153		3.550	
AP1-28- GGHBVTh (SEQ ID NO: 70)	ISA51	1642	4.792	4.612	4.526	4.582	4.548	4.498	4.441	4.261
		1643	4.432		4.637		4.447		4.081	
A $\beta$ <sub>1-42</sub> (SEQID NO:65)*	ISA51	1636	2.724	1.864	3.603	2.402	2.286	1.997	3.250	2.873
		1637	1.004		1.201		1.707		2.495	
* no dentro del alcance de la invención										

Tabla 7

Inmunógeno	Adyuvante	GP ID #	Título de ELISA (Log <sub>10</sub> )							
			4 WPI				6 WPI			
			A $\beta$ <sub>1-14</sub>	Media	A $\beta$ <sub>1-42</sub>	Media	A $\beta$ <sub>1-14</sub>	Media	A $\beta$ <sub>1-42</sub>	Media
A $\beta$ <sub>1-10</sub> - $\epsilon$ k-MVF Th1-16 (SEQ ID NO:71*)	CFA/IFA	1666	4.293	4.495	4.924	5.087	4.414	4.320	5180	5.265
		1667	4.696		5.250		4.225		5.350	
A $\beta$ <sub>1-12</sub> - $\epsilon$ k-MVF Th1-16 (SEQ ID NO:72*)	CFA/IFA	1664	4.577	4.495	5.100	4.891	5.320	4.545	6.000	5.278
		1665	4.322		4.682		3.700		4.555	
A $\beta$ <sub>1-14</sub> - $\epsilon$ k-MVF Th1-16 (SEQ ID NO:73)	CFA/IFA	1660	3.700	3.285	4.677	5.060	4.544	4.683	5.250	5.625
		1661	4.764		5.443		4.822		6.000	
A $\beta$ <sub>1-28</sub> - $\epsilon$ k-MVF Th1-16 (SEQ ID NO:74*)	CFA/IFA	1584	3.355	3.201	4.610	4.328	2.743	3.592	4.487	4.901
		1585	3.707		4.688		3.731		5.155	
		1586	2.545		3.685		4.304		5.061	
* no dentro del alcance de la invención										

Tabla 8

Inmunógeno	Adyuvante	GP ID #	Título de ELISA (Log <sub>10</sub> )							
			4 WPI				6 WPI			
			A $\beta$ <sub>1-14</sub>	Media	péptido Th o KLH	Media	A $\beta$ <sub>1-14</sub>	Media	péptido Th o KLH	Media
A $\beta$ <sub>1-14</sub> ID NO:67)	ISA 51	1658	1.229	0.975	NA	NA	1.285	1.080	NA	NA

		1659	0.720		NA		0.874		NA	
Th1-14-εk-MVFT1-16 (SEQ ID NO:73)	ISA 51	1662	4.388	4.094	0.006	0.038	4.559	4.126	0.065	0.064
		1663	3.800		0.070		3.693		0.063	
KLH-(C) Aβ <sub>1-14</sub> (SEQ ID NO: 67)	ISA51	1670	3.181	3.342	4.672	4.903	2.625	2.736	4.876	5.018
		1671	3.502		5.133		2.846		5.160	

Tabla 9

Formulación de la Vacuna	GP ID#	Título de ELISA (Log <sub>10</sub> )				Inmunotinción <sup>a</sup> de secciones congeladas en serie de tejido de cerebro con AD	
		Aβ <sub>1-42</sub>		Aβ <sub>1-14</sub>		Placa	TSBV
			Media		Media		
Aβ <sub>1-28</sub> en Alum <sup>b</sup>	1630	0.878	2.401	1.244	2.326	+1	+4
	1631	3.924		3.408			
Aβ <sub>1-28</sub> en ISA51 <sup>b</sup>	1632	3.686	3.397	2.341	2.291	+3	+5
	1633	3.107		2.241			
Aβ <sub>1-28</sub> -εk-MVF Th1-16 en CFA/IFA (SEQ ID NO: 74) <sup>b</sup>	1584	4.610	4.328	3.355	3.201	+4	+6
	1585	4.688		3.707			
	1586	3.685		2.540			
Aβ <sub>1-28</sub> -εk-MVF Th1-16 en ISA51 (SEQ ID NO: 74) <sup>b</sup>	1642	3.603	4.582	2.724	3.510	+4	+6
	1643	1.201		1.004			
Aβ <sub>1-14</sub> en ISA51	1658	1.229	0.975	1.168	1.129	Neg	Neg
	1659	0.720		1.090			
Aβ <sub>1-14</sub> εk-MVF Th1-16 en CFA/IFA (SEQ ID NO: 73)	1660	4.677	5.060	3.700	4.232	+4	+6
	1661	5.443		4.764			
Aβ <sub>1-14</sub> -εk-MVF Th1-16 en ISA51 (SEQ ID NO: 73)	1662	4.388	4.094	3.551	3.285	+4	+6
	1663	3.800		3.018			
Aβ <sub>1-12</sub> -εk-MVF Th1-16 en CFA/IFA (SEQ ID NO: 72) <sup>b</sup>	1664	5.100	4.891	4.577	4.450	+4	+6
	1665	4.682		4.322			
Aβ <sub>1-10</sub> εk-MVF Th1-16 en CFA/IFA (SEQ ID NO: 71) <sup>b</sup>	1666	4.924	5.087	4.293	4.455	+4	+5
	1667	5.250		4.696			

KLH-(C) A $\beta$ <sub>1-14</sub> en ISA51	1670	3.181	3.342	3.280	3.102	+2	+4
	1635	3.502		2.924			
Control Negativo (suero preimmune)	<0.5		<0.5			Neg	Neg
a: Dilución en serie @ 1:100							
b: sólo de referencia							

Tabla 10 (sólo de referencia)

Grupo #	Formulación de la Vacuna	Dosis	Título de ELISA (Log <sub>10</sub> )						Inmunotinción de secciones congeladas de cerebro con AD (8 wpi)	
			A $\beta$ <sub>1-42</sub>			A $\beta$ <sub>1-14</sub>			Placas	TSBV
			0WPI	5WPI	8WPI	0WPI	5WPI	8WPI		
1	A $\beta$ <sub>1-28</sub> - $\epsilon$ kV-MVFT <sub>h1</sub> - 16 en ISA51	25 $\mu$ g	0.894	2.962	2.736	0.665	1.745	2.706	+2	+
2		100 $\mu$ g	0.610	2.987	3.640	0.794	2.816	4.800	+4	+6
3		400 $\mu$ g	0.696	2.696	4.050	0.539	4.250	3.799	+4	+6
4	A $\beta$ <sub>1-28</sub> + A $\beta$ <sub>1-42</sub> en Alum	100 $\mu$ g	0.897	1.963	2.485	0.798	0.727	2.850	+	+
5	Control negativo	-	-	-	-	-	-	-	Neg	Neg

**LISTA DE SECUENCIAS**

- 5 <110> United Biomedical Inc.
- <120> Composición de Péptidos Inmunogénicos como vacuna para la Prevención y Tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer
- <130> 73868 ST/OH/NW
- <150> US 01/865,294
- 10 <151> 2001-05-25
- <160> 77
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 15
- 15 <212> PRT
- <213> Virus de la Hepatitis B
- <400> 1

ES 2 360 465 T3

Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp  
1 5 10 15

<210> 2

<211> 30

<212> PRT

5 <213> Bordetella pertussis

<400> 2

Lys Lys Leu Arg Arg Leu Leu Tyr Met Ile Tyr Met Ser Gly Leu Ala  
1 5 10 15

Val Arg Val His Val Ser Lys Glu Glu Gln Tyr Tyr Asp Tyr  
20 25 30

<210> 3

10 <211> 17

<212> PRT

<213> Clostridium tetani

<400> 3

Lys Lys Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu  
1 5 10 15

15 <210> 4

<211> 22

<212> PRT

<213> Clostridium tetani

<400> 4

Lys Lys Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys  
1 5 10 15

20

Val Ser Ala Ser His Leu  
20

<210> 5

<211> 15



ES 2 360 465 T3

Leu Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly Val  
1 5 10 15

<210> 9

<211> 20

<212> PRT

5 <213> Escherichia coli

<400> 9

Gly Ile Leu Glu Ser Arg Gly Ile Lys Ala Arg Ile Thr His Val Asp  
1 5 10 15

Thr Glu Ser Tyr

20

<210> 10

10 <211> 17

<212> PRT

<213> Clostridium tetani

<400> 10

Trp Val Arg Asp Ile Ile Asp Asp Phe Thr Asn Glu Ser Ser Gln Lys  
1 5 10 15

Thr

15 <210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> Clostridium tetani

<400> 11

Asp Val Ser Thr Ile Val Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu Asn His Val  
1 5 10 15

20

<210> 12



ES 2 360 465 T3

<211> 25

<212> PRT

<213> Chlamydia trachomatis

<400> 12

5 Asp Val Ser Thr Ile Val Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu Asn His Val  
1 5 10 15

Thr Thr Gly Tyr Leu Lys Gly Asn Ser  
20 25

<210> 13

<211> 23

<212> PRT

10 <213> Difteria

<400> 13

Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Val Ala Ala Leu Ser  
1 5 10 15

Ile Leu Pro Gly His Gly Cys  
20

<210> 14

15 <211> 39

<212> PRT

<213> Difteria

<400> 14

Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala  
1 5 10 15

Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp Ile Gly Phe Ala Ala  
20 25 30

20

Thr Asn Phe Val Glu Ser Cys  
35

ES 2 360 465 T3

<210> 15

<211> 21

<212> PRT

<213> Plasmodium falciparum

5 <400> 15

Asp His Glu Lys Lys His Ala Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser Val Phe

1 5 10 15

Asn Val Val Asn Ser

20

<210> 16

<211> 17

10 <212> PRT

<213> Schistosoma mansoni

<400> 16

Lys Trp Phe Lys Thr Asn Ala Pro Asn Gly Val Asp Glu Lys His Arg

1 5 10 15

<210> 17

15 <211> 14

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 17

Gly Leu Gln Gly Lys His Ala Asp Ala Val Lys Ala Lys Gly

1 5 10

20 <210> 18 <211> 19

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 18

Gly Leu Ala Ala Gly Leu Val Gly Met Ala Ala Asp Ala Met Val Glu

1 5 10 15



<212> PRT

<213> Virus del Sarampión

<400> 22

Leu Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly Val  
 1 5 10 15

5 <210> 23

<211> 16

<212> PRT

<213> Virus del Sarampión

<400> 23

Asp Leu Ser Asp Leu Lys Gly Leu Leu Leu His Lys Leu Asp Gly Leu  
 1 5 10 15

10

<210> 24

<211> 16

<212> PRT

<213> Virus del Sarampión

15 <400> 24

Glu Ile Ser Glu Ile Arg Gly Ile Ile Ile His Arg Ile Glu Gly Ile  
 1 5 10 15

<210> 25

<211> 16

<212> PRT

20 <213> Virus del Sarampión

<400> 25

Asp Val Ser Asp Val Lys Gly Val Val Val His Lys Val Asp Gly Val  
 1 5 10 15

<210> 26

<211> 16

25 <212> PRT

<213> Virus del Sarampión

<400> 26

Asp Phe Ser Asp Phe Lys Gly Phe Phe Phe His Lys Phe Asp Gly Phe  
 1 5 10 15

<210> 27

5 <211> 15

<212> PRT

<213> Virus del Sarampión

<400> 27

Ile Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Ile Glu Gly Ile  
 1 5 10 15

10 <210> 28

<211> 15

<212> PRT

<213> Virus del Sarampión

<400> 28

Met Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Met Glu Thr Met  
 1 5 10 15

15

<210> 29

<211> 15

<212> PRT

<213> Virus del Sarampión

20 <400> 29

Leu Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Leu Glu Gly Val  
 1 5 10 15

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

25 <213> Virus del Sarampión

<400> 30

Ile Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Ile Glu Gly Ile  
 1 5 10 15

<210> 31

<211> 15

5 <212> PRT

<213> Virus del Sarampión

<400> 31

Ile Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Ile Glu Thr Ile  
 1 5 10 15

<210> 32

10 <211> 15

<212> PRT

<213> Virus del Sarampión

<400> 32

Met Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Leu Glu Gly Met  
 1 5 10 15

15 <210> 33

<211> 15

<212> PRT

<213> Virus del Sarampión

<400> 33

Leu Thr Glu Met Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Met Glu Thr Val  
 1 5 10 15

20

<210> 34

<211> 15

<212> PRT

<213> Virus del Sarampión

25 <400> 34

ES 2 360 465 T3

Ile Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Ile Glu Gly Ile  
1 5 10 15

<210> 35

<211> 15

<212> PRT

5 <213> Virus del Sarampión

<400> 35

Ile Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Ile Glu Thr Ile  
1 5 10 15

<210> 36

<211> 15

10 <212> PRT

<213> Virus del Sarampión

<400> 36

Met Ser Glu Met Lys Gly Val Ile Val His Lys Met Glu Gly Met  
1 5 10 15

<210> 37

15 <211> 15

<212> PRT

<213> Virus del Sarampión

<400> 37

Leu Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Leu Glu Thr Val  
1 5 10 15

20 <210> 38

<211> 19

<212> PRT

<213> Virus del Sarampión

<400> 38

ES 2 360 465 T3

Ile Ser Ile Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Ile Glu Gly  
1 5 10 15

Ile Leu Phe

<210> 39

<211> 19

5 <212> PRT

<213> Virus del Sarampión

<400> 39

Ile Ser Met Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Met Glu Thr  
1 5 10 15

Met Leu Phe

<210> 40

10 <211> 19

<212> PRT

<213> Virus del Sarampión

<400> 40

Ile Ser Leu Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Leu Glu Gly  
1 5 10 15

Val Leu Phe

15 <210> 41

<211> 19

<212> PRT

<213> Virus del Sarampión

<400> 41



# ES 2 360 465 T3

Ile Ser Ile Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Ile Glu Gly  
1 5 10 15

Ile Leu Phe

<210> 42

<211> 19

<212> PRT

5 <213> Virus del Sarampión

<400> 42

Ile Ser Ile Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Ile Glu Thr  
1 5 10 15

Ile Leu Phe

<210> 43

<211> 19

10 <212> PRT

<213> Virus del Sarampión

<400> 43

Ile Ser Leu Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Leu Glu Gly  
1 5 10 15

Met Leu Phe

<210> 44

15 <211> 19

<212> PRT

<213> Virus del Sarampión

<400> 44

# ES 2 360 465 T3

Ile Ser Met Thr Glu Met Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Met Glu Thr  
1 5 10 15

Val Leu Phe

<210> 45

<211> 19

<212> PRT

5 <213> Virus del Sarampión

<400> 45

Ile Ser Leu Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Leu Glu Thr  
1 5 10 15

Val Leu Phe

<210> 46

<211> 19

10 <212> PRT

<213> Virus del Sarampión

<400> 46

Ile Ser Ile Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Ile Glu Thr  
1 5 10 15

Ile Leu Phe

<210> 47

15 <211> 19

<212> PRT

<213> Virus del Sarampión

<400> 47

# ES 2 360 465 T3

Ile Ser Ile Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Ile Glu Gly  
1 5 10 15

Ile Leu Phe

<210> 48

<211> 19

<212> PRT

5 <213> Virus del Sarampión

<400> 48

Ile Ser Ile Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Ile Glu Thr  
1 5 10 15

Ile Leu Phe

<210> 49

<211> 19

10 <212> PRT

<213> Virus del Sarampión

<400> 49

Ile Ser Met Ser Glu Met Lys Gly Val Ile Val His Lys Met Glu Gly  
1 5 10 15

Met Leu Phe

<210> 50

15 <211> 19

<212> PRT

<213> Virus del Sarampión

<400> 50

# ES 2 360 465 T3

Ile Ser Leu Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Leu Glu Thr  
1 5 10 15

Val Leu Phe

<210> 51

<211> 19

<212> PRT

5 <213> Virus del Sarampión

<400> 51

Ile Ser Ile Thr Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Ile Glu Thr  
1 5 10 15

Ile Leu Phe

<210> 52

<211> 15

10 <212> PRT

<213> Virus de la Hepatitis B

<400> 52

Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp  
1 5 10 15

<210> 53

15 <211> 18

<212> PRT

<213> Virus de la Hepatitis B

<400> 53

# ES 2 360 465 T3

Lys Lys Lys Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser  
1 5 10 15

Leu Asp

<210> 54

<211> 14

<212> PRT

5 <213> Virus de la Hepatitis B

<400> 54

Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu  
1 5 10

<210> 55

<211> 18

10 <212> PRT

<213> Virus de la Hepatitis B

<400> 55

Lys Lys Lys Leu Phe Leu Leu Thr Lys Leu Leu Thr Leu Pro Gln Ser  
1 5 10 15

Leu Asp

<210> 56

15 <211> 18

<212> PRT

<213> Virus de la Hepatitis B

<400> 56

ES 2 360 465 T3

Arg Arg Arg Ile Lys Ile Ile Thr Arg Ile Ile Thr Ile Pro Leu Ser  
1 5 10 15

Ile Arg

<210> 57

<211> 18

<212> PRT

5 <213> Virus de la Hepatitis B

<400> 57

Lys Lys Lys Val Arg Val Val Thr Lys Val Val Thr Val Pro Ile Ser  
1 5 10 15

Val Asp

<210> 58

<211> 18

10 <212> PRT

<213> Virus de la Hepatitis B

<400> 58

Lys Lys Lys Phe Phe Phe Phe Thr Lys Phe Phe Thr Phe Pro Val Ser  
1 5 10 15

Phe Asp

<210> 59

15 <211> 18

<212> PRT

<213> Virus de la Hepatitis B

<400> 59

ES 2 360 465 T3

Lys Lys Lys Leu Phe Leu Leu Thr Lys Leu Leu Thr Leu Pro Phe Ser  
1 5 10 15

Leu Asp

<210> 60

<211> 18

<212> PRT

5 <213> Virus de la Hepatitis B

<400> 60

Lys Lys Lys Ile Ile Thr Ile Thr Arg Ile Ile Thr Ile Ile Thr Thr  
1 5 10 15

Ile Asp

<210> 61

<211> 17

10 <212> PRT

<213> Virus de la Hepatitis B

<400> 61

Lys Lys Lys Ile Ile Thr Ile Thr Arg Ile Ile Thr Ile Ile Thr Thr  
1 5 10 15

Ile

15 <210> 62

<211> 18

<212> PRT

<213> Virus de la Hepatitis B

<400> 62

ES 2 360 465 T3

Lys Lys Lys Met Met Thr Met Thr Arg Met Ile Thr Met Ile Thr Thr  
1 5 10 15

Ile Asp

<210> 63

<211> 16

<212> PRT

5 <213> Virus de la Hepatitis B

<400> 63

Phe Ile Thr Met Asp Thr Lys Phe Leu Leu Ala Ser Thr His Ile Leu  
1 5 10 15

<210> 64

<211> 19

10 <212> PRT

<213> Virus de la Hepatitis B

<400> 64

Lys Lys Lys Phe Ile Thr Met Asp Thr Lys Phe Leu Leu Ala Ser Thr  
1 5 10 15

His Ile Leu

15 <210> 65

<211> 42

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys  
1 5 10 15

20



ES 2 360 465 T3

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile  
20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala  
35 40

<210> 66

<211> 28

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys  
1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys  
20 25

10 <210> 67

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His  
1 5 10

15

<210> 68

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 68

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val  
1 5 10

<210> 69

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 69

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr  
1 5 10

<210> 70

<211> 45

<212> PRT

10 <213> Virus de la Hepatitis B

<400> 70

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys  
1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Gly Phe Phe  
20 25 30

Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp  
35 40 45

15 <210> 71

<211> 30

<212> PRT

<213> Virus del Sarampión

<400> 71

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Lys Ile Ser Ile Thr Glu  
1 5 10 15

20

Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Ile Glu Thr Ile Leu Phe  
20 25 30



ES 2 360 465 T3

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Lys Ile Ser Ile  
20 25 30

Thr Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Ile Glu Thr Ile Leu Phe  
35 40 45

<210> 75

<211> 34

5 <212> PRT

<213> Virus del Sarampión

<400> 75

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Lys Ile  
1 5 10 15

Ser Ile Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Ile Glu Gly Ile  
20 25 30

Leu Phe

10 <210> 76

<211> 34

<212> PRT

<213> Virus del Sarampión

<400> 76

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Lys Ile  
1 5 10 15

15

Ser Ile Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Ile Glu Thr Ile  
20 25 30

Leu Phe

<210> 77

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> ligador del péptido sintético

<220>

<221> MISC-FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> X=CUALQUIER AMINOÁCIDO

10 <220>

<221> MISC-FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> X=CUALQUIER AMINOÁCIDO

<400> 77

Pro Pro Xaa Pro Xaa Pro

1

5

**REIVINDICACIONES**

1. Un inmunógeno del péptido representado por una de las siguientes fórmulas:

$(A)_n$ -(fragmento N-terminal del péptido  $A\beta_{1-42}$ )-(B)<sub>o</sub>-(Th)<sub>m</sub>-X; o

$(A)_n$ -(Th)<sub>m</sub>-(B)<sub>o</sub>-(fragmento N-terminal del Péptido  $A\beta_{1-42}$ )-X;

5 en donde

cada A es independientemente un aminoácido;

cada B es un espaciador seleccionado del grupo que consiste de Gly-Gly, ( $\alpha$ ,  $\epsilon$ -N)-Lys, y Pro-Pro-Xaa-Pro-Xaa-Pro (SEQ ID NO: 77);

Th es el epítipo de la célula T auxiliar de SEQ ID NO: 51;

10 (fragmento N-terminal del péptido  $A\beta_{1-42}$ ) es el péptido de SEQ ID NO: 67;

X es un  $\alpha$ -COOH o  $\alpha$ -CONH<sub>2</sub> de un aminoácido;

n es de 0 a aproximadamente 10;

m es de 1 a aproximadamente 4; y

o es de 0 a aproximadamente 10.

15 2. El inmunógeno del péptido de la reivindicación 1, en donde el espaciador es Gly-Gly.

3. El inmunógeno del péptido de la reivindicación 1, en donde el espaciador es  $\epsilon$ -N-Lys.

4. El inmunógeno del péptido de la reivindicación 1, en donde el espaciador es Pro-Pro-Xaa-Pro-Xaa-Pro (SEQ ID NO: 77).

5. El inmunógeno del péptido de la reivindicación 1, que tiene la SEQ ID NO: 73.

20 6. Una composición que comprende un inmunógeno del péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un adyuvante y/o portador farmacéuticamente aceptable.

7. Uso de una composición de la reivindicación 6, para la preparación de un medicamento para prevenir o tratar la enfermedad de Alzheimer.

**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCION**

*Esta lista de referencias citada por el aspirante es solamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento de la patente Europea. Aún cuando se ha tenido gran cuidado en recopilar las referencias, los errores u omisiones no se pueden excluir y la EPO desconoce toda responsabilidad a este respecto.*

**5 Documentos de patentes citadas en la descripción**

- WO 0118169 A, Solomon [0010] [0018] [0019]
- WO 9927944 A [0013] [0018] [0019] [0020] [0021] [0024] [0025]
- EP 526511 A [0020] [0025]
- WO 0072880 A2 [0023]

**10 • US 5759551 A [0027] [0029] [0047] [0082]**

- US 6025468 A [0027]
- WO 9511998 A, Wang [0028]
- WO 9966957 A [0028] [0035]
- WO 199927944 A [0035]

**15 • US 01865294 A [0092]****Literatura no-patente citada en la descripción**

- **Masters.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, vol. 82, 4245-4249 [0003]
- **Glenner; Wong.** *Biochem Biophys Res Comm*, 1984, vol. 120, 885-890 [0004]
- *BIOCHEM BIOPHYS RES COMMM*, vol. 122, 1131-1135 [0004]

**20 • Yankner et al. Science, 1990, vol. 250, 279-282 [0005]**

- **Goate et al.** *Nature*, 1991, vol. 349, 704-706 [0005]
- **Mullan et al.** *Nature Genetics*, 1992, vol. 1, 345-347 [0005]
- **Citron et al.** *Nature*, 1992, vol. 360, 672-674 [0005]
- **Kang et al.** *Nature*, 1987, vol. 325, 733-737 [0006]

**25 • Anderton. Nature, 1987, vol. 325, 658-659 [0006]**

- **Barnes.** *Science*, 1987, vol. 235, 846-847 [0006]
- **Selkoe.** *J Biol Chem*, 1996, vol. 271, 18295-18298 [0007]
- **Thomas et al.** *Nature*, 1996, vol. 380, 168-171 [0008]
- **Behl et al.** *Cell*, 1994, vol. 77, 817-827 [0008]

**30 • Arispe et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, vol. 90, 567-571 [0008]**

- **Busciglio et al.** *Neuron*, 1995, vol. 14, 879-888 [0008]
- **Soloman et al.** *Proc Natl Acad. Sci*, 1996, vol. 93, 452-455 [0010] [0066] [0068]

- *Proc Natl Aca. Sci*, 1997, vol. 94, 4109-4112 [0010] [0066] [0068]
- **Schenk et al.** *Nature*, 1999, vol. 400, 173-177 [0011] [0024]
- **Araujo, DM; Cotman, CW.** *Brain Res*, 1992, vol. 569, 141-145 [0011]
- **AD. Janus et al.** *Nature*, 2000, vol. 408, 979-982 [0012]
- 5 • **Morgan et al.** *Nature*, 2000, vol. 408, 982-985 [0012] [0024]
- **Bard et al.** *Nature Medicine*, 2000, vol. 6, 916-919 [0013] [0022]
- **Chapman.** *Nature*, 2000, vol. 408, 915-916 [0014]
- The Neuropathology of Alzheimer Disease and the Structure Basis of its Alterations. Alzheimer Disease. Lippincott Williams and Wilkins, 1999, 187-206 [0015]
- 10 • **Klein et al.** Targeting small A $\beta$ 1-42 oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum?. *Trends in Neurosciences*, vol. 24, 219-224 [0016]
- *Proc Natl Acad. Sci*, 2000, vol. 97, 11455-11459 [0018]
- **Frenkel et al.** *Vaccine*, 2001, vol. 19, 2615-2619 [0019]
- **Johnson-Wood et al.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, vol. 94, 1550-1555 [0024]
- 15 • **Seubert et al.** *Nature*, 1992, vol. 359, 325-327 [0024]
- **Janus et al.** *Nature*, 2000, vol. 408, 979-982 [0024]
- **Cease et al.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, vol. 84, 4249-4253 [0028]
- **Partidos et al.** *JGenViro*, 1991, vol. 72, 1293 [0028]
- **Meister et al.** *Vaccine*, 1995, vol. 13, 581-591 [0028]
- 20 • **Babbitt et al.** *Nature*, 1985, vol. 317, 359 [0035]
- **Fields et al.** Synthetic Peptides: A User's Guide. W. H. Freeman & Co, 1992, 77 [0050]
- **Wang et al.** *Science*, 1991, vol. 254, 285-288 [0051]
- **O'Hagan et al.** *Vaccine*, 1991, vol. 9, 768-771 [0057]
- Immunology. Mosby International Ltd, 1998, 88-89 [0070]
- 25 • **Gaskin et al.** *J. Exp Med.*, 1987, vol. 165, 245 [0074]
- **Ferrari et al.** *J Clin Invest*, 1991, vol. 88, 214 [0082]
- **Stagg et al.** *Immunology*, 1993, vol. 71, 1 [0082]