



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 029**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/385 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00938075 .9**

96 Fecha de presentación : **01.06.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1185296**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.03.2002**

54 Título: **Prevención y tratamiento de enfermedades amiloidogénicas.**

30 Prioridad: **01.06.1999 US 137010 P**

73 Titular/es: **NEOTOPE BIOSCIENCES LIMITED**
Monksland Athlone
Westmeath, IE

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.06.2011

72 Inventor/es: **Schenk, Dale, B.**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.06.2011

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 362 029 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

Prevención y tratamiento de enfermedades amiloidogénicas

Campo de la invención

La invención se refiere a composiciones y procedimientos de tratamiento de afecciones relacionadas con amiloides en seres humanos y otros vertebrados mamíferos.

Antecedentes de la invención

Amiloidosis es un término general que describe un número de enfermedades caracterizadas por la deposición extracelular de fibrillas de proteína, que forman numerosos "depósitos amiloides," que se pueden producir en sitios localizados o sistémicos. La composición fibrillar de éstos es una característica de identificación para las diferentes formas for de enfermedad amiloide. Por ejemplo, depósitos intracerebrales y cerebrovasculares compuestos principales de fibrillas de péptido beta amiloide (β -AP) son características de enfermedad de Alzheimer (tanto formas familiares como esporádicas), péptido de proteína amiloide de islotes (IAPP; amilina) es característica de las fibrillas en los depósitos de células de islotes pancreáticos asociados a la diabetes de tipo II, y β 2-microglobulina es un componente principal de depósitos de amiloides que se forman como consecuencia de un tratamiento de hemodiálisis a largo plazo. Más recientemente, las enfermedades asociadas a priones, tal como la enfermedad de Creutzfeld-Jacob, también se han reconocido como enfermedades amiloides.

Las diversas formas de enfermedad de se han dividido en clases, principalmente en la base a si la amiloidosis está asociada o no a una enfermedad sistema subyacente. De este modo, ciertos trastornos se consideran que son amiloidosis primaria, en las que no existe evidencia de enfermedad preexistente o coexistente. En general, la amiloidosis primaria de la enfermedad se caracterizan por la presencia de (tipo AL) fibrillas de proteína de "tipo de cadena ligera de amiloide", así llamado por la homología de la región N-terminal de las fibrillas AL con el fragmento variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (kappa o lambda).

La amiloidosis secundaria o "reactiva" se caracteriza por deposición de fibrillas de tipo AA derivadas de proteína A amiloide de suero (ApoSSA). Estas formas de amiloidosis se caracterizan por un estado patológico inflamatorio o infeccioso crónico subyacente (*por ejemplo*, artritis reumatoide, osteomielitis, tuberculosis, lepra). caracterizadas por un estado patológico inflamatorio o infeccioso crónico subyacente (*por ejemplo*, artritis reumatoide, osteomielitis , tuberculosis, lepra).

La amiloidosis de herencia familiar puede estar asociada a depósitos neuropáticos, renales, o cardiovasculares del tipo transtiretina ATTR. Otras amiloidosis de herencia familiar incluyen otros síndromes y pueden tener componentes amiloides (*por ejemplo*, fiebre Mediterránea familiar que se caracteriza por fibrillas AA). Otras formas de amiloidosis incluyen formas locales, caracterizadas por depósitos focales, a menudo de tipo tumoral que se producen en órganos aislados. Otras de amiloidosis están asociadas a la edad, y se caracterizan comúnmente por formación de placa en el corazón o cerebro. También son comunes depósitos amiloides asociados a hemodiálisis a largo plazo. Éstas y otras formas de enfermedad amiloide se resumen en la Tabla 1. (Tan, S. Y. y Pepys, Histopatología 25: 403 - 414, 1994; Harrison's Handbook of Internal Medicine, 13ª Ed., Isselbacher, K.J., et al, eds, McGraw-Hill, San Francisco, 1995).

Tabla 1

Clasificación de Enfermedades Amiloides

Proteína/Péptido Amiloide	Precursor de Proteína	Variantes de Proteína	Clínica
AA	Proteína A amiloide de suero (ApoSSA)		Amiloidosis reactiva (secundaria) fiebre Mediterránea familiar Neuropatía amiloide familiar con urticaria y sordera (síndrome de Muckle-Wells)
AA	Proteína A amiloide de suero (ApoSSA)		Amiloidosis sistémica reactiva asociada a enfermedades inflamatorias sistémicas

(CONT)			
AL	Cadenas ligeras de inmunoglobulina monoclonales (kappa, lambda)	Ak, A (por ejemplo, AkIII)	Amiloidosis idiopática (primaria): mieloma o asociada a macroglobulinemia; amiloidosis sistémica asociada a discrasia de inmunocitos; gammopatía monoclonal; discrasia oculta; amiloidosis nodular local asociada a enfermedades inflamatorias crónicas
AH	IgG (1 (γ1))	A γ 1	Amiloidosis de cadena pesada asociada a varias discrasias de inmunocitos
ATTR	Transtirretina (TTR)	Al menos 30 mutaciones puntuales conocidas	Polineuropatía amiloide familiar (por ejemplo, Met 30, Portuguesa)
ATTR	Transtirretina (TTR)	por ejemplo, Met 111	Cardiopatía amiloide familiar (Danesa)
ATTR	Transtirretina (TTR)	TTR o Ile 122 de tipo salvaje	Amiloidosis senil sistémica
ApoAI	ApoAI	Arg 26	Polineuropatía amiloide familiar
Agel	Gelsolina	Asn 187	Amiloidosis familiar (Finlandesa)
Acys	Cistatina C	Gln 68	Hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (Islandesa)
Aβ	Precursor de proteína β amiloide (por ejemplo, β-APP ₆₉₅)	Diversos: Gln 618	Enfermedad de Alzheimer síndrome de Down amiloidosis hemorrágica cerebral hereditaria (Alemana) angiopatía de amiloide cerebral esporádica miositis de cuerpos de inclusión
AB ₂ M	Microglobulina beta ₂		Asociada a hemodiálisis crónica
Acal	(Pro)calcitonina	(Pro)calcitonina	Carcinoma medular de tiroides
AANF	Factor natriureético atrial		Amiloidosis senil focal: amiloide atrial aislada
A β SVPA ^a AB ₂ M	Microglobulina beta ₂ de proteína Precursora β amiloide		Vesículas seminales de cerebro Próstata
	Queratina		Amiloide cutánea localizada primaria (macular, popular)

(CONT)			
PrP	Proteína precursora de priones (forma celular de 33 - 35 kDa)	Proteína Scrapie 27 - 30 kDa)	Enfermedad Creutzfeldt-Jacob Kuru (encefalopatías espongiformes transmisibles, enfermedades de priones)
AIAPP	Polipéptido de amiloides de islotes (APP)		Islotes de Langerhans Diabetes de tipo II, Insulinoma
Hormonas peptídicas, fragmentos	Por ejemplo, precalcitonina		Amiloidosis exocrina asociada a APUDomas
^a Proteínas exocrinas de vesículas seminales			

A menudo, las fibrillas que forman el volumen de un depósito de amiloide se derivan de una o más proteínas o péptidos precursores primarios, y están usualmente asociados a glicosaminoglicanos sulfatados. Además, los depósitos de amiloides pueden incluir proteínas y péptidos secundarios de diversos tipos, junto con otros componentes, tales como proteoglicanos, gangliósidos y otros azúcares, como se describe en más detalle en las secciones que siguen.

Actualmente, no existen tratamientos específicos, dirigidos a amiloides para ninguna de las enfermedades de amiloide. Cuando existe un estado patológico subyacente o asociado, la terapia se dirige a la disminución de la producción de proteína amiloidogénica mediante tratamiento de la enfermedad subyacente. Esto se ejemplifica mediante el tratamiento de tuberculosis con antibióticos, reduciendo por lo tanto la carga micobacteriana, que da como resultado la reducción de inflamación y en la reducción asociada de proteína SSA. En el caso de amiloide AL debido a mieloma múltiple, se administra quimioterapia a pacientes, provocando una reducción en células de plasma y una reducción de niveles de inmunoglobulina de mieloma. A medidas que estos niveles disminuyen, el amiloide AL se puede eliminar. Las solicitudes de patente de Estados Unidos de propiedad común USSN 09/201,430, presentada el 30 de noviembre de 1998 y USSN 09/322,289, presentada el 28 de mayo de 1999 revelan que la carga de placa amiloide asociada a la enfermedad de Alzheimer se puede reducir en gran medida (y prevenir) mediante la administración de agentes que producen o confieren una respuesta inmune dirigida al péptido β -amiloide ($A\beta$) y sus fragmentos. Es el descubrimiento de la presente invención que la inducción de una respuesta inmune a diversos componentes de placa amiloide es eficaz en el tratamiento de una amplia gama de enfermedades amiloides.

Sumario de la invención

La presente invención se dirige a composiciones farmacéuticas y procedimientos para tratar numerosas enfermedades amiloides. De acuerdo con un aspecto, la invención incluye una composición farmacéutica de acuerdo con reivindicación 1. Tales composiciones también incluirán excipientes e incluyen adyuvantes. En realizaciones adicionales preferidas, los adyuvantes incluyen, por ejemplo, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, MPL™, QS-21 (Stírnulon™) o adyuvante de Freund incompleto. De acuerdo con una realización relacionada, tales composiciones farmacéuticas pueden incluir una pluralidad de agentes eficaces para inducir una respuesta inmune contra más de un componente amiloide en el paciente.

El agente es eficaz para producir una respuesta inmune dirigida contra un componente amiloide de péptido o proteína de fibrilla. Preferiblemente, tal péptido o proteína de fibrilla se deriva de una proteína precursora de fibrilla conocida que está asociada a ciertas formas de enfermedades amiloides, como se describe en el presente documento. Tales proteínas precursoras incluyen, pero no se limitan a, proteína A amiloide de suero (ApoSSA), cadena ligera de inmunoglobulina, cadena pesada de inmunoglobulina, ApoAI, Transtirretina, Lisozima, cadena α de fibrinógeno, gelsolina, cistatina C, Precursor de proteína β amiloide (β -APP), Beta₂ microglobulina, proteína precursora de priones (PrP), factor natriurético atrial, queratina, polipéptido amiloide de islotes, una hormona de péptido, y sinucleína. En una realización preferida, el agente es eficaz para inducir una respuesta inmune dirigida contra un neoepítipo formado por una proteína o péptido de fibrilla, con respecto a una proteína precursora de fibrilla. Esto es, como se describe en más detalle en el presente documento, muchos péptidos o proteínas formadores de fibrilla son fragmentos de tales proteínas precursoras, tales como las enumeradas anteriormente. Cuando se forman tales fragmentos, tal como mediante escisión proteolítica, epítopos se puede revelar que no están presentes en el precursor y por lo tanto no están inmunológicamente disponibles para el sistema inmune cuando el fragmento es una parte de la proteína precursora. Los agentes dirigidos a tales epítopos se pueden preferir agentes terapéuticos, ya que ellos es menos probable que induzcan una respuesta autoinmune en el paciente.

Las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agentes dirigidos a componentes amiloides seleccionados entre el grupo que incluyen, los siguientes tipos de péptidos o proteínas de fibrillas: cadena lambda AL, ATTR, AApoAI, Alys, Agel, AB2M, Acal, AIAPP y fragmento sinucleína-NAC. Los nombres completos y composiciones de estos péptidos se describen en el presente documento. Tales péptidos se pueden hacer de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica, como se describe en el presente documento.

De acuerdo con una realización relacionada adicional, los agentes incluidos en tales composiciones farmacéuticas también incluyen ciertos proteoglicanos sulfatados. En una realización relacionada, el proteoglicano es un glicosaminoglicano de sulfato de heparina, preferiblemente perlecan, sulfato de dermatan, 4-sulfato de condroitina, o polisulfato de pentosán.

Esta solicitud también describe un procedimiento de prevención o tratamiento de un trastorno caracterizado por deposición amiloide en un sujeto mamífero. Al sujeto se le proporciona una dosificación de un agente eficaz para producir una respuesta inmune contra un componente amiloide característico de un trastorno amiloide que padece el sujeto. Esencialmente, los procedimientos incluyen la administración de composiciones farmacéuticas que contienen componentes amiloides inmunogénicos específicos al trastorno, tales como los descritos anteriormente. Tales procedimientos además se caracterizan por su eficacia en la inducción de respuestas inmunogénicas en el sujeto. El procedimiento es eficaz para producir una respuesta inmunológica que se caracteriza por una valoración en suero de al menos 1:1000 con respecto al componente amiloide contra el que se dirige el agente inmunogénico, preferiblemente al menos 1:5000 con respecto al componente de fibrilla. De acuerdo con una realización relacionada, la respuesta inmune se caracteriza por una cantidad en suero de inmunorreactividad correspondiente a más de aproximadamente cuatro veces mayor que un nivel en suero de inmunorreactividad medida en una muestra en suero de control de pre-tratamiento. Esta última caracterización es particularmente cuando la inmunorreactividad en suero se mide por técnicas de ELISA, pero se puede aplicar a cualquier medición relativa o absoluta de inmunorreactividad en suero. De acuerdo con una realización preferida, la inmunorreactividad se mide a una dilución en suero de aproximadamente 1:100.

De acuerdo con incluso un aspecto relacionado adicional, la invención incluye un procedimiento de determinar la prognosis de un paciente sometido a un tratamiento para un trastorno amiloide. Aquí, se mide la cantidad en suero de paciente de inmunorreactividad contra un componente amiloide característico del trastorno seleccionado, y una cantidad en suero de paciente de inmunorreactividad de al menos cuatro veces un nivel de control inicial de inmunorreactividad en suero indicativo de una prognosis de estatus mejorado con respecto al trastorno amiloide particular. De acuerdo con realizaciones preferidas, la cantidad de inmunorreactividad contra el componente amiloide seleccionado presente en el suero del paciente se caracteriza por una valoración en suero de al menos aproximadamente 1:1000, o al menos 1:5000, con respecto al componente amiloide.

De acuerdo con un aspecto más relacionado, la invención también describe los procedimientos denominados de "inmunización pasiva" y composiciones farmacéuticas para prevenir o tratar enfermedades amiloides. De acuerdo con este aspecto, a los pacientes se les proporciona una dosificación eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a un componente amiloide seleccionado, preferiblemente un componente de fibrilla presente en los depósitos de amiloides característicos de la enfermedad a tratar. En general, tales anticuerpos se seleccionan por sus capacidades para unirse específicamente a las proteínas, péptidos, y componentes descritos con respecto a las composiciones farmacéuticas y procedimientos descritos en los párrafos precedentes de esta sección. De acuerdo con una realización relacionada, tales procedimientos y composiciones pueden incluir combinaciones de anticuerpos que se unen al menos a dos componentes amiloides de fibrillas. En general, composiciones farmacéuticas se administran para proporcionar una cantidad en suero de inmunorreactividad contra el componente amiloide diana que es al menos aproximadamente cuatro veces mayor que un nivel en suero de inmunorreactividad contra el componente medio en una muestra de suero control. Los anticuerpos también se pueden administrar con un vehículo, como se describe en el presente documento. En general, de acuerdo con este aspecto de la invención, tales anticuerpos, se administrarán (o formularán para administración) por vía peritoneal, oral, intranasal, subcutánea, intramuscular, tópica o intravenosa, pero se puede administrar o formular para administración mediante cualquier vía farmacéuticamente eficaz (es decir, eficaz para producir los niveles terapéuticos indicados, como se establece anteriormente y en el presente documento).

De acuerdo con realizaciones preferidas, los regímenes de inmunización descritos anteriormente pueden incluir administración de agentes, incluyendo anticuerpos, en dosificaciones múltiples, tal como un período de 6 meses, tal como inmunización inicial seguida de inyecciones de recuerdo a intervalos de tiempo, tales como intervalos de 6 semanas, de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica, o de acuerdo con la necesidad del paciente, como se determina mediante respuesta inmunológica. De manera alternativa, o además, tales regímenes pueden incluir el uso de formulaciones de "liberación sostenida", tales como se conocen en la técnica.

Éstos y otros objetos y características de la invención serán más completamente evidentes cuando la siguiente descripción detallada de la invención se lee junto con los dibujos anexos.

Breve Descripción de las Figuras

FIG. 1: Título de anticuerpo en ratones transgénicos después de inyección con A β 1-42.

FIG. 2: Carga amiloide en el hipocampo. El porcentaje del área de la región de hipocampo ocupado por placas amiloides, definida por la reactividad con anticuerpo monoclonal 3D6 específico de A β , se determinó mediante análisis de imagen cuantitativo por ordenador de secciones de cerebro inmunorreactivas. Los valores para los ratones individuales se muestran clasificados por grupo de tratamiento. La línea horizontal para cada agrupación indica la mediana de la distribución.

FIG. 3: distrofia neurítica en el hipocampo. El porcentaje del área de la región de hipocampo ocupada por las neuríticas distróficas, definida por su reactividad con el monoclonal 8E5 específico de APP, se determinó mediante análisis de imagen cuantitativo por ordenador de secciones de cerebro inmunorreactivas. Los valores para los ratones individuales se muestran para el grupo tratado por AN1792 y el grupo control tratado con PBS. La línea horizontal para cada agrupación indica la mediana de la distribución.

FIG. 4: Astrocitosis en la corteza retroesplénica. El porcentaje del área de la región cortical ocupada por los astrositos positivos de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) se determinó mediante análisis de imagen cuantitativo por ordenador de secciones de cerebro inmunorreactivas. Los valores para los ratones individuales se muestran clasificados por grupo de tratamiento y las medianas del grupo se indican por líneas horizontales.

FIG. 5: Media geométrica de titulación de anticuerpo con inmunización posterior de A β 42 con un intervalo de ocho dosis de A β 42 ("AN1792") que contiene 0,14, 0,4, 1,2, 3,7, 11, 33, 100, o 300 μ g.

FIG. 6: Cinética de respuesta de anticuerpo a inmunización con AN1792. Las titulaciones se expresan como medias geométricas de los valores para los 6 animales en cada grupo.

FIG. 7: Análisis de imagen cuantitativo de la carga amiloide cortical en ratones tratados con PBS- y AN1792.

FIG. 8: Análisis de imagen cuantitativo de la carga de placa neurítica en ratones tratados con PBS y AN1792.

FIG. 9: Análisis de imagen cuantitativo del porcentaje de la corteza retroesplénica ocupado por astrocitosis en ratones tratados con PBS y AN1792.

FIG. 10: Ensayo de proliferación de linfocitos sobre células del bazo de ratones tratados con AN1792 (panel superior) o tratados con PBS (panel inferior).

FIG. 11: Niveles de A β totales en la corteza cerebral. Un gráfico de dispersión de perfiles individuales de A β en los ratones inmunizados con A β o derivados de APP combinados con adyuvante de Freund.

FIG. 12: Carga amiloide en la corteza, determinado mediante análisis de imagen cuantitativo de secciones de cerebro inmunoreactivos para los ratones inmunizados con los conjugados de péptido A β A β 1-5, A β -12, y A β 13-28; los agregados de longitud completa de A β A β 42 ("AN1792") y A β 1-40 ("AN1528") y el grupo control tratado con PBS.

FIG. 13: Media geométrica de las titulaciones de anticuerpo específico de A β para los grupos de ratones inmunizados con A β o derivados de APP combinados con adyuvante de Freund.

FIG. 14: Media geométrica de las titulaciones de anticuerpo específico de A β para los grupos de cobayas inmunizados con AN1792, o su derivado palmitoilado, combinado con diversos adyuvantes.

FIG. 15 (A-E): niveles de A β en la corteza de ratones PDAPP de 12 meses de edad tratados con AN1792 o AN1528 con diferentes adyuvantes.

FIG. 16: Titulación media de ratones tratados con anticuerpo policlonal para A β .

FIG. 17: Titulación media de ratones tratados con anticuerpo monoclonal 10D5 para A β .

FIG. 18: Titulación media de ratones tratados con anticuerpo monoclonal 2F12 para A β .

Descripción detallada de la invención**A. Definiciones**

Salvo que se indique de otra manera, todos los términos usados en el presente documento tienen el mismo significado que los descritos por los expertos en la técnica de la presente invención. Los profesionales se dirigen particularmente a Sambrook, et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Segunda Edición), Cold Spring Harbor Press, Plainview, N. Y. y Ausubel, F.M., et al. (1998) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, NY,

para definiciones, términos de la técnica y procedimientos convencionales proporcionados en la técnica de bioquímica y biología molecular. Se entiende que esta invención no se limita a la metodología particular, protocolos, y reactivos descritos, ya que éstos se pueden variar para producir el mismo resultado.

5 El término "adyuvante" se refiere a un compuesto que, cuando se administra conjuntamente con un antígeno, aumenta la respuesta inmune al antígeno, pero cuando se administra solo no genera una respuesta inmune al antígeno. Los adyuvantes pueden aumentar la respuesta inmune mediante varios mecanismos incluyendo reclutamiento de linfocitos, estimulación de células B y / o T, y estimulación de macrófagos.

"Enfermedad amiloide" o "amiloidosis" se refiere a cualesquiera de un número de trastornos que tienen un síntoma o como parte de su patología la acumulación o formación de placas amiloides.

10 Una "placa amiloide" es un depósito extracelular compuesto principalmente de fibrillas proteináceas. En general, las fibrillas están compuestas de proteína o péptido dominante; sin embargo, la placa también puede incluir componentes adicionales que son moléculas de péptido o no péptido, como se describe en el presente documento.

15 Un "componente amiloide" es cualquier entidad molecular que está presente en una placa amiloide que incluye partes antigénicas de tales moléculas. Componentes amiloides incluyen pero no se limitan a proteínas, péptidos, proteoglicanos, y carbohidratos. Un "componente amiloide específico" se refiere a una entidad molecular que se encuentra principalmente o exclusivamente en la placa amiloide de interés.

Un "agente" es una molécula química de origen sintético o biológico. En el contexto de la presente invención, un agente es generalmente una molécula que se puede usar en una composición farmacéutica.

20 Un "agente anti-amiloide" es un agente que es capaz de producir una respuesta inmune contra un componente de placa amiloide en un sujeto vertebrado, cuando se administra mediante técnicas de inmunización activas o pasivas.

25 Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico," como se usa indistintamente en el presente documento se refiere a una molécula polimérica que tiene una estructura central que soporta las bases capaces de unirse por hidrógeno a polinucleótidos típicos, cuando la estructura central del polímero presenta las bases de una manera que permita tal enlace de hidrógeno de una manera específica de la secuencia entre la molécula polimérica y un polinucleótido típico (*por ejemplo*, ADN de una sola cadena). Tales bases son típicamente inosina, adenosina, guanosina, citosina, uracilo y timidina. Las moléculas poliméricas incluyen ADN y ARN de cadena doble y sencilla, y sus modificaciones de estructura central, por ejemplo, enlaces metilfosfonato.

30 El término "polipéptido" como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto hecho de una sola cadena de restos de aminoácido unidos por enlaces de péptido. El término "proteína" puede ser sinónimo del término "polipéptido" o se puede referir a un complejo de dos o más polipéptidos.

El término "péptido" también se refiere a un compuesto que consta de restos de aminoácido unidos por enlaces de péptido. En general los péptidos están compuestos de 100 o menos aminoácidos, mientras que los polipéptidos o proteínas tienen más de 100 aminoácidos. Como se usa en el presente documento, el término "fragmento de proteína" también puede significar un péptido.

35 Un "péptido de fibrilla" o "proteína de fibrilla" se refiere a una forma monomérica o agregada de una proteína o péptido que forma fibrillas presentes en placas amiloides. Los ejemplos de tales péptidos y proteínas se proporcionan en el presente documento.

40 Una "composición farmacéutica" se refiere a una composición química o biológica adecuada para la administración a un individuo mamífero. Tales composiciones se pueden formular específicamente para administración mediante una o más numerosas vías, que incluyen, pero no se limitan a, oral, parenteral, intravenosa, intraarterial, subcutánea, intranasal, sublingual, intraespinal, intracerebroventricular, y similares.

45 Un "excipiente farmacéutico" o un "excipiente farmacéuticamente aceptable" es un vehículo, usualmente un líquido, en el que se formula un agente terapéutico activo. El excipiente en general no proporciona ninguna actividad farmacológica a la formulación, aunque puede proporcionar estabilidad química y / o biológica, características de liberación, y similares. Las formulaciones ejemplares se pueden encontrar, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 19ª Ed., Grennaro, A., Ed., 1995.

Una "glicoproteína" es una proteína a la que al menos una cadena de carbohidrato (oligopolisacárido) está unida covalentemente.

50 Un "proteoglicano" es una glicoproteína en el que al menos una de las cadenas de carbohidrato es un glicosaminoglicano, que es un polímero lineal largo de disacáridos de repetición en el que un miembro del par usualmente es un ácido de azúcar (ácido urónico) y el otro es un azúcar amino.

El término respuesta "inmunológica" o "inmune" o "inmunogénica" se refiere al desarrollo de una respuesta humoral (mediada por anticuerpo) y / o a celular (mediada por células T específicas de antígeno-de sus productos de secreción) dirigidas contra un antígeno en un individuo vertebrado. Tal respuesta puede ser una respuesta activa inducida por la administración de inmunógeno o una respuesta pasiva inducida por la administración de anticuerpo o células T cebadas.

5 Una respuesta inmune celular se induce por la presentación de epítopes de polipéptido en asociación con las moléculas MHC de la Clase I o Clase II para activar las células auxiliares T CD4⁺ específicas de antígeno y / o células T citotóxicas CD8⁺. La respuesta también puede implicar la activación de monocitos, macrófagos, células NK, basófilos, células dendríticas, astrocitos, células de microglia, eosinófilos u otros componentes de inmunidad innata. La presencia de una respuesta inmunológica mediada por células se puede determinar mediante ensayos de proliferación
10 convencionales (células T CD4⁺) o ensayos CTL (linfocitos T citotóxicos) conocidos en la técnica. Las contribuciones relativas de respuestas humorales y celulares al efecto protector y terapéutico de un inmunógeno se puede distinguir mediante aislamiento de manera separada de inmunoglobulina (IgG) y fracciones de células T de un animal singénico inmunizado y midiendo el efecto protector y terapéutico en un segundo sujeto.

15 Un "agente inmunogénico" o "inmunógeno" o "antígeno" es una molécula que es capaz de inducir una respuesta inmunológica contra él mismo después de la administración a un paciente, o bien junto con, o en ausencia de, en adyuvante. Tales moléculas incluyen, por ejemplo, péptidos de fibrilla amiloide o sus fragmentos conjugados a una proteína vehículo, tal como hemocianina de lapa californiana, Cd3 o toxina de tétanos.

Un "epítopo" o "determinante antigénico" es la parte de un antígeno que se une a la región de unión de antígeno de un anticuerpo.

20 El término "Aβ," "péptido Aβ" y péptido "Amiloide β" son sinónimos, y se refieren a uno o más composiciones de péptido de aproximadamente 38 - 43 aminoácidos derivados de Proteína Precursora Amiloide Beta β-APP), como se describe en el presente documento. "Aβxx" se refiere a un péptido amiloide β 1-xx, donde xx es un número que indica el número de aminoácidos en el péptido; por ejemplo, Aβ42 es el mismo que Aβ1-42, que también se denomina en el presente documento "AN1792," y Aβ40 es el mismo que Aβ1-40, que también se denomina en el presente documento "AN1578."

25 Aβ disgregado o monomérico significa unidades de péptido soluble, monomérico de Aβ. Un procedimiento para preparar Aβ monomérico es disolver péptido liofilizado en DMSO puro con sonicación. La solución resultante se centrifuga para retirar cualesquiera partículas insolubles. Aβ agregado es una mezcla de oligómeros en las que las unidades monoméricas se mantienen juntas por enlaces no covalentes.

30 El término "polinucleótido desnudo" se refiere a un polinucleótido que no forma complejo con materiales coloidales. Los polinucleótidos desnudos están algunas veces clonados en un vector plásmido.

El término "paciente" incluye sujetos humanos y otros mamíferos que reciben o bien tratamiento profiláctico o terapéutico.

35 Las expresiones "significativamente diferentes de", "estadísticamente significativos", "significativamente mayor (o menor) que," y frases similares se refieren a comparaciones entre datos o mediciones, en los que las diferencias entre dos individuos o grupos comparados son evidentemente o razonablemente diferentes de las del observador entrenado, o estadísticamente significativos (si la frase incluye el término "estadísticamente" o si existe alguna indicación de ensayo estadístico, tal como un valor p, o si los datos cuando se analizan, producen una diferencia estadística mediante ensayos estadísticos convencionales conocidos en la técnica).

40 Las composiciones o procedimientos "que comprenden" uno o más elementos descritos pueden incluir otros elementos no descritos específicamente. Por ejemplo, una composición que comprende un péptido componente de fibrilla abarca tanto el péptido aislado como el péptido como un componente de secuencia de polipéptido mayor. A modo de un ejemplo adicional, una composición que comprende elementos A y B también abarca una composición que consiste en A, B y C.

B. Enfermedades amiloides

1. Visión general y Patogénesis

45 Las Enfermedades amiloides o amiloidosis incluyen numerosos estados patológicos que tienen una amplia diversidad de síntomas externos. Estos trastornos tienen en común la presencia de depósitos extracelulares anormales de fibrillas de proteína, conocidas como "depósitos amiloides" o "placas amiloides" que tienen usualmente aproximadamente 10 - 100 μm de diámetro y están localizadas en órganos o regiones de tejido específicos. Tales placas se componen
50 específicamente de principalmente una proteína o péptido soluble de origen natural. Estos depósitos insolubles se componen de agregados laterales generalmente de fibrillas que son aproximadamente de 10 - 15 nm de diámetro. Las fibrillas amiloides producen una birrefringencia característica de color verde manzana en luz polarizada, cuando se tiñen con colorante Rojo Congo. Los trastornos se clasifican en base al componente de fibrillas principal que forma los

depósitos de placa, como se describe más adelante.

Los péptidos o proteínas que forman los depósitos de placa a menudo se producen a partir de una proteína precursora mayor. Más específicamente, la patogénesis de depósitos de fibrilla de amiloide en general implica la escisión proteolítica de proteína precursora "anormal" en fragmentos. Estos fragmentos en general se agregan en hojas plegadas anti- paralelas β ; sin embargo, ciertas formas no degradadas de proteína precursora se han reseñado y agregar para formar fibrillas en polineuropatía amiloide familiar (fibrillas de Transtirretina variantes) y amiloidosis relacionada con diálisis (fibrillas de microglobulina β_2) (Tan, *et al.*, 1994, *supra*).

2. Síndromes clínicos

Esta sección proporciona descripciones de tipos principales de amiloidosis, incluyendo sus composiciones de fibrilla de placas características. Es un descubrimiento general de la presente invención que las enfermedades amiloides se pueden tratar mediante la administración de agentes que sirvan para estimular una respuesta inmune contra un componente o componentes de diversos depósitos de amiloides específicos de enfermedad. Como se describe en más detalle en la Sección C más adelante, tales componentes son preferiblemente constituyentes de las fibrillas que forman las placas. Las secciones abajo sirven para ejemplificar las formas principales de amiloidosis a. Amiloidosis AA (reactivo)

En general, la amiloidosis AA es una manifestación de un número de enfermedades que provocan una respuesta de fase aguda sostenida. Tales enfermedades incluyen enfermedades inflamatorias crónicas, infecciones microbianas locales o sistémicas, y neoplasmas malignos.

Las fibrillas AA en general están compuestas de fragmentos de 8000 dalton (péptido o proteína de AA) formados por escisión proteolítica de la proteína A amiloide de suero (apoSSA), una apolipoproteína circulante que está presente en las partículas HDL y que se sintetiza en los hepatocitos en respuesta a citoquinas tales como IL-1, IL-6 y TNF. La deposición puede estar extendido en el cuerpo, con una preferencia para órganos parenquimales. El bazo es usualmente un sitio de deposición, y los riñones también pueden estar afectados. La deposición es también común en el corazón y tracto gastrointestinal.

Las enfermedades amiloides AA incluyen, pero no se limitan a enfermedades inflamatorias, tales como artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, espondilitis anquilosante, psoriasis, artropatía psoriática, síndrome de Reiter, enfermedad de Still de adultos, síndrome de Behcet, y enfermedad de Crohn. Los depósitos AA también se producen como resultado de infecciones microbianas crónicas, tales como lepra, tuberculosis, bronquioectasis, úlceras de decúbito, pielonefritis crónica, osteomielitis, y enfermedad de Whipple. Ciertos neoplasmas malignos también pueden dar como resultado depósitos de amiloide de fibrillas AA. Ésos incluyen afecciones tales como linfoma de Hodgkin, carcinoma renal, carcinomas del intestino, pulmón y tracto urogenital, carcinoma de células basales, y leucemia de células peludas.

b. Amiloidosis AL

Deposición de amiloide AL está en general asociada a casi cualquier discrasia del linaje de linfocitos B, que varían entre malignidad de células de plasma (mieloma múltiple) para gammopatía monoclonal benigna. A veces, la presencia de depósitos de amiloides puede ser un indicador primario de la discrasia subyacente.

Fibrillas de los depósitos de amiloides AL se componen de cadenas ligeras de inmunoglobulina monoclonal o sus fragmentos. Más específicamente, los fragmentos se derivan de la región N-terminal de la cadena ligera (κ o λ) y contienen todo o parte de su dominio variable (VL). Los depósitos en general se producen en los tejidos mesenquimáticos, que provocan neuropatía autonómica o periférica, síndrome del túnel carpiano, macroglosia, cardiomiopatía restrictiva, artropatía de grandes articulaciones, discrasias inmunes, mielomas, así como discrasias ocultas. Sin embargo, se debe indicar que casi cualquier tejido, particularmente órganos viscerales tales como corazón, pueden estar implicados.

c. Amiloidosis sistémica hereditaria

Existen muchas formas de amiloidosis sistémica hereditaria. Aunque son afecciones relativamente raras, la aparición en adultos de los de los síntomas y sus patrones de herencia (usualmente dominante autosómico) conducen a una persistencia de tales trastornos en la población general. En general, los síndromes son atribuibles a mutaciones puntuales en la proteína precursora que conduce a la producción de péptidos o proteínas amiloidogénicas variantes. La Tabla 2 resume la composición de fibrilla de formas ejemplares de estos trastornos.

Tabla 2

Amiloidosis Hereditaria ^a		
Péptido/Proteína de fibrilla	Variante genética	Síndrome clínico
Transtirretina y fragmentos (ATTR)	Met30, muchos otros	Polineuropatía amiloide familiar (FAP) (principalmente nervios periféricos)
Transtirretina y fragmentos (ATTR)	Thr45, Ala60, Ser84, Met111, Ile122	Predominante implicación cardíaca sin neuropatía
Fragmento N-terminal de Apolipoproteína A1 (apoA1)	Arg26	Polineuropatía amiloide familiar (FAP) (principalmente nervios periféricos)
Fragmento N-terminal de Apolipoproteína A1 (ApoA1)	Arg26, Arg50, Arg 60, otros	Tipo Ostertag, no neuropático (predominantemente implicación visceral)
Lisozima (Alys)	Thr56, His67	Tipo Ostertag, no neuropático (predominantemente implicación visceral)
Fragmento de cadena α de fibrinógeno	Leu554, Val 526	Tipo Ostertag, no neuropático (predominantemente implicación visceral)
Fragmento de Gelsolina (Agel)	Asn187, Tyr187	Neuropatía craneal con distrofia corneal reticular
Fragmento de cistatina C	Glu68	Hemorragia cerebral hereditaria (angiopatía amiloide cerebral) - tipo islandesa
Proteína de amiloide β (A β) derivada de proteína precursora amiloide (AAP)	Gln693	Hemorragia cerebral hereditaria (angiopatía amiloide cerebral) - tipo alemana
Proteína de amiloide β (A β) derivada de proteína precursora amiloide (AAP)	Ile717, Phe717, Gli717	Enfermedad de Alzheimer familiar
Proteína de amiloide β (A β) derivada de proteína precursora amiloide (AAP)	Asn670, Leu671	Demencia familiar – probable enfermedad de Alzheimer
Proteína de prión (PrP) derivada de proteína precursora PrP inserto 51-91	Leu102, Va1167, Asn178, Lys200	Enfermedad de Greutzfeldt- Jakob; síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker (encefalopatías espongiformes hereditarias), enfermedades de priones)
AA derivada de proteína de amiloide A de suero (ApoSSA)		Fiebre mediterránea familiar, implicación renal predominante (recesiva autonómica)
AA derivada de proteína de amiloide A de suero (ApoSSA)		Síndrome de Muckle-Well, nefropatía, sordera, urticaria, dolor de miembro
Desconocido		Cardiomiopatía con inactividad atrial

		persistente
(CONT)		
Desconocido		Depósitos cutáneos (buloso, papular, pustulodérmico)
^a Datos derivados de Tan & Pepys, 1994, <i>supra</i> .		

Los datos proporcionados en la Tabla 2 son ejemplares y no se pretende que limiten el alcance de la invención. Por ejemplo, se han descrito más de 40 mutaciones puntuales separadas en el gen de Transtirretina, todas las cuales dan lugar a formas clínicamente similares de polineuropatía amiloide familiar.

5 Transtirretina (TIR) es una proteína de 14 kilodaltons que también algunas veces se denomina prealbúmina. Se produce por el hígado y plexos coroides, y funciona en el transporte de hormonas de tiroides y vitamina A. Al menos 50 formas variantes de la proteína, cada una caracterizada por un único cambio de aminoácido, son responsables de diversas formas de polineuropatía amiloide familiar. Por ejemplo, sustitución de prolina por leucina en la posición 55 da como resultado una forma particularmente progresiva de neuropatía; substitución de metionina por leucina en la posición 111 da como resultado una cardiopatía grave en pacientes daneses. Depósitos de amiloides aislados de tejidos cardíacos de pacientes con amiloidosis sistémica ha revelado que los depósitos están compuestos de una mezcla heterogénea de TIR y sus fragmentos, colectivamente denominada ATTR, las secuencias de longitud completa de la cual se han caracterizado. El componente de fibrillas de ATTR se puede extraer de tales placas y su estructura y secuencia determinadas de acuerdo con los procedimientos conocidos en la técnica (por ejemplo, Gustavsson, A., et al., Laboratory Invest. 73: 703 - 708, 1995; Kametani, F., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 125: 622 - 628, 1984; Pras, M., et al., PNAS 80: 539 - 42, 1983).

Las personas que tienen mutaciones puntuales en la molécula apolipoproteína AI (por ejemplo, Gli → Arg26; Trp → Arg50; Leu → Arg60) muestran una forma de amiloidosis ("Tipo Östertag ") caracterizada por depósitos de la proteína apolipoproteína AI o sus fragmentos (AApoAI). Estos pacientes tienen bajos niveles de lipoproteína de alta densidad (HDL) y presente con una neuropatía periférica o fallo renal.

Una mutación en la cadena alfa de la enzima Lisozima (por ejemplo, Ile → Thr56 o Asp → His57) es la base de otra forma de amiloide hereditaria no neuropática de tipo Östertag reseñada en las familias inglesas. Aquí, las fibrillas de la proteína lisozima mutante (Alys) se depositan, y los pacientes en general muestran función renal alterada. Esta proteína, a diferencia de la mayoría de las proteínas que forman fibrilla como se describe en el presente documento, está usualmente presente en la forma entera (no fragmentada) (Benson, M.D., et al. CIBA Fdn. Symp. 199: 104 - 131, 1996).

El péptido amiloide β (Aβ) es un péptido de 39 - 43 aminoácidos derivados de proteólisis de una gran proteína conocida como proteína precursora de amiloide beta (βAPP). Las mutaciones en βAPP dan como resultado formas familiares de enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down y / o demencia senil, caracterizadas por deposición cerebral de placas compuestas de fibrillas Aβ y otros componentes, que se describen en más detalle más adelante. Las mutaciones conocidas en APP asociada a enfermedad de Alzheimer se producen aproximadamente en los sitios de escisión de β o secretasa γ, o dentro de Aβ. Por ejemplo, posición 717 está próxima al sitio de escisión de secretasa γ y de APP en su procesamiento de Aβ, y las posiciones 670/671 están próximos al sitio de escisión de la secretasa β. Las mutaciones en cualquiera de estos restos puede dar como resultado enfermedad de Alzheimer, presumiblemente mediante la provocación de un incremento de la cantidad de la forma de 42/43 aminoácidos de Aβ generada de APP. La estructura y secuencia de péptidos Aβ de diversas longitudes se conocen bien en la técnica. Tales péptidos se pueden preparar de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica (*por ejemplo*, Glenner y Wong, Biochem Biophys. Res. Comm. 129: 885 - 890, 1984; Glenner y Wong, Biochem Biophys. Res. Comm. 122: 1131 - 1135, 1984). Además, diversas formas de los péptidos están comercialmente disponibles.

Sinucleína es una proteína asociada a sinapsis que se parece a una alipoproteína y es abundante en citosol neuronal y terminales presinápticos. Un fragmento de péptido derivado de sinucleína α, denominada NAC, es también un componente de placas amiloides de enfermedad de Alzheimer. (Clayton, et al., 1998). Este componente también sirve como una diana para tratamientos basados inmunológicamente de la presente invención, como se detalla más adelante.

Gelsolina es una proteína de unión de calcio que se une a filamentos de fragmentos de actina. Mutaciones en la posición 187 (por ejemplo, Asp → Asn; Asp → Tyr) de la proteína da como resultado una forma de amiloidosis sistémica hereditaria, usualmente encontrada en pacientes de Finlandia, así como personas de origen holandés o japonés. En los individuos afligidos, fibrillas formadas a partir de fragmentos de gelsolina (Agel), usualmente constan de aminoácidos 173-243 (fragmento carboxiterminal de 68 kDa) y se depositan en los vasos sanguíneos y membranas basales, que da

como resultado distrofia corneal y neuropatía craneal que progresa a neuropatía periférica, cambios cutáneos distróficos y deposición en otros órganos. (Kangas, H., et al. Human Mol. Genet. 5(9): 1237 - 1243, 1996).

Otras proteínas mutadas, tales como la cadena alfa mutante de fibrinógeno (AfibA) y cistatina C mutante (Acys) también forman fibrillas y producen trastornos hereditarios característicos. Las fibrillas AfibA forman depósitos característicos de un amiloide hereditario no neuropático con enfermedad renal; los depósitos Acys son característicos de una angiopatía amiloide cerebral hereditaria reseñada en Islandia. (Isselbacher, et al., Harrison's Principles of Internal Medicine, McGraw-Hill, San Francisco, 1995; Benson, *et al.*, *supra.*). En al menos algunos casos, pacientes con angiopatía amiloide cerebral (CAA) se ha mostrado que tiene fibrillas amiloides que contienen una forma no mutante de cistatina C junto con proteína beta. (Nagai, A., et al. Molec. Chem. Neuropathol. 33: 63 - 78, 1998).

Ciertas formas de enfermedad de priones se consideran ahora que son hereditables, siendo responsable de hasta 15% de los casos, que previamente se pensó que eran infecciosos por naturaleza (Baldwin, et al., en Research Advances in Alzheimer's Disease and Related Disorders, John Wiley and Sons, New York, 1995). En tales trastornos de priones, los pacientes desarrollan placas compuestas de isoformas anormales de la proteína de prión normal (Prp^C). Una isoforma mutante predominante, Prps^C, también denominada AScr, difiere de la proteína celular normal en su resistencia a la degradación por proteasa, insolubilidad después de extracción con detergente, deposición en lisosomas secundarios, la síntesis después de la traducción, y alto contenido en hojas plagadas β . La unión genética se ha establecida para al menos cinco mutaciones que dan como resultado la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob (CJD), síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), e insomnio familiar fatal (FFI). (Baldwin) Los procedimientos para extraer péptidos de fibrillas de Scrapie, determinación de las secuencias y preparación de tales péptidos se conocen en la técnica (por ejemplo, Beekes, M., et al. J. Gen. Virol. 76: 2567-76, 1995).

Por ejemplo, una forma de GSS se ha ligado a una mutación PrP en el codón 102, mientras que GSS telencefálico se segrega con una mutación en el codón 117. Las mutaciones en los codones 198 y 217 da como resultado una forma de GSS en el que las placas neuríticas características de la enfermedad de Alzheimer contienen PrP en lugar de péptido A β . Ciertas formas de CJD familiar han estado asociadas a mutaciones en los codones 200 y 210; mutaciones en los codones 129 y 178 se ha encontrado tanto en CJD como FFI familiar. (Baldwin, *supra.*)

d. Amiloidosis sistémica senil

La deposición de amiloide, o bien sistémica o focal, se incrementa con la edad. Por ejemplo, fibrillas de Transtirretina (TIR) de tipo salvaje se encuentran comúnmente en el tejido cardíaco de individuos mayores. Éstos pueden ser asintomáticos, clínicamente silenciosos, o pueden dar como resultado insuficiencia cardíaca. Los depósitos focales fibrilares asintomáticos se pueden producir en el cerebro (A β), corpórea amilácea de la próstata (microglobulina A β 2), articulaciones y vesículas seminales.

e. Amiloidosis Cerebral

La deposición local de amiloide es común en el cerebro, particularmente en los individuos mayores. El tipo más frecuente de amiloide en el cerebro se compone principalmente de fibrillas de péptido A β , dando como resultado demencia o enfermedad de Alzheimer esporádica (no hereditaria). De hecho, la incidencia de la enfermedad de Alzheimer esporádica excede en gran medida las formas mostradas que son hereditarias. Los péptidos de fibrilla que forman estas placas son muy similares a los descritos anteriormente, con referencia a las formas hereditarias de *enfermedad de Alzheimer* (AD).

f. Amiloidosis relacionada con diálisis

Placas compuestas de fibrillas de microglobulina β_2 (A β_2 M) comúnmente se desarrollan en pacientes que reciben hemodiálisis de larga duración o diálisis peritoneal. La microglobulina β_2 es un polipéptido de 11,8 kilodaltons y es la cadena ligera de los antígenos de MHC de Clase I, que están presentes en las células nucleadas. En circunstancias normales, se desprende continuamente de las membranas celulares y se filtra normalmente por el riñón. El fallo en la eliminación, tal como en el caso de la función renal alterada, conduce a la deposición en el riñón y otros sitios (principalmente en los tejidos ricos en colágeno de las articulaciones). A diferencia de otras proteínas de fibrilla, las moléculas de A β_2 M están generalmente presentes en forma no fragmentada en las fibrillas. (Benson, *supra.*)

g. Amiloidosis derivada de hormonas

Los órganos endocrinos pueden albergar depósitos de amiloide, particularmente en individuos mayores. Los tumores que segregan hormonas también pueden contener placas amiloides derivadas de hormonas, las fibrillas de las cuales están hechas de hormonas polipeptídicas tales como calcitonina (carcinoma medular del tiroides), polipéptido amiloide de islotes (amilina; que se produce en la mayoría de los pacientes con diabetes de Tipo II), y péptido natriurético atrial (amiloidosis atrial aislada). Las secuencias y estructuras de estas proteínas se conocen bien en la técnica.

h. Amiloidosis miscelánea

Existen una diversidad de otras formas de enfermedad amiloide que se manifiestan normalmente como depósitos de amiloide depositados. En general, estas enfermedades son probablemente el resultado de la producción localizada y / o carencia de catabolismo de precursores de fibrilla específicos o una predisposición de un tejido particular (tal como la articulación) para la deposición de fibrilla. Los ejemplos de tal deposición idiopática incluyen AL amiloide AL nodular, amiloide cutáneo, amiloide endocrino, y amiloide relacionado con tumor.

C. Composiciones farmacéuticas

Es el descubrimiento de la presente invención que las composiciones capaces de inducir o proporcionar una respuesta inmune dirigida a ciertos componentes de placas amiloides son eficaces para tratar o prevenir el desarrollo de enfermedades amiloides. En particular, de acuerdo con la invención proporcionada en el presente documento, es posible prevenir la progresión de, mejorar los síntomas de, y / o reducir la carga de placa amiloide en individuos afligidos, cuando se administra una dosis inmunoestimuladora de un agente anti-amiloide, o reactivo inmune anti- amiloide correspondiente, al paciente. Esta sección describe agentes anti-amiloides ejemplares que muestran que producen respuestas inmunes activas, así como pasivas, a placas amiloides y proporciona los datos ejemplares de que muestran el efecto del tratamiento usando composiciones sobre la carga de placa amiloide.

En general, los agentes anti-amiloide de la invención se componen de un componente de placa específica, preferiblemente un componente formador de fibrilla, que es usualmente una proteína, péptido, o su fragmento característicos, como se describe en la sección previa y se ejemplifican más adelante. Más generalmente, los agentes terapéuticos para uso en la presente invención producen o inducen una respuesta inmune contra una placa, o más específicamente, su componente de fibrilla. Por lo tanto tales agentes incluyen, pero no se limitan a, el propio componente y sus variantes, análogos y miméticos del componente que inducen y / o reaccionan de manera cruzada con anticuerpos para el componente, así como anticuerpos o células T que son específicamente reactivos con el componente amiloide. De acuerdo con una característica importante, las composiciones farmacéuticas no se seleccionan entre los componentes no específicos esto es, a partir de los componentes que son en general circulantes o que son ubicuos en todo el cuerpo. A modo de ejemplo, Proteína Amiloide de Suero (SAP) es una glicoproteína de plasma circulante que se produce en el hígado y se une a la mayoría de las formas conocidas de depósitos de amiloide. Las composiciones terapéuticas preferiblemente se dirigen a este componente.

La inducción de una respuesta inmune puede ser activa, como cuando un inmunógeno se administra para inducir anticuerpos o células T reactivas con el componente en un paciente, o pasiva, como cuando un anticuerpo se administra ese mismo se une al componente amiloide en el paciente. Los agentes ejemplares para inducir o producir una respuesta inmune contra placas amiloides se describen en las secciones más adelante.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, además del agente (s) inmunogénico (s), una cantidad eficaz de un adyuvante y / o un excipiente. Los adyuvantes y excipientes útiles y farmacéuticamente aceptables se conocen bien en la técnica, y se describen más detalle en las Secciones que siguen.

1. Agentes inmunoestimuladores (Respuesta Inmune activa)**a. Composiciones Anti-fibrilla**

Una clase general class de agentes anti-amiloide preferidos consta de agentes que se derivan de proteínas de fibrilla amiloide. Como se ha mencionado anteriormente, el sello de enfermedades amiloides es la deposición en un órgano u órgano de placas amiloides que constan principalmente de fibrillas, que, a su vez, se componen de proteínas o péptidos de fibrillas característicos. De acuerdo con la presente invención, tal componente de proteína o péptido de fibrilla es un agente útil para inducir una respuesta inmune anti-amiloide.

Las Tablas 1 y 2 resumen proteínas formadoras de fibrillas ejemplares que son características de diversas enfermedades amiloides. De acuerdo con este aspecto de la presente invención, administración a un individuo afligido o susceptible de una composición inmunoestimuladora que incluye la proteína o péptido de fibrilla apropiado proporciona terapia o profilaxis con respecto a la enfermedad amiloide.

A modo de ejemplo, A β , también conocido como péptido amiloide β , o péptido A4 (véase la patente de Estados Unidos 4.666.829; Glenner y Wong, Biochem. Biophys. Res. Commun. 120, 1131 (1984)), es un péptido de 39 - 43 aminoácidos, que es el componente principal de placas of enfermedad de Alzheimer características. A β se genera mediante el procesamiento de una proteína APP mayor por dos enzimas, denominadas secretasas β y gamma (véase Hardy, TINS 20, 154 (1997)).

El Ejemplo I describe los resultados de experimentos llevados a cabo en el soporte de la presente invención, en la que el péptido A β 42 se administró a ratones transgénicos heterocigóticos que sobreexpresan APP humana con una mutación en la posición 717. Estos ratones, conocidos como "ratones PDAPP" muestran patología de tipo Alzheimer y

se considera que son un modelo animal para la enfermedad de Alzheimer (Games, et al., Nature 373: 523 - 7, 1995). Como se detalla en el Ejemplo, estos ratones muestran neuropatología detectables de placa A β en sus cerebros que comienzan a aproximadamente 6 meses de edad, progresando la deposición de placa con el tiempo. En los experimentos descritos en el presente documento, A β 42 agregado (AN 1792) se administró a los ratones. La mayoría de los ratones tratados (7/9) no tenían amiloide detectable en sus cerebros a los 13 meses de edad, al contrario que los ratones control (inyectados con solución salina o no tratados), todos los cuales mostraron carga amiloide significativa en el cerebro a esta edad (FIG. 2). Estas diferencias eran incluso más pronunciadas en el hipocampo (FIG. 3). Los ratones tratados mostraron títulos de anticuerpo en suero significativos contra A β (todos mayor que 1:1000, 8/9 mayor que 1/10,000; FIG. 1, Tabla 3A). En general, los ratones tratados con solución salina mostraron menos de 4 - 5 veces niveles de fondo de anticuerpos contra A β a una dilución de 1:100 todas las veces ensayadas, y por lo tanto considerados que no tienen respuesta relativa significativa con el control (Tabla 3B). Estos estudios demostraron que la inyección con el péptido A β formador de fibrillas proporciona protección contra deposición de placas amiloides A β .

La Proteína Amiloide de Suero (SAP), es una glicoproteína de plasma circulante que se produce en el hígado y se une de una manera dependiente de calcio para todas las formas de fibrilla de amiloide, que incluye fibrillas de placas amiloides cerebrales en la enfermedad de Alzheimer. Como parte de los experimentos anteriores, un grupo de los experimentos anteriores un grupo de ratones se inyectó con SAP; estos ratones desarrollaron títulos en suero significativos para SAP (1:1000 - 1:30000), pero no desarrollaron títulos en suero detectables para el péptido A β y desarrollaron neuropatología de placa cerebral (FIG. 2).

Los experimentos adicionales, detallados en el Ejemplo II, demuestra la dependencia de la dosis del efecto inmunogénico de inyecciones A β en los ratones tratados entre 5 semanas y aproximadamente 8 meses de edad. En estos ratones, títulos en suero medios de anticuerpos de péptido anti-A β aumentó con el número de inmunizaciones y con dosis crecientes; sin embargo, después de cuatro inmunizaciones, títulos en suero medidos cinco días después de la inmunización fuera de los niveles en las dosis mayores (1 - 300 μ g) a niveles alrededor de 1:10000 (FIG. 5).

Los experimentos adicionales en el soporte de la presente invención se describen en el Ejemplo III, el que los ratones de modelo PDAPP se trataron con A β 42 que comienza en un momento (aproximadamente 11 meses de edad) después que las placas amiloides estaban ya presentes en sus cerebros. En estos estudios, los animales se inmunizaron con A β 42 o solución salina, y se sacrificaron para ensayar la carga de amiloide ensayada a la edad de 15 ó 18 meses. Como se ilustra en FIG. 7, a los 18 meses de edad, los ratones tratados con A β 42 mostraron una carga de placa amiloide media significativamente menor (carga de placa, 0,01%) que o bien los controles tratados con PBS de 18 meses de edad (carga de placa, 4,7%) o animales no tratados de 12 meses de edad (0,28%), cuando la carga de placa se mide mediante análisis de imagen, como se detalla en el Ejemplo XIII, parte 8. Estos experimentos demuestran la eficacia de los procedimientos de tratamiento en la reducción existente de la carga de placa y prevención de la progresión de carga de placa en individuos enfermos.

De acuerdo con este aspecto de la invención, los agentes terapéuticos se derivan de péptidos o proteínas de fibrilla que comprenden las placas que son características de la enfermedad de interés. De manera alternativa, tales son agentes lo suficientemente similares antigénicamente para que tales componentes induzcan una respuesta inmune que también reaccione de manera cruzada con el componente de fibrilla. Tablas 1 y 2 proporcionan ejemplos de tales péptidos y proteínas de fibrilla, las composiciones y secuencias de las que se conocen en la técnica o se pueden determinar fácilmente de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica (véanse las referencias citadas más adelante y en la Sección B2 para referencias que específicamente enseñan procedimientos para extracción y / o composiciones de diversos componentes de péptido de fibrilla; los componentes de fibrillas adicionales ejemplares se describen más adelante.)

Cuando se realiza una diagnosis de una enfermedad de amiloide, basándose en determinaciones clínicas y / o de biopsia, los profesionales expertos serán capaces de determinar la composición de fibrilla de los depósitos de amiloides y proporcionar un agente que induce una respuesta inmune dirigida a los péptidos o proteínas fibrilares.

A modo de ejemplo, como se describe anteriormente, el agente terapéutico usado en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer u otras enfermedades amiloides caracterizadas por deposición de fibrilla de A β puede ser cualquiera de las formas de origen natural de péptido A β , y particularmente las formas humanas (es decir, A β 39, A β 40, A β 41, A β 42 o A β 43). Las secuencias de estos péptidos y su relación con el precursor de APP se conocen en la técnica y son bien conocidos en la técnica (*por ejemplo*, Hardy et al., TINS 20, 55 - 158 (1997)). Por ejemplo, A β 42 tiene la secuencia:

H2N-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala-OH. (SEQ ID NO: 1).

A β 41, A β 40 y A β 39 difieren de A β 42 mediante la omisión de Ala, Ala-Ile, y Ala-Ile-Val respectivamente del extremo C-terminal del péptido. A β 43 difiere de A β 42 en la presencia de un resto de treonina en el extremo C. De acuerdo con una realización preferida de la invención, los agentes terapéuticos inducirán una respuesta inmune contra toda o una parte del componente de fibrilla de la enfermedad de interés. Por ejemplo, una composición inmunogénica de A β es un

agente que induce un anticuerpo específico para el extremo N de A β . Tal composición tiene la ventaja que no reconocería la proteína precursora, β -APP, por lo tanto haciendo menos probable que produzca autoinmunidad.

A modo de ejemplo adicional, se aprecia que los pacientes afligidos con enfermedades caracterizadas por la deposición de fibrillas AA, por ejemplo, ciertos trastornos inflamatorios crónicos, infecciones microbianas locales o sistémicas, y neoplasmas malignos, como se describe anteriormente, se pueden tratar con péptido AA, un fragmento conocido de 8 kilodaltons de proteína A amiloide de suero (ApoSSA). Los trastornos amiloides AA incluyen, pero no se limitan a enfermedades inflamatorias tales como artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, espondilitis anquilosante, psoriasis, artropatía psoriática, síndrome de Reiter, enfermedad de Still de adultos, síndrome de Behcet, enfermedad de Crohn, infecciones microbianas crónicas tales como lepra, tuberculosis, bronquioectasis, úlceras de decúbito, pielonefritis crónica, osteomielitis, y enfermedad de Whipple así como neoplasmas malignos tales como linfoma de Hodgkin, carcinoma renal, carcinomas del intestino, pulmón y tracto urogenital, carcinoma de células basales, y leucemia de células peludas.

El péptido AA se refiere a uno o más de un grupo heterogéneo de péptidos derivados del extremo N de amiloide A de proteína precursora de suero (ApoSSA), que comienza en el resto 1, 2 ó 3 de la proteína precursora y que acaba en cualquier punto entre los restos 58 y 84; comúnmente las fibrillas AA están compuestas de los restos 1 - 76 de ApoSSA. Las estructuras y composiciones precisas de pueden determinar, y los péptidos apropiados sintetizarse de acuerdo con los procedimientos bien conocidos en la técnica (Liepnieks, J.J., et al. Biochem. Biophys Acta 1270: 81-86, 1995).

A modo de ejemplo adicional, los fragmentos derivados de la región N-terminal que contiene toda o parte del dominio variable (V_L) de las cadenas ligeras de inmunoglobulina (cadena kappa o lambda) en general comprenden depósitos de amiloides en los tejidos mesenquimales, que provocan neuropatía periférica y autonómica, síndrome del túnel carpiano, macroglosia, cardiomiopatía restrictiva, artropatía de grandes articulaciones, discrasias inmunes, mielomas, así como discrasias ocultas. Las composiciones de la invención preferiblemente inducirán una respuesta inmune contra una parte de la cadena ligera, preferiblemente contra un "neoeptope" - un epítipo que se forma como resultado de fragmentación de la molécula precursora - para reducir los efectos autoinmunes posibles.

Diversas enfermedades amiloides hereditarias se pueden someter a procedimientos de tratamiento de la presente invención. Tales enfermedades se describen en la Sección B.2, anterior. Por ejemplo, diversas formas de polineuropatía amiloide familiar son el resultado de al menos cincuenta formas mutantes de Transtirretina (TTR), una proteína de 14 kilodaltons producida por el hígado, cada una de ellas caracterizada por un cambio de un único aminoácido. Mientras muchas de estas formas de esta enfermedad son distinguibles en la base de sus patologías particulares y / u orígenes demográficos, se aprecia que las composiciones terapéuticas también están compuestas de agentes que inducen una respuesta inmune contra más de una forma de TTR, tal como una mezcla de dos o más formas de ATTR, incluyendo TTR de tipo salvaje, para proporcionar una composición terapéutica útil en general.

Los depósitos de amiloides que contienen AapoAI se encuentran en las personas que tienen mutaciones puntuales en la molécula de apolipoproteína AI. Los pacientes con esta forma de enfermedad en general presentan neuropatía periférica o insuficiencia renal. De acuerdo con la presente invención, las composiciones terapéuticas están hechas de hasta una o más de las diversas formas de AapoAI descritas en el presente documento o conocidas en la técnica.

Ciertas formas familiares de enfermedad de Alzheimer, así como síndrome de Down, son el resultado de mutaciones en la proteína precursora de amiloide beta, que da como resultado la deposición de placas que tienen fibrillas compuestas principalmente de péptido amiloide β (A β). El uso de péptido A β en composiciones terapéuticas de la presente invención se describe antes y se ejemplifica en el presente documento.

Otras formulaciones para tratamiento de formas hereditarias de amiloidosis, descritas anteriormente, incluyen las composiciones que producen respuestas inmunes contra los fragmentos de gelsolina para el tratamiento de amiloidosis sistémica hereditaria, proteína de Lisozima mutante (Alys), para el tratamiento de una neuropatía hereditaria, cadena alfa mutante de fibrinógeno (AfibA) para una forma no neuropática de amiloidosis se manifiestan como enfermedad renal, cistatina C mutante (Acys) para el tratamiento de una forma de angiopatía cerebral hereditaria reseñada en Islandia. Además, ciertas formas hereditarias de enfermedad de priones (*por ejemplo*, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob (CJD), síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), e insomnio familiar fatal (FFI) se caracterizan por una isoforma mutante de proteína de prión, PrP^{Sc}. Esta proteína se puede usar en composiciones terapéuticas para tratamiento y prevención de deposición de placas de PrP, de acuerdo con la presente invención.

Como se ha descrito anteriormente, la deposición amiloide, o bien sistémica o focal, también se asocia al envejecimiento. Es un aspecto adicional de la presente invención que tal deposición se pueda prevenir o tratar mediante la administración a individuos susceptibles de composiciones que constan de una o más proteínas asociadas a tal envejecimiento. De este modo, las placas compuestas de ATTR derivadas de TIR de tipo salvaje se encuentran frecuentemente en el tejido cardíaco de las personas mayores. De manera similar, ciertos individuos mayores pueden desarrollar depósitos focales fibrilares de A β en sus cerebros; el tratamiento por péptido A β , como se detalla en el presente documento se puede garantizar en tales individuos. La microglobulina β 2 es un componente frecuente de la

córpora amilácea de la próstata, y por lo tanto es un agente candidato adicional agente de acuerdo con la presente invención.

A modo de ejemplo adicional, pero sin limitación, existe un número de formas adicionales no hereditarias de enfermedad amiloide, que son candidatas para los procedimientos de tratamiento de la presente invención. Las placas fibrilares de microglobulina $\beta 2$ comúnmente se desarrollan en pacientes que reciben hemodiálisis de larga duración o diálisis peritoneal. Tales pacientes se pueden tratar mediante tratamiento con composiciones terapéuticas dirigidas a microglobulina $\beta 2$ o, más preferiblemente, sus epítopes inmunogénicos, de acuerdo con la presente invención.

Los tumores que segregan hormonas también pueden contener placas amiloides derivadas de hormonas, la composición de las cuales son en general características del órgano endocrino particular afectado. De este modo tales fibrillas se pueden hacer de hormonas polipeptídicas tal como calcitonina (carcinoma medular del tiroides), polipéptido amiloide de islotes (que se produce en la mayoría de los pacientes con diabetes de Tipo II), y péptido natriurético atrial (amiloidosis atrial aislada). Las composiciones dirigidas a depósitos de amiloides que se forman en la íntima aórtica en aterosclerosis también se contemplan en la presente invención. Por ejemplo, Westermark, *et al.* describen un fragmento N-terminal de 69 aminoácidos de Apolipoproteína A que forma tales placas (Westermark, *et al.* Am. J. Path. 147: 1186 - 92, 1995); las composiciones terapéuticas de la presente invención incluyen reactivos inmunológicos dirigidos a tal fragmento, así como su fragmento.

La descripción anterior se ha centrado en el componente de fibrillas amiloide que se puede usar como agentes terapéuticos en el tratamiento o prevención de diversas formas de enfermedad amiloide. El agente terapéutico también puede ser un fragmento activo o análogo de un péptido o proteína de fibrilla de origen natural o mutante que contiene un epítipo que induce una respuesta inmune protectora o similar sobre la administración a un ser humano. Los fragmentos inmunogénicos típicamente tienen una secuencia de al menos 3, 5, 6, 10 ó 20 aminoácidos contiguos de un péptido natural. Los fragmentos inmunogénicos del péptido A β ejemplares incluyen A β 1-5, 1 - 6, 1 - 7, 1 - 10, 3 - 7, 1 - 3, 1 - 4, 1 - 12, 13 - 28, 17 - 28, 1 - 28, 25 - 35, 35 - 40 y 35 - 42. Los fragmentos que carecen de al menos uno, y algunas veces al menos 5 o 10 aminoácidos C-terminal presentes en una forma de origen natural del componente de fibrilla se usan en algunos procedimientos. Por ejemplo, un fragmento que carece de 5 aminoácidos del extremo C-terminal de A β 43 incluye los primeros 38 aminoácidos del extremo N-terminal de AB. Los fragmentos de la mitad N-terminal de A β se prefieren en algunos procedimientos. Los análogos incluyen variantes alélicas, de especies e inducidas. Los análogos típicamente difieren de los péptidos de origen natural en una o unas pocas posiciones, a menudo en virtud de sustituciones conservadoras. Los análogos típicamente muestran al menos 80 ó 90% de identidad de secuencia con los péptidos naturales. Algunos análogos incluyen aminoácidos no naturales o modificaciones de aminoácidos N o C terminal. Los ejemplos de aminoácidos no naturales son aminoácidos α, α , disustituidos, N-alquil aminoácidos, ácido láctico, 4-hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, aminoácidos γ -N,N,N-trimetil lisina, γ -N-acetil lisina, O-fosfoserina, N-acetil serina, N-formil metionina, 3-metil histidina, 5-hidroxilisina, ω -N-metilarginina.

En general, las personas expertas en la técnica apreciarán que los fragmentos y análogos diseñados de acuerdo con este aspecto de la invención se pueden seleccionar mediante reactividad cruzada con el componente de fibrillas de origen natural y / o eficacia profiláctica o terapéutica en modelos de animal transgénico como se describe más adelante. Tales fragmentos o análogos se pueden usar en composiciones terapéuticas de la presente invención, si su inmunorreactividad y eficacia de modelo animal es aproximadamente equivalente a o mayor que los parámetros correspondientes medidos para el componente amiloide de fibrillas.

Tales péptidos, proteínas, o fragmentos, análogos y otros péptidos amiloidogénicos se pueden sintetizar mediante síntesis de péptido de fase sólida o expresión recombinante, de acuerdo con procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica, o se pueden obtener a partir de fuentes naturales. Las composiciones de fibrilla ejemplares, los procedimientos de extracción de fibrillas, secuencias de componentes de péptido o proteína de fibrilla se proporcionan mediante muchas de las referencias citadas junto con las descripciones de componente de fibrillas específicos proporcionadas en el presente documento. De manera adicional, otras composiciones, procedimientos de extracción y determinación de secuencias se conocen en la técnica disponibles para personas que deseen hacer uso de estas composiciones. Sintetizadores de péptido automáticos se pueden usar para preparar tales composiciones y están comercialmente disponibles de numerosos fabricantes, tal como Applied Biosystems (Perkin Elmer; Foster City, California), y procedimientos para preparar péptidos sintéticos se conocen en la técnica. La expresión recombinante puede ser en bacterias, tal como E. coli, levadura, células de insecto o células de mamífero; de manera alternativa, se pueden producir proteínas usando sistemas de traducción *in vitro* sin células conocidos en la técnica. Procedimientos para la expresión recombinante se describen por Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (C.S.H.P. Press, NY 2ª ed., 1989). Ciertos péptidos y proteínas están también comercialmente disponibles; por ejemplo, algunas formas de péptido A β están disponibles de proveedores tales como American Peptides Company, Inc., Sunnyvale, California, y California Peptide Research, Inc. Napa, California.

Los agentes terapéuticos también pueden estar compuestos de polipéptidos más largos que incluyen, por ejemplo, el fragmento de péptido de fibrillas activo o análogo, conjuntamente con otros aminoácidos. Por ejemplo, el péptido A β

puede estar presente en proteína APP intacta o su segmento, tal como el fragmento C-100 que comienza en el extremo N de A β y continúa hasta el final de APP. Tales polipéptidos se pueden seleccionar por la eficacia profiláctica o terapéutica en modelos animales como se describe más adelante. El péptido A β , análogo, fragmento activo u otro polipéptido se puede administrar en forma asociada (es decir, como un péptido amiloide) o en forma disociada. Los agentes terapéuticos también pueden incluir multímeros de agentes inmunogénicos monoméricos o conjugados o proteínas vehículo, y / o, como se ha mencionado anteriormente, se puede añadir a otros componente de fibrillas, con el fin de proporcionar un intervalo más amplio de actividad amiloide anti-placa.

Un péptido inmunogénico, tal como un fragmento de A β , se puede presentar por un virus o una bacteria como parte de una composición inmunogénica. Un ácido nucleico que codifica el péptido inmunogénico se incorpora en un genoma o episoma del virus o bacteria. De manera opcional, el ácido nucleico se incorpora de tal manera que el péptido inmunogénico se expresa como una proteína secretada o como una proteína de fusión con una proteína de superficie externa de un virus o una proteína transmembrana de una bacteria de manera que el péptido se visualice. Los virus o bacterias usadas en tales procedimientos deben ser no patogénicos o atenuados. Los virus adecuados incluyen adenovirus, HSV, virus de encefalitis equina Venezolana y otros virus alfa, virus de estomatitis vesicular, y otros virus rhabdo, vaccinia y viruela aviar. Las bacterias adecuadas incluyen Salmonella y Shigella. La fusión de un péptido inmunogénico a HBsAg de HBV es particularmente adecuada. Los agentes terapéuticos también incluyen péptidos y otros compuestos que no necesariamente tienen una secuencia de aminoácido secuencia similar significativa con A β pero no obstante sirven como miméticos de A β e inducen una respuesta inmune similar. Por ejemplo, cualesquiera péptidos y proteínas que forman hojas plegadas β se pueden seleccionar para conveniencia. Los anticuerpos monoclonales anti-idiotípicos contra anticuerpos monoclonales a A β u otros péptidos amiloidogénicos también se pueden usar. Tales anticuerpos anti-Id imitan el antígeno y generan una respuesta inmune a él (véase Essential Immunology (Roit ed., Blackwell Scientific Publications, Palo Alto, 6ª ed.), p. 181). Los agentes diferentes de péptidos A β deben inducir una respuesta inmunogénica contra uno o más de los segmentos preferidos de A β enumerados anteriormente (por ejemplo, 1 - 10, 1 - 7, 1 - 3, y 3 - 7). Preferiblemente, tales agentes inducen una respuesta inmunogénica que se dirige específicamente a uno de estos segmentos sin dirigirse a otros segmentos de A β .

También se pueden seleccionar genotecas aleatorias de péptidos u otros compuestos para conveniencia. Se pueden producir genotecas combinatorias para muchos tipos de compuestos que se pueden sintetizar de una manera por etapas. Tales compuestos incluyen polipéptidos, miméticos de cambio beta, polisacáridos, fosfolípidos, hormonas, prostaglandinas, esteroides, compuestos aromáticos, v heterocíclicos, benzodiazepinas, glicinas oligoméricas N sustituidas y oligocarbamatos. Las grandes genotecas combinatorias de los compuestos se pueden construir mediante el procedimiento de genotecas sintéticas codificadas (ESL) descritos en Affymax, documento WO 95/12608, Affymax, documento WO 93/06121, Columbia University, documento WO 94/08051, Pharmacopeia, documento WO 95/35503 y Scripps, documento WO 95/30642 (cada uno de los cuales se incorpora por referencia para todos los propósitos). Las genotecas de péptido también se pueden generar mediante procedimientos de despliegue en fago. Véase, *por ejemplo*, Devlin, documento WO 91/18980.

Las genotecas combinatorias y otros compuestos se seleccionan inicialmente para conveniencia mediante determinación de su capacidad de unirse a anticuerpos o linfocitos (B o T) que se sabe que son específicos para A β u otros péptidos amiloidogénicos tales como ADR. Por ejemplo, se pueden realizar selecciones iniciales con cualquier suero policlonal o anticuerpo monoclonal a A β o cualquier otro péptido amiloidogénico de interés. Los compuestos identificados por tales selecciones se analizan después para determinar la capacidad de inducir anticuerpos o linfocitos reactivos a A β u otro péptido amiloidogénico. Por ejemplo, diluciones múltiple de suero se pueden ensayar en placas de microvaloración que se han recubierto previamente con péptido de fibrilla, y un ELISA estándar se puede realizar para ensayar anticuerpos reactivos a A β . Los compuestos se pueden después ensayar para determinar la eficiencia profiláctica y terapéutica en animales transgénicos predispuestos a una enfermedad amiloidogénica, como se describe en los Ejemplos. Tales animales incluyen, por ejemplo, ratones que llevan una mutación 717 de APP descrita por Games et al., supra, y los ratones que llevan una mutación sueca 670/671 de APP tal como se describe por McConlogue et al., documento US 5.612.486 y Hsiao et al., Science 274, 99 (1996); Staufenbiel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 13287 - 13292 (1997); Sturchler- Pierrat et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 13287 - 13292 (1997); Borchelt et al., Neuron 19, 939 - 945 (1997)). El mismo planteamiento de selección se puede usar sobre otros agentes potenciales tales como fragmentos de A β , análogos de A β y péptidos más largos que incluyen A β , descritos anteriormente.

b. Otros Componentes de placa

Se aprecia que la respuesta inmunológica dirigida a otros componentes de placa amiloide también puede ser eficaz en la prevención, retraso o reducción de deposición de placa en enfermedades amiloides. Tales componentes pueden ser componentes secundarios de fibrillas o asociación a fibrillas o formación de fibrilla en las placas, con la restricción que los componentes son ubicuos en todo el cuerpo, o relativamente no específicos para el depósito amiloide, son en general menos adecuado para uso como dianas terapéuticas.

Por lo tanto es un descubrimiento adicional de la presente invención que los agentes que inducen una respuesta

inmune a componentes de placa específica son útiles en el tratamiento o prevención de progresión de enfermedades amiloides. Esta sección proporciona antecedentes sobre varias moléculas asociadas a placa amiloide ejemplares. La inducción de una respuesta inmune contra cualquiera de estas moléculas, solas o en combinación con composiciones inmunogénicas terapéuticas contra el componente de fibrillas descritas anteriormente o contra cualquiera de los otros

5 componentes que no forman fibrillas que se describen más adelante, proporciona un régimen de tratamiento antiamiloides adicional, de acuerdo con la presente invención. Que también forma parte de la presente invención son regímenes de inmunización pasivos basados en tales componentes de placa, como se describe en el presente documento.

A modo de ejemplo, la sinucleína es una proteína que es estructuralmente similar a apolipoproteínas pero se encuentra en el citosol neuronal, particularmente en la proximidad de terminales presinápticos. Existen al menos tres formas de la proteína, denominadas α , β y γ sinucleína. Recientemente, se ha mostrado que α y β sinucleína están implicadas en la nucleación de depósitos de amiloides en ciertas enfermedades amiloides, particularmente enfermedad de Alzheimer. (Clayton, D.F., et al., TINS 21(6): 249 - 255, 1998). Más específicamente, un fragmento del dominio NAC de α y β sinucleína (restos 61 - 95) se han aislado de placas amiloides en pacientes de Alzheimer; in de hecho este fragmento

10 comprende aproximadamente 10% de la placa que permanece insoluble después de la solubilización con dodecil sulfato sódico (SDS). (George, J.M., et al. Neurosci. News 1: 12 - 17, 1995). Además, tanto la α sinucleína como su fragmento NAC se ha reseñado que aceleran la agregación de péptido amiloide β en amiloide insoluble *in vitro*. (Clayton, *supra*).

Los componentes adicionales asociadas a placas amiloides incluyen componentes no peptídicos. Por ejemplo, perlecan y glicosaminoglicanos derivados de perlecan son proteoglicanos de sulfato de heparina que están presentes en placas

20 amiloides que contienen A β de enfermedad de Alzheimer y otra amiloidosis del SNC y sistémica, incluyendo placas de amilina asociadas a diabetes. Estos compuestos se ha mostrado que potencian la formación de fibrillas de A β . Tanto la proteína de núcleo como las cadenas de glicosaminoglicano de perlecan se ha mostrado que participan en la unión a A β . Los glicosaminoglicanos adicionales, específicamente, sulfato de dermatan, condroitin-4-sulfato, y polisulfato de pentosan, se encuentran comúnmente en las placas amiloides de diversos tipos y también se ha mostrado que

25 potencian la formación de fibrilla. El sulfato de dextrano también tiene esta propiedad. Esta potenciación está significativamente reducida cuando las moléculas son agentes. terapéuticos inmunogénicos desulfatados dirigidos contra las formas sulfatadas de glicosaminoglicanos, incluyendo los propios glicosaminoglicanos específicos, de una realización adicional de la presente invención, o bien como un tratamiento primario o secundario. La producción de tales moléculas, así como las composiciones terapéuticas apropiadas que contienen tales moléculas, está dentro de la

30 experiencia de los profesionales en la técnica.

2. Agentes que inducen Respuesta inmune pasiva

Los agentes terapéuticos de la invención también incluyen reactivos inmunes, tales como anticuerpos, que específicamente se unen a péptidos de fibrilla u otros componentes de placas amiloides. Tales anticuerpos puede ser monoclonal o policlonal, y tienen especificidades de unión son consonantes con el tipo de enfermedad amiloide a dirigir.

35 Las composiciones terapéuticas y regímenes de de tratamiento pueden incluir anticuerpos dirigidos a un único dominio de unión o epítipo en un componente de fibrilla particular o no de fibrilla de una placa, o pueden incluir anticuerpos dirigidos a dos o más epítopes en el mismo componente o anticuerpos dirigidos a epítopes sobre componentes múltiples de la placa.

Por ejemplo, en experimentos llevados a cabo en el soporte de la presente invención, 8 ½ a 10 ½ de edad de ratones PDAPP se administraron mediante inyecciones por vía intraperitoneal (i.p.) de anticuerpos policlonales anti-A β 42 o monoclonales anti-A β preparados contra epítopes específicos del péptido A β , o solución salina, como se detalla en el Ejemplo XI en el presente documento. En estos experimentos, se controlaron concentraciones de anticuerpo circulante, y se proporcionaron inyecciones de recuerdo según se necesite para mantener una concentración de anticuerpo

40 circulante mayor que 1:1000 con respecto al antígeno específico para el que se fabrica el anticuerpo. Se observaron las reducciones en los niveles de A β totales, comparados con control, en la corteza, hipocampo y regiones del cerebro de cerebelo de ratones tratados con anticuerpo; las reducciones mayores se mostraron en ratones tratados con anticuerpos policlonales en estos estudios.

En experimentos adicionales llevados a cabo en el soporte de la invención, un ensayo *ex vivo* predictivo (Ejemplo XIV) se usó para ensayar la eliminación de un anticuerpo contra un fragmento de sinucleína denominado NAC. Sinucleína se ha mostrado que puede ser una proteína asociada a placa amiloide. Un anticuerpo a NAC se puso en contacto con una muestra de tejido de cerebro que contiene placas amiloides y células microgliales. Suero de conejo se usó como un control. El control posterior mostró una reducción marcada en el número y tamaño de placas indicativas de actividad de

50 eliminación del anticuerpo.

A partir de estos datos, es evidente que la carga de placa amiloide asociada a enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades amiloides se pueden disminuir en gran medida mediante la administración de reactivos inmunes dirigidos

55 contra epítopes de péptido A β o contra el fragmento NAC de sinucleína, que son eficaces para reducir la carga de placa

- amiloide. Se entiende además que una amplia diversidad de anticuerpos se puede usar en tales composiciones. Los anticuerpos que se unen específicamente a la forma agregada de A β sin unirse a la forma disociada son adecuados para uso en la invención, como son los anticuerpos que se unen específicamente a la forma disociada sin unirse a la forma agregada. Otros anticuerpos adecuados se unen a las formas tanto agregadas como no agregadas. Algunos de tales anticuerpos se unen a una forma corta de origen natural de A β (es decir, A β 39, 40 ó 41) sin unirse a la forma larga de origen natural de A β (es decir, A β 42 y A β 43). Algunos anticuerpos se unen a una forma larga sin unirse a una forma corta. Algunos anticuerpos se unen a A β sin unirse a la proteína precursora de amiloide de longitud completa. Algunos anticuerpos se unen a A β con una afinidad de unión mayor que o igual a aproximadamente 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , o 10^{10} M⁻¹.
- Los sueros policlonales típicamente contienen poblaciones mixtas de anticuerpos que se unen a varios epítopes a lo largo de la longitud de A β . Los anticuerpos monoclonales se unen a un epítipo específico dentro de A β que puede ser un epítipo conformacional o no conformacional. Algunos anticuerpos monoclonales se unen a un epítipo dentro de los restos 1 - 28 de A β (con el primer resto N terminal de A β natural denominado 1). Otros anticuerpos monoclonales se unen a un epítipo con los restos 1 - 10 de A β . También hay anticuerpos monoclonales que se unen a un epítipo con los restos 1 - 16 de A β . Otros anticuerpos monoclonales se unen a un epítipo con los restos 1 - 25 de A β . Algunos anticuerpos monoclonales se unen a un epítipo dentro de los aminoácidos 1 - 5, 5 - 10, 10 - 15, 15 - 20, 25 - 30, 10 - 20, 20, 30, o 10 - 25 de A β . La eficiencia profiláctica y terapéutica de los anticuerpos se puede ensayar usando procedimientos de modelo animal transgénico descritos en los Ejemplos.
- Más generalmente, a partir de las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, los profesionales pueden diseñar, producir y ensayar anticuerpos dirigidas a proteínas o péptidos de fibrilla característicos de otras enfermedades amiloides, tales como las enfermedades descritas en la Sección 2 en el presente documento, usando las composiciones descritas en el presente documento, así como anticuerpos contra otros componentes amiloides.

a. Características generales de Inmunoglobulinas

- La unidad estructural de anticuerpo básica se sabe que comprende un tetrámero de subunidades. Cada tetrámero está compuesto de dos pares idénticos de cadenas de polipéptido, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una "pesada" (aproximadamente 50 - 70 kDa). La parte amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsable del reconocimiento de antígeno. La parte carboxi terminal de cada cadena define una región constante principalmente responsable de la función efectora.
- Las cadenas ligeras se clasifican como o bien kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta, o epsilon, y definen el isótopo de anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD y IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas ligera y pesada, la variable y las regiones constantes se unen por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo también la cadena pesada una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más. (véase *en general*, Fundamental Immunology (Paul. W., ed. 2ª ed. Raven Press, N.Y., 1989), Capítulo. 7 (incorporado por referencia en su totalidad para todos los propósitos).
- Las regiones variables de cada par de cadena ligera/ pesada del sitio de unión de anticuerpo. De este modo, un anticuerpo intacto tienen dos sitios de unión. Excepto en anticuerpos bifuncionales o bispecíficos, los dos sitios de unión son los mismos. Todas las cadenas muestran la misma estructura general de regiones de marco relativamente conservadas (FR) unidas por tres regiones hipervariables, también llamadas regiones determinantes complementarias o CDR. Los CDR de las dos cadenas de cada par están alineadas con las regiones de marco conservadas, que permite que se unan a un epítipo específico. Desde el N-terminal al C-terminal, tanto las cadenas ligeras como pesadas comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio está de acuerdo con las definiciones de Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MO, 1987 y 1991), o Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901 - 917 (1987); Chothia et al., Nature 342: 878 - 883 (1989).

b. Producción de Anticuerpos no humanos

- La producción de anticuerpos monoclonales no humanos, por ejemplo, murino, cobaya, conejo o rata, se puede llevar a cabo mediante, por ejemplo, inmunización del animal con un componente de placa, tal como A β u otro componente de fibrillas. También se puede usar un polipéptido de mayor longitud que comprende A β o un fragmento inmunogénico de A β o anticuerpos anti-idiotípicos a un anticuerpo a A β . Véase *por ejemplo*, Harlow y Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (CSHP NY, 1988) (incorporada por referencia para todos los propósitos). Tal inmunógeno se puede obtener a partir de una fuente a natural, mediante síntesis de péptido o mediante expresión recombinante. De manera opcional, el inmunógeno se puede administrar fusionado o de otra manera formando complejo con una proteína vehículo, como se describe más adelante. De manera opcional, el inmunógeno se puede administrar con un adyuvante. Se pueden usar varios tipos de adyuvante como se describe más adelante. El adyuvante de Freund completo seguido de adyuvante incompleto se prefiere para la inmunización de animales de laboratorio. Se usan típicamente conejos o cobayas para

preparar anticuerpos policlonales. Se usan típicamente ratones para preparar anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos se selecciona para la unión específica al inmunógeno. De manera opcional, los anticuerpos se seleccionan además para detectar la unión a una región específica del inmunógeno. Por ejemplo, en el caso de péptido A β como inmunógeno, se puede realizar la selección determinando la unión de un anticuerpo a una colección de mutantes de supresión de un péptido A β y determinando los mutantes de supresión que se unen al anticuerpo. La unión se puede determinar mediante, por ejemplo, transferencia de Western o ELISA. El fragmento más pequeño que muestra la unión específica anticuerpo define el epítipo del anticuerpo. De manera alternativa, la especificidad de epítipo se puede determinar mediante un ensayo de competición es que es un anticuerpo de ensayo y referencia compiten por la unión al componente. Si los anticuerpos de ensayo y de referencia compiten, entonces se pueden unir al mismo epítipo o epítopos suficientemente próximos que la unión de un anticuerpo interfiera con la unión al otro.

c. Anticuerpos quiméricos y humanizados

Los anticuerpos quiméricos y humanizados tienen la misma o similar especificidad de unión que un anticuerpo de ratón u otro no humano que proporciona el material de partida para la construcción de un anticuerpo quimérico o humanizado. Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos cuyos genes de cadena ligera y pesada se han construido, típicamente por ingeniería genética, a partir de los segmentos del gen de inmunoglobulina que pertenecen a diferentes especies. Por ejemplo, los segmentos variables (V) de los genes de un anticuerpo monoclonal de ratón se pueden unir a segmentos constantes humanos (C), tales como IgG1 e IgG4. Un anticuerpo quimérico típico es de esta manera una proteína híbrida que consta del V o dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de ratón y el C o dominio efector de un anticuerpo humano.

Los anticuerpos modificados tienen restos de marco conservados variables sustancialmente de un anticuerpo humano (denominado un anticuerpo receptor) y regiones determinante complementarias sustancialmente de un anticuerpo de ratón, (denominado la inmunoglobulina donante). Véase, Queen et al., Proc. NatL Acad. Sci. USA 86: 10029 - 10033 (1989) y los documentos WO 90/07861, US 5.693.762. US 5.693.761. US 5.585.089. US 5.530.101 y Winter, US 5.225.539 (incorporados en su totalidad por referencia para todos los propósitos). La (s) región (regiones) constante (s), si está (n) presente (s), también son sustancialmente o completamente de una inmunoglobulina humana. Los dominios variables humanos se eligen usualmente entre anticuerpos humanos cuyas secuencias de marco conservado muestran un alto grado de identidad de secuencia con los dominios de región variable murino a partir de los cuales de derivan los CDR. Los restos de marco conservado de la región variable de la cadena ligera y pesada se pueden derivar de las mismas o diferentes secuencias de anticuerpos humanos. Las secuencias de anticuerpos humanos pueden ser las secuencias anticuerpos humanos de origen natural de origen natural pueden ser secuencias de consenso de varios anticuerpos humanos. Véase Carter et al., documento WO 92/22653. Ciertos aminoácidos de los restos de marco conservado de la región variable de tipo humano se seleccionan para substitución basándose en su posible influencia en la conformación de CDR y / o unión a antígeno. La investigación de tales influencias posible es mediante modelación, examen de las características de los aminoácidos en lugares particulares, u observación empírica de los efectos de substitución o mutagénesis de aminoácidos particulares.

Por ejemplo, cuando un aminoácido difiere entre un resto de marco conservado de región variable de tipo murino y un resto de marco conservado de la región variable humano seleccionado, el aminoácido del marco conservado humano se debe usualmente sustituir por el aminoácido de marco conservado equivalente del anticuerpo de ratón cuando se espera razonablemente que el aminoácido:

- (1) se una de manera no covalente a antígeno directamente,
- (2) ser adyacente a la región de CDR,
- (3) de otra manera interaccione con una región CDR (por ejemplo, está dentro de aproximadamente 6 Å de una región CDR), o
- (4) participe en la interfase VL-VH.

Otros candidatos para substitución son aminoácidos de marco conservado humano aceptores que son inusuales para una inmunoglobulina humana en esa posición. Estos aminoácidos pueden estar sustituidos con aminoácidos de la posición equivalente del anticuerpo del ratón donante o de las posiciones equivalentes de más inmunoglobulinas humanas típicas. Otros candidatos para substitución son aminoácidos de marco conservado humanos aceptores que son inusuales para una inmunoglobulina humana en esa posición. Los marcos conservados de la región variable de inmunoglobulinas humanizadas usualmente muestran al menos 85% de identidad de secuencia a una secuencia de marco conservado de la región variable humana o consenso de tales secuencias.

d. Anticuerpos humanos

Los anticuerpos humanos contra A β se proporcionan mediante una diversidad de técnicas descritas más adelante.

Algunos anticuerpos humanos se seleccionan mediante experimentos de unión competitivos, o de otra manera, que tenga la misma especificidad de epítipo que un anticuerpo de ratón particular, tales como los monoclonales de ratón descritos en el Ejemplo XI. Los anticuerpos humanos también se pueden seleccionar para una especificidad de epítipo particular mediante el uso de solamente un fragmento de A β como el inmunógeno, y / o mediante selección de anticuerpos contra una colección de mutantes de supresión de A β .

(1) Metodología de Trioma

El planteamiento básico y una pareja de fusión de células ejemplar, SPAZ-4, para uso en este planteamiento se han descrito por Oestberg et al., Hybridoma 2: 361 - 367 (1983); Oestberg, Patente de Estados Unidos N° 4.634.664; y Engleman et al., la Patente de Estados Unidos 4.634.666 (cada uno de los cuales se incorpora por referencia en su totalidad para todos los propósitos). Las líneas celulares que producen anticuerpo obtenidas mediante este procedimiento se llaman triomas, debido a que descienden de tres células- -dos humanas y una de ratón.

Inicialmente, una línea de mieloma de ratón se fusiona con un linfocito B humano para obtener una célula híbrida xenogénica que no produce anticuerpo, tal como la línea celular SPAZ- 4 descrita por Oestberg, *supra*. La célula xenogénica se fusiona después con un linfocito B humano inmunizado para obtener una línea celular de trioma que produce anticuerpo. Los triomas se ha encontrado que producen anticuerpo de manera más estable que los hibridomas ordinarios hechos de células humanas.

Los linfocitos B inmunizados se obtienen a partir de sangre, bazo, ganglios linfáticos o médula ósea de un donante humano. Si se desean anticuerpos contra un antígeno o epítipo específico es preferible usar ese antígeno o su epítipo para inmunización. La inmunización puede ser o bien *in vivo* o *in vitro*. Para la inmunización *in vivo*, células B se aíslan típicamente de un ser humano inmunizado con A β , su fragmento, polipéptido mayor que contiene A β o fragmento, o un anticuerpo anti-idiotípico a un anticuerpo a A β . En algunos procedimientos, las células B se aíslan del mismo paciente al que por último se va a administrar terapia de anticuerpo. Para la inmunización *in vitro*, linfocitos B se expusieron típicamente a antígeno durante un período de 7 - 14 días en un medio tal como RPMI-1640 (véase Engleman, *supra*) complementado con 10% de plasma humano.

Los linfocitos B inmunizados se fusionan a una célula híbrida xenogénica tal como SPAZ- 4 mediante procedimientos bien conocidos. Por ejemplo, las células se tratan con 40 - 50% de polietilén glicol de PM 1000 - 4000, a aproximadamente 37 grados C, durante aproximadamente 5 - 10 min. Las células se separan de la mezcla de fusión y se propaga en medio selectivo para los híbridos deseados (por ejemplo, HAT o AH). Los clones que secretan anticuerpos que tienen la especificidad de unión requerida se identifican mediante ensayo del medio de cultivo de trioma para determinar la capacidad de unirse a A β o su fragmento. Los triomas que producen anticuerpos humanos que tienen la especificidad deseada se subclonan mediante la técnica de dilución limitante y crecimiento *in vitro* en medio de cultivo. Las líneas celulares de trioma obtenidas se ensayan después para determinar la capacidad de unirse a A β o a su fragmento.

Aunque los triomas son genéticamente estables no producen anticuerpos a niveles muy altos. Los niveles de expresión se pueden incrementar mediante la clonación de genes de anticuerpo del trioma en uno o más vectores de expresión, y transformar el vector en líneas celulares de mamífero, bacterianas de levadura convencionales, de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica.

(2) Mamíferos no humanos transgénicos

Los anticuerpos humanos contra A β también se pueden producir a partir de mamíferos no humanos transgénicos que tienen transgenes que codifican al menos un segmento del locus de inmunoglobulina humana. Usualmente, el locus de inmunoglobulina endógeno de tales mamíferos transgénicos está funcionalmente inactivado. Preferiblemente, el segmento del locus de la de inmunoglobulina humana incluye secuencias no dispuestas de los componentes de cadena pesada y ligera. Tanto la inactivación de los genes de inmunoglobulina endógenos como la introducción de genes de inmunoglobulina exógenos se puede lograr mediante la recombinación homóloga dirigida, o mediante la introducción de cromosomas YAC. Los mamíferos transgénicos que se producen de este procedimiento son capaces de reestructurar funcionalmente las secuencias de componente de inmunoglobulina, y expresar un repertorio de anticuerpo anticuerpos de diversos isotipos codificados por genes de inmunoglobulina humana, sin expresar los genes de inmunoglobulina endógenos. La producción y de mamíferos que tienen estas propiedades se describen en detalle, por ejemplo, Lonberg et al., documentos W093/12227 (1993); US 5.877.397, US 5.874.299, US 5.814.318, US 5.789.650, US 5.770.429, US 5.661.016, US 5.633.425, US 5.625.126, US 5.569.825, US 5.545.806, Nature 148, 1547 - 1553 (1994), Nature Biotechnology 14, 826 (1996), Kucherlapati, documento WO 91/10741 (1991) (cada uno de los cuales se incorpora por referencia en su totalidad para todos los propósitos). Los ratones transgénicos son particularmente adecuados a este respecto. Los anticuerpos Anti-A β se obtienen mediante inmunización de un mamífero no humano transgénico, tal como se describe por Lonberg o Kucherlapati, *supra*, con A β o su fragmento. Los anticuerpos monoclonales se preparan mediante, por ejemplo, fusión de las células B de tales mamíferos B a líneas celulares de mieloma adecuadas usando la tecnología convencional Kohler-Milstein. Los anticuerpos policlonales humanos también se pueden proporcionar en la

forma de suero de seres humanos inmunizados con un agente inmunogénico. De manera opcional, tales anticuerpos policlonales se pueden concretar mediante afinidad por purificación usando A β u otro péptido amiloide inmunógeno como un reactivo de afinidad.

(3) Procedimientos de despliegue en fago

5 Un planteamiento adicional para obtener anticuerpos anti-A β humanos es seleccionar una genoteca de ADN de células B humanas de acuerdo con el protocolo general indicado por Huse et al., Science 246: 1275 - 1281 (1989). Por ejemplo, como se describe para la metodología de trioma, tales células B se pueden obtener a partir de un ser humano inmunizado con A β , fragmentos, polipéptidos más largos que contienen A β o fragmentos o anticuerpos anti-idiotípicos. De manera opcional, tales células B se obtienen a partir de un paciente que por último recibe tratamiento de anticuerpo.

10 Se seleccionan anticuerpos que se unen a un epítipo del componente amiloide de interés, tal como A β o su fragmento. Las secuencias que codifican tales anticuerpos (o un fragmento de unión) se clonan después y se amplifican. El protocolo descrito por Huse se hace más eficaz en combinación la tecnología de despliegue en fago. Véase, por ejemplo, Dower et al., documento WO 91/17271 y McCafferty et al., documentos WO 92/01047, US 5.877.218, US 5.871.907, US 5.858.657, US 5.837.242, US 5.733.743 y US 5.565.332 (cada uno de los cuales se incorpora por

15 referencia en su totalidad para todos los propósitos). En estos procedimientos, se producen genotecas de fago cuyos miembros muestran diferentes anticuerpos en sus superficies externas. Los anticuerpos usualmente se muestran como fragmentos Fv o Fab. Los anticuerpos de despliegue en fago con una especificidad deseada se seleccionan por enriquecimiento de afinidad a un péptido A β o su fragmento.

En una variación del procedimiento de despliegue en fago, se pueden producir anticuerpos humanos que tienen la especificidad de unión de un anticuerpo murino seleccionado. Véase Winter, documento WO 92/20791. En este procedimiento, o bien la región variable de la cadena pesada o ligera del anticuerpo murino seleccionado se usa como un material de partida. Si, por ejemplo, una región variable de la cadena ligera se selecciona como el material de partida, se construye una genoteca de fago en la que los miembros la misma región variable de la cadena ligera (es decir, el material de partida murino) y una región variable de la cadena pesada. Las regiones variables de la cadena pesada se

20 obtienen a partir de una genoteca de las regiones variables de la cadena pesada humanas reestructuradas. Se selecciona un fago que muestra fuerte unión específica para el componente de interés (por ejemplo, al menos 10^8 y preferiblemente al menos 10^9 M $^{-1}$). La región variable de la cadena pesada humana de este fago después sirve como un material de partida para construir una genoteca de fago adicional. En esta genoteca, cada fago muestra la misma región variable de la cadena pesada (es decir, la región identificada de la primera genoteca de despliegue) y una diferente

25 región variable de la cadena ligera. Las regiones variables de la cadena ligera se obtienen a partir de una genoteca de regiones variables de la cadena ligera humana reestructuradas. Del mismo modo, se selecciona fagos que muestran fuerte unión específica para el componente de péptido amiloide. Estos fagos despliegan las regiones variables de anticuerpos péptido anti-amiloide completamente humanos. Estos anticuerpos usualmente tienen la misma o similar especificidad de epítipo que el material de partida murino.

e. Selección de Región Constante

Las regiones variables de la cadena pesada y ligera anticuerpos quiméricos, humanizados, o humanos pueden estar unidos a al menos una parte de una región constante humana. La elección de la región constante depende, en parte, si se desea que el complemento dependa de anticuerpo y / o toxicidad celular mediada. Por ejemplo, isótopos IgG1 y IgG3 tienen actividad de complemento y los isótopos IgG2 y IgG4 no. La elección de isótopo también puede afectar el paso de anticuerpo en el cerebro. Las regiones constantes de la cadena ligera pueden ser lambda o kappa. Anticuerpos pueden

40 estar expresados en forma de tetrámeros que contienen dos cadenas ligeras y dos pesadas, como cadena pesadas, cadenas ligeras, separadas, como Fab, Fab' F(ab') $_2$, y Fv, o como anticuerpos de una sola cadena en los que los dominios variables de cadena pesada y ligera están ligadas mediante un espaciador.

f. Expresión de Anticuerpos Recombinantes

Los anticuerpos quiméricos, humanizado y humanos se producen típicamente por expresión recombinante. Las construcciones de polinucleótidos recombinantes típicamente incluyen una secuencia de control de expresión ligada a las secuencias de codificación de las cadenas de anticuerpo, incluyendo regiones promotoras asociadas naturalmente o heterólogas. Preferiblemente, las secuencias de control de expresión son sistemas promotores eucarióticos en vectores capaces de transformar o transfectar células huésped eucarióticas. Una vez el vector se ha incorporado en el huésped apropiado, el huésped se mantiene en condiciones adecuadas para la expresión de alto nivel de las secuencias de nucleótidos, y la recogida y purificación de los anticuerpos de reacción cruzada.

50

Estos vectores de expresión son típicamente replicables en los organismos huésped o bien como episomas o como una parte integral del ADN cromosómico huésped. Comúnmente, vectores de expresión contienen marcadores de selección, por ejemplo, resistencia a ampicilina o resistencia a higromicina, para permitir la detección de aquellas células transformadas con las secuencias de ADN deseadas.

55

E. coli es un huésped procariótico particularmente útil para la clonación de las secuencias de ADN de la presente invención. Microbios, tal como levadura son también útiles para la expresión. *Saccharomyces* es un huésped de levadura preferido, teniendo los vectores secuencias de control de expresión, un origen de replicación, secuencias de terminación y similares según se desee. Los promotores típicos incluyen 3-fosfoglicerato quinasa y otras enzimas glicolíticas. Los promotores de levadura inducibles incluyen, entre otros, promotores de alcohol deshidrogenasa, isocitocromo C. y las enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa.

Las células de mamífero son un huésped preferido para la expresión de segmentos de nucleótido que codifican inmunoglobulinas o sus fragmentos. Véase Winnacker, From Genes to Clones, (VCH Publishers, NY, 1987). Un número de líneas celulares huésped capaces de secretar proteínas heterólogas intactas se han desarrollado en la técnica, e incluyen líneas celulares CHO, diversas líneas celulares COS, células HeLa, células L y líneas celulares de mieloma. Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de expresión, tal como orden de replicación, un promotor, un potenciador (Queen et al., Immunol. Rev. 89: 49 (1986)), y sitios de información de procesamiento necesarios, tales como sitios de unión de ribosoma, sitios de ajuste de ARN, sitios de poliadenilación, y secuencias de terminación de la traducción. Las secuencias de control de expresión preferidas son promotores derivados de genes endógenos, citomegalovirus, SV40, adenovirus, papilomavirus bovino, y similares. Véase Co et al., J. Immunol. 148: 1149 (1992).

De manera alternativa, secuencias que codifican anticuerpo se pueden incorporar en transgenes para introducción en el genoma de un animal transgénico y posteriormente la expresión en la leche del animal transgénico (*por ejemplo*, de acuerdo con procedimientos descritos en los documentos US 5.741 .957, US 5.304.489, US 5.849.992, todos incorporados por referencia en su totalidad en el presente documento). Los transgenes adecuados incluyen secuencias de codificación de las cadenas ligera y / o pesada en enlace operativo con un promotor y potenciador de un gen específico de glándula mamaria, tal como caseína o beta lactoglobulina.

Los vectores que contienen los segmentos de ADN de interés se pueden transferir en la célula huésped por procedimientos bien conocidos, dependiendo del huésped celular. Por ejemplo, transfección por cloruro sódico se usa comúnmente para las células eucarióticas, mientras que el tratamiento por fosfato de calcio, electroporación, lipofección, transfección por bombardeo con microproyectiles o basada en virus se puede usar para otros huéspedes celulares. Otros procedimientos usados para transformar células de mamífero incluyen el uso de polibreno, fusión de protoplastos, liposomas, electroporación, y microinyección (véase en general, Sambrook et al., supra). Para la producción de animales transgénicos, transgenes se pueden inyectar en oocitos fertilizados, o se pueden incorporar en el genoma o células del tronco embrionario, y los núcleos de tales células transferirse en oocitos sin núcleo.

Una vez expresados, anticuerpos se pueden purificar de acuerdo con procedimientos convencionales de la técnica, que incluyen purificación por HPLC, cromatografía en columna, electroforesis en gel y similares (véase en general, Scopes, Protein Purification (Springer- Verlag, NY, 1982)).

4. Otros Agentes terapéuticos

Agentes terapéuticos para uso en los procedimientos presentes también incluyen células T que se unen a un componente de placa, tal como péptido Aβ. Por ejemplo, células T se pueden activar contra péptido Aβ mediante la expresión del gen de la clase I de MHC humano y un gen de microglobulina β-2 humana de una línea celular de insectos, mediante los cual se forma un complejo vacío sobre la superficie de las células y se puede unir a péptido Aβ. Las células T puestas en contacto con la línea celular se llega a activar específicamente contra el péptido. Véase Peterson et al., documento US 5.314.813. Las líneas celulares de insecto que expresan un antígeno de clase II de MHC se puede usar de manera similar a células T CD4.

5. Proteínas vehículo

Algunos agentes para inducir una respuesta inmune contienen el epítipo apropiado para inducir una respuesta inmune contra los depósitos de amiloides pero son demasiado pequeños para que sean inmunogénicos. En esta situación, un péptido inmunógeno puede estar ligado a un vehículo adecuado para ayudar a inducir una respuesta inmune. Los vehículos adecuados incluyen albúminas séricas, hemocianina de lapa californiana, moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovalbúmina, toxoide de tétanos, o toxoide de otras bacterias patógenas, tales como difteria, *E. coli*, cólera, o *H. pylori*, o un derivado de toxina adecuado. Otros vehículos incluyen epítopes de células T que unen a alelos múltiples MHC, por ejemplo, al menos 75% de todos los alelos de MHC humano. Tales vehículos se conocen algunas veces en la técnica como " epítopes de células T universales." Los ejemplos epítopes de células T universales incluyen:

Hemaglutinina de Influenza : HA₃₀₇₋₃₁₉ PKYVKQNTLKLAT (SEQ ID NO : 1)

PADRE (restos comunes en negrita) AKXVAAWTLKAAA (SEQ ID NO: 2)

Malaria CS: epítopo T3 EKKIAKMEKASSVFNV (SEQ ID NO: 3)

Antígeno de superficie de Hepatitis B: HBsAg₁₉₋₂₈ FFLTRILTI (SEQ ID NO: 4)

Proteína 65 de choque térmico: hsp65₁₅₃₋₁₇₁ DQSIGDLIAEAMDKVGNEG (SEQ ID NO: 5)

bacilo Calmette-Guerin QVHFQPLPPAVVKL (SEQ ID NO : 6)

5 Toxoide de tétanos: TI₈₃₀₋₈₄₄ QYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO: 7)

Toxoide de tétanos: TI₉₄₇₋₉₆₇ FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO: 8)

HIV gp120 T1: KQINMWQEVGKAMYA. (SEQ ID NO: 9)

10 Otros vehículos para estimular o potenciar una respuesta inmune incluyen citoquinas tales como IL-1, péptidos α y β de IL-1, IL-2, γ INF, IL-10, GM-CSF, y quimioquinas, tales como MIP1 α y RANTES. Los agentes v también se pueden ligar a péptidos que potencian el transporte a través de los tejidos, como se describe in O'Mahony, documentos WO 97/17613 y WO 97/17614.

15 Los agentes inmunogénicos pueden estar ligados a vehículos mediante reticulación química. Las técnicas para union de un inmunógeno a un vehículo incluyen la formación de enlaces disulfuro usando N-succinimidil-3-(2-piridil-tio) propionato (SPDP) y succinimidil-4-(N- maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC) (si el péptido carece de un grupo sulfhidrilo, esto se puede proporcionar mediante la adición de un resto de cisteína). Estos reactivos crean un enlace disulfuro entre ellos mismos y los restos del péptido cisteína en una proteína y un enlace amida mediante el ϵ -amino sobre una lisina, u otro grupo amino libre amino en otros aminoácidos. Una diversidad de tales agentes que forman disulfuro/amida se describen mediante Immun. Rev. 62, 185 (1982). Otros agentes de acoplamiento bifuncionales forman un tioéter en lugar de un enlace disulfuro. Muchos de estos agentes que forman tioéter están comercialmente
20 disponibles e incluyen ésteres reactivos de ácido 6-maleimidocaproico, ácido 2-bromoacético, y ácido 2- yodoacético, ácido 4-(N-maleimido-metil)ciclohexano-1-carboxílico. Los grupos carboxílicos se pueden activar combinándolos con succinimida o ácido 1-hidroxil-2-nitro-4-sulfónico, sal sódica.

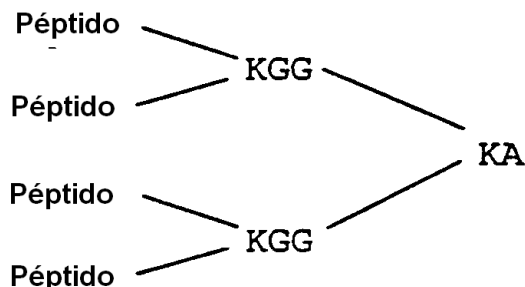
25 Los péptidos inmunogénicos también se pueden expresar como proteínas de fusión con vehículos (es decir, péptidos heterólogos). El péptido inmunogénico puede estar ligado a su extremo amino, su extremo carboxilo, o ambos a un vehículo. De manera opcional, repeticiones múltiples del péptido inmunogénico pueden estar presentes en la proteína de fusión. De manera opcional, un péptido inmunogénico puede estar ligado a copias múltiples de un péptido heterólogo, por ejemplo, a los extremos tanto N como C del péptido. Algunos péptidos vehículo sirven para inducir una respuesta de células T auxiliares contra el péptido vehículo. Las células T auxiliares inducidas a su vez inducen una respuesta de células B contra el péptido inmunogénico ligado al péptido vehículo.

30 Algunos agentes de la invención comprenden una proteína de fusión en el que un fragmento N-terminal de A β está ligado a su extremo C a un péptido vehículo. En tales agentes, el resto N-terminal del fragmento de A β constituye el resto N-terminal de la proteína de fusión. De acuerdo con lo anterior, tales proteínas de fusión son eficaces en la inducción de anticuerpos que se unen a un epítopo que requiere que el resto N-terminal de A β esté en la forma libre. Algunos agentes de la invención comprenden una pluralidad de repeticiones de un segmento N-terminal de A β ligado al
35 extremo C a una o más copias de un péptido vehículo. El fragmento N-terminal de A β incorporado en tales proteínas de fusión algunas veces comienza en A β 1-3 y los extremos en A β 7-11. Se prefieren A β 1-7, A β 1-3, 1-4, 1-5, y 3-7 como el fragmento N-terminal de A β . Algunas proteínas de fusión comprenden diferentes segmentos N-terminal de A β en tándem. Por ejemplo, una proteína de fusión puede comprender A β 1-7 seguido de A β 1-3 seguido de un péptido heterólogo.

40 En algunas proteínas de fusión, un segmento N-terminal de A β está fusionado a su extremo N-terminal a un péptido vehículo heterólogo. La misma variedad de los segmentos N-terminal de A β se puede usar con fusiones C-terminal. Algunas proteínas de fusión comprenden un péptido heterólogo ligado al extremo N de un segmento N-terminal de A β , que a su vez se liga a uno o más segmentos N-terminal adicionales de A β en tándem.

45 Algunos ejemplos de proteínas de fusión adecuadas para uso en la invención se muestran más adelante. Alguna de estas proteínas de fusión comprende segmentos de A β ligados a epítopos de toxoide de tétanos tal como se describe en los documentos US 5.196.512, EP 378.881 y EP 427.347. Algunas proteínas de fusión comprenden segmentos de A β ligados a péptidos vehículo descritos en el documento US 5.736.142. Algunos péptidos heterólogos son epítopos de células T universales. En algunos procedimientos, el agente para administración es simplemente una sola proteína de fusión con un segmento A β ligado a un segmento heterólogo en la configuración lineal. En algunos procedimientos, el
50 agente es multímero de proteínas de fusión representados por la fórmula 2^x, en la que x es un número entero entre 1 - 5. Preferiblemente x es 1, 2 ó 3, siendo 2 más preferido. Cuando x es dos, tal multímero tiene 4 proteínas de fusión ligadas en una configuración preferida denominada MAP4 (véase el documento US 5.229.490). Epítopos de A β están subrayados.

La configuración MAP4 se muestra más adelante, cuando se producen estructuras ramificadas por inicio de síntesis de péptido tanto en el N terminal como las aminas de cadena lateral de lisina. Dependiendo del número de veces que la lisina se incorpora en la secuencia y permite que se ramifique, la presente resultante se presentará múltiples extremos N. En este ejemplo, cuatro extremos N se han producido sobre el núcleo que contiene lisina ramificado. Tal multiplicidad potencia en gran medida la sensibilidad de las células B afines.



AN90549 (Aβ 1-7/Toxoide de tétanos 830-844 en una configuración MAP4):

DAEFRHDDQYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO: 10)

AN90550 (Aβ 1-7/Toxoide de tétanos 947-967 en una configuración MAP4):

10 DAEFRHDDFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO: 11)

AN90542 (Aβ 1-7/Toxoide de tétanos 830-844 + 947-967 en una configuración lineal):

DAEFRHDDQYIKANSKFIGITELFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO: 12)

AN90576: (Aβ 3-9)/Toxoide de tétanos 830-844 en una configuración MAP4):

EFRHDSGQYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO: 13)

15 Péptido descrito en el documento US 5.736.142 (todas en configuraciones lineales):

AN90562 (Aβ 1-7/ péptido) AKXVAAWTLKAAADAEFRHD (SEQ ID NO: 14)

AN90543 (Aβ1-7 x 3/ péptido): DAEFRHDDAEFRHDDAEFRHDAKXVAAWTLKAAA (SEQ ID NO: 15)

Otros ejemplos de proteínas de fusión (epitope inmunogénico de Aβ en negrita) incluyen

AKXVAAWTLKAAA-**DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD** (SEQ ID NO: 16)

DAEFRHD-AKXVAAWTLKAAA (SEQ ID NO: 17)

DAEFRHD-ISQAVHAAHAEINEAGR (SEQ ID NO: 18)

FRHDSGY-ISQAVHAAHAEINEAGR (SEQ ID NO: 19)

EFRHDSG-ISQAVHAAHAEINEAGR (SEQ ID NO: 20)

PKYVKQNTLKLAT-**DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD** (SEQ ID NO: 21)

DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT-**DAEFRHD** (SEQ ID NO: 22)

DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT (SEQ ID NO: 23)

DAEFRHD-DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT (SEQ ID NO: 24)

DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT-EKKIAKMEKASSVFNV-
QYIKANSKFIGITEL-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-**DAEFRHD**
DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL-
FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID

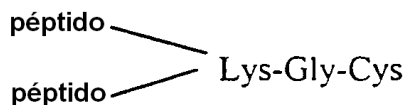
20 NO: 25)

DAEFRHD-QYIKANSKFIGITELCFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO: 26)

DAEFRHD-QYIKANSKFIGITELCFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-
DAEFRHD

(SEQ ID NO: 27)

DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO: 28) en una resina 2 ramificada



EQVTNVGGAISQAVHAAHAEINEAGR (proteína de fusión de sinucleína en configuración MAP-4; SEQ ID NO: 29)

La misma o proteínas vehículo similares y procedimientos de enlace se puede usar para generar inmunógenos a usar en la generación de anticuerpos contra A β para uso en la inmunización pasiva. Por ejemplo, A β o un fragmento ligado a un vehículo se puede administrar a un animal de en la producción de anticuerpos monoclonales a A β .

6. Ácido nucleico que codifica agentes terapéuticos

Respuestas inmunes contra depósitos de amiloides también se inducir mediante la administración de ácidos nucleicos que codifican inmunógenos de péptidos, o anticuerpos seleccionados y sus cadenas de componente usados para la inmunización pasiva. Tales ácidos nucleicos pueden ser ADN o ARN. Un segmento de ácido nucleico que codifica un inmunógeno está ligado típicamente a elementos reguladores, tal como un promotor y potenciador, que permiten la expresión del segmento de ADN en las células diana de un paciente. Para la expresión en células sanguíneas, como es deseable para la inducción de una respuesta inmune, los elementos promotores y potenciadores de los genes de inmunoglobulina de cadena ligera o pesada o el promotor y potenciador temprano del intermedio principal de CMV son adecuados para la expresión directa. Los elementos reguladores ligados y secuencias de codificación están a menudo clonadas en un vector. Para la administración de anticuerpos de cadena doble, las dos cadenas se pueden clonar en los mismos vectores o separados.

Un número de sistemas de vectores virales están disponibles incluyendo sistemas retrovirales (véase, por ejemplo, Lawrie y Tumin, Cur. Opin. Genet. Develop. 3, 102 - 109, 1993); vectores adenovirales (véase, por ejemplo, Bett et al., J. Virol. 67, 5911, 1993); vectores de virus asociados a adeno (véase, por ejemplo, Zhou et al., J. Exp. Med. 179, 1867, 1994), vectores virales de la familia viruela que incluye virus vaccinia y los virus de la viruela aviar, vectores virales del género de virus alfa tales como los derivados de los Virus Forestales Sindbis y Semliki (véase, por ejemplo, Dubensky et al., J. Virol. 70, 508 - 519, 1996), Virus de encefalitis equina venezolana (véase el documento US 5.643.576) y rhabdovirus, tal como virus de estomatitis vesicular (véase el documento WO 96/34625) y papilomavirus (Ohe et al., Human Gene Therapy 6, 325 - 333, 1995); Woo et al., documento WO 94/12629 y Xiao y Brandsma, Nucleic Acids. Res. 24, 2630 - 2622, 1996).

ADN que codifica un inmunógeno, o un vector que contiene el mismo, se puede empaquetar en liposomas. Los lípidos adecuados y análogos se describen en los documentos US 5.208.036, 5.264.618, 5.279.833 y 5.283.185. Vectores y ADN que codifican un inmunógeno también pueden estar adsorbidos o asociados a vehículos particulados, ejemplos de los cuales incluyen polímeros de polimetil metacrilato y polilactidas y poli(lactida-co-glicólidos), véase, por ejemplo, McGee et al., J. Micro Encap. (1996).

Los vectores de terapia génica o ADN desnudo se pueden administrar *in vivo* mediante la administración a un paciente individual, típicamente por administración sistémica (por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, intranasal, gástrica, intradérmica, intramuscular, subdérmica, o infusión intracraneal) o aplicación tópica (véase por ejemplo, el documento US 5.399.346). Tales vectores pueden además incluir agentes de facilitación tal como bupivacaína (documento US 5.593.970). ADN también se puede administrar mediante una pistola de genes. Véase Xiao y Brandsma, *supra*. El ADN que codifica un inmunógeno se precipita en la superficie de perlas metálicas microscópicas. Los microproyectiles se aceleran con una onda de choque o gas de helio de expansión, y penetra en los tejidos hasta una profundidad de varias capas de células. For ejemplo, es adecuado el dispositivo de administración de genes Acce!™ fabricado por Agracetus, Inc., (Middleton, WI). De manera alternativa, ADN desnudo puede pasar a través de la piel al torrente sanguíneo simplemente mediante observación del ADN sobre la piel con irritación química o mecánica (véase el documento WO 95/05853).

En una variación adicional, vectores que codifican inmunógenos se puede administrar a células ex vivo, tales como células explantadas de un paciente individual (por ejemplo, linfocitos, aspirados de médula ósea, biopsia de tejido) o células del tronco hematopoyéticas de donante universal, seguido del implante de las células en un paciente, usualmente después de selección de células que han incorporado el vector.

7. Selección de anticuerpos para actividad de eliminación

El ejemplo XIV describe procedimientos de selección de un anticuerpo para actividad en la eliminación y depósito de amiloide. Para seleccionar la actividad contra un depósito amiloide, se pone en contacto una muestra de tejido de un paciente con amiloidosis, tal como tejido de cerebro en enfermedad de Alzheimer, o un modelo animal que tiene patología amiloide característica con células fagocíticas que llevan un receptor Fc, tales como células microgliales, y el

anticuerpo en el ensayo de un medio *in vitro*. Las células fagocíticas pueden ser un cultivo primario o una línea celular, tal como BV-2, C8-B4, o THP-1. Estos componentes se combinan sobre un portaobjetos de microscopio para facilitar el control microscópico, o reacciones múltiples se pueden realizar en paralelo en los pocillos de un disco de microvaloración. En tal formato, se puede usar un portaobjetos de microscopio de miniatura separado se puede montar en los pocillos separados, o un formato de detección microscópica, tal como detección por ELISA de A β . Preferiblemente, se realiza una serie de mediciones de la cantidad de depósito de amiloide en la mezcla de reacción *in vitro*, partiendo de un valor inicial antes que la reacción haya procedido, y uno o más valores de ensayo durante la reacción. El antígeno se puede detectar mediante tinción, por ejemplo, con un anticuerpo marcado de manera fluorescente a A β u otro componente de placas amiloides. El anticuerpo usado para tinción puede o no puede ser el mismo que el anticuerpo que se está ensayando para determinar la actividad de eliminación. Una reducción relativa al inicio durante la reacción de los depósitos de amiloide indican que el anticuerpo en ensayo tiene actividad de eliminación. Tales anticuerpos es probable que sean útiles en el tratamiento de enfermedades de Alzheimer y otras amiloidogénicas. Como se describe anteriormente, experimentos llevados a cabo en el soporte de la presente invención revelaron, que el uso de tal ensayo, estos anticuerpos para el fragmento NAC de sinucleína son eficaces para eliminar las placas amiloides características de enfermedad de Alzheimer.

D. Pacientes que se pueden someter a Regímenes de Tratamiento Anti-amiloide

Pacientes que se pueden someter a tratamiento incluyen individuos en riesgo de enfermedad pero que no muestran los síntomas, así como pacientes que actualmente muestran síntomas de amiloidosis. En el caso de enfermedad de Alzheimer, virtualmente ninguno está en riesgo de padecer enfermedad de Alzheimer si él o ella vive mucho tiempo. Por lo tanto, los procedimientos actuales se pueden administrar de manera profiláctica a la población general sin la necesidad de cualquier determinación del riesgo del paciente sujeto. Los procedimientos actuales son especialmente útiles para individuo que tienen riesgo genético de enfermedad de Alzheimer o cualquiera de las otras enfermedades amiloides hereditarias. Tales individuos incluyen los que tienen relación con los que han experimentado esta enfermedad, y aquellos cuyos riesgo se determina mediante análisis de marcadores genéticos o bioquímicos. Los marcadores genéticos de riesgo hacia la enfermedad de Alzheimer incluyen mutaciones en el gen APP, particularmente mutaciones en la posición 717 y posiciones 670 y 671 llamadas las mutaciones Hardy y Swedish respectivamente (véase Hardy, TINS, supra). Otros marcadores de riesgo son mutaciones en los genes de presenilina, PS1 y PS2, y ApoE4, historia familiar de AD, hipercolesterolemia o aterosclerosis. Los individuos que actualmente padecen enfermedad de Alzheimer se pueden reconocer a partir de demencia característica, así como la presencia de factores de riesgo descritos anteriormente. Además, un número de ensayos de diagnóstico están disponibles para la identificación de individuos que tienen AD. Éstos incluyen las mediciones de los niveles de CSF tau and A β 42. Los niveles elevados de tau y disminuidos de A β 42 significan la presencia de AD. Los individuos que padecen la enfermedad de Alzheimer también se pueden diagnosticar mediante los criterios MMSE o ADRDA como se describe en la sección de Ejemplos.

En pacientes asintomáticos, el tratamiento se puede comenzar a cualquier edad (por ejemplo, 10, 20, 30). Usualmente, sin embargo, it no es necesario comenzar el tratamiento hasta que un paciente alcance los 40, 50, 60 o 70. El tratamiento típicamente supone múltiples dosificaciones durante un período de tiempo. El tratamiento se puede controlar mediante el ensayo de anticuerpo, o respuestas de células T o células b activadas al agente terapéutico (por ejemplo, péptido A β) con el tiempo, junto con las líneas descritas en los Ejemplos I y II en el presente documento. Ni no hay respuesta, está indicada una dosificación de refuerzo. En el caso de pacientes con síndrome potencial de Down, el tratamiento puede comenzar antes del nacimiento mediante la administración del agente terapéutico a la madre o en breve tiempo después del nacimiento.

Otras formas de amiloidosis a menudo se van a diagnosticar, salvo que se sospeche una predilección particular para la enfermedad. Un síntoma fundamental es la presencia de enfermedad cardíaca o renal en un paciente de mediana edad a mayor también tiene signos de otra implicación de órganos. Las desviaciones de eje de baja tensión o extremo del electrocardiograma y y tejido ventricular engrosado puede ser indicativo de complicación cardíaca. Proteinuria es un síntoma de complicación renal. La complicación hepática también se puede sospechar, si se detecta hepatomegalia mediante examen físico del paciente. La neuropatía periférica es también un suceso común en ciertas formas de amiloidosis; también se puede encontrar neuropatía autonómica, caracterizada por hipotensión postural. Se debe sospechar amiloidosis en cualquier neuropatía progresiva o de origen indeterminado. Una diagnosis definitiva de la enfermedad se puede realizar usando procedimientos de biosia de tejidos, cuando el (los) órgano (s) afectado (s) está (n) disponibles. Para la amiloidosis sistémica, se puede usar una almohadilla de grasa aspirada o muestras de biopsia rectal. El material de biopsia se tiñe con rojo Congo, con muestras positivas que muestran birrefringencia de color verde manzana bajo microscopio de luz polarizada.

E. Regímenes de Tratamiento

En aplicaciones profilácticas, las composiciones farmacéuticas o medicamentos se administran a un paciente susceptible de, o de otra manera en riesgo de, una enfermedad particular en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo o retraso del comienzo de la enfermedad. En aplicaciones terapéuticas, composiciones o medicamentos

se administran a un paciente sospechoso de, o que ya padece tal enfermedad en una cantidad suficiente para curar, o al menos detiene parcialmente, los síntomas de la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para llevar a cabo esto se define como una dosis terapéuticamente o farmacéuticamente eficaz. En tanto los regímenes profilácticos como terapéuticos, los agentes se administran usualmente en varias dosificaciones hasta que se la logrado una respuesta inmune suficiente. Típicamente, la respuesta inmune se controla y se proporcionan dosis repetidas si la respuesta inmune comienza a disminuir.

Las dosis eficaces de las composiciones de la presente invención, para el tratamiento de las afecciones descritas anteriormente varían dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo medios de administración, sitio diana, estado fisiológico del paciente, si el paciente es humano o animal, otras medicaciones administradas, y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Usualmente, el paciente es un ser humano, pero en algunas enfermedades, tal como enfermedad de las vacas locas asociadas proteínas de príon, el paciente puede ser un mamífero no humano, tal como un bovino. Las dosificaciones de tratamiento necesitan estar valoradas para optimizar la seguridad y eficacia. La cantidad de inmunógeno depende de si el adyuvante también se administra, con dosificaciones mayores de las que se requieren en general en la ausencia de adyuvante. Dependiendo de la inmunogenicidad de la formulación particular, una cantidad de un inmunógeno para la administración puede variar entre 1 µg - 500 µg por paciente y más usualmente entre 5 - 500 µg por inyección para administración humana. De manera ocasional, se usa una dosis mayor de 0,5 - 5 mg por inyección. Típicamente al menos aproximadamente 10, 20, 50 ó 100 µg se usa para cada inyección humana. La programación de inyecciones puede variar de manera significativa desde un día, a una vez al año, a una vez cada diez años, se prefieren "refuerzos" sucesivos de algo de inmunógeno. En general, de acuerdo con las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, las dosificaciones eficaces se pueden controlar mediante la obtención de una muestra de fluido del paciente, en general una muestra de suero de sangre, y determinar el título de anticuerpo desarrollado contra el inmunógeno, usando procedimientos bien conocidos en la técnica y fácilmente adaptables al antígeno a medir. Idealmente, se recoge una muestra antes de la dosificación inicial; las muestras posteriores se recogen y se valoran después de cada inmunización. En general, una dosis o programa de dosificación que proporciona un título detectable al menos cuatro veces mayor que los niveles de control o "de fondo" a una dilución de suero de 1:100 es deseable, cuando el fondo se define con relación a un suero de control o con relación a un fondo de placa en los ensayos ELISA. Se prefieren títulos de al menos 1:1000 ó 1:5000 se prefieren de acuerdo con la presente invención.

Un día cualquiera que se proporciona una dosificación de inmunógeno, la dosificación usualmente es mayor que aproximadamente 1 µg/paciente y preferiblemente mayor que 10 µg/ paciente si el adyuvante también se administra, y al menos mayor que 10 µg/paciente y usualmente mayor que 100 µg/paciente en la ausencia de adyuvante. Las dosis para inmunógenos individuales, seleccionadas de acuerdo con la presente invención, se determinan de acuerdo con dosificación estándar y procedimientos de valoración, tomadas junto con las enseñanzas proporcionadas en el presente documento. Un régimen tipo consta de una inmunización seguido de inyecciones de recuerdo a intervalos de tiempo, tal como intervalos de 6 semanas. Otro régimen consta de una inmunización seguida de inyecciones de recuerdo 1, 2 y 12 meses más tarde. Otro régimen supone una inyección cada dos meses durante toda la vida. De manera alternativa, inyecciones de recuerdo pueden ser en base irregular como se indica mediante control de la respuesta inmune.

Para la inmunización pasiva con un anticuerpo, los intervalos de dosificación entre aproximadamente 0,0001 y 100 mg/kg, y más usualmente 0,01 a 5 mg/kg, del peso corporal del huésped. Por ejemplo las dosificaciones pueden ser 1 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal. Un régimen de tratamiento ejemplar supone la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. En algunos procedimientos, se administran dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión de manera simultánea, en cuyo caso la dosificación de cada anticuerpo administrada cae dentro de los intervalos indicados. El anticuerpo usualmente se administra en ocasiones múltiples. Los intervalos entre dosificaciones individuales pueden ser semanalmente, mensualmente o anualmente. Los intervalos también pueden ser irregulares como se indica mediante la medición de los niveles en sangre de anticuerpo a Aβ en el paciente. De manera alternativa, se puede administrar anticuerpo como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere la administración menos frecuente. La dosificación y frecuencia depende de la semivida del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos muestran la mayor semivida, seguido de los anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, y anticuerpos no humanos. La dosificación y frecuencia de administración puede variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En las aplicaciones profilácticas, se administra una dosis relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes durante un largo período de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento durante el resto de su vida. En aplicaciones terapéuticas, una dosis relativamente alta a intervalos relativamente cortos algunas veces se requieren hasta que la progresión de la enfermedad se reduce o termina, y preferiblemente hasta que el paciente muestra mejora parcial o completa de los síntomas de enfermedad. Después de esto, la patente se puede administrar un régimen profiláctico.

Las dosis para los ácidos nucleicos que codifican inmunógenos varían entre aproximadamente 10 ng y 1 g, 100 ng a 100 mg, 1 µg a 10 mg, o 30 - 300 µg de ADN por paciente. Las dosis para vectores virales infecciosos varían entre 10 - 100, o más, viriones por dosis.

- Los agentes para inducir una respuesta inmune se pueden administrar por vía parenteral, tópica, intravenosa, oral, subcutánea, intraperitoneal, intranasal o intramuscular para tratamiento profiláctico y / o terapéutico. Las vías típicas de administración de un agente inmunogénico son intramuscular (i.m.), intravenosa (i.v.) o subcutánea (s.c.), aunque otras vías pueden ser igualmente eficaces. La inyección intramuscular se realiza lo más típicamente en los músculos de brazo o pierna. En algunos procedimientos, los agentes se inyectan directamente en un tejido particular donde se han acumulado los depósitos, por ejemplo inyección intracraneal. Inyección intramuscular o infusión intravenosa se prefieren para la administración de anticuerpo. En algunos procedimientos, anticuerpos terapéuticos particulares se inyectan directamente en el cráneo. En algunos procedimientos, los anticuerpos se administran como una composición o dispositivo de liberación sostenida, tal como un dispositivo Medipad.
- Los agentes de la invención se pueden de manera opcional administrar en combinación con otros agentes que son al menos parcialmente eficaces en el tratamiento de enfermedad amiloidogénica. En el caso de enfermedad de Alzheimer y síndrome de Down, en los que se producen depósitos de amiloides en el cerebro, los agentes de la invención también se pueden administrar junto con otros agentes que incrementan el paso de los agentes de la invención a través de la barrera sangre - cerebro. Además, los cóctel terapéuticos que comprenden inmunógenos diseñados para provocar una respuesta inmune contra más de un componente amiloide también se contemplan en la presente invención, ya que son una combinación de un anticuerpo dirigido contra un componente de placa y un inmunógeno dirigido a un componente de placa diferente.
- Los agentes inmunogénicos de la invención, tales como péptidos, se administran en combinación con un adyuvante. Se puede usar una diversidad de adyuvantes en combinación con un péptido, tal como A β , para inducir una respuesta inmune. Los adyuvantes preferidos aumentan la respuesta intrínseca a un inmunógeno sin provocar cambios conformacionales en el inmunógeno que afecten a la forma cualitativa de la respuesta. Los adyuvantes preferidos incluyen hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, 3 De-O-acilado monofosforil lípido A (MPLTM) (véase el documento GB 2220211 (RIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton, Montana, ahora parte de Corixa). StimulonTM QS-21 es un glicósido de triterpeno o saponina aislados de la corteza del árbol Quillaja Saponaria Molina encontrado en América del Sur (véase Kensil et al., en Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (ediciones. Powell y Newman, Plenum Press, NY, 1995); la patente de Estados Unidos No. 5.057.540), (Aquila BioPharmaceuticals, Framingham, MA). Otros adyuvantes son emulsiones de aceite en agua (tal como escualeno o aceite de cacahuete), de manera opcional en combinación con los estimulantes inmunes, tal como monofosforil lípido A (véase Stoute et al., N. Engl. J Med. 336, 86 - 91 (1997)). Otro adyuvante es CpG (documento WO 98/40100). De manera alternativa, A β se puede acoplar a un adyuvante. Sin embargo, tal acoplamiento no debe cambiar sustancialmente la conformación de A β de manera que afecte la naturaleza de la respuesta inmune a él. Los adyuvantes se pueden administrar como un componente de una composición terapéutica con un agente activo o se puede administrar de manera separada, antes, de manera simultánea con, o después de la administración del agente terapéutico.
- Una clase preferida de adyuvantes es sales de aluminio (alum), tal como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio. Tales adyuvantes se pueden usar con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como MPL o 3-DMP, QS-21, aminoácidos poliméricos o monoméricos tales como ácido poliglutámico o polilisina. Otra clase de adyuvantes es formulaciones de emulsión de aceite en agua. Tales adyuvantes se pueden usar con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como péptidos de muramilo (*por ejemplo*, N- acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MOP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'dipalmitoil-sn-glicero-3- hidroxifosforiloxi)-atilamina (MTP-PE), N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Al-D-isoglu-L-Ala- dipalmitoxi propilamida (DTP-DPP) teramidaTM, u otros componentes de la pared celular bacteriana. Las emulsiones de aceite en agua incluyen (a) MF59 (documento WO 90/14837), que contiene 5% de escualeno, 0,5% de Tween 80, y 0.5% de Span 85 (de manera opcional que contiene varias cantidades de MTP-PE) formulados en partículas submicrónicas usando un microfluidificador tal como as Model 110Y microfluidificador (Microfluidics, Newton MA), (b) SAF, que contiene 10% de escualeno, 0,4% de Tween 80, 5% de polímero L121 bloqueado por plurónico , y thr-MDP, o bien microfluidificado en una a emulsión submicrónica o agitada en un aparato Vortex generan una emulsión de tamaño de partícula mayor, y (c) sistema adyuvante RibiTM (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) que contiene 2% de escualeno, 0,2% de Tween 80, y uno o más componentes de las pared de la célula bacteriana del grupo que consta de monofosforil lípido A, dimicolato de trehalosa (TDM), y esqueleto de la pared celular (CWS), preferiblemente MPL + CWS (DetoxTM). Otra clase de adyuvantes preferidos es adyuvantes de saponina, tal como StimulonTM (QS-21; Aquila, Framingham, MA) o las partículas generadas a partir de ellos tales como ISCOM (incomplejos inmunoestimulantes) e ISCOMATRIX. Otros adyuvantes incluyen adyuvante de Freund (IFA) incompleto, citoquinas, tales como interleuquinas (IL-1, IL-2, e IL-12), colonia del factor estimulante de macrófagos (M-CSF), y factor de necrosis tumoral (TNF). Tales adyuvantes están en general disponibles de fuentes comerciales.
- El inmunógeno y adyuvante se pueden envasar y suministrar en el mismo vial o se pueden envasar en viales separados y mezclarse antes de uso. El inmunógeno y adyuvante se envasan típicamente con una etiqueta que indica la aplicación terapéutica indicada. Si el inmunógeno y adyuvante se envasan de manera separada, el envase típicamente incluye instrucciones para mezclar antes de uso. La elección de un adyuvante y / o vehículo depende de tales factores como estabilidad de la formulación que contiene el adyuvante, la vía de administración, el programa de dosificación, y la

eficiencia del adyuvante para las especies que están vacunadas. En seres humanos, un adyuvante farmacéuticamente aceptable preferido es uno que se ha aprobado para administración humana por los cuerpos reguladores pertinentes. Los ejemplos de tales adyuvantes preferidos para seres humanos incluyen alumbre, MPL y QS- 21. De manera opcional, dos o más adyuvantes diferentes se pueden usar de manera simultánea. Las combinaciones preferidas incluyen alumbre con MPL, alumbre con QS-21, MPL con QS-21, y alumbre, QS-21 y MPL conjuntamente. También, se puede usar adyuvante de Freund incompleto (Chang et al., *Advanced Drug Delivery Reviews* 32, 173-186 (1998)), de manera opcional en combinación cualesquiera de alumbre, QS-21, y MPL y todas sus combinaciones.

Los agentes de la invención a menudo se administran en forma de composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto terapéutico activo y una diversidad otros componentes farmacéuticamente aceptables. Véase Remington's *Pharmaceutical Science* (19ª ed., 1995). La forma preferida depende de del modo de administración pretendido y aplicación terapéutica. Las composiciones también pueden incluir, dependiendo de la formulación deseada, vehículos farmacéuticamente aceptables, no tóxicos o diluyentes, que se definen como vehículos usados comúnmente para composiciones farmacéuticas para la administración animal o humana. El diluyente se selecciona de manera que no afecte a la actividad biológica de la combinación. Los ejemplos de tales diluyentes son agua destilada, solución salina tamponada con fosfato fisiológica, soluciones de Ringer, solución de dextrosa, y solución de Hank. Además, la composición farmacéutica o formulación también puede incluir otros vehículos, adyuvantes, o estabilizantes no tóxicos, no terapéuticos, no inmunogénicos y similares.

Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente tales como proteínas, polisacáridos tales como quitosán, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos y copolímeros (tales como sefarsa funcionalizada por látex, agarosa, celulosa, y similares), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, y agregados de lípidos (tales como gotitas de aceite o liposomas). De manera adicional, estos vehículos pueden funcionar como agentes inmunoestimulantes (es decir, adyuvantes).

Para la administración parenteral, agentes de la invención se pueden administrar dosificaciones inyectables de una solución o suspensión de sustancia en un diluyente fisiológicamente aceptable con un vehículo farmacéutico que puede ser un líquido estéril tal como agua, aceites, solución salina, glicerol, o etanol. De manera adicional, también pueden estar presentes en las composiciones sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, tensioactivos, sustancias de tamponación de pH y similares. Otros componentes de composiciones farmacéuticas son los de origen de petróleo, animal, vegetal, o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja, y aceite mineral. En general, glicoles tales como propileno glicol o polietileno glicol son vehículos líquidos preferidos, particularmente para soluciones inyectables. Los anticuerpos se pueden administrar en la forma de una inyección de liberación prolongada o preparación de implante que se puede formular de tal manera que permita la liberación sostenida del ingrediente activo. Una composición ejemplar comprende anticuerpo monoclonal a 5 mg/ml, formulado en tampón acuoso consistente en 50 mM de L-histidina, 150 mM de NaCl, ajustado hasta pH 6,0 con HCl.

Típicamente, las composiciones se preparan como inyectables, bien como soluciones o suspensiones líquidas formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de inyección también se pueden preparar. La preparación también se puede emulsionar o encapsular en liposomas o micropartículas tales como polilactida, poliglicolida, o copolímero para un efecto adyuvante potenciado, como se ha descrito anteriormente (véase Langer, *Science* 249, 1527 (1990) y Hanes, *Advanced Drug Delivery Reviews* 28, 97 - 119 (1997)). Los agentes de esta invención se pueden administrar en la forma de una inyección de liberación prolongada o preparación de implante que se puede formular de tal manera que permita una liberación sostenida o por pulsos del ingrediente activo.

Las formulaciones adicionales adecuadas para otros modos of administración incluyen formulaciones oral, intranasal, y pulmonar, supositorios, y aplicaciones transdérmicas.

Para supositorios, los ligandos y vehículos incluyen, por ejemplo, poliaquilen glicoles o triglicéridos; tales supositorios se pueden formar a partir de mezclas que contienen el ingrediente activo en el intervalo de 0,5% a 10%, preferiblemente 1% - 2%. Las formulaciones orales incluyen excipientes, tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, y carbonato de magnesio. Estas composiciones tienen la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y contienen 10% - 95% de ingrediente activo, preferiblemente 25% - 70%.

La aplicación tópica puede dar como resultado distribución transdérmica o intradérmica. La administración tópica se puede facilitar mediante la co-administración del agente con toxina de cólera o derivados destoxificados o sus subunidades u otras toxinas bacterianas similares (véase Glenn et al., *Nature* 391, 851 (1998)). La co-administración se puede lograr mediante el uso de componentes como una mezcla o como moléculas ligadas obtenidas mediante reticulación química o expresión como una proteína de fusión.

De manera alternativa, la distribución transdérmica se puede lograr usando un parche cutáneo o usando transferosomas (Paul et al., 55 *Eur. J. Immunol.* 25, 3521 - 24 (1995); Cevc et al., *Biochem. Biophys. Acta* 1368, 201 - 15 (1998)).

F. Procedimientos de Diagnóstico

La invención proporciona procedimientos de detección de una respuesta inmune contra péptido Aβ en un paciente que padece o es susceptible de enfermedad de Alzheimer de acuerdo con reivindicación 10. Los procedimientos son particularmente útiles para controlar un curso de tratamiento que se administra a un paciente. Los procedimientos se pueden usar para controlar tanto tratamiento terapéutico en pacientes sintomáticos como tratamiento profiláctico en pacientes asintomáticos. Los procedimientos son útiles para controlar tanto la inmunización activa (por ejemplo, anticuerpo producido en respuesta a administración de inmunógeno) como inmunización pasiva (por ejemplo, midiendo el nivel de anticuerpo administrado).

1. Inmunización activa

Algunos procedimientos suponen la determinación de un valor inicial de una respuesta inmune en un paciente antes de administrar una dosificación de agente, y comparar esto con un valor para la respuesta inmune después de tratamiento. Un incremento significativo (es decir, mayor que el margen típico de error experimental en mediciones repetidas de la misma muestra, expresado como una desviación estándar de la media de tales mediciones) en valor de respuesta inmune señala resultado de tratamiento positivo (es decir, que la administración del agente ha logrado o aumentado una respuesta inmune). Si el valor para la respuesta inmune no cambia, o disminuye de manera significativa, se indica un resultado de tratamiento negativo. En general, pacientes que están sometidos a un curso inicial de tratamiento con un agente inmunogénico se espera que muestren un incremento en la respuesta inmune con dosificaciones sucesivas, que alcanza eventualmente una meseta. La administración de agente es en general continuada mientras que la respuesta inmune está aumentando. La consecución de la meseta es un indicador de que el tratamiento administrado se puede discontinuar o reducir en la dosificación o frecuencia.

En otros procedimientos, un valor control (es decir, una media y una desviación estándar) de respuesta inmune se determina para una población control. Típicamente los individuos en la población control no han recibido tratamiento previo. Los valores medidos de respuesta inmune en un paciente después de administrar un agente terapéutico después se comparan con el valor control. Un incremento significativo con relación al valor control (por ejemplo, mayor que una desviación estándar de la media) señala un resultado de tratamiento positivo. Una falta de incremento significativo o una disminución señala un resultado de tratamiento negativo. La administración de agente es en general continuada mientras que la respuesta inmune está aumentando con relación al valor control. Como antes, la consecución de una meseta con relación a los valores control es un indicador de que la administración de tratamiento se puede discontinuar o reducir en dosificación o frecuencia.

En otros procedimientos, un valor control de respuesta inmune (*por ejemplo*, una media y desviación estándar) se determina a partir de una población control de individuos que están sometidos a tratamiento con un agente terapéutico y cuyas respuestas inmunes han alcanzado una meseta en respuesta a tratamiento. Los valores medidos de respuesta inmune en un paciente se comparan con el valor control. Si el nivel medido en un paciente no es significativamente diferente (*por ejemplo*, más de una desviación estándar) del valor control, el tratamiento se puede discontinuar. Si el nivel en un paciente está significativamente por debajo del valor control, la administración de agente continuada está justificada. Si el nivel en el paciente persiste por debajo del valor control, entonces un cambio en el régimen del tratamiento, *por ejemplo*, uso de un adyuvante diferente puede estar indicado.

En otros procedimientos, un paciente que actualmente no está recibiendo tratamiento pero que ha estado sometido a un curso previo de tratamiento se controla para respuesta inmune con el fin de determinar si se requiere una continuación de tratamiento. El valor medido de respuesta inmune en el paciente se puede comparar con un valor de respuesta inmune previamente logrado en el paciente después de un curso previo de tratamiento. Una disminución significativa con relación a la medición previa (es decir, mayor que un margen típico de error en mediciones repetidas de la misma muestra) es una indicación de que el tratamiento se puede continuar. De manera alternativa, el valor medido en un paciente se puede comparar con un valor control (media más desviación estándar) determinada en una población de pacientes después de someterse a un curso de tratamiento. De manera alternativa, el valor medido en un paciente se puede comparar con un valor control en poblaciones de pacientes tratados profilácticamente que permanecen sin síntomas de enfermedad, o poblaciones de pacientes tratados terapéuticamente que muestran mejora en las características de enfermedad. En todos estos casos, una disminución significativa con relación al nivel control (es decir, más de una desviación estándar) es un indicador de que el tratamiento se debe continuar en un paciente.

La muestra de tejido para análisis es típicamente sangre, plasma, suero, mucosa o fluido cerebroespinal del paciente. La muestra se analiza para determinar la indicación de una respuesta inmune para el componente amiloide de interés, tal como cualquier forma de péptido Aβ. La respuesta inmune se puede determinar a partir de la presencia de, *por ejemplo*, anticuerpos o células T que específicamente se unen al componente de interés, tal como péptido Aβ. Procedimientos ELISA de detección de anticuerpos específicos para Aβ se describen en la sección de Ejemplos y se pueden aplicar a otros antígenos de péptido. Procedimientos de detección de células T reactivas se conocen bien en la técnica.

2. Inmunización pasiva

En general, los procedimientos para controlar la inmunización pasiva son similares a aquellos para controlar la inmunización activa descritos anteriormente. Sin embargo, el perfil de anticuerpo después de la inmunización pasiva típicamente muestra un máximo inmediato en la concentración de anticuerpo después de una disminución exponencial. Sin una dosificación adicional, la disminución se acerca a los niveles de pretratamiento dentro de un período de días a meses dependiendo de la semivida de anticuerpo administrado. Por ejemplo la semivida de algunos anticuerpos humanos es del orden de 20 días.

En algunos procedimientos, una medición inicial de anticuerpo a A β en el paciente se realiza antes de la administración, se realiza una segunda medición tan pronto como se determine el nivel de anticuerpo máximo, y se realizan una o más mediciones adicionales a intervalos para controlar la disminución de los niveles de anticuerpo. Cuando el nivel de anticuerpo ha disminuido hasta un valor inicial o un porcentaje predeterminado del valor inicial menor del máximo (*por ejemplo*, 50%, 25% o 10%), la administración de una dosificación adicional de anticuerpo se administra. En algunos procedimientos, los niveles máximos o medidos posteriormente menores del fondo se comparan con los niveles de referencia determinados anteriormente para constituir un tratamiento profiláctico o terapéutico beneficioso en otros pacientes. Si el nivel de anticuerpo medido es significativamente menor que un nivel de referencia (*por ejemplo*, menor que la media menos una desviación estándar del valor de referencia en la población de pacientes que se benefician del tratamiento) administración de una dosificación adicional de anticuerpo está indicada.

3. Kits de diagnóstico

Kits de diagnóstico se describen para realizar los procedimientos de diagnóstico descritos anteriormente. Típicamente, tales kits contienen un agente que específicamente se une a anticuerpos a un componente de placa amiloide, tal como A β , o reacciona con células T específicas para el componente. El kit también puede incluir una etiqueta. Para la detección de anticuerpos a A β , la etiqueta está típicamente en la forma de anticuerpos anti-idiotípicos marcados. Para la detección de anticuerpos, el agente se puede suministrar unido previamente a una fase sólida, tal como a los pocillos de un disco de microvaloración. Para la detección de células T reactivas, la etiqueta se puede suministrar como 3H-timidina para medir una respuesta proliferativa. Kits también típicamente direcciones que proporcionan etiquetado para uso del kit. El etiquetado también puede incluir un diagrama u otro régimen de correspondencia que correlaciona los niveles de la etiqueta medida con los niveles de anticuerpos a A β o células T reactivas con A β . El término etiquetado se refiere a cualquier material escrito o registrado que se une a, o de otra manera acompaña un a kit en cualquier momento durante su fabricación, transporte, venta o uso. Por ejemplo, el término etiquetado abarca panfletos de publicidad folletos, materiales de envase, instrucciones, casetes de audio o video, discos de ordenador, así como impresos directamente sobre los kits.

EJEMPLOS

1. Eficiencia profiláctica de A β contra enfermedad de alzheimer (Ad)

Estos ejemplos describen la administración de péptido A β ₄₂ a ratones transgénicos que sobreexpresan APP con una mutación en la posición 717 (APP_{717V→F}) que los predispone para desarrollar neuropatología de tipo Alzheimer. Producción y características de estos ratones (ratones PDAPP) se describe en Games et al., Nature, *supra*. Estos animales, en su forma heterocigótica, comienzan a depositar A β a los seis meses de edad antes. A los quince meses de edad muestran niveles de deposición de A β equivalente a los observados en la enfermedad de Alzheimer. Los ratones PDAPP se inyectaron con A β ₄₂ agregado (A β ₄₂ agregado) o solución salina tamponada con fosfato. A β ₄₂ agregado se eligió debido a su capacidad para inducir anticuerpos a epítopes múltiples de A β .

A. Procedimientos

1. Fuente de ratones

Treinta ratones hembra heterogénicos PDAPP se dividieron al azar en los siguientes grupos: 10 ratones para inyección con A β ₄₂ agregado (uno murió en el tránsito), 5 ratones a inyectar con PBS/adjuvante o PBS, y 10 controles no inyectados. Cinco ratones se inyectaron con péptidos derivados de la secuencia de Proteína Amiloide de Suero (SAP).

2. Preparación de Inmunógenos

Preparación de A β ₄₂ agregado: dos miligramos de A β ₄₂ (US Peptides Inc, lote K-42-12) se disolvieron en 0,9 ml de agua y se completó hasta 1 ml mediante la adición de 0,1 ml de 10 x PBS. Esto se agitó en un aparato Vortex y se dejó incubar durante toda una noche a 37° C, en dichas condiciones el péptido agregado. Todo el A β no usado se almacenó en forma de un polvo liofilizado seco a -20° C hasta la siguiente inyección.

Se debe indicar que cuando se usan tales péptidos comercialmente disponible, los pesos secos pueden incluir pesos de sal; los pesos reseñados en todos los Ejemplos en el presente documento, salvo que se indique de otra manera,

incluyen pesos de sal. Las masas exactas de péptido se pueden determinar usando ensayos convencionales de la preparación, tales como determinación de nitrógeno, junto con la composición conocida.

3. Preparación de Inyecciones

5 Para cada inyección, 100 µg de Aβ₄₂ agregado en PBS por ratón se emulsionó 1:1 con Adyuvante de Freund Completo (CFA) en un volumen final de 400 µl de emulsión para la primera inmunización, seguido de un refuerzo de la misma cantidad de inmunógeno en Adyuvante de Freund Incompleto (IFA) a las 2 semanas. Dos dosis adicionales en IFA se proporcionaron a intervalos mensuales. Las inmunizaciones posteriores se realizaron a intervalos mensuales en 500 µl de PBS. Las inyecciones se administraron por vía intraperitoneal (i.p.).

10 Las inyecciones de PBS siguieron el mismo programa y los ratones se inyectaron con una mezcla 1:1 mix de PBS/Adyuvante a 400 µl por ratón, o 500 µl de PBS por ratón. Inyecciones SAP del mismo modo siguieron el mismo programa usando una dosis de 100 µg por inyección.

4. Valoración de extracciones de sangre de ratón, preparación de tejidos e inmunohistoquímica

Los procedimientos anteriores se describen abajo en Materiales y Procedimientos Generales.

B. Resultados

15 Ratones PDAPP se inyectaron o bien con Aβ₄₂ agregado (Aβ₄₂ agregado), péptidos SAP, o solución salina tamponada con fosfato. Un grupo de ratones PDAPP también se dejaron sin inyectar, controles positivos. Los títulos de los ratones a Aβ₄₂ agregado se controlaron cada mes desde el cuarto refuerzo hasta que los ratones tenían un año de edad. Se sacrificaron los ratones a los 13 meses. En todos los momentos examinados, ocho de los nueve ratones de Aβ₄₂ agregado desarrollaron un alto título de anticuerpo, que se mantuvo alto a lo largo de las series de inyecciones (títulos mayores que 1/10000). El noveno ratón tenía un título bajo, pero medible de aproximadamente 1/1000 (FIG. 1, Tabla 3).
20 Los ratones inyectados con SAPP tenían títulos de 1:1.000 to 1:30.000 para este inmunógeno excediendo solamente un único ratón 1:10,0000.

Tabla 3A

Títulos al 50% de D. O máxima									
Ratones inyectados con Aβ ₄₂ agregado									
Edad de PDAPP (meses)	Nº 100	Nº 101	Nº 102	Nº 103	Nº 104	Nº 105	Nº 106	Nº 107	Nº 108
4	70000	150000	15000	120000	1000	15000	50000	60000	100000
6	15000	65000	30000	55000	300	15000	15000	50000	60000
8	20000	55000	50000	50000	400	15000	18000	50000	60000
10	40000	20000	60000	50000	900	15000	50000	20000	40000
12	25000	30000	60000	40000	2700	20000	70000	25000	20000

Tabla 3B

Títulos al 50% de D. O máxima					
Ratones inyectados con PBS sobre ambos inmunógenos a 1/100					
Edad de PDAPP (meses)	Nº 113	Nº 114	Nº 115	Nº 116	Nº 117
6	< 4xbkg	< 4xbkg	< 4xbkg	< 4xbkg	< 4xbkg
10	5 x bkg	< 4xbkg	< 4xbkg	< 4xbkg	< 4xbkg
12	< 4xbkg	< 4xbkg	< 4xbkg	< 4xbkg	< 4xbkg

Sueros de ratones tratados con PBS se valoraron contra A β ₄₂ agregado a los seis, diez y doce meses. A una dilución 1/100 los ratones PBS, se valoraron contra A β ₄₂ agregado, solamente excedían 4 veces el fondo en un punto de información, de otra manera, son menores que 4 veces el fondo en todos los puntos (Tabla 3). La respuesta específica de SAP era insignificante en estos momentos con todas las titulaciones menores que 300.

Siete de los nueve ratones en el grupo tratado con A β 1-42 agregado no tenía amiloide detectable en sus cerebros. Por el contrario, tejido de cerebro de los ratones en los grupos SAP y PBS contenían numerosos depósitos de amiloides en el hipocampo, así como en las cortezas frontal y cingulada. El patrón de deposición era similar al de los controles no tratados, con implicación de las características de subregiones vulnerables, tal como la capa molecular externa del giro dentado del hipocampo. Un ratón del grupo inyectado con A β 1-42- tenía una carga amiloide reducida en gran medida, confinada en el hipocampo. Una placa aislada se identificó en otro ratón tratado con A β 1-42-.

El análisis de imagen cuantitativo de la carga amiloide en el hipocampo verificó la reducción notable lograda en los animales tratados con A β 42(AN1792) (FIG. 2). Los valores medianos de la carga amiloide para el grupo PBS (2,22%), y para el grupo control no tratado (2,65%) eran significativamente mayores que para los inmunizados con AN1792 (0,00%, p = 0,0005). Por el contrario, el valor mediano para el grupo inmunizado con péptidos SAP (SAPP) era 5,74%. Tejido de cerebro de los ratones de control no tratados contenían numerosos depósitos de amiloides A β visualizados con anticuerpo monoclonal (mAb) específico de A β 3D6 en el hipocampo, así como en la corteza retrosplenica. Un patrón similar de deposición de amiloide observado en los ratones inmunizados con SAPP o PBS (FIG. 2). Además, en estos tres últimos grupos existía una implicación característica de subregiones vulnerables del cerebro clásicamente observados en AD, tal como la capa molecular externa del giro dentado del hipocampo en los tres grupos.

Los cerebros que no contenían depósitos A β estaban también desprovistos de placas neuríticas que típicamente se visualizan en ratones PDAPP con el anticuerpo de APP humano 8E5. Todos los cerebros de los grupos restantes (ratones inyectados con SAP, PBS y no inyectados) tenían numerosas placas neuríticas típicas de ratones PDAPP no tratados. Un pequeño número de placas neuríticas estaban presentes en un ratón tratado con AN1792, y un único racimo de neuritas distróficas se encontró en un segundo ratón tratado con AN1792. El análisis de imagen del hipocampo, y se muestra en la FIG. 3, demostró la eliminación virtual de neuritas distróficas en ratones tratados con AN1792 (mediana 0,00%) comparado con los receptores de PBS (mediana 0,28%, P = 0,0005).

La astrocitosis característica de inflamación asociada a placa también estaba ausente en los cerebros del grupo inyectado con A β 1-42. Los cerebros de los ratones en los otros grupos contenían astrocitos abundantes y positivos para GFAP en racimos típicos de gliosis asociada a placa de A β . Un subconjunto de los portaobjetos que reaccionan con GFAP se tiñeron en contraste con Tioflavina S para localizar depósitos A β . Los astrositos positivos de GFAP estaban asociadas a placas de A β placas en los controles SAP, PBS y no tratados. No se encontró ninguna asociación en los ratones tratados con A β 1-42 negativos a las placas, mientras que una gliosis asociada a placa –se identificó en un ratón tratado con AN1792.

Los análisis de imagen, mostrados en la FIG. 4 para la corteza retrosplenica, verificaron que la reducción en la astrocitosis era significativa con un valor mediano de 1,56% para los tratados con AN1792 contra los valores medianos mayores que 6% para los grupos inmunizados con péptidos SAP, PBS o no tratados (p = 0,0017).

Evidencia de un subconjunto de los ratones inyectados con A β 1-42 y PBS indicaban que la inmunorreactividad de MHC II asociada a placa estaba ausente en los ratones inyectados con A β 1-42, consistente con la pérdida de una respuesta inflamatoria relacionada con A β .

Secciones de los cerebros de ratón también se hicieron reaccionar con un mAb específico con un anticuerpo monoclonal específico para MAC-1, una proteína de superficie de la célula. MAC-1 (CD11b) es un miembro de la

familia de integrina y existe como un heterodímero con CD 18. El complejo CD11b/CD18 está presente en monocitos, macrófagos, neutrófilos y células destructoras naturales (Mak y Simard). El tipo de célula reactiva a MAC-1 residente en el cerebro es probable que sea microglia basándose en una morfología fenotípica similar en secciones inmunorreactivas a MAC-1. El etiquetado de MAC-1 asociado a placa era menor en los cerebros de ratones tratados con AN 1792 comparado con el grupo control PBS, un hallazgo consistente con la carencia de respuesta inflamatoria inducida por A β .

C Conclusión

La carencia de placas A β y cambios neuronales y glióticos en los cerebros de los ratones inyectados con A β 1-42 indican que ningún o extremadamente poco amiloide se depositó en sus cerebros, y las consecuencias patológicas, tales como gliosis y patología neurítica, estaban ausentes. Los ratones PDAPP tratados con A β 1-42 muestran esencialmente la misma carencia de patología que los ratones no transgénicos control. Por lo tanto, las inyecciones de A β 1-42 son altamente eficaces en la prevención de la deposición o eliminación de A β humano de tejido de cerebro, y eliminación de posteriores cambios degenerativos neuronales e inflamatorios. De este modo, administración de péptido A β puede tener tanto beneficio preventivo como terapéutico en la prevención de AD.

II. Estudio de respuesta de dosis

Grupos de ratones hembra de cinco semanas de edad, Swiss Webster (N = 6 por grupo) se inmunizaron con 300, 100, 33, 11, 3, 7, 1,2, 0,4, o 0,13 μ g de A β formulado en CFAI FA administrado por vía intraperitoneal. Se proporcionaron tres dosis a intervalos de dos veces a la semana seguido de una cuarta dosis un mes más tarde. La primera dosis se emulsionó con CFA y las dosis remanentes se emulsionaron con IFA. Se tomaron muestras de sangre de animales 4 - 7 días después de cada inmunización partiendo de la segunda dosis para medición de títulos de anticuerpo. Animales en un subconjunto de los tres grupos, los inmunizados con 11, 33, o 300 μ g de antígeno, de manera adicional se sacaron muestras de sangre aproximadamente a intervalos mensuales durante cuatro meses después de la cuarta inmunización para controlar la disminución de la respuesta de anticuerpo a través de un intervalo de dos dosis de formulaciones inmunogénicas. Estos animales recibieron una quinta inmunización final a los siete meses después del inicio del estudio. Se sacrificaron una semana más tarde para medir las respuestas de anticuerpo a AN1792 y para realizar análisis toxicológicos.

Se observó una disminución en la respuesta de dosis de 300 a 3,7 μ g sin respuesta a las dos dosis más bajas. La media de los títulos de anticuerpo son aproximadamente 1:1000 después de 3 dosis y aproximadamente 1:10.000 después de 4 dosis de 11 - 300 μ g de antígeno (véase FIG. 5).

Los títulos de anticuerpo se alcanzaron de manera notable excepto para el grupo de la dosis inferior después de la tercera inmunización con incrementos de GMT que varían desde 5 - a 25 veces. Las respuestas bajas de anticuerpo eran después detectables para incluso los receptores de 0,4 μ g. Los grupos 1,2 y 3,7 μ g tenían títulos comparables con GMT de aproximadamente 1000 y las cuatro dosis más altas agrupadas conjuntamente con GMT de aproximadamente 25.000, con la excepción del grupo de dosis de 33 μ g con un menor valor de GMT de 3000. Después de la cuarta inmunización, el incremento del título era más modesto para la mayoría de los grupos. Existía una respuesta de dosis evidente en los grupos de dosis inferiores de antígeno de 0,14 μ g a 11 μ g que varían entre anticuerpo no detectable para los receptores de 0,14 μ g a un GMT de 36.000 para receptores de 11 μ g. Del mismo modo, los títulos para los cuatro grupos de dosis más altas de 11 a 300 μ g se agruparon conjuntamente. De este modo después de dos inmunizaciones, el título de anticuerpo era dependiente de la dosis de antígeno a lo largo del amplio intervalo de 0,4 a 300 μ g. A la tercera inmunización, los títulos de las cuatro dosis más altas eran comparables y permanecían en una meseta después una inmunización adicional.

Un mes después de la cuarta inmunización, los títulos eran 2- a 3-veces más altos en el grupo de 300 μ g que los medidos en la sangre extraída cinco días después de la inmunización (FIG. 6). Esta observación sugiere que el máximo de la respuesta de anticuerpo anamnésica ocurrida 5 días después de la inmunización. Un incremento más modesto (50%) se observó en este tiempo en el grupo de 33 μ g. En el grupo de dosis de 300 μ g a los dos meses después de la última dosis, los valores de GMT disminuyeron de una manera considerable en aproximadamente 70%. Después de otro mes, la disminución era considerablemente menor a 45% (100 μ g) y aproximadamente 14% para las dosis de 33 y 11 μ g. De este modo, la tasa de disminución de los títulos de anticuerpo circulante después del cese de la inmunización parece ser bifásica con una disminución considerable el primer mes después de la respuesta máxima seguido de una tasa más modesta de disminución después de esto.

Los títulos de anticuerpo y la cinética de la respuesta de estos ratones Swiss Webster eran similares a los de los ratones transgénicos PDAPP transgénicos heterocigóticos de una manera paralela. Las dosificaciones eficaces para inducir una respuesta inmune en seres humanos son típicamente similares a las dosificaciones eficaces en ratones.

III. Selección para determinar la eficacia terapéutica contra AD establecida

Este ensayo se diseñó para ensayar los agentes inmunogénicos para determinar la actividad en la detención de o inversión de características neuropatológicas de AD en animales de edad avanzada. Inmunizaciones con A β de 42 aminoácidos de longitud (AN1792) se comenzaron en el mismo momento que las placas amiloides ya estaban presentes en los cerebros de los ratones PDAPP.

5 Durante el curso de tiempo usado en este estudio, ratones PDAPP no tratados desarrollan numerosos cambios neurodegenerativos que se parecen a los encontrados en AD (*Games et al., supra* y Johnson-Wood et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 1550 - 1555 (1997)). La deposición de A β en las placas amiloides está asociada a una respuesta neuronal degenerativa que consta de elementos aberrantes axonales y dendríticos, llamadas neuritas distróficas. Depósitos de amiloides que están rodeados y contienen neuritas distróficas se llaman placas neuríticas. Tanto en el
10 ratón AD como en PDAPP, las neuritas distróficas tienen una estructura globular distintiva, son inmunoreactivos con un panel de anticuerpos que reconocen APP y los componentes citoesqueléticos, y muestran cambios degenerativos subcelular es complejos a nivel ultraestructural. Estas características permiten mediciones selectivas y reproducibles relevantes de enfermedad de la formación de la placa neurítica en los cerebros PDAPP. El componente neuronal distrófico de placas neuríticas de PDAPP se visualiza fácilmente con un anticuerpo específico para APP humano
15 (anticuerpo monoclonal 8E5), y se puede medir fácilmente mediante análisis de imagen asistida por ordenador. Por lo tanto, además de medir los efectos de AN 1792 en la formación de placa amiloide, los inventores controlaron los efectos de este tratamiento en el desarrollo de la distrofia neurítica.

Astrocitos y microglia no son células neuronales que responden a reflejan el grado de lesión neuronal. Los astrositos positivos de GFAP y microglia positiva a MHC II se observan de manera común en AD, y su activación se incrementa
20 con la gravedad de la enfermedad. Por lo tanto, los inventores también controlaron el desarrollo de astrocitosis reactiva y microgliosis en los ratones tratados con AN1792.

A. Materiales y Procedimientos

Cuarenta y ocho ratones hembra herocigotos PDAPP, de 11 a 11,5 meses de edad, obtenidos de Charles River, se dividieron al azar en dos grupos: 24 ratones se inmunizaron con 100 μ g de AN1792 y 24 ratones se inmunizaron con
25 PBS, cada uno se combinó con adyuvante de Freund. Los grupos AN1792 y PBS de la misma manera se dividieron cuando alcanzaron ~15 meses de edad. A los 15 meses de edad aproximadamente la mitad de cada grupo de los animales tratados con AN1792 y PBS se sacrificaron (n = 10 y 9, respectivamente), el resto continuó recibiendo inmunizaciones hasta la terminación a los ~18 meses (n = 9 y 12, respectivamente). Un total de 8 animales (5 AN1792, 3 PBS) murieron durante el estudio. Además de los animales inmunizados, ratones PDAPP de un año de edad (n = 10),
30 15 meses de edad (n = 10) y 18 meses de edad (n = 10) no tratados se incluyeron para comparación en los análisis ELISA para medir los niveles de A β y APP en el cerebro; los animales de un año también se incluyeron en los análisis inmunohistoquímicos.

La metodología era como en el Ejemplo 1, salvo que se indique de otra manera. El lote de Péptidos de Estados Unidos 12 y lote de péptidos de California ME0339 de AN1792 se usaron para preparar el antígeno para las seis
35 inmunizaciones administradas antes de los 15 meses. Los lotes de péptidos de California ME0339 y ME0439 se usaron para las tres inmunizaciones posteriores administradas entre 15 y 18 meses.

Para inmunizaciones, 100 μ g de AN1792 en 200 μ l de PBS o PBS sola 1:1 (vol:vol) con Adyuvante de Freund Completo (CFA) o Adyuvante de Freund Incompleto Incompleto (IFA) o PBS en un volumen final de 400 μ l. La primera
40 inmunización se administró con CFA como adyuvante, las cuatro dosis siguientes se proporcionaron con IFA y las cuatro dosis finales con PBS sola sin adyuvante añadido. Un total de nueve inmunizaciones se proporcionaron durante el período de siete meses en un programa de dos semanas para las tres primeras dosis seguido de un intervalo de cuatro semanas para las inyecciones restantes. El grupo de tratamiento de cuatro meses, sacrificado a 15 meses de edad, recibió solamente las 6 primeras inmunizaciones.

B. Resultados

1. Efectos de A β 42 (AN1792) Tratamiento sobre la carga de Amiloide

Los resultados de tratamiento de AN1792 sobre la carga amiloide cortical determinado por análisis de imagen cuantitativo se muestran en la FIG. 7. El valor mediano de carga amiloide cortical era 0,28% en un grupo de ratones PDAPP no tratados de 12 meses de edad, un valor representativo de la carga de placa en ratones al comienzo del estudio. A los 18 meses, la carga amiloide se incrementó por encima de 17 veces hasta 4,87% en los ratones tratados
50 con PBS, mientras que los ratones tratados con AN1792 tenían una carga amiloide reducida en gran medida de solamente 0,01%, notablemente menor que los no tratados de 12 meses y los grupos tratados con PBS tanto de 15 como 18 meses. La carga amiloide se redujo de manera significativamente en los receptores de AN1792 a tanto 15 (96% de reducción; p = 0,003) como 18 (>99% de reducción; p = 0,0002) meses.

Típicamente, deposición amiloide cortical en ratones PDAPP comienza en las cortezas frontal y retrosplénica (RSC) y progresa en una dirección ventral-lateral que implica las cortezas temporal y entorrinal (EC). Se encontró poco o nada de amiloide en la EC de los ratones de meses de edad, la edad aproximada a la que AN1792 se administró primero. Después de 4 meses de tratamiento con AN1792, deposición amiloide se disminuyó en gran medida en la RSC, y la implicación progresiva de EC se eliminó completamente por tratamiento con AN1792. La última observación mostró que AN1792 detuvo completamente la progresión de amiloide que invade normalmente las cortezas temporal y ventral, así como detiene o posiblemente invierte la deposición en la RSC.

Los efectos profundos de tratamiento con AN1792 sobre el desarrollo de carga amiloide cortical en los ratones PDAPP se demuestran además en el grupo de 18 meses, que se ha tratado durante siete meses. Una clara ausencia completa de amiloide cortical se encontró en los ratones tratados con AN1792, con una carencia total de placas difusas, así como una reducción de los depósitos compactos.

2. Cambios celulares y morfológicos asociados a tratamiento con A β 42 (AN1792)

Una población de células positivas para A β se encontró en las regiones de cerebro que típicamente contienen depósitos de amiloide. De manera notable, en varios cerebros de receptores de AN1792, se encontraron muy pocas o ningunas placas amiloides corticales extracelulares. La mayoría de la inmunoreactividad de A β parecían estar contenidas dentro de las células con gran soma lobular o agrupado. Fenotípicamente, estas células se parecían a microglia o monocitos activados. eran inmunoreactivas con los anticuerpos que reconocen ligandos expresados por monocitos activados y microglia (MHC II y CD11b) y estaban de manera ocasional asociadas al lumen de la pared de los vasos sanguíneos. La comparación de secciones próximas o adyacentes marcadas con A β y anticuerpos específicos de MHC II revelaron que los patrones similares de estas células se reconocieron por ambas clases de anticuerpos. El examen detallado de los cerebros tratados con AN1792 revelaron que las células positivas de MHC II estaban limitadas a la vecindad del amiloide limitado remanente en estos animales. En las condiciones de fijación empleadas, las células no eran inmunoreactivas con los anticuerpos que reconocen los ligandos de las células T (CD3, CD3e) o células B (CD45RA, CD45RB) o antígeno común a leucocitos (CD45), pero eran reactivos con un anticuerpo que reconoce leukosialina (CD43) que reacciona de manera cruzada con monocitos. No se encontraron tales células en ninguno de los ratones tratados con PBS.

Los ratones PDAPP invariablemente desarrollan una pesada deposición amiloide en la capa molecular externa del giro dentado del hipocampo. La deposición forma una raya distinta dentro de la ruta perforante, una subregión que clásicamente contiene placas amiloides en AD. La aparición característica de estos depósitos en los ratones tratados con PBS se parecían a las caracterizadas previamente en los ratones PDAPP no tratados. La deposición amiloide consistía de placas tanto difusas como compactadas en una banda continua. Por el contrario, en un número de cerebros de ratones tratados con AN1792 este patrón se alteró drásticamente. La deposición amiloide del hipocampo no contenía más amiloide difuso, y el patrón dividido en bandas estaba completamente alterado. En cambio, un número de estructuras punteadas inusuales estaban presentes que son reactivas con anticuerpos anti-A β , varias de las cuales parecían que contenían amiloide.

Las células positivas para MHC II se observaron frecuentemente en la proximidad de amiloide extracelular en animales tratados con AN1792. El patrón de asociación de células positivas para A β con amiloide era muy similar en varios cerebros de Ratones tratados con AN1792. La distribución de estas células monocíticas estaba restringida a la proximidad del amiloide depositado estaba completamente ausente de las otras regiones del cerebro desprovistas de placas A β .

El análisis de imagen cuantitativo de las secciones marcadas con MHC II y MAC I revelaron una tendencia hacia un incremento de inmunoreactividad en la RSC e hipocampo de ratones tratados con AN1792 comparados con el grupo PBS que alcanzó significación con la medida de reactividad de MAC 1 en el hipocampo.

Estos resultados son indicativos de eliminación activa, mediada por células de amiloide en regiones de cerebro que llevan placa.

3. Efectos de AN1792 sobre los niveles de A β : Determinaciones ELISA

(a) Niveles corticales

En ratones PDAPP no tratados, el nivel mediano del A β total en la corteza a los 12 meses era 1.600 ng/g, que se incrementó hasta 8.700 ng/g en 15 meses (Tabla 4). A los 18 meses el valor era 22.000 ng/g, un incremento de por encima de 10 veces durante el tiempo del curso del experimento. Los animales tratados con PBS tenían 8.600 ng/g de A β total a los 15 meses que se incrementó hasta 19.000 ng/g a los 18 meses. Por el contrario, animales tratados con AN1792 tenían 81% menos de A β total a los 15 meses (1.600 ng/g) que el grupo inmunizado con PBS. Significativamente menor ($p = 0,0001$) de A β total (5.200 ng/g) se encontró a los 18 meses cuando los grupos AN1792 y PBS se compararon (Tabla 4), que representa una reducción de 72% en el A β que de otra manera estaría presente.

Similares resultados se obtuvieron cuando se compararon los niveles corticales de A β 42, a saber el grupo tratado con AN1792 contenía mucho menos A β 42, pero en este caso las diferencias entre los grupos AN1792 y PBS eran significativas a tanto 15 meses ($p = 0,04$) como 18 meses ($p = 0,0001$, Tabla 4).

Tabla 4: Niveles medianos de A β (ng/g) en la Corteza

	NO TRATADO			PBS			AN1792		
Edad	Total	A β 42	(n)	Total	A β 42	(n)	Total	A β 42	(n)
12	1.600	1.300	(10)						
15	8.700	8.300	(10)	8.600	7.200	(9)	1.600	1.300*	(10)
18	22.200	18.500	(10)	19.000	15.900	(12)	5.200**	4.000**	(9)
* $p = 0,0412$									
** $p = 0,0001$									

5

(b) Niveles en hipocampo

En ratones PDAPP no tratados, los niveles medianos en el hipocampo A β total a los doce meses de edad eran 15.000 ng/g que se incrementó hasta 51.000 ng/g a los 15 meses y después a 81.000 ng/g a los 18 meses (Tabla 5). De manera similar, ratones inmunizados con PBS mostraron valores de 40.000 ng/g y 65.000 ng/g a los 15 meses y 18 meses, respectivamente. Los animales inmunizados con AN1792 mostraron menos A β total, específicamente 25.000 ng/g y 51.000 ng/g en los momentos de 15 meses y 18 meses respectivos. El valor del grupo tratado con AN1792 de 18 meses era significativamente inferior que los del grupo tratado con PBS ($p = 0,0105$; Tabla 5). La medición de A β 42 proporcionó el mismo patrón de resultados, a saber los niveles del grupo tratado con AN1792 eran significativamente menores que el grupo PBS (39.000 ng/g contra. 57.000 ng/g, respectivamente; $p = 0,002$) en la evaluación de 18 meses (Tabla 3).

10

15

Tabla 5: Niveles medianos de A β (ng/g) en el Hipocampo

	NO TRATADO			PBS			AN1792		
Edad	Total	A β 42	(n)	Total	A β 42	(n)	Total	A β 42	(n)
12	15.500	11.100	(10)						
15	51.500	44.400	(10)	40.100	35.70	(9)	24.50	22.100	(10)
18	80.000	64.200	(10)	65.400	57.10	(12)	50.90	38.900**	(9)
* $p = 0,0105$									
** $p = 0,0022$									

(e) Niveles en el cerebelo

En los ratones PDAPP no tratados de 12 meses, el nivel mediano cerebelar de A β total era 15 ng/g (Tabla 6). A los 15 meses, esta mediana se incrementó hasta 28 ng/g y a los 18 meses habían aumentado hasta 35 ng/g. Los animales tratados con PBS mostraron valores medianos de A β total de 21 ng/g a los 15 meses y 43 ng/g a los 18 meses. Los animales tratados con AN1792 se encontró que tenían 22 ng/g de A β total a los 15 meses y significativamente menor ($p = 0,002$) de A β total a los 18 meses (25 ng/g) que el grupo PBS correspondiente (Tabla 6).

20

Tabla 6: Niveles medianos de A β (ng/g) en Cerebelo

	NO TRATADO	PBS	AN1792
Edad	A β Total (n)	A β Total (n)	A β Total (n)
12	15,6 (10)		
15	27,7 (10)	20,8 (9)	21,7 (10)
18	35,0 (10)	43,1 (12)	24,8* (9)
*p = 0,0018			

4. Efectos de tratamiento con AN1792 en los niveles de APP

La molécula APP- α y de APP de longitud completa ambas contienen parte de la secuencia A β y de esta manera pueden estar potencialmente impactadas por la generación de una respuesta inmune dirigida por AN1792. En los estudios hasta la fecha, un ligero incremento en los niveles de APP se ha notado ya que la neuropatología se incrementa en los ratones PDAPP. En la corteza, los niveles de APP- α /FL (longitud completa) o APP- α estaban esencialmente inalterados por tratamiento con la excepción que APP- α se redujo en 19% a los 18 meses en el grupo tratado con AN1792 contra el grupo tratado con PBS. Los valores de APP tratados con AN1792 de 18 meses no eran significativamente diferentes de los valores de los grupos no tratados de 12 meses y 15 meses y PBS de 15 meses. En todos los casos los valores de APP permanecían dentro de los intervalos que normalmente se encuentran en los ratones PDAPP.

5. Efectos de tratamiento con AN1792 sobre la Patología Neurodegenerativa y Gliótica

La carga de placa neurítica redujo significativamente la corteza frontal de los ratones tratados con AN1792 comparada con el grupo PBS a tanto 15 (84%; p = 0,03) como 18 (55%; p = 0,01) meses de edad (FIG. 8). El valor mediano de la carga de placa neurítica aumentó desde 0,32% a 0,49% en el grupo PBS entre 15 y 18 meses de edad. Esto contrastó con el desarrollo reducido en gran medida de placas neuríticas en el grupo AN1792, con valores medianos de carga de placa neurítica de 0,05% y 0,22%, en los grupos de 15 y 18 meses, respectivamente.

Las inmunizaciones con AN1792 parecían ser bien toleradas y astrocitosis reactiva también se redujo de manera significativa en la RSC de ratones tratados con AN1792 cuando se compara con el grupo PBS a tanto 15 (56%; p = 0,011) como 18 (39%; p = 0,028) meses de edad (FIG. 9). Los valores medianos del porcentaje de astrocitosis en el grupo PBS aumentó entre 15 y 18 meses desde 4,26% a 5,21%. El tratamiento con AN1792 suprimió el desarrollo de astrocitosis en ambos momentos hasta 1,89% y 3,2%, respectivamente. Esto sugiere que el neuropilo no estaba dañado por el proceso de eliminación.

6. Respuestas de Anticuerpo

Como se describe anteriormente, ratones PDAPP de once meses de edad, heterocigóticos (N = 24) recibió una serie de 5 inmunizaciones de 100 μ g de AN1792 emulsionado con adyuvante de Freund y se administró por vía intraperitoneal a las semanas 0, 2, 4, 8, y 12, y una sexta inmunización con PBS sola (sin adyuvante de Freund) a la semana 16. Como control negativo, un conjunto paralelo de 24 ratones transgénicos de edad parecida recibieron inmunizaciones de PBS emulsionada con los mismos adyuvantes y se administró en el mismo programa. Se tomaron muestras de sangre de los animales entre tres y siete días después de cada inmunización a partir de la segunda dosis. Las respuestas de anticuerpo a AN1792 se midieron mediante ELISA. Los títulos de media geométrica (GMT) para los animales que se inmunizaron con AN1792 eran aproximadamente 1.900, 7.600, y 45.000 después de la segunda, tercera y última (sexta) dosis respectivamente. No se midió anticuerpo específico de A β –en los animales control después de la sexta inmunización.

Aproximadamente la mitad de los animales se trataron durante tres meses adicionales, que recibieron inmunizaciones a aproximadamente 20, 24 y 27 semanas. Cada una de estas dosis se administraron en vehículo de PBS sola sin adyuvante de Freund. Los títulos medios de anticuerpo permanecieron inalterados durante este periodo de tiempo. De hecho, los títulos de anticuerpo parecían permanecer estables desde la cuarta a la octava toma de sangre hasta la octava toma de sangre que corresponde a un período que cubre la quinta a la novena inyecciones.

Para determinar si los anticuerpos específicos de A β inducidos por inmunización que se detectaron en los sueros de ratones tratados con AN1792 también se asociaron con el amiloide del cerebro depositado, un subconjunto de secciones de los ratones tratados con AN1792 y PBS –se hicieron reaccionar con un anticuerpo específico de IgG de ratón. Al contrario que el grupo PBS, placas A β en cerebros tratados con AN1792 se revistieron con IgG endógena.

Esta diferencia entre los dos grupos se observó tanto en los grupos de 15 como 18 meses. Particularmente sorprendente era la carencia de marcaje en el grupo PBS, a pesar de la presencia de una carga pesada de amiloide en estos ratones. Estos resultados muestran que la inmunización con una proteína de A β sintética genera anticuerpos que reconocen y se unen in vivo al A β en las placas amiloides.

5 **7. Respuestas inmunes mediadas celulares**

Se extrajeron bazo de nueve ratones PDAPP inmunizados con AN1792 y 12 inmunizados con PBS de 18 meses de edad 7 días después de la novena inmunización. Se aislaron esplenocitos y se cultivaron durante 72 h en la presencia de A β 40, A β 42, o A β 40-1 (proteína de orden inverso). El mitógeno Con A sirvió como un control positivo. Las respuestas óptimas se obtuvieron con >1,7 μ M de proteína. Las células de los nueve animales tratados con AN1792 proliferaron en respuesta a proteína o bien A β 1-40 o A β 1-42, con niveles iguales de incorporación para ambas proteínas (FIG. 10, Panel Superior). No había ninguna respuesta para la proteína inversa A β 40-1. Las células de los animales control no respondieron a ninguna de las proteínas A β (FIG. 10, Panel Inferior).

C. Conclusión

Los resultados de este estudio muestran que la inmunización con AN1792 de ratones PDAPP que poseían depósitos de amiloides existentes reduce y previene la deposición amiloide progresiva y retrasa los cambios neuropatológicos consiguientes en el cerebro de los ratones PDAPP de edad avanzada. Las inmunizaciones con AN1792 esencialmente detuvieron el desarrollo amiloide en las estructuras que normalmente sucumbirían a amiloidosis. De este modo, administración de péptido A β tienen un beneficio terapéutico en el tratamiento de AD.

IV. Selección de fragmentos A β

100 ratones PDAPP de 9 - 11 meses de edad se inmunizaron con 9 regiones diferentes de APP y A β para determinar qué epítopes conducen a la respuesta eficaz. Los 9 inmunógenos diferentes y un control se inyectan por vía i.p, como se describe anteriormente. Los inmunógenos incluyen cuatro conjugados de péptido A β humanos 1-12, 13-28, 32-42, 1-5, todos acoplados a IgG de anti-ratón de oveja mediante un enlace de cistina; un polipéptido APP de aminoácidos 592 - 695, agregaron A β 1-40 humano, y A β 25-35 agregado humano, y agregado A β 42 de ratón. El agregado A β 42 y PBS se usaron como controles positivo y negativo, respectivamente. Diez ratones se usaron por grupo de tratamiento. Se controlaron los títulos como antes y se sacrificaron los ratones al final de los 4 meses de inyecciones. Se determine después de la muerte, se determinaron la histoquímica, niveles de A β , y análisis de toxicología.

A. Materiales y Procedimientos

1. Preparación de Inmunógenos

Preparación de péptidos A β acoplados: cuatro conjugados de péptido A β humano (restos de aminoácido 1-5, 1-12, 13-28, y 33-42, cada uno conjugado a IgG de anti-ratón de oveja) se prepararon por acoplamiento mediante una cisteína artificial añadida al péptido A β usando el reactivo de reticulación sulfo-EMCS. Los derivados del péptido A β se sintetizaron con las siguientes secuencias de aminoácido finales. En cada caso, la localización del resto de cisteína insertado se indica por subrayado. El derivado de péptido A β 13-28 también tenía dos restos de glicina añadidos antes a la cisteína carboxilo terminal como se indica.

Péptido A β 1-12 NH₂-DAEFRHDSGYEVC-COOH (SEQ ID NO: 30)

Péptido A β 1-5 NH₂-DAEFR.C-COOH (SEQ ID NO: 31)

Péptido A β 33-42 NH₂-C-ácido amino-heptanoico -GLMVGGVVIA-COOH (SEQ ID NO: 32)

40 Péptido A β 13-28 Ac-NH-HHQLVFFAEDVGSNKGGC-COOH (SEQ ID NO: 33)

Para preparar la reacción de acoplamiento, diez mg de IgG de anti-ratón de oveja (Laboratorios Jackson ImmunoResearch) se dializaron durante toda una noche contra 10 mM de tampón borato sódico, pH 8,5. El anticuerpo dializado después se concentró hasta un volumen de 2 ml usando un tubo de centrifuga de Amicon Centriprep. Diez mg de sulfo-EMCS

45 [N (γ -maleimidocaproyloxi) succinimida] (Molecular Sciences Co.) se disolvió en un ml de agua desionizada. Un exceso molar de 40 veces de sulfo-EMCS se añadió gota a gota con agitación a la IgG de anti-ratón de oveja y después la solución se agitó durante diez minutos adicionales. La IgG de anti-ratón de oveja activada se purificó y se cambió el tampón mediante pase sobre columna de filtración en gel de 10 ml (Columna Pierce Presto, obtenida de Pierce Chemicals) equilibrada con 0,1 M de NaP04, 5 mM de EDTA, pH 6,5. Anticuerpo que contiene fracciones, identificados por absorbancia a 280 nm, se combinaron y se diluyeron hasta una concentración de aproximadamente 1 mg/ml,

usando 1,4 mg por D O como el coeficiente de extinción. Un exceso molar de 40 veces de péptido A β se disolvió en 20 ml de 10 mM de NaP04, pH 8,0, con la excepción del péptido A β 33-42 para el que 10 mg se disolvieron primero en 0,5 ml de DMSO y después se diluyó hasta 20 ml con el tampón 10mM de NaP04. Las soluciones de péptido se añadieron cada una a 10 ml de IgG de anti-ratón de oveja activada y se agitaron a temperatura ambiente durante 4 hr. Los conjugados resultantes se concentraron hasta un volumen final de menos de 10 ml usando un tubo Amicon Centriprep y después se dializó contra PBS para cambiar el tampón y eliminar el péptido libre. Los conjugados se pasaron a través de filtros de tamaño de poro 0,22 μ m para esterilización y después se tomaron alícuotas en fracciones de 1 mg y se almacenaron congeladas a -20°C. Las concentraciones se determinaron usando el ensayo de proteína BCA (Pierce Chemicals) con IgG de caballo para la curva estándar. La conjugación se documentó por el incremento de peso molecular de los péptidos conjugados con relación a la de la IgG de anti-ratón de oveja activada. El conjugado de anti-ratón de oveja de A β 1-5 era una combinación de dos combinaciones el resto grande una sola preparación.

2. Preparación de péptidos A β agregados

Los péptidos 1-40 humano (AN1528; California Peptides Inc., Lote ME0541), 1-42 humano (AN1792; California Peptides Inc., Lotes ME0339 y ME0439), 25-35 humano, y 1-42 de roedor (California Péptidos Inc., Lot ME0218) se solubilizaron de forma recién preparada para la preparación de cada conjunto de inyecciones a partir de polvos liofilizados que se habían almacenado desecado a -20°C. Para este propósito, dos mg de péptido se añadieron a 0,9 ml de agua desionizada y la mezcla se agitó con aparato Vortex para generar una solución o suspensión relativamente uniforme. De los cuatro, AN1528 era el único péptido soluble en esta etapa. Una alícuota de 100 μ l de 10X PBS (1X PBS: 0,15 M de NaCl, 0,01 M de fosfato de sodio, pH 7,5) se añadió en un momento en el que AN1528 comenzó a precipitar. La suspensión se agitó en aparato Vortex otra vez y se incubó durante toda una noche a 37°C para uso al siguiente día.

Preparación de la proteína pBx6: un plásmido de expresión que codifica pBx6, una proteína de fusión que consta de la secuencia guía N-terminal de la polimerasa de 100 aminoácidos del bacteriófago MS-2 seguido de los aminoácidos 592 - 695 de APP (β APP) se construyó como se describe por Oltersdorf et al., J. Biol. Chem. 265, 4492 - 4497 (1990). El plásmido se transfectó en E. coli y la proteína se expresó después de inducción del promotor. Las bacterias lisadas en 8M de urea y pBx6 se purificaron parcialmente mediante SDS PAGE preparativa. Las fracciones que contenían pBx6 se identificaron mediante transferencia de Western usando un anticuerpo policlonal anti-pBx6 de conejo, se combinaron, se concentraron usando un tubo Amicon Centriprep y se dializaron contra PBS. La pureza de la preparación, estimada por SDS PAGE teñida por Azul Coomassie, era aproximadamente 5 a 10%.

B. Resultados y Discusión

1. Diseño de estudio

Cien ratones PDAPP machos y hembras transgénicos heterocigóticos, de nueve a diez meses de edad se obtuvieron de Charles River Laboratory y Taconic Laboratory. Los ratones se clasificaron en diez grupos para inmunizarse con regiones diferentes A β o APP combinadas con adyuvante de Freund. Los animales se distribuyeron para que coincidiera el género, edad, origen y fuente de los animales entre los grupos tan próximos como fueran posible. Los inmunógenos incluían cuatro péptidos A β derivados de la secuencia humana, 1 - 5, 1 - 12, 13 - 28, y 33 - 42, cada conjugado a IgG de anti-ratón de oveja; cuatro péptidos A β agregados, 1-40 (AN1528) humano, 1-42 (AN1792) humano, 25-35 humano, y 1 - 42 de roedor; y un polipéptido de fusión, denominados pBx6, que contienen restos de aminoácido 592 - 695 de APP. Un décimo grupo se inmunizó con PBS combinado con adyuvante como un control.

Para cada inmunización, se emulsionaron 100 μ g de cada péptido A β en 200 μ l de PBS o 200 μ g del derivado de APP pBx6 en el mismo volumen de PBS o PBS sola 1:1 (vol:vol) con Adyuvante de Freund Completo (CFA) en un volumen final de 400 μ l para la primera inmunización, seguido de un refuerzo de la misma cantidad de inmunógeno en Adyuvante de Freund Incompleto (IFA) durante las posteriores cuatro dosis y con PBS para la dosis final. Inmunizaciones se administraron por vía intraperitoneal en un programa bisemanal para las tres primeras dosis, después un programa mensual de ahí en adelante. Se extrajo sangre de animales cuatro a siete días después de cada inmunización comenzando después de la segunda dosis para la medición de los títulos de anticuerpo. Los animales se sacrificaron aproximadamente una semana después de la dosis final.

2. Niveles de A β y APP en el Cerebro

Después de aproximadamente cuatro meses de inmunización con los diversos péptidos A β o el derivado de APP, se retiraron los cerebros de los animales infiltrados con solución salina. Se prepare un hemisferio para análisis inmunohistoquímico y el segundo se usó para la cuantificación de los niveles de A β y APP. Para medir las concentraciones de las diversas formas de péptido beta amiloide y proteína precursora de amiloide, se diseccionó el hemisferio y los homogenatos de las regiones de hipocampo, cortical, y del cerebelo se prepararon en 5 M de guanidina. Éstas se diluyeron y el nivel de amiloide o APP se cuantificó por comparación con una serie de diluciones de patrones de péptido A β o APP de concentraciones conocidas en un formato ELISA.

La concentración mediana de A β total para el grupo control inmunizado con PBS era 5,8 veces mayor en el hipocampo que en la corteza (mediana de 24.318 ng/g de tejido de hipocampo comparado con 4.221 ng/g para la corteza). El nivel mediano en el cerebelo del grupo control (23,4 ng/g de tejido) era aproximadamente 1.000 veces menor que en el hipocampo. Estos niveles son similares a los que se han reseñado previamente para ratones PDAPP heterocigóticos transgénicos de esta edad (Johnson-Woods et al., 1997, supra).

Para la corteza, un subconjunto de grupos de tratamiento tenían niveles medianos de A β total y A β 1-42 que diferían de manera significativa de los del grupo control ($p < 0,05$), los animales que reciben AN1792, A β 1-42 de roedor o el conjugado de péptido A β 1-5 como se muestra en la FIG. 11. Los valores medianos de A β total se redujeron en 75%, 79% y 61 %, respectivamente, comparado con el control para estos grupos de tratamiento. No existían correlaciones discernibles entre los títulos de anticuerpo específicos de A β y los niveles de A β en la región cortical del cerebro para cualquiera de los grupos.

En el hipocampo, la reducción mediana de A β total asociada a tratamiento con AN1792 (46%, $p = 0,0543$) no era tan grande como la observada en la corteza (75%, $p = 0,0021$). Sin embargo, la magnitud de la reducción era mucho mayor en el hipocampo que en la corteza, una reducción neta de 11.186 ng/g de tejido en el hipocampo contra 3.171 ng/g de tejido en la corteza. Para los grupos de animales que reciben A β 1-42 o A β 1-5 de roedor, los niveles medianos de A β total se redujeron en un 36% y 26%, respectivamente. Sin embargo, dados los pequeños tamaños de los grupos y la alta variabilidad de los niveles de péptido amiloide entre un animal y otro animal dentro de ambos grupos, estas reducciones no eran significativas. Cuando se midieron los niveles de A β 1-42 en el hipocampo, ninguna de las reducciones inducidas por el tratamiento alcanzaron significación. De este modo, debido a la carga más pequeña de A β en la corteza, los cambios en esta región son un indicador más sensible de los efectos de tratamiento. Estos cambios en los niveles de A β medidos por ELISA en la corteza son similares, pero no idénticos, a los resultados de los análisis de inmunohistoquímica (véase más adelante).

A β total también se midió en el cerebelo una región típicamente y mínimamente afectada con patología de AD. Ninguna de las concentraciones de A β medianas de cualquiera de los grupos inmunizados con los diversos péptidos A β o el derivado de APP difería de las del grupo control en esta región del cerebro. Este resultado sugiere que los niveles no patológicos de A β no están afectados por el tratamiento.

La concentración de APP se determina también por ELISA en la corteza y cerebelo de ratones tratados y control. Se utilizaron dos ensayos diferentes APP. El primero, denominado APP- α /FL, reconoce tanto APP-alfa (α , la forma secretada de APP que se ha escindido dentro de la secuencia de A β), como las formas de longitud completa (FL) de APP, mientras el segundo reconoce solamente APP- α . Al contrario que la disminución asociada a tratamiento de A β en un subconjunto de grupos de tratamiento, los niveles de APP estaban inalterados en todos los animales comparados con el control. Estos resultados indican que las inmunizaciones con péptidos A β no están sin APP; por el contrario el efecto del tratamiento es específico para A β .

En resumen, los niveles de A β total y A β 1-42 estaban significativamente reducidos en la corteza por el tratamiento con AN 1792, A β 1-42 de roedor o conjugado A β 1-5. En el hipocampo, A β total estaba significativamente reducido solamente por el tratamiento AN1792. Ningún otro cambio asociado a tratamiento en los niveles de A β o APP en las regiones del hipocampo, cortical o cerebelar era significativo.

2. Análisis histoquímicos

Cerebros de un subconjunto de seis grupos se prepararon para análisis inmunohistoquímico, tres grupos inmunizados con los conjugados de péptido A β A β 1-5, A β 1-12, y A β 13-28; dos grupos inmunizados con los agregados de A β de longitud completa AN1792 y AN1528 y el grupo control tratado con PBS. Los resultados de análisis de imagen de la carga amiloide en las secciones de cerebro de estos grupos se muestran en la FIG. 12. No existían reducciones significativas de carga amiloide en las regiones corticales de tres de los grupos de tratamiento contra los animales control. La mayor reducción de carga amiloide se observó en el grupo que recibe AN1792 donde el valor medio se reduce en un 97% ($p = 0,001$). También se observaron reducciones significativas para los animales tratados con AN1528 (95%, $P = 0,005$) y el conjugado del péptido A β 1-5 (67%, $p = 0,02$).

Los resultados obtenidos por cuantificación de A β total o A β 1-42 por ELISA y carga amiloide por análisis de imagen difieren en algún grado. El tratamiento con AN1528 tenía un impacto significativo en el nivel de carga amiloide cortical cuando se mide por análisis de imagen cuantitativo pero no en la concentración de A β total en la misma región cuando se mide por ELISA. La diferencia entre estos dos resultados es probable que se deba a las especificidades de los ensayos. El análisis de imagen mide solamente A β insoluble agregado en placas. Por el contrario, el ELISA mide todas las formas de A β , tanto soluble como insoluble, monomérico y agregado. Ya que la patología de la enfermedad se cree que está asociada a la forma asociada a la placa insoluble de A β , la técnica de análisis de imagen puede tener más sensibilidad para revelar los efectos del tratamiento. Sin embargo ya que el ELISA es un ensayo más rápido y más fácil, es muy útil para propósitos de selección. Además puede revelar que la reducción asociada a tratamiento de A β es mayor para el asociado a la placa que A β total.

Para determinar si los anticuerpos específicos de A β inducidos por inmunización en los animales tratados reaccionaban con el amiloide del cerebro depositado, un subconjunto de las secciones de los animales tratados y los ratones control se hicieron reaccionar con un anticuerpo específico para IgG de ratón. Por el contrario para el grupo PBS, las placas que contienen A β se recubrieron con IgG endógena los animales inmunizados con los conjugados de péptido A β A β 1-5, A β 1-12, y A β 13-28; y los agregados de A β de longitud completa AN1792 y AN1528. Cerebros de animales inmunizados con los otros péptidos A β o el péptido APP pBx6 no se analizaron por este ensayo.

3. Medición de Títulos de Anticuerpo

Se extrajo sangre de los ratones cuatro a siete días después de cada inmunización partiendo después de la segunda inmunización, durante un total de cinco extracciones de sangre. Todos los títulos de cuerpo se midieron como anticuerpo de unión a A β 1-42 usando un ELISA sándwich con placas de pocillos múltiples de plástico recubiertos con A β 1-42. Como se muestra en la FIG. 13, los títulos de anticuerpo se indujeron después de la cuarta dosis para las cuatro formulaciones de inmunización que indujeron los títulos más altos de anticuerpos específicos de AN1792: AN1792 (GMT máximo: 94.647), AN1528 (GMT máximo: 88.231), conjugado A β 1-12 (GMT máximo: 47.216) y A β 1-42 de roedor (GMT máximo: 10.766). Títulos para estos grupos disminuyeron algo después de la quinta y sexta dosis. Para los cinco inmunógenos restantes, títulos máximos se alcanzaron para la quinta o la sexta dosis y éstos eran de mucha menor magnitud que los de los cuatro grupos de título más alto: A conjugado β 1-5 (GMT máximo: 2,356), pBx6 (GMT máximo: 1,986), conjugado A β 13-28 (GMT máximo: 1,183), conjugado A β 33-42 (GMT máximo: 658), A β 25-35 (GMT máximo: 125). Títulos de anticuerpo se midieron también contra los péptidos homólogos usando el mismo formato de ELISA sándwich para un subconjunto de los inmunógenos, los grupos inmunizados con A β 1-5, A β 13-28, A β 25-35, A β 33-42 o A β 1-42 de roedor. Estos títulos eran aproximadamente los mismos que los medidos contra A β 1-42 excepto para el inmunógeno de A β 1-42 de roedor en cuyo caso los títulos de anticuerpo contra el homologous inmunógeno homólogo eran aproximadamente dos veces más alto. La magnitud del título de anticuerpo específico de AN1792 de los animales individuales o los valores medios de los grupos de tratamiento no se correlacionan con la eficacia medida como la reducción de A β en la corteza.

4. Respuestas Linfoproliferativas

La linfoproliferación dependiente de A β se midió usando células de bazo recogidas aproximadamente una semana después de la inmunización final, sexta. Células recogidas recientemente, 10^5 por pocillo, se cultivaron durante 5 días en la presencia de A β 1-40 a una concentración de 5 μ M para estimulación. Células de un subconjunto de siete de los diez grupos también se cultivaron en la presencia del péptido inverso, A β 40-1. Como un control positivo, células adicionales se cultivaron con el mitógeno de células T, PHA, y, como control negativo, células se cultivaron sin péptido añadido.

Los linfocitos de una mayoría de los animales proliferaron en respuesta a PHA. No había respuestas significativas para el péptido inversos de A β 40-1. Células de animales inmunizados con los péptidos A β agregados mayores, AN1792, A β 1-42 de roedor y AN1528 proliferaron de manera robusta cuando se estimula con A β 1-40 con las cpm más alta en los receptores de AN1792. Un animal en cada uno de los grupos inmunizados con conjugado A β 1-12, conjugado A β 13-28 y A β 25-35 proliferaron en respuesta a A β 1-40. Los grupos remanente que recibían conjugado A β 1-5, conjugado A β 33-42 pBx6 o PBS to tenían animales con respuesta estimulada por A β . estos resultados se resumen en la en la Tabla 7 más adelante.

Tabla 7			
Inmunógeno	Conjugado	Aminoácidos A β	Respondedores
A β 1-5	Sí	5-mer	0/7
A β 1-12	Sí	12-mer	1/8
A β 13-28	Sí	16 -mer	1/9
A β 25-35		11-mer	1/9
A β 33-42	Sí	10-mer	0/10
A β 1-40		40-mer	5/8
A β 1-42		42-mer	9/9
rA β 1-42		42-mer	8/8
pBx6			0/8
PBS		0-mer	0/8

Estos resultados muestran que AN 1792 y AN 1528 estimulan fuertes respuestas de células T, lo más probable del

fenotipo CD4+. La ausencia de una respuesta de células T específica de A β en animales inmunizados con A β 1-5 no es sorprendente ya que los epítopes de péptido reconocidos por las células T CD4+ son usualmente aproximadamente de 15 aminoácidos de longitud, aunque péptidos más cortos pueden algunas veces funcionar con menos eficacia. De este modo la mayoría de epítopes de células T auxiliares para los cuatro péptidos conjugados es probable que residan en la pareja conjugada de IgG, no en la región A β . Esta hipótesis está apoyada por la muy baja incidencia de respuestas proliferativas para los animales en cada uno de estos grupos de tratamiento. Ya que el conjugado de A β 1-5 era eficaz a reducción significativa del nivel de A β en el cerebro, en la ausencia evidente de células T específicas de A β , la respuesta inmune del efector clave inducida por inmunización con este péptido parece ser anticuerpo.

La pérdida de células T y baja respuesta de anticuerpo del péptido de fusión pBx6, que abarcan aminoácidos 592 - 695 de APP que incluyen todos los restos de A β se puede deber a la escasa inmunogenicidad de esta preparación particular. La escasa inmunogenicidad del agregado A β 25-35 es probablemente debida a que el péptido es demasiado pequeño para contener un buen epítipo de células T que ayude a la inducción de una respuesta de anticuerpo. Se anticipa que la conjugación de este péptido a una proteína vehículo la haría más inmunogénica.

V. Preparación de Anticuerpos policlonales para Protección pasiva

125 ratones no transgénicos se inmunizaron con A β , más adyuvante, y se sacrificaron a 4 - 5 meses. Se recogió sangre de ratones inmunizados. IgG se separó de los otros componentes de sangre. Anticuerpo específico para el inmunógeno se puede purificar parcialmente mediante cromatografía de afinidad. Un promedio de aproximadamente 0,5 - 1 mg de anticuerpo específico de inmunógeno se obtiene por ratón, dando un total de 60 - 120 mg.

VI. Inmunización Pasiva con Anticuerpos para A β

Grupos de ratones PDAPP de 7 - 9 meses de edad cada uno se inyectaron con 0,5 mg en PBS de anti-A β policlonal o monoclonales anti-AB específicos como se muestra más adelante. Todas las preparaciones de anticuerpo se purificaron para que tuvieran bajos niveles de endotoxina. Monoclonales se pueden preparar contra un fragmento mediante inyección del fragmento o forma más larga de A β en un ratón, la preparación de hibridomas y selección de los hibridomas para un anticuerpo que específicamente se une a un fragmento deseado de A β sin unirse a otros fragmentos de A β que no se superponen.

Tabla 8

Anticuerpo	Epítipo
2H3	A β 1-12
10D5	A β 1-12
266	A β 13-28
21F12	A β 33-42
A β 42anti-humano policlonal de ratón	Anti- A β ₄₂ agregado

Se inyectaron los ratones i.p. según se necesite durante un período de 4 meses para mantener una concentración de anticuerpo circulante medida por título de ELISA mayor que 1/1000 definido por ELISA a A β 42 u otro inmunógeno. Se controlaron los títulos como antes y los ratones se sacrificaron al final de los 6 meses de inyecciones. Se describen la histoquímica, niveles de A β y toxicología después de la muerte. Diez ratones se usaron por grupo. Estudios adicionales de inmunización pasiva se describen en los Ejemplos XI y XII más adelante.

VII. Comparación de Diferentes Adyuvantes

Este ejemplo compara CFA, alumbre, una emulsión aceite en agua MPL para determinar la capacidad de estimular una respuesta inmune.

A. Materiales Procedimientos

1. Diseño del estudio

Cien cobayas hembra de seis semanas de edad de la raza Hartley, obtenidos de Laboratorios Elm Hill Breeding, Chelmsford, MA, se clasificaron en diez grupos para inmunizar con AN1792 o su derivado patmitoiledo combinado con diversos adyuvantes. Siete grupos recibieron inyecciones de AN1792 (33 μ g salvo que se especifique de otra manera) combinado con a) PBS, b) adyuvante de Freund, c) MPL, d) escualeno, e) MPL/ escualeno f) baja dosis de alumbre, o g) alta dosis de alumbre (300 μ g de AN1792). Dos grupos recibieron inyecciones de un derivado palmitoiledo de AN1792 (33 μ g) combinado con a) PBS o b) escualeno. Un décimo grupo, recibió PBS sola sin antígeno o adyuvante adicional.

Para el grupo que recibía adyuvante de Freund, la primera dosis se emulsionó con CFA y las cuatro dosis remanentes con IFA. El antígeno se administró a una dosis de 33 µg para todos los grupos excepto el grupo de alta dosis de alumbre, que recibió 300 µg de AN1792. Las inyecciones se administraron por vía intraperitoneal para CFA/IFA y por vía intramuscular en el cuádriceps de la pata trasera de manera alternativa sobre el lado derecho e izquierdo de todos los grupos. Las tres primeras dosis proporcionadas en un programa bisemanal seguido de dos dosis de un intervalo mensual). Se extrajo sangre a los siete días después de cada inmunización, partiendo después de la segunda dosis, para medición de títulos de anticuerpo.

2. Preparación de Inmunógenos

Dos mg de Aβ42 (California Péptido, Lote ME0339) se añadió a 0,9 ml of agua desionizada y la mezcla se agitó en aparato Vortex para generar una suspensión relativamente uniforme. Se añadió una alícuota de 100 µl de 10X PBS (1XPBS, 0,15 M de NaCl, 0,01 M de fosfato de sodio, pH 7,5). La suspensión se agitó en aparato Vortex de nuevo y se incubó durante toda una noche a 37°C para uso el siguiente día. El Aβ1-42 no usado se almacenó con desecador en forma de un polvo liofilizado - 20°C.

Un derivado palmitoilado de AN1792 se prepare mediante acoplamiento de anhídrido palmítico, se disolvió en dimetil formamida, al resto terminal amino de AN1792 antes de la retirada del péptido naciente de la resina mediante tratamiento con ácido fluorhídrico.

Para preparar la dosis de formulación inmunogénica con Adyuvante de Freund Completo (CFA) (grupo 2), 33 µg de AN1792 en 200 µl de PBS se emulsionó 1:1 (vol:vol) con CFA in a volumen final de 400 µl para la primera inmunización. Para las posteriores inmunizaciones, el antígeno se emulsionó de manera similar Adyuvante de Freund Incompleto (IFA).

Para preparar la dosis de formulación con MPL para los grupos 5 y 8, polvo liofilizado (Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MT) se añadió a 0,2% de trietilamina acuosa hasta una concentración final de 1 mg/ml y se agitó en aparato Vortex. La mezcla se calentó hasta 65 a 70°C durante 30 seg para crear una suspensión uniforme ligeramente opaca de micelas. La solución se prepare recientemente para cada conjunto inyecciones. Para cada inyección en el grupo 5, 33 µg de AN1792 en 16,5 µl de PBS, 50 µg de MPL (50 µl) y 162 µl de PBS se mezclaron en un tubo de borosilicato inmediatamente antes de uso.

Para preparar la dosis de formulación con la baja emulsión de aceite en agua, AN1792 en PBS se añadió a 5% de escualeno, 0,5% de Tween 80, 0,5% de Span 85 en PBS hasta alcanzar una única concentración de dosis final single de 33 µg de AN1792 en 250 µl (grupo 6). La mezcla se emulsionó pasando a través de un dispositivo portátil de dos cámaras 15 a 20 veces hasta que aparecieron gotitas de emulsión que eran aproximadamente igual en diámetro a una perla de látex de diámetro estándar 1,0 µm cuando se ve bajo un microscopio. La suspensión resultante era opalescente, de color blanco leche. Las emulsiones se prepararon recientemente para cada serie de inyecciones. Para el grupo 8, MPL en 0,2% de trietilamina se añadió a una concentración de 50 µg por dosis a la mezcla de escualeno y detergente para emulsificación como se ha indicado anteriormente. Para el derivado de palmitoil (grupo 7), 33 µg por dosis de palmitoil-NI-Aβ1-42 se añadió al escualeno y se l-Apt-az y se agitó en aparato Vortex. Tween 80 y Span 85 se añadieron después con agitación en aparato Vortex. Esta mezcla se añadió a PBS hasta alcanzar concentraciones finales de 5% de escualeno, 0,5% de Tween 80, 0,5% de Span 85 y la mezcla se emulsionó como se ha indicado anteriormente.

Para preparar la dosis de formulación con alumbre (grupos 9 y 10), AN1792 en PBS se añadió a Alhydrogel (gel de hidróxido de aluminio, Accurate, Westbury, NY) hasta alcanzar concentraciones de 33 µg (dosis inferior, grupo 9) o 300 µg (dosis alta, grupo 10) AN1792 por 5 mg de alumbre en un volumen de dosis final de 250 µl. La suspensión se agitó suavemente durante 4 hr a TA.

3. Medición de Títulos de Anticuerpo

Se tomaron muestras de sangre de cobayas seis a siete días después de la inmunización comenzando después de la segunda inmunización durante un total de cuatro tomas de sangre. Los títulos de anticuerpo contra Aβ42 se midieron por ELISA como se describe en Materiales and Procedimientos Generales.

4. Preparación de Tejidos

Después de aproximadamente 14 semanas, se sacrificaron todos los cobayas mediante administración de CO₂. Se recogió fluido cerebrospinal y se extrajeron los cerebros y las tres regiones de cerebro (hipocampo, corteza y cerebelo) se diseccionaron y se usaron para medir la concentración de proteína total de Aβ usando ELISA.

B. Resultados

1. Respuestas de Anticuerpo

Existía un amplio intervalo en la potencia de diversos adyuvantes cuando se mide como la respuesta de anticuerpo a AN1792 después de inmunización. Como se muestra en la FIG. 14, cuando se administra AN1792 en PBS, no se detectó ningún anticuerpo después de dos o tres inmunizaciones y se detectaron respuestas insignificantes después de la cuarta y quinta dosis con media geométrica de títulos (GMT) se solamente aproximadamente 45. La emulsión de aceite/agua indujo títulos modestos después de la tercera dosis (GMT 255) que se mantuvieron después de la cuarta dosis (GMT 301) y disminuyó con la dosis final (GMT 54). Existía una clara respuesta a dosis de antígeno para AN1792 unido a alumbre siendo 300 µg más inmunogénico en todos los puntos que 33 µg. En el máximo de la respuesta de anticuerpo, después de la cuarta inmunización, la diferencia entre las dos dosis era 43% con GMT de aproximadamente 1940 (33 µg) y 3400 (300 µg). La respuesta de anticuerpo a 33 µg de AN1792 más MPL era muy similar a la generada con casi diez veces más alta de dosis de antígeno (300 µg) unido a alumbre. La adición de MPL a una emulsión de aceite / agua disminuyó la potencia de la formulación con relación a la de MPL como el único adyuvante en como mucho 75%. Un derivado palmitoilado de AN1792 era completamente no inmunogénico cuando se administra en PBS y proporcionó títulos modestos cuando está presente en una emulsión de aceite / agua con GMT de 340 y 105 para la tercera y cuarta tomas de sangre. Los títulos de anticuerpo más altos se generaron con adyuvante de Freund con un máximo de GMT de aproximadamente 87.000, un valor casi 30 veces mayor que los GMT de las dos siguientes formulaciones más potentes, MPL y alta dosis de AN1792/alumbre.

Los adyuvantes más prometedores identificados en este estudio son MPL y alumbre. De estos dos, MPL parece preferible debido a que una dosis de antígeno 10 veces inferior se requirió para generar la misma respuesta de anticuerpo que la obtenida con alumbre. La respuesta se puede aumentar mediante incremento de dosis de antígeno y / o adyuvante y mediante optimización del programa de inmunización. La emulsión de aceite / agua era un adyuvante muy débil para AN1792 u añadiendo una emulsión de aceite / agua a adyuvante MPL disminuyó la actividad intrínseca de adyuvante de MPL solo.

2. Aβ Niveles en el Cerebro

A aproximadamente 14 semanas las cobayas se anestesiaron profundamente, se extrajo el fluido cefalorraquídeo (CSF) y los cerebros se escindieron de los animales en un subconjunto los grupos, los inmunizados con adyuvante de Freund (grupo 2), MPL (grupo 5), alumbre con una dosis alta, 300 µg, de AN1792 (grupo 10) y el grupo control inmunizado con PBS (grupo 3). Para medir el nivel de péptido Aβ, se diseccionó un hemisferio y los homogenatos de las regiones de hipocampo, cortical, y cerebelar se prepararon en 5 M de guanidina. Éstos se diluyeron y se cuantificaron mediante comparación a una serie de diluciones de proteína estándar de Aβ de concentraciones conocidas en un formato ELISA. Los niveles de proteína Aβ en el hipocampo, la corteza y el cerebelo eran muy similares para los cuatro grupos a pesar del amplio intervalo de respuestas de anticuerpo a Aβ inducido por estas formulaciones. Los niveles medios de Aβ de aproximadamente 25 ng/g de tejido se midieron en el hipocampo, 21 ng/g en la corteza, y 12 ng/g en el cerebelo. De este modo, la presencia de un alto título de anticuerpo circulante para Aβ durante casi tres meses en algunos de estos animales no alteró los niveles totales de Aβ en sus cerebros. Los niveles de Aβ en el CSF eran también completamente similares entre los grupos. La carencia de un gran efecto de inmunización con AN1792 sobre Aβ endógeno indica que la respuesta inmune se localiza sobre las formaciones patológicas de Aβ.

VIII. Respuesta inmune a Diferentes Adyuvantes en Ratones

Ratones hembras Swiss Webster de seis semanas de edad se usaron para este estudio con 10 - 13 animales por grupo. Las inmunizaciones se proporcionaron los días 0, 14, 28, 60, 90 y 20 se administraron por vía subcutánea en un volumen de dosis de 200 µl. PBS se usó como el tampón para todas las formulaciones. Se extrajo sangre de los animales siete días después de cada inmunización partiendo después de la segunda dosis para análisis de títulos de anticuerpo por ELISA. El régimen de tratamiento de cada grupo se resume en la Tabla 9.

Tabla 9

Diseño Experimental del Estudio 010					
Grupo	N ^a	Adyuvante ^b	Dosis	Antígeno	Dosis (µg)
1	10	MPL	12,5 µg	AN1792	33
2	10	MPL	25 µg	AN 1792	33
3	10	MPL	50 µg	AN1792	33
4	13	MPL	125 µg	AN1792	33
5	13	MPL	50 µg	AN 1792	150
6	13	MPL	50 µg	AN1528	33
7	10	PBS		AN1792	33
8	10	PBS		Ninguno	
9	10	Escualeno emulsionado	5%	AN1792	33
10	10	Escualeno mezclado	5%	AN1792	33
11	10	Alumbre	2 mg	AN1792	33
12	13	MPL + Alumbre	50 µg/2 mg	AN1792	33
13	10	QS-21	5 µg	AN1792	33
14	10	QS-21	10 µg	AN1792	33
15	10	QS-21	25 AN1792	AN1792	33
16	13	QS-21	25 AN1792	AN1792	150
17	13	QS-21	25 AN1792	AN1528	33
18	13	QS-21 + MPL	25 µg/50 µg	AN1792	33
19	13	QS-21 + Alumbre	25 µg/2 mg	AN1792	33
<p>Notas a pie de página:</p> <p>^a Número de ratones en cada grupo al inicio del experimento.</p> <p>^b Los adyuvantes están indicados. El tampón para todas las formulaciones era PBS. Para el grupo 8, no existía ningún adyuvante y ningún antígeno.</p>					

Los títulos ELISA de anticuerpos contra Aβ42 en cada grupo se muestran en la Tabla 10 más adelante.

Tabla 10.

Media geométrica de títulos de anticuerpo					
Semana de la extracción de sangre					
Grupo de tratamiento	de 2,9	5,0	8,7	12,9	16,7
1	248	1797	2577	6180	4177
2	598	3114	3984	5287	6878
3	1372	5000	7159	12333	12781
4	1278	20791	14368	20097	25631
5	3288	26242	13229	9315	23742
6	61	2536	2301	1442	4504
7	37	395	484	972	2149
8	25	25	25	25	25
9	25	183	744	952	1823
10	25	89	311	513	817
11	29	708	2618	2165	3666
12	198	1458	1079	612	797
13	38	433	566	1080	626
14	104	541	3247	1609	838
15	212	2630	2472	1224	1496
16	183	2616	6680	2085	1631
17	28	201	375	222	1540
18	31699	15544	23095	6412	9059
19	63	243	554	299	441
La Tabla muestra que los títulos más altos se obtuvieron para los grupos 4, 5 y 18, en los que los adyuvantes eran 125 µg de MPL, 50 µg de MPL y QS-21 más MPL.					

IX. Eficacia Terapéutica de Diferentes Adyuvantes

Un estudio de eficacia terapéutica se llevó a cabo en ratones PDAPP transgénicos con un conjunto de adyuvantes adecuados para uso en seres humanos para determinar su capacidad de potenciar respuestas inmunes a Aβ y para inducir la eliminación mediada inmune de depósitos de amiloides en el cerebro.

Ciento ochenta machos y hembras, de 7,5 a 8,5 meses de edad de ratones transgénicos PDAPP se obtuvieron de los Laboratorios Charles River. Los ratones se clasificaron en nueve grupos que contenían 15 a 23 animales por grupo a inmunizar con AN1792 o AN1528 combinados con diversos adyuvantes. Animales se distribuyeron para emparejar el género, edad, y porcentaje de los animales dentro de los grupos para que fueran tan cercanos como fuera posible. Los adyuvantes incluían alumbre, MPL, y QS-21, cada uno combinado con ambos antígenos, y adyuvante de Freund (FA) combinado con solamente AN1792. un grupo adicional se inmunizó con AN1792 formulado en tampón PBS más el conservante timerosal sin adyuvante. Un noveno grupo se inmunizó con PBS sola como un control negativo.

Preparación de péptidos Aβ agregados: péptidos Aβ1-40 humano (AN1528; California Peptides Inc., Napa, CA; Lot

ME0541) y A β 1-42 humano (AN1792; California Peptides Inc., Lote ME0439) se solubilizaron recientemente para la preparación de cada conjunto de inyecciones a partir de polvos liofilizados que se habían almacenado desecados a -20°C. Para este propósito, dos mg de péptido se añadieron a 0,9 ml de agua desionizada y la mezcla se agitó en aparato Vortex para generar una solución o suspensión relativamente uniforme. AN1528 era soluble en esta etapa, al contrario que AN1792. Una alícuota de 100 μ l de 10X PBS (1X PBS: 0,15 M de NaCl, 0,01 M de fosfato de sodio, pH 7,5) se añade después en el momento que AN1528 comienza a precipitar. Las suspensiones se agitaron en aparato Vortex de nuevo y se incubaron durante toda una noche a 37°C para uso al día siguiente.

Para preparar la dosis de formulación con alumbre (Grupos 1 y 5), péptido A β en PBS se añadió a Alhydrogel (gel de hidróxido de aluminio acuoso al dos por ciento, Sargeant, Inc., Clifton, NJ) hasta alcanzar concentraciones de 100 μ g de péptido A β por 1 mg de alumbre. 10X PBS se añadió hasta un volumen de dosis final de 200 μ l en 1X PBS. La suspensión se mezcló después suavemente durante aproximadamente 4 hr a T A antes de inyección.

Para preparar la dosis de formulación con MPL (Grupos 2 y 6), polvo liofilizado (Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MT; Lote 67039-E0896B) se añadió a 0,2% de trietilamina acuosa hasta una concentración final de 1 mg/ml y se agitó en aparato Vortex. La mezcla se calentó hasta 65 a 70°C durante 30 seg. para crear una suspensión uniforme ligeramente opaca de micelas. La solución se almacenó a 4°C. Para cada conjunto de inyecciones, 100 μ g de péptido por dosis en 50 μ l de PBS, 50 μ g de MPL por dosis (50 μ l) y 100 μ l de PBS por dosis se mezclaron en un tubo de borosilicato inmediatamente antes de uso.

Para preparar la dosis de formulación con QS-21 (Grupos 3 y 7), se añadió polvo liofilizado (Aquila, Framingham, MA; Lote A7018R) a PBS, pH 6,6 - 6,7 hasta una concentración final de 1 mg/ml y se agitó en aparato Vortex. La solución se almacenó a -20°C. Para cada conjunto de inyecciones, 100 μ g de péptido por dosis en 50 μ l PBS, 25 μ g de QS-21 por dosis en 25 μ l de PBS y 125 μ l de PBS por dosis se mezclaron en un tubo de borosilicato inmediatamente antes de uso.

Para preparar la dosis de formulación con adyuvante de Freund (Grupo 4), se emulsionaron 100 μ g de AN1792 en 200 μ l de PBS 1:1 (vol:vol) con Adyuvante de Freund Completo (CFA) en un volumen final de 400 μ l para la primera inmunización. Para posteriores inmunizaciones, el antígeno se emulsionó de manera similar con Adyuvante de Freund Incompleto (1 FA). Para las formulaciones que contienen adyuvantes alumbre, MPL o QS-21, 100 μ g por dosis de AN1792 o AN1528 se combinó con alumbre (1 mg por dosis) o MPL (50 μ g por dosis) o QS-21 (25 μ g por dosis) en un volumen final de 200 μ l de PBS y se administró mediante inoculación subcutánea en la parte trasera de las paletas del hombro. Para el grupo que recibe FA, se emulsionaron 100 μ g de AN1792 1: 1 (vol:vol) con Adyuvante de Freund Completo (CFA) en un volumen final de 400 μ l y se administraron por vía intraperitoneal para la primera inmunización, seguido con el refuerzo de la misma cantidad de inmunógeno en Adyuvante de Freund Incompleto (IFA) para las cinco dosis posteriores. Para el grupo que recibe AN1792 sin adyuvante, 10 μ g de AN1792 se combinó con 5 μ g de timerosal en un volumen final de 50 μ l de PBS y se administró por vía subcutánea. El noveno, grupo control recibió solamente 200 μ l de PBS administrado por vía subcutánea. Inmunizaciones se proporcionó en un programa bisemanal por las tres primeras dosis, después un programa mensual después de esto los días 0, 16, 28, 56, 85 y 112. Se recogió sangre de los animales seis a siete días después de cada inmunización a partir de la segunda dosis para la medición de títulos de anticuerpo. Se sacrificaron los animales aproximadamente una semana después de la dosis final. Los resultados se midieron mediante ensayo ELISA de los niveles de A β y APP en el cerebro y mediante evaluación inmunohistoquímica de la presencia de placas amiloides en secciones de cerebro. Además, se determinaron títulos de anticuerpo específico de A β , y respuestas proliferativas y de citoquina dependientes de A β .

Tabla 10 muestra que los títulos de anticuerpo para A β 1-42 se indujeron con FA y AN1792, títulos que alcanzaban máximos en la cuarta inmunización (GMT máximo: 75.386) y después disminuyeron en un 59% después de la sexta, inmunización final. El título medio máximo inducido por MPL con AN1792 era 62% menor que el generado con FA (GMT máximo: 28.867) y también se alcanzó de manera temprana en el programa de inmunización, después de 3 dosis, después de una disminución hasta 28% del valor máximo después de la sexta inmunización. El título medio máximo generado con QS-21 combinado con AN1792 (GMT: 1.511) era aproximadamente 5 veces inferior que el obtenido con MPL. Además, la cinética de la respuesta era menor, ya que se requería una inmunización adicional para alcanzar la respuesta máxima. Títulos generados por AN 1792 unido a alumbre eran marginalmente mayores que los obtenidos con QS-21 y la cinética de la respuesta era más rápida. Para AN1792 administrado en PBS con timerosal la frecuencia y tamaño de los títulos eran apenas mayor que el de PBS sola. Los títulos máximos generados con MPL y AN1528 (GMT máximo 3099) eran aproximadamente 9 veces menor que aquellos con AN1792. AN1528 unido a alumbre era muy escasamente muy inmunogénica con bajos títulos generados solamente en algunos de los animales. No se observó ninguna respuesta de anticuerpo en los animales inmunizados control PBS sola.

Tabla 11

Media geométrica de títulos de anticuerpo ^a					
Semana de la extracción de sangre					
Tratamiento	3,3	5,0	9,0	13,0	17,0
Alumbre/ AN1792	102 (12/21) ^b	1.081 (17/20)	2.366 (21/21)	1.083 (19/21)	572 (18/21)
MPL/ AN1792	6241 (21/21)	28.867 (21/21)	1.1242 (21/21)	5.665 (20/20)	8.204 (20/20)
QS21/ AN1792	30 (1/20)	227 (10/19)	327 (10/19)	1.511 (17/18)	1.188 (14/18)
CFA/ AN1792	10.076 (15/15)	61.279 (15/15)	75.386 (15/15)	41.628 (15/15)	30.574 (15/15)
Alumbre/ AN1528	25 (0/21)	33 (1/21)	39 (3/20)	37 (1/20)	31 (2/20)
MPL/ AN1528	184 (15/21)	2.591 (20/21)	1.653 (21/21)	1.156 (20/20)	3.099 (20/20)
QS21/ AN1528	29 (1/22)	221 (13/22)	51 (4/22)	820 (20/22)	2,994 (21/22)
PBS más Timerosal	25 (0/16)	33 (2/16)	39 (4/16)	37 (3/16)	47 (4/16)
PBS	25 (0/16)	25 (0/16)	25 (0/15)	25 (0/12)	25 (0/16)
Notas a pie de página:					
^a Media geométrica de títulos de anticuerpo medidos contra Aβ1-42					
^b Número de respondedores por grupo					

Los resultados de tratamiento con AN1792 o AN 1528 con diversos adyuvantes, o timerosal sobre carga amiloide cortical en ratones de 12 meses de edad determinada por ELISA se muestran en la FIG. 15. En ratones PDAPP de control de PBS, el nivel mediano de Aβ total en la corteza a los 12 meses era 1.817 ng/g. Se observaron niveles notablemente reducidos de Aβ en los ratones tratados con AN 1792 más CFA/IFA, AN 1792 más alumbre, AN 1792 más MPL y QS-21 más AN1792. La reducción alcanzó significación estadística al nivel $p < 0,05$ solamente para AN1792 más CFA/IFA. Sin embargo, como se muestra en los Ejemplos I y III, los efectos de inmunización en la reducción de los niveles de Aβ llegaron a ser sustancialmente mayores en ratones de 15 meses y 18 meses de edad. De este modo, se anticipa que formulaciones adicionales, particularmente composiciones AN1792 más alumbre, AN1792 más MPL y AN1792 más QS-21 proporcionarán resultados más positivos en el tratamiento de ratones de mayor edad. Por el contrario, el AN1792 más el timerosal mostró un nivel mediano de Aβ aproximadamente el mismo que en los ratones tratados con PBS. Resultados similares se obtuvieron cuando niveles de Aβ42 se compararon. El nivel mediano de Aβ42 en controles PBS era 1624 ng/g. Se observaron niveles notablemente reducidos de 403, 1149, 620 y 714 en los ratones tratados con AN1792 más CFA/IFA, AN1792 más alumbre, AN1792 más MPL y AN1792 más QS-21 respectivamente, con la reducción que alcanza significación relativa ($p = 0,05$) para el grupo de tratamiento AN1792 CFA/IFA. El nivel mediano en los ratones tratados con timerosal AN1792 era 1619 ng/g Aβ42.

X. Análisis de toxicidad

Se recogieron tejidos para examen histopatológico a la finalización de los estudios descritos en los Ejemplos II, III y VII. Además, se realizó hematología y química clínica sobre muestras de sangre terminal de los Ejemplos III y VI. Se evaluaron la mayoría de los órganos principales, incluyendo cerebro, pulmonar, linfático, gastrointestinal, hígado, riñón, adrenal y gónadas. Aunque se observaron lesiones esporádicas en los animales de estudio, no hubo diferencias obvias, o bien en tejidos afectados o gravedad de lesión, entre animales tratados con AN1792 y no tratados. No se observaron lesiones histopatológicas singulares en los animales inmunizados con AN-1528 comparado con los animales tratados con PBS o no tratados. Tampoco había diferencia en el perfil de química clínica entre los grupos de adyuvante y los animales tratados con PBS en el Ejemplo VI. Aunque existían incrementos significativos en varios de los parámetros de hematología entre los animales tratados con AN1792 y adyuvante de Freund en el Ejemplo VI con relación a los animales tratados con PBS, estos tipos de efectos se esperan del tratamiento con adyuvante de Freund y la peritonitis acompañante no indican ningún efecto adverso del tratamiento con AN1792. Aunque no es parte de la evaluación toxicológica, la patología de cerebro en ratón PDAPP se examinó de manera extensa como parte de la eficacia de los resultados finales. Ningún signo de tratamiento con relación a efecto adverso sobre la morfología del cerebro se observó en cualquiera de los estudios. Estos resultados indican que el tratamiento con AN1792 estaba bien tolerado y al menos sustancialmente sin efectos secundarios.

XI. Tratamiento terapéutico con anticuerpos Anti-A β

Los experimentos descritos en esta sección se llevaron a cabo con el fin de ensayar las capacidades de diversos anticuerpos monoclonales y policlonales contra A β para inhibir la acumulación de A β en el cerebro de ratones transgénicos heterocigóticos.

A. Estudio 1**1. Diseño de estudio**

Sesenta ratones transgénicos heterocigóticos PDAPP, machos y hembras, de 8,5 a 10,5 meses de edad se obtuvieron de Laboratorio Charles River. Los ratones se clasificaron en seis grupos a tratar con anticuerpos dirigidos a A β . Los animales se distribuyeron para emparejar el género, edad, linaje y origen de los animales dentro de los grupos tan estrechamente como fuera posible. Como se muestra en la Tabla 12, los anticuerpos incluían cuatro anticuerpos específicos de A β murinos monoclonales, 2H3 (dirigido a los restos de A β 1 - 12), 10D5 (dirigido a los restos de A β 1 - 16), 266 (dirigido a los restos de A β 13 -28 y se une a AN1792 monomérico pero no agregado), 21F12 (AN179233-42). Un quinto grupo se trató con una fracción de anticuerpo policlonal específico de A β (incrementada con inmunización con AN1792 agregado). El grupo control negativo recibió el diluyente, PBS, sola sin anticuerpo.

Los anticuerpos monoclonales se inyectaron a una dosis de aproximadamente 10 mg/kg (asumiendo que los ratones pesaban 50 g). Se administraron inyecciones por vía intraperitoneal cada siete días de promedio para mantener títulos anti-A β por encima de 1000. Aunque se midieron títulos inferiores para mAb 266 ya que no se une al AN1792 agregado usado como el antígeno de captura en el ensayo, se mantuvo el mismo programa de dosificación para este grupo. El grupo que recibía anticuerpo monoclonal 2H3 se discontinuó las primeras tres semanas ya que el anticuerpo se eliminó demasiado rápidamente in vivo. Se extrajo sangre de los animales para cada dosificación para la medición de los títulos de anticuerpo. El tratamiento se continuó durante un período de seis meses durante un total de 196 días. Los animales se sacrificaron una semana después de la dosis final.

Tabla 12

DISEÑO EXPERIMENTAL DEL ESTUDIO 006				
Grupo de Tratamiento	N ^a	Anticuerpo de Tratamiento	Especificidad de Anticuerpo	Isotipo de Anticuerpo
1	9	ninguno (PBS solo)	NA ^b	NA
2	10	Policlonal	A β 1-42	mixto
3	0	mAb ^c 2H3	A β 1-12	IgG1
4	8	mAb 10D5	A β 1-16	IgG1
5	6	mAb 266	A β 13-28	IgG1
6	8	mAb 21F12	A β 33-42	IgG2a
<p>Notas a pie de página:</p> <p>a. Número de ratones en el grupo a la finalización del experimento. Todos los grupos comenzaron con 10 animales por grupo.</p> <p>b. NA: no aplicable</p> <p>c. mAb: anticuerpo monoclonal</p>				

2. Materiales y Procedimientos

a. Preparación de los Anticuerpos

El anticuerpo policlonal anti-A β se preparó de sangre recogida de dos grupos de animales. El primer grupo constaba de 100 ratones hembra Swiss Webster, 6 a 8 semanas de edad. Se inmunizaron los días 0, 15, y 29 con 100 μ g de AN1792 combinado con CFAII FA. Una cuarta inyección se proporcionó el día 36 con la mitad de la dosis de AN1792. Se extrajo sangre de los animales después del día 42, se preparó suero y los sueros se combinaron para crear un total de 64 ml. El segundo grupo constaba de 24 ratones isogénicos hembra con los ratones PDAPP pero no transgénicos para el gen APP humano, de 6 a 9 semanas de edad. They se inmunizaron los días 0, 14, 28 y 56 con 100 μ g de AN1792 combinado con CFA/IFA. A estos animales también se les extrajo sangre después del sacrificio el día 63, se preparó suero y se combinó para un total de 14 ml. Los dos lotes de sueros se combinaron. La fracción de anticuerpo se purificó usando dos rondas secuenciales de precipitación con 50% de sulfato amónico saturado. El precipitado final se dializó contra PBS y se ensayó para determinar endotoxina. El nivel de endotoxina era menor que 1 EU/mg.

Los anticuerpos monoclonales anti-A β se prepararon a partir de fluido de ascitos. TEI fluido se deslipidó primero mediante la adición de sulfato de dextrano de sodio concentrado a fluido de ascitos enfriados con hielo mediante agitación sobre hielo hasta alcanzar una concentración final de 0,238%. Después se añadió CaCl₂ concentrado con agitación hasta alcanzar una concentración final de 64 mM. Esta solución se centrifugó a 10.000 x g y se desechó el sedimento. El sobrenadante se agitó sobre hielo con un volumen igual de suslato de amonio concentrado añadido gota a gota. La solución se centrifugó de Nuevo a 10.000 x g y se desechó el sobrenadante. El sedimento se volvió a suspender y se dializó contra 20 mM de Tris-HCl, 0,4 M NaCl, pH 7,5. Esta fracción se añadió a una columna de Sefarosa C Pharmacia FPLC y se eluyó con un gradiente inverso de 0,4 M a 0,275 M de NaCl en 20 mM de Tris-HCl, pH 7,5.

El máximo de anticuerpo se identificó mediante absorbancia a 280 nm y se combinaron las fracciones apropiadas. La preparación de anticuerpo purificado se caracterizó por medición de la concentración de proteína usando el procedimiento BCA y la pureza usando SDS-PAGE. La combinación también se ensayó para determinar endotoxina. El nivel de endotoxina era menor que 1 EU/mg. Los títulos menores que 100 se asignaron de manera arbitraria a un valor de título de 25.

3. Niveles de A β y APP en el Cerebro:

Después de aproximadamente seis meses de tratamiento con los diversas preparaciones de anticuerpo anti-A β , se retiraron los cerebros de los animales después de la perfusión de solución salina. Se prepare un hemisferio para análisis de inmunohistoquímica y el Segundo se usó se usó para la cuantificación de los niveles de A β y APP. Para medir las

concentraciones de diversas formas de péptido beta amiloide y proteína precursora amiloide (APP), se diseccionó el hemisferio y los homogenatos de las regiones de hipocampo, cortical, y cerebelar se prepararon en 5M de guanidina. Éstas se diluyeron en serie y el nivel de péptido amiloide o APP se cuantificó mediante comparación con una serie de diluciones de patrones de péptido A β o APP de concentraciones conocidas en un formato ELISA.

- 5 Los niveles de A β total y de A β 1-42 medido por ELISA en los homogenatos de la corteza, y el hipocampo y el nivel de A β total en el cerebelo se muestran en las Tablas 11, 12, y 13, respectivamente. La concentración mediana de A β total para el grupo control, inoculado con PBS, era 3,6 veces más alto que en el hipocampo que en la corteza (mediana de 63.389 ng/g de tejido de hipocampo comparado con 17.818 ng/g para la corteza). El nivel mediano en el cerebelo del grupo control (30,6 ng/g de tejido) era más de 2.000 veces menor que en el hipocampo. Estos niveles son similares a los que se han reseñado previamente para los ratones PDAPP transgénicos de esta edad (Johnson-Woods et al., 1997).

10 Para la corteza, un grupo de tratamiento tenía un nivel de A β mediano, medido como A β 1-42, que difería significativamente del grupo control ($p < 0,05$), los animales que recibían el anticuerpo policlonal anti-A β como se muestra en la Tabla 13. El nivel mediano de A β 1-42 se redujo en un 65%, comparado con el control para este grupo de tratamiento. Los niveles medianos de A β 1-42 se redujeron también significativamente en un 55% comparado con el control en un grupo de tratamiento adicional, los animales dosificados con el mAb 10D5 ($p = 0,0433$).

Tabla 13

CORTEZA									
Grupo de tratamiento	Nº	Medianas						Medias	
		A β total			A β 42			A β total	A β 42
		Valor ELISA ^b	Valor de P ^c	% de cambio	Valor ELISA	Valor de P	% de cambio	Valor ELISA	Valor ELISA
PBS	9	17818	NA ^d	NA	13802	NA	NA	16150+/- 7456'	12621+/- 5738
Anti-A β 42 policlonal	10	6160	0,0055	-65	4892	0,0071	-65	5912+/- 4492	4454+/- 3347
mAb 10D5	8	7915	0,1019	-56	6214	0,0433	-55	9695+/- 6929	6943+/- 3351
mAb 266	6	9144	0,1255	-49	8481	0,1255	-39	9204+/- 9293	7489+/- 6921
mAb 21F12	8	15158	0,2898	-15	13578	0,7003	-2	12481 +/- 7082	11005+/- 6324
Notas a pie de página:									
a. Número de animales por grupo al final del experimento; b. ng/g de tejido; c. análisis de Mann Whitney; d. NA: no aplicable; e. Desviación estándar									

20 En el hipocampo, el porcentaje de reducción mediana de A β total asociado a tratamiento con anticuerpo antiA β policlonal (50%, $p = 0.0055$) no era tan grande como el observado en la corteza (65%) (Tabla 14). Sin embargo, la magnitud absoluta de la reducción era casi 3 veces mayor 3en el hipocampo que en la corteza, una reducción neta de 31.683 ng/g de tejido en el hipocampo contra 11.658 ng/g de tejido en la corteza. Cuando se mide como el nivel de la forma más amiloidogénica de A β , A β 1-42, mejor que como A β total, la reducción lograda con el anticuerpo policlonal era

significativo ($p = 0,0025$). Los niveles medianos en los grupos tratados con los mAb 10D5 y 266 se redujeron en 33% y 21 %, respectivamente.

Tabla 14

HIPOCAMPO									
Grupo de tratamiento	Nº	Medianas						Medias	
		A β total			A β 42			A β total	A β 42
		Valor ELISA ^b	Valor de P ^c	% de cambio	Valor ELISA	Valor de P	% de cambio	Valor ELISA	Valor ELISA
PBS	9	63389	NA ^d	NA	54429	NA	NA	58351+/- 13308 ^c	52801+/- 14701
Anti- A β 42 policlonal	10	31706	0.0055	-50	27127	0.0025	-50	30058+/- 22454	24853+/- 18262
mAb 10D5	8	46779	0.0675	-26	36290	0.0543	-33	44581+/- 18632	36465+/- 17146
mAb 266	6	48689	0.0990	-23	43034	0.0990	-21	36419+/- 27304	32919+/- 25372
mAb 21F12	8	51563	0.7728	-19	47961	0.8099	-12	57327+/- 28927	50305+/- 23927
Notas a pie de página: a. Número de animales por grupo al final del experimento b. ng/g de tejido c. análisis de Mann Whitney d. NA: no aplicable e. Desviación estándar									

- 5 A β total también se midió en el cerebelo (Tabla 15). Los grupos dosificados con el anticuerpo policlonal anti- A β y el 266 mostró reducciones significativas de los niveles de A β total (43% y 46%, $p = 0,0033$ y $p = 0,0184$, respectivamente) y que el grupo tratado con 10D5 tenían una reducción clara significativa (29%, $p = 0,0675$).

Tabla 15

CEREBELO					
Grupo de tratamiento	N ^a	Medianas			Medias
		A β total			A β total
		Valor ELISA ^b	Valor de P ^c	% de cambio	Valor ELISA
PBS	9	30,64	NA ^d	NA	40,00+/-31,89 ^e
Anti-A β 42 policlonal	10	17,61	0,0033	-43	18,15+/-4,36
mAb 10D5	8	21,68	0,0675	-29	27,29+/-19,43
mAb 266	6	16,59	0,0184	-48	19,59+/-6,59
mAb 21F12	8	29,80	>0,9999	-3	32,88+/-9,90
Notas a pie de página: a. Número de animales por grupo al final del experimento b. ng/g de tejido (CONT) c. análisis de Mann Whitney d. NA: no aplicable e. Desviación estándar					

La concentración de APP también se determinó mediante ELISA en la corteza y cerebelo de ratones tratados con y control, tratados con PBS. Se utilizaron dos ensayos diferentes de APP. El primero, denominado APP- α /FL, reconoce tanto APP-alfa (α , la forma secretada de APP que se ha escindido dentro de la secuencia A β), y las formas de longitud completa (FL) de APP, mientras la segunda reconoce solamente APP- α . Al contrario que la disminución asociada a tratamiento de A β en un subconjunto de grupos de tratamiento, los niveles de APP estaban virtualmente inalterados en todos los animales tratados con el control. Estos resultados indican que las inmunizaciones con anticuerpos A β agotan A β sin agotar APP.

En resumen, los niveles de A β se redujeron significativamente en la corteza, hipocampo y cerebelo en animales tratados con el anticuerpo policlonal surgidos contra AN1792. Hasta un grado menor los anticuerpos monoclonales a la región amino terminal de A β 1-42, específicamente aminoácidos 1 - 16 y 13-28 también muestran efectos significativos de tratamiento.

4. Análisis histoquímico:

La morfología de placas inmunorreactivas de A β en los subconjuntos de cerebros de ratones en los grupos de tratamiento PBS, A β 42 policlonal, 21F12, 266 y 10D5 se compararon de manera cuantitativa a la de los estudios previos en los que los se siguen los procedimientos inmunización convencionales con A β 42.

La mayor alteración tanto en el grado como en la apariencia de placas amiloides producidas en los animales inmunizados con el anticuerpo policlonal A β 42. La reducción de carga amiloide, morfología de placa erosionada e inmunorreactividad de A β asociada a célula se parecía estrechamente a los efectos producidos por el procedimiento inmunización estándar. Estas observaciones apoyan los resultados de ELISA en los que reducciones significativas tanto en A β total como A β 42 se lograron mediante la administración del anticuerpo policlonal A β 42.

En evaluaciones cuantitativas similares, placas amiloides en el grupo 10D5 también se redujeron en el número y aparición, con alguna evidencia de inmunorreactividad de A β asociada a célula. No se observaron diferencias importantes entre los grupos 21F12 y 266 cuando se compara con los controles PBS.

5. Medición de Títulos de anticuerpo:

A un subconjunto de tres ratones elegidos al azar para cada grupo se les extrajo sangre antes de cada inoculación intraperitoneal, para un total de 30 extracciones de sangre. Títulos de anticuerpo se midieron como anticuerpo de unión a A β 1-42-usando un ELISA estándar con placas multipocillo estándar recubiertas con A β 1-42 como se describe en detalle en Materiales y Procedimientos Generales. Los títulos medios para cada extracción de sangre se muestran en las Figuras 16 - 18 para el anticuerpo policlonal y los monoclonales 10D5 y 21F12, respectivamente. El promedio de los títulos eran aproximadamente 1:1000 durante este período de tiempo para la preparación de anticuerpo policlonal y eran ligeramente superiores al nivel de este nivel para los animales tratados con 10D5 y 21F12.

6. Respuestas linfoproliferativas

La linfoproliferación dependiente de A β se midió usando células de bazo recogidas ocho días después de la infusión final de anticuerpo. Células recogidas recientemente, 10^5 por pocillo, se cultivaron durante 5 días en la presencia de A β 1-40 a una concentración de 5 μ M para estimulación. Como un control positivo, se cultivaron células adicionales con el mitógeno de células T, PHA, y, como un control negativo, células se cultivaron sin péptido añadido.

Esplenocitos de ratones PDAPP viejos se inmunizaron de manera pasiva con diversos anticuerpos anti-A β se estimularon *in vitro* con AN1792 y se midieron las respuestas proliferativas y de citoquina. El propósito de estos ensayos era determinar si la inmunización pasiva facilitaba la presentación de antígeno, y de este modo el cebado de las respuestas de las células T específicas para AN1792. No se observó ni respuestas proliferativas ni de citoquina específicas de AN1792 en ratones inmunizados de manera pasiva con los anticuerpos anti-A β .

B. Estudio 2

En un segundo estudio, se repitió el tratamiento con anticuerpo 10D5 y se ensayaron dos anticuerpos anti-A β adicionales, anticuerpos monoclonales 3D6 (A β ₁₋₅) y 16C11 (A β ₃₃₋₄₂), los grupos control recibieron o bien PBS o un anticuerpo (TM2a) de igual isotipo irrelevante. Los ratones eran de edad mayores (11,5 - 12 meses de edad heterocigóticos) que en el estudio previo; por lo demás el diseño experimental era el mismo. De nuevo una vez, después de seis meses de tratamiento, 10D5 redujo la carga de placa en más de 80% con relación a o bien PBS o controles de anticuerpo de igual isotipo ($p = 0,003$). Uno de los otros anticuerpos contra A β , 3D6, era igualmente eficaz, produciendo una reducción del 86% ($p = 0,003$). Por el contrario, el tercer anticuerpo contra el péptido, 16C11, no tenía ningún efecto contra la carga de la placa. Se obtuvieron similares hallazgos con las mediciones de ELISA de A β 42. Estos resultados demuestran que una respuesta de anticuerpo contra el péptido A β , en la ausencia de inmunidad de las células T, es suficiente para disminuir la deposición amiloide en ratones PDAPP, excepto que no todos los anticuerpos anti-A β son eficaces. Anticuerpos dirigidos a epítopes que comprenden los aminoácidos 1 - 5 ó 3 - 7 de A β son particularmente eficaces.

Estos estudios demuestran que los anticuerpos contra A β administrados de manera pasiva redujeron el grado de la deposición de placa en un modelo de ratón de enfermedad de Alzheimer. Cuando se mantiene a concentraciones modestas en suero (25 - 70 μ g/ml), los anticuerpos ganaron acceso al SNC a niveles suficientes para decorar placas β amiloides. La entrada de anticuerpo en el SNC no se debió a una pérdida anormal de la barrera sangre-cerebro ya que no había incremento en la permeabilidad vascular según se mide por Azul Evans en ratones PDAPP. Además, la concentración de anticuerpo en el parénquima de cerebro de ratones PDAPP viejos era la misma que en los ratones no transgénicos, que representan 0,1 % de la concentración de anticuerpo en suero (independientemente del isotipo).

C. Estudio 3: Control de Unión de Anticuerpo

Para determinar si los anticuerpos contra A β pueden ser activos directamente dentro del SNC, se tomaron cerebros de ratones perfundidos con solución salina al final del Ejemplo XII, se examinaron para determinar la presencia de los anticuerpos administrados periféricamente. las secciones de cerebro en criostato no fijadas se expusieron a un reactivo fluorescente contra inmunoglobulina de ratón (IgG-Cy3anti-ratón de cabra). Placas dentro de los cerebros de los grupos 10D5 y 3D6 grupos se decoraron fuertemente con anticuerpo, mientras no existía tinción en el grupo 16C11. Para revelar el grado total de deposición de placa, las secciones en serie de cada se hicieron inmunorreaccionar primero con un anticuerpo anti-A β , y después con el reactivo secundario. 10D5 y 3D6, después de la administración periférica, ganó acceso a la mayoría de las placas dentro del SNC. La carga de placa se redujo en gran medida en estos grupos de tratamiento comparado con el grupo 16C11. Estos datos indican que los anticuerpos administrados periféricamente pueden entrar en el SNC si pueden desencadenar la eliminación amiloide directamente. Es probable que 16C11 también tuviera acceso a las placas pero era incapaz de unirse a las placas.

XII. Prevención y Tratamiento de Sujetos Humanos

Un ensayo de única fase 1 se realiza para determinar la seguridad en seres humanos. Un agente terapéutico se administra en dosificaciones crecientes a diferentes pacientes partiendo de aproximadamente 0,01 el nivel de la eficacia

presunta, e incrementando en un factor de tres hasta que se alcanza un nivel de aproximadamente 10 veces la dosificación de ratón eficaz.

Un ensayo de fase II se realiza para determinar la eficacia terapéutica. Se seleccionan pacientes con temprana a media Enfermedad de Alzheimer definida usando los criterios de La Asociación de Enfermedad de Alzheimer y Trastornos Relacionados (ADRDA) para AD probable. Los pacientes adecuados puntúan en el intervalo 12 -26 en el Examen de Estado Mini-Mental (MMSE). Otros criterios de selección son que los pacientes probablemente sobrevivan a la duración del estudio y carecen de tejidos de complicación tales como el uso de medicaciones simultáneas que pueden interferir. Las evaluaciones iniciales de la función del paciente se preparan usando mediciones sicométricas clásicas, tal como el MMSE, y el ADAS, que es una escala comprensiva para la evaluación de pacientes con estado y función de Enfermedad de Alzheimer. Estas escalas sicométricas proporcionan una medición de la progresión de la afección de Alzheimer. Las escalas de vida cualitativas también se pueden usar para controlar el tratamiento. La progresión de la enfermedad también se puede controlar mediante MRI. Los perfiles de sangre de los pacientes también se puede controlar incluyendo ensayos de anticuerpos específicos de inmunógeno y respuestas de células T.

Después de las mediciones iniciales, pacientes que comienzan a recibir tratamiento. Se distribuyen ala zar y se tratan con o bien el agente terapéutico o placebo de una manera ciega. Los pacientes se controlaron al menos cada seis meses. La eficacia se determina mediante una reducción significativa en la progresión de un grupo de tratamiento con relación a un grupo placebo.

Un Segundo ensayo de fase II se realiza para evaluar la conversión de pacientes que no tenían pérdida de memoria temprana sin Enfermedad Alzheimer, algunas veces denominada alteración de la memoria asociada a la edad (AAMI) o alteración cognitiva suave (MCI), a probable enfermedad de Alzheimer como se define por los criterios de ADRDA. Pacientes con alto riesgo de conversión a enfermedad de Alzheimer se seleccionan entre una población no clínica mediante selección de poblaciones de referencia para los signos tempranos de pérdida de memoria u otras dificultades asociadas a sintomatología antes de Alzheimer, una historia familiar de enfermedad de Alzheimer, factores de riesgo genéticos, edad, sexo, y otras características encontradas para predecir alto riesgo para la enfermedad de Alzheimer. Se recogen las puntuaciones iniciales sobre métricas adecuadas incluyendo MMSE y el ADAS conjuntamente con otras métricas diseñadas para evaluar una población más normal. Estas poblaciones de pacientes se dividieron en grupos adecuados con comparación de placebo contra alternativas de dosificación con el agente. Estas poblaciones de pacientes se siguieron a intervalos de aproximadamente seis meses, y el punto final para cada paciente es si o no él o ella se convierte en probable enfermedad de Alzheimer como se define por los criterios de ADRDA al final de la observación.

XIII. Materiales y Procedimientos Generales

1. Medición de los Títulos de anticuerpo

Se extrajo sangre de los ratones haciendo una pequeña muesca en la vena de la cola y recogiendo aproximadamente 200 µl de sangre en un tubo de microcentrífuga. Se extrajo sangre de cobayas mediante un primer afeitado del área del corvejón trasero y después usando una aguja de calibre 18 para cortar la vena metatarsiana y recoger la sangre en tubos de microcentrífuga. Se dejó que la sangre coagulara durante una hora a temperatura ambiente (T A), se agitó en aparato Vortex, después se centrifugó a 14.000 x g durante 10 min para separar el coágulo del suero. El suero después se transfirió a un tubo de microcentrífuga limpio y se almacenó a 4°C hasta que se valoró.

Títulos de anticuerpo se midieron mediante ELISA. placas de microvaloración de 96 pocillos (placas Costar EIA) se recubrieron con 100 µl de una solución que contiene o bien 10 µg/ml o bien Aβ42 o SAPP u otros antígenos como se ha indicado en cada uno de las reseñas individuales en Tampón de Recubrimiento de Pocillos (0,1 M de fosfato de sodio, pH 8,5, 0,1% de azida de sodio) y se mantuvo durante toda una noche a T A. Los pocillos se aspiraron y se añadieron los sueros a los pocillos pertiendo de una solución de 1/100 en Diluyente de Muestra (0,014 M de fosfato de sodio, pH 7,4, 0,15 M de NaCl, 0,6% de albúmina sérica bovina, 0,05% de timerosal). Se prepararon varias diluciones en serie de las muestras directamente en las placas en etapas de tres veces hasta alcanzar una dilución final de 1/218.700. Las diluciones se incubaron en los pocillos de las placas recubiertos durante 1 hora a T A. Las placas se lavaron después cuatro veces con PBS que contenía 0,05% de Tween 20. El segundo anticuerpo, una Ig anti-ratón de cabra conjugada a peroxidasa de rábano picante (obtenida de Boehringer Mannheim), se añadió a los pocillos como 100 µl de una dilución 1/3000 en Diluyente de Muestra y se incubó durante 1 hora a T A. Las placas se lavaron de nuevo cuatro veces en PBS, Tween 20. Para desarrollar el cromógeno, 100 µl de Slow TMB (3,3',5,5'-tetrametil benzidina obtenida de Pierce Chemicals) se añadió a cada pocillo y se incubó durante 15 min a T A. La reacción se detuvo mediante la adición de 25 µl de 2 M H₂SO₄. La intensidad de color se leyó después sobre un Molecular Devices Vmax a (450 nm - 650 nm).

Títulos se definieron en el recíproco de la dilución de suero proporcionando una mitad de la DO máxima. La DO máxima en general tomada de una dilución inicial 1/100, excepto en los casos con títulos muy altos, en cuyo caso una dilución inicial mayor era necesario para establecer la DO máxima. Si el 50% del punto caen entre dos diluciones, se realizó una extrapolación lineal para calcular el título final. La para calcular la media geométrica de los títulos de anticuerpo, títulos

menores que 100 se asignaron arbitrariamente a un valor de título de 25.

2. Ensayo de proliferación de linfocitos

Los ratones se anestesiaron con isoflurano. Se retiraron los bazo y se enjuagaron dos veces con 5 ml de PBS que contienen 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (PBS- FBS) y después se homogeneizó en una unidad 50°
 5 Centricon (Dako A/S, Dinamarca) en 1,5 ml de PBS-FBS durante 10 seg a 100 rpm en un Medimachine (Dako) seguido de filtración a través de una malla de nylon de tamaño de poro de 100 micrones. Los esplenocitos se lavaron una vez con 15 ml de PBS-FBS, después se sedimentaron mediante centrifugación a 200 x g durante 5 min. Los glóbulos rojos se lisaron mediante resuspensión del sedimento en 5 ml de tampón que contenía 0,15 M de NH₄Cl, 1 M de KHCO₃, 0,1 M de NaEDTA, pH 7,4 durante cinco min a T A. Después los leucocitos se lavaron como se ha indicado
 10 anteriormente. Las células de bazo aisladas recientemente (10⁵ células por pocillo) se cultivaron en conjuntos triplicados en placas de microvaloración de 96 pocillos de fondo en U placas tratadas de cultivo de tejido (Coming, Cambridge, MA) en medio RPMI 1640 (JRH Biosciences, Lenexa, KS) complementado con 2,05 mM de L glutamina, 1% Penicilina/Estreptomina, y 10% de FBS inactivado por calor, durante 96 hr a 37°C. Diversos péptidos A β , proteína de secuencia inversa A β 1-16, A β 1-40, A β 1-42 o A β 40-1 se añadieron también a dosis que varían entre 5 y 0,18 micromolar
 15 en cuatro etapas. Las células en los pocillos control se cultivaron con Concanavalina A (Con A) (Sigma, cat. N° C-5275, a 1 microgramo/ml) sin proteína añadida. Se pulsaron las células durante las 24 hr finales con 3H-timidina (1 μ Ci/pocillo obtenida de Amersham Corp., Arlington Heights IL). Células se recogieron después en placas UniFilter y se contaron en un Top Count Microplate Scintillation Counter (Packard Instruments, Downers Grove, IL). Los resultados se expresan como cuentas por minuto (cpm) de radiactividad incorporada en las macromoléculas insolubles.

4. Preparación de Tejido de Cerebro

Después de la eutanasia, los cerebros se retiraron y se preparó un hemisferio para análisis inmunohistoquímico, mientras tres regiones de cerebro (hipocampo, corteza y cerebelo) se diseccionaron del otro hemisferio y se usaron para medir la concentración de diversas proteínas A β y formas de APP usando ELISA específicos (Johnson-Wood et al., supra).

Los tejidos destinados para los ELISA se homogeneizaron en 10 volúmenes de tampón de guanidina enfriado con hielo (5,0 M guanidina HCl, 50 mM de Tris-HCl, pH 8,0). Los homogenatos se mezclaron mediante agitación suave usando un Adams Nutator (Fisher) durante tres a cuatro horas a T A, después se almacenó a -20°C antes de la cuantificación de A β y APP. Los experimentos previos han mostrado que los análisis eran estables en esta condición de almacenamiento analitos, y que la proteína de A β sintética (Bachem) se podría cuantificar de manera cuantitativa cuando se inutilizan en homogenatos de tejido de cerebro control de camadas de ratón (Johnson-Wood et al., supra).

5. Medición de niveles de A β

Los homogenatos de cerebro se diluyeron 1:10 con Diluyente de Caseína (0,25% de caseína, PBS, 0,05% de azida de sodio, 20 μ g/ml de aprotinina, 5 mM de EDTA pH 8,0, 10 μ g/ml de leupeptina) y después se centrifugó a 16.000 x g durante 20 min a 4°C. Los patrones de proteína de A β (1 - 42 aminoácidos) y los patrones de APP se prepararon para
 35 incluir 0,5 M de guanidina y 0.1% albúmina sérica bovina (BSA) en la composición final. El ELISA sándwich de A β "total" utiliza anticuerpo monoclonal 266, específico para aminoácidos 13 - 28 de A β (Seubert, et al.), como el anticuerpo de captura, y anticuerpo monoclonal biotinilado 3D6, específico para aminoácidos 1 - 5 de A β (Johnson-Wood, et al), como el anticuerpo indicador. El anticuerpo monoclonal 3D6 no reconoce APP secretado o APP de longitud completa, pero detecta solamente las especies de A β con un ácido aspártico amino terminal. Este ensayo tiene un límite con de
 40 sensibilidad de ~ 50 ng/ml (11 nM) y no muestra reactividad cruzada para la proteína A β de tipo murino endógena a concentraciones de hasta 1 ng/ml (Johnson-Wood et al., supra).

El ELISA sándwich específico de A β 1-42 emplea mA β 21F12, específico para los aminoácidos 33-42 de A β (Johnson-Wood, et al.), como el anticuerpo de captura. mA β 3D6 biotinilado es también el anticuerpo indicador en este ensayo que tiene un límite inferior de sensibilidad de aproximadamente 125 μ g/ml (28 μ M, Johnson-Wood et al.). Para los ELISA
 45 de A β , 100 μ l de o bien mA β 266 (a 10 μ g/ml) o mA β 21F12 a (5 μ g/ml) se recubrió en los pocillos de placas de inmunoensayo de 96 pocillos (Costar) por una incubación durante toda una noche a T A. La solución se retiró mediante aspiración y los pocillos se bloquearon mediante la adición de 200 μ l de 0,25% albúmina sérica humana en tampón PBS durante al menos 1 a T A. Se retiró la solución de bloqueo y las placas se almacenaron desecadas a 4°C hasta uso Las placas se rehidrataron con tampón de lavado [solución salina tamponada con Tris (0,15 M NaCl, 0,01 M Tris-HCl, pH 7,5), más 0,05% de Tween 20] antes de uso. Las muestras y patrones se añadieron por triplicado en alícuotas de 100 μ l por pocillo y después se incubaron durante toda una noche a 4° C. Las placas se lavaron al menos tres veces con
 50 Tampón de Lavado entre cada etapa del ensayo. El mA β 3D6 biotinilado, diluido hasta 0,5 μ g/ml en Tampón de Ensayo de Caseína (0,25% de caseína, PBS, 0,05% de Tween 20, pH 7,4), se añadió y se incubó en los pocillos durante 1 hr a T A. Un conjugado de avidina-peroxidasa de rábano picante, (Avidina-HRP obtenida de Vector, Burlingame, CA), diluido
 55 1:4000 en Tampón de Ensayo de Caseína, se añadió a los pocillos durante 1 hr a T A. El sustrato colorimétrico, Slow TMB-ELISA (Pierce), se añadió y se permitió que reaccionara durante 15 minutos a T A, después de lo cual se detuvo la

reacción enzimática mediante la adición de 25 µl de 2 N H₂SO₄. Se cuantificó el producto de reacción usando un Molecular Devices Vmax que mide la diferencia en absorbancia a 450 nm y 650 nm.

6. Medición de niveles de APP

Se utilizaron dos ensayos diferentes de APP. El primero, denominado APP-α/FL, reconoce las formas tanto APP-alpha (α) como de longitud completa (FL) de APP. El segundo ensayo específico para APP-α. El ensayo APP-α /FL reconoce APP secretada incluyendo los 12 primeros aminoácidos de Aβ. Ya que el anticuerpo indicador (2H3) no es específico al sitio de sitio de clip α, que se produce entre los aminoácidos 612 - 613 de APP695 (Esch et al., Science 248, 1122 - 1124 (1990)); este ensayo también reconoce APP de longitud completa (APP-FL). Los experimentos preliminares que usan anticuerpos inmovilizados de APP a la cola citoplasmática de APP-FL para agotar los homogenatos de cerebro de APP-FL sugiere que aproximadamente 30 - 40% de la APP-α/FL APP es FL (datos no mostrados). El anticuerpo de captura para los ensayos tanto el APP-α/FL como APP-α es mAb BE5, surgido contra los aminoácidos 444 a 592 de la forma APP695 (Games et al., supra). El mAb reseñado para el ensayo APP-α/FL es mAb 2H3, específico de los aminoácidos 597 -608 de APP695 (Johnson-Wood et al., supra) y el anticuerpo indicador para el ensayo APP-α es un derivado biotinilado de mAb 16H9, surgido para los aminoácidos 605 a 611 de APP. El límite inferior de sensibilidad del ensayo APP-αFL es aproximadamente 11 ng/ml (150 pM) (Johnson-Wood et al.) y el del ensayo específico de APP-α es 22 ng/ml (0,3 nM). Para ambos ensayos de APP, mAb 8E5 se recubrió sobre los pocillos de placas EIA de 96 pocillos como se describe anteriormente para mAb 266. Se usó APP-α secretado recombinante como el patrón de referencia para el ensayo APP-α y el ensayo APP- α/FL (Esch et al., supra). Las muestras de homogenato de cerebro en 5 M de guanidina se diluyeron 1:10 en Diluyente de Muestra ELISA (0,014 M de tampón fosfato, pH 7,4, 0,6% de albúmina sérica bovina, 0,05% de timerosal, 0,5 M de NaCl, 0,1% de NP40). Después se diluyeron 1:4 en Diluyente de Muestra que contiene 0,5 M de guanidina. Los homogenatos diluidos se centrifugaron después en 16.000 x 9 5 durante 15 segundos a T A. Los patrones y muestras de APP se añadieron a la placa en alícuotas duplicadas y se incubaron durante 1,5 hr a T A. El anticuerpo indicador biotinilado 2H3 o 16H9 se incubó con las muestras durante 1 hr a T A. Fosfatasa alcalina de estreptavidina (Boehringer Mannheim), diluida 1:1000 en diluyente de muestra, se incubó en los pocillos durante 1 hr a T A. El sustrato fluorescente 4-metil-umbeliferil- fosfato se añadió para una incubación durante 30 min a T A y las placas se leyeron en un fluorímetro Cytofluor tm 2350 (Millipore) a 365 nm de excitación y 450 nm de emisión.

7. Inmunohistoquímica

Los cerebros se fijaron durante tres días a 40°C en 4% de paraformaldehído en PBS y después se almacenaron entre uno y siete días a 4°C en 1% de paraformaldehído, PBS hasta que se seccionaron. secciones coronales de cuarenta micrones de espesor se cortaron en un vibratomo a T A y se almacenaron en un crioprotector (30% de glicerol, 30% de etilen glicol en tampón fosfato) a -20°C antes del procesamiento inmunohistoquímico. Para cada cerebro, seis secciones al nivel del hipocampo dorsal, cada uno separado mediante intervalos consecutivos de 240 µm, se incubaron durante toda una noche con uno de los siguientes anticuerpos: (1) un anti- Aβ biotinilado (mAb, 3D6, específico para Aβ humano) diluido hasta una concentración de 2 µg/ml en PBS y 1% de suero de caballo; o (2) un mAb biotinilado específico para APP humana, 8E5, diluido hasta una concentración de 3 µg/ml en PBS y 1,0% de suero de caballo; o (3) un mAb específico para la proteína fibrilar glial (GFAP; Sigma Chemical Co.) diluido 1:500 con 0,25% de Triton X-100 y 1% suero de caballo, en solución salina tamponada con Tris , pH 7,4 (TBS); o (4) a mAb específico para CD11b, antígeno MAC-1, (Chemicon International) diluido 1:100 con 0,25% de Triton X-100 y 1% de suero de conejo en TBS; o (5) un mAb específico para antígeno MHC II, (Pharmingen) diluido 1:100 con 0,25% de Triton X-100 y 1% suero de conejo en TBS; o (6) un mAb específico de rata CD 43 (Pharmingen) diluido 1:100 con 1% suero de conejo en PBS o (7) un mAb específico de rata para CD 45RA (Pharmingen) diluido 1:100 con 1% de suero de conejo en PBS; o (8) un monoclonal Aβ de rata específico para CD 45RB (Pharmingen) diluido 1:100 con 1% suero de conejo en PBS; o (9) un monoclonal Aβ de rata específico para CD 45 (Pharmingen) diluido 1:100 con 1% suero de conejo en PBS; o (10) un Aβ policlonal biotinilado de hámster específico para CD3e (Pharmingen) diluido 1:100 con 1% suero de conejo en PBS u (11) un mAb específico de rata para CD3 (Serotec) diluido 1:200 con 1% suero de conejo en PBS; o con (12) una solución de PBS que carece de un anticuerpo primario que contiene 1% de suero de caballo normal.

Secciones se hicieron reaccionar con soluciones de anticuerpo enumeradas en 1, 2 y 6 - 12 por encima eran superiores a los pretratados con 1,0% de Triton X-100, 0,4% de peróxido de hidrógeno en PBS durante 20 min a T A para bloquear la peroxidasa endógena. A continuación se incubaron durante toda una noche a 4°C con anticuerpo primario. Las secciones se hicieron reaccionar con 3D6 ó 8E5 o CD3e mAbs después se hicieron reaccionar durante una hora a T A con un complejo peroxidasa de rábano picante-avidina-biotina con componentes de kit "A" y "B" diluidos 1:75 en PBS (Kit Vector Elite Standard, Vector Labs, Burlingame, CA.). Las secciones se hicieron reaccionar con anticuerpos específicos para CD 45RA, CD 45RB, CD 45, CD3 y solución de PBS desprovista de anticuerpo primario se incubaron durante 1 hora a T A con anti-rat IgG biotinilado (Vector) diluido 1:75 en PBS o anti-ratón IgG biotinilado (Vector) diluido 1:75 en PBS, respectivamente. Las secciones después se hicieron reaccionar durante una hr a T A con un complejo peroxidasa de rábano picante-avidina-biotina-con los componentes de kit "A" y "B" diluido 1:75 en PBS (Kit Vector Elite Standard, Vector Labs, Burlingame, CA.).

Se desarrollaron las secciones en 0,01% de peróxido de hidrógeno, 0,05% de 3,3'- diaminobenzidina (DAB) a T A. Las secciones destinadas para incubación con los anticuerpos específicos de GFAP-, MAC-1- y MHC II se trataron previamente con 0,6% de peróxido de hidrógeno a T A para bloquear la peroxidasa endógena después se incubó durante toda una noche con el anticuerpo primario a 4°C. Las secciones que reaccionaron con el anticuerpo GFAP se incubaron durante 1 hr a T A con anti-ratón IgG biotinilado preparado en caballo (Laboratorios Vector; Kit Vectastain Elite ABC) diluido 1:200 con TBS. Las secciones a continuación se hicieron reaccionar durante una hr con un complejo avidina-biotina-peroxidasa (Laboratorios Vector; Kit Vectastain Elite ABC) diluido 1:1000 con TBS. Las secciones se incubaron con el anticuerpo monoclonal específico de MAC-1-o MHC II –como el anticuerpo primario se hicieron reaccionar posteriormente durante 1 hr a T A con anti-rat IgG biotinilado preparado en conejo diluido 1:200 con TBS, seguido de incubación durante hr con complejo avidina-biotina-peroxidasa diluido 1:1000 con TBS. Las secciones incubadas con anticuerpos específicos de GFAP-, MAC-1- y MHC II –se visualizaron después mediante tratamiento a T A con 0,05% de DAB. 0,01% de peróxido de hidrógeno, 0,04% de cloruro de níquel, TBS durante 4 y 11 min, respectivamente.

Las secciones inmunomarcadas se montaron sobre portaobjetos de vidrio (portaobjetos VWR, Superfrost), secados al aire durante toda una noche, se sumergieron en Propar (Anatech) y se cubrieron con cubreobjetos usando Permout (Fisher) como el medio de montaje.

Para teñir por contraste de fase las placas A β , un subconjunto de las secciones GFAP positivas se montaron sobre portaobjetos Superfrost y se incubaron en 1% Tioflavina S (Sigma) acuoso durante 7 min después del procesamiento de inmunohistoquímica. Las secciones después se deshidrataron y se limpiaron en Propar, después se montaron con cubreobjetos con Permout.

8. Análisis de Imagen

Un Sistema de Análisis de imagen Videometric 150 (Oncor, Inc., Gaithersburg, MD) unido a un microscopio Nikon Microphot-FX mediante una cámara de video y CCD y un monitor Sony Trinitron se usó para cuantificación de los portaobjetos inmunorreactivos. La imagen de la sección se almacenó en un tampón video y se determinó un umbral basado en color y saturación y se determinó para seleccionar y calcular el área pixelada total ocupada por las estructuras inmunomarcadas. Para cada sección, el hipocampo se perfiló manualmente y se calculó el área pixelada total ocupada por el hipocampo. El porcentaje de carga de amiloide se midió como: (la fracción del área de hipocampo que contiene depósitos A β inmunorreactivos con mAb 3D6) x 100. De manera similar, el porcentaje de carga neurítica se midió como: (la fracción del área de hipocampo que contiene neuritas distróficas reactivas con anticuerpo monoclonal 8E5) x100. El sistema de formación de imágenes C (Compix, Inc., Cranberry Township, PA) que funciona con el programa de aplicación Software Simple 32 Application se ligó a un microscopio Nikon Microphot-FX mediante una cámara Optronics y se usó para cuantificar el porcentaje de la corteza retroesplénica ocupado por astrositos positivos para GFAP y MAC-1- y microglia MHC II- positiva. La sección de la sección inmunorreactiva se almacenó en un tampón de video y se determinó un umbral basado en monocromo para seleccionar y calcular el área pixelada total ocupada por las células inmunomarcadas. Para cada sección, la corteza retroesplénica (RSC) se esbozó manualmente y se calculó el área pixelada total ocupada por la RSC. Se definió el porcentaje de como: (la fracción de RSC ocupada por astrositos reactivos a GFAP) X 100. De manera similar, el porcentaje de microgliosis se definió como: (la fracción de RSC ocupada por microglia reactiva a MAC-1- o MHC 11- 15) X 100. Para todos los análisis de imagen, seis secciones al nivel del hipocampo dorsal, cada una separadas por intervalos consecutivos de 240 μ m, se cuantificaron para cada animal. En todos los casos, el estado de tratamiento de los animales era desconocido para el observador.

XIV: Ensayo de selección ex vivo para determinar la actividad de un Anticuerpo contra depósitos de Amiloide

Se estableció un ensayo *ex vivo* en el que las células microgliales se cultivaron con secciones de criostato no fijadas de cerebros o bien de ratón PDAPP o AD con el fin de examinar los efectos de anticuerpos sobre la eliminación de placa. Las células microgliales se obtuvieron a partir de las cortezas cerebrales de ratones neonatos DBA/2N (1-3 días). Las cortezas se disociaron mecánicamente were en HBSS- (Solución Salina equilibrada de Hanks, Sigma) con 50 μ g/ml de ADNasa I (Sigma). Las células disociadas se filtraron con un tamiz de celda de 100 μ m (Falcon), y se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos. El sedimento se volvió a suspender en medio de crecimiento (DMEM alto en glucosa 10% de FBS, 25 ng/ml de rmGM-CSF), y las células se sembraron en placa a una densidad de 2 cerebros por matraz de cultivo de plástico T-75. Después de 7-9 días, los matraces se agitaron en un agitador orbital a 200 rpm durante 2h a 37°C. La suspensión de células se centrifugó a 1000 rpm y se volvió a suspender en medio de ensayo.

Secciones de 10 μ m de criostato de cerebros de ratón PDAPP o de AD (intervalo después de la muerte < 3hr) se montaron descongelados en cubreobjetos de vidrio redondos recubiertos de poli lisina y se colocaron en pocillos de placas de cultivo de tejido de 24 pocillos. Los cubreobjetos se lavaron dos veces con medio de ensayo que constaba de H-SFM (medio Hibridoma - sin suero, Gibco BRL) con 1% de FBS, glutamina, penicilina/estreptomicina, y 5ng/ml de rmGM-CSF (Ry D). Los anticuerpos de control o anti-A β se añadieron a una concentración 2x (5 μ g/ml final) durante 1 hora. Las células microgliales después se sembraron a una densidad de 0,8x 10⁶ células/ml de medio de ensayo. Los

cultivos se mantuvieron en un incubador humidificado (37°C, 5%CO₂) durante 24hr o más. Al final de la incubación los cultivos se fijaron con 4% de paraformaldehído y se permeabilizaron con 0,1% de Triton-X100. Las secciones se tiñeron con 3D6 biotinilado seguido de un conjugado de estreptavidina / Cy3 (Jackson ImmunoResearch). Las células microgiales exógenas se visualizaron mediante una tinción nuclear (DAPI). Los cultivos se observaron con un microscopio fluorescente invertido (Nikon, TE300) y se tomaron microfotografías con una cámara digital SPOT usando software SPOT (Diagnostic instruments). Para el análisis de transferencia de Western, los cultivos se extrajeron en 8M urea, diluido 1:1 en tampón de muestra de tricina y se cargaron en 16% de gel de tricina (Novex). Después de la transferencia sobre inmunoglobulina, se expusieron las transferencias a 5 µg/ml del pAbAβ42 seguido de anticuerpo anti-ratón-conjugado a HRP, y se desarrolló con ECL (Amersham)

Cuando el ensayo se realizó con las secciones de cerebro de PDAPP en la presencia de anticuerpo 16C11 (uno de los anticuerpos contra Aβ que no era eficaz *in vivo*), placas amiloides β permanecían intactas y no se observó ninguna fagocitosis. Por el contrario, cuando las secciones adyacentes se cultivaron en la presencia de 10D5, los depósitos de amiloides se ampliaron en gran medida y las células microgliales mostraron numerosas vesículas fagocíticas que contenían Aβ. Idénticos resultados se obtuvieron con secciones de cerebro de AD; 10D5 indujo fagocitosis de placas de AD, mientras que 16C11 era ineficaz. Además, el ensayo proporcionó resultados comparables cuando se realizó con células microgliales o bien de ratón o humanas, y con anticuerpos de ratón, de conejo, o de primates contra Aβ.

La Tabla 16 muestra los resultados obtenidos con varios anticuerpos contra Aβ, que compara sus capacidades para inducir fagocitosis en el ensayo *ex vivo* y para reducir *in vivo* la carga de placa en estudios de transferencia pasiva. Aunque 16C11 y 21F12 unidos a péptido Aβ agregado sintético con una alta avidéz, estos anticuerpos eran incapaces de reaccionar con placas amiloides β en secciones de cerebro no fijadas, pueden no desencadenar fagocitosis en el ensayo *ex vivo*, y cuando no son eficaces *in vivo*. 10D5, 3D6, y el anticuerpo policlonal contra Aβ era activo por las tres medidas. El anticuerpo 22C8 se une más fuertemente a una forma análoga de Aβ natural en la que ácido aspártico en las posiciones 1 y 7 se reemplaza con ácido iso-aspártico. Estos resultados muestran que la eficacia *in vivo* se debe a una eliminación mediada por anticuerpo directa de las placas dentro del SNC, y que el ensayo *ex vivo* es predictivo de la eficacia *in vivo*.

El mismo ensayo se ha usado para ensayar la eliminación de un anticuerpo contra un fragmento de sinucleína denominado NAC. La sinucleína se ha mostrado que es una proteína asociada a placa amiloide. Un anticuerpo para NAC se puso en contacto con una muestra de tejido de cerebro que contiene placas amiloides, células microgliales, como antes. Suero de conejo se usó como un control. El control posterior mostró una reducción marcada en el número y tamaño de placas indicativas de la actividad de eliminación del anticuerpo.

Tabla 16 El ensayo *ex vivo* como predictor de eficacia *in vivo*

Anticuerpo	Isotipo	Avidéz para Aβ agregado (pM)	Unión a placas de amiloide β	Eficacia <i>ex vivo</i>	Eficacia <i>in vivo</i>
monoclonal					
3D6	IgG2b	470	+	+	+
10D5	IgG1	43	+	+	+
16C11	IgG1	90	-	-	-
21F12	IgG2a	500	-	-	-
TM2a	IgG1	-	-	-	-
policlonal					
1 - 42	mixto	600	+	+	+

Se usó microscopía confocal para confirmar que Aβ se internalizó durante el curso del ensayo *ex vivo*. En la presencia de anticuerpos control, las células microgliales exógenas permanecían en el plano confocal por encima del tejido, no existían vesículas fagocíticas que contienen Aβ, y las placas permanecían intactas dentro de la sección. En la presencia de 10D5, casi todo el material de la placa estaba contenido en vesículas dentro de las células microgliales exógenas. Para determinar el destino del péptido internalizado, cultivos tratados con 10D5 se extrajeron con 8M urea en diversos momentos, y se examinaron con análisis de transferencia de Western. En momento de una hora, cuando todavía no se había producido la fagocitosis, reacción con un anticuerpo policlonal contra Aβ reveló una fuerte banda de 4 kD

(correspondiente al péptido A β). La inmunorreactividad de v disminuyó el día 1 y estaba ausente el día 3. De este modo, fagocitosis mediada por anticuerpo de A β conduce a su degradación.

5 Para determinar si la fagocitosis en el ensayo *ex vivo* estaba mediada por Fc, se prepararon fragmentos F(ab')₂ del anticuerpo anti-A β 3D6. Aunque los fragmentos F(ab')₂ retenían su capacidad total para reaccionar con las placas, eran incapaces de desencadenar fagocitosis mediante células microgliales. Además, fagocitosis con el anticuerpo completo se podría bloquear por un reactivo contra receptores Fc de tipo murino (anti-CD16/32). Estos datos indicant que la eliminación *in vivo* de A β se produce emdiante fagocitosis mediada por el receptor Fc.

XV: Pase de Anticuerpos a través de la barrera Sangre-Cerebro

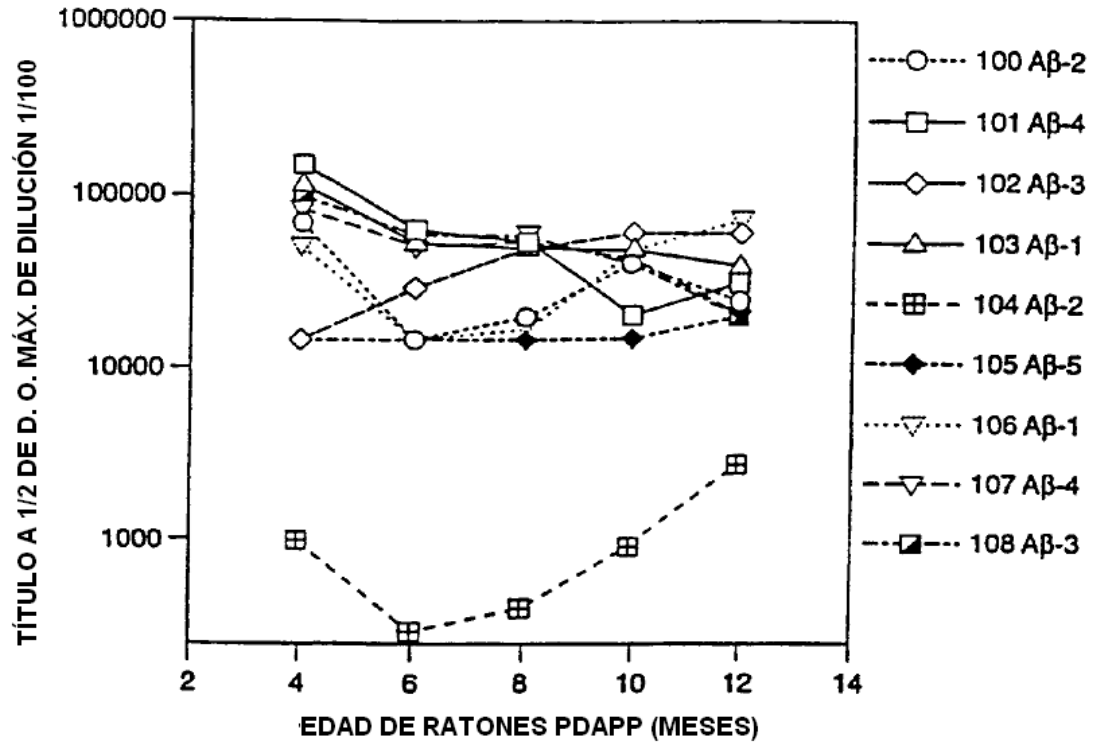
10 Estos experimentos descritos en el presente documento se realizaron con el fin de proporcionar información sobre la capacidad de anticuerpos de pasar dentro del cerebro después de inyección intravenosa y para proporcionar medios para medir la concentración de anticuerpo distribuido al cerebro después de inyección intravenosa en un tejido periférico de bien ratones normales o PDAPP. Tales mediciones son útiles en la predicción y determinación de dosificaciones eficaces.

15 Se prefundieron ratones PDAPP o normales control con 0,9% de NaCl. Regiones de cerebro (hipocampo o corteza) se diseccionaron y se congelaron rápidamente. Se homogeneizaron los cerebros en 0,1% de tritón + inhibidores de proteasa. Se detectó inmunoglobulina en los extractos mediante ELISA. IgG Anti-ratón de cabra de Fab'2 se recubrió sobre una placa RIA como reactivo de captura. Los extractos de suero o del cerebro se incubaron durante 1hr. Se detectaron los isotipos con IgG1-HRP anti-ratón o IgG2a-HRP o IgG2b-HRP (Caltag). Anticuerpos, independientemente de isotipo, estaban presentes en el SNC a una concentración que es 1:1000 que se encontró en la sangre. Por ejemplo, 20 cunado la concentración de IgG1 era tres veces la de IgG2a en la sangre, era tres veces IgG2a en el cerebro también, estando ambos presentes en un 0,1% de sus niveles respectivos en la sangre. Este resultado se observó en ratones tanto transgénicos como no transgénicos - así PDAPP no tienen exclusivamente la barrera sangre cerebro permeable.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica, que comprende un componente amiloide eficaz para inducir una respuesta inmune en un paciente, un excipiente farmacéutico y un adyuvante que provoca o aumenta la respuesta inmune al componente amiloide, para uso en el tratamiento de un trastorno, que **se caracteriza por** deposición de amiloide, en la que el componente amiloide se selecciona entre el grupo que consta de AH, cadena Lambda de AL, AApoA1, ATTR, Alys, Agel, AB₂M AANF, AIAPP, Acal y sinucleína-NAC.
2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el componente amiloide es un componente de fibrilla.
3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que dicha composición comprende al menos dos componentes amiloides diferentes.
4. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que dicho componente amiloide es un péptido ligado a una proteína vehículo.
5. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que dicho adyuvante se selecciona entre el grupo que consta de Q821, monofosforil lípido, alumbre y adyuvante de Freund.
6. La composición de la reivindicación 1, en la que dicha respuesta inmune **se caracteriza por** un título en suero de al menos 1:1000 con respecto a dicho componente amiloide.
7. La composición de la reivindicación 6, en la que dicho título en suero es al menos 1:5000 con respecto a dicho componente.
8. La composición de la reivindicación 1, en la que dicha respuesta inmune **caracterizado por** una cantidad en suero de inmunorreactividad correspondiente a mayor que aproximadamente cuatro veces mayor que un nivel en suero de inmunorreactividad medida en una muestra de suero de control de pretratamiento.
9. La composición de la reivindicación 8, en la que dicha cantidad en suero de inmunorreactividad se mide a una dilución en suero de aproximadamente 1:100.
10. Un procedimiento de determinación de la prognosis de un paciente sometido a tratamiento para un trastorno amiloide, que comprende la medición de una cantidad en suero de paciente de la inmunorreactividad contra un componente amiloide seleccionado en una muestra de paciente, en el que una cantidad en suero de paciente de inmunorreactividad de al menos cuatro veces de un nivel de control de la línea base de inmunorreactividad en suero del paciente antes de tratamiento es indicativo de una prognosis de estado mejorado con respecto a dicho trastorno, en el que el componente amiloide se selecciona entre el grupo que consta de AH, cadena Lambda de AL, AApoA1, ATTR, Alys, Agel, AB₂M AANF, AIAPP, Acal y sinucleína-NAC.
11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que dicha cantidad de inmunorreactividad en suero del paciente contra dicho componente amiloide **caracterizado por** un título en suero de al menos aproximadamente 1:1000, preferiblemente al menos aproximadamente 1:5000.
12. Un anticuerpo que específicamente se une a un componente amiloide presente en un depósito amiloide para uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad **se caracteriza por** dicho depósito amiloide, en el que dicho componente amiloide se selecciona entre el grupo que consta de AH, cadena Lambda de AL, AApoA1, ATTR, Alys, Agel, AB₂M, AANF, AIAPP, Acal y sinucleína-NAC.
13. El anticuerpo de la reivindicación 12, en el que dicho componente amiloide es un componente de fibrilla.
14. El anticuerpo de la reivindicación 13, en el que dicho anticuerpo se une a un epítipo de dicho componente de fibrilla.
15. El anticuerpo de la reivindicación 14, en el que el anticuerpo específicamente se une a dicho componente de fibrilla sin unirse a un precursor de dicho componente de fibrilla.
16. El anticuerpo de la reivindicación 15, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humano a dicho componente de fibrilla preparado a partir de células B de un ser humano inmunizado con un epítipo de componente de fibrilla.
17. El anticuerpo de la reivindicación 13, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humano.
18. El anticuerpo de la reivindicación 13 en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
19. El anticuerpo de la reivindicación 13, en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico.
20. El anticuerpo de la reivindicación 13, en la que el anticuerpo es un isotipo de IgG1 humano.

- 5 **21.** Una composición farmacéutica para uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad **que se caracteriza por** deposición de amiloide, comprendiendo dicha composición un anticuerpo que específicamente se une a un componente amiloide presente en un depósito amiloide en combinación con un segundo anticuerpo que se une a un segundo componente amiloide presente en el depósito amiloide, en la que el componentes amiloides se selecciona entre el grupo que consta de AH, cadena Lambda de AL, AApoA1, ATTR, Alys, Agel, AB₂M, AANF, AIAPP, Acal y sinucleína-NAC.
- 22.** El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 12 - 20 o la composición de la reivindicación 21 que se adaptado para la administración por vía intraperitoneal, oral, subcutánea, intramuscular, intranasal, tópica o intravenosa.
- 23.** El anticuerpo o la composición de las reivindicaciones 12 - 22 que está adaptado para administrarse en dosis múltiples durante un período de al menos seis meses.
- 10 **24.** El anticuerpo o la composición de las reivindicaciones 12 - 22, que está adaptado para ser administrado como una composición de liberación sostenida.

TÍTULO DE RATONES PDAPP INYECTADOS CON A β ₄₂ AGREGADO CON EL TIEMPO**FIG._1**

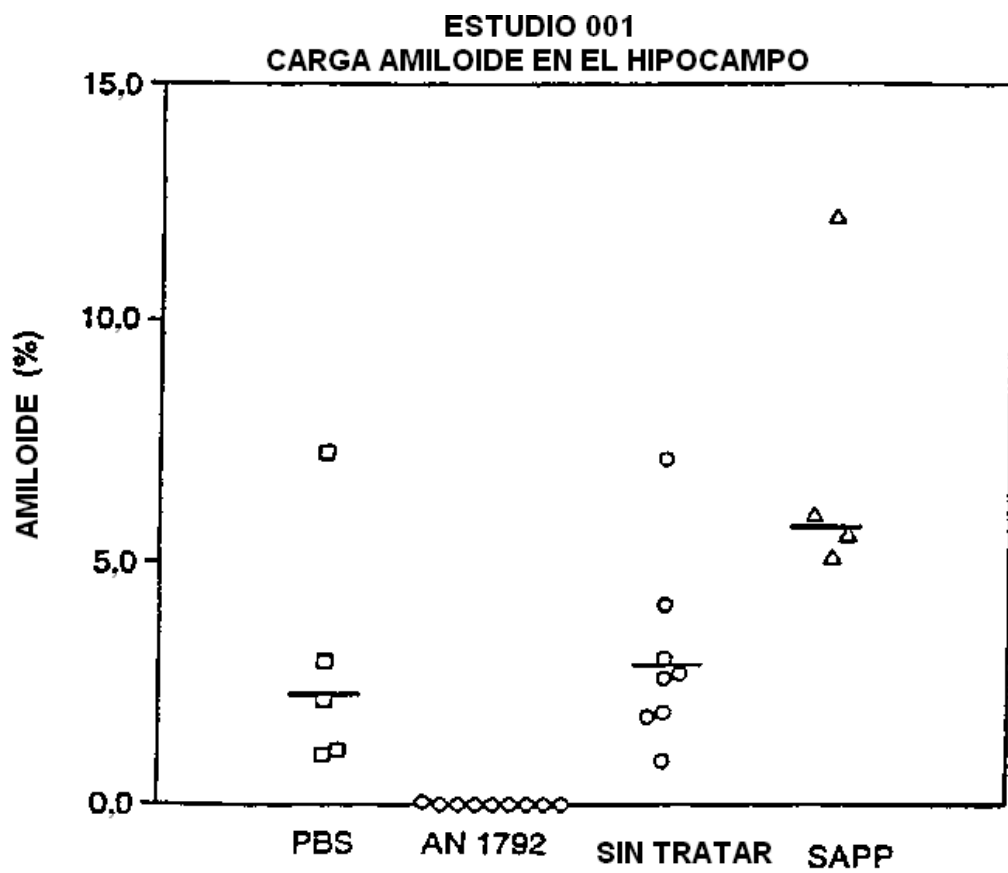


FIG._2

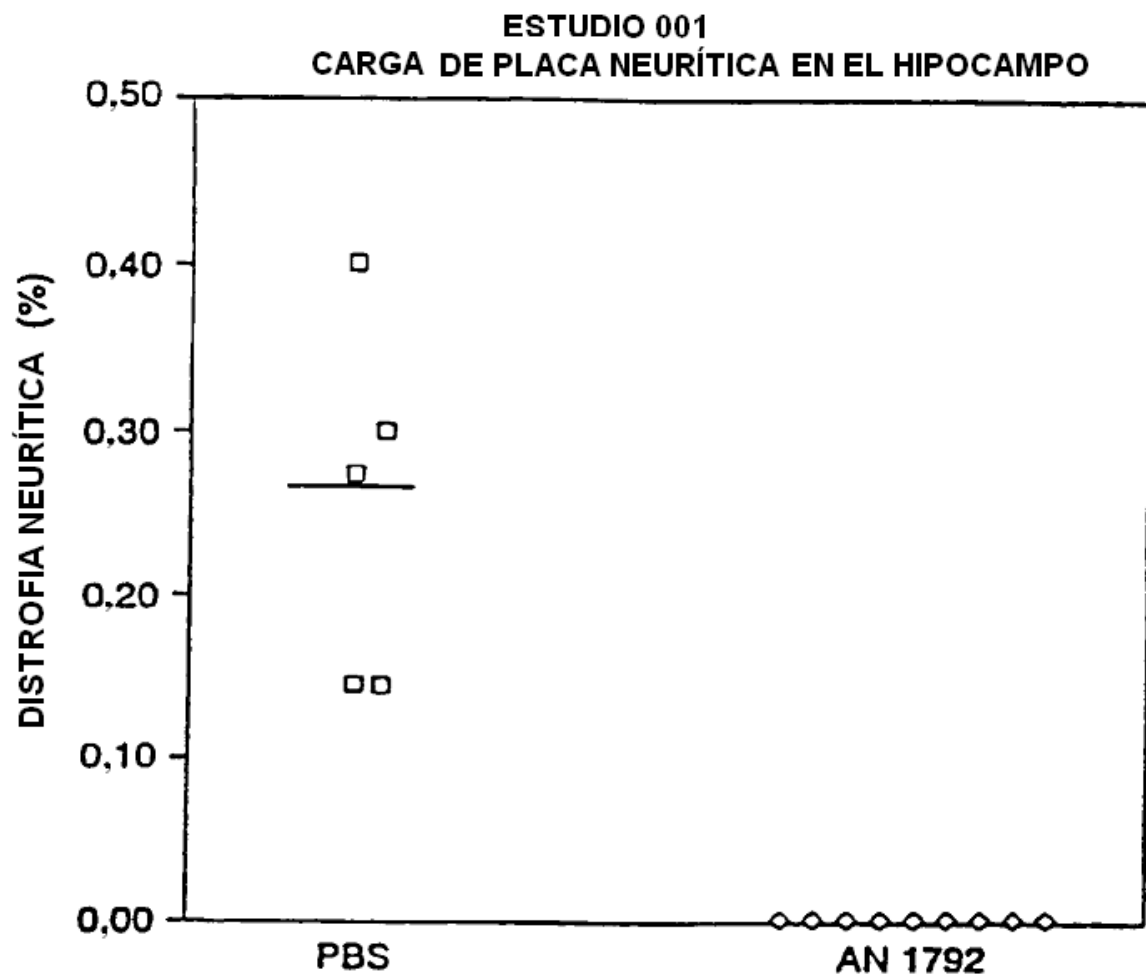
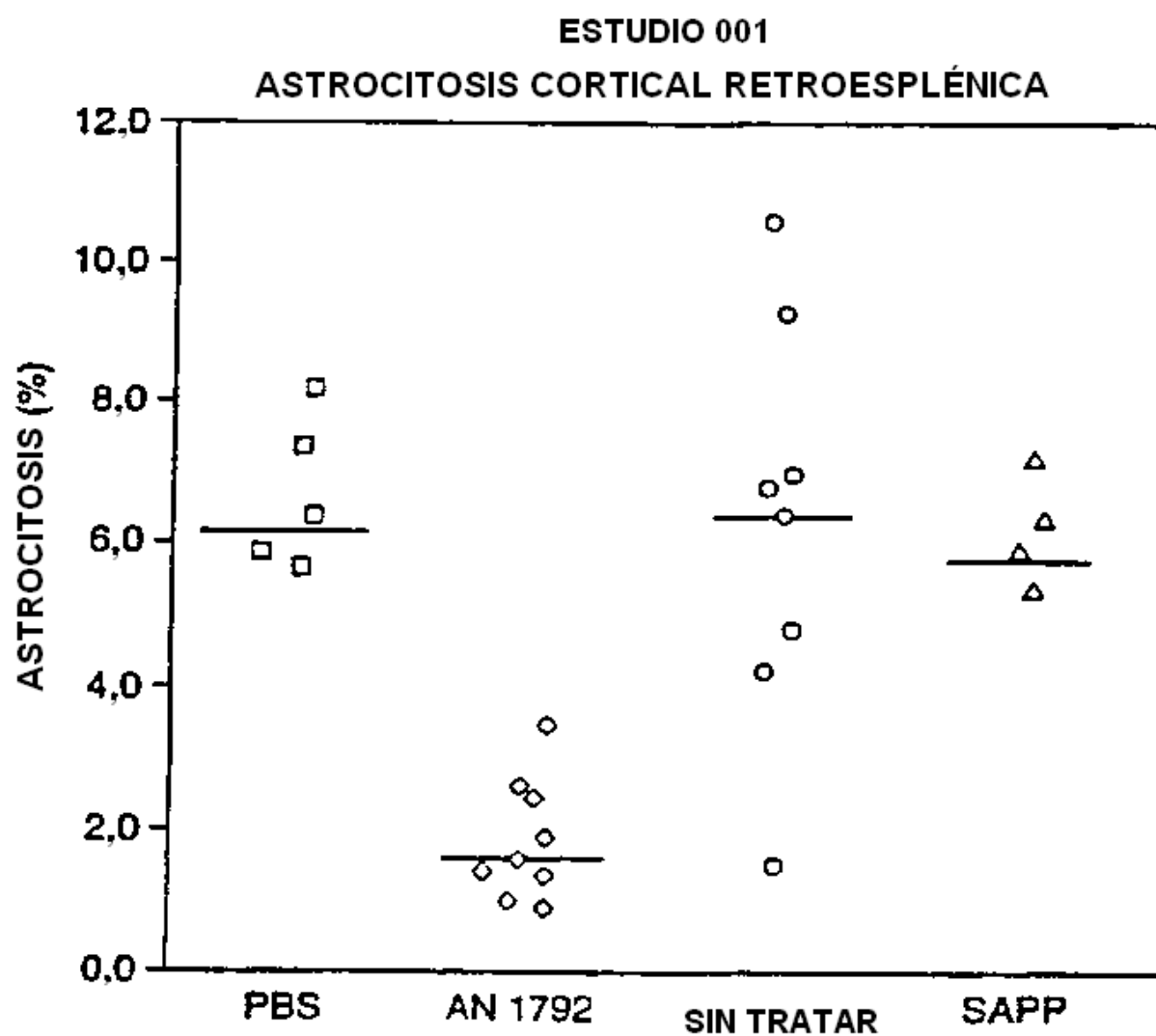
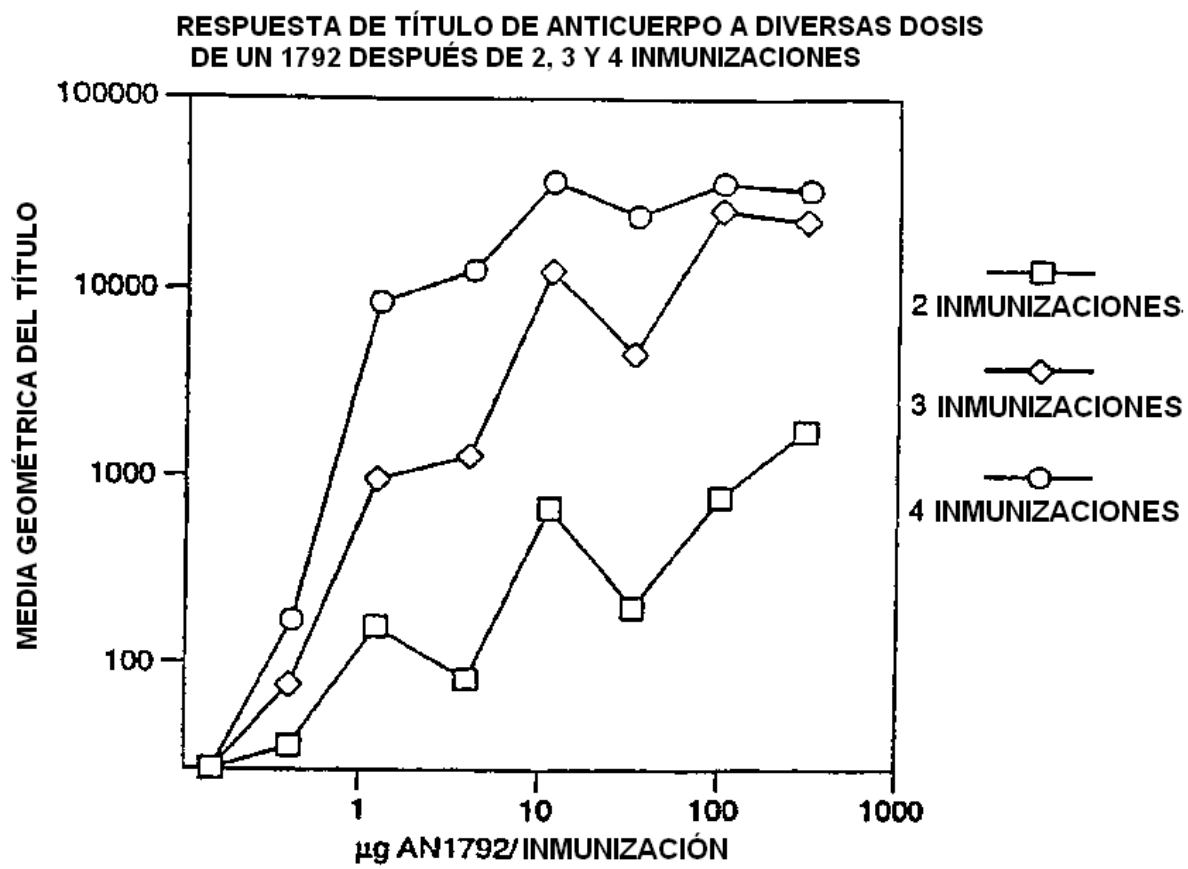
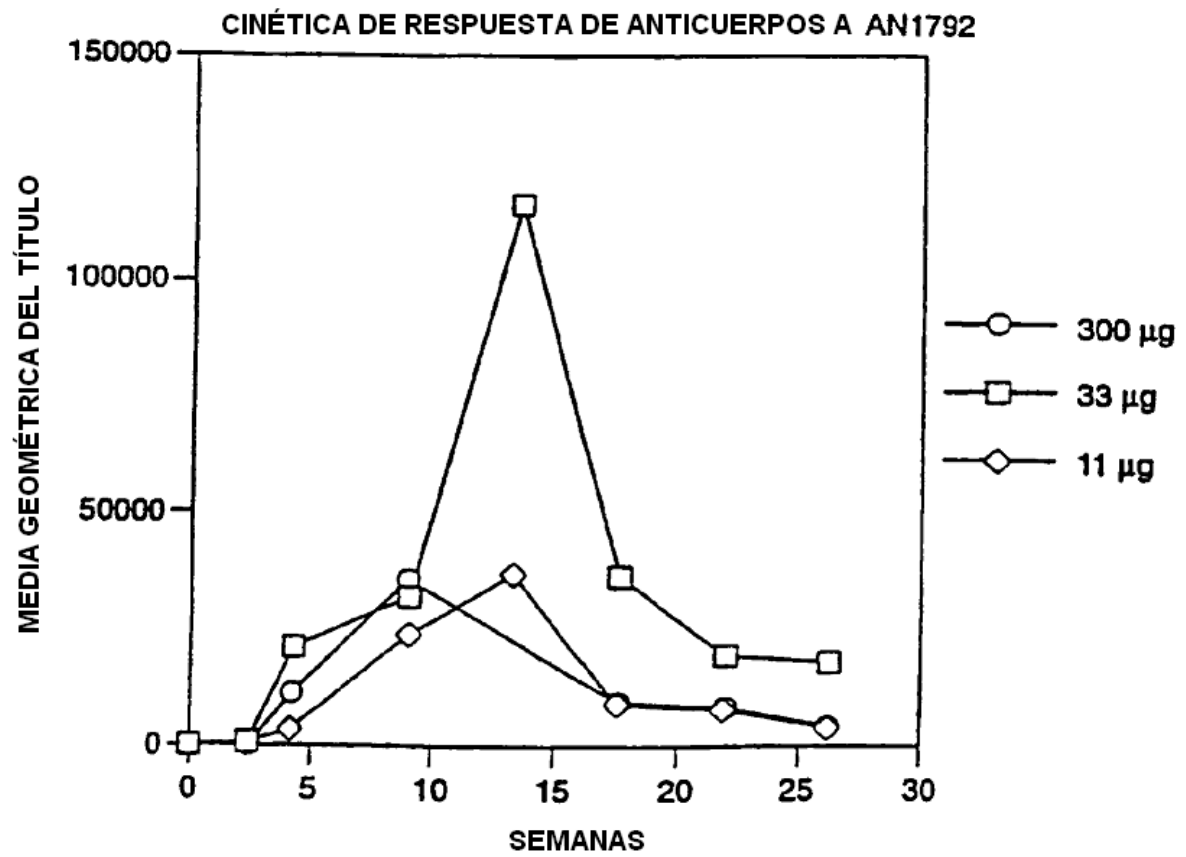


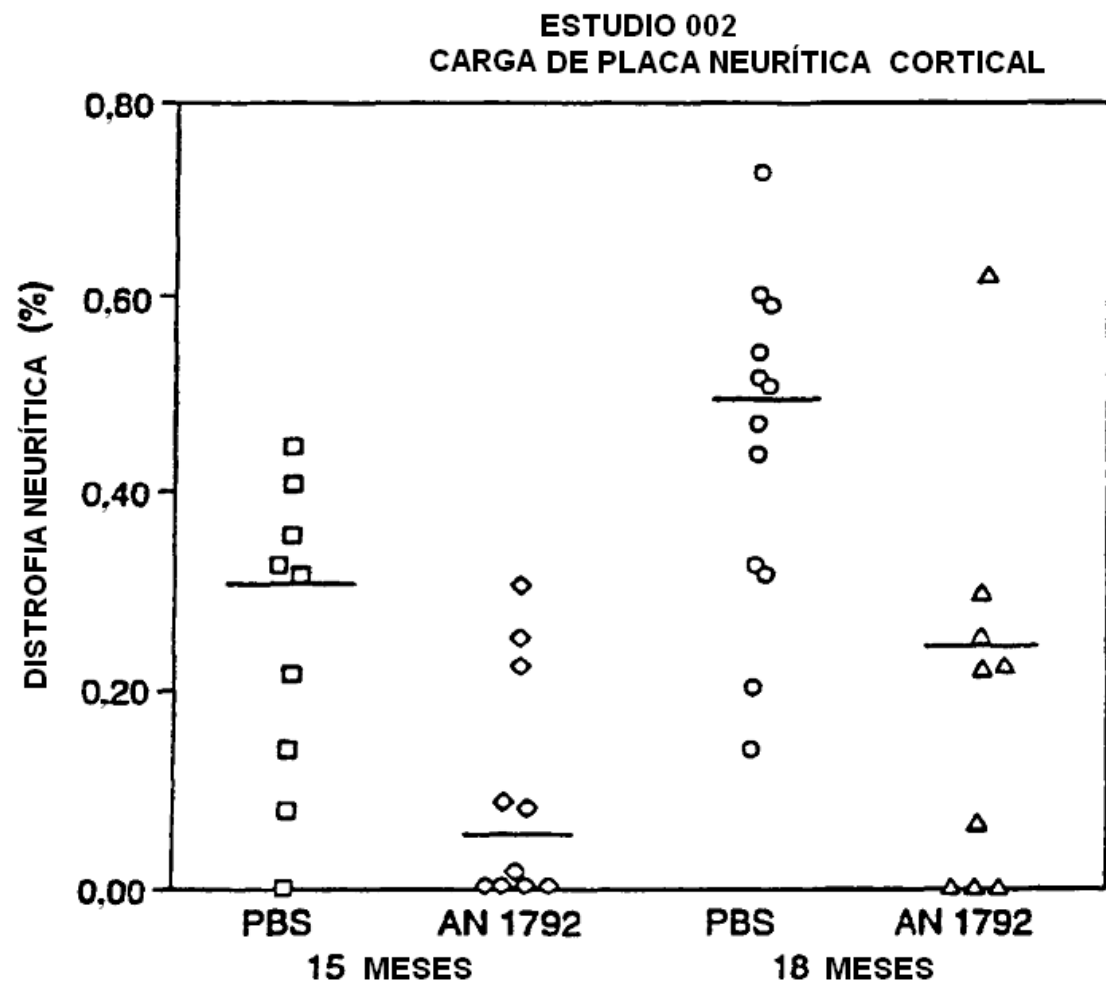
FIG._3

**FIG._4**

**FIG._5**

**FIG._6**





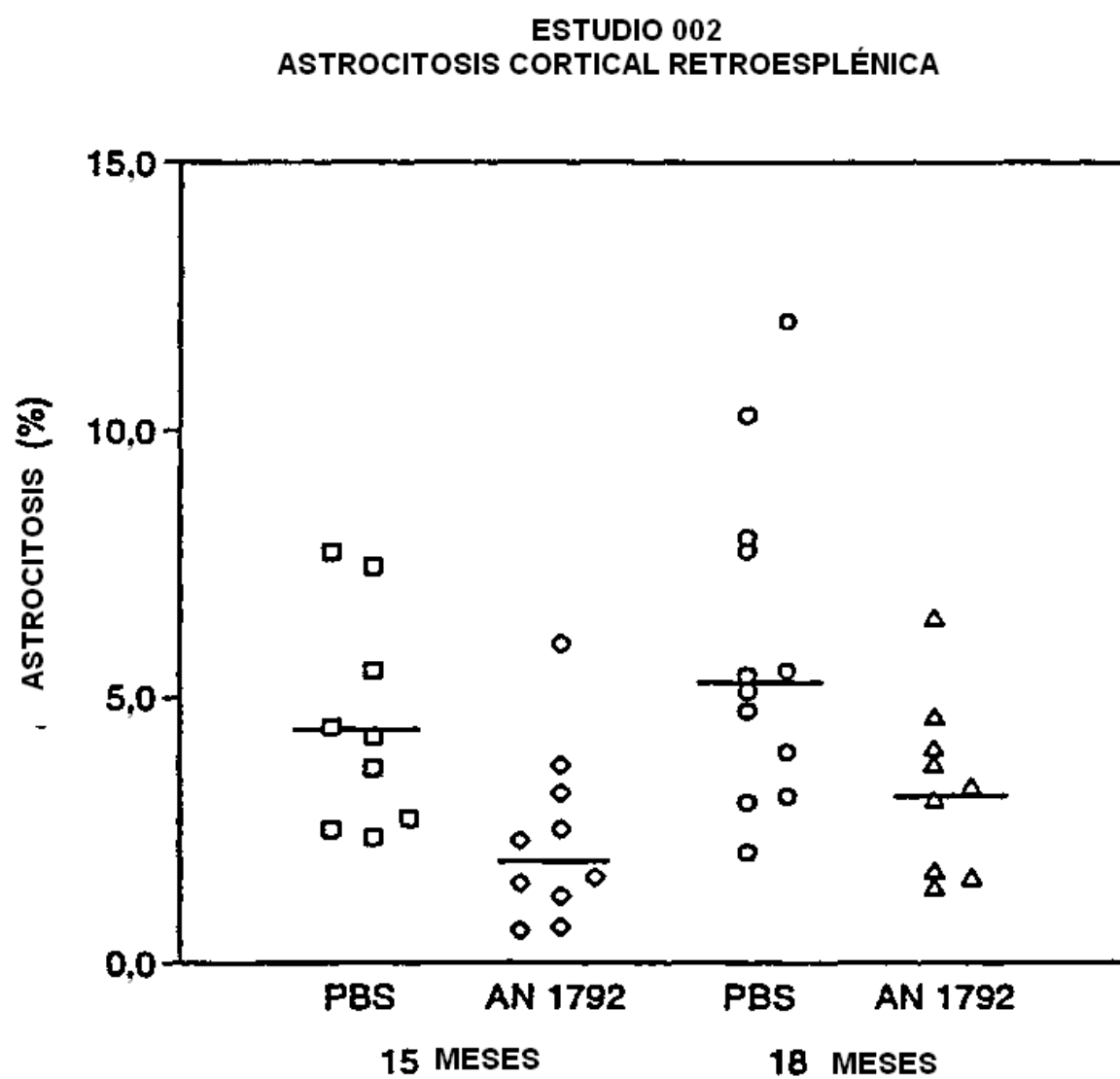
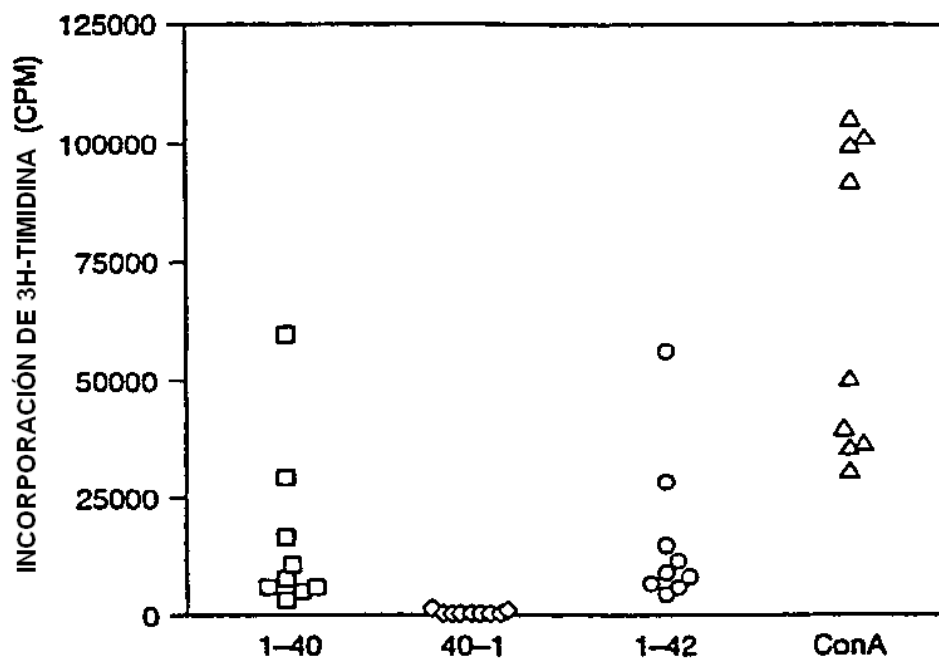


FIG. _9

ESTUDIO 002
ASTROCITOSIS CORTICAL RETROESPLÉNICA

GRUPO TRATADO CON AN1792



GRUPO TRATADO CON PBS

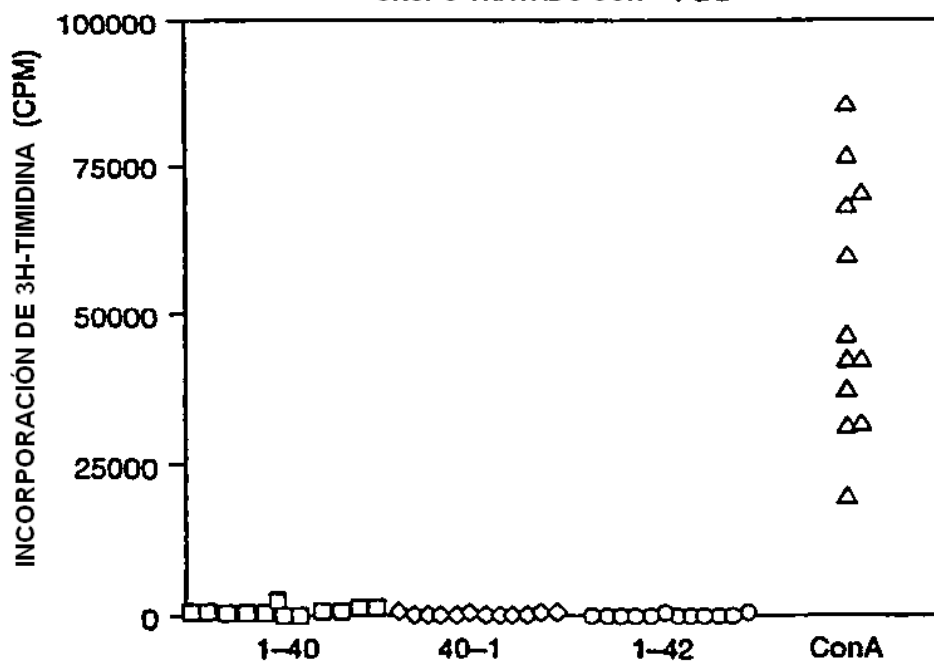


FIG._10

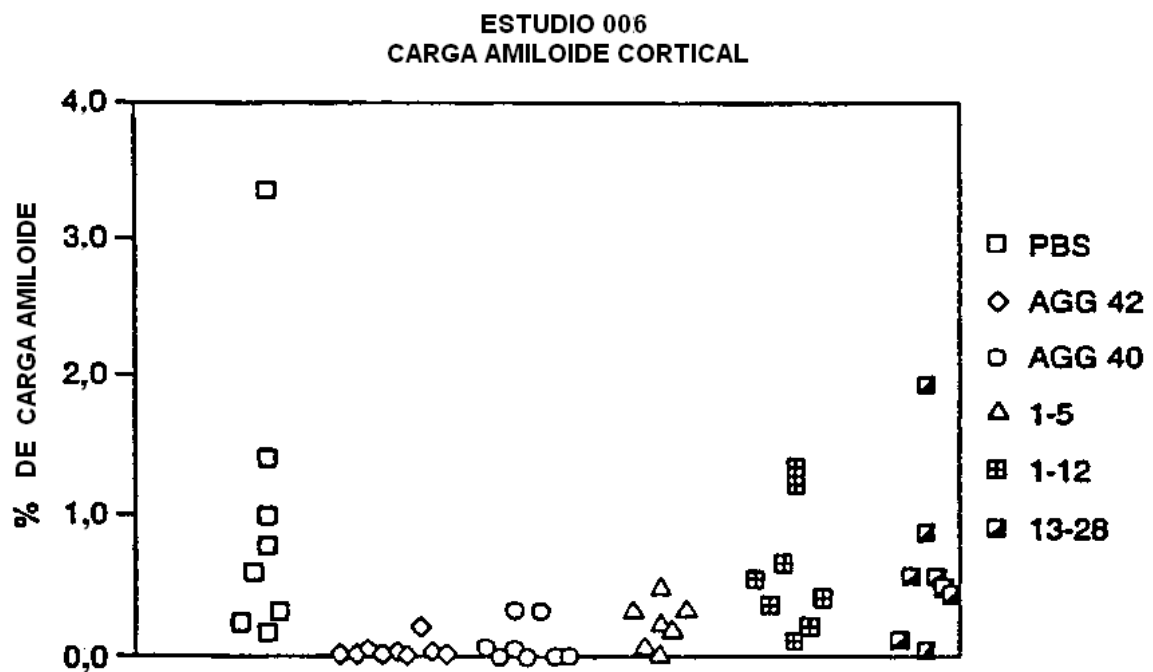
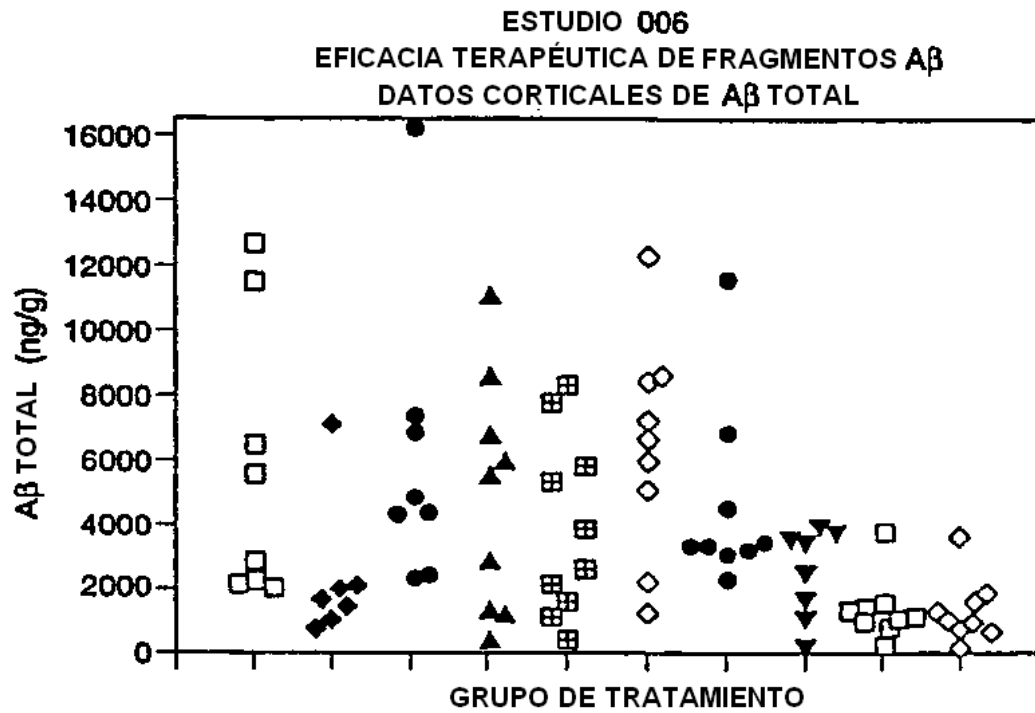
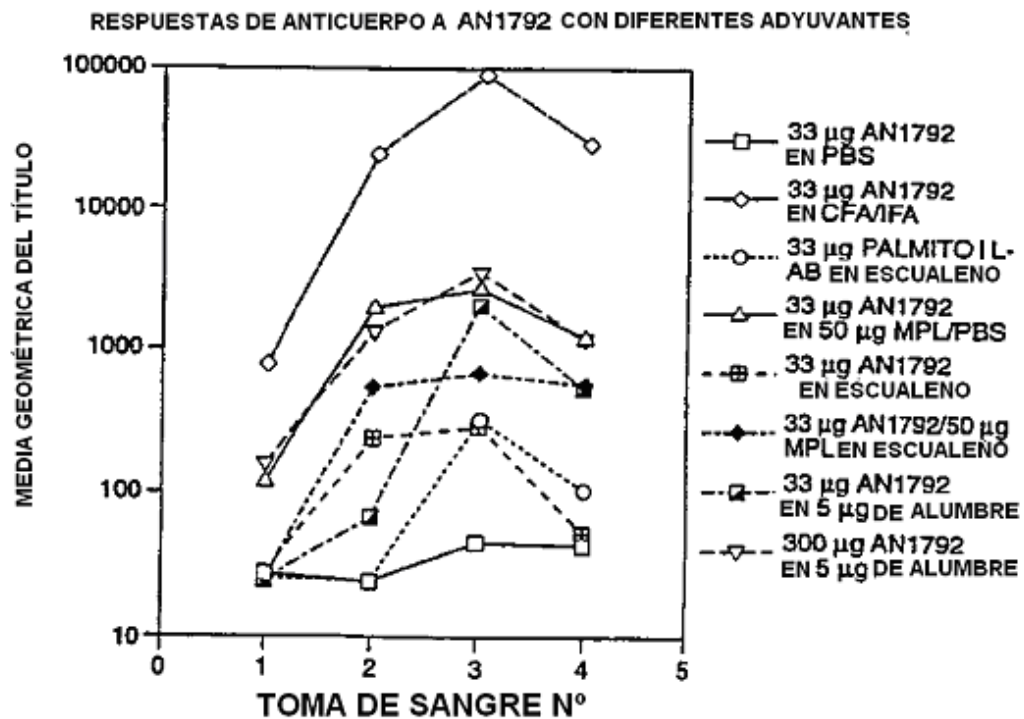
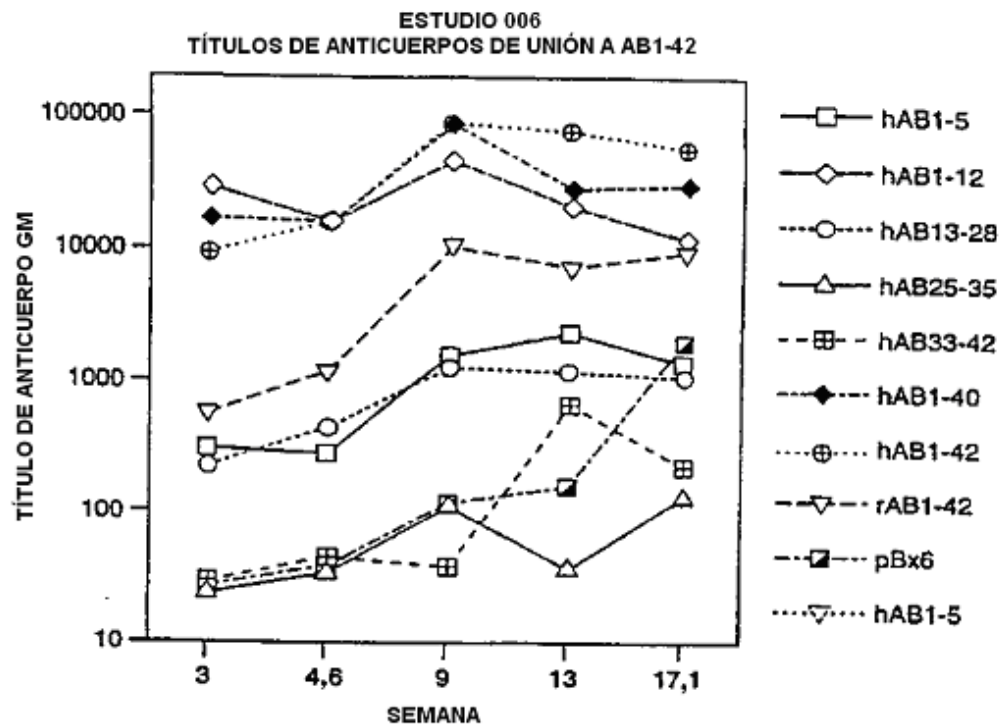


FIG._12



CORTEZA

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

FIG._15A

CORTEZA

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

FIG._15B

CORTEZA

25 µg QS21 100 µg AN1528		CEA/IFA 100 µg AN1792	
615-128	1257	539-068	693
616-129	361	640-069	508
617-130	1008	641-070	440
536-131	3290	642-071	467
637-132	2520	690-072	42
638-133	3880	691-073	2491
744-134	627	692-074	121
745-135	58	795-075	137
746-136	2610	796-076	822
747-137	1509	797-077	475
769-138	1788	748-087	600
770-139	988	749-079	78
773-140	1199	750-080	1267
774-141	339	751-081	1351
775-142	402	761-082	69
776-143	537		
840-144	1119		
841-145	194		
821-146	1259		
822-147	5413		
823-148	2233		
MEDIANA DEL VALOR p (M-W)	1199	MEDIANA DEL VALOR p (M-W)	475 0,0481
MEDIA DE LA DESV. ESTÁNDAR. % CV DEL VALOR DE p (ENSAYO t)	1552 1364 88 n=21	MEDIA DE LA DESV. ESTÁNDAR. % CV DEL VALOR DE p (ENSAYO t)	637 655 103 0,0106 n=15

FIG._15C

CORTEZA

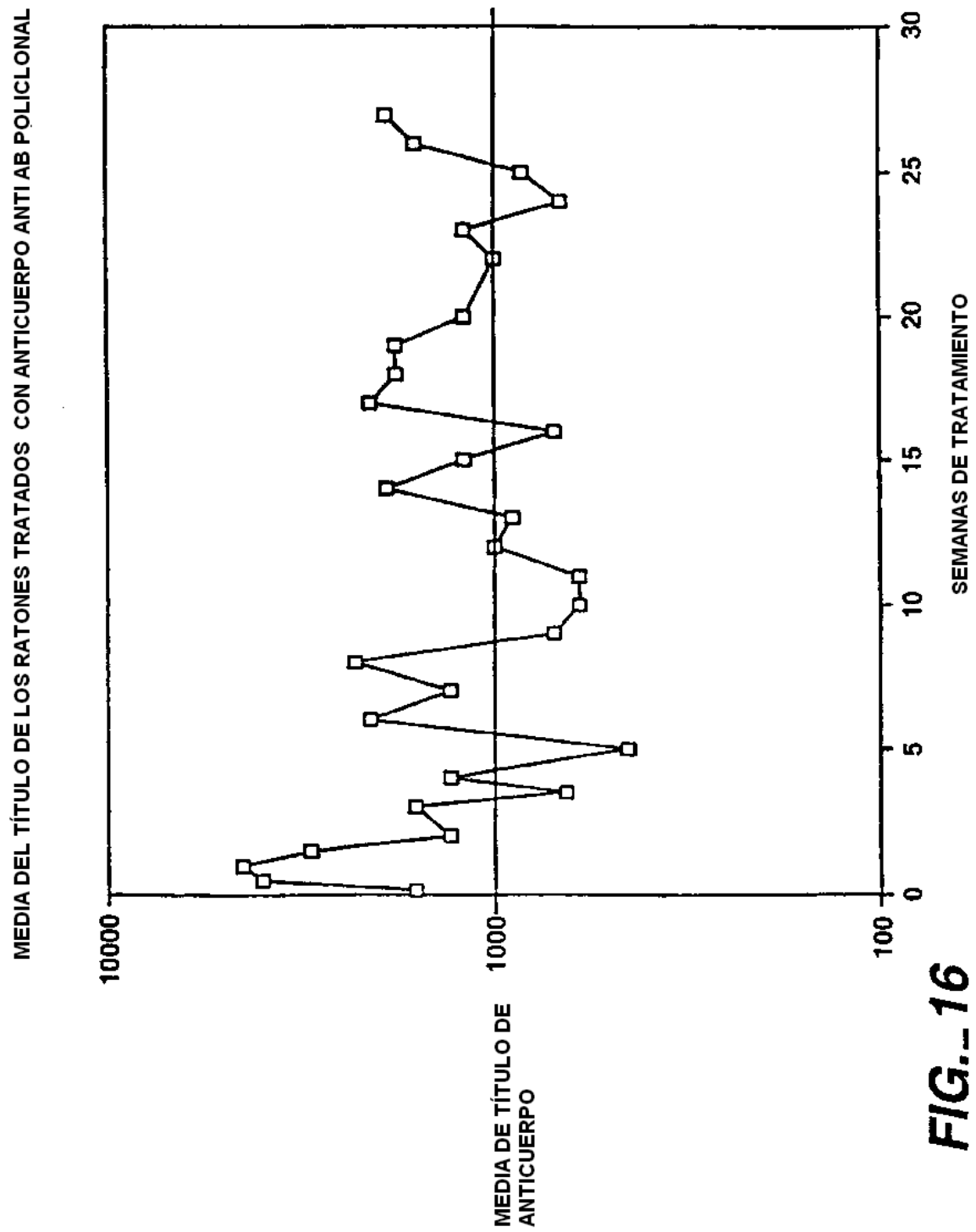
5 µg TIMEROSAL/PBS 10 µg AN1792		2 µg ALUMBRE 100 µg AN1792	
635-149	1337	610-001	432
669-150	4644	611-002	1012
670-151	6335	612-003	3607
673-152	3700	613-004	508
674-153	2750	620-005	465
676-154	1687	621-006	16
681-156	185	622-007	28
682-157	8031	623-008	217
683-158	3450	708-009	2738
754-159	157	709-010	927
755-160	6857	710-011	1609
756-161	482	716-012	1608
805-162	524	784-014	3890
806-163	397	785-015	1614
807-164	234	786-018	285
		787-017	3102
		788-018	1617
		789-019	1474
		815-020	424
		816-021	1375
		817-022	2323
MEDIANA DEL VALOR p (M-W)	1687	MEDIANA DEL VALOR p (M-W)	1375 0,5000
MEDIA DE LA DESV. ESTÁNDAR. % CV DEL VALOR DE p (ENSAYO t)	2718 2685 99 n=15	MEDIA DE LA DESV. ESTÁNDAR. % CV DEL VALOR DE p (ENSAYO t)	1394 1166 84 0,2650 n=21

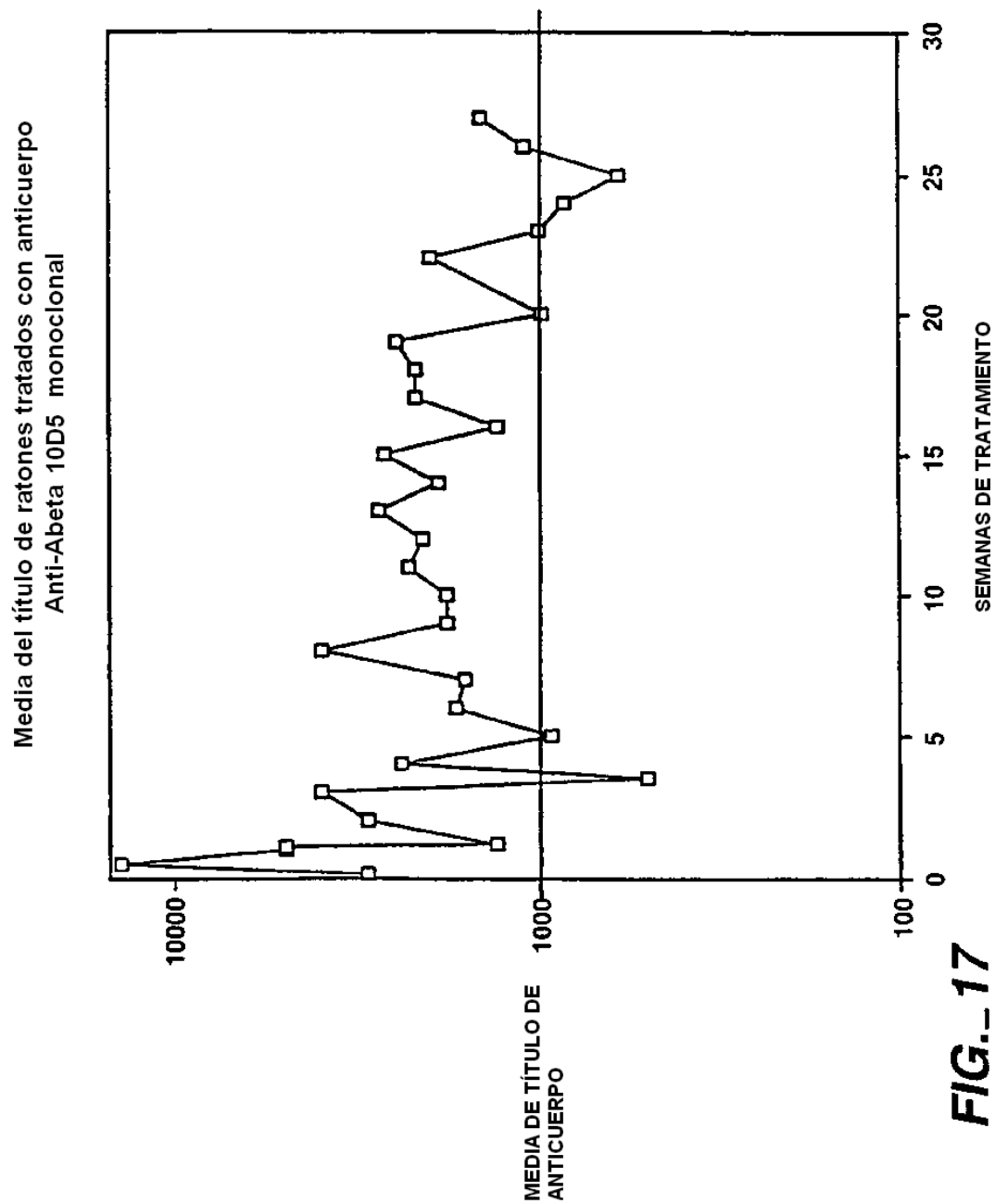
FIG._15D

CORTEZA

50 µg MPL 100 µg AN1792		25 µg QS21 100 µg AN1792	
646-023	2002	627-045	91
647-024	147	628-046	3397
648-025	1304	631-049	3702
649-026	34	632-050	1776
650-027	980	667-052	1832
724-028	1282	668-053	3023
726-030	1966	686-054	189
727-031	733	687-055	891
720-032	2563	688-056	240
721-033	5563	689-057	110
802-034	113	712-059	3311
803-035	671	825-061	1009
804-036	51	826-082	18165
811-037	613	827-063	73
812-038	332	828-064	78
813-039	1454	837-065	1051
814-040	2441	838-066	270
833-014	742	839-067	371
834-042	40		
836-044	807		
MEDIANA DEL VALOR p (M-W)	774 0,1710	MEDIANA DEL VALOR p (M-W)	950 0,4076
MEDIA DE LA DESV. ESTÁNDAR.	1192 1299	MEDIA DE LA DESV. ESTÁNDAR.	2199 4187
% CV DEL VALOR	109	% CV DEL VALOR	190
DE p (ENSAYO t)	0,1506 n=21	DE p (ENSAYO t)	0,8131 n=18

FIG._15E





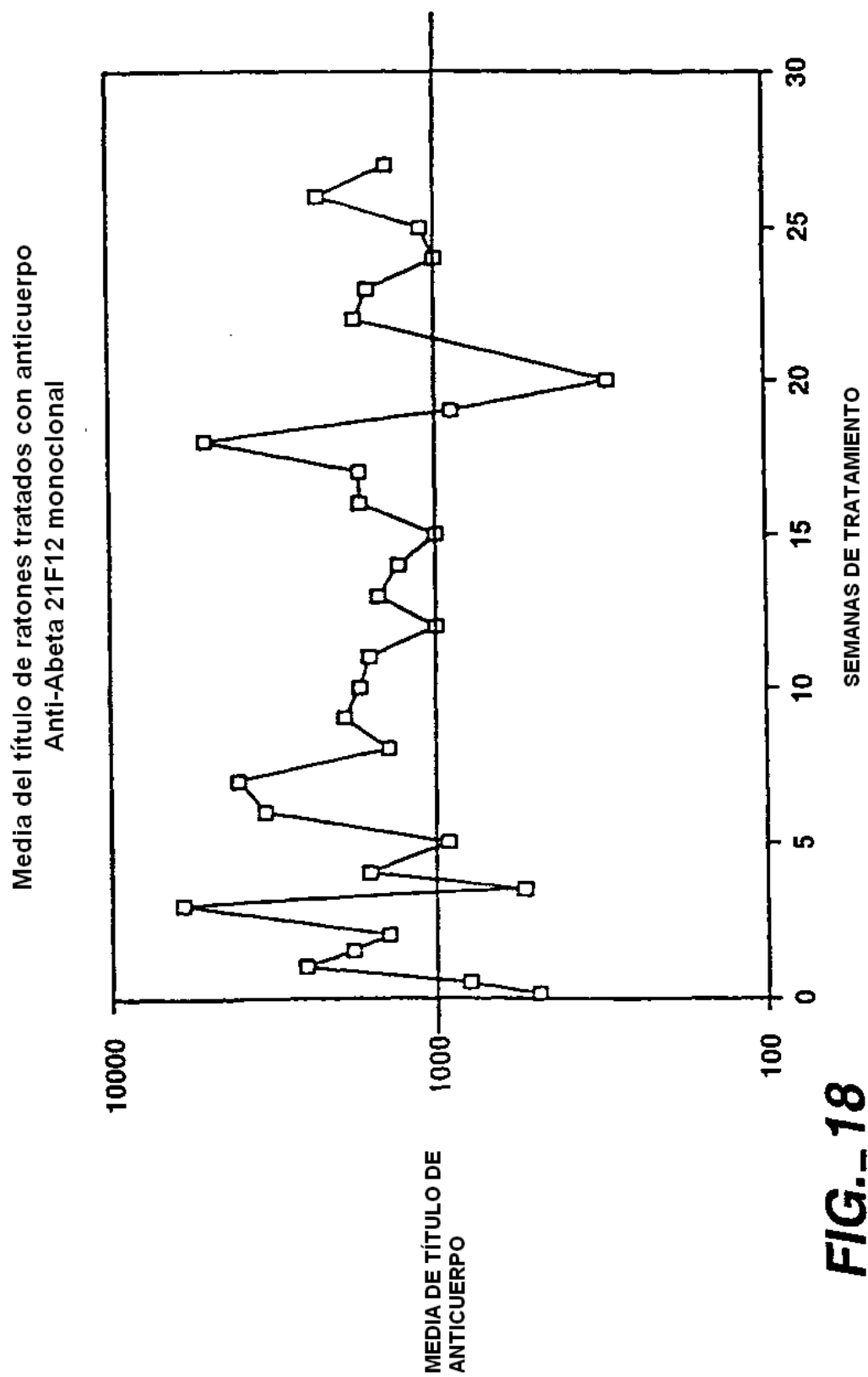


FIG. 18