

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 907**

51 Int. Cl.:
C07K 14/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 38/03 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03711746 .2**
96 Fecha de presentación: **07.04.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1497321**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.01.2005**

54 Título: **PROCEDIMIENTOS Y COMPOSICIONES INMUNOLÓGICAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.**

30 Prioridad:
19.04.2002 US 373914 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.11.2011

73 Titular/es:
**THE GOVERNING COUNCIL OF THE UNIVERSITY OF TORONTO
106 SIMCOE HALL, 27 KING'S COLLEGE CIRCLE
TORONTO, ONTARIO M5S 1A1, CA**

72 Inventor/es:
**ST. GEORGE-HYSLOP, Peter y
MCLAURIN, Joanne**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 368 907 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

Procedimientos y composiciones inmunológicas para el tratamiento de la enfermedad de alzheimer

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

CAMPO DE LA INVENCION

10 [0001] Esta invención se refiere a procedimientos y composiciones inmunológicas para tratar la enfermedad de Alzheimer. Esta invención además se refiere a procedimientos para identificar compuestos que inhiben la formación de la placa amiloide y/o eliminan las placas amiloides existentes asociadas con la enfermedad de Alzheimer y con otras enfermedades neurodegenerativas.

DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA RELACIONADA

15 [0002] La enfermedad de Alzheimer ("EA") es una enfermedad cerebral neurodegenerativa que es una causa importante de demencia junto con la ancianidad. Entre los síntomas de la EA pueden incluirse pérdida progresiva de las funciones del aprendizaje y la memoria, cambios de personalidad, cambios neuromusculares, convulsiones y, ocasionalmente, comportamiento psicótico.

20 [0003] La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por dos neuropatologías diferenciadas: el depósito de placas amiloides en áreas del cerebro que son críticas para la memoria y otras funciones cognitivas y el desarrollo de ovillos neurofibrilares en las células nerviosas. Se considera que el depósito de placas amiloides en estas zonas críticas del cerebro interfiere con las funciones cerebrales. De forma similar, se ha propuesto que los ovillos neurofibrilares, que se acumulan dentro de las células nerviosas en los pacientes con EA, interfieren con la comunicación entre neuronas.

25 [0004] Una característica adicional de la enfermedad de Alzheimer es la presencia del péptido beta amiloide hidrófobo (Abeta₄₂) como componente principal de las placas amiloides. El péptido beta amiloide (Abeta₄₂) es un fragmento formado a partir del procesamiento proteolítico de una proteína normal integral de membrana conocida como proteína precursora del amiloide (APP) o conocida, alternativamente, como proteína amiloide A4 de la enfermedad de Alzheimer.

30 [0005] Los péptidos beta amiloides (Abeta) comprenden un grupo de péptidos de 39-43 aminoácidos de longitud que se procesan a partir de la APP. Véase Pallitto y col., Biochemistry 38:3570-3578 (1999). Generalmente, los péptidos Abeta incluyen de 11 a 15 restos de la región transmembrana de APP y, por tanto, contienen una región hidrófoba, aunque el péptido Abeta completo puede tener carácter anfifílico. Véase Kang y col., Nature 325:733-736 (1987). Se ha demostrado que los péptidos Abeta son tóxicos para células en cultivo. Véase Pike y col., Eur. J. Pharmacol. 207:367-368 (1991); Iversen y col., Biochem. J. 311:1-16 (1995). Se considera que la toxicidad de los péptidos Abeta en la enfermedad de Alzheimer está relacionada con el proceso de agregación de péptidos Abeta solubles en fibrillas insolubles y, posteriormente, la incorporación de la fibrilla a las placas amiloides. Véanse Pike y col., Eur. J. Pharmacol. 207:367-368 (1991); Pike y col., Brain Research, 563:311-314 (1991) y Pike y col., J. Neurosci. 13:1676-1687 (1993). De forma similar, los péptidos Abeta formarán fibrillas *in vitro* y este proceso puede aprovecharse para medir la inhibición de la agregación de Abeta y la formación de fibrillas.

40 [0006] Previamente, varios grupos han utilizado modelos de ratones transgénicos para la enfermedad de Alzheimer en los que ratones transgénicos que mostraban tanto depósitos amiloides en el cerebro como defectos cognitivos, fueron inmunizados con preparaciones de antígeno Abeta₄₂. Los resultados de estos estudios demostraron que la inmunización con Abeta₄₂ podría producir reducciones tanto en la neuropatología similar a la enfermedad de Alzheimer como en las alteraciones de la memoria espacial de los ratones. Véanse Schenk y col., Nature 400:173-177 (1999); Bard y col., Nature Medicine 6:916-919 (2000); Janus y col., Nature 408:979-982 (2000) y Morgan y col., Nature 408:982-982 (2000). Bard y col. postularon que la inmunización con una vacuna de Abeta₄₂ probablemente induciría la activación de la microglia y posterior inclusión de agregados Abeta₄₂ por parte de la microglia. Bard y col., Nature Medicine 6:916-919 (2000). Desafortunadamente, no se han elucidado todos los mecanismos inmunológicos que subyacen a la reducción de los depósitos de placa amiloide y la mejora de la función cognitiva.

50 [0007] Estudios previos de administración pasiva de los anticuerpos 3D6 y 10D5, cuyos epítopes son los restos 1-5 y 3-6 de Abeta, respectivamente, fueron eficaces a la hora de disminuir tanto la carga de Abeta como de placa amiloide en ratones transgénicos. Véase Bard y col., Nature Medicine 6:916-919 (2000). Los ratones eran transgénicos para una forma mutante ligada a la enfermedad de una proteína precursora del amiloide (APP) humana que estaba bajo el control del promotor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PD). Estos ratones (PDAPP) sobreexpresan la proteína precursora del amiloide humana y manifiestan muchos de los síntomas patológicos de la enfermedad de Alzheimer. Véase Bard y col., Nature Medicine 6:916-919 (2000).

65

[0008] En otro estudio, la administración periférica de m266, un anticuerpo frente a los restos 13-28 de Abeta, mostró una disminución de la carga de Abeta en el cerebro a través del aclaramiento plasmático en ratones PDAPP. Véase Demattos y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:8850-8855 (2001). El anticuerpo m266 está directamente dirigido hacia un sitio inmunogénico secundario de Abeta, que puede mostrar una especificidad de unión diferente para los oligómeros, protofibrillas y placas de Abeta o acceso diferencial al SNC.

[0009] Tanto el antígeno Abeta₄₂ como las APP son proteínas propias y, por tanto, normalmente no son inmunogénicas en un individuo que expresa estas proteínas. Por consiguiente, los intentos de producir vacunas a base de estos antígenos requieren necesariamente la inducción de autoinmunidad. Además, cualquier protocolo de inmunización que pretenda inducir autoinmunidad debería examinar con cuidado las respuestas inmunitarias inducidas por dichos autoantígenos. En este caso, es importante que todo autoantígeno que incorpore Abeta₄₂, o elementos de Abeta₄₂, no induzca autoinmunidad frente a la proteína APP normal ni altere su función celular normal.

[0010] Para el desarrollo de procedimientos inmunoterapéuticos eficaces para el tratamiento de la EA, sería deseable que se determinaran los mecanismos inmunológicos de reducción mediados por el sistema inmune de la carga de placa amiloide tras la inmunización con antígenos de tipo Abeta₄₂.

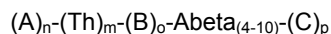
[0011] Sería ventajoso utilizar el conocimiento sobre el mecanismo de reducción de placa amiloide para diseñar composiciones inmunogénicas y antígenos que incorporen solo aquellos epítopes que tienen actividad biológica beneficiosa. Una ventaja adicional es que estas composiciones inmunogénicas pueden diseñarse para excluir aquellos epítopes que inducen inmunidad perjudicial. Por tanto, existe la necesidad de antígenos definidos que induzcan respuestas inmunes muy específicas y limitadas solo frente a formas aberrantes del antígeno Abeta.

[0012] También existe la necesidad de composiciones inmunogénicas que comprendan antígenos definidos que pueden usarse en inmunoterapia para inducir respuestas inmunes muy específicas y limitadas solo a formas patogénicas del antígeno Abeta. Además, sería ventajoso aislar anticuerpos para definir epítopes de Abeta que tengan propiedades biológicas beneficiosas para su uso en inmunoterapia pasiva. Podría suponer una ventaja adicional desarrollar pruebas diagnósticas para determinar, lo antes posible después de iniciar el tratamiento, si un paciente con enfermedad de Alzheimer se beneficiará del tratamiento con composiciones inmunogénicas de antígenos Abeta. Existe una necesidad adicional de identificar inhibidores de depósitos amiloides y de formación de fibrillas.

RESUMEN DE LA INVENCION

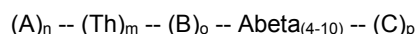
[0013] La presente invención cumple con la necesidad previa de proporcionar composiciones inmunogénicas que comprenden los restos 4-10 (SEQ ID NO: 1) del péptido amiloide Abeta₄₂ (SEQ ID NO: 2) y conocido como Abeta(4-10), que es como se define en las reivindicaciones adjuntas. Los antígenos y las composiciones inmunogénicas de la presente invención son útiles para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, para el diseño de moléculas pequeñas inhibitorias del depósito amiloide y como reactivos de diagnóstico. La descripción proporciona adicionalmente anticuerpos que se unen al determinante antigénico Abeta₍₄₋₁₀₎. La composición inmunogénica de la invención y los anticuerpos descritos en este documento también puede usarse en procedimientos para mejorar los síntomas de la enfermedad de Alzheimer reduciendo la carga amiloide en pacientes con Alzheimer.

[0014] En un primer aspecto, la invención proporciona un péptido representado por la fórmula:



en la que cada A, B y C son un resto de aminoácido o una secuencia de restos de aminoácidos;
 en la que n, o y p son independientemente números enteros que oscilan de 0 a aproximadamente 20;
 Th es independientemente una secuencia de restos de aminoácidos que comprende un epítipo de células T colaboradoras;
 cuando o es igual a 0, entonces Th está directamente conectado con el epítipo de células B a través de un péptido unido sin restos espaciadores;
 en la que m es un número entero de 1 a aproximadamente 5, y Abeta₍₄₋₁₀₎ es (SEQ ID NO: 1), en la que dicho péptido se selecciona entre el grupo compuesto por SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 26; SEQ ID NO: 27; SEQ ID NO: 28; SEQ ID NO: 29; SEQ ID NO: 30; SEQ ID NO: 31; SEQ ID NO: 32; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 34; SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 36; SEQ ID NO: 37; SEQ ID NO: 38; SEQ ID NO: 39; SEQ ID NO: 40; SEQ ID NO: 41; SEQ ID NO: 42; SEQ ID NO: 43; SEQ ID NO: 44; SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 46.

[0015] También se describen en este documento péptidos representados por la fórmula



en la que cada A, B y C son un resto de aminoácido o una secuencia de restos de aminoácidos;

en la que n, o y p son independientemente números enteros que oscilan de 0 a aproximadamente 20;
 Th es independientemente una secuencia de restos de aminoácidos que comprende un epítotope de células T colaboradoras o un análogo o segmento del mismo que potencia la respuesta inmune;
 cuando o es igual a 0, entonces Th está directamente conectado con el epítotope de células B a través de un péptido unido sin restos espaciadores;
 en la que m es un número entero de 1 a aproximadamente 5 y
 Abeta₍₄₋₁₀₎ es (SEQ ID NO: 1) o un análogo del mismo que contiene una sustitución de aminoácido conservadora.

10 **[0016]** La invención presente proporciona una composición inmunogénica para inducir la producción de anticuerpos que se unen específicamente a un péptido beta amiloide (SEQ ID NO: 2) que comprende:
 a) un antígeno que comprende un epítotope de células T que proporciona una cantidad eficaz de ayuda de células T y un epítotope de células B compuesto por el péptido Abeta₍₄₋₁₀₎ (SEQ ID NO: 1); en la que dicho antígeno se selecciona entre el grupo compuesto por SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 26; SEQ ID NO: 27; SEQ ID NO: 28;
 15 SEQ ID NO: 29; SEQ ID NO: 30; SEQ ID NO: 31; SEQ ID NO: 32; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 34; SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 36; SEQ ID NO: 37; SEQ ID NO: 38; SEQ ID NO: 39; SEQ ID NO: 40; SEQ ID NO: 41; SEQ ID NO: 42; SEQ ID NO: 43; SEQ ID NO: 44; SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 46 y
 b) un adyuvante.

20 **[0017]** También se describe en este documento una composición inmunogénica para inducir anticuerpos que se unen específicamente a un péptido beta amiloide (SEQ ID NO: 2) que comprende: un antígeno, que comprende un epítotope de células T que proporciona una cantidad eficaz de ayuda de células T y un epítotope de células B compuesto por el péptido Abeta₍₄₋₁₀₎ (SEQ ID NO: 1) y un adyuvante.

25 **[0018]** En una determinada realización, la presente invención proporciona una composición inmunogénica para inducir la producción de anticuerpos que se unen específicamente a un péptido beta amiloide que comprende: un antígeno, que comprende un epítotope de células T que proporciona una cantidad eficaz de ayuda de células T y un epítotope de células B compuesto por un péptido Abeta₍₄₋₁₀₎ y un adyuvante, en la que el epítotope de células T se selecciona entre el grupo compuesto por:
 30 a) uno o más epítopos de células T localizados en posición N-terminal del epítotope de células B en la misma estructura fundamental proteica,
 b) uno o más epítopos de células T localizados en posición C-terminal del epítotope de células B en la misma estructura fundamental proteica y
 35 c) uno o más epítopos de células T localizados en una estructura fundamental proteica diferente que está unida a través de un enlace covalente a una estructura fundamental proteica que contiene el epítotope de células B.

[0019] En una realización en particular, la presente invención proporciona una composición inmunogénica que tiene un epítotope de células B y un epítotope de células T, en la que el epítotope de células T tiene una secuencia de aminoácido que se selecciona entre el grupo compuesto por SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21.

45 **[0020]** En otra realización particular, la presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende un antígeno y un adyuvante, en el que dicho adyuvante comprende una o más sustancias seleccionadas entre el grupo compuesto por hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, saponina, Quill A, Quill A/ISCOM, bromuro de dimetil dioctadecil amonio/arvidina, polianiones, adyuvante completo de Freund, N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina, N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina, adyuvante incompleto de Freund y liposomas.

50 **[0021]** También se describe en este documento un procedimiento para tratar a un individuo afectado por la enfermedad de Alzheimer que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición inmunogénica para inducir la producción de anticuerpos que se unen específicamente a un péptido beta amiloide (SEQ ID NO: 2) que comprende: a) un antígeno que comprende un epítotope de células T que proporciona una cantidad eficaz de ayuda de células T y un epítotope de células B compuesto por el péptido Abeta₍₄₋₁₀₎ (SEQ ID NO: 1) y b) un adyuvante.

60 **[0022]** También se describe en este documento un procedimiento para reducir la cantidad de depósitos amiloides en el cerebro de un individuo afectado por la enfermedad de Alzheimer que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición inmunogénica para inducir la producción de anticuerpos que se unen específicamente a un péptido beta amiloide (SEQ ID NO: 2) que comprende: a) un antígeno que comprende un epítotope de células T que proporciona una cantidad eficaz de ayuda de células T y un epítotope de células B compuesto por el péptido Abeta₍₄₋₁₀₎ (SEQ ID NO: 1) y b) un adyuvante.

65 **[0023]** También se describe en este documento un procedimiento para disgregar las fibrillas amiloides en el

cerebro de un individuo afectado por la enfermedad de Alzheimer que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición inmunogénica para inducir la producción de anticuerpos que se unen específicamente a un péptido beta amiloide (SEQ ID NO: 2) que comprende: a) un antígeno que comprende un epítipo de células T que proporciona una cantidad eficaz de ayuda de células T y un epítipo de células B compuesto por el péptido Abeta₍₄₋₁₀₎ (SEQ ID NO: 1) y b) un adyuvante.

[0024] También se describe en este documento un anticuerpo aislado o un fragmento de unión al antígeno del mismo capaz de unirse al péptido Abeta₍₄₋₁₀₎ (SEQ ID NO: 1).

[0025] También se describe en este documento un anticuerpo aislado o un fragmento de unión al antígeno del mismo capaz de unirse al péptido Abeta₍₄₋₁₀₎ (SEQ ID NO: 1), en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno inhiben el depósito amiloide.

[0026] También se describe en este documento un anticuerpo aislado o un fragmento de unión al antígeno del mismo capaz de unirse al péptido Abeta₍₄₋₁₀₎ (SEQ ID NO: 1), en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno disgregan las fibrillas amiloides.

[0027] También se describe en este documento un procedimiento para tratar a un individuo afectado por la enfermedad de Alzheimer que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición de anticuerpos que reconoce y se une al péptido Abeta₍₄₋₁₀₎ (SEQ ID NO: 1).

[0028] También se describe en este documento un procedimiento para tratar a un individuo afectado por la enfermedad de Alzheimer que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición de anticuerpo que reconoce y se une al péptido Abeta₍₄₋₁₀₎ (SEQ ID NO: 1), en el que la composición de anticuerpos comprende anticuerpos policlonales.

[0029] También se describe en este documento un procedimiento para tratar a un individuo afectado por la enfermedad de Alzheimer que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición de anticuerpo que reconoce y se une al péptido Abeta₍₄₋₁₀₎ (SEQ ID NO: 1), en el que la composición de anticuerpo comprende un anticuerpo monoclonal.

[0030] Aún en otra realización preferida de la presente invención se proporciona un procedimiento para determinar si un compuesto es un inhibidor del depósito amiloide y de la formación de fibrillas que comprende: poner en contacto el compuesto con el péptido Abeta₍₄₋₁₀₎ (SEQ ID NO: 1) y detectar la unión del compuesto con el péptido. En otra realización, el procedimiento además comprende evaluar si el compuesto inhibe la formación de fibrillas amiloides *in vitro*.

[0031] En otro ejemplo, la descripción presente proporciona un procedimiento diagnóstico para predecir la eficacia de una terapia de inmunización activa para la enfermedad de Alzheimer que comprende: controlar el desarrollo de una respuesta inmune frente al péptido Abeta₍₄₋₁₀₎ (SEQ ID NO: 1); en la que una respuesta inmune positiva frente al péptido Abeta₍₄₋₁₀₎ (SEQ ID NO: 1) indica que el tratamiento debería continuarse y la ausencia de respuesta inmune o una respuesta muy débil indican que el tratamiento debe interrumpirse.

[0032] En un ejemplo adicional, la presente descripción proporciona una composición inmunogénica que comprende: un antígeno y un adyuvante; en el que el antígeno comprende un epítipo de células T que proporciona una cantidad eficaz de ayuda de células T y un epítipo de células B compuesto por el péptido Abeta₍₄₋₁₀₎ (SEQ ID NO: 1); en el que el antígeno proporciona un contexto estructural proteico eficaz para inducir anticuerpos que se unen a una diana inmune localizada en un péptido beta amiloide (SEQ ID NO: 2).

[0033] En un ejemplo determinado, la presente descripción proporciona un antígeno que comprende un epítipo de células B, en el que el contexto estructural proteico del epítipo de células B, que proporciona un mimetismo estructural secundario de la diana inmune como el que se encuentra en el péptido beta amiloide (SEQ ID NO: 2), se selecciona a partir del grupo compuesto por lámina beta, giro inverso, hélice, plegamiento aleatorio o una combinación de ellos. En determinadas realizaciones adicionales, el antígeno incluye un epítipo de células B que comprende un mimético del péptido Abeta₍₄₋₁₀₎ (SEQ ID NO: 1).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

DEFINICIONES

[0034] Se entenderá que los términos siguientes, a no ser que se indique lo contrario, tienen el siguiente significado:

Adyuvante: se refiere a las sustancias que pueden ser mezclas de sustancias que se combinan con un antígeno para potenciar la inmunogenicidad del antígeno en una composición inmunogénica. Los adyuvantes ejercen su

función aumentando la respuesta inmune frente al antígeno, normalmente actuando directamente sobre el sistema inmune y proporcionando una liberación lenta del antígeno.

Péptido beta amiloide (Abeta): se refiere a cualquiera de un grupo de péptidos de 39-43 restos de aminoácidos que se procesan a partir de la proteína precursora del amiloide (APP). Según se usa en este documento, Abeta₄₂ se refiere al péptido de Abeta de 42 restos de aminoácidos. Además, Abeta₍₄₋₁₀₎ se refiere al péptido de 7 restos de aminoácidos de Abeta₄₂ del resto 4 al resto 10. Como se describe con más detalle a continuación, el gen APP sufre un ajuste alternativo para generar tres isoformas comunes que contienen 770 aminoácidos (APP₇₇₀), 751 aminoácidos (APP₇₅₁) y 695 aminoácidos (APP₆₉₅). Por convención, se usa la numeración de codones de la isoforma más larga APP₇₇₀, incluso cuando se hace referencia a posiciones de codones de las isoformas más cortas.

Antígeno: los antígenos de la presente invención son combinaciones de los epítopes de las células T colaboradoras y de los epítopes de células B. El epítipo de células T colaboradoras puede estar localizado en posición N-terminal o C-terminal con respecto al epítipo de células B en la misma estructura fundamental polipeptídica. El epítipo de células T también puede estar localizado en una estructura fundamental polipeptídica diferente que está unida covalentemente al polipéptido que contiene el epítipo de células B como , por ejemplo, cuando un péptido pequeño está unido covalentemente a una molécula portadora, como la hemocianina de lapa californiana para proporcionar inmunogenicidad. Alternativamente, el epítipo de células T puede estar asociado no covalentemente con el epítipo de células B por combinación del epítipo de células T y B en una composición con el adyuvante.

Procesamiento del antígeno: se refiere al proceso en el que los antígenos extracelulares de bacterias, virus o composiciones inmunogénicas son captados por las células presentadoras de antígeno (APC, por sus siglas en inglés) por endocitosis o fagocitosis. Posteriormente, el antígeno se fragmenta en los endosomas o lisosomas y los fragmentos peptídicos se cargan dentro de las hendiduras de unión de las moléculas de MHC de clase I y de MHC de clase II.

Presentación del antígeno: se refiere al proceso en el que las moléculas de MHC de clase I y de MHC de clase II se unen a los péptidos procesados cortos y presentan estos péptidos sobre la superficie celular para su selección por las células T a través de una interacción mediada por un receptor de células T.

Epítipo de células B: se refiere a la parte del antígeno que es la diana de unión del anticuerpo y que también se conoce como determinante antigénico. En el caso de determinantes antigénicos proteicos, el epítipo de células B se refiere a restos de aminoácidos en una disposición tridimensional especial que normalmente se corresponde con la estructura nativa. A diferencia de los epítopes de células T, los epítopes de células B pueden ser sumamente sensibles a la conformación proteica.

Cantidad eficaz: se refiere a una cantidad de las composiciones inmunogénicas, anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de la invención que cumplen cualquiera de los objetivos de tratamiento definidos. El término cantidad eficaz también pretende incluir tanto usos profilácticos como terapéuticos de las composiciones, anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos.

Epítipo de células T colaboradoras: los epítopes de células T colaboradoras (epítipo Th o *helper*) son péptidos que se unen a moléculas MHC de clase II y sirven para activar células T CD4⁺ proporcionando ayuda en forma de citocinas a las células B para la generación de una respuesta anticorpal a un antígeno. Las moléculas de MHC de clase II están cargadas con fragmentos peptídicos procesados de aproximadamente 7 a aproximadamente 30 restos de longitud, en compartimentos celulares que se comunican con el entorno extracelular. Por tanto, los epítopes de células T colaboradoras generalmente representan fragmentos de proteínas extrañas.

Diana inmune: se refiere al epítipo tridimensional actual (nativo) en el depósito amiloide o péptidos Abeta en circulación que pretende mimetizar al epítipo de células B dentro del antígeno. Generalmente, los anticuerpos antiproteína son específicos para secuencias de aminoácidos en una estructura secundaria en particular. Idealmente, la inducción de anticuerpos frente al mimético del antígeno del epítipo da lugar a la producción de anticuerpos que reconocen y se unen al epítipo nativo que aparece en los depósitos amiloides patológicos o en los péptidos Abeta en circulación.

Inmunógeno: se refiere a un antígeno que se demuestra es inmunogénico.

Inmunogenicidad: se refiere a la capacidad de un antígeno para provocar una respuesta inmune. En general, los antígenos deben estar asociados a células presentadoras de antígeno para ser inmunogénicos. Muchos factores influyen sobre la inmunogenicidad, como el tamaño, estructura y secuencia del antígeno, el grado de diferencia con respecto a lo propio, presencia de adyuvante, estado inmunológico del paciente, así como otros factores genéticos.

Péptido: se refiere a un número pequeño, normalmente 2 o más, de aminoácidos unidos entre sí.

5 Polipéptido: se refiere a cadenas más largas de aminoácidos unidos entre sí, pero con una secuencia o longitud generalmente indefinida. Los términos proteína, péptido y polipéptido se utilizarán ocasionalmente de forma indistinta.

10 Epítoto de células T colaboradoras promiscuo: se refiere a epítotoes de células T colaboradoras capaces de inducir respuestas de activación de células T (ayuda a células T) en gran número de individuos que expresan diversos haplotipos de MHC, es decir, una población genéticamente diversa. Estos epítotoes de Th ejercen su función en muchos individuos diferentes de una población heterogénea y se considera que son epítotoes Th promiscuos.

15 Estructura fundamental proteica o polipeptídica: se refiere a la unidad repetida que representa un aminoácido como parte de una secuencia proteica. La estructura fundamental polipeptídica consta de la secuencia de tres átomos: el nitrógeno amida (N-H), el carbono alfa (C) y el carbono carbonilo (C=O): que generalmente puede representarse como sigue –N-C-C-.

20 Proteína: generalmente se refiere a las cadenas específicas de aminoácidos que tienen una secuencia, longitud y confirmación plegada definidas, aunque proteína, polipéptido y péptido pueden ocasionalmente utilizarse indistintamente.

25 Tratamiento: incluye los siguientes objetivos: 1) prevenir la aparición de síntomas o estados patológicos no deseados en un sujeto que aún no ha sido diagnosticado que los tenga; 2) inhibir síntomas o estados patológicos no deseados, es decir, detener su desarrollo o 3) mejorar o aliviar los síntomas o estados patológicos no deseados, es decir, causar la regresión de los síntomas y estados patológicos no deseados.

30 **[0035]** Las composiciones y procedimientos de la presente invención provienen del descubrimiento por estos inventores de que las reducciones mediadas por el sistema inmune de los depósitos de la placa amiloide y las correspondientes mejoras en la función cognitiva pueden estar mediadas por respuestas anticorpales específicas frente a una diana inmune en particular o a un epítoto de células B en Abeta₄₂. Esta diana inmune crítica ha sido identificada por los presentes inventores como los restos 4-10 (FRHDSGY) (SEQ ID NO: 1) de Abeta₄₂ que se corresponden con los restos 675 a 681 de la proteína precursora del amiloide (APP) según la numeración de codones de la isoforma más larga APP₇₇₀. Como consecuencia, los presentes inventores han elucidado un importante mecanismo inmunológico de reducción mediada por el sistema inmune de la carga de placa amiloide tras la inmunización con antígenos de tipo Abeta₄₂.

40 **[0036]** Los presentes inventores han descubierto que los anticuerpos que reconocen y se unen a los restos 4-10 (FRHDSGY) (SEQ ID NO: 1) de Abeta₄₂, inhiben la formación de fibrillas Abeta y la neurotoxicidad de Abeta. Además, los presentes inventores han descubierto que los anticuerpos que reconocen y se unen a los restos 4-10 (FRHDSGY) de Abeta₄₂, disgregan las fibrillas de Abeta₄₂ previamente formadas. Adicionalmente, la presente invención describe que los anticuerpos generados durante la inmunización con Abeta₄₂ anulan la muerte celular *in vitro* provocada por Abeta.

45 **[0037]** La presente invención se realizó usando ratones TgCRND8 como modelo para la EA humana. Los ratones TgCRND8 son útiles como modelo de la EA porque son portadores de un transgén APP₆₉₅ humano doble mutante controlado por el promotor de la proteína priónica y muestran una acumulación progresiva del péptido Abeta₄₂ y de placas amiloides neuríticas en la corteza cerebral (un rasgo característico neuropatológico de la EA) que se acompaña de un deterioro cognitivo progresivo. Véase Chishti y col., J. Biol. Chem., 276:21562-570 (2001).

50 **[0038]** La presente descripción proporciona anticuerpos específicamente dirigidos frente al péptido N-terminal de Abeta que se generaron durante la inmunización de ratones C57BL6 x C3H con formas protofibrilares de Abeta₄₂. La descripción actual además proporciona la secuencia Abeta FRHDSGY (SEQ ID NO: 1) que se corresponde con Abeta₍₄₋₁₀₎ y representa un epítoto crítico para la inmunidad protectora para la enfermedad de Alzheimer. Además, la presente invención identifica el epítoto Abeta₍₄₋₁₀₎ como una diana inmune para la generación de inmunidad protectora beneficiosa en pacientes afectados por la enfermedad de Alzheimer.

PRESENTACIÓN ANTIGÉNICA

60 **[0039]** La presentación antigénica se refiere a los acontecimientos moleculares y celulares en los que los antígenos proteicos son captados y procesados por las células presentadoras de antígeno (APC). A continuación, los fragmentos de antígeno procesados son presentados a las células efectoras que posteriormente se activan e inician una respuesta inmune. Los macrófagos (que son productos desarrollados directamente a partir de monocitos), células dendríticas y determinadas células B se han caracterizado como las células presentadoras de antígeno más activas.

[0040] Los participantes moleculares clave en la presentación antigénica y en el proceso de la respuesta inmune son las moléculas de MHC, que son una familia polimórfica de genes cromosómicamente codificados en una región conocida como el complejo principal de histocompatibilidad *Mhc*. Las moléculas de MHC de clase I y clase II en humanos se denominan moléculas HLA (por las siglas en inglés de antígeno leucocitario humano). Determinadas moléculas de MHC ejercen su función mostrando fragmentos moleculares exclusivos sobre la superficie de las células y facilitando su reconocimiento por las células T y otras células efectoras del sistema inmune. Véase D.H. Margulies, "The Major Histocompatibility Complex", pág. 263-285 en *Fundamental Immunology*, Cuarta Edición, Editado por W.F. Paul, Lippencott-Raven, Filadelfia, PA (1999). Adicionalmente, las moléculas de MHC de clase I y de clase II ejercen su función uniéndose a péptidos en las células presentadoras de antígeno y, a continuación, interaccionando con los receptores $\alpha\beta$ de células T sobre la superficie de las células T.

[0041] Más específicamente, las moléculas de MHC de clase I se unen y presentan muestras de los péptidos de las propias células, incluyendo proteínas endógenas citosólicas, virus traducidos *de novo* y antígenos tumorales. Las moléculas de MHC de clase I presentan generalmente péptidos de aproximadamente 7 a aproximadamente 16 restos de longitud que son reconocidos por células T citotóxicas CD8+. Las moléculas de MHC de clase I están implicadas en llevar a cabo la respuesta de las células T citotóxicas en las que se mata a las células infectadas por un virus.

[0042] La presente invención se refiere principalmente a epítopes de células T que sirven para activar a las células T CD4+ que pueden proporcionar ayuda a las células B para generar una respuesta anticorporeal frente a un antígeno. Los epítopes de las células T colaboradoras (epítipo Th) se unen a las moléculas de MHC de clase II, las cuales están cargadas con fragmentos peptídicos procesados de aproximadamente 7 a aproximadamente 30 restos de longitud, en compartimentos celulares que se comunican con el entorno extracelular. Véase D.H. Margulies, "The Major Histocompatibility Complex", pág. 263-285 en *Fundamental Immunology*, Cuarta Edición, Editado por W.F. Paul, Lippencott-Raven, Filadelfia, PA (1999). Más especialmente, las moléculas de MHC de clase II se unen y presentan muestras de péptidos, que son ingeridos por las células presentadoras de antígenos desde el entorno extracelular inmediato, a las células T CD4+. A continuación, las células T CD4+ se activan y después proporcionan ayuda en forma de citocinas a las células B para la producción de anticuerpos. En humanos, las moléculas de MHC de clase II comprenden las moléculas de HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP, que se encuentran en diversos alelos genéticamente codificados.

[0043] Las composiciones inmunogénicas de la presente invención comprende antígenos que tienen un epítipo de células B y un epítipo de células T que se procesan y presentan como fragmentos proteicos o peptídicos por las moléculas MHC sobre la superficie de las denominadas "células presentadoras de antígeno" y son reconocidos por los linfocitos T CD4+ como células efectoras.

[0044] Para asegurar una inmunovigilancia eficaz, la fisiología de las moléculas MHC se diseña de modo que puedan presentar el más amplio espectro posible de péptidos antigénicos. Finalmente, el número de copias de un péptido antigénico definido sobre la superficie celular de las células presentadoras de antígeno es muy bajo (una magnitud de 10^2 de un péptido antigénico definido da lugar a una población total de aproximadamente 10^5 receptores peptídicos). Esto significa que se expone una mezcla muy heterogénea de péptidos antigénicos unidos a moléculas de MHC ("ligandos peptídicos") sobre la superficie celular de las células presentadoras de antígeno.

[0045] El término "epítipo de células T" se refiere a una secuencia de una proteína que provoca la activación de linfocitos T colaboradores CD4+ (Th) tras el procesamiento del antígeno y la presentación del péptido en el bolsillo de unión de una molécula de MHC de clase II. Los receptores de células T alfa/beta sobre la superficie de células T interaccionan con el complejo formado por el péptido y la molécula de MHC de clase II, que sirve como estímulo para la activación. Como resultado, la conformación nativa del epítipo de células T no es importante, sino tan solo la secuencia primaria y la capacidad para unirse a una molécula MHC en particular.

[0046] La presente invención se refiere a péptidos, preferiblemente péptidos sintéticos, que son capaces de inducir anticuerpos frente a formas patológicas de Abeta como las encontradas en las placas amiloides y en las fibrillas.

[0047] La inmunogenicidad de un péptido se refiere a la capacidad del péptido para inducir una respuesta anticorporeal que comprenda anticuerpos que reconozcan de forma específica y se unan a un "epítipo de células B" o a un "determinante antigénico" dentro del péptido. Véase R. N. Germain, "Antigen Processing and Presentation", pág. 287-340 en *Fundamental Immunology*, Cuarta Edición, Editado por W.F. Paul, Lippencott-Raven, Filadelfia, PA (1999) (Germain). Para ser inmunogénico, un péptido que contenga un epítipo de células B debe ser presentado junto con un antígeno MHC de clase II o un epítipo de clase II de células T. El epítipo de células T normalmente es procesado a partir del inmunógeno durante el procesamiento del antígeno por las células presentadoras de antígeno y, a continuación, se une a la molécula de MHC de clase II de forma específica de secuencia. Véase Germain. Este complejo MHC de clase II y epítipo de células T es reconocido por linfocitos T CD4+ (células Th). Las células Th tienen la capacidad de provocar la proliferación de células B específicas que producen moléculas de anticuerpo que

son capaces de reconocer el epítoto de células B asociado a partir del inmunógeno presentado. Por tanto, la producción de un anticuerpo, que es específico de un epítoto de células B en particular, está ligado a la presencia de un epítoto de células T dentro o asociado con el inmunógeno.

5 **[0048]** Otra complicación surge cuando el antígeno no es una proteína extraña. Puesto que Abeta es una molécula propia, no debería contener ningún epítoto Th que induzca la activación de los linfocitos y, por tanto, una respuesta anticorpal contra sí misma. Por tanto, tienen que proporcionarse epítotos de células T extraños mediante la incorporación de secuencias específicas derivadas de inmunógenos extraños potentes, como toxina tetánica, toxina pertusis, la proteína F del virus del sarampión o el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg),
10 entre otras. Estas secuencias de epítotos de células T pueden estar incluidas en la misma estructura fundamental proteica que el epítoto de células B, que es el péptido Abeta₍₄₋₁₀₎. La localización del epítoto de células T puede ser el extremo N-terminal del epítoto de células B o el extremo C-terminal del epítoto de células B. Alternativamente, el epítoto de células T puede proporcionarse en una estructura fundamental proteica independiente, conocida como molécula vehículo, que puede estar unida covalentemente o no al péptido que contiene el epítoto de células B.

15 **[0049]** Pueden seleccionarse epítotos de células T adicionales siguiendo procedimientos bien conocidos en la técnica, como elución con ácido y secuenciación por espectroscopía de masas de los péptidos unidos a MHC de clase II a partir de moléculas de clase II purificadas por inmunofinidad, como se describe en Rudensky y col., Nature 353:622-627 (1991); Chiczy y col., Nature 358:764-768 (1992) y Hunt y col., Science 256:1817-1820 (1992).

20 **[0050]** Idealmente, los epítotos Th seleccionados son, preferiblemente, capaces de provocar respuestas de activación de células T (ayuda a células T) en gran número de individuos que expresan haplotipos MHC diversos. Esto significa que estos epítotos ejercen su función en muchos individuos diferentes de una población heterogénea y se considera que son epítotos Th promiscuos. Los epítotos Th promiscuos proporcionan la ventaja de provocar respuestas anticorcales anti-Abeta potentes en la mayoría de los miembros de una población genéticamente diversa.

25 **[0051]** Los epítotos de células T colaboradoras se seleccionan no solo por su capacidad para inducir respuestas inmunes en la mayoría de los miembros de una población determinada, sino también por su capacidad para causar respuestas de memoria/recuerdo. La inmensa mayoría de los pacientes humanos que reciban inmunoterapia con Abeta ya habrán sido inmunizados con las vacunas pediátricas del sarampión, paperas, rubeola, difteria, pertusis y tétano. Por tanto, estos pacientes han estado expuestos previamente a más de uno de los epítotos Th presentes en la mezcla inmunogénica. Esta exposición previa puede ser útil debido a que la exposición previa a un epítoto Th a través de la inmunización con las vacunas convencionales debería establecer clones de células T que pueden responder inmediatamente y proporcionar ayuda para una respuesta anticorpal.

30 **[0052]** El epítoto de células T colaboradoras es una secuencia de aminoácidos (aminoácidos naturales o no naturales) que comprende un epítoto Th. Un epítoto de células T colaboradoras puede consistir en un epítoto continuo o discontinuo. Por tanto, no son parte necesaria del epítoto cada uno de los restos de aminoácidos de un epítoto de células T colaboradoras. Por consiguiente, los epítotos Th, incluyendo análogos y segmentos de epítotos Th, son capaces de potenciar o estimular una respuesta inmune frente a Abeta. Los epítotos de células T colaboradoras inmunodominantes son ampliamente reactivos en poblaciones animales y humanas con tipos de MHC ampliamente divergentes. Véase Celis y col. J. Immunol. 140:1808-1815 (1988); Demotz y col. J. Immunol. 142:394-402 (1989); Chong y col. Infect. Immun. 60:4640-4647 (1992). El epítoto de células T colaboradoras de los péptidos del sujeto tiene de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 aminoácidos, preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 restos de aminoácidos, más preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 restos de aminoácidos, incluso más preferiblemente, de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 restos de aminoácidos o, preferiblemente, de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 restos de aminoácidos. Cuando se presentan múltiples epítotos de células T colaboradoras (es decir, n>2), entonces cada epítoto de células T colaboradoras es independientemente el mismo o diferente.

35 **[0053]** El epítoto de células T colaboradoras puede incluir análogos, sustituciones, deleciones e inserciones de uno a aproximadamente 10 restos de aminoácidos en el epítoto de las células T colaboradoras. Los segmentos del epítoto de células T colaboradoras son porciones contiguas de un epítoto de células T colaboradoras que son suficientes para potenciar o estimular una respuesta inmune frente a Abeta. El epítoto de células T colaboradoras puede estar separado del epítoto de células B por uno o más restos de aminoácidos espaciadores.

40 **[0054]** Entre los epítotos de la presente invención se incluyen los epítotos de células T colaboradoras del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HB-Th), epítotos de células T colaboradoras de la toxina pertusis (PT-Th), epítotos de células T colaboradoras de la toxina tetánica (TT-Th), epítotos de células T colaboradoras de la proteína F del virus del sarampión (MV-Th), epítotos de células T colaboradoras de la proteína principal de la membrana externa de *Chlamydia trachomatis* (CT-Th), epítotos de células T colaboradoras de la toxina diftérica (DT-Th), epítotos de células T colaboradoras de circunsporozoitos de *Plasmodium falciparum* (PF-Th), epítotos de células T colaboradoras de la triosa fosfato isomerasa de *Schistosoma mansoni* (SM-Th), epítotos de células T colaboradoras de Tra T de *Escherichia coli* (TraT-Th) y análogos y segmentos que potencian el sistema inmune de

todos estos epítopes Th. En la patente de EE. UU. N° 5.759.551 de Ladd y col. se describe una selección de epítopes de Th ampliamente reactivos. A continuación se proporcionan ejemplos de secuencias de epítopes de células T colaboradoras:

Tabla 1. Epítopes de células T colaboradoras

HB-Th:	Phe--Phe--Leu--Leu--Thr--Arg--Ile--Leu--thr--Ile--Pro--Gln-- Ser--Leu--Asp, SEQ ID NO:3
PT-Th:	Lys--Lys--Leu--Arg--Arg--Leu--Leu--Tyr--Met--Ile--Tyr--Met-- Ser--Gly--Leu--Ala--Val--Arg--Val--His--Val--Ser--Lys--Glu-- Glu--Gln--Tyr--Tyr--Asp--Tyr, SEQ ID NO:4
TT-Th:	Lys--Lys--Gln--Tyr--Ile--Lys--Ala--Asn--Ser--Lys--Phe--Ile-- Gly--Ile--Thr--Glu--Leu, SEQ ID NO:5
TT2-Th:	Lys--Lys--Phe--Asn--Asn--Phe--Thr--Val--Ser--Phe--Trp--Leu-- Arg--Val--Pro--Lys--Val--Ser--Ala--Ser--His--Leu SEQ ID NO:6
PT-Th:	Tyr--Met--Ser--Gly--Leu--Ala--Val--Arg--Val--His--Val--Ser-- Lys--Glu--Glu, SEQ ID NO:7
TT3-Th:	Tyr--Asp--Pro--Asn--Tyr--Leu--Arg--Thr--Asp--Ser--Asp--Lys-- Asp--Arg--Phe--Leu--Gln--Thr--Met--Val--Lys--Leu--Phe--Asn-- Arg--Ile--Lys, SEQ ID NO:8
PT-Th:	Gly--Ala--Tyr--Ala--Arg--Cys--Pro--Asn--Gly--Thr--Arg--Ala-- Leu--Thr--Val--Ala--Glu--Leu--Arg--Gly--Asn--Ala--Glu--Leu SEQ ID NO:9
MVF1-Th:	Leu--Ser--Glu--Ile--Lys--Gly--Val--Ile--Val--His--Arg--Leu-- Glu--Gly--Val SEQ ID NO:10
MVF2-Th:	Gly--Ile--Leu--Glu--Ser--Arg--Gly--Ile--Lys--Ala--Arg--Ile-- Thr--His--Val--Asp--Thr--Glu--Ser--Tyr SEQ ID NO:11
TT4-Th:	Trp--Val--Arg--Asp--Ile--Ile--Asp--Asp--Phe--Thr--Asn--Glu-- Ser--Ser--Gln--Lys--Thr SEQ ID NO:12
TT5-Th:	Asp--Val--Ser--Thr--Ile--Val--Pro--Tyr--Ile--Gly--Pro--Ala-- Leu--Asn--His--Val SEQ ID NO:13
CT-Th:	Ala--Leu--Asn--Ile--Trp--Asp--Arg--Phe--Asp--Val--Phe--Cys-- Thr--Leu--Gly--Ala--Thr--Thr--Gly--Tyr--Leu--Lys--Gly--Asn-- Ser SEQ ID NO:14
DT-Th:	Asp--Ser--Glu--Thr--Ala--Asp--Asn--Leu--Glu--Lys--Thr--Val-- Ala--Ala--Leu--Ser--Ile--Leu--Pro--Gly--His--Gly--Cys SEQ ID NO:15
DT-Th:	

(continuación)

Glu--Glu--Ile--Val--Ala--Gln--Ser--Ile--Ala--Leu--Ser--Ser--
 Leu--Met--Val--Ala--Gln--Ala--Ile--Pro--Leu--Val--Gly--Glu--
 Leu--Val--Asp--Ile--Gly--Phe--Ala--Ala--Thr--Asn--Phe--Val--
 Glu--Ser--Cys
 SEQ ID NO:16

PF-Th:

Asp--His--Glu--Lys--Lys--His--Ala--Lys--Met--Glu--Lys--Ala--
 Ser--Ser--Val--Phe--Asn--Val--Val--Asn--Ser
 SEQ ID NO: 17

SM-Th:

Lys--Trp--Phe--Lys--Thr--Asn--Ala--Pro--Asn--Gly--Val--Asp--
 Glu--Lys--His--Arg--His SEQ ID NO:18

TraT1-Th:

Gly--Leu--Gln--Gly--Lys--His--Ala--Asp--Ala--Val--Lys--Ala--
 Lys--Gly SEQ ID NO:19

TraT2-Th:

Gly--Leu--Ala--Ala--Gly--Leu--Val--Gly--Met--Ala--Ala--Asp--
 Ala--Met--Val--Glu--Asp--Val--Asn SEQ ID NO:20

TraT-Th:

Ser--Thr--Glu--Thr--Gly--Asn--Gln--His--His--Tyr--Gln--Thr--
 Arg--Val--Val--Ser--Asn--Ala--Asn--Lys SEQ ID NO:21

5 **[0055]** En determinadas realizaciones, la presente invención tiene un epítoto de células T que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo compuesto por SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO:6; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21.

10 **DISEÑO DEL ANTÍGENO**

[0056] Las composiciones inmunogénicas de la presente invención incluyen un antígeno, que comprende un epítoto de células T que proporciona una cantidad eficaz de ayuda de células T y un epítoto de células B compuesto por el péptido Abeta₍₄₋₁₀₎.

15 **[0057]** Los péptidos del antígeno de esta descripción están representados por las fórmulas siguientes:

- I. (A)_n (Th)_m (B)_o -- Abeta₍₄₋₁₀₎ -- (C)_p
- 20 II. (A)_n -- Abeta₍₄₋₁₀₎ -- (B)_o -- (Th)_m -- (C)_p
- III. (D)_q -- Abeta₍₄₋₁₀₎ -- (E)_r

en la que A, C, D y E son independientemente un resto de aminoácido o una secuencia de restos de aminoácidos;

25 en la que B, un espaciador, es un resto de aminoácido o una secuencia de restos de aminoácidos; cuando o es igual a 0, entonces Th está directamente conectado al epítoto de células B a través de un enlace peptídico sin ningún resto espaciador;

30 en la que n, o y p son independientemente números enteros en el intervalo de 0 a aproximadamente 20, cuando o es igual a 0, entonces el Th está directamente conectado al epítoto de la células B sin ningún resto espaciador;

en la que m es un número entero de 1 a aproximadamente 5;

35 en la que q y r son independientemente números enteros que oscilan de 0 a aproximadamente 100;

Th es independientemente una secuencia de restos de aminoácidos que comprende un epítoto de células T colaboradoras o un análogo o segmento que potencia el sistema inmune del mismo, o un análogo del mismo que contiene una sustitución de aminoácidos conservador; Th puede estar repetido en forma de tándem;

Abeta₍₄₋₁₀₎ está formado por los restos 4-10 (FRHDSGY) de Abeta₄₂ SEQ ID NO: 1, o un análogo de la misma que contiene una sustitución de aminoácido conservadora; Abeta₍₄₋₁₀₎ SEQ ID NO: 1 puede repetirse en tándem o estar presente de cualquier otra forma en copias múltiples.

5 **[0058]** La invención también incluye hasta donde estén recogidas en las reivindicaciones adjuntas, composiciones de uno o más de los péptidos representados por las fórmulas I, II y III. Pueden combinarse uno o más péptido de Fórmula I para formar las composiciones. Alternativamente, pueden combinarse uno o más péptidos de las fórmulas I, II y III para formar mezclas o composiciones.

10 **[0059]** Los péptidos antigénicos de la presente descripción tienen de aproximadamente 20 a aproximadamente 100 restos de aminoácidos, alternativamente de aproximadamente 20 a aproximadamente 80 restos de aminoácidos. En una realización determinada, los péptidos antigénicos de la presente invención tienen de aproximadamente 20 a aproximadamente 60 restos de aminoácidos, preferiblemente de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 restos de aminoácidos y, más preferiblemente, de aproximadamente 25 a aproximadamente 40 restos de aminoácidos. En otra realización preferida, el péptido antigénico tiene de aproximadamente 20 a aproximadamente 35 restos de aminoácidos.

20 **[0060]** Cuando A, B, C, D y E son restos de aminoácidos, entonces pueden ser cualquier aminoácido que no se encuentra en la naturaleza o cualquier aminoácido natural. Entre los aminoácidos no naturales se incluyen, pero sin limitaciones, beta-alanina, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, tiroxina, ácido gamma-amino butírico, homoserina, citrulina y similares. Entre los aminoácidos naturales se incluyen alanina, arginina, asparragina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina. Además, cuando m es al menos uno, y dos o más de los grupos A, B, C, D o E son aminoácidos, entonces cada aminoácido es independientemente el mismo o diferente.

25 **[0061]** Los aminoácidos de los grupos A, B, C, D o E puede estar modificados con ácidos grasos. Por ejemplo, pueden añadirse uno o más épsilon-palmitoillisininas a los extremos N-terminal y C-terminal del epítipo Abeta y el péptido completo puede estar anclado a la superficie de vesículas. Las vesículas pueden contener el inmunoestimulador lípido A. Véase Nicolau y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:2332-2337 (2002).

30 **[0062]** El epítipo Abeta₍₄₋₁₀₎ puede incorporarse en dendrímeros proteicos mediante el uso de una estrategia de conjugación ortogonal para la construcción de antígenos proteicos. Dendrímeros construidos especialmente pueden formar la base para el ensamblaje de antígenos para vacunas eficaces, como, por ejemplo, una construcción múltiple del péptido antigénico como se describe en la patente de EE. UU. N° 6.310.810 de Tam.

35 **PÉPTIDOS SINTÉTICOS COMO ANTÍGENOS Y VACUNAS**

[0063] En muchos casos, el uso de una proteína o glucoproteína completa como inmunógeno para el desarrollo de vacunas e inmunoterapias eficaces para enfermedades humanas y agentes infecciosos han mostrado su ineficacia debido a su falta de inmunogenicidad o a que dan lugar a potenciamiento de la infección y enfermedad debido a la inclusión de epítopes no protectores. Véanse Osterhaus y col, Vaccine, 7:137-141 (1989) ; Gilbert y col. Virus Research, 7:49-67 (1987); Burke, D. Perspect. Biol. Med., 35:511-530 (1992).

45 **[0064]** El uso de antígenos peptídicos sintéticos en vacunas o en composiciones inmunogénicas puede sortear muchos de los problemas asociados con vacunas recombinantes. Entre las ventajas de usar péptidos sintéticos que se corresponden con dominios proteicos específicos se incluyen: selección e inclusión solo de epítopes protectores; exclusión de epítopes que potencian la enfermedad, exclusión de epítopes autoinmunes nocivos; exclusión de material infeccioso; y los antígenos peptídicos sintéticos están químicamente bien definido o pueden producirse a un coste razonable. Véase Arnon y Horwitz, Curr. Opin. Immunol., 4:449-453, (1992).

50 **[0065]** Las desventajas son que los péptidos sintéticos pequeños pueden no contener las secuencias precisas de aminoácidos necesarias para el procesamiento y la unión a las proteínas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I y clase II, para la presentación al sistema inmune. Véase Rothbard, Biotechnology, 20:451-465, (1992). Otra desventaja es que la estructura tridimensional en solución de péptidos pequeños puede ser diferente a la encontrada en la proteína nativa y, por tanto, el péptido puede no inducir inmunidad humoral de la especificidad y afinidad apropiadas para proporcionar inmunidad protectora. Véase Bernard y col. Aids Res. and Hum. Retroviruses, 6:243-249, (1990).

60 **[0066]** Los antígenos peptídicos de la presente invención pueden prepararse en una amplia variedad de formas. El péptido, debido a su tamaño relativamente pequeño, puede sintetizarse en solución o sobre un soporte líquido de acuerdo con técnicas convencionales. Hoy en día hay diversos sintetizadores automáticos y manuales disponibles en el mercado y pueden usarse según protocolos conocidos. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. N° 5.827.666 de Finn y col.; Stewart y Young, Solid Phase Peptide Synthesis, 2ª ed., Pierce Chemical Co., 1984 y Tam y col., J. Am Chem. Soc. (1983) 105:6442.

65

[0067] Alternativamente, la tecnología de ADN híbrido puede emplearse cuando un gen sintético se prepara empleando cadenas sencillas que codifican el polipéptido o cadenas sustancialmente complementarias del mismo, donde las cadenas sencillas solapan y pueden juntarse en un medio de hibridación para que hibriden. A continuación, las cadenas hibridadas pueden ligarse para formar el gen completo y, mediante la elección de extremos apropiados, el gen puede insertarse en un vector de expresión, muchos de los cuales ya están disponibles hoy en día. Véase, por ejemplo, Sambrook, Fritsch y Maniatis, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (en este documento "Sambrook, y col., 1989"); y expresados en sistemas de expresión de procariotas o eucariotas para producir los péptidos deseados.

VEHÍCULOS

[0068] Los antígenos de epítopes de Abeta₍₄₋₁₀₎ de la invención, como se describe dentro de esta aplicación pueden conjugarse con una molécula vehículo para proporcionar ayuda a las células T.

[0069] Las moléculas vehículo a las que los antígenos de la invención se unen covalentemente (conjugan) son ventajosas, no tóxicas, farmacéuticamente aceptables y de un tamaño suficiente para producir una respuesta inmune en mamíferos. Ejemplos de moléculas vehículo adecuadas son toxina tetánica, hemocianina de lapa americana (KLH) y péptidos correspondientes a epítopes de células T (es decir, T1 y T2) de la glucoproteína del envoltorio gp120 que puede sustituirse por moléculas vehículo no derivadas del virus del SIDA (Cease, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 84:4249, 1987; Kennedy y col., J. Biol. Chem. 262:5769, 1987). También pueden administrarse péptidos con un adyuvante farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, alumbre, y conjugado a otras moléculas vehículo más inmunogénicas que el toxoide tetánico.

[0070] La unión de una molécula transportadora a un antígeno peptídico de la invención puede ser directa o a través de una molécula espaciadora. De forma ventajosa, las moléculas espaciadoras son no tóxicas y reactivas. Dos restos de glicina añadidos al extremo amino terminal del péptido pueden proporcionar una molécula espaciadora adecuada para unir secuencias de Abeta₍₄₋₁₀₎, o porciones de las mismas, a una molécula diana; alternativamente, las secuencias Abeta₍₄₋₁₀₎, o porciones de las mismas, puede, por ejemplo, sintetizarse directamente de forma adyacente a, por ejemplo, otra secuencia amiloide inmunogénica. Pueden añadirse cisteínas tanto al extremo N terminal como al C terminal del péptido Abeta₍₄₋₁₀₎ para la conjugación a la molécula vehículo o a ambos extremos para facilitar la polimerización intercatenaria a través de la formación de enlaces disulfuro para formar agregados moleculares más grandes. La conjugación de la molécula vehículo al péptido se logra usando un agente de conjugación. De forma ventajosa, se usa el agente de conjugación heterofuncional éster de M-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS) o el compuesto hidrosoluble éster m-maleimidobenzoil-sulfosuccinimida (sulfo-MBS), como se describe en Green y col., Cell, 28:477 (1982) y por Palker y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:2479 (1987). Se dispone de muchos otros agentes de conjugación, como glutaraldehído para conjugar péptidos a otras moléculas. Los procedimientos de conjugación son bien conocidos en la técnica. Véase por ejemplo, el capítulo 9 (páginas 419-455) y el capítulo 11 (páginas 494-527) de Bioconjugate Techniques de G.T. Hermanson, Academic Press, San Diego 1996).

ADYUVANTES

[0071] Dos de las características de los antígenos son su inmunogenicidad o su capacidad para inducir una respuesta inmune *in vivo* (incluyendo la formación de anticuerpos específicos) y su antigenicidad, es decir, su capacidad para ser reconocidos selectivamente por los anticuerpos que son específicos para esa secuencia y estructura.

[0072] Algunos antígenos son solo débilmente inmunogénicos cuando se administran por sí solos. Por consiguiente, un antígeno débilmente inmunogénico puede no inducir la respuesta inmune necesaria para proporcionar inmunoterapia o protección eficaz al organismo.

[0073] La inmunogenicidad de un antígeno puede aumentarse administrándolo como una mezcla con sustancias adicionales denominadas adyuvantes. Los adyuvantes ejercen su función aumentando la respuesta inmunitaria frente al antígeno actuando directamente sobre el sistema inmune y proporcionando una lenta liberación del antígeno. Por tanto, el adyuvante modifica las características farmacocinéticas del antígeno y aumenta el tiempo de interacción entre el antígeno y el sistema inmune. El uso de adyuvantes es bien conocido en la técnica y pueden usarse muchos adyuvantes adecuados. La preparación de composiciones inmunogénicas y el uso de adyuvantes se describe generalmente en Vaccine Design: The subunit and adjuvant approach (Ed. Powell y Newman) Pharmaceutical Biotechnology Vol. 6 Plenum Press 1995.

[0074] Los adyuvantes más extendidos son el adyuvante de Freund, una emulsión que contiene micobacterias muertas en una solución salina dentro de un aceite mineral y el adyuvante incompleto de Freund, que no contiene micobacterias.

[0075] Los adyuvantes son capaces de aumentar la intensidad de la respuesta inmune frente al antígeno o de producir una activación específica del sistema inmune. Existen cinco categorías generales de adyuvantes que son 1) sales de aluminio, como hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, 2) agentes tensioactivos, como saponina y Quill A, QuillA/ISCOM, bromuro de dimetil dioctadecil amonio/arvidina, 3) polianiones, 4) derivados bacterianos, como adyuvante completo de Freund, N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina (dipéptidos de muramilo), N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina (treonil MDP) y 5) vehículos y materiales de liberación lenta, como adyuvante incompleto de Freund (emulsión en aceite) o liposomas. Véase New Generation Vaccines, Capítulo 11, páginas 129-140, Adjuvants for a New Generation of Vaccines de A.C. Allison and N.E. Byars, Marcel Dekker, Nueva York, 1990).

[0076] Las composiciones inmunogénicas de la presente invención comprenden un antígeno y un adyuvante. Entre los adyuvantes adecuados se incluyen el alumbre, que es una sal de aluminio como gel de hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio, aunque también puede ser una sal de calcio, hierro o cinc. Entre otros adyuvantes adecuados se incluyen suspensiones insolubles de tirosina acilada, azúcares acilados, polisacáridos catiónica o aniónicamente derivatizados o polifosfacenos.

[0077] Las combinaciones de adyuvantes pueden usarse para crear un sistema adyuvante. Los sistemas de adyuvante adecuados incluyen, por ejemplo, una combinación de monofosforil lípido A, preferiblemente monofosforil lípido A 3-de-O-acetilado (3D-MPL) junto con una sal de aluminio. Un sistema adyuvante alternativo comprende, por ejemplo, el RIBI ADJUVANT SYSTEM™, que es una combinación de monofosforil lípido A, preferiblemente monofosforil lípido A 3-de-O-acetilado (3D-MPL), dicorinomicolato de trehalosa sintético y materiales del esqueleto de la pared celular. Un sistema potenciado supone la combinación de un monofosforil lípido A y un derivado de saponina, especialmente la combinación de QS21 y 3D-MPL como se describe en el documento WO 94/00153, o una composición menos reactogénica en la que el QS21 se inactiva con el colesterol como se describe en el documento WO 96/33739. Una formulación de adyuvante especialmente potente que contiene QS21, 3D-MPL y tocoferol en una emulsión de aceite en agua se describe en el documento WO 95/17210 y es una formulación preferida. Las descripciones de los documentos WO 94/00153, WO 96/33739 y WO 95/17210.

[0078] Alternativamente, las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden estar encapsuladas dentro de liposomas o vehículos como se describe en la patente de EE. UU. Nº 4.235.877 de Fullerton.

ESTRUCTURA DEL ANTICUERPO

[0079] La presente descripción contempla anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen al epítipo de Abeta₍₄₋₁₀₎ e inhibe el depósito de amiloide y formación de fibrillas. En general, se sabe que la unidad estructural básica del anticuerpo es un tetrámero. Cada tetrámero incluye dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (de aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (de aproximadamente 50-70 kDa). La porción amino terminal de cada cadena puede incluir una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos, responsable principalmente del reconocimiento antigénico. La porción carboxilo terminal de cada cadena puede definir una región constante responsable principalmente de la función efectora. Típicamente, las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda. Además, las cadenas pesadas humanas se clasifican normalmente como mu, delta, gamma, alfa o épsilon y definen los isotipos de anticuerpos como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas ligeras y pesadas, las regiones variables y constantes se unen por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo la cadena pesada también una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más. Véase J.K. Frazer y J.D. Capra, "Immunoglobulins: Structure and Function", pág. 37-75 en Fundamental Immunology, Cuarta Edición, Editado por W.F. Paul, Lippencott-Raven, Filadelfia, PA (1999) (Frazer).

[0080] Las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada pueden formar el sitio de unión al anticuerpo. Por tanto, en general, un anticuerpo IgG intacto tiene dos sitios de unión. Excepto en anticuerpos bifuncionales o biespecíficos, los sitios de unión son, en general, los mismos.

[0081] Normalmente, las cadenas muestran todas la misma estructura general de regiones estructurales (FR) relativamente conservadas unidas por tres regiones hipervariables, denominadas también regiones determinantes de complementariedad o CDR. Las CDR de las dos cadenas de cada par normalmente están alineadas por las regiones estructurales, lo que permite la unión al epítipo específico. En general, desde el extremo N-terminal al C-terminal, ambas cadenas ligera y pesada comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio está, generalmente, de acuerdo con las definiciones de Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 y 1991)) o Chothia y col., J Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Chothia, y col., Nature 342:878-883 (1989).

TIPOS DE ANTICUERPOS

[0082] El término "molécula de anticuerpo" incluye, pero sin limitaciones, anticuerpos y fragmentos de los mismos. El término incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos biespecíficos,

fragmentos de anticuerpo Fab, fragmentos de anticuerpos F(ab)₂, fragmentos de anticuerpos Fv (p. ej., V_H o V_L), fragmentos de anticuerpos Fv de cadena sencilla y fragmentos de anticuerpos dsFv. Adicionalmente, las moléculas de anticuerpo pueden ser anticuerpos completamente humanos, anticuerpos humanizados o anticuerpos quiméricos. Preferiblemente, las moléculas de anticuerpo son anticuerpos monoclonales completamente humanos.

[0083] Las moléculas de anticuerpo anti-Abeta₍₄₋₁₀₎ reconocen preferiblemente a proteínas y péptidos Abeta amiloides humanos; sin embargo, en la presente descripción se incluyen moléculas de anticuerpo que reconocen proteínas y péptidos Abeta amiloides de especies diferentes, preferiblemente mamíferos (p. ej., ratón, rata, conejo, oveja o perro).

[0084] Además, el anticuerpo anti-Abeta₍₄₋₁₀₎ puede derivar de un anticuerpo monoclonal humano. Estos anticuerpos se obtienen a partir de ratones transgénicos que han sido "manipulados genéticamente" para producir anticuerpos humanos específicos en respuesta a una estimulación antigénica. En esta técnica, se introducen elementos del locus de las cadenas pesada y ligera humanas en cepas de ratones derivados de líneas de células madre embrionarias que contiene alteraciones dirigidas de los loci endógenos de la cadena pesada y la cadena ligera. Los ratones transgénicos puede sintetizar anticuerpos humanos específicos de antígenos humanos, y los ratones pueden usarse para producir hibridomas que secreten anticuerpos humanos. Los procedimientos para obtener anticuerpos humanos a partir de ratones transgénicos se describen en Green y col., *Nature Genet.* 7:13 (1994), Lonberg y col., *Nature* 368:856 (1994), y Taylor y col., *Int. Immun.* 6:579 (1994).

[0085] En una realización preferida se generan anticuerpos monoclonales completamente humanos dirigidos frente a Abeta₍₄₋₁₀₎ usando ratones transgénicos portadores de partes del sistema inmune humano en lugar del sistema murino. Estos ratones transgénicos, que pueden denominarse en este documento como ratones "AcMHu", contienen un miniloci del gen de la inmunoglobulina humana que codifica secuencia de inmunoglobulinas de la cadena pesada (mu y gamma) y ligera kappa humana sin reordenar, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci de las cadenas mu y kappa endógenas (Lonberg, N., y col., (1994) *Nature* 368 (6474): 856-859). Por consiguiente, los ratones muestran la expresión reducida de IgM o kappa murina y, en respuesta a la inmunización, los transgenes de cadenas ligera y pesada humana introducidos experimentan cambio de clase y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales IgG humanos de alta afinidad (Lonberg, N., y col. (1994), *supra*; revisado por Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101 y Lonberg, N., y col., (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93. La preparación de AcMHu es frecuentemente conocido en la técnica y se describe, por ejemplo, en Lonberg, y col., (1994) *Nature* 368(6474) 856-859; Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N., y col., (1995) *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13: 65-93; Fishwild, D., y col., (1996) *Nature Biotechnology* 14 : 845-851. Véanse también las patentes de EE. UU. N°. 5.814.318; 5.874.299 y 5.770.429; todas de Lonberg y Kay y GenPharm International y la patente de EE. UU. N°. 5.545.807 de Surani y col.

[0086] Para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos frente a Abeta₍₄₋₁₀₎, los ratones AcMHu puede inmunizarse con una composición inmunogénica que comprende el antígeno Abeta₍₄₋₁₀₎ de la presente invención. Preferiblemente, los ratones tendrán una edad de 6-16 semanas en la primera inmunización. Por ejemplo, puede usarse una composición inmunogénica que comprende el antígeno Abeta₍₄₋₁₀₎ de la presente invención para inmunizar a los ratones AcMHu por vía intraperitoneal. Los ratones también pueden inmunizarse con células HEK293 completas que estén transformadas o transfectadas de forma estable con un gen que contenga Abeta₍₄₋₁₀₎. La expresión un "polipéptido Abeta₍₄₋₁₀₎ antigénico" puede referirse a un polipéptido Abeta₍₄₋₁₀₎ de cualquier fragmento del mismo que provoca una respuesta inmune anti-Abeta₍₄₋₁₀₎ en ratones AcMHu.

[0087] En general, los ratones transgénicos AcMHu responden mejor cuando inicialmente se inmunizan por vía intraperitoneal (IP) con antígeno en adyuvante completo de Freund, seguido de inmunizaciones IP cada dos semanas (normalmente, hasta un total de 6) con antígeno en adyuvante incompleto de Freund. Los ratones pueden inmunizarse, primero, con células que expresan Abeta₍₄₋₁₀₎ (p. ej., transformadas de forma estable con células HEK293), a continuación, con un fragmento soluble de un antígeno que contiene Abeta₍₄₋₁₀₎, tales como las composiciones inmunogénicas de la presente invención y, continuamente, recibir inmunizaciones alternativas con los dos antígenos. La respuesta inmune puede controlarse a lo largo del ciclo del protocolo de inmunización obteniéndose muestras de plasma mediante sangrado retroorbital o de la cola. Puede analizarse en el plasma la presencia de anticuerpos anti-Abeta₍₄₋₁₀₎, por ejemplo, mediante ELISA y los ratones con títulos de inmunoglobulina suficientes pueden usarse para fusiones. Los ratones pueden inmunizarse por vía intravenosa con antígeno 3 días antes de su sacrificio y de extraer el bazo. Se prevé que pueda ser necesario realizar 2-3 fusiones para cada antígeno. Pueden inmunizarse varios ratones para cada antígeno. Por ejemplo, pueden inmunizarse un total de doce ratones AcMHu de las cepas HC07 y HC012.

[0088] Las células de hibridoma que producen los anticuerpos monoclonales completamente humanos anti-Abeta₍₄₋₁₀₎ pueden producirse a continuación mediante procedimientos que son conocidos normalmente en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero sin limitaciones, la técnica de hibridomas desarrollada originalmente por Kohler, y col., *Nature* 256:495-497 (1975), así como la técnica de triomas de Hering y col., *Biomed. Biochim. Acta.* 47:211-216 (1988) y Hagiwara, y col., *Hum. Antibod. Hybridomas* 4:15 (1993); la técnica de hibridomas de células B humanas (Kozbor, y col., *Immunology Today* 4:72 (1983) y Cote, y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:2026-2030

(1983) y la técnica del hibridoma-EBV (Cole y col., en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pág. 77-96, 1985). Preferiblemente, se aíslan los esplenocitos del ratón y se fusionan con PEG a una línea celular de mieloma de ratón en base a protocolos convencionales. A continuación, se analiza la producción de anticuerpos específicos del antígeno en los hibridomas resultantes. Por ejemplo, las suspensiones celulares de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados se fusionan con un sexto del número de células de mieloma de ratón no secretoras P3X63-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) con PEG al 50%. Las células se siembran en placas a aproximadamente 2×10^5 células por pocillo en placa de microtitulación de fondo plano, seguido por una incubación de dos semanas en medio selectivo que contenía suero de ternera fetal al 20%, medio acondicionado "653" al 18%, origen (IGEN) al 5%, L-glutamina 4 mM, L-glutamina 1 mM, piruvato sódico 1 mM, HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, penicilina a 50 unidades/ml, estreptomycin a 50 mg/ml, gentamicina a 50 mg/ml y HAT 1X (Sigma, el HAT se añade 24 horas después de la fusión). Después de dos semanas, las células se cultivan en medio en el que el HAT se sustituye por HT. A continuación se analizan la producción de anticuerpos monoclonales IgM e IgG anti-Abeta₍₄₋₁₀₎ en los pocillos individuales mediante ELISA. Una vez que se produce el crecimiento extensivo del hibridoma, el medio se observa normalmente después de 10-14 días. Los hibridomas secretores de anticuerpo se siembran de nuevo, se analizan otra vez y, si siguen produciendo anticuerpos monoclonales IgG anti-Abeta₍₄₋₁₀₎, pueden subclonarse al menos dos veces por dilución límite. Los subclones estables se cultivan a continuación *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en medio de cultivo tisular para su caracterización.

[0089] Las moléculas de anticuerpo anti-Abeta también puede producirse de forma recombinante (p. ej., en un sistema de expresión *E.coli/T7* como se describe anteriormente). En esta realización, los ácidos nucleicos que codifican las moléculas de anticuerpo (p. ej., V_H o V_L) pueden insertarse en una plásmido pET y expresarse en el sistema *E.coli/T7*. Existen varios procedimientos para producir anticuerpos recombinantes que son bien conocidos en la técnica. Un ejemplo de un procedimiento para la producción recombinante de anticuerpos se describe en la patente de EE. UU. N° 4.816.567. Las moléculas de anticuerpo también puede producirse de forma recombinante en células CHO o NSO.

[0090] Según se usa en este documento, el término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que componen la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden presentarse en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, estando dirigidos frente a un único sitio antigénico. Los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque pueden ser sintetizados por un cultivo de hibridomas, esencialmente sin contaminación de otras inmunoglobulinas. El adjetivo "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no debe interpretarse como que la producción del anticuerpo requiera ningún procedimiento en particular. Como se mencionó anteriormente, los anticuerpos monoclonales usados según la presente invención puede obtenerse mediante el procedimiento de hibridomas descrito por primera vez por Kohler, y col., *Nature* 256:495 (1975).

[0091] Un anticuerpo policlonal es un anticuerpo que puede producirse entre o en presencia de uno o más anticuerpos no idénticos. En general, los anticuerpos policlonales se producen a partir de un linfocito B en presencia de varios otros linfocitos B que producen anticuerpos no idénticos. Normalmente, los anticuerpos policlonales se obtienen directamente a partir de un animal inmunizado.

[0092] El término "anticuerpo completamente humano" se refiere a un anticuerpo que comprende solo secuencias de inmunoglobulina humana. De forma similar, "anticuerpo murino" se refiere a un anticuerpo que comprende solo secuencias de inmunoglobulina murina.

[0093] En la presente descripción se incluyen "anticuerpos quiméricos" (un anticuerpo que comprende una región variable de la presente descripción fusionada o quimerizada con una región de anticuerpo (p. ej., la región constante) de otra especie no humana (p. ej., ratón, caballo, conejo, perro, vaca o pollo). Estos anticuerpos pueden usarse para modular la expresión o actividad de Abeta₍₄₋₁₀₎ en las especies no humanas.

[0094] La expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo que incluye una CDR no humana dentro de la estructura de un anticuerpo por lo demás humano o una región variable no humana unida a la región constante de un anticuerpo por lo demás humano. La presente descripción contempla a los anticuerpos humanizados, lo que incluyen una CDR o región variable de una especie no humana que comprende la secuencia de aminoácidos de una región variable o CDR de la presente descripción.

[0095] Dependiendo de las secuencias de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas ligeras, las inmunoglobulinas pueden asignarse a clases diferentes. Existen al menos cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varias de estas pueden además dividirse en subclases (isotipos), p. ej., IgG-1, IgG-2, IgG-3 e IgG-4; IgA-1 e IgA-2. Preferiblemente, las moléculas de anticuerpo de la descripción son IgG-1 o IgG-4.

[0096] Los anticuerpos de la descripción también puede estar conjugados con marcadores radioisotópicos como ⁹⁹Tc, ⁹⁰Y, ¹¹¹In, ³²P, ¹⁴C, ¹²⁵I, ³H, ¹³¹I, ¹¹C, ¹⁵O, ¹³N, ¹⁸F, ³⁵S, ⁵¹Cr, ⁵⁷To, ²²⁶Ra, ⁶⁰Co, ⁵⁹Fe, ⁵⁷Se, ¹⁵²Eu, ⁶⁷Cu,

²¹⁷Ci, ²¹¹At, ²¹²Pb, ⁴⁷Sc, ¹⁰⁹Pd, ²³⁴Th y ⁴⁰K y marcadores no radioisotópicos como ¹⁵⁷Gd, ⁵⁵Mn, ⁵²Tr y ⁵⁶Fe.

[0097] Los anticuerpos de la descripción también pueden conjugarse con marcadores fluorescentes o quimioluminiscentes, incluso fluoróforos como quelatos de tierras raras, fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, isotiacianato, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftalaldehído, fluorescamina, ¹⁵²Eu, dansilo, umbeliferona, luciferina, marcador luminal, marcador isoluminal, un marcador éster de acridinio aromático, un marcador imidazol, un marcador sal de acridinio, un marcador éster de oxalato, un marcador aecuorina, 2,3-dihidroftalazinedionas, biotina/avidina, marcadores de spin y radicales libres estables.

[0098] Puede emplearse cualquier procedimiento conocido en la técnica para la conjugación de las moléculas de anticuerpo de la descripción con los diversos restos, incluidos los procedimientos descritos por Hunter, y col., Nature 144:945 (1962); David y col., Biochemistry 13:1014 (1974); Pain, y col., J. Immunol. Meth. 40:219 (1981) y Nygren J., Histochem. and Cytochem. 30:407 (1982). Los procedimientos para la conjugación de anticuerpos son convencionales y muy bien conocidos en la técnica.

[0099] La presente invención también se refiere a determinados procedimientos terapéuticos basados en la administración de composiciones inmunogénicas que comprenden Abeta₍₄₋₁₀₎ o moléculas que se unen a péptidos Abeta. Por tanto, pueden administrarse antígenos que comprenden Abeta₍₄₋₁₀₎ para inhibir o potenciar el depósito de placa durante el envejecimiento o en enfermedades humanas como la enfermedad de Alzheimer.

[0100] La presente invención también se refiere a procedimientos para producir, identificar, purificar y caracterizar antígenos Abeta₍₄₋₁₀₎ y análogos de los mismos y a procedimientos para utilizar los antígenos Abeta₍₄₋₁₀₎ y análogos de los mismos. Los antígenos Abeta₍₄₋₁₀₎ pueden producirse mediante modificaciones como la escisión proteolítica de péptidos amiloides más largos aislados de fuentes naturales, a través de técnicas de ingeniería genética, o la síntesis química, por ejemplo, mediante síntesis de péptidos en fase sólida, o producción *de novo* mediante metodología de ingeniería genética o síntesis de péptidos en fase sólida.

BIOLOGÍA MOLECULAR

[0101] De acuerdo con la presente invención pueden emplearse técnicas convencionales de biología molecular, microbiología y recombinación de ADN dentro de la experiencia en la materia. Estas técnicas se explican en detalle en la literatura. Véase, por ejemplo, Sambrook, Fritsch y Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (en este documento "Sambrook y col., 1989"); DNA Cloning: A Practical Approach, Volúmenes I y II (D. N. Glover ed. 1985); "Oligonucleotide Synthesis" (M.J. Gait editor 1984); Nucleic Acid Hybridization [B.D. Hames y S.J. Higgins editores (1985)]; Transcription And Translation [B.D.Hames y S.J. Higgins, editores (1984)]; Animal Cell Culture [R. I. Freshney, editores (1986)]; Immobilized Cells And Enzymes [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); F. M. Ausubel y col. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

Ratones CRND8

[0102] Los ratones TgCRND8 son un modelo animal de EA que muestran niveles elevados de síntesis de Abeta y depósito amiloide en el SNC a los 3 meses de edad. Véase la publicación internacional N° WO01/97607 publicada el 12/27/01. Adicionalmente, los ratones TgCRND8 muestran cambios cognitivos dentro del periodo de tiempo en los que comienza el depósito amiloide. El modelo de ratón TgCRND8 transgénico se caracteriza por una gran similitud con el fenotipo natural de la enfermedad de Alzheimer, basado en la expresión de la proteína amiloide Abeta en el SNC, así como en el análisis histológico, necrológico y de déficits de comportamiento.

[0103] El gen APP sufre un ajuste alternativo para generar tres isoformas frecuentes. La isoforma más larga, que contiene 770 aminoácidos (APP₇₇₀) y la segunda isoforma más larga que contiene 751 aminoácidos (APP₇₅₁), se expresan en la mayoría de los tejidos. La tercera transcripción, que contiene 695 aminoácidos (APP₆₉₅), se expresa predominantemente en el cerebro. Por convención, se usa la numeración de codones de la isoforma más larga APP₇₇₀ incluso cuando se hace referencia a posiciones de codones de las isoformas más cortas.

[0104] El ratón transgénico TgCRND8 contiene un transgén que expresa una forma mutante de la isoforma APP₆₉₅ específica del cerebro; este transgén es portador de las mutaciones de APP "Swedish" e "Indiana".

[0105] Se generó un ADNc de APP₆₉₅ que contenía (usando la numeración de codones de APP₆₉₅) las mutaciones K595N/M596L (la mutación Swedish) y V642F (la mutación Indiana). Estas y otras mutaciones de APP generalmente se referirán en este documento por el sistema de numeración de codones de APP₇₇₀ más frecuente, es decir, para estas dos mutaciones, K670N/M671L (la mutación Swedish) y V717F (la mutación Indiana).

[0106] El casete de ADNc de APP₆₉₅ doble mutante se insertó dentro del vector de expresión cósmico, cosTet, que contiene el promotor del gen de la proteína priónica de hámster sirio. A continuación, el vector se

microinyectó en un oocito de ratón para crear una línea transgénica denominada TgCRND8. Estos ratones muestran múltiples depósitos amiloides difusos a los tres meses de edad, momento en el que las deficiencias en el aprendizaje espacial son aparentes.

- 5 **[0107]** Los ratones TgCRND8 se han cruzado con otros ratones transgénicos portadores de una mutación relacionada con la EA para obtener un ratón bitransgénico que muestra, además, una neuropatología relacionada con la EA potenciada.

ADMINISTRACIÓN Y USOS MÉDICOS

- 10 **[0108]** Las siguientes afirmaciones hacen referencia a los procedimientos de tratamiento. Se entenderá que los procedimientos de tratamiento no son parte de la invención, pero las afirmaciones se conservan como relevantes para el uso de la invención que son como se define en las reivindicaciones adjuntas.

- 15 **[0109]** La presente invención también incluye procedimientos de uso de los antígenos Abeta₍₄₋₁₀₎ para identificar fármacos que interfieren con la unión de Abeta₄₂ a las placas. Uno de estos aspectos incluye las pruebas de análisis de fármacos para identificar fármacos que mimetizan y complementan el efecto de Abeta₄₂. En una de estas realizaciones, se analiza una biblioteca de fármacos ensayando la capacidad de unión de un péptido que contiene Abeta₍₄₋₁₀₎ a una molécula pequeña específica. Se controla el efecto de un fármaco prospectivo sobre la afinidad de Abeta₄₂ por las placas. Si el fármaco disminuye la afinidad de unidad de Abeta₄₂ a las placas, se convierte en un fármaco candidato. Pueden analizarse los fármacos por sus capacidad para interrumpir la formación de placas, dificultar el proceso de fibrillogénesis o disgregar las fibrillas previamente formadas.

- 20 **[0110]** Los antígenos, anticuerpos u otros compuestos útiles en la presente invención puede incorporarse como componente de composiciones farmacéuticas. Las composiciones farmacéuticas contienen preferiblemente una cantidad terapéutica o profiláctica de al menos uno de los antígenos, anticuerpos u otros compuestos de los mismos con una vehículo farmacéuticamente eficaz.

- 25 **[0111]** Durante la preparación de las composiciones farmacéuticas útiles en los presentes procedimientos, debería emplearse un vehículo farmacéutico que sea cualquier sustancia compatible no tóxica adecuada para administrar los antígenos, anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos, o compuestos terapéuticos identificados según los procedimientos descritos en este documentos para el paciente. Pueden usarse como vehículo agua estéril, alcohol, grasas, ceras, sólidos inertes e incluso liposomas. También pueden incorporarse adyuvantes farmacéuticamente aceptables (agentes de tamponamiento y agentes dispersantes) a la composición farmacéutica. Los anticuerpos y composiciones farmacéuticas de las mismas son especialmente útiles para la administración parenteral, es decir, por vía intravenosa, intraarterial, intramuscular o subcutánea. Sin embargo, también son útiles la vía intranasal u otras formulaciones en aerosol. La concentración del compuesto, como un anticuerpo en una formulación para administración, puede varían ampliamente, es decir, de menos de aproximadamente el 0,5%, normalmente al menos el 1% hasta tanto como el 15 o 20% o más en peso y se seleccionará principalmente en base a volúmenes de fluido, viscosidades etc., preferidos para el modo de administración seleccionado en particular. Los procedimientos reales para preparar composiciones administrables serán conocidos o aparentes para los expertos en la materia y se describen en mayor detalle, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Science, 18ª Ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa. (1990).

- 30 **[0112]** Las composiciones inmunogénicas de la presente invención, o anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de la presente descripción se administran a una dosis suficiente terapéuticamente eficaz para modular el depósito amiloide (o carga amiloide) en un sujeto. Una "dosis terapéuticamente eficaz" modula preferiblemente el depósito amiloide en al menos aproximadamente el 20%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 40%, incluso más preferiblemente al menos el 60% y aún más preferiblemente al menos el 80% en relación con los sujetos no tratados. La capacidad de un procedimiento para modular el depósito amiloide puede evaluarse en sistemas modelo que pueden predecir la eficacia a la hora de modular el depósito amiloide en enfermedades humanas, como sistemas modelo animales conocidos en la técnica (incluyendo el procedimiento descrito en la publicación PCT WO 96/28187) o por procedimientos *in vitro*, p. ej., el procedimiento de Chakrabarty, descrito en la publicación PCT WO 97/07402 o el sistema modelo TgCRND8 descrito en este documento. Adicionalmente, la cantidad o distribución de depósitos amiloides en un sujeto puede controlarse *in vivo* de forma no invasiva, por ejemplo, usando radiomarcadores que pueden asociarse con depósitos amiloides, seguido de centelleo para obtener la imagen de los depósitos amiloides (véase, p. ej., Aprile C. y col., Eur. J. Nuc. Med. 22:1393 (1995); Hawkins, P. N., Baillieres Clin. Rheumatol. 8:635 (1994) y referencias citadas en esta). Por tanto, por ejemplo, la carga amiloide de un sujeto puede evaluarse después de un periodo de tratamiento según los procedimientos descritos y compararse con la carga amiloide del sujeto antes de iniciar el tratamiento con un compuesto terapéutico de la invención, para determinar el efecto del compuesto terapéutico sobre el depósito amiloide en el sujeto.

- 35 **[0113]** Se apreciará que la capacidad de un procedimiento de la descripción para modular el depósito amiloide o la carga amiloide puede evaluarse, en determinadas realizaciones, observando los síntomas o signos asociados con el depósito amiloide o con la carga amiloide *in vivo*. Por tanto, por ejemplo, la capacidad de un

procedimiento de la presente descripción para disminuir el depósito amiloide o la carga amiloide puede asociarse con una mejora observable en una manifestación clínica de la enfermedad o afección subyacente relacionada con el amiloide, o una ralentización o retraso de la progresión de los síntomas de la afección. Por tanto, el control de las manifestaciones clínicas de la enfermedad puede ser útil para evaluar la eficacia de la modulación amiloide de un procedimiento de la descripción.

[0114] Los procedimientos de la presente descripción pueden ser útiles para tratar la amiloidosis asociada con otras enfermedades en las que aparece depósito amiloide. Clínicamente, la amiloidosis puede ser primaria, secundaria, familiar o aislada. Los amiloides se han caracterizado según el tipo de proteína amiloidogénica contenida dentro del amiloide. A continuación aparecen ejemplos no limitantes de amiloides que pueden modularse, según se identifica por su proteína amiloidogénica (con la enfermedad asociada entre paréntesis tras la proteína amiloidogénica): beta-amiloide (enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, amiloidosis hemorrágica cerebral hereditaria [holandés], angiopatía cerebral); amiloide A (amiloidosis reactiva [secundaria], fiebre mediterránea familiar, nefropatía amiloide familiar con urticaria y sordera [síndrome de Muckle-Wells]); cadena L kappa amiloide o cadena L lambda amiloide (idiopática [primaria], mieloma o asociada a macroglobulinemia), Abeta2M (hemodiálisis crónica), ATTR (polineuropatía amiloide familiar [portuguesa, japonesa o sueca], cardiomiopatía amiloide familiar [danesa], amiloide cardíaca aislada, amiloidosis senil sistémica); AIAPP o amilina (diabetes del adulto, insulinoma); factor natriurético auricular (amiloidosis auricular aislada); procalcitonina (carcinoma medular de la tiroides); gelsolina (amiloidosis familiar [finlandesa]); cistatina C (hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis [islandesa]); AApoA-I (polineuropatía amiloidótica familiar [Iowa]); AApoA-II (senectud acelerada en ratones); amiloide asociado a fibrinógeno; amiloide asociado a lisozima y AscR o PrP-27 (encefalopatía espongiiforme ovina, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker, encefalitis espongiiforme bovina).

[0115] Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración, pero no a modo de limitación.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

Ejemplo 1

Síntesis del antígeno y caracterización estructural

[0116] En este ejemplo, los inventores describen cómo se sintetizan, purifican y caracterizan los inmunógenos del péptido Abeta sintéticos.

[0117] La síntesis de los siguientes péptidos Abeta: Abeta₄₂, Abeta₄₀, Abeta₃₀ y los péptidos del epítipo N-terminal se realizaron con un sintetizador de péptidos semiautomático EPS-221 de ABIMED, usando la resina de polímero injertado PEG NovaSun (Novabiochem) y metodología de protección Fmoc del extremo N-terminal como se ha descrito. Véase Mayer-Fligge y col. J. Pept. Sci. 4:355-363 (1998). Las etapas de desprotección Fmoc y los ciclos de desprotección final se controlaron espectrofotométricamente. Los péptidos sintéticos se purificaron usando una columna de HPLC C18 μ bondapak semipreparativa y de fase inversa.

[0118] A continuación, los pesos moleculares de los péptidos sintéticos purificados se caracterizaron mediante desorción de plasma (MALDI) y espectroscopía de masas por electropulverización (ESI). Para las inmunizaciones posteriores se usaron solo las fracciones peptídicas que tenían masas moleculares que se correspondían con las masas previstas.

[0119] La estructura secundaria de los péptidos en solución se evaluó por medio de dicroísmo circular (DC). El espectro de DC se registró usando un espectropolarímetro J-500 de JASCO. Véase Mayer-Fligge y col. J. Pept. Sci. 4:355-363 (1998). Además, se realizaron estudios de RMN usando análisis 2D-RMN-NOESY con un aparato Bruker-AMX-600 como se describió previamente. Michels y col., "Structure and Functional Characterization of the periplasmic N-terminal polypeptide domain of the sugar specific ion channel protein (scry-porin) "Protein Science (en prensa, 2002).

Ejemplo 2

Inmunización de ratones CRND8 con Abeta₄₂

[0120] En este ejemplo, los inventores muestran que el péptido Abeta₄₂ es inmunogénico en ratones que expresan el transgén APP y en ratones no transgénicos.

Ratones

[0121] Los ratones TgCRND8 fueron descritos previamente por Chishti y col., J. Biol. Chem. 276:21562-21570 (2001). Los ratones se mantuvieron en un fondo no consanguíneo C3H/C57BL/6J que sobreexpresaba las mutaciones Beta-APP^{Swedish} y Beta-APP^{V717F} en cis con la transcripción beta-APP⁶⁹⁵. Los genes Beta-APP^{Swedish} y

Beta-APP_{V717F} estaban bajo el control del promotor del gen priónico del hámster sirio. Los ratones TgCRND8 derivados de los cruces de ratones C3H/C57BL6 hemicigóticos positivos para el transgén (82%/18%) y los ratones CS7BL/6J wt fueron destetados, se realizó su genotipo para comprobar la presencia del transgén beta-APP y se mantuvieron en jaulas para ratones convencionales en grupos de 2-4 ratones del mismo sexo. A los ratones se les proporcionó acceso libre a bloques de pienso, pienso en polvo y agua. Todos los animales se mantuvieron durante una semana antes de la primera inmunización y se registraron sus pesos el día anterior y dos días después de cada inmunización. Todos los grupos experimentales coincidían en sexo y en peso.

Protocolo de inmunización y obtención de sueros

[0122] El péptido sintético Abeta₄₂ y un péptido control compuesto por los restos 8-37 (ATQRLANELVHSSNCFGAIL-SSTNVGSNTY) (SEQ ID NO: 52) de los péptidos del polipéptido amiloide del islote (IAPP) se aislaron mediante HPLC en fase inversa en una columna C18 μ bondapak y se determinó la pureza de los péptidos mediante espectrometría de masas y análisis de aminoácidos.

[0123] El protocolo y el programa de inmunización fueron según se describió previamente en Schenk y col. Nature 400:173-177 (1999). A continuación, se determinaron los títulos de anticuerpos en las muestras de suero (200 μ l de sangre) recogidas mediante punción de la vena de la pata trasera izquierda a las 13 semanas y mediante punción cardíaca al final del procedimiento, a las 25 semanas de edad. Antes de su uso en estos estudios, el complemento se desactivó mediante incubación a 56°C durante 30 minutos. Las fracciones de Ig se aislaron sobre una columna de proteína G de 5 ml. Se cargaron las muestras, se lavó la columna con PBS, se eluyó con citrato sódico 0,1 M y se tamponó con Tris 1 M. Todas las fracciones de Ig fueron esterilizadas por filtración antes de su uso.

Resultados de la inmunización

[0124] Los sueros se aislaron a partir de ratones no inmunizados (N=18) y tanto de ratones TgCRND8 como de animales no transgénicos de la misma camada que habían sido inmunizados repetidamente durante un periodo de 5 meses con Abeta₄₂ (n=34; 18 TgCRND8 y 16 no Tg) o con un péptido amiloide periférico (polipéptido asociado al islote (IAPP)), donde el número de ratones inmunizados fue de 17, siendo 10 TgCRND8 y 7 no transgénicos (no Tg). Los ratones desarrollaron títulos significativos frente a Abeta₄₂ (1:5.000-1:50.000) y frente a IAPP (de 1:5.000 a 1:30.000). Curiosamente no se detectaron diferencias significativas en los títulos de anti-Abeta₄₂ de los ratones transgénicos TgCRND8 y de ratones no transgénicos de la misma camada. Cada muestra de suero de ratones inmunizados con Abeta₄₂ podía teñir positivamente placas Abeta maduras en cortes histológicos de cerebro de ratones TgCRND8 no inmunizados de 20 semanas de edad. Por el contrario, los sueros de los ratones inmunizados con el péptido control IAPP y sin inmunizar no podía teñir placas Abeta maduras en cortes histológicos del cerebro de ratones TgCRND8 no inmunizados de 20 semanas de edad. Por tanto, los resultados muestran que puede inducirse autoinmunidad del anticuerpo que puede reconocer y unirse a placas neuropatológicas que contienen Abeta.

EJEMPLO 3

Inhibición de la formación de fibrillas mediante el suero de ratones inmunizados

[0125] En este ejemplo, como se muestra en la Tabla 2, los inventores muestran que los sueros de la mayoría de los ratones inmunizados con Abeta₄₂ inhibían la formación de fibrillas.

[0126] A concentraciones bajas, soluciones de péptidos Abeta se ensamblarán espontáneamente en fibrillas durante un periodo de incubación de 14 días. Estas fibrillas tienen un diámetro característico de 50-70 Å que puede controlarse mediante microscopía electrónica como se describe a continuación.

Microscopía electrónica

[0127] Abeta₄₂ se usó directamente tras la solubilización en agua a una concentración madre de 10 mg/ml o tras el ensamblaje en fibrillas amiloides maduras. Abeta₄₂ se incubó en presencia y ausencia de sueros a una concentración final de péptido de 100 μ g/ml. Se añadieron diluciones seriadas de diversos sueros a Abeta₄₂ y se incubaron a temperatura ambiente (TA) durante 2 semanas. Para la tinción negativa en microscopía electrónica, se hicieron flotar rejillas de pioloform recubiertas de carbono en soluciones acuosas de péptidos. Después de transferir las gradillas y secarlas al aire, las muestras se tiñeron con ácido fosfovolfámico al 1% (p/v). Los ensamblajes de los péptidos se observaron en un microscopio electrónico 7000 de Hitachi que funcionaba a 75V con un aumento de 60.000 X.

Resultados de la microscopía electrónica

[0128] Para evaluar el efecto de los sueros de ratones inmunizados con Abeta sobre el ensamblaje de Abeta

en fibrillas, los sueros se incubaron como se describió anteriormente en presencia o ausencia de Abeta₄₂ a 37°C durante un máximo de 14 días. La presencia de fibrillas de Abeta₄₂ se examinó en alícuotas de cada mezcla de reacción los días 1, 3, 7, 10 y 14 mediante tinción negativa en microscopía electrónica.

5 **[0129]** En ausencia de sueros, o en presencia de sueros no inmunizados, Abeta₄₂ formaba fibrillas largas (~7.500Å) con un diámetro característico de 50-70 Å. Por tanto, las fibrillas largas indican que los componentes del suero normal no inhiben la formación de fibrillas Abeta en las condiciones de ensayo actuales. En presencia de sueros de animales inmunizados con IAPP, se produjeron fibrillas de Abeta₄₂ menos largas, aunque las fibrillas que se formaban tenían el diámetro característico de 50-70 Å. Por el contrario, como se muestra en la Tabla 2, la mayoría de los sueros de ratones inmunizados con Abeta₄₂ (n=27/34) bloqueaba en gran parte la formación de fibrillas, aunque algunos sueros (n=7/34) mostraron poco o ningún efecto. Adicionalmente, los sueros procedentes de inmunizaciones con Abeta de ratones TgCRND8 o de sus compañeros de camada no transgénicos inhibían la formación de fibrillas Abeta de forma equivalente, lo que indicaba que el repertorio de anticuerpos depende solo del inmunógeno y no de la carga de Abeta₄₂ endógeno.

15 **[0130]** Como se resume en la Tabla 2, no se detectaron diferencias en la estructura de las fibrillas cuando se incubaron en presencia de sueros de ratones no inmunizados. Los sueros de ratones inmunizados con IAPP disminuían el grado de formación de fibrillas, pero las fibrillas formadas eran similares a las formadas por Abeta₄₂ solo. Finalmente, los sueros de ratones inmunizados con Abeta₄₂ inhibían la fibrillogénesis a distintos grados desde la inhibición completa a solo una ligera disminución en la densidad de la fibrilla. Véase la Tabla 2.

Tabla 2. Resumen de los efectos de los sueros de ratones no inmunizados, inmunizados con Abeta₄₂ e inmunizados con IAPP sobre la formación de fibrillas, desensamblaje de las fibrillas y citotoxicidad

ESTUDIOS DE INHIBICIÓN				
Inmunógeno	Muestras totales	Agregación	Disgregación	Toxicidad
No inmune	18	0/18	0/18	0/18
Abeta ₄₂	34	27/34	26/34	22/30
IAPP	17	4/17	1/17	2/11

25

Ejemplo 4

Rotura de las fibrillas existentes por el suero inmune

30 **[0131]** En este ejemplo, los inventores muestran que los sueros de ratones inmunizados con Abeta₄₂ disgregaban las fibrillas de Abeta₄₂ previamente formadas, pero que estas fibrillas Abeta₄₂ previamente formadas no se ven afectadas por la incubación con sueros de ratones control no inmunizados o con sueros de ratones inmunizados con IAPP.

35 **[0132]** Para determinar si los sueros de ratones inmunizados con Abeta₄₂ podían romper las fibrillas de Abeta previamente formadas se incubaron sueros de ratones inmunizados con Abeta₄₂ con fibrillas Abeta₄₂ previamente formadas durante un máximo de 30 días. Las fibrillas Abeta₄₂ con muestras de agregación, se generaron mediante la incubación de alícuotas de Abeta a concentraciones altas con agitación constante. La incubación de las fibrillas formadas previamente sin suero (Abeta solo), con sueros de ratones inmunizados con IAPP o con sueros de ratones no inmunizados (datos no mostrados) no tenía efecto, incluso después de 30 días de incubación. Por el contrario, los sueros de ratones inmunizados con Abeta₄₂ (n=26/34) disgregaban las fibrillas de Abeta₄₂ en fibrillas pequeñas y cortas de 30Å de diámetro con una longitud media de 100Å o en agregados amorfos. Esta disgregación era evidente después de solo tres días de incubación y era completa a los 14 días. Además, la disgregación era dependiente de la concentración, observándose una disminución del tiempo necesario para la disgregación de las fibrillas con concentraciones crecientes de anticuerpo. Finalmente, puesto que no era necesaria una relación 1:1 de anticuerpo con respecto a Abeta₄₂ para la disgregación, es probable que los anticuerpos anti-Abeta se unieran solo a un subgrupo de especies de Abeta, como oligómeros protofibrilares u otros precursores. Los resultados se determinaron usando microscopía electrónica como se describe en el Ejemplo 4, a un aumento de 60.000X.

EJEMPLO 5

Determinación por espectrometría de masas del epítipo diana inmune de Abeta₄₂ reconocido por los antisueros de ratón

55 **[0133]** En este ejemplo, los inventores muestran cómo identificar con precisión un epítipo que tiene importancia biológica crítica para su uso en el tratamiento de enfermedades con depósito de amiloide.
Esquema general

[0134] Para elucidar el epítipo reconocido por los sueros anti-Abeta₄₂, se aplicó espectrometría de masas de

resonancia del ciclotrón de iones con transformada de Fourier de alta resolución (FT-ICR-MS, Marshall y col., Mass Spectrom. Rev. 17:1-35 (1998)) usando tanto nanoelectropulverización (nESI) como ionización MALDI, en combinación con procedimientos de escisión y extracción de epítopes descritos a continuación. Véanse Macht y col., Biochemistry 35: 15,633-15,639 (1996); Suckau y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:9848-9852 (1990); Przybylski y col., "Approaches to the characterization of tertiary and supramolecular protein structures by combination of protein chemistry and mass spectrometry." En New Methods for the study of Biomolecular Complexes, Kluwer Acad. Publ., Amsterdam, pág. 17-43 (1998).

[0135] En un procedimiento, conocido como escisión de epítope, se combinó la escisión proteolítica selectiva del complejo inmune inmovilizado con el mapeo peptídico por espectrometría de masas sobre el péptido unido después de que este se liberara. Especialmente, los antisueros de ratones TgCRND8 inmunizados con Abeta₄₂, los antisueros control de ratones inmunizados con IAPP y los anticuerpos de ratón (monoclonales) y de conejo (policlonales) frente a Abeta₄₂ se inmovilizaron en microcapilares de sefarosa. A continuación, los anticuerpos inmovilizados se expusieron a agregados Abeta₄₂ y se permitió que se unieran al epítope Abeta₄₂. El procedimiento de escisión del epítope del complejo inmune se realizó usando diversas proteasas y exopeptidasas, o con combinaciones de enzimas. (Véase la Tabla 2).

[0136] Alternativamente, se usó el procedimiento de extracción del epítope. Para la extracción del epítope, Abeta₄₂ se digirió previamente con las diversas proteasas y, posteriormente, se aplicó la correspondiente mezcla de péptidos de Abeta₄₂ procesados con proteasas a las columnas de anticuerpo y se permitió que el anticuerpo se uniera al epítope. El epítope se identificó usando espectroscopía de masas tras la elución del péptido unido. Este procedimiento es conocido como extracción de epítope.

[0137] Los procedimientos individuales se describen en detalle a continuación:

Inmovilización del anticuerpo

[0138] Se añadió una solución de 100 µg de tampón de conjugación (NaHCO₃ 0,2M, NaCl 0,5 M, pH 8,3) a sefarosa conjugada con ácido 6-aminohexanóico activado con NHS (Sigma) y la reacción de conjugación se realizó durante 60 min a 20°C. A continuación el material de sefarosa se transfirió a una columna de microcapilaridad de 100 µm que permite el lavado exhaustivo sin pérdida de material. Véase Macht y col., Biochemistry 35: 15633-15639 (1996). La columna se lavó alternativamente usando tampón de bloqueo (etanolamina/NaCl) y tampón de lavado (NaAc/NaCl) como se ha descrito y esta se conservó finalmente en PBS a pH 7,5, 4°C. Véase Macht y col., Biochemistry 35: 15633-15639 (1996).

Escisión del epítope

[0139] Los procedimientos de escisión del epítope se realizaron mediante la aplicación inicial de 2-5 µg de Abeta₄₂ u otros antígenos de Abeta a una microcolumna con anticuerpo e incubación durante 60 min a 20°C con agitación suave. Tras lavados sucesivos con 5 x 4 ml de PBS, se realizó una digestión con proteasa en la columna durante 2 h a 37°C mediante la incubación de 0,2 µg de proteasa en 200 µl de PBS. Entre las proteasas se incluyeron tripsina, Lys-C-proteasa, Asp-N-proteasa, α-quimiotripsina y Glu-C-proteasa. Los péptidos no unidos y digeridos o sobrenadante se eliminaron lavando con 5 x 4 ml de PBS. A continuación, el péptido del epítope unido al anticuerpo se disoció y eluyó mediante la adición de 500 µl de TFA al 0,1% (v/v) (elución de epítope). Tras la incubación durante 15 min a 20°C, la fracción de elución del epítope se liofilizó y reconstituyó en 10 µl de TFA al 0,1% para su análisis por espectrometría de masas. Los procedimientos con digestión adicional con exopeptidasa se realizaron mediante incubación con 0,1 µg de aminopeptidasa M o carboxipeptidasa Y durante 30 min, seguido de lavados con 5 x 4 ml de PBS.

Extracción del epítope

[0140] El procedimiento de extracción del epítope se realizó de la misma forma que la elución del epítope, excepto porque la mezcla de digestión proteolítica se aplicó a la columna de anticuerpo y se incubó durante 60 min a 20°C. Posteriormente, los péptidos no unidos (sobrenadante) se eliminaron lavando con 5 x 4 ml de PBS. A continuación, el epítope unido al anticuerpo se disoció y eluyó mediante la adición de 500 µl de TFA al 0,1% (v/v) (elución del epítope). Tras la incubación durante 15 min a 20°C, la fracción de elución del epítope se liofilizó y reconstituyó en 0 µl de TFA al 0,1% para su análisis por espectrometría de masas.

Digestión proteolítica

[0141] Las digestiones proteolíticas de los antígenos libres se realizaron con 5-50 µg de péptido disuelto en NH₄HCO₃ 50 mM durante 2 h a 37°C a una relación de sustrato con respecto a la proteasa de 50:1. Las mezclas de reacción se liofilizaron para su análisis por espectrometría de masas o se prepararon para la extracción del epítope. Las proteasas utilizadas fueron tripsina (Promega, Madison), Lys-C, Asp-N, Glu-C (Roche-Boehringer Mannheim); α-quimiotripsina, aminopeptidasa M, carboxipeptidasa Y (Sigma).

Espectrometría de masas

5 **[0142]** La FTICR-MS se realizó con un espectrómetro FTICR Apex II de Bruker (Bruker Daltonik, Bremen, FRG) equipado con un imán superconductor de 7T y una célula de análisis ICR. Véase Bauer y col., Anal. Biochem. 298:25-31 (2001). La fuente MALDI-FTICR con Apollo-nano-ESI-fuente de colisión pulsada, así como las condiciones instrumentales y de calibración de masa se describieron previamente. Véase Fligge y col., Biochemistry 39: 8491-8496 (2000). Las precisiones de la determinación de masas fueron de ~1 ppm (MALDI) y, normalmente, de 0,5-1 ppm (ESI) a una resolución de masa de ~200.000. Se usó ácido 2,5-di-hidroxibenzoico (DHB) como matriz para la preparación de las muestras para MALDI-MS. Véase Bauer y col., Anal. Biochem. 298:25-31 (2001). La ESI-EM se realizó generalmente con soluciones acuosas de TFA al 0,01%. Véase Fligge y col., Biochemistry 39: 8491-8496 (2000).

Resultados de la espectroscopía de masas

15 **[0143]** Se usó la escisión y extracción del epítipo con el anticuerpo inmovilizado en un microcapilar acondicionado con sefarosa, con análisis mediante espectrometría de masas ESI y MALDI-FTICR. Véanse Macht y col. Biochemistry 35:15633-39 (1996); Fligge y col., Biochemistry 39: 8491-8496 (2000); véanse Bauer y col., Anal. Biochem. 298:25-31 (2001); Przybylski y col., "Approaches to the characterization of tertiary and supramolecular protein structures by combination of protein chemistry and mass spectrometry." En New Methods for the study of Biomolecular Complexes, Kluwer Acad. Publ., Amsterdam, pág.17-43 (1998). En primer lugar, el análisis MALDI-EM de la mezcla triptica de péptidos del antígeno Abeta₄₂ libre muestra todos los péptidos proteolíticos de Abeta previstos:

Masa del péptido (Da)**[0144]**

- 30 1. Abeta₍₁₋₁₆₎ 1.954,8892
2. Abeta₍₆₋₁₆₎ 1.336,6030
3. Abeta₍₁₇₋₂₈₎ 1.325,6735
3. Abeta₍₂₉₋₄₂₎ 1.268,7804
5. Abeta₍₁₇₋₄₂₎ 2.575,4164

35 **[0145]** De la escisión del epítipo, usando digestiones con Lys-C y tripsina, eluía un fragmento peptídico único que producía una única especie iónica Abeta₍₁₋₁₆₎ de 1.954,8806 usando detección MALDI-FTICR. En este caso, el resto R5 de Abeta había sido protegido de la digestión con Lys-C y tripsina.

40 **[0146]** El fragmento peptídico Abeta₍₁₋₁₁₎ de 1.324,5395 Da eluía tras la escisión del epítipo con Glu-C proteasa de *S. aureus*.

40 **[0147]** Los espectros ESI y MALDI de eluido de la extracción del epítipo tras la escisión con α -quimotripsina y aminopeptidasa M producía fragmentos Abeta₍₁₋₁₀₎ de 1.195,4968 Da y Abeta₍₄₋₁₀₎ de 889,3827 Da.

45 **[0148]** El epítipo central se determinó usando la digestión con aminopeptidasa M del anticuerpo unido al fragmento quimotriptico y del inmunocomplejo Abeta₍₁₁₀₎. Con esta digestión doble se identificó Abeta₍₄₋₁₀₎, FRHDSGY como el epítipo mínimo con afinidad comparable a la de Abeta₄₂. El aminoácido C-terminal es Y10 ya que la digestión C-terminal adicional de Y10 usando carboxipeptidasa A producía péptidos que presentaban una notable disminución de la afinidad en comparación con Abeta₄₂.

50 **[0149]** En la Tabla 3 se muestran los fragmentos peptídicos que se obtuvieron mediante espectroscopía de masas de los procedimientos de escisión y extracción de epítopos usando los anticuerpos anti-Abeta y los péptidos Abeta. Cuando el péptido Abeta₄₂ (Tabla 3, fila 1) se digería previamente con tripsina, el péptido obtenido del sitio de unión al anticuerpo se correspondía con la secuencia mostrada en la Tabla 3, fila 1. La combinación de las proteasas tripsina y Lys-C identificada el mismo péptido de 16 restos (Tabla 3, fila 2). Cuando la proteasa era Glu-C-proteasa de *S. aureus* y se usó en la escisión del epítipo, se eluyó un péptido de 11 restos del sitio de unión al anticuerpo, como se muestra en la fila 3. Se observó un péptido de diez restos solo con la digestión con α -quimotripsina. Como se muestra en la fila 5 de la Tabla 3, se observó el epítipo central de siete aminoácidos cuando las digestiones con proteasas se realizaron con las dos enzimas α -quimotripsina y aminopeptidasa M.

Tabla 3. Péptidos identificados mediante espectroscopía de masas

Nº de fila	Número de restos				Proteasas utilizadas
	1	5	10	15	
1	DAEFRHDSGYEVHHQK SEQ ID NO:22				tripsina
2	DAEFRHDSGYEVHHQK SEQ ID NO:22				tripsina y lys-C-proteasa
3	DAEFRHDSGYES SEQ ID NO:23				Glu-C-proteasa de <i>S. aureus</i>
4	DAEFRHDSGY SEQ ID NO:24				α -quimotripsina
5	FRHDSGY SEQ ID NO:1				α -quimotripsina y aminopeptidasa M

Resumen

5 **[0150]** Los análisis MALDI y ESI-EM identificaron un epítipo lineal que comprendía la secuencia N-terminal, Abeta₍₁₋₁₀₎ como el único producto específico tras la escisión del epítipo. Véanse las Tablas 3 y 4. La espectroscopía de masas de una digestión con tripsina del antígeno Abeta₄₂ libre producía todos los péptidos previstos: (1-6), (6-16), (17-28) y (19-42). Véanse las Tablas 3 y 4. La escisión del epítipo con tripsina y Lys-C-proteasa proporcionaba un único péptido (1-16). La Glu-C-proteasa y la α -quimotripsina generaban solo los fragmentos (1-11) y (1-10), respectivamente. Véanse las Tablas 3 y 4. Por el contrario, los restos R5, E3 y F4 estaban protegidos de la digestión con estas proteasas, respectivamente. Se realizó una digestión adicional de los fragmentos de endoproteasa unidos al anticuerpo con exopeptidasas para definir el epítipo central. La digestión con aminopeptidasa M del fragmento quimotriptico identificaba Abeta₍₄₋₁₀₎ FRHDSBY como el epítipo mínimo con afinidad comparable a la de Abeta₄₂, mientras que la digestión C-terminal adicional de Y10 (carboxipeptidasa A) producía una notable disminución de la afinidad. Las diferencias de afinidad obtenidas en los experimentos de escisión del epítipo por espectrometría de masas eran completamente comparables con las afinidades determinadas por ELISA de los péptidos del epítipo sintéticos biotinilados en el extremo N-terminal mediante un grupo espaciador alquilamido. Véanse Gitlin y col., Biochem. J. 242:923-926 (1987); Craig y col., Anal. Chem. 68:697-701 (1996). El epítipo se identificó de forma inequívoca mediante la alta precisión de la determinación de masa (0,5 - 2 ppm) de los iones moleculares monoisotópicos. Además, estos resultados se confirmaron mediante fragmentación específica de secuencia de los iones moleculares seleccionados en espectros FTICR mediante disociación láser multifotónica IR y mediante experimentos control con mutantes de secuencia y péptidos Abeta₄₂ homólogos (datos no mostrados). Véase Fligge y col., Biochemistry 39: 8491-8496 (2000). Por tanto, el Abeta₄₂ de rata que contiene una doble mutación R5G e Y10F no producía producto de elución tras la escisión del epítipo. Por el contrario, Abeta₍₁₋₄₀₎ y Abeta₍₁₋₃₀₎ humanos proporcionaban el mismo epítipo (4-10) que Abeta₄₂. El anticuerpo control de ratones inmunizados con IAPP no producía péptido de epítipo detectable. Véanse las Tablas 3 y 4.

Tabla 4. Resumen de los datos de escisión/extracción de epítipo por espectroscopía de masas de sueros de ratones inmunizados con A β 42 e inmunizados con IAPP.

Experimento de epítipo ^a	Proteasa	Péptidos identificados ^c			
		Antisueros A2		Antisueros ^c L4, PP	
		Sobrenadante	Elución	Sobrenadante	Elución
		Fracción		Fracción	
escisión	Lys-C	17-28 29-42	1-16	1-16 17-28 29-42	- ^d
	Tripsina	17-28 29-42	1-16	1-5 6-16 17-28 29-42	-
	Glu-C	12-22 23-42	1-11	4-11 12-22 23-42	-
	Asp-N	23-42	2-22	2-22 23-43	-
extracción	Tripsina	1-5 6-16 17-28 29-42	1-16	1-5 6-16 17-28 29-42	-
	α -quimotripsina	5-10 11-20 21-42	1-10	1-4 5-10 11-20 21-42	-
	α -quimotripsina/Apasa-M	1-4 5-10 11-20 ^e	4-10	nd	-
	Tripsina/Apasa-M	6-16 7-16 ^e	4-16	nd	-

^a Escisión y extracción del epítipo (v. *Procedimientos* y texto)
^b Concentración de proteasas según se proporciona en *Procedimientos*; Apasa-M, aminopeptidasa microsomal.
^c Secuencias de péptidos principales identificados en el sobrenadante y en las fracciones de epítipes tras la elución con TFA.
^d Unión no detectable de secuencias A β .
^e Solo se proporcionan los péptidos N-terminales.

Ejemplo 6*Caracterización estructural de los péptidos Abeta*

5 **[0151]** En este ejemplo, los inventores compararon la afinidad de los péptidos de epítipo sintéticos identificados con la de Abeta₄₂ para los anticuerpos inmovilizados y caracterizaron la estructura secundaria de los péptidos de epítipo sintéticos en solución.

10 **[0152]** El epítipo identificado mediante espectrometría de masas se caracterizó adicionalmente usando péptidos sintéticos, análisis estructural secundario y caracterización inmunoanalítica de los correspondientes péptidos auténticos biotina-Gly-Gly-Abeta₍₁₋₁₀₎ y biotina-Abeta₍₄₋₁₀₎. En primer lugar, la afinidad de los diversos péptidos por el anticuerpo anti-Abeta se estimó usando un ELISA y análisis de transferencia en puntos de los péptidos de epítipo (datos no mostrados). Los resultados mostraron que todos los péptidos mostrados en la Tabla 3 presentaban una afinidad comparable por Abeta₄₂.

15 **[0153]** Para evaluar un posible efecto conformacional del epítipo activo, se realizó una comparación de la estructura secundaria de los péptidos N-terminales con las estructuras publicadas previamente de Abeta₄₀ y Abeta₄₂. Los espectros de DC y los espectros de RNM-NOESY 2D (datos no mostrados) de los péptidos N-terminales polares Abeta₍₁₋₁₀₎ y Abeta₍₁₋₁₆₎ no muestran ningún indicio de una estructura en solución definida para los fragmentos Abeta. Estos datos sugieren, sin embargo, una cierta flexibilidad de reconocimiento del anticuerpo por parte del epítipo. Esto coincide con la predicción de la estructura secundaria de la secuencia Abeta₄₂ que muestra un corte en la propensión a la formación de estructura α -hélice alrededor de la región del epítipo Abeta₍₄₋₁₀₎. Por el contrario, se observaron propensión α -hélice y transición conformacional de hélice a espiral/lámina para secuencias que comprenden la región transmembrana (Abeta₍₁₈₋₄₂₎). Véase Coles y col. Biochemistry 37: 11064-11077 (1998); Kohno y col., Biochemistry 35: 16094-16104 (1996).

Ejemplo 7*Efecto de los suero sobre la toxicidad inducida por Abeta*

30 **[0154]** En este ejemplo, los inventores evaluaron la capacidad de los sueros de ratones inmunizados con Abeta para inhibir la citotoxicidad inducida por Abeta₄₂.

Esquema general

35 **[0155]** Para explorar si la prevención de los déficit de memoria en ratones TgCRND8 tras la inmunización con Abeta podía reflejar un efecto similar sobre la citotoxicidad de Abeta, se realizaron pruebas de toxicidad de Abeta₄₂ convencionales usando células PC-12. Véanse McLaurin y col., J. Biol. Chem. 275:18495-502 (2000); Pallitto y col., Biochemistry 38:3570-78 (1999). En primer lugar, las células PC12 se incubaron con Abeta₄₂ en presencia o ausencia de sueros durante 24 horas. A continuación, se determinó la toxicidad celular usando tanto la prueba de azul alamar (Anhem y col., J. Immunol. Methods 170:211-24 (1994)), que es indicativa de actividad metabólica, como la prueba de Vivo/Muerto (Pike y col., J. Biol. Chem. 270:23895-98 (1995)), que indica tanto la actividad esterasa intracelular como la integridad de la membrana plasmática.

Ensayo de toxicidad Abeta

45 **[0156]** Las células PC-12 se sembraron en placas a 500 células por pocillo en una placa de 96 pocillos y se resuspendieron en NGF a 30 ng/ml (Alamone Labs, Israel) diluido en N2/DMEM (Gibco/BRL, Rockville, MD). Se permitió que las células se diferenciases durante 5-7 días hasta un número final de células de 10.000-15.000 por pocillo. Abeta se mantuvo en solución (25 micromolar) durante 3 días a TA para inducir la fibrillogénesis antes de la adición a los cultivos. Esta preparación Abeta contiene múltiple oligómeros ensamblados, como ADDL y protofibrillas (especies de Abeta identificadas hasta el momento como neurotóxicas) según se determina mediante microscopía electrónica (datos no mostrados). Véanse Lambert y col., J. Neurochem. 79:595-605 (2001); Walsh y col., J. Biol. Chem., 274:25945-52 (1999); Hartley y col., J. Neuroscience 19:8876-8884 (1999). Además, los análisis por inmunotransferencia mostraron que los sueros de ratones inmunizados con Abeta₄₂ reconocían monómeros, tetrámeros, hexámeros y oligómeros grandes de Abeta₄₂ mayores de 98 kDa (datos no mostrados). Después de la incubación previa de 3 días, se añadió Abeta a los cultivos celulares a una concentración final de 0,1 μ g/ μ l y se incubaron durante 24 horas a 37°C. A continuación, se comprobó la toxicidad usando la prueba de fluorescencia Muerto/Vivo (Molecular Probes, Eugene, OR) y la prueba de azul de alamar (Biosource Inc., Camarillo, CA).

Resultados

60 **[0157]** Los sueros de ratones no inmunizados o inmunizados con IAPP no tenían efecto sobre la toxicidad de Abeta. Por el contrario, los sueros aislados de ratones inmunizados con Abeta₄₂ prevenían la citotoxicidad Abeta₄₂ de forma dependiente de la concentración, pero mostraban una variabilidad notable en el grado de este efecto. En

este ensayo $n=18/22$, $p<0,01$ y $n=4/22$, $p<0,001$ en comparación con la toxicidad inducida por Abeta₄₂. Se representó la correlación entre la supervivencia celular y el grado de disgregación fibrilar de sueros individuales y se descubrió una correlación directa entre la eficacia de los sueros para inhibir la toxicidad y disgregar las fibrillas. Además, los anticuerpos que eran los más eficaces para inhibir la formación/disgregación de las fibrillas también eran los más eficaces a la hora de reducir la toxicidad (día 3, $p<0,001$ y día 7 $p<0,0001$ en comparación con los sueros inactivos).

[0158] La estequiometría del anticuerpo con respecto a Abeta necesaria por prevenir la citotoxicidad podría proporcionar datos sobre el mecanismo de acción. Para determinar la estequiometría del anticuerpo con respecto a Abeta necesaria para provocar la inhibición de la citotoxicidad, se determinó la CE₅₀ de 10 sueros reactivos. Los valores de CE₅₀ oscilaron de 1:00 a 1:300 con una media \pm DT de 234 ± 39 , donde la CE₅₀ se define como la cantidad de suero que recupera el 50% de la citotoxicidad inducida por Abeta. Como resultado, se encuentra que el efecto protector se detectaba a relaciones bajas de anticuerpo con respecto a Abeta, 50:1, lo que sugiere que los anticuerpos se unían a especies poco abundantes de Abeta, como oligómeros de Abeta, protofibrillas o fragmentos proteicos precursores, en lugar de Abeta monomérica o agregados de Abeta. Adicionalmente, los sueros activos causaron una disminución significativa en la citotoxicidad de Abeta a todas las dosis probadas; lo que sugiere que la muerte celular era inducida por los procesos bloqueados específicamente por los sueros. Los análisis estadísticos se realizaron usando un análisis ANOVA unilateral con PLSD de Fischer * $p<0,01$ y † $p<0,001$.

Ejemplo 8

Componentes del suero que median en el efecto protector

[0159] En este ejemplo, los inventores muestran cómo determinar qué componentes del suero eran responsables de la reducción de la citotoxicidad de Abeta. Los inventores encontraron que el componente activo estaba en la fracción de la IgG purificada de los sueros y ningún otro componente del suero podía inhibir la muerte celular mediada por Abeta.

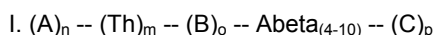
[0160] Para verificar que los efectos de la inmunización con Abeta eran debidos a los anticuerpos inducidos por Abeta, en lugar de algún otro efecto, p. ej., cambios secundarios en la expresión de otras proteínas séricas. Por tanto, para confirmar que solo eran eficaces anticuerpos dirigidos selectivamente frente al epítipo Abeta₍₄₋₁₀₎, se realizaron experimentos de citotoxicidad usando fracciones de IgG purificadas de sueros de ratones inmunizados con Abeta₄₂. Además, se concluyó que los anticuerpos monoclonales comerciales 4G8, 6E10 y Bam10 tenían especificidad por epítopos especiales de Abeta.

[0161] Los resultados fueron concluyentes. La inmunoglobulina G purificada a partir de sueros de ratones inmunizados con Abeta₄₂ mostraban la misma inhibición de la toxicidad que los sueros sin procesar, lo que sugiere que otros componentes del suero no contribuyen a la respuesta protectora. Adicionalmente, estas fracciones de IgG inhibían la fibrillogénesis de Abeta e inducían la disgregación de las fibrillas de Abeta al mismo grado que los sueros completos. Los anticuerpos 4G8 y 6E10, que reconocen las secuencias de Abeta 17-24 y 11-17, respectivamente, no inhiben la fibrillogénesis aunque disminuyen la cantidad de fibrilla total. Este último efecto puede aparecer porque estos anticuerpos se unan a una pequeña porción del péptido Abeta libre en solución, secuestrándolo de este modo de la formación de fibrillas. Por el contrario, Bam10, que reconoce una secuencia en Abeta₁₋₁₀, inhibe la formación de fibrillas de forma similar a la mostrada por los sueros de ratones inmunizados con Abeta₄₂. Estos resultados además demuestran tanto que solo los anticuerpos que reconocen el extremo N-terminal de la secuencia Abeta son inhibidores eficaces de la fibrillogénesis como que el componente activo dentro de los sueros de animales inmunizados con Abeta₄₂ es una IgG específica.

Ejemplos 9 - 27

DISEÑO DEL ANTÍGENO

[0162] Los péptidos mostrados en la Tabla 5 y en los Ejemplos 9-17 se diseñaron según la fórmula mostrada a continuación:



[0163] En la que se presenta una copia única de Abeta₍₄₋₁₀₎ y n es 0, m es 1 o es 2, B es glicina, C es glicina, p es 1 y el epítipo de la célula T colaboradora es cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21. Estos antígenos que contienen epítopos de células B y T combinados se corresponden con las SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 y 43.

Tabla 5. Antígenos de péptidos Abeta

Ejemplo	SEQ ID NO:	SECUENCIA DEL PÉPTIDO DEL ANTÍGENO
9	25	FFLLTRILTIPQSLD-GGFRHDSGYG
10	26	KKLRRLLYMIYMSGLAVRVHVSKEEQYYDY-GGFRHDSGYG
11	27	KKQYIKANSKFIGITE-GGFRHDSGYG
12	28	KKFNNFTVSFWLRVPKVSASHL-GGFRHDSGYG
13	29	YMSGLAVRVHVSKEE-GGFRHDSGYG
14	30	YDPNYLRTDSDKDRFLQTMVKLFNRIK-GGFRHDSGYG
15	31	GAYARCPNGTRALTVAELRGNAEL-GGFRHDSGYG
16	32	LSEIKGVIVHRLEGV-GGFRHDSGYG
17	33	GILES RG IKARITHVDTESY-GGFRHDSGYG
18	34	WVRDIIDDFTNESQKT-GGFRHDSGYG
19	35	DVSTIVPYIGPALNHV-GGFRHDSGYG
20	36	ALNIWDRFDVFCTLGATTGGYKLGNS-GGFRHDSGYG
21	37	DSETADNLEKTVAALSILPGHGC-GGFRHDSGYG
22	38	EEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGELVDIGFAATNFVESC GGFRHDSGYG
23	39	DHEKKHAKMEKASSVFNVVNS-GGFRHDSGYG
24	40	KWFKT NAPNGVDEKHRH-GGFRHDSGYG
25	41	GLQGKHADAVKAKG-GGFRHDSGYG
26	42	GLAAGLVGMAADAMVEDVN-GGFRHDSGYG
27	43	STETGNQH HYQTRWSNANK-GGFRHDSGYG
28	44	STETGNQH HYQTRWSNANK-GFRHDSGYG
29	45	STETGNQH HYQTRWSNANK-FRHDSGYG
30	46	STETGNQH HYQTRVSNANK- FRHDSGY
31	47	GGFRHDSGYGG-STETGNQH HYQTRWSNANK
32	48	GGFRHDSGYG-STETGNQH HYQTRWSNANK
33	49	GGFRHDSGY-STETGNQH HYQTRWSNANK
34	50	FRHDSGYGG-STETGNQH HYQTRWSNANK
35	51	FRHDSGYG-STETGNQH HYQTRWSNANK

5 **Ejemplo 28**

DISEÑO DEL ANTÍGENO

10 **[0164]** El péptido mostrado en el Ejemplo 28 (Tabla 5), que se corresponde con la SEQ ID NO: 44 es un ejemplo en el que n es 0, m es 1, o es 1, B es glicina, C es glicina, p es 1 y el epítoto de células T colaboradoras es la SEQ ID NO: 21. El antígeno que contiene los epítotos de células B y T combinados se corresponde con el péptido mostrado en la SEQ ID NO: 44.

15 **Ejemplo 29**

DISEÑO DEL ANTÍGENO

20 **[0165]** El péptido mostrado en el Ejemplo 29 (Tabla 5), que se corresponde con la SEQ ID NO: 45 es un ejemplo en el que n es 0, m es 1, o es 0 y el epítoto de células T está conectado con el epítoto de células B directamente a través de un enlace peptídico, C es glicina, p es 1 y el epítoto de células T colaboradoras es la SEQ ID NO: 21. El antígeno que contiene los epítotos de células B y T combinados se corresponde con el péptido

mostrado en la SEQ ID NO: 45.

Ejemplo 30

5 *DISEÑO DEL ANTÍGENO*

[0166] El péptido mostrado en el Ejemplo 30 (Tabla 5), que se corresponde con la SEQ ID NO: 46 es un ejemplo en el que n es 0, m es 1, o es 0 y el epítipo de células T está conectado con el epítipo de células B directamente a través de un enlace peptídico, C es glicina, p es 1 y el epítipo de células T colaboradoras es la SEQ ID NO: 21. El antígeno que contiene los epítipos de células B y T combinados se corresponde con el péptido mostrado en la SEQ ID NO: 46.

Ejemplos 31-33

15 *DISEÑO DEL ANTÍGENO*

[0167] Los péptidos mostrados en los Ejemplos 31-33 (Tabla 5) se diseñaron según la fórmula mostrada a continuación:

20 II. (A)_n -- Abeta₍₄₋₁₀₎ -- (B)_o -- (Th)_m -- (C)_p

[0168] En la que se presenta una copia única de Abeta₍₄₋₁₀₎ y n es 0, m es 1 o es 2, B es glicina, C es glicina, p es 2 y el epítipo de la célula T colaboradora es la SEQ ID NO: 21. Estos antígenos que contienen epítipos de células B y T combinados se corresponden con las SEQ ID NO: 47, 48 y 49.

25

Ejemplo 34 y 35:

DISEÑO DEL ANTÍGENO

30 [0169] El péptido mostrado en los Ejemplos 34 (Tabla 5) se diseñaron según la fórmula II mostrada a continuación:

II. (A)_n -- Abeta₍₄₋₁₀₎ -- (B)_o -- (Th)_m -- (C)_p

[0170] En la que se presenta una copia única de Abeta₍₄₋₁₀₎ y n es 0, m es 1, o es 2 en el Ejemplo 34 y o es 1 en el Ejemplo 35, B es glicina y p es 0 y el epítipo de la célula T colaboradora es la SEQ ID NO: 21. Estos antígenos que contienen epítipos de células B y T combinados se corresponden con las SEQ ID NO: 50 y 51.

35

Ejemplo 36

40 *Síntesis de los péptidos diseñados*

[0171] Las síntesis peptídica en fase sólida de los péptidos diseñados correspondientes a las SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51 y un péptido control, el polipéptido amiloide del islote (IAPP) (SEQ ID NO: 52) se realizan a una escala de 100 μmoles usando síntesis manual en fase sólida y un sintetizador de péptidos Symphony usando una resina MBHA amida de Rink protegida con *Fmoc*, aminoácidos protegidos con *Fmoc*, hexafluorofosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N-tetrametiluronio (HBTU) en solución de N,N-dimetilformamida (DMF), activación con metil-morfolina (NMM) y desprotección con piperidina de los grupos *Fmoc* (etapa 1). Cuando es necesario, la desprotección selectiva del grupo Lys(Aloc) se realiza manualmente y se consigue tratando la resina con una solución de 3 eq de Pd(PPh₃)₄ disuelto en 5 ml de CHCl₃:NMM:HOAc (18:1:0,5) durante 2 h (etapa 2). A continuación, la resina se lava con CHCl₃ (6 X 5 ml), HOAc al 20% en diclorometano (DCM) (6 X 5 ml), DCM (6 X 5 ml) y DMF (6 X 5 ml). En algunos casos, la síntesis se reautomatizó a continuación para la adición de un grupo de AEEA (ácido aminoetoxietoxiacético), la adición de ácido acético o la adición de un ácido 3-maleimidopropiónico (MPA) (etapa 3). La escisión de la resina y el aislamiento del producto se realiza usando TFA al 85%/TIS al 5%/tioanisol al 5% y fenol al 5%, seguido de precipitación en Et₂O enfriado en hielo seco (etapa 4). Los productos se purifican mediante HPLC preparativa en fase inversa usando un sistema de HPLC binario preparativo Varian (Rainin): elución en gradiente del 30-55% de B (TFA al 0,045% en H₂O (A) y TFA al 0,045% en CH₃CN (B)) durante 180 min a 9,5 ml/min usando una columna de 10 μ fenil-hexilo Phenomenex Luna, 21 mm x 25 cm y un detector de UV (Varian Dynamax UVD II) a 214 y 254 nm. La pureza y la verificación de la masa se determinan en el 95% mediante espectrometría de masas acoplada a RP-HPLC usando un espectrómetro de la serie LCMS-1100 de Hewlett Packard equipado con un detector de dispositivos de fotodiodos y usando ionización por electropulverización.

60

Ejemplo 37

65 *Inmunización de ratones CRND8 con antígenos peptídicos diseñados según las Fórmulas I y II*

[0172] Los ratones TgCRND8 según se describe en el Ejemplo 2 se destetaron, se les realizó el genotipo para comprobar la presencia del transgén beta-APP y se alojaron en jaulas para ratones convencionales en grupos de 2-4 ratones del mismo sexo. A los ratones se les proporcionó acceso libre a bloques de pienso, pienso en polvo y agua. Todos los ratones se mantuvieron durante una semana antes de la primera inmunización y se registraron sus pesos el día anterior y dos días después de cada inmunización. Todos los grupos experimentales coincidían en sexo y en peso.

Protocolo de inmunización y obtención de sueros

[0173] Se usaron los péptidos sintéticos correspondientes a las SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51 y un péptido control, el péptido del polipéptido amiloide del islote (IAPP) (SEQ ID NO: 52) para inmunizar a ratones CRND8 transgénicos. El protocolo y el programa de inmunización fueron según se describió previamente en Schenk y col. Nature 400:173-177 (1999). Cada péptido se prepara en el momento a partir de polvo liofilizado para cada conjunto de inyecciones. Para las inmunizaciones, se añaden 2 mg de cada péptido a un recipiente independiente de agua desionizada de 0,9 ml y las mezclas se agitan para su mezcla. A continuación, se añaden a cada solución de péptidos 100 μ l de fosfato salino tamponado (PBS) (en la que PBS 1X es NaCl 0,15 M, fosfato sódico 0,01 a pH 7,5). Cada solución se agita de nuevo y se deja reposar durante la noche a 37°C. Los péptidos se emulsionan en una proporción 1:1 (v/v) con adyuvante completo de Freund para la primera inmunización y adyuvante incompleto de Freund para las inmunizaciones posteriores. La primera reinmunización se hace dos semanas después de la inmunización inicial y, a continuación, cada mes. Cada animal se inmuniza con aproximadamente 100 μ g de antígeno por inyección. Cada grupo de inmunización contiene de 6 a 10 ratones. A continuación, se determinan los títulos de anticuerpos en las muestras de suero (200 μ l de sangre) recogidas mediante punción en la vena de la pata trasera izquierda a las 13 semanas y mediante punción cardíaca al final del procedimiento, a las 25 semanas de edad. Antes de su uso en estos estudios, el complemento se inactiva mediante incubación a 56°C durante 30 minutos. Las fracciones de Ig se aíslan a través de una columna de proteína G de 5 ml. Las muestras se cargan, se lavan con PBS, se eluyen con citrato sódico 0,1 M y se tamponan con Tris 1 M. Todas las fracciones de Ig fueron esterilizadas por filtración antes de su uso.

Resultados de la inmunización

[0174] Los sueros se aíslan de los ratones inmunizados con péptidos sintéticos que se corresponden con las SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51 y un péptido control, el péptido del polipéptido amiloide del islote (IAPP) (SEQ ID NO: 52) y a partir de ratones TgCRND8 no inmunizados y ratones no transgénicos de la misma camada.

[0175] La mayoría de los ratones desarrollan títulos significativos frente a Abeta₄₂, el inmunógeno o contra IAPP. Curiosamente no se detectan diferencias significativas en los títulos anti-Abeta₄₂ de los ratones transgénicos TgCRND8 y los ratones no transgénicos de la misma camada. Los sueros de ratones inmunizados se usan para teñir positivamente placas Abeta maduras en cortes histológicos de cerebro de ratones TgCRND8 no inmunizados de 20 semanas. Por el contrario, los sueros de los ratones inmunizados con el péptido control IAPP y sin inmunizar no eran capaces de teñir placas de Abeta maduras en cortes histológicos de cerebro de ratones TgCRND8 no inmunizados de 20 semanas de edad. Por tanto, los resultados muestran que puede inducirse la autoinmunidad del anticuerpo el cual puede reconocer y unirse a placas neuropatológicas que contienen Abeta.

EJEMPLO 38

Inhibición de la formación de fibrillas por el suero de ratones inmunizados

[0176] Como se describe en el Ejemplo 3, los péptidos Abeta se ensamblarán espontáneamente en fibrillas tras un periodo de incubación de 14 días y las fibrillas tienen un diámetro característico de 50-70 Å que pueden controlarse mediante microscopía electrónica como se describe a continuación.

Microscopía electrónica

[0177] Abeta₄₂ se usa directamente tras la solubilización en agua a una concentración madre de 10 mg/ml o tras el ensamblaje en fibrillas amiloides maduras. Abeta₄₂ se incuba en presencia y ausencia de sueros de ratones inmunizados con antígenos peptídicos correspondientes a las SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51 y un péptido control, péptidos del polipéptido amiloide del islote (IAPP) a una concentración de péptido final de 100 μ g/ml. Se añaden diluciones seriadas de los sueros a Abeta₄₂ y se incuban a temperatura ambiente (TA) durante 2 semanas. Para la tinción negativa en microscopía electrónica, se hacen flotar rejillas de polioform recubiertas de carbono en soluciones acuosas de péptidos. Después de transferir las rejillas y secarlas al aire, las muestras se tiñen con ácido fosfolvofrámico al 1% (p/v). Los ensamblajes de los péptidos se observan en un microscopio electrónico 7000 de Hitachi que funciona a 75V con un

aumento de 60.000 X.

Resultados de la microscopía electrónica

5 **[0178]** Para evaluar el efecto de los sueros de ratones inmunizados sobre el ensamblaje de Abeta en fibrillas, los sueros se incubaron como se describió anteriormente en presencia o ausencia de Abeta₄₂ a 37°C durante un máximo de 14 días. La presencia de fibrillas de Abeta₄₂ se examina en alícuotas de cada mezcla de reacción los días 1, 3, 7, 10 y 14 mediante tinción negativa en microscopía electrónica.

10 **[0179]** En ausencia de sueros, o en presencia de sueros no inmunizados, Abeta₄₂ formaba fibrillas largas (~7.500Å) con un diámetro característico de 50-70 Å. En presencia de sueros de animales inmunizados con IAPP, se producen fibrillas de Abeta₄₂ menos largas, aunque las fibrillas que se formaban tenían el diámetro característico de 50-70 Å. Por el contrario, la mayoría de los sueros de ratón obtenidos de ratones inmunizados con antígenos peptídicos que se correspondían con las SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 15 41, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 49, 50 y 51 que contienen el epítipo de células B de Abeta₍₄₋₁₀₎ bloqueaban en gran medida la formación de fibrillas, aunque algunos sueros mostraba poco o ningún efecto.

[0180] Además, no se detectan diferencias en la estructura de las fibrillas cuando se incubaron en presencia de sueros de ratones no inmunizados. Los sueros de ratones inmunizados con IAPP disminuyen el grado de formación de fibrillas, pero las fibrillas formadas son similares a las formadas por Abeta₄₂ solo. Finalmente, los sueros de ratones que se inmunizaron con los antígenos peptídicos correspondientes con las SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 49, 50 y 51 inhiben la fibrilgénesis en grados variables.

25 **Información de secuencia**

[0181]

Número de restos 1 5 10 15	
DAEFRHDSGY	Escis. del epítipo Maldi/ESI de productos de Proteasa Aβ42 presentados a AB
DAEFRHDSGYEVHH QK	Fragmentos de escisión del epítipo de tripsina y lys-C-proteasa
DAEFRHDSGYE	Glu-C-proteasa de <i>S. aureus</i>
DAEFRHDSGY	α-quimotripsina
FRHDSGY	α-quimotripsina (Y10) y aminopeptidasa M (DI, A2, E3);

Abeta 42

```

          1           5           10           15           20
25      30
(APP-672) D A E F R H D S G Y E V H H Q K L V F F A E D V
G S N K G A

          31           35           40
          I I G L M V G G V V I A- (APP-713)
    
```

30

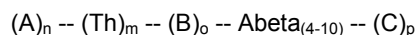
REIVINDICACIONES

1. Un péptido representado por la fórmula



en la que cada A, B y C son un resto de aminoácido o una secuencia de restos de aminoácidos; en la que n, o y p son independientemente números enteros que oscilan de 0 a aproximadamente 20; Th es independientemente una secuencia de restos de aminoácidos que comprende un epítotope de células T colaboradoras; cuando o es igual a 0 entonces Th está directamente conectado al epítotope de células B mediante un péptido unido sin ningún resto espaciador; en la que m es un número entero de 1 a aproximadamente 5 y Abeta₍₄₋₁₀₎ es (SEQ ID NO: 1), en la que dicho péptido se selecciona entre el grupo compuesto por SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 26; SEQ ID NO: 27; SEQ ID NO: 28; SEQ ID NO: 29; SEQ ID NO: 30; SEQ ID NO: 31; SEQ ID NO: 32; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 34; SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 36; SEQ ID NO: 37; SEQ ID NO: 38; SEQ ID NO: 39; SEQ ID NO: 40; SEQ ID NO: 41; SEQ ID NO: 42; SEQ ID NO: 43; SEQ ID NO: 44; SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 46.

2. Una composición peptídica que comprende una mezcla de dos o más péptidos representados por la fórmula



en la que cada A, B y C son un resto de aminoácido o una secuencia de restos de aminoácidos;

en la que n, o y p son independientemente números enteros que oscilan de 0 a aproximadamente 20;

Th es independientemente una secuencia de restos de aminoácidos que comprende un epítotope de células T colaboradoras; cuando o es igual a 0 entonces Th está directamente conectado al epítotope de células B mediante un péptido unido sin ningún resto espaciador;

en la que m es un número entero de 1 a aproximadamente 5 y Abeta₍₄₋₁₀₎ es (SEQ ID NO: 1), en la que uno de dichos péptidos se selecciona entre el grupo compuesto por SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 26; SEQ ID NO: 27; SEQ ID NO: 28; SEQ ID NO: 29; SEQ ID NO: 30; SEQ ID NO: 31; SEQ ID NO: 32; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 34; SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 36; SEQ ID NO: 37; SEQ ID NO: 38; SEQ ID NO: 39; SEQ ID NO: 40; SEQ ID NO: 41; SEQ ID NO: 42; SEQ ID NO: 43; SEQ ID NO: 44; SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 46.

3. Una composición inmunogénica para inducir la producción de anticuerpos que se unen específicamente a un péptido beta amiloide (SEQ ID NO: 2) que comprende:

a) un antígeno que comprende un epítotope de células T que proporciona una cantidad eficaz de ayuda de células T y un epítotope de células B compuesto por el péptido Abeta₍₄₋₁₀₎ (SEQ ID NO: 1); en la que dicho antígeno se selecciona entre el grupo compuesto por SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 26; SEQ ID NO: 27; SEQ ID NO: 28; SEQ ID NO: 29; SEQ ID NO: 30; SEQ ID NO: 31; SEQ ID NO: 32; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 34; SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 36; SEQ ID NO: 37; SEQ ID NO: 38; SEQ ID NO: 39; SEQ ID NO: 40; SEQ ID NO: 41; SEQ ID NO: 42; SEQ ID NO: 43; SEQ ID NO: 44; SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 46; y

b) un adyuvante.

4. La composición de la reivindicación 3, en la que dicho adyuvante comprende una o más sustancias seleccionadas entre el grupo compuesto por hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, saponina, Quill A, Quill A/ISCOM, bromuro de dimetil dioctadecil amonio/arvidina, polianiones, adyuvante completo de Freund, N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina, N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina, adyuvante incompleto de Freund y liposomas.

5. El uso de una composición inmunogénica según cualquiera de las reivindicaciones 3-4 en la fabricación de un medicamento para tratar a un individuo afectado por la enfermedad de Alzheimer.

6. El uso de una composición inmunogénica según cualquiera de las reivindicaciones 3-4 en la fabricación de un medicamento para reducir la cantidad de depósitos amiloides en el cerebro de un individuo afectado por la enfermedad de Alzheimer.

7. El uso de una composición inmunogénica según cualquiera de las reivindicaciones 3-4 en la fabricación de un medicamento para disgregar las fibrillas amiloides en el cerebro de un individuo afectado por la enfermedad de Alzheimer.

8. Un procedimiento para determinar si un compuesto es un inhibidor del depósito amiloide y de la formación de fibrillas que comprende:

- i) poner en contacto el compuesto con el péptido Abeta₍₄₋₁₀₎ (SEQ ID NO: 1) y
- ii) detectar la unión del compuesto con el péptido.

5

9. El procedimiento de la reivindicación 8 que además comprende evaluar si el compuesto inhibe la formación de fibrillas amiloides *in vitro*.