



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 203**

51 Int. Cl.:
A61K 35/76 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06734085 .1**
96 Fecha de presentación : **31.01.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1853285**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.11.2007**

54 Título: **Método para tratar una inflamación asociada a depósitos amiloides y una inflamación cerebral que implica una microglia activada.**

30 Prioridad: **01.02.2005 US 648383 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.07.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.07.2011

73 Titular/es: **Ramot at Tel-Aviv University Ltd.**
P.O. Box 39296
32, Haim Levanon Street
61392 Tel Aviv, IL

72 Inventor/es: **Solomon, Beka y**
Goren, Orna

74 Agente: **No consta**

ES 2 363 203 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

Método para tratar una inflamación asociada a depósitos amiloides y una inflamación cerebral que implica una microglia activada.

5

Sector de la técnica

La invención se refiere a la inhibición de la formación de depósitos amiloides y a la disolución de depósitos amiloides pre-formados y a productos y compuestos farmacéuticos para tratar la inflamación cerebral y para tratar la inflamación asociada a los depósitos amiloides o similares a amiloides en el cerebro y en otras partes del cuerpo.

10

Estado de la técnica

Las enfermedades en las que se forman placas se caracterizan por la presencia de depósitos de placas amiloides en el cerebro así como por degeneración neuronal. Los depósitos amiloides se forman por péptidos agregados a una masa insoluble. La naturaleza del péptido varía según la enfermedad pero en la mayoría de los casos, el agregado tiene una estructura de lámina beta y se tiñe con tinción Rojo del Congo. Además de la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Alzheimer de aparición precoz, la enfermedad de Alzheimer de aparición tardía, la enfermedad de Alzheimer presintomática, otras enfermedades caracterizadas por depósitos amiloides son, por ejemplo, la amiloidosis SAA, el síndrome islandés hereditario, el mieloma múltiple, y las enfermedades priónicas. La enfermedad priónica más común en animales son el temblor epidémico (escrapie) de ovejas y cabras y la encefalopatía espongiforme (BSE) del ganado (Wilesmith y Wells, 1991). En los humanos se han identificado cuatro enfermedades priónicas: (i) Kuru, (ii) la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), (iii) la enfermedad Gerstmann-Straussler-Sheinker (GSS), y (iv) y el insomnio familiar fatal (FFI) (Gajdusek, 1977; y Tritschler *et al.* 1992).

15

20

25

Las enfermedades priónicas implican la conversión de la proteína priónica celular normal (PrPC) en la correspondiente isoforma escrapie (PrPSc). Las mediciones espectroscópicas demuestran que la conversión de PrPC en la isoforma escrapie (PrPSc) supone una importante transición de conformación, implicando que las enfermedades priónicas, como otras enfermedades amiloidogénicas, son trastornos de la conformación proteínica. La transición de PrPC a PrPSc está acompañada de una disminución de la estructura secundaria α -helicoidal (del 42% al 30%) y de un notable incremento del contenido en lámina beta (del 3% al 43%) (Caughey *et al.*, 1991; y Pan *et al.*, 1993). Esta reestructuración está asociada a propiedades fisicoquímicas anormales, incluyendo la insolubilidad de detergentes no desnaturalizantes y la resistencia parcial a la proteólisis. Estudios anteriores han mostrado que un péptido sintético homólogo a residuos 106-126 de PrP humano (PrP106-126) muestra algunas de las propiedades fisicoquímicas y patogénicas de PrPSc (Selvaggini *et al.*, 1993; Tagliavini *et al.*, 1993; y Forloni *et al.*, 1993). El péptido muestra un notable polimorfismo conformacional, adquiriendo diferentes estructuras secundarias en diversos entornos (De Gioia *et al.*, 1994). Tiende a adoptar una conformación de lámina beta en soluciones tamponadas y se acumula en fibrillas amiloides que son resistentes en parte a la digestión con proteasa. Recientemente, los estudios cristalográficos por rayos x de un complejo de anticuerpos 3F4 y su epitopo péptido (PrP104-113) han proporcionado una visión estructural de esta flexible región que se considera es un componente de la reestructuración conformacional esencial para el desarrollo de una enfermedad priónica (Kanyo *et al.*, 1999). La identificación de clases de secuencias que participan en los procesos de plegado-desplegado y/o solubilización-agregación puede abrir una nueva vía en el tratamiento de enfermedades que forman placas, basado en la prevención de la agregación y/o la inducción de la desagregación (Silen y Agard, 1989; Frenkel *et al.*, 1998; Horiuchi y Caughey, 1999).

30

35

40

45

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno progresivo que tiene como resultado la demencia senil. De manera general, la enfermedad presenta dos categorías: la aparición tardía que se produce en la vejez (normalmente pasados los 65 años) y la aparición precoz que se desarrolla mucho antes del periodo senil, entre los 35 y 60 años por ejemplo. En ambos tipos de enfermedad, la patología es similar, pero las anomalías tienden a ser más graves y generalizadas en los casos que comienzan a una edad temprana. La enfermedad se caracteriza por dos tipos de lesiones del cerebro, las placas seniles y los nudos neurofibrilares. Las placas seniles son áreas de neutrófilos desorganizados de hasta 150 nm con depósitos amiloides extracelulares en el centro, visibles mediante análisis microscópico de secciones de tejido cerebral. Los nudos neurofibrilares son depósitos intracelulares de proteína tau consistentes en dos filamentos enrollados entre sí en parejas.

50

55

El principal componente de las placas seniles es un péptido denominado $A\beta$ o péptido beta-amiloide (β AP). El péptido beta-amiloide es un fragmento interno de 39-43 aminoácidos de una proteína precursora denominada proteína precursora de amiloide (PPA). Varias mutaciones de la proteína PPA han sido correlacionadas con la presencia de la enfermedad de Alzheimer (Ver, por ej., Goate *et al.*, Nature 349,704, 1991, valina717 a isoleucina; Chartier Harían *et al.* Nature 353, 844, 1991, valina717 a glicina; Murrell *et al.*, Science 254, 97, 1991, valina717 a fenilalanina; Mullan *et al.*, Nature Genet. 1, 345, 1992, una mutación doble, cambiando lisina595-metionina596 por asparagina595-leucina596).

60

65

Se cree que tales mutaciones causan la enfermedad de Alzheimer por el procesamiento incrementado o alterado de la PPA en beta-amiloide, en particular, por el procesamiento de la PPA en cantidades mayores de la forma larga del beta-amiloide (es decir, $A\beta$ 1-42 y $A\beta$ 1-43). Se cree que las mutaciones en otros genes, como los genes de la presenilina, PS1 y PS2, afectan indirectamente el procesamiento de la PPA generando mayores cantidades del beta-

amiloide de forma larga (ver Hardy, TINS 20, 154, 1997). Estas observaciones indican que el beta-amiloide y en particular su forma larga, es un elemento causativo de la enfermedad de Alzheimer.

5 También se conocen otros péptidos o proteínas de los que hay pruebas de auto-agregación, como por ejemplo, sin ánimo de ser exhaustivos, la amilina (Young A A. *et al.*, 1994, FEBS Lett, 343(3);237-41); bombesina, ceruleína, octapéptido de colecistokinina, eleidoisina, pentapéptido relacionado con la gastrina, tetrapéptido de gastrina, somatostatina (reducida), sustancia P; y péptido, hormona que libera la hormona luteinizante, somatostatina N-Tyr (Banks y Kastin, 1992).

10 Las publicaciones sobre fibras amiloides indican que las láminas beta cilíndricas son las únicas estructuras que concuerdan con algunos de los datos del microscopio electrónico y rayos x, y fibras de fragmentos A β Alzheimer y variantes están probablemente compuestas de dos o tres láminas beta cilíndricas (Perutz *et al.*, 2002). El péptido completo A β contiene 42 residuos, exactamente el número correcto para nuclear un cuerpo cilíndrico; este hallazgo y las muchas posibles interacciones electroestáticas fuertes en láminas beta hicieron que el péptido A β representara en ausencia de prolinas la propensión del péptido A β a formar las placas amiloides extracelulares encontradas en pacientes con Alzheimer. Si esta interpretación es correcta, los amiloides consisten en tubos estrechos (nanotubos) con una cavidad central rellena de agua. La reversibilidad del crecimiento de la placa amiloide *in-vitro* sugiere un equilibrio de estado estable entre β A en placas y en solución (Maggio y Mantyh, 1996). La dependencia de la polimerización β A en las interacciones péptido-péptido para formar una fibrilla de lámina beta y la influencia estimuladora de otras proteínas en la reacción, sugieren que la formación de amiloides puede estar sujeta a modulación. Se han hecho muchos intentos de encontrar sustancias capaces de interferir la formación de amiloides. Entre los compuestos más investigados están los anticuerpos, péptidos compuestos de aminoácidos beta-rompedores como la prolina, la adición de grupos cargados al motivo de reconocimiento y el empleo de aminoácidos N-metilados como módulos (revisado por Gazit, 2002).

25 Péptidos cíclicos hechos de residuos D y L alternos forman dichos nanotubos que matan bacterias introduciéndose en membranas y despolarizándolas (Perutz *et al.*, 2002). Existen algunos indicios de que algunas fibras amiloides pueden ser conductores y matan células por el mismo mecanismo.

30 Compuestos aromáticos como la tinción rojo del Congo que se pueden introducir en los huecos entre las espiras helicoidales pueden desestabilizar los cuerpos cilíndricos e iniciar este proceso, pero la prevención sería más eficaz y probablemente más fácil de conseguir. (Perutz *et al.*, 2002).

35 La cita de un documento en la presente patente no constituye la aceptación de que dicho documento esté relacionado con la técnica anterior o que sea considerado importante para la patentabilidad de cualquiera de las reivindicaciones de la presente solicitud. Cualquier declaración con respecto al contenido o fecha de un documento se basa en la información disponible para el solicitante y no constituye el reconocimiento de que dicha declaración sea correcta.

Descripción breve de la invención

40 La presente invención proporciona un bacteriófago para inhibir o para tratar la inflamación asociada a depósitos amiloides cerebrales y en otras partes del cuerpo y la inflamación cerebral que implica microglia activada de acuerdo con la reivindicación 1. El bacteriófago es un bacteriófago filamentoso de tipo salvaje o un bacteriófago filamentoso que no presenta un anticuerpo o un antígeno de bacteriófago no filamentoso en su superficie.

45 La presente invención también proporciona un compuesto farmacéutico que comprende el bacteriófago filamentoso como ingrediente activo.

50 La presente invención también proporciona métodos *in vitro* para inhibir la formación de depósitos amiloides o para desagregar los depósitos amiloides previamente formados mediante el contacto del bacteriófago filamentoso con los péptidos formadores de placas o con los depósitos amiloides previamente formados.

Descripción breve de las figuras

55 La Figura 1 es una representación esquemática de una sección transversal del cerebro mostrando una aplicación intracraneal del fago/PBS a un ratón transgénico hAPP. Los fagos fueron intracerebralmente inyectados a cinco ratones transgénicos. En el hemisferio contralateral se inyectó PBS. Los ratones fueron sacrificados después de 1 hora, 2 días y 3 días. Sus cerebros fueron cortados en secciones de 5 μ m, y tintados con Tioflavina-S para evaluar su carga en placa.

60 Las Figuras 2A y 2B son gráficos que muestran la desagregación (Fig. 2A) y prevención (Fig. 2B) de la agregación α -amiloide 1-40 por el fago filamentoso utilizando el ensayo ThT. En la Figura 2A (prueba de desagregación), se incubó el β -amiloide (580) durante 21 días solo. El día 21, se añadieron diferentes concentraciones de fago y se incubaron durante toda la noche. En la Figura 2B (prueba de prevención) se incubó el β -amiloide (58 μ M) o bien solo o bien con fago filamentoso durante 7 días, y a continuación se añadieron las muestras a la solución ThT y se midió el contenido en amiloides en el espectrofluorímetro. El contenido en amiloides se midió utilizando tioflavina-T que se une a las fibrillas amiloides y su emisión fluorescente fue detectada a una longitud de onda de 485 nm.

Las Figuras 3A-3K son micrografías electrónicas de β -amiloides que fueron incubados en ausencia o en presencia de fagos filamentosos (aumento x100K). Fig. 3A: β -amiloide 97 μ M en PBS en ausencia de fago. El β -amiloide fue tintado con anticuerpo monoclonal de ratón 10D5 seguido de anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado con partículas de oro 12 nm. Las Figs. 3B-3C: β -amiloide 97 μ M incubado con fagos 0,5 nM (1x10¹⁰). El β -amiloide fue tintado con anticuerpo monoclonal de ratón 10D5 y un segundo anticuerpo conjugado con partículas de oro 12 nm. El fago fue etiquetado con suero policlonal anti-fago de conejo, seguido de anticuerpo anti-conejo de cabra conjugado con 6 nm de oro. No se observó señal alguna de estos segundos anticuerpos en las muestras que no contenían fago o los primeros anticuerpos. Fig. 3D: fago filamentosos (fd) (fagos 1x10¹⁰) fue tintado con suero policlonal de conejo. El segundo anticuerpo fue conjugado con partículas de oro de 6 nm. Fig. 3E: Fago filamentosos casi beta amiloide. El péptido aumenta probablemente la degradación del fago como lo muestra el etiquetado disperso con anticuerpo anti-fago (flecha). Este etiquetado está ausente cuando el fago se incuba solo (muestra D). Las Figs. 3F-3G: β -amiloide solo después de 10 días de incubación a 37°C (aumento: F-x30K, G-x100K). Figs. 3H-3I: β -amiloide fue incubado solo durante 10 días, el 10° día se añadieron fagos filamentosos durante otras 16 horas (H-x30K, I-x100K aumento de H). Figs. 3J-3K: Interfaz entre fibrilla amiloide y fago filamentosos. Los fagos están organizados a lo largo de los ejes de las fibrillas (x100K).

Las Figuras 4A-4C son micrografías electrónicas en las que se añadieron fagos esféricos a β -amiloides pre-agregados y se incubaron juntos durante toda la noche, β -amiloides con fagos esféricos (Figs. 4A y 4B). Fago esférico solo (Fig. 4C) (aumento x100K.).

Las Figuras 5A-5C son gráficos que muestran la inhibición de la toxicidad del β -amiloide en células LAN-1 por el fago filamentosos utilizando el ensayo MTT. Para el ensayo de prevención de la Fig. 5A, se añadieron fagos a 25 μ M β -amiloides a relaciones molares de 1760:1, I3A/fago. Los preparados fueron añadidos a las células. Los porcentajes de viabilidad están relacionados con la viabilidad celular en ausencia de β -amiloides (tratamiento-PBS), que están considerados ser del 100%. En las Figs. 5B y 5C, se midió la capacidad del fago de proteger contra la toxicidad PA utilizando dos péptidos preagregados: pA1-40 y β A 17-42. Ambos péptidos (β A 1-40 y β A 17-42) fueron incubados durante 5 días a 37°C. El 6° día, se añadió fago filamentosos a los péptidos preagregados a una concentración de 1,2 nM y fueron incubados durante otras 12 horas y añadidos luego a la línea de células que fue sembrada en una placa de 96 pocillos el día anterior. Se dejó que las células crecieran durante otros tres días y luego se añadió MTT. Después de 3 horas se añadió solución tamponada extractora y la placa fue incubada durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente la placa se leyó a 570 nm de longitud de onda.

Las Figuras 6A y 6B muestran fago filamentosos inyectado en un hemisferio de ratones transgénicos hAPP (SWE2576, Tacónico) (Fig. 6B) y PBS solo fue inyectado en el otro hemisferio (Fig. 6A). Los ratones que fueron sacrificados 3 días después del tratamiento mostraron un 40% de reducción de la carga de placa, en comparación con el hemisferio tratado con PBS.

La Figura 7 es un gráfico que muestra la distribución del fago en ratones BALB/c después de su aplicación intranasal. La comparación entre la distribución del fago en el cerebro y en el bulbo olfativo, 1, 3, y 24 horas después de la administración nasal a ratones BALB/c mostró presencia de fago (fagos etiquetados en uCi/mg) incluso una hora después de su administración. Su concentración se redujo después de este periodo de una hora.

Descripción detallada de la invención

El péptido β -Amiloide (β A) es uno de los dos rasgos distintivos de la enfermedad de Alzheimer. Este péptido forma agregados fibrilares tóxicos en el cerebro que solamente pueden ser disueltos por fuertes agentes desnaturalizantes. Dado que estas propiedades neurotóxicas están relacionadas con formas de agregación de péptidos, se han hecho muchos esfuerzos para desarrollar un enfoque terapéutico para reducir o eliminar el alcance de los depósitos fibrilares amiloides en el cerebro.

En condiciones fisiológicas, un β A sintético adopta una forma de agregado y también muestra un cambio a partir de una neurita, promoviendo un efecto neurotóxico sobre neuronas del hipocampo. Se ha demostrado que la agregación de β A depende del pH, de la concentración de péptidos, de la temperatura, y del tiempo de incubación.

Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que el fago filamentosos *per se* tiene la capacidad de impedir la agregación de β A *in vitro*, así como de disolver agregados ya formados.

En el laboratorio de los presentes inventores, se utilizaron los fagos filamentosos M13, f1, y fd, que están bien comprendidos a nivel tanto estructural como genético (Greenwood *et al.*, 1991). Este laboratorio demostró primero que el bacteriófago filamentosos muestra propiedades de penetración en el sistema nervioso central conservando al mismo tiempo tanto las propiedades inertes del vector como la capacidad de transportar moléculas extrañas (Frenkel y Solomon, 2002).

Los bacteriófagos filamentosos son un grupo de virus estructuralmente relacionados que contienen un genoma de ADN monocatenario circular. No matan a su anfitrión durante la infección productiva. Los fagos que infectan *Escherichia coli* conteniendo los plásmidos F son denominados colectivamente como bacteriófagos Ff. No infectan células de mamíferos.

Los bacteriófagos filamentosos son varillas flexibles de aproximadamente 1 a 2 micras de largo y 6 nm de diámetro, con un cuerpo helicoidal de subunidades de proteínas que rodean un núcleo de ADN. Las dos proteínas principales con envoltura, la proteína pIII y la proteína de envoltura principal pVIII, difieren en el número de copias de la proteína mostrada. Mientras la pIII se presenta en 4-5 copias, la pVIII se encuentra en ~3000 copias. La subunidad pVIII de proteína de envoltura principal de aproximadamente 50- residuos es en gran parte alfa-helicoidal y el eje de la hélice alfa hace un pequeño ángulo con el eje del virión. El cuerpo de la proteína puede ser considerado en tres secciones: la superficie exterior, ocupada por la región N-terminal de la subunidad, rica en residuos ácidos que interactúan con el disolvente circundante y dan al virión un bajo punto isoeléctrico; el interior del cuerpo, incluyendo un tramo de 19 residuos de cadenas laterales no polares, donde las subunidades de proteínas interactúan fundamentalmente entre sí y la superficie interior, ocupada por la región C-terminal de la subunidad, rica en residuos básicos que interactúan con el núcleo de ADN. El hecho de que prácticamente todas las interacciones de cadenas laterales proteínicas tengan lugar entre diferentes subunidades en la disposición de proteína de envoltura y no dentro de las subunidades, lo convierte en un sistema de modelo útil para estudiar las interacciones entre subunidades alfa-helicoidales en un conjunto macromolecular. La estructura única del bacteriófago filamentosos permite su penetración en el cerebro, aunque tenga una masa de aproximadamente 16.3MD y puede contribuir a su capacidad de interferir en la formación de fibrillas β A ya que la estructura del fago se parece a la de una fibrilla amiloide.

Teniendo en cuenta lo anterior, los presentes inventores han examinado la capacidad del fago filamentosos de interferir en el proceso de agregación del péptido β -amiloide y han descubierto que la incubación *in vitro* de fago filamentosos de tipo salvaje con péptido β -amiloide a diferentes intervalos de tiempo, con diferentes relaciones, conduce a la prevención y/o desagregación del β -amiloide. Además, el fago filamentosos muestra un efecto protector sobre la viabilidad celular.

Los datos más prometedores se obtuvieron después de la incubación del fago filamentosos-fibrillas β -amiloides con células de microglia cultivadas en placas. Si el β -amiloide activa la microglia, el fago lo disuelve sin activar la microglia. La tecnología de fago proporciona una fuente nueva y prácticamente ilimitada de agentes anti-agregación del β -amiloide, impidiendo el dañino efecto de anticuerpos que podrían sobreactivar la microglia a través de receptores Fc.

Los bacteriófagos presentan diferentes ventajas sobre los virus animales en tanto que vehículos de genes y/o suministro. Son sistemas simples cuya producción y purificación a gran escala es muy eficiente y mucho más barata que la de vectores víricos animales. Además, se puede empaquetar de manera eficiente grandes segmentos de ADN en vectores fagémidos. Habiendo evolucionado para replicación, reunión e infección procariótica, el bacteriófago no puede reproducirse en, ni mostrar tropismo natural por las células de mamíferos. Esto reduce al mínimo la posibilidad de suministro de genes no específicos. Los vectores del fago son potencialmente mucho más seguros que los virus ya que tienen menos probabilidades de generar una entidad capaz de replicación en células animales (Monaci *et al.*, 2001).

La presente invención proporciona un bacteriófago para inhibir o tratar la inflamación cerebral asociada a depósitos amiloides o que implique microglia activada tal como se reivindica en el presente. Además, el bacteriófago puede ser utilizado para inhibir o tratar la inflamación asociada a los depósitos amiloides en otras partes del cuerpo además del cerebro, como en el caso de mieloma múltiple y amiloidosis renal.

El bacteriófago filamentosos puede ser cualquier bacteriófago filamentosos como el M13, f1, o fd. Aunque el M13 fue utilizado en el ejemplo que sigue, se espera que cualquier otro bacteriófago filamentosos se comporte y funcione de manera similar ya que tienen estructura similar y sus genomas presentan una similitud superior al 95%.

Cuando se utiliza el bacteriófago para inhibir o tratar la inflamación cerebral, el bacteriófago filamentosos se administra de manera preferente por vía intranasal para introducir el ingrediente activo en el cuerpo del receptor a través del sistema olfativo del receptor.

El bacteriófago no solo inhibe la agregación de proteínas en placas o depósitos amiloides en una enfermedad provocada por la formación de placas, sino que también es efectivo para desagregar depósitos amiloides previamente formados como las fibrillas β -amiloides.

La propiedad de anti-agregación o desagregación del bacteriófago filamentosos con respecto a la formación o desagregación de fibrillas β A puede medirse mediante el bien conocido ensayo de unión mediante tioflavina ThT (ThT). La interrupción de la formación de la estructura de fibrillas β A y la desagregación de fibrillas β A preformadas vienen indicadas por una sustancial reducción de la fluorescencia ThT.

A efectos de esta especificación y las reivindicaciones que la acompañan los términos “paciente”, “sujeto” y “receptor” se utilizan de manera intercambiable. Incluyen humanos y otros mamíferos que son el objeto de tratamiento profiláctico, experimental o terapéutico.

A efectos de esta especificación y las reivindicaciones que la acompañan los términos “péptido beta amiloide” es sinónimo de “péptido β -amiloide”, “ β AP”, “ β A”, y “A β ”. Todos estos términos se refieren a péptidos que forman placas derivados de la proteína precursora de amiloide.

Tal como se utiliza aquí, “proteína PrP”, “PrP”, “prión” y “proteína priónica” se refieren a polipéptidos que son capaces, bajo las condiciones apropiadas, de inducir la formación de agregados responsables de enfermedades provocadas por placas. Por ejemplo, la proteína priónica celular normal (PrPC) se convierte en tales condiciones en la correspondiente isoforma escrapie (PrPSc) que es responsable de enfermedades por la formación de placas como, sin ánimo de exhaustividad, la encefalopatía espongiforme bovina (EEB), o enfermedad de las vacas locas, la encefalopatía espongiforme felina de los gatos, kuru, la enfermedad Creutzfeldt-Jakob (CJD), la enfermedad Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS), y el insomnio familiar fatal (IFF).

Tal como se utiliza en la especificación y en las reivindicaciones, el término “desagregación” se refiere a la solubilización de proteínas agregadas unidas normalmente por enlaces no covalentes.

El término “tratamiento” incluye fundamentalmente inhibir, ralentizar e invertir la progresión de una enfermedad, especialmente la mejora de los síntomas clínicos de una enfermedad o impedir la aparición de síntomas clínicos de una enfermedad.

También tal como se utiliza aquí, el término “enfermedad por formación de placas” se refiere a enfermedades caracterizadas por la formación de placas por la agregación de proteínas (péptidos que forman placas), como por ejemplo, aunque no limitándose a los beta-amiloides, suero amiloide A, cistatina C, proteínas priónicas o cadenas ligeras IgG kappa, en enfermedades como, pero sin limitarse a, la enfermedad de Alzheimer de aparición precoz, la enfermedad de Alzheimer de aparición tardía, la enfermedad de Alzheimer presintomática, la amiloidosis SAA, el síndrome islandés hereditario, la demencia senil, el mieloma múltiple, y a enfermedades priónicas que se conoce afectan a los humanos, como por ejemplo, kuru, la enfermedad Creutzfeldt-Jakob (CJD), la enfermedad Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS), y el insomnio familiar fatal (IFI) y a los animales, como por ejemplo, el temblor epidémico (escrapie) y la encefalopatía espongiforme bovina (BSE).

Debido a que la mayoría de placas amiloides (también conocidas como depósitos amiloides) asociadas a las enfermedades descritas más arriba están localizadas en el cerebro, cualquier modalidad de tratamiento propuesto debe demostrar su habilidad para cruzar la barrera hematoencefálica (BHE) así como su capacidad de disolver las placas de amiloides. Normalmente, el tamaño medio de las moléculas capaces de penetrar la BHE es aproximadamente 2 kDa.

Un creciente Corpus de pruebas muestra que en el curso clínico de la enfermedad de Alzheimer (EA) tienen lugar déficits olfativos y cambios degenerativos en las vías olfativas centrales. Además, los patrones anatómicos implicados en la EA hacen pensar que la vía olfativa puede estar en la etapa inicial de desarrollo de la EA.

Las neuronas receptoras olfativas son células bipolares que residen en el revestimiento epitelial de la cavidad nasal. Sus axones atraviesan la placa cribiforme y se proyectan a la primera sinapsis de la vía olfativa en el bulbo olfativo del cerebro. Esta configuración les convierte en una autopista por la que los virus u otras sustancias transportadas pueden tener acceso al SNC a través de la BHE.

Como se ha indicado previamente, la administración intranasal (Mathison *et al*, 1998; Chou *et al*, 1997; Draghia *et al*, 1995) permite la entrada directa de virus y macromoléculas al fluido cerebrospinal (FCE) o SNC.

El empleo de neuronas receptoras olfativas como punto de suministro de un vector adenoviral al cerebro está recogido en la literatura. Se dice que este método provoca la expresión de un gen reportero en el cerebro durante 12 días sin toxicidad aparente (Draghia *et al*, 1995).

Por lo tanto, de acuerdo con una realización preferente de la presente invención, el bacteriófago filamentoso capaz de desagregar o de impedir la formación de un agregado de polipéptido asociado a una enfermedad de formación de placas o capaz de inhibir la activación de microglia es suministrado a través de esta ruta al cerebro.

Como $A\beta$ es continuamente producido por células en tejidos periféricos que atraviesan la barrera hematoencefálica (BHE) provocando efectos tóxicos localizados en poblaciones neuronales específicas, la administración intranasal de dicho vehículo también puede impedir la progresión de la enfermedad al minimizar la cantidad de $A\beta$ periférico disponible para formar placas.

Un preparado farmacéutico de acuerdo con la presente invención incluye, como ingrediente activo, un bacteriófago filamentoso de tipo salvaje o un bacteriófago filamentoso que no presenta un anticuerpo o un antígeno de bacteriófago no filamentoso en su superficie. El preparado farmacéutico también puede ser una mezcla de diferentes bacteriófagos filamentosos.

El preparado de acuerdo con la presente invención puede ser administrado a un organismo *per se*, o en un compuesto farmacéutico en el que es mezclado con soportes y excipientes adecuados.

Tal como se utiliza aquí un “compuesto farmacéutico” hace referencia a la preparación de uno o más de los ingredientes activos descritos en el presente documento con otros componentes químicos tales como soportes y excipientes fisiológicamente adecuados. El objeto de un compuesto farmacéutico es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

ES 2 363 203 T3

En este documento el término “ingrediente activo” se refiere al preparado responsable del efecto biológico.

En lo sucesivo, las frases “soporte fisiológicamente aceptable” y “soporte farmacéuticamente aceptable” que pueden utilizarse de manera intercambiable se refieren a un soporte o un diluyente que no cause una irritación significativa a un organismo y no suprima la actividad biológica y las propiedades del compuesto administrado. Un coadyuvante está incluido en estas frases.

Aquí el término “excipiente” se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar la administración de un ingrediente activo. Ejemplos de excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de la celulosa, gelatina, aceites vegetales y glicoles de polietileno.

Se pueden encontrar técnicas para la formulación y administración de medicamentos en “Remington’s Pharmaceutical Sciences”, Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición, que se incorpora aquí como referencia.

Vías de administración adecuadas pueden incluir por ejemplo la vía oral, rectal, transmucosal, especialmente transnasal, intestinal o administración parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas e intramedulares así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares.

Alternativamente, se puede administrar un preparado de manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, a través de inyección del preparado directamente en el cerebro del paciente.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser fabricadas por procesos bien conocidos por la técnica, por ejemplo, por medio de procesos de mezclado, disolución, granulado, fabricación de grageas, pulverización, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

Las composiciones farmacéuticas a utilizar de acuerdo con la presente invención pueden por lo tanto ser formuladas de la manera convencional utilizando uno o más soportes fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares, que facilitan el procesado de los ingredientes activos en preparados que, pueden ser utilizados farmacéuticamente. La formulación correcta depende de la vía de administración elegida.

Para su inyección, los ingredientes activos de la invención pueden ser formulados en soluciones acuosas, preferentemente en soluciones tamponadas fisiológicamente compatibles como la solución de Hank, la solución de Ringer, o solución salina fisiológica tamponada. Para la administración transmucosal, se utilizan fluidos penetrantes adecuados para la barrera a ser impregnada para la formulación. Dichos fluidos penetrantes son por lo general conocidos por la técnica.

Para la administración oral, los compuestos pueden ser formulados fácilmente combinando los compuestos activos con soportes farmacéuticamente aceptables bien conocidos por la técnica. Dichos soportes permiten que los compuestos de la invención sean formulados como comprimidos, pastillas, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones para ingestión oral por un paciente. Los preparados farmacológicos para uso oral pueden ser realizados utilizando un excipiente sólido, opcionalmente triturando la mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir auxiliares adecuados si se desea, para obtener núcleos de grageas o comprimidos. Excipientes adecuados son, en particular, rellenos como azúcares, incluyendo la lactosa, sucrosa, manitol, o sorbitol; preparados de celulosa como por ejemplo almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetil celulosa, carbometilcelulosa de sodio; y/o polímeros fisiológicamente aceptables como la polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se puede añadir agentes desintegrantes, como polivinilpirrolidona reticulada, agar, o ácido algínico o una de sus sales como el alginato de sodio.

Los núcleos de comprimidos están provistos de los revestimientos adecuados. Para ello, se pueden utilizar soluciones de azúcar concentradas que pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinil pirrolidona, gel de carbopol, polietileno glicol, dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Se puede añadir a los revestimientos de comprimidos o grageas colorantes o pigmentos para su identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuestos activos.

Composiciones farmacéuticas que pueden ser utilizadas oralmente, incluyen cápsulas duras hechas de gelatina así como cápsulas blandas y selladas hechas de gelatina y un plastificante como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los ingredientes activos en mezcla con un relleno como lactosa, aglutinantes como el almidón, lubricantes como el talco o el estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizadores. En las cápsulas blandas, los ingredientes activos pueden ser disueltos o suspendidos en líquidos adecuados, como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicol líquido. Además, se puede añadir estabilizadores. Todas las formulaciones para la administración oral deberían hacerse en dosis adecuadas para la vía elegida de administración.

Para administración bucal, las composiciones pueden adoptar la forma de comprimidos o pastillas formulados de manera convencional.

Para su administración por inhalación nasal, los ingredientes activos para su uso de acuerdo con la presente invención se suministran convenientemente en forma de un spray aerosol con nebulizador o pack presurizado que utiliza un gas propelente adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, dicloro-tetrafluoroetano o dió-

ES 2 363 203 T3

xido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse mediante una válvula que suministre una cantidad medida. Las cápsulas y comprimidos de, por ejemplo, gelatina para su uso en un dosificador pueden formularse con una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada como lactosa o almidón.

Los preparados descritos aquí pueden ser formulados para administración parenteral, por ejemplo, por inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosis unitarias, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis con, de manera opcional, la adición de un conservante. Las composiciones pueden ser suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos acuosos u oleosos y pueden contener agentes de formulación como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión.

Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas del preparado activo en forma soluble en agua. Adicionalmente, se puede preparar suspensiones de los ingredientes activos como suspensiones para inyección basadas en agua o en aceite, según sea pertinente. Vehículos o disolventes lipofílicos adecuados incluyen aceites grasos como el aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos como el etil oleato, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que incrementan la viscosidad de la suspensión, como la celulosa carboximetil de sodio, sorbitol o dextran. De manera opcional, la suspensión puede contener también agentes o estabilizadores adecuados que incrementen la solubilidad de los ingredientes activos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

Alternativamente, el ingrediente activo puede ser en forma de polvo para su composición con un vehículo adecuado como por ejemplo, solución estéril basada en agua exenta de pirógenos, antes de su uso.

La preparación de la presente invención también puede ser formulada en composiciones rectales como supositorios o enemas de retención, utilizando por ejemplo bases de supositorios convencionales tales como mantequilla de coco u otros glicéridos.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en el contexto de la presente invención incluyen composiciones en las que los ingredientes activos están contenidos en una cantidad efectiva para lograr el propósito buscado. De manera más específica, una cantidad terapéuticamente efectiva significa una cantidad de ingredientes activos eficaz para prevenir, aliviar o mejorar síntomas de enfermedad o prolongar la supervivencia del sujeto que está siendo tratado.

La determinación de una cantidad terapéuticamente efectiva no presenta problemas para quienes dominan la técnica, especialmente a la luz de la descripción detallada que se suministra aquí.

Para cualquier preparado utilizado en los métodos de la invención, la cantidad o dosis terapéuticamente efectiva puede ser inicialmente estimada a partir de ensayos con cultivos celulares e *in vitro*. Por ejemplo, una dosis puede ser formulada en modelos animales para lograr la concentración o título de anticuerpos en circulación deseados. Dicha información puede ser utilizada para determinar con mayor precisión dosis útiles en humanos.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de los ingredientes activos descritos en la presente especificación pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar *in vitro*, en cultivos celulares o en animales de experimentación. Los datos obtenidos de estos ensayos con cultivos celulares e *in vitro* y de los estudios con animales pueden ser utilizados para formular una gama de dosis para su uso en humanos. La dosificación puede variar según la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. La formulación exacta, vía de administración y dosificación pueden ser elegidos por cada facultativo particular según el estado del paciente. (Ver por ejemplo, Fingl, *et al.*, 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 p.1).

La cantidad de la dosis y el intervalo pueden ser ajustados individualmente para proporcionar niveles de anticuerpos en plasma y cerebro que sean suficientes para impedir la agregación o desagregar los agregados ya existentes (concentración mínima efectiva, CME). La CME puede variar en cada preparado, pero puede calcularse a partir de datos *in vitro*. Las dosis necesarias para alcanzar la CME dependerán de las características individuales y la vía de administración. Se puede utilizar ensayos de unión para determinar las concentraciones en plasma.

También se puede determinar los intervalos de dosificación utilizando el valor CME. Los preparados deberían administrarse utilizando un régimen, que mantenga los niveles de plasma por encima de la CME durante el 10-90% del tiempo, preferentemente entre 30-90% y de manera más preferente aún entre el 50-90%.

En función de la gravedad y del grado de reacción de la enfermedad a tratar, la dosificación puede ser una administración única o una pluralidad de ellas, durando el tratamiento desde varios días a varias semanas o hasta que la cura se produzca o se logre la mejoría de la enfermedad.

La cantidad de composición a administrar dependerá, evidentemente, del sujeto que se trate, de la gravedad de la enfermedad, de la forma de administración, de la opinión del médico que receta, etc.

Las composiciones de la presente invención pueden, si se desea, presentarse en un envase o en un dispositivo dosificador, como un kit autorizado por la FDA, que puede contener una o más formas de dosis unitarias que contengan el

ingrediente activo. El envase puede, por ejemplo, comprender lámina metalizada o plástica como un envase ampolla. El envase o dosificador puede estar acompañado de instrucciones de utilización. El envase o dosificador también puede estar acompañado de un aviso asociado al recipiente con una forma prescrita por una agencia del gobierno que regule la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos, el cual refleje la autorización por la agencia de la forma de las composiciones o su administración para uso humano o veterinario. Dicho aviso, por ejemplo, puede ser sobre el etiquetado autorizado por la FDA sobre medicamentos con receta o de una etiqueta de producto autorizado. También pueden prepararse composiciones que comprendan un preparado de la invención formuladas en un soporte farmacéuticamente compatible, colocadas en un recipiente adecuado y etiquetadas para el tratamiento de una enfermedad indicada, como se detalla más arriba.

Habiendo descrito la invención de manera general, ésta podrá ser entendida más a fondo mediante el siguiente ejemplo que se proporciona a modo de ilustración sin que pretenda constituir una limitación de la presente invención.

15 Ejemplo

Materiales y métodos

Crecimiento y purificación del fago

Se prepararon fagos filamentosos (M13) a partir de cultivos TG1 transformados en caldo 2YT, conteniendo 50 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina. Células bacterianas fueron comprimidas por centrifugado, y se decantó el sobrenadante clarificado. Los fagos fueron precipitados a partir del sobrenadante añadiendo el 20% del volumen original del 20% de polietileno glicol (masa molecular 8000 Da) en 2,5M NaCl y dejándolo reposar a 4°C durante 3 horas. Los fagos fueron comprimidos por centrifugado (9.000 rpm, 1 hora) y luego fueron vueltos a suspender en 3% del volumen sobrenadante de PBS. Los residuos bacterianos fueron eliminados mediante centrifugado a 7000 rpm, y los fagos fueron concentrados de nuevo añadiendo más precipitado de polietileno glicol. El gránulo fue finalmente resuspendido en PBS en 0,001 del volumen original del medio de cultivo. (Hart *et al.*, 1994).

Interferencia del fago con la agregación β -amiloides

Se analizó la capacidad del fago de impedir la agregación βA y de desagregar los agregados ya formados mediante tres métodos:

1. Ensayo de Fluorescencia con Tioflavina-T

Se midió la agregación βA utilizando tinción de tioflavina T (ThT) que cambia su espectro de emisión cuando se une a las fibrillas amiloides (LeVine, 1993). Para evaluar la capacidad del fago de impedir la formación de agregados, se incubaron 8 μl de $\beta\text{Al-40}$ 577 μM (Bachem), a 37°C durante 14 días, o bien solo (diluido a 80111 con PBS a una concentración final de 58 μM) o con fago filamentosos (72 μl de 3×10^{12} fagos/ml). Se midió la fluorescencia de cada mezcla de reacción (20 μl) después de la adición de 980 μl ThT (2 μM) (Sigma) en 50 mM de solución tamponada de glicina de pH9. Se midió la fluorescencia utilizando un espectrofluorímetro modelo Perkin-Elmer LS-50 a una longitud de onda de excitación de 435 nm y una longitud de onda de emisión de 485 nm.

Se examinó la actividad desagregadora del fago como sigue: se incubó βA (58 μM) durante 21 días a 37°C para fomentar la agregación. Se añadieron fagos (igual volumen de fagos de concentración 1014 fagos/ml solución) y se incubaron con el βA agregado durante otras 17 horas. La extensión de la agregación se evaluó utilizando fluorescencia ThT, tal como se describe más arriba.

2. Microscopía Electrónica (ME)

Interacción del β -amiloides y del fago filamentosos. Se visualizó el nivel de agregación βA utilizando ME. Para impedir la formación de βA , se incubaron 10 μl del péptido (289 μM) o bien solo (se añadieron 20 μl PBS) o en combinación con diferentes concentraciones de fago (20 μl de fago de las siguientes concentraciones: 1 $\times 10^{14}$ fagos/ml, 1 $\times 10^{12}$ fagos/ml, 1 $\times 10^{10}$ fagos/ml) durante 9 días a 37°C.

Se demostró la actividad desagregadora del fago añadiendo diferentes concentraciones de fago a βA preagregados. Se incubaron 20 μl de β -amiloides 1-40 (193 μM) disueltos en PBS a 37°C durante 10 días. El 10º día, se añadió a la muestra 10 μl de PBS o diferentes concentraciones de fago (1 $\times 10^{14}$ fagos/ml, 1 $\times 10^{12}$ fagos/ml) y se incubó durante otras 16 horas.

Tanto en los ensayos de prevención y desagregación, fagos y βA fueron adheridos a rejillas de malla 200 formvar revestidas con carbono evaporado. El inmunoetiquetado de fagos y amiloides se realizó utilizando diversos tamaños de anticuerpos conjugados con oro (Lin *et al.*, 1999) para distinguir con facilidad entre fibrillas β -amiloides y el fago que se puede parecer a filamentos amiloides. Las fibrillas β -amiloides fueron tintadas con anticuerpo monoclonal

ES 2 363 203 T3

(mAb) 10D5, y el segundo anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado a partículas de oro 12 nm (Electron Microscopy Sciences, Washington, USA). Para etiquetar el fago, se utilizó suero policlonal de conejo contra fago, y el 2° anticuerpo fue conjugado a partículas de oro de 6 nm (Electron Microscopy Sciences). Las muestras fueron negativamente tincionadas con acetato de uranilo acuoso (2% peso/vol) (Sigma). Las rejillas fueron visualizadas utilizando un microscopio electrónico JEOL 1200 EX a aumentos de 30K y 100K.

Interacción de β -amiloides y fagos tratados con cloroformo. Se añadió 200 μ l de fagos (1014 fagos/ml) a 200 μ l de cloroformo. La solución fue agitada 6 veces (10 segundos cada vez) durante 3 minutos a temperatura ambiente (Griffith *et al*, 1981). El tubo fue centrifugado a 13.200 rpm durante 1 minuto; la fase acuosa fue transferida a otro tubo y se dejó en la campana para que se evaporaran los residuos de cloroformo. La interacción entre el β -amiloide y los fagos esféricos fue analizada con un microscopio electrónico.

Se incubaron β -amiloides (97 μ M) a 37°C durante 13 días. El día treceavo, se añadieron a las muestras PBS o diferentes concentraciones de fagos-S (tratados con cloroformo) (5x1013 fagos/ml, 5x1011 fagos/ml) y se incubaron durante otras 16 horas. Se visualizó el grado de agregación de β -amiloides con un microscopio electrónico JEOL 1200 EX como se ha indicado anteriormente.

3. Ensayo MTT

Se realizó un ensayo MTT para evaluar la protección del fago contra la toxicidad β A en la viabilidad de una línea de células neuronales humanas. El ensayo está basado en la reducción de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio (MTT) a MTT-formazán en células vivas. Se midió la concentración de MTT-formazán con el espectrómetro a 570 nm y directamente correlacionada con la viabilidad celular.

Se cultivó una línea de células neuronales humanas LAN-1 en RPM1 complementado con 10% de suero de ternero fetal y 100 unidades/ml de penicilina/estreptomicina y fue incubado a 37°C bajo 5% CO₂. Para el ensayo de neurotoxicidad, se sembraron células LAN-1 cultivadas en una placa de 96 pocillos a una densidad de 104 células/100 μ l/pocillo. Se midió la neurotoxicidad dependiente de la dosis utilizando muestras de β -amiloide (289 μ M) o bien solo o bien con diferentes concentraciones de fago.

Se incubaron 2 μ l del péptido con 8 μ l de diferentes concentraciones de fago (5x1013/ml, 5x1012/ml, 5x1011/ml fagos) durante 4 días a 37°C con el fin de examinar el efecto preventivo del fago contra la neurotoxicidad β A. Las muestras fueron añadidas 24 horas después de que las células fueran sembradas y fijadas a la placa. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 2 días después de los cuales se evaluó la viabilidad celular midiendo la actividad redox celular con 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio (MTT) como se ha descrito previamente (Solomon *et al*, 1997). MTT (Sigma) fue añadido a los pocillos a una concentración final de 1 mg/ml e incubado con las células durante otras 3 horas a 37°C. Se añadió una solución de lisis celular (20% peso/vol SDS en una solución 50% dimetilformamida, pH 7.4) y la placa fue incubada durante toda la noche a 37°C. La reducción MTT fue determinada colorimétricamente por el cambio en OD a 570 nm utilizando un espectro fotómetro de microplacas automático.

En el ensayo de desagregación de fibrillas β A ya formadas, se utilizaron dos péptidos (β -amiloide 17-42 y β -amiloide 1-40) como los factores neurotóxicos. La capacidad del fago de proteger la viabilidad celular de los péptidos agregados fue examinada como se describe a continuación. En el primer experimento, las células fueron incubadas durante 5 días con β A 1-40 preagregado, mientras que en el segundo experimento, se utilizó β -amiloide 17-42 como péptido neurotóxico. Como se ha descrito previamente, las células fueron sembradas en una placa de 96 pocillos a una densidad de 104 células/100 μ l/pocillo y se dejó que se fijaran durante 24 horas antes de que fueran añadidas las muestras. A 2 μ l del péptido agregado (288 μ M-solución stock), se añadieron 8 μ l de los fagos (1014 fagos/ml, 1013 fagos/ml, 1012 fagos/ml) y se incubaron durante la noche. Las muestras fueron añadidas a las células y fueron incubadas durante otros dos días. Se añadió MTT a una concentración final de 1 mg/ml, y 33 horas más tarde se puso solución lisis para permitir la medición del contenido MTT-formazán. Se evaluó la viabilidad celular cuantificando el cambio O.D. en 570 nm.

Aplicación *in-vivo* de fago filamentoso

Ratones de tipo salvaje, así como transgénicos, modelos de EA (enfermedad de Alzheimer) fueron tratados con un fago filamentoso:

Evaluación de las propiedades anti-agregantes. A fin de evaluar el máximo potencial de la actividad del fago como agente anti-agregante, los fagos fueron inyectados intracranalmente a ratones transgénicos (Tacónicos, APPSWE (2576), 10 meses de edad) como sigue:

2,5 μ l de la solución de fago filamentoso (1014 fagos/ml) fueron inyectados durante 10 minutos (Bregma -2.8 mm, lateral 2.5 mm, ventral 2.5 mm) a un hemisferio, mientras que se aplicó como control al lado contralateral solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Fig. 1). Dado que el periodo de tiempo que requieren los fagos para desagregar los depósitos amiloides es desconocido, los ratones tratados fueron sacrificados a diferentes intervalos de tiempo. Se procedió a la perfusión intracardial del primer grupo con paraformaldehído al 4% una hora después de la inyección,

el segundo grupo -dos días después de la administración y el último grupo- después de 3 días. Los cerebros fueron dejados durante la noche en paraformaldehído al 4%, y cortados utilizando un micrótopo. Se realizó una tinción con tioflavina-S (ThS) para evaluar la carga de placas. Con este fin, las secciones fueron tintadas con hematoxilina de Mayer para atenuar la autofluorescencia nuclear y después de lavarlas, se aplicó solución ThS (1%) durante 3 minutos. La diferenciación se realizó utilizando ácido acético al 1% durante 20 minutos y después del lavado las placas fueron secadas y montadas con medio de montaje anti-decoloración. La carga en placas se calculó utilizando un programa Qwin LEICA.

Biodistribución del etiquetado radioactivo del fago filamentoso. Fagos filamentosos fueron radioactivamente etiquetados con ¹²⁵I. Los fagos fueron purificados del yodo no ligado utilizando columna sephadex G25 y el eluato fue precipitado utilizando polietileno-glicol (PEG) como se ha descrito previamente. 9 ratones BALB/c fueron divididos en 3 grupos. Cada ratón recibió intranasalmente 100 μ l de fagos (1.25×10^{12} fagos) durante una hora, etiquetados con 9 microcuries ¹²⁵I. El primer grupo de ratones fue sacrificado una hora después de la administración de perfusión intracardial utilizando paraformaldehído al 4%. El segundo grupo fue sacrificado 3 horas después del tratamiento y el último grupo después de 24 horas. Después de la perfusión, los cerebros así como los órganos periféricos fueron eliminados y se midió su radiación gamma.

Administración intranasal del fago filamentoso. Para evaluar en su totalidad el efecto del fago filamentoso, los fagos fueron intranasalmente administrados a ratones transgénicos SWEI APP2576 (Tacónicos, 10 meses de edad). Cada dos semanas y durante 4 meses se aplicó 20 μ l de solución de fago (5×10^{12} /ml) y se evaluaron las funciones cognitivas. Después de la novena inmunización, se llevó a cabo una prueba de reconocimiento de objetos para estudiar la influencia del fago sobre la mejora de la memoria. El primer día, los ratones fueron expuestos a dos nuevos objetos durante 20 minutos. Al día siguiente, se sustituyó un objeto y se evaluó la curiosidad de los ratones para explorarlo. Se calculó el índice de reconocimiento de cada ratón dividiendo el tiempo que pasó junto al nuevo objeto entre el tiempo total empleado cerca de ambos objetos. Por lo tanto, los valores por encima de 0,5 son indicativos del reconocimiento del objeto antiguo y del empleo de más tiempo en torno al nuevo objeto para su investigación.

Resultados

Se evaluaron las propiedades anti-agregantes *in vitro* de los fagos filamentosos con relación a la reducción y prevención de la formación de amiloides. En el ensayo de tioflavina-T, los fagos fueron más eficientes a la hora de desagregar fibrillas β A que en prevenir su formación. Se observó una reducción del 26% de agregación β A (Fig. 2B) cuando el péptido fue incubado con fago filamentoso en una relación molar de 1:10,000 (fago a β A). La adición de fagos (28 nM) a β A pre-agregados tuvo como resultado una reducción del 45% de las fibrillas amiloides (Fig. 2A).

La visualización de la interacción física entre fagos y el péptido β -amiloide mediante microscopía electrónica se realizó utilizando β -amiloides tintados con inmuno-oro y sus complejos con fagos. Cuando los fagos interactúan con el péptido β -amiloide, los agregados son más pequeños y están más difusos que cuando no hay fagos. Curiosamente, la incubación de fagos con péptido β -amiloide produjo la degradación de los fagos, tal como se puede deducir del etiquetado masivo de anticuerpos contra proteína de envoltura principal de fago no en partículas de fago (Fig. 3C). Este fenómeno no fue observado cuando los fagos fueron incubados con péptido β -amiloide durante la noche (en el ensayo de desagregación) o cuando se incubaron fagos solos durante el mismo periodo de tiempo (Fig. 3D). La Fig. 3 (F-K) muestra el efecto de los fagos sobre los agregados amiloides formados. La Figura 3F muestra fibrillas amiloides en un racimo etiquetado por la partícula de oro 12 nm. Un mayor aumento (Fig. 3G) muestra los diferentes tamaños de agujas de fibrillas agregadas. Las Figuras 3H-K presentan fagos organizados en haces (punta de flecha) que se dispersan cuando se fijan a las agujas amiloides (flecha). El racimo de amiloides es pequeño y contiene pequeñas fibrillas amiloides estrechas. De especial interés es la organización paralela de los fagos con respecto a las fibrillas amiloides (flecha abierta).

Se ha demostrado que la molécula pVIII existe en tres conformaciones. En el fago intacto, la proteína es por lo menos un 90% α -helicoidal, pero se producen grandes cambios en la forma por la exposición a la interfaz cloroformo/agua. Es un proceso que depende de la temperatura. A 2°C se forman varillas (formas en I) mientras que a 25°C se forman estructuras esféricas (Formas en S). La conversión a formas en S se produce cuando hay una reducción sustancial del contenido hélice de la proteína de envoltura pero con un cambio significativo en el entorno del triptófano 26 (Roberts y Dunker, 1993).

El tratamiento de los fagos con cloroformo durante tres minutos mostró que aunque hay presencia de fagos esféricos en el sitio de los agregados β A, están situados por lo general al final de las fibrillas y no contribuyen a la solubilización. (Figs. 4A-B).

MTT

Se demostró la protección del fago filamentoso de las células LAN-1 contra la neurotoxicidad β A utilizando el ensayo MTT. Cuando se incubaron fagos con β A, aumentó la viabilidad neuronal por comparación a las células que crecieron solo con β A. La cantidad más elevada de fagos que se añadió al cultivo de células provocó el efecto más significativo (17% de incremento de la viabilidad celular) (Fig. 5A).

La protección aportada por los fagos contra la toxicidad del β -amiloide 17-42 fue mayor que su capacidad de impedir la toxicidad β -amiloide 1-40. Cuando se añadieron fagos al β A 17-42 preagregado, aumentó un 30% la viabilidad celular, en comparación con las células que se cultivaron solo con β A (Fig. 5B). La adición de la misma concentración de fagos a β A 1-40 provocó solamente un 17% de incremento de la viabilidad celular. La adición de una mayor concentración de fagos tuvo como consecuencia el incremento de la viabilidad celular al 25% en comparación con las células tratadas con β A.

Una posible razón de esta diferencia podría ser atribuida al amino-término del β -amiloide que puede interferir con la actividad del fago o debido al hecho de que el β -amiloide 17-42 forma agregados con más rapidez que el β -amiloide 1-40 (Pike *et al.*, 1995). La afinidad del fago con el β -amiloide 1-40 se incrementa con la agregación de péptidos. El ensayo ELISA, que verificó la unión de los fagos a β -amiloides solubles, 1 hora β -amiloides agregados o 3 semanas péptidos agregados, mostró una importante diferencia en la unión de fagos a β A 1-40. Por lo tanto, la mayor afinidad de los fagos a los péptidos altamente agregados puede explicar sus interacciones más fuertes con β -amiloides 17-42.

En los estudios *in-vivo* de desagregación de placas amiloides por inyección intracerebral de fagos filamentosos, no se detectó ninguna reducción de la carga de placas en los ratones sacrificados una hora después de la inyección. En los ratones sacrificados dos días después del tratamiento, se observó el 25% de reducción de la carga de placa en el hemisferio tratado con fago filamentosos en comparación con el hemisferio inyectado con PBS. Los ratones sacrificados tres días después del tratamiento mostraron una reducción del 40% en la reducción de carga de placa en el hemisferio inyectado con fago (Figs. 6A y 6B).

Distribución cerebral de fagos filamentosos etiquetados radioactivos

Tras la administración intranasal, se detectaron fagos filamentosos en el bulbo olfativo y en el cerebro tan pronto como 1 hora después de la administración (Hg. 7). Aunque los grupos fueron demasiado pequeños ($n=3$) para establecer un índice de resolución del fago, parece que la concentración de fagos alcanza su máximo después de una hora y luego queda eliminada casi completamente en 24 horas. La elevada variabilidad entre los ratones puede ser resultado de tragar e inhalar diferentes cantidades de fagos. La dosis introducida en el parénquima cerebral varió de 0,0009% al 0,018% de la dosis dada. Conviene mencionar que el 0,1% de concentración de suero de anticuerpos logró alcanzar el cerebro y reducir la carga de placas. Estos datos preliminares muestran que el fago puede penetrar en el cerebro en un corto plazo y comenzar a actuar una hora después en ratones BALB/C normales. Por lo tanto, se puede poner a prueba la eficiencia de la administración intranasal de fagos filamentosos en el tratamiento de ratones transgénicos portadores de depósitos amiloides.

Administración intranasal repetida de fago filamentosos en ratones transgénicos

Se observó una mejora significativa en las funciones cognitivas en los ratones tratados con fago en comparación con el grupo no tratado (datos no mostrados). Al final del estudio, se realizará un análisis histoquímico para evaluar la carga de placa, la activación de microglia, densidad de sinapsis y probables efectos adversos a fin de obtener una estimación completa de la eficiencia del tratamiento.

Discusión

El laboratorio de los presentes inventores ha informado previamente de que anticuerpos monoclonales dirigidos (mAbs) hacia la región N-terminal de β a, se unen a fibrillas β A preformadas, y provocan la desagregación de amiloides en un estado amorfo e inhiben su efecto neurotóxico (Solomon *et al.*, 1996, 1997). Esta actividad fue también demostrada *in vivo* en ratones transgénicos para la EA (Bard *et al.*, 2000). Se utilizó fago que mostraba un seFv contra β A para suministrar intranasalmente fragmentos de anticuerpos anti-agregación a placas cerebrales (Frenkel *et al.*, 2002). El fago fue utilizado como un vehículo que permitía la penetración de scFv en el cerebro y su unión a depósitos amiloides en ratones transgénicos.

Se mostró una correlación directa entre el número de aplicaciones y la cantidad de fago detectado en el hipocampo y bulbo olfativo. La estructura lineal del fago parece conferir propiedades de penetración a través de diversas membranas. Conviene mencionar que no se observaron signos patológicos en aquellos cerebros de ratones después de la administración del fago (Frenkel *et al.*, 2002).

Se visualizaron fibrillas β A tanto a través de anticuerpos anti-fago etiquetados ThT y fluorescentes y se mostró la desaparición de fago filamentosos del cerebro sin inducir efecto tóxico en estudios histológicos. En experimentos anteriormente reportados, se inyectaron intravenosamente fagos filamentosos en ratones y fueron posteriormente rescatados de los diferentes órganos, mostrando que su integridad no se vio afectada durante su circulación por el cuerpo.

Se considera que la creación de fibrillas amiloides es impulsada por interacciones hidrofóbicas más que electrostáticas. β A contiene dos segmentos hidrofóbicos, cuya parte central está compuesta de residuos 17-21 y la región C-terminal que contiene residuos 30-40. De acuerdo con el modelo basado en limitaciones experimentales a partir de RMN en estado sólido, la conformación de péptidos contiene dos β -hebras, separadas por una curva de 180° formada

por residuos 25-29. Las β -hebras forman dos láminas beta paralelas, que interactúan a través de contactos cadena lateral-cadena lateral. Las cadenas laterales hidrofóbicas están expuestas a la superficie exterior y forman una cara hidrofóbica, mientras que las otras cadenas laterales cargadas y polares están distribuidas en la cara opuesta, en el lado convexo de la curva y en el segmento N-terminal donde podrían ser disueltas a medida que crecen las fibrillas (Petkova *et al.*, 2002).

Por otro lado, la proteína de envoltura de fago principal se compone de tres secciones: la superficie exterior, ocupada por la región N-terminal de la subunidad, rica en residuos ácidos que interactúan con el disolvente circundante y dan al virión un bajo punto isoeléctrico; el interior del cuerpo, incluyendo un tramo de 19 residuos de cadenas laterales apolares, donde subunidades de proteínas interactúan principalmente entre sí; y la superficie interior, ocupada por la región C-terminal de la subunidad, rica en residuos básicos que interactúan con la núcleo de ADN. El hecho de que prácticamente todas las interacciones de cadenas laterales proteínicas tengan lugar entre diferentes subunidades en la disposición de proteína de envoltura y no dentro de las subunidades, lo convierte en un sistema de modelo útil para estudiar las interacciones entre subunidades alfa-helicoidales en un conjunto macromolecular.

En el presente estudio, se demostró que los fagos poseen propiedades anti-agregantes además de su función reportada como vehículo para suministrar anti-cuerpos contra β A al cerebro. A partir de los datos presentados en el ejemplo, el fago filamentosos interactúa con β -amiloides y puede interferir en su proceso de agregación e incluso inducir su solubilización. La propiedad desagregante es de gran valor ya que, actualmente, el diagnóstico se efectúa en etapas tardías de la enfermedad cuando las placas de β -amiloides ya están formadas. Este proceso depende del tiempo ya que después de la inyección intracraneal de fagos en ratones Tg portadores de placas amiloides, el efecto máximo se observó solamente después de 3 días. Este efecto puede ser el resultado de la estructura única del fago como un largo filamento delgado que le permite organizarse a lo largo de las fibrillas amiloides, como puede verse en las micrografías de microscopía electrónica. Esta teoría es demostrada por el hecho de que fagos esféricos que perdieron su estructura lineal no podían inhibir la formación de amiloides. Otro factor que puede tener importancia en la actividad del fago es su elevado contenido en hélices alfa (proteína 8) que puede interferir con la estructura de lámina beta. Las subunidades pVIII componen una disposición helicoidal para formar una estructura tubular que rodea al genoma ssADN. El extremo C-terminal de pVIII está expuesto hacia el interior de la estructura tubular y contiene residuos de carga positiva que interactúan con el genoma ssADN de carga negativa. La porción media es rica en aminoácidos hidrofóbicos que son responsables de la interacción entre subunidades. Por último, la porción flexible, N-terminal negativamente cargada está expuesta a la parte exterior de la partícula (Marvin, 1998).

Los bacteriófagos filamentosos ofrecen una ventaja evidente sobre otros vectores. Los fagos filamentosos, M13, f1, y fd, están bien comprendidos a nivel estructural y genético (Wilson y Finley 1998; Rodi y Makowski, 1999). Fueron genéticamente modificados para mostrar tanto el antígeno y/o el anticuerpo y fueron utilizados en diferentes sistemas biológicos para presentar proteínas extrañas en sus superficies (Scott *et al.* 1990; McCafferty *et al.* 1990). Habiendo evolucionado para replicación, reunión e infección procariótica, el bacteriófago no puede reproducirse en, ni mostrar tropismo natural por las células de mamíferos. Esto reduce al mínimo la posibilidad de suministro de genes no específicos. Los vectores del fago son potencialmente mucho más seguros que los virus ya que tienen menos probabilidades de generar una entidad capaz de replicación en células animales.

Otra ventaja de utilizar bacteriófagos como agente desagregante es su fácil producción, ya que se puede obtener fácilmente más material mediante cultivos bacterianos. De acuerdo con el ensayo de etiquetado radioactivo, el fago penetra en el parénquima cerebral después de menos de una hora. Su eliminación empieza probablemente poco después. El porcentaje del fago penetrado a partir de la dosis administrada varió de 0,0009% al 0,018%. Deberían realizarse más estudios para minimizar la variabilidad entre los ratones. Minimizar la dosis y esperar más tiempo entre cada aplicación puede ayudar. En comparación, el 0,1% de concentración de suero de anticuerpo alcanza el cerebro. Aunque el peso molecular del fago es dos órdenes de magnitud más alto que el anticuerpo, la aplicación intranasal puede provocar la penetración del fago.

La referencia a las etapas de métodos conocidos, etapas de métodos convencionales, métodos conocidos o métodos convencionales no constituye en modo alguno una aceptación de que cualquier aspecto, descripción o realización de la presente invención sea revelada, mostrada o sugerida en la técnica pertinente.

Referencias

Banks and Kastin, *Prog Brain Res.*, 91:139-4 (1992).

Bard F, Cannon C, Barbour R, Burke RL, Games D, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Lieberburg I, Motter R, Nguyen M, Soriano F, Vasquez N, Weiss K, Welch B, Seubert P, Schenk D, Yednock T. Peripherally administered antibodies against amyloid β peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med.* Aug; 6(8):916-9 (2000).

Caughey *et al.*, "Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy", *Biochemistry* 30:7672-7680 (1991).

Chartier Harlan *et al.*, *Nature* 353:844 (1991).

ES 2 363 203 T3

Chou et al, *Biopharm Drug Dispos.* 18(4):335-46 (1997).

De **Gioia et al**, "Conformational polymorphism of the amyloidogenic and neurotoxic peptide homologous to residues 106-126 of the prion protein", *J Biol Chem* 269:7859-7862 (1994).

5 **Draghia et al**, *Gene Therapy* 2:418-423 (1995).

Forloni et al., "Neurotoxicity of a prion protein fragment", *Nature* 362:543-546 (1993).

10 **Frenkel and Solomon**, *PNAS*, 99:5675-5679 (2002).

Frenkel D, Solomon B. Filamentous phage as vector mediated antibody delivery to the brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. Apr 16;99(8):5675-9 (2002).

15 **Frenkel et al**, "N-terminal EFRH sequence of Alzheimer's β -amyloid peptide represents the epitope of its anti-aggregating antibodies", *J Neuroimmunology* 88:85-90 (1998).

Gajdusek, *Science* 197:943-960 (1991).

20 **Gazit E.**, Mechanistic studies of the process of amyloid fibrils formation by the use of peptide fragments and analogues: implications for the design of fibrillization inhibitors. *Curr Med Chem*. Oct; 9(19): 1725-35 2002.

Goate et al, *Nature* 349:704 (1991).

25 **Greenwood et al.**, *J. Mol. Biol.*, 220:821-827 (1991).

Griffith J., Manning M., Dunn K. Filamentous bacteriophage contract into hollow spherical particles upon exposure to a chloroform-water interface. *Cell*. Mar; 23(3):747-53 (1981).

30 **Hardy**, *TINS*, 20:154 (1997).

Hart SL, Knight AM, Harbottle RP, Mistry A, Hunger HD, Cutler DF, Williamson R, Coutelle C. Cell binding and internalization by filamentous phage displaying a cyclic Arg-Gly-Asp-containing peptide. *J Biol Chem*. Apr 29; 269(17): 12468-74 (1994).

35 **Horiuchi and Caughey**, "Specific binding of normal prion protein to the scrapie form via a localized domain initiates its conversion to the protease-resistant state", *EMBO J* 18:3193-3203 (1999).

40 **Kanyo et al**, "Antibody binding defines a structure for an epitope that participates in the PrPC \rightarrow PrPSc conformational change", *J Mol Biol*. 293:855-863 (1999).

LeVine H 3rd, Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci*. Mar; 2(3):404-10 (1993).

45 **Lin J. Manase K, Rutgers A, Madaio MP, Meyers KE**, Selection of specific phage from display libraries: monoclonal antibody against VCS M13 helperphage coat protein III (gliip). *Hybridoma*, Jun; 18((3): 257-61 (1999).

Maggio JE, Mantyh PW, Brain amyloid -a physicochemical perspective. *Brain Pathol*. Apr; 6(2): 147-62 (1996).

50 **Marvin DA, Hale RD, Nave C, Citterich MH**, Molecular models and structural comparisons of native and mutant class I filamentous bacteriophages Ff (fd, fi, M13), If1 and Ike. *J. Mol. Biol*. 235:260-286 (1994).

Marvin DA. Filamentous phage structure, infection and assembly. *Curr Opin Struct Biol*. Apr; 8(2): 150-8 (1998).

55 **Mathison et al**, *J. Drug Target*, 5(6):415-441 (1998).

McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*. Dec 6;348(6301): 552-4 (1990).

60 **Medori, Tritschler et al.**, *N Engl J Med* 326: 444-449 (1992).

Monaci P., et al., *Curr Opin Mol Ther.*, 3(2): 159-69 (2001).

Mullan et al, *Nature Genet*. 1:345 (1992).

65 **Murrell et al**, *Science* 254:97 (1991).

ES 2 363 203 T3

Pan et al, "Conversion of alpha-helices into betasheets features in the formation of the scrapie prion proteins", *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10962-10966 (1993).

5 **Peretz et al**, "A conformational transition at the N terminus of the prion protein features in formation of the scrapie isoform", *J Mol Biol* 273:614-622 (1997).

Pike CJ, Overman M.J, Cotman C.W, Amino-terminal deletions enhance aggregation of beta-amyloid peptides *in vitro*. *J Biol Chem*. Oct 13;270(41): 23895-8 (1995).

10 **Roberts LM, Dunker AK**, Structural changes accompanying chloroform-induced contraction of the filamentous phage fd. *Biochemistry*. Oct 5;32(39): 10479-88 (1993).

Rodi, DJ. and Makowski, L., Phage-display technology-finding a needle in a vast molecular haystack. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 10:87-93 (1999).

15 **Scott, JK.; and Smith, GP**, Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science*, 249: 386-390 (1990).

Selvaggini et al, "Molecular characteristics of a protease-resistant, amyloidogenic and neurotoxic peptide homologous to residues 106-126 of the prion protein", *Biochem Biophys Res Commun* 194: 1380-1386 (1993).

20 **Silen and Agard**, "The alpha-lytic protease pro-region does not require a physical linkage to activate the protease domain *in vivo*", *Nature* 341:462-464 (1989).

Solomon B, Koppel R, Frankel D, Hanan-Aharon E., Disaggregation of Alzheimer beta-amyloid by site-directed mAb. *Proc Natl Acad Sci USA*. Apr 15;94 (8):4109-12 (1997).

25 **Solomon B, Koppel R, Hanan E, Katzav T.**, Monoclonal antibodies inhibit *in vitro* fibrillar aggregation of the Alzheimer beta-amyloid peptide. *Proc Natl Acad Sci USA*. Jan 9;93(1):452-5 (1996).

30 **Tagliavini et al**, "Synthetic peptides homologous to prion protein residues 106-147 form amyloid-like fibrils *in vitro*", *Proc Natl Acad Sci USA* 90:9678-9682 (1993).

Wilesmith and Wells, *Curr Top Microbiol immunol* 172:21-38 (1991).

35 **Wilson, DR. and Finlay, BB.**, Phage display: applications, innovations, and issues in phage and host biology. *Can. J. Microbiol.* 44: 313-329 (1998).

Young AA. et al, *FEBS Lett*, 343(3):237-41 (1994).

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Bacteriófago filamentoso de tipo salvaje o bacteriófago filamentoso que no presenta un anticuerpo o un antígeno de bacteriófago no filamentoso en su superficie, para ser utilizado en la inhibición o el tratamiento de una inflamación asociada a depósitos amiloides y de una inflamación cerebral asociada a depósitos de amiloides o que implique microglías activadas.

10 2. Bacteriófago para ser utilizado de acuerdo con la reivindicación 1, donde la inflamación cerebral es inhibida o tratada mediante la administración intranasal de una cantidad efectiva del bacteriófago filamentoso.

3. Bacteriófago para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, donde la inflamación cerebral asociada a depósitos de amiloides o que implica microglías activadas es una enfermedad formadora de placas, seleccionada entre la enfermedad de Alzheimer y una enfermedad priónica.

15 4. Bacteriófago para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la inflamación asociada a depósitos de amiloides es seleccionada entre el mieloma múltiple y una amiloidosis renal.

20 5. Bacteriófago para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el bacteriófago filamentoso es seleccionado entre los bacteriófagos M13, f1 y fd y una mezcla cualquiera de éstos.

25 6. Composición farmacéutica que comporta un soporte o un excipiente farmacéuticamente aceptable y, como ingrediente activo, o bien un bacteriófago filamentoso de tipo salvaje o bien un bacteriófago filamentoso que no presenta un anticuerpo o un antígeno de bacteriófago no filamentoso en su superficie.

7. Composición farmacéutica según la reivindicación 6, en la que dicho bacteriófago filamentoso es elegido entre el grupo constituido por M13, f1 y fd, y mezclas de estos.

30 8. Bacteriófago filamentoso de tipo salvaje o bacteriófago filamentoso que no presenta un anticuerpo o un antígeno de bacteriófago no filamentoso en su superficie, para ser utilizado como medicamento.

35 9. Procedimiento *in vitro* para inhibir la formación de depósitos de amiloides, que comprende el provocar que un bacteriófago filamentoso entre en contacto con un péptido que forma placas para inhibir la formación de depósitos de amiloides, donde el bacteriófago filamentoso es un bacteriófago filamentoso de tipo salvaje o un bacteriófago filamentoso que no presenta un anticuerpo o un antígeno de bacteriófago no filamentoso en su superficie.

40 10. Procedimiento *in vitro* para desagregar depósitos de amiloides preformados, que comprende el provocar que un bacteriófago filamentoso entre en contacto con los depósitos de amiloides preformados para desagregar los depósitos de amiloides preformados, donde el bacteriófago filamentoso es un bacteriófago filamentoso de tipo salvaje o un bacteriófago filamentoso que no presenta un anticuerpo o un antígeno de bacteriófago no filamentoso en su superficie.

45 11. Procedimiento según la reivindicación 9 ó 10, donde el bacteriófago filamentoso es elegido entre el grupo constituido por bacteriófagos M13, f1 y fd, y mezclas de éstos.

50 12. Bacteriófago filamentoso de tipo salvaje o bacteriófago filamentoso que no presenta un anticuerpo o un antígeno de bacteriófago no filamentoso en su superficie, para ser utilizado en el tratamiento de una enfermedad elegida entre el grupo constituido por la enfermedad de Alzheimer, la amiloidosis SAA, el síndrome islandés hereditario, la demencia senil, mielomas múltiples, de Kuru, la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob (CJD), la enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS), el insomnio familiar fatal (FFI), el temblor epidémico (escrapie) y la encefalitis espongiforme bovina (BSE).

55 13. Bacteriófago para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, donde la enfermedad es la enfermedad de Alzheimer.

14. Bacteriófago para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, donde la enfermedad es la enfermedad de Alzheimer de aparición precoz, la enfermedad de Alzheimer de aparición tardía o la enfermedad de Alzheimer pre-sintomática.

60 15. Bacteriófago para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, donde el bacteriófago filamentoso es elegido entre los bacteriófagos M13, f1 y fd, y las mezclas de cualquiera de éstos.

65 16. Utilización de un bacteriófago filamentoso de tipo salvaje o bacteriófago filamentoso que no presenta un anticuerpo o un antígeno de bacteriófago no filamentoso en su superficie, en la preparación de un medicamento destinado a inhibir o tratar una inflamación asociada a depósitos de amiloides y una inflamación cerebral asociada a depósitos de amiloides o implicando microglías activadas.

ES 2 363 203 T3

17. Utilización de un bacteriófago filamentoso de tipo salvaje o bacteriófago filamentoso que no presenta un anticuerpo o un antígeno de bacteriófago no filamentoso en su superficie, en la preparación de un medicamento destinado a tratar una enfermedad elegida entre el grupo constituido por la Alzheimer, la amiloidosis SAA, el síndrome islandés hereditario, la demencia senil, mielomas múltiples, de Kuru, la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob (CJD), la enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS), el insomnio familiar fatal (FFI), el temblor epidémico (scrapie) y la encefalitis espongiforme bovina (BSE).

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

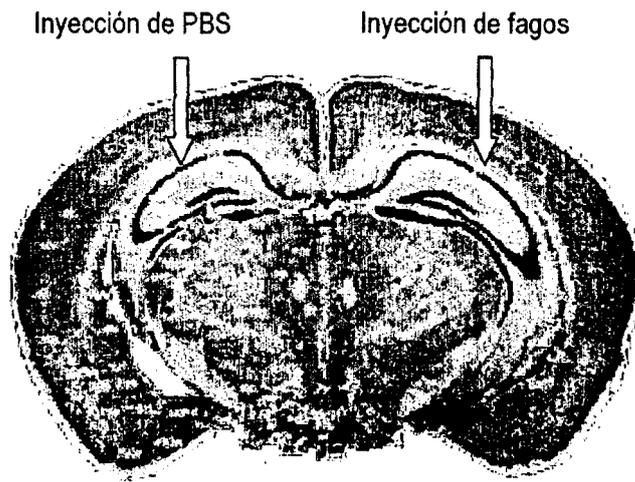


FIG. 1

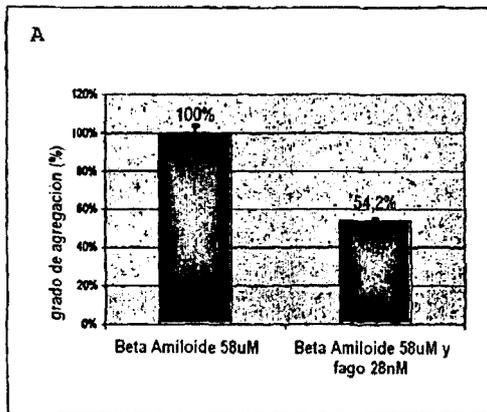


FIG. 2A

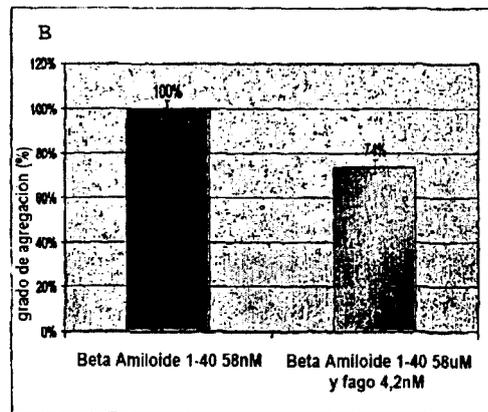


FIG. 2B



FIG. 3A

FIG. 3B

FIG. 3C

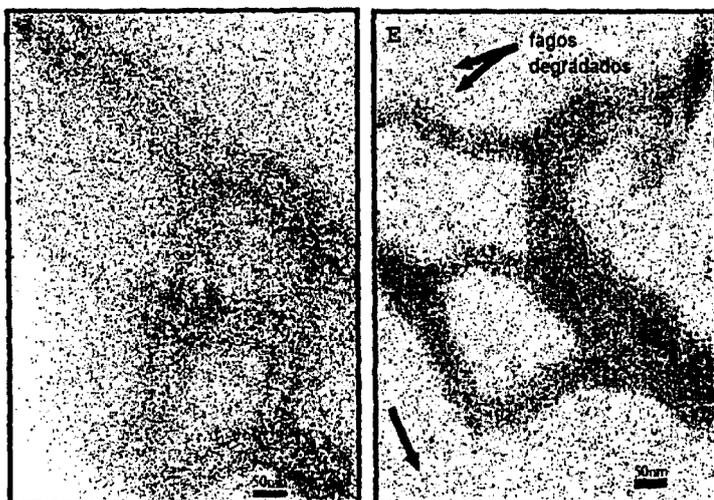


FIG. 3D

FIG. 3E

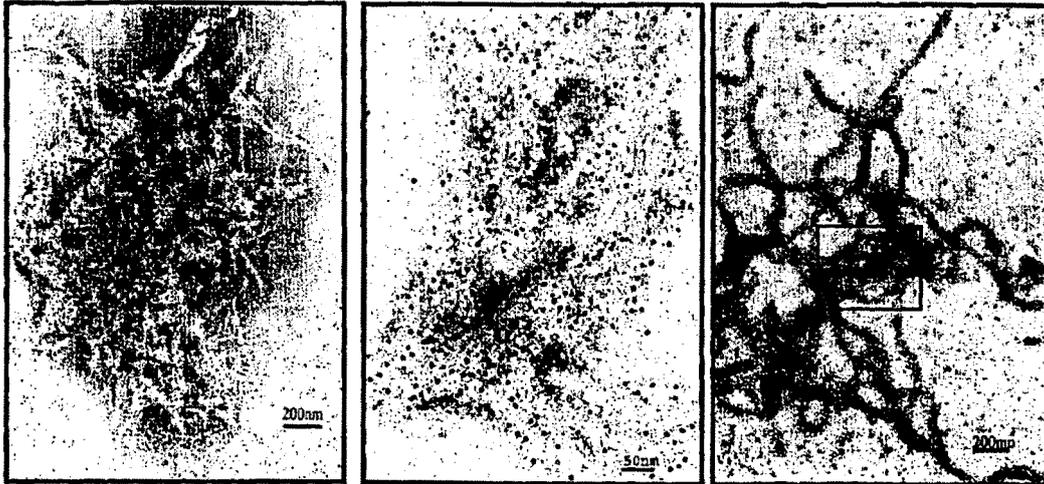


FIG. 3F

FIG. 3G

FIG. 3H

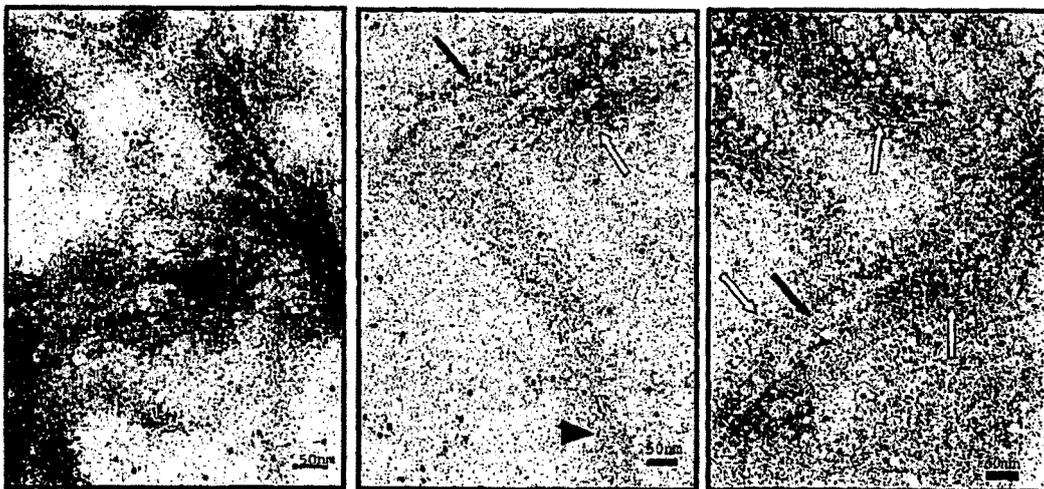


FIG. 3I

FIG. 3J

FIG. 3K



FIG. 4A

FIG. 4B

FIG. 4C

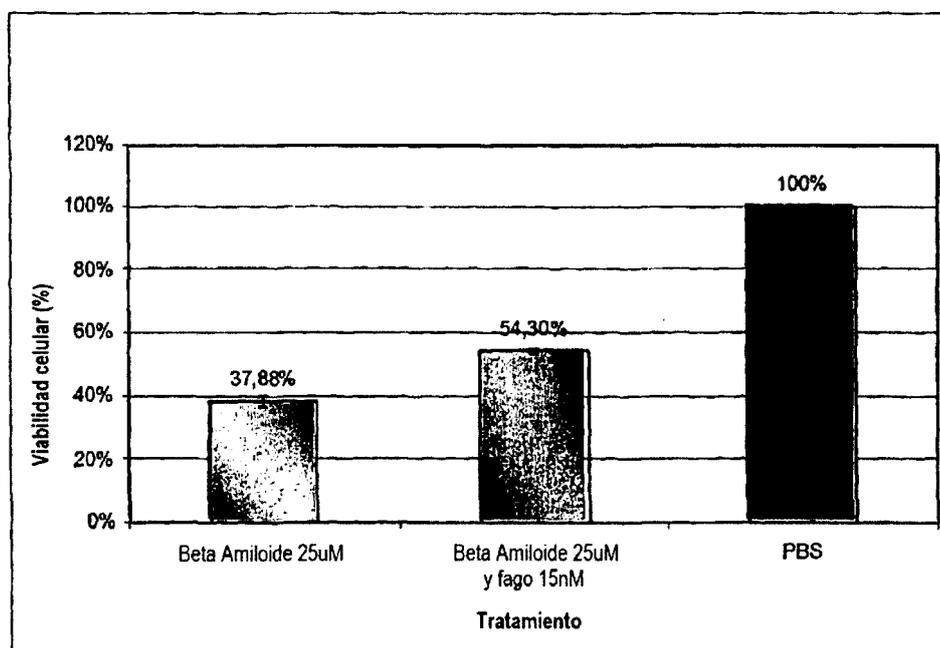


FIG. 5A

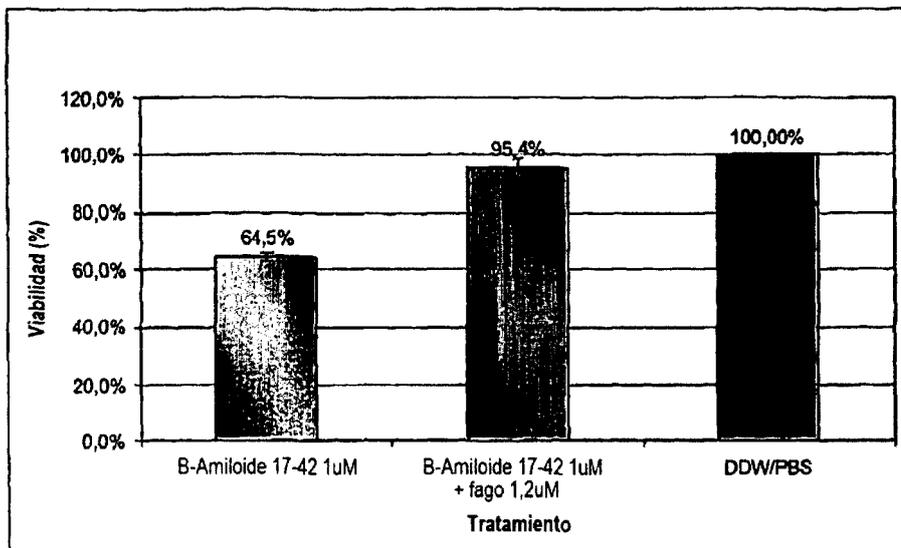


FIG. 5B

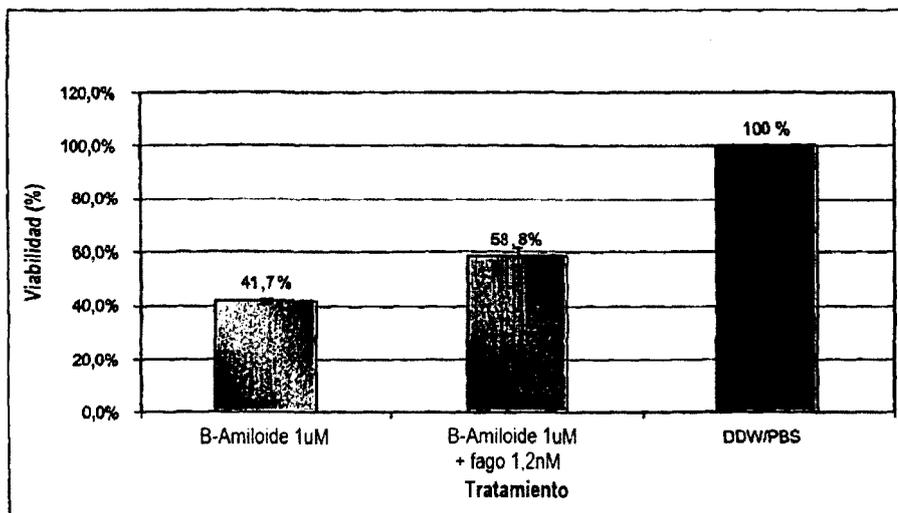


FIG. 5C



FIG. 6A

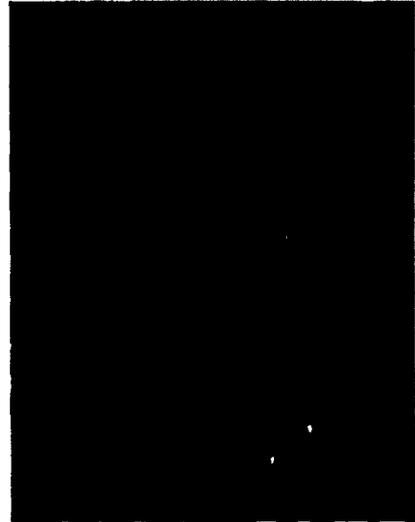


FIG. 6B

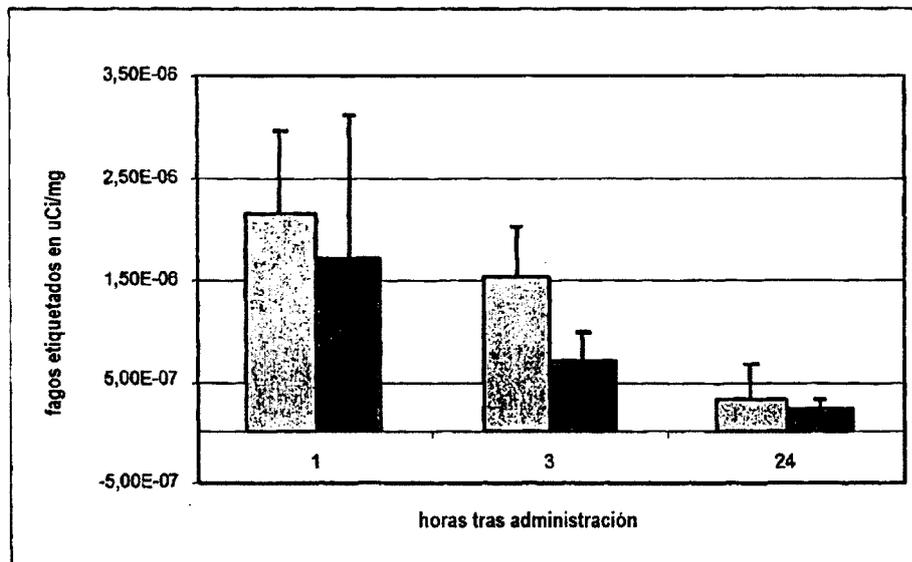


FIG. 7