

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 226**

51 Int. Cl.:
A61K 39/385 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05723323 .1**
96 Fecha de presentación: **22.02.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1763364**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.03.2007**

54 Título: **Métodos y composiciones que comprenden construcciones supramoleculares**

30 Prioridad:
20.02.2004 US 783975
04.10.2004 US 958211

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.07.2012

73 Titular/es:
AC IMMUNE S.A.
EPFL-PSE BUILDING B
1015 LAUSANNE, CH

72 Inventor/es:
NICOLAU, Claude Yves;
GREFERATH, Ruth y
HICKMAN, David

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 385 226 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

Métodos y composiciones que comprenden construcciones supramoleculares.

La presente invención se refiere a métodos y composiciones para producir respuestas inmunitarias altas. En particular, la presente invención incluye composiciones y métodos nuevos para producir anticuerpos sensibles a la conformación.

El sistema inmunitario es un sistema de respuestas complejo del cuerpo que implica muchos tipos diferentes de células que tienen diferentes actividades. La activación de una parte del sistema inmunitario normalmente produce una variedad de respuestas debido a la activación no deseada de otras partes relacionadas del sistema. Actualmente no hay métodos o composiciones satisfactorios para producir una respuesta específica deseada dirigiéndose a los componentes específicos del sistema inmunitario.

El sistema inmunitario es un sistema interactivo complejo del cuerpo que implica una amplia variedad de componentes incluyendo células y factores celulares, que interaccionan con estímulos tanto del interior del cuerpo como del exterior del cuerpo. Aparte de su acción directa, en la respuesta del sistema inmunitario también influyen otros sistemas del cuerpo incluyendo los sistemas nervioso, respiratorio, circulatorio y digestivo.

Uno de los aspectos mejor conocidos del sistema inmunitario es su capacidad para responder a antígenos extraños presentados por organismos invasores, cambios celulares en el cuerpo o en la vacunación. Algunos de los primeros tipos de células que responden a dicha activación del sistema inmunitario son fagocitos y linfocitos citotóxicos naturales. Los fagocitos incluyen entre otras células, monocitos, macrófagos y neutrófilos polimorfonucleares. Estas células en general se unen al antígeno extraño, lo internalizan y con frecuencia lo destruyen. También producen moléculas solubles que median otras respuestas inmunitarias, tales como respuestas inflamatorias. Los linfocitos citotóxicos naturales pueden reconocer y destruir determinadas células tumorales y embrionarias infectadas por virus. Otros factores de la respuesta inmunitaria incluyen rutas complementarias, que son capaces de responder independientemente a antígenos extraños o actuar conjuntamente con células o anticuerpos.

En general, se cree que la respuesta a los antígenos implica tanto respuestas humorales como celulares. Las respuestas inmunitarias humorales son mediadas por factores no celulares que son liberados por las células y se pueden encontrar libres o no en el plasma o fluidos intracelulares. Un componente mayoritario de una respuesta humoral del sistema inmunitario es mediado por anticuerpos producidos por linfocitos B. Las respuestas inmunitarias mediadas por células resultan de las interacciones de células, incluyendo células presentadoras de antígeno y linfocitos B y linfocitos T.

Uno de los aspectos más ampliamente usados de las capacidades de las respuestas inmunitarias es la producción de anticuerpos monoclonales. La llegada de la tecnología de anticuerpos monoclonales (Mab) a mediados de 1970 proporcionó una nueva herramienta terapéutica y de diagnóstico valiosa. Por primera vez, los investigadores y médicos tenían acceso a cantidades ilimitadas de anticuerpos uniformes capaces de unirse a un sitio antigénico predeterminado y que tenían diferentes funciones inmunológicas efectoras. Actualmente, las técnicas de producción de anticuerpos monoclonales son bien conocidas en la técnica. Sin embargo, sigue habiendo una necesidad continua de anticuerpos especializados. Básicamente lo que se desea es la capacidad de producir anticuerpos a medida. La necesidad es especialmente grande en el campo de combatir una enfermedad infecciosa en la que los patógenos han adquirido resistencia a los antibióticos usados normalmente. Además, son necesarios antibióticos para dirigirse a afecciones patológicas que resultan de una causa distinta de un agente infeccioso.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurológico que se cree que es causado principalmente por la formación de placas amiloides causadas por el depósito anormal de proteínas en el cerebro. Las pruebas científicas demuestran que la EA resulta de un aumento en la producción o acumulación de proteína beta-amiloide en placas, que conduce a la muerte de las células nerviosas. La pérdida de células nerviosas en zonas estratégicas del cerebro produce, a su vez, la reducción de neurotransmisores y un deterioro de la memoria. Las proteínas responsables principalmente de la formación de placa incluyen la proteína precursora de amiloide (APP) y dos presenilinas (presenilina I y presenilina II). La degradación de las APP probablemente aumenta su propensión a agregarse en placas. Son necesarios anticuerpos específicos que puedan dirigirse y difundirse a la formación de placa amiloide.

Los síntomas de la EA se manifiestan lentamente y el primer síntoma puede ser solo una falta de memoria leve. En esta etapa, los individuos pueden olvidar sucesos recientes, actividades, los nombres de personas o cosas familiares y pueden no ser capaces de resolver problemas matemáticos sencillos. A medida que la enfermedad avanza, los síntomas se notan más fácilmente y se convierten en suficientemente graves para hacer que las personas con EA o sus familiares busquen ayuda médica. Los síntomas de la etapa media de la EA incluyen olvidar cómo se hacen tareas sencillas tales como asearse, y se desarrollan problemas con el habla, comprensión, lectura o escritura. Los pacientes con EA en la etapa final pueden convertirse en ansiosos o agresivos, deambular alejándose de casa y finalmente necesitan un cuidado completo.

Actualmente, la única forma definitiva de diagnosticar la EA es identificar placas y marañas en el tejido cerebral en una autopsia después de la muerte del individuo. Por lo tanto, los médicos solo pueden hacer un diagnóstico de EA "posible" o "probable" mientras la persona todavía está viva. Usando métodos habituales, los médicos pueden

5 diagnosticar correctamente la EA hasta 90 por ciento de las veces usando varias herramientas para diagnosticar la EA "probable". Los médicos hacen preguntas sobre la salud general de la persona, los problemas médicos anteriores y cualquier dificultad que tenga la persona para llevar a cabo actividades cotidianas. Las pruebas de comportamiento de la memoria, resolución de problemas, de atención, de contar y lenguaje, proporcionan información sobre la degeneración cognitiva, y las pruebas médicas como análisis de sangre, orina o líquido cefalorraquídeo, y barridos cerebrales pueden proporcionar alguna información adicional.

10 El tratamiento de la EA consiste en tratamientos basados en medicamentos y no basados en medicamentos. Los tratamientos dirigidos a cambiar el curso subyacente de la enfermedad (retrasar o invertir el avance) hasta ahora han sido en gran medida insatisfactorios. Se ha mostrado que los medicamentos que restablecen la deficiencia (defecto) o el mal funcionamiento, en los mensajeros químicos de las células nerviosas (neurotransmisores), tales como los inhibidores de la colinesterasa (ChEI) mejoran los síntomas. También hay medicamentos disponibles que se dirigen a las manifestaciones psiquiátricas de la EA.

15 Los inhibidores de la colinesterasa, tales como la tacrina y rivastigmina, actualmente son la única clase de agentes que están aprobados por la FDA para el tratamiento de la EA. Estos agentes son medicamentos que restablecen el defecto, o el mal funcionamiento, en la neurotransmisión química del cerebro. Los ChEI impiden la degradación enzimática de neurotransmisores aumentando así la cantidad de mensajeros químicos disponibles para transmitir las señales nerviosas en el cerebro.

20 Para algunas personas en las etapas temprana y media de la enfermedad, los fármacos tacrina (COGNEX®, Morris Plains, NJ), donepezil (ARICEPT®, Tokyo, JP), rivastigmina (EXELON®, East Hanover, NJ), o galantamina (REMINYL®, New Brunswick, NJ) pueden ayudar a prevenir que empeoren algunos síntomas durante un tiempo limitado. Otro fármaco, la memantina (NAMENDA®, New York, NY), se ha aprobado para el tratamiento de la EA de moderada a grave. Además, algunos medicamentos pueden ayudar a controlar los síntomas de comportamiento de la EA tales como el insomnio, agitación, vagabundeo, ansiedad y depresión. El tratar estos síntomas con frecuencia hace que los pacientes estén más cómodos y hace que su cuidado sea más fácil para los cuidadores.

25 Desgraciadamente, a pesar de los significativos avances de los tratamientos que muestran que esta clase de agentes son sistemáticamente mejores que el placebo, la enfermedad sigue su avance a pesar del tratamiento, y el efecto medio en el funcionamiento mental ha sido solo modesto. Los ChEI también tienen efectos secundarios que incluyen disfunción gastrointestinal, toxicidad hepática y pérdida de peso.

30 Se espera que los avances en la comprensión de las anomalías cerebrales que se producen en la EA proporcionen el marco para nuevos objetivos de tratamiento que están más centrados en la alteración del curso y el desarrollo de la enfermedad. Se están investigando activamente muchos compuestos, incluyendo agentes antiinflamatorios. También están en marcha ensayos clínicos que usan inhibidores específicos de la ciclooxigenasa (COX-2), tales como rofecoxib y celecoxib.

35 Otro factor a tener en cuenta cuando se desarrollan nuevos fármacos es la facilidad de uso para los pacientes objetivo. El suministro oral de fármacos, específicamente comprimidos, cápsulas y geles blandos, dan cuenta de 70% de todas las formas farmacéuticas consumidas por conveniencia del paciente. Los diseñadores de fármacos están de acuerdo en que los pacientes prefieren el suministro oral a someterlos a inyecciones u otras formas más invasivas de administración de medicamentos. También son preferibles las formulaciones que son de intervalos de dosificación bajos (es decir, una vez al día o liberación sostenida). La facilidad de administración de antibióticos en formas farmacéuticas orales produce un aumento de la observancia del paciente durante el tratamiento.

40

La técnica anterior describe diferentes composiciones y métodos para tratar enfermedades (p. ej., cáncer) o enfermedades neurológicas (p. ej., EA).

45 Janssen et al., describen un PEG-liposoma dirigido a péptidos usado en terapia antiangiogénica, en el que péptidos RGD cíclicos o péptidos ATWLPPR acoplados a la superficie de PEG-liposomas producen la unión de esos liposomas a células endoteliales in vitro, y los liposomas dirigidos al péptido RGD demuestran la unión específica al endotelio tumoral in vivo (Janssen et al., *International Journal of Pharmaceutics*, 2003, 254, 55-58).

Se describe un método conocido para inhibir la fibrillogénesis amiloide en el documento WO99/41279, en el que el método comprende poner en contacto el tejido con una composición que comprende un péptido amiloidogénico que se ha bloqueado.

50 Nicolau et al. enseñan una composición inmunogénica que comprende un péptido antigénico amiloide modificado con ácido palmítico reconstituido en un liposoma y su uso para reducir placas en el páncreas de ratones NOBRA transgénicos (Nicolau et al., *PNAS*, 2002, 99(4), 2332-2337).

55 Allen et al. describen derivados lipídicos sintéticos de polietilenglicol (PEG) que se han sintetizado y ensayado por su capacidad para reducir la absorción de liposomas en el sistema de fagocitos mononucleares (MPS, sistema reticuloendotelial) en ratones y prolongar las semividas en la circulación de los liposomas (Allen et al., *Biochimica et Biophysica acta*, 1991, 1066, 29-36). Más en particular, se describe que el polietilenglicol unido covalentemente a albúmina de suero bovino disminuye la inmunogenicidad de esta proteína.

Lo que se necesitan son métodos y composiciones eficaces para generar anticuerpos altamente específicos y altamente eficaces. Preferiblemente, dichos anticuerpos reconocerán epítomos específicos en diferentes antígenos tales como la proteína amiloide, proteína priónica o glicoproteína P₁₇₀.

- 5 Por lo tanto, lo que se necesita también, son composiciones y métodos eficaces para abordar las complicaciones asociadas con la enfermedad neurológica asociada con la formación de placas amiloides, tal como la enfermedad de Alzheimer. En particular, lo que se necesita son anticuerpos especializados capaces de contrarrestar las manifestaciones fisiológicas de la enfermedad, tales como la formación de placas asociada con la agregación de fibras del péptido amiloide en su conformación en lámina beta.

RESUMEN DE LA INVENCION

- 10 La presente invención incluye nuevos métodos y composiciones para producir anticuerpos altamente específicos y altamente eficaces. A diferencia de los productos actualmente disponibles, la presente invención proporciona métodos y composiciones únicos que dan lugar a anticuerpos que tienen la capacidad de reconocer epítomos específicos de una variedad de antígenos.

- 15 La presente invención satisface la necesidad que hay desde hace tiempo de composiciones que permitan la generación de anticuerpos que reconocen específicamente epítomos tales como los de la proteína amiloide o proteína priónica.

La presente invención comprende una presentación de antígeno única que produce una exposición potenciada y finalmente anticuerpos con un mayor grado de sensibilidad conformacional.

- 20 En una realización, la invención se refiere a una composición que comprende una construcción antigénica en la que la construcción antigénica comprende

a) un péptido antigénico o fragmento activo del mismo, en el que el péptido antigénico o fragmento activo del mismo se modifica para tener un polietilenglicol covalentemente unido, uno en cada extremo, y

b) en la que la construcción antigénica se reconstituye en liposomas; para potenciar la antigenicidad.

- 25 En otra realización, la invención se refiere a la composición de la invención que comprende una construcción antigénica en la que la construcción antigénica comprende

a) un péptido antigénico o fragmento activo del mismo, en el que el péptido antigénico o fragmento activo del mismo se modifica para tener una lisina pegilada covalentemente unida, una en cada extremo, y

b) en la que la construcción antigénica se reconstituye en liposomas para potenciar la antigenicidad.

- 30 En una realización, la invención incluye composiciones que comprenden construcciones antigénicas que comprenden una secuencia peptídica, unida covalentemente a un aminoácido pegilado (tal como lisina pegilada), uno en cada extremo.

Por consiguiente, un objeto de la presente invención es proporcionar métodos y composiciones para producir respuestas inmunitarias específicas y eficaces.

- 35 Otro objeto de la presente invención es proporcionar métodos y composiciones para tratar y prevenir la aparición o extensión de una enfermedad.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar métodos y composiciones para prevenir, tratar o reducir la enfermedad produciendo una respuesta celular y humoral activa en el huésped.

Otro objeto más de la presente invención es proporcionar métodos y composiciones para reducir y prevenir la aparición de trastornos neurológicos.

- 40 También se describen métodos y composiciones para reducir y prevenir la aparición de enfermedades hiperproliferativas.

Otro objeto más de la presente invención es proporcionar métodos y composiciones para la intervención inmunológica terapéutica en enfermedades neurológicas.

- 45 Se describen además métodos y composiciones para vacunar un ser humano o animal contra organismos infecciosos seleccionados, y métodos y composiciones para inmunizar de forma pasiva un ser humano o animal contra organismos infecciosos seleccionados.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una construcción antigénica y composiciones que son antigénicas y producir una respuesta inmunitaria contra la manifestación patológica en seres humanos o animales.

Otro objeto más de la presente invención es proporcionar una construcción antigénica y composiciones que son

antigénicas y producir una respuesta inmunitaria contra la manifestación patológica en seres humanos o animales, en el que dicha manifestación patológica comprende anomalías tales como placas amiloides.

Se describe además una construcción antigénica y composiciones que son antigénicas y producen una respuesta inmunitaria contra organismos infecciosos en seres humanos o animales.

5 Otro objeto de la presente invención es proporcionar composiciones de vacuna que comprenden construcciones antigénicas que son no inmunogénicas en un ser humano o animal que se va a inmunizar con la composición; y vehículos en los que el péptido antigénico es presentado exclusivamente en la superficie del vehículo, de modo que los anticuerpos resultantes son muy específicos y tienen un grado mayor de sensibilidad conformacional cuando se administran al ser humano o animal.

10 Otro objeto más de la presente invención es proporcionar métodos y composiciones que comprenden restos antigénicos modificados para aumentar la respuesta de un individuo a la enfermedad y trastornos.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar composiciones de vacunas que comprenden construcciones antigénicas, en las que los péptidos se modifican para potenciar el efecto antigénico.

15 Otro objeto más de la presente invención es proporcionar composiciones de vacunas que comprenden construcciones antigénicas que comprenden péptidos modificados para potenciar el efecto antigénico, en las que dichos péptidos se modifican por pegilación (usando polietilenglicol o polietilenglicol modificado), o se modifican por otros métodos tales como por poliaminoácidos (p. ej., poliglicina, polihistidina), polisacáridos (p. ej., poli(ácido galacturónico), poli(ácido láctico), poliglicólido, quitina, chitosán), polímeros sintéticos (poliamidas, poliuretanos, poliésteres) o copolímeros (poli(ácido metacrílico) y N-(2-hidroxi)propilmetacrilamida) y similares.

20 Otro objeto más de la presente invención es proporcionar composiciones inmunogénicas en las que el vehículo para el péptido antigénico comprende liposomas modificados.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar composiciones inmunogénicas en las que el vehículo para el péptido antigénico comprende un metal coloidal.

25 Otro objeto de la presente invención es proporcionar composiciones inmunogénicas en las que el vehículo para el péptido antigénico comprende una vesícula derivada de baculovirus.

Otro objeto más de la presente invención es proporcionar composiciones inmunogénicas en combinación con adyuvantes farmacéuticamente aceptables para estimular la respuesta inmunitaria.

Otro objeto más de la presente invención es proporcionar composiciones inmunogénicas que se pueden administrar por vía intramuscular, intravenosa, transdérmica, oral o subcutánea.

30 Estos y otros objetos, características y ventajas de la presente invención serán más evidentes después de una revisión de la siguiente descripción detallada de la realización descrita y las reivindicaciones adjuntas.

La figura 1 proporciona un esquema que muestra el antígeno β -amiloide químicamente modificado.

La figura 2 proporciona un esquema representativo que muestra el liposoma reconstituido con un antígeno amiloide químicamente modificado.

35 La figura 3 proporciona un esquema que muestra un antígeno P₁₇₀ múltiple.

La figura 4 proporciona péptidos sintéticos, homólogos a segmentos diferentes de PrP^o usados para investigar su influencia en la viabilidad de las neuronas primarias de hipocampo de rata.

La figura 5 proporciona un esquema de los péptidos derivados de las secuencias A β 4-11 (SEQ ID NO: 2), 1-16 (SEQ ID NO: 5), 22-35 (SEQ ID NO: 3) y 29-40 (SEQ ID NO: 4).

40 La figura 6 proporciona un esquema que muestra los procedimientos sintéticos generales de antígenos derivados de secuencias de péptidos con o sin restos de His o Lys internos.

La figura 7 proporciona los resultados del análisis ELISA llevado a cabo con sueros diluidos 1:5000 de ratones C57BL/6 inmunizados con amiloide pegilado/liposomas/lípido A. PEG-A β ₁₋₁₆ (--negro), PEG-A β ₁₋₁₆ + ALUM (- -gris), PEG-A β ₄₋₁₁ (— —gris). Se muestra la media de los valores de 10 ratones por antígeno; la media de los valores de 2 ratones para A β ₁₋₁₆ + ALUM. Como control se muestran los valores medios de 12 animales a los que se inyectó A β ₁₋₁₆ palmitoilado (--gris brillante) (publicado en 2002).

La figura 8 proporciona los resultados de ensayos que evalúan la solubilización de fibras A β ₁₋₄₂ por sueros de ratones C57BL/6 inmunizados con PEG-A β ₄₋₁₁. La intensidad de la emisión de fluorescencia de la tioflavina se correlaciona con la cantidad de amiloide fibrilar presente en la disolución. Formación de fibras A β ₁₋₄₂ durante 7 días a 37°C en PBS, pH = 7,1. Los sueros se añadieron el día 7 y se incubaron durante 24 h. Las barras 1-9 representan

experimentos de solubilización hechos con sueros de animales vacunados. Se muestran las medias de 4 muestras + ET.

5 La figura 9 proporciona los resultados del ensayo de solubilización de fibras $A\beta_{1-42}$ por los líquidos sobrenadantes de clones de hibridoma de ratones C57BL/6 inmunizados con palm- $A\beta_{1-16}$. Formación de fibras $A\beta_{1-42}$ durante 7 días a 37°C en PBS, pH = 7,1. Los líquidos sobrenadantes se incubaron durante 24 h. Medio sfr = medio sin FCS. Los clones de hibridoma se cultivaron en suero sin medio durante 1 día. Se muestra la media de 4 muestras + ET.

La figura 10 proporciona el espectro de correlación de ^{13}C - ^{13}C de fibras amiloides hechas del péptido β -amiloide marcado en ^{10}Tyr y ^{12}Val .

10 La figura 11 proporciona la proyección del espectro de correlación de ^{13}C - ^{13}C de fibras de péptido $A\beta$ (A) y después de incubación con el anticuerpo durante 12 días (B).

La figura 12 proporciona los datos de los espectros de RMN para evaluar el efecto de los anticuerpos monoclonales en las fibras de amiloide beta.

La figura 13 proporciona una gráfica que muestra los datos comparativos para los antígenos pegilados y palmitoilados.

15 La figura 14 proporciona una gráfica que muestra los datos comparativos del beta amiloide pegilado (1-16, 4-11, 22-35, 1-15) y beta amiloide palmitoilado (1-16).

20 La presente invención se puede entender mejor por referencia a la siguiente descripción detallada de las realizaciones específicas incluidas en la presente memoria. Aunque la presente memoria se ha descrito con referencia a detalles específicos de algunas realizaciones de la misma, no se pretende que dichos detalles se consideren como limitaciones del alcance de la invención.

25 Los autores de la invención describen en la presente memoria un método para producir respuestas inmunitarias altas, de gran especificidad que producen anticuerpos sensibles a la conformación. Estos anticuerpos reconocen epítomos específicos en una amplia variedad de antígenos incluyendo, pero sin limitar, la proteína amiloide, proteína priónica, glicoproteína P₁₇₀. Más específicamente, los autores de la invención describen en la presente memoria el concepto de modificación de péptidos, tales como péptidos amiloides, para producir una respuesta inmunogénica mejorada. En algunas realizaciones, los péptidos se modifican por pegilación.

Definiciones

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína", como se usan en la presente memoria, son intercambiables y se definen para indicar una biomolécula compuesta de dos o más aminoácidos unidos por un enlace peptídico.

30 El término "péptidos", son cadenas de aminoácidos (típicamente L-aminoácidos) cuyos carbonos alfa están unidos por enlaces peptídicos formados por una reacción de condensación entre el grupo carboxilo del carbono alfa de un aminoácido y el grupo amino del carbono alfa de otro aminoácido. El aminoácido terminal en un extremo de la cadena (es decir, el amino terminal) tiene un grupo amino libre, mientras que el aminoácido terminal en el otro extremo de la cadena (es decir, el carboxi terminal) tiene un grupo carboxilo libre. Como tal, la expresión "extremo amino" (abreviado extremo N) se refiere al grupo alfa-amino libre en el aminoácido en el extremo amino del péptido, o al grupo alfa-amino (grupo imino cuando participa en un enlace peptídico) de un aminoácido en cualquier otro sitio en el péptido. Igualmente, la expresión "extremo carboxi" (abreviado extremo C) se refiere al grupo carboxilo libre en el aminoácido en el extremo carboxi de un péptido, o al grupo carboxilo de un aminoácido en cualquier otro sitio en el péptido.

40 Típicamente, los aminoácidos que componen un péptido se numeran en orden, empezando en el amino terminal y aumentando en la dirección hacia el carboxi terminal del péptido. Por lo tanto, cuando se dice que un aminoácido "sigue" a otro, el aminoácido está situado más acerca del carboxi terminal del péptido que el aminoácido precedente.

45 El término "resto" se usa en la presente memoria para referirse a un aminoácido que se incorpora a un péptido mediante un enlace amida. Como tal, el aminoácido pueden ser un aminoácido natural o, salvo que esté limitado de otra forma, puede abarcar análogos conocidos de aminoácidos naturales que funcionan de una forma similar a los aminoácidos naturales (es decir, miméticos de aminoácidos). Además, un mimético de enlace amida incluye modificaciones de la cadena principal del péptido bien conocidas para los expertos en la técnica.

50 La frase "que consiste esencialmente en" se usa en la presente memoria para excluir cualquier elemento que altere sustancialmente las propiedades esenciales de los péptidos a los que se refiere la frase. Por lo tanto, la descripción de un péptido "que consiste esencialmente en..." excluye cualesquiera sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos que alteren sustancialmente la actividad biológica de ese péptido.

Además, una experto reconocerá que, como se ha mencionado antes, las sustituciones, eliminaciones o adiciones individuales que alteren, añadan o eliminen un aminoácido individual o un porcentaje pequeño de aminoácidos

(típicamente menos de 5%, más típicamente menos de 1%) en una secuencia modificada, son variaciones modificadas de forma conservativa cuando las alteraciones producen la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Los siguientes 6 grupos contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservativas de uno por otro:

1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T);

2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E);

3) Asparagina (N), Glutamina (Q);

4) Arginina (R), Lisina (K);

10 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y

6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W).

Las frases “aislado” o “biológicamente puro” se refieren a material que carece sustancial o esencialmente de componentes que normalmente lo acompañan cuando se encuentra en su estado natural. Por lo tanto, los péptidos descritos en la presente memoria no contienen materiales asociados normalmente con su entorno. Típicamente, los péptidos inmunogénicos aislados descritos en la presente memoria son al menos aproximadamente 80% puros, normalmente al menos aproximadamente 90% y preferiblemente al menos aproximadamente 95% medido por la intensidad de la banda en un gel teñido con plata.

La pureza u homogeneidad de la proteína se puede indicar mediante una serie de métodos bien conocidos en la técnica, tales como la electroforesis en gel de poliacrilamida de una muestra de proteína, seguido de visualización tras la tinción. Para algunos propósitos será necesaria la alta resolución y se usará HPLC o un medio similar para la purificación.

Cuando los péptidos inmunogénicos son relativamente cortos de longitud (es decir, menos de aproximadamente 50 aminoácidos) a menudo se sintetizan usando técnicas convencionales de síntesis química de péptidos.

La síntesis en fase sólida en la que el aminoácido C-terminal de la secuencia se une a un soporte insoluble seguido de la adición secuencial del resto de los aminoácidos en la secuencia, es un método preferido para la síntesis química de péptidos inmunogénicos descritos en la presente memoria. Las técnicas de síntesis en fase sólida son conocidas para los expertos en la técnica.

Alternativamente, los péptidos inmunogénicos descritos en la presente memoria se sintetizan usando la metodología de ácido nucleico recombinante. En general, esto implica crear una secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido, poner el ácido nucleico en un casete de expresión bajo el control de un promotor particular, expresar el péptido en un huésped, aislar el péptido o polipéptido expresado y, si es necesario, renaturalizar el péptido. Las técnicas necesarias para guiar al experto en dichos procedimientos se encuentran en la bibliografía.

Una vez expresados, los péptidos recombinantes se pueden purificar de acuerdo con procedimientos convencionales, que incluyen la precipitación con sulfato amónico, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel y similares. Se prefieren las composiciones sustancialmente puras de aproximadamente 50 a 95% de homogeneidad, y las más preferidas son las de 80 a 95% o más de homogeneidad para usar como agentes terapéuticos.

Un experto en la técnica reconocerá que después de la síntesis química, expresión biológica o purificación, los péptidos inmunogénicos pueden tener una conformación sustancialmente diferente de las conformaciones naturales de los péptidos constituyentes. En este caso, a menudo es necesario desnaturalizar y reducir el péptido antiproliferativo y después hacer que el péptido vuelva a plegarse en la conformación preferida. Los métodos para reducir y desnaturalizar proteínas e inducir de nuevo el plegado son bien conocidos para los expertos en la técnica.

La antigenicidad de la proteína purificada se puede confirmar, por ejemplo, demostrando la reacción con suero inmunológico, o con antisuero producido contra la propia proteína.

Los términos “un”, “una” y “el/la”, como se usan en la presente memoria, se definen para referirse a “uno o más” e incluyen el plural salvo que el contexto sea inadecuado.

Los términos “detectar” o “detectado”, como se usan en la presente memoria, significan usar técnicas conocidas para detectar moléculas biológicas tales como métodos inmunoquímicos o histológicos y se refieren a determinar cualitativa o cuantitativamente la presencia o la concentración de la biomolécula que se está investigando.

Por “aislado” se entiende una molécula biológica que carece de al menos algunos de los componentes con los que se produce en forma natural.

Los términos “anticuerpo” o “anticuerpos”, como se usan en la presente memoria, incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, quiméricos, de cadena sencilla, biespecíficos, adaptados a modelo simio y humanizados, así como fragmentos Fab, incluyendo los productos de una biblioteca de expresión de inmunoglobulina Fab.

- 5 El término “antígeno” se refiere a una entidad o fragmento de la misma que puede inducir una respuesta inmunitaria en un mamífero. El término incluye inmunógenos y regiones responsables de la antigenicidad o determinantes antigénicos.

Como se usa en la presente memoria, el término “soluble” significa parcial o completamente disuelto en una disolución acuosa.

- 10 También como se usa en la presente memoria, el término “inmunogénico” se refiere a sustancias que producen o potencian la producción de anticuerpos, linfocitos T y otras células inmunitarias reactivas dirigidas contra un agente inmunogénico y contribuyen a una respuesta inmunitaria en seres humanos o animales.

- 15 Una respuesta inmunitaria ocurre cuando un individuo produce suficientes anticuerpos, linfocitos T y otras células inmunitarias reactivas contra composiciones inmunogénicas de la presente invención administradas para moderar o aliviar el trastorno que se va a tratar.

- 20 El término “vehículo”, como se usa en la presente memoria, significa una estructura en la que se pueden incorporar o asociar un péptido antigénico o construcción supramolecular, presentando o exponiendo de esta forma péptidos antigénicos o parte del péptido al sistema inmunitario de un ser humano o animal. El término “vehículo” comprende además métodos de suministro en los que las composiciones de construcciones antigénicas supramoleculares que comprenden el péptido antigénico pueden ser transportadas a los sitios deseados mediante mecanismos de suministro. Un ejemplo de dicho sistema de suministro utiliza metales coloidales tales como oro coloidal.

- 25 Además, el término “vehículo” comprende además mecanismos de suministro conocidos para los expertos en la técnica que incluyen, pero sin limitar, hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero bovino (BSA) y otros adyuvantes. Debe entenderse también que las composiciones de construcciones antigénicas supramoleculares de la presente invención pueden comprender además adyuvantes, conservantes, diluyentes, emulsionantes, estabilizantes y otros componentes que son conocidos y se usan en vacunas de la técnica anterior. Se puede usar cualquier sistema adyuvante conocido en la técnica en la composición de la presente invención. Dichos adyuvantes incluyen, pero sin limitar, adyuvante incompleto de Freund, adyuvante completo de Freund, manano acetilado con enlace β -(1-4) (“Acemannan”), TITERMAX® (adyuvantes copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno de CytRx Corporation), adyuvantes lipídicos modificados de Chiron Corporation, adyuvantes derivados de saponina de Cambridge Biotech, Bordetella pertussis inactivada, lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram negativas, aniones poliméricos grandes tales como sulfato de dextrano, y geles inorgánicos tales como alumbre, hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio.

- 35 Las proteínas vehículo que se pueden usar en las composiciones de construcciones antigénicas supramoleculares de la presente invención incluyen, pero sin limitar, proteína de unión a maltosa “MBP”; albúmina de suero bovino “BSA”; hemocianina de lapa californiana “KLH”; ovoalbúmina; flagelina; tiroglobulina; albúmina de suero de cualquier especie; gammaglobulina de cualquier especie; células singénicas; células singénicas que llevan antígenos; y polímeros de D- y/o L-aminoácidos.

- 40 Además, la expresión “cantidad eficaz” se refiere a la cantidad de composición antigénica/inmunogénica que, cuando se administra a un ser humano o animal, produce una respuesta inmunitaria. La cantidad típica la determina fácilmente el experto en la técnica siguiendo procedimientos rutinarios.

- 45 Por ejemplo, las composiciones de construcciones antigénicas supramoleculares se pueden administrar por vía parenteral u oral en un intervalo de aproximadamente 1,0 μ g a 10,0 mg por paciente, aunque no se pretende que este intervalo sea limitante. La cantidad real de la composición requerida para producir una respuesta inmunitaria variará para cada paciente individual dependiendo de la inmunogenicidad de la composición administrada y de la respuesta inmunitaria del individuo. Por consiguiente, la cantidad específica administrada a un individuo se determinará mediante experimentación rutinaria y basándose en la práctica y la experiencia del experto en la técnica.

- 50 Las composiciones de la presente invención se usan para producir anticuerpos dirigidos contra péptidos antigénicos. Los anticuerpos resultantes se administran a individuos para inmunizarlos de forma pasiva contra una variedad de enfermedades o trastornos, incluyendo pero sin limitar, la enfermedad de Alzheimer, cáncer resistente a múltiples fármacos o enfermedad priónica.

- 55 Las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden comprender liposomas hechos reconstituyendo los liposomas en presencia de péptidos antigénicos modificados o purificados o purificados parcialmente. Además, los fragmentos de péptidos se pueden reconstituir en liposomas. La presente invención también incluye fragmentos de péptidos antigénicos modificados para así aumentar su antigenicidad. Por ejemplo, los restos y adyuvantes antigénicos se pueden unir a o mezclar con el péptido. Los ejemplos de restos y adyuvantes antigénicos incluyen,

pero sin limitar, derivados de dipéptido muramilo lipófilo, adyuvantes polímeros de bloques no iónicos, hidróxido de aluminio o fosfato o de aluminio, y mezclas de los mismos.

5 La presente invención abarca además péptidos antigénicos modificados con restos hidrófobos, tales como ácido palmítico, que facilitan la inserción en la bicapa lipídica hidrófoba de un vehículo. Los restos hidrófobos de la presente invención pueden ser ácidos grasos, triglicéridos y fosfolípidos en los que las cadenas principales de carbonos del ácido graso tienen al menos 10 átomos de carbono. Los más preferibles son ácidos grasos que tienen restos lipófilos con una cadena principal de carbonos de al menos aproximadamente 14 átomos de carbono y hasta aproximadamente 24 átomos de carbono. Los restos hidrófobos más preferidos tienen una cadena principal de carbonos de al menos 14 átomos de carbono. Los ejemplos de restos hidrófobos incluyen, pero sin limitar, ácido 10 palmítico, ácido esteárico, ácido mirístico, ácido láurico, ácido oleico, ácido linoleico y ácido linolénico. El resto hidrófobo más preferido es el ácido palmítico.

Las composiciones de construcciones antigénicas supramoleculares de la presente invención se administran a un ser humano o animal para inducir inmunidad frente a agentes antigénicos tales como organismos infecciosos. El ser humano o animal inmunizado desarrolla anticuerpos en la circulación contra el organismo infeccioso, reduciendo o 15 inactivando de esta forma su capacidad para estimular la enfermedad.

Las composiciones de construcciones antigénicas supramoleculares de la presente invención también se usan para producir un panel de anticuerpos monoclonales o policlonales que son específicos para diferentes trastornos, incluyendo por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer. Los anticuerpos se hacen por métodos bien conocidos para el experto en la técnica.

20 Las composiciones de la presente invención se administran a un ser humano o animal por cualquier medio adecuado, preferiblemente por inyección. Por ejemplo, un péptido antigénico modificado reconstituido en liposomas se administra por inyección subcutánea. Sean producidos internamente o proporcionados de fuentes externas, los anticuerpos de la circulación se unen al antígeno y reducen o inactivan su capacidad para estimular la enfermedad.

Los liposomas que se pueden usar en las composiciones de la presente invención incluyen los conocidos para el experto en la técnica. Se puede usar cualquiera de los lípidos convencionales útiles para preparar liposomas. Los liposomas de bicapa y múltiples capas convencionales se pueden usar para hacer composiciones de la presente invención. Aunque se puede usar cualquier método para hacer liposomas conocido por el experto en la técnica, los liposomas más preferidos se hacen de acuerdo con el método de Alving et al., *Infect. Immun.* 60:2438-2444, 1992. El liposoma puede contener opcionalmente un adyuvante. Un adyuvante preferido es el lípido destoxificado, tal como monofosforil o difosforil-lípido A. 25

Cuando las vesículas son liposomas, el péptido antigénico en general tiene una cola hidrófoba que se inserta en la membrana del liposoma cuando se forma. Además, los péptidos antigénicos se pueden modificar para contener una cola hidrófoba de forma que se puedan insertar en el liposoma. Por ejemplo, el péptido antigénico se puede exponer en la superficie de los liposomas previamente formados mediante unión química o electroinserción.

35 Los anticuerpos proporcionados en la presente memoria son anticuerpos monoclonales o policlonales que tienen especificidad de unión para organismos infecciosos o péptidos antigénicos representativos de diferentes trastornos tales como la enfermedad de Alzheimer, cáncer resistente a múltiples fármacos y enfermedades priónicas.

El anticuerpo monoclonal se prepara inmunizando un animal, tal como un ratón o conejo, con composiciones de construcciones antigénicas supramoleculares de la presente invención. Se recogen células de bazo de los animales inmunizados y se generan hibridomas mediante fusión de las células de bazo sensibilizadas con una línea celular de mieloma, tal como células de mieloma murinas SP2/O (ATCC, Manassas, VA). Se induce a las células a fusionarse mediante adición de polietilenglicol. Los hibridomas se seleccionan químicamente mediante cultivo en placa de las células en un medio de selección que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT). 40

Después se seleccionan los hibridomas según su capacidad para producir anticuerpos monoclonales contra enfermedades o trastornos específicos. Los hibridomas que producen anticuerpos de interés se clonan, se expanden y se almacenan congelados para la producción futura. El hibridoma preferido produce un anticuerpo monoclonal que tiene el isotipo IgG, más preferiblemente el isotipo IgG1. 45

El anticuerpo policlonal se prepara inmunizando animales, tales como ratones o conejos, con las composiciones de construcciones antigénicas supramoleculares de la presente invención descritas antes. Posteriormente se recoge suero sanguíneo de los animales, y se seleccionan los anticuerpos en el suero por su reactividad de unión contra agentes objetivos. 50

El anticuerpo monoclonal o el anticuerpo policlonal, o ambos se pueden marcar directamente con un marcador detectable para identificar un agente objetivo en una muestra biológica como se describe a continuación. Los marcadores para usar en inmunoensayos son conocidos en general por los expertos en la técnica, e incluyen enzimas, radioisótopos y sustancias fluorescentes, luminiscentes y cromogénicas incluyendo partículas coloreadas, tales como oro coloidal y perlas de látex. Los anticuerpos también se pueden unir a una fase sólida para facilitar la separación de los complejos de anticuerpo-antígeno de los componentes que no han reaccionado en un 55

inmunoensayo. Las sustancias de ejemplo de la fase sólida incluyen, pero sin limitar, placas de microvaloración, tubos de ensayo, perlas magnéticas, de plástico o vidrio, y portaobjetos. Los métodos para acoplar anticuerpos a las fases sólidas son bien conocidos para los expertos en la técnica.

5 Alternativamente, el anticuerpo se puede marcar indirectamente por reacción con sustancias marcadas que tienen afinidad por la inmunoglobulina, tales como proteína A o G o segundos anticuerpos. El anticuerpo se puede conjugar con una segunda sustancia y detectar con una tercera sustancia marcada que tiene afinidad por la segunda sustancia conjugada con el anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo se puede conjugar con biotina y el conjugado de anticuerpo-biotina se puede detectar usando avidina o estreptavidina marcada. Igualmente, el anticuerpo se puede conjugar con un hapteno y el conjugado de anticuerpo-hapteno se puede detectar usando anticuerpo dirigido contra hapteno marcado. Estos y otros métodos de marcaje de anticuerpos y conjugados de ensayo son bien conocidos para el experto en la técnica.

15 En una realización preferida, el anticuerpo se marca indirectamente por reactividad con un segundo anticuerpo que se ha marcado con un marcador detectable. El segundo anticuerpo preferiblemente es uno que se une a anticuerpos del animal del cual se obtiene el anticuerpo monoclonal. En otras palabras, si el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo de ratón, entonces el segundo anticuerpo marcado es un anticuerpo dirigido contra Ig de ratón. Para el anticuerpo monoclonal que se va a usar en el ensayo descrito a continuación, este marcador preferiblemente es una perla revestida de anticuerpo, en particular una perla magnética. Para el anticuerpo policlonal que se va a usar en el inmunoensayo descrito en la presente memoria, el marcador preferiblemente es una molécula detectable tal como una sustancia radiactiva, fluorescente o electroquimioluminiscente.

20 *Formulaciones*

La proteína, péptido o fragmentos de proteína natural o sintético, que contiene todo o una parte activa de una proteína o péptido inmunogénico se puede preparar en una formulación fisiológicamente aceptable, tal como en un vehículo farmacéuticamente aceptable, usando técnicas conocidas. Por ejemplo, la proteína, péptido o fragmento de proteína se combina con un excipiente farmacéuticamente aceptable para formar una composición terapéutica.

25 Alternativamente, el gen para la proteína, péptido o fragmento de proteína, que contiene todo o una parte activa del péptido inmunogénico, se puede suministrar en un vector para la administración continua usando técnicas de terapia génica. El vector se puede administrar en un vehículo que tiene especificidad para un sitio objetivo, tal como un tumor.

30 Las composiciones de la presente invención se pueden administrar en forma de un sólido, líquido o aerosol. Los ejemplos de composiciones sólidas incluyen píldoras, cremas y unidades de dosificación que se pueden implantar. Las píldoras se pueden administrar por vía oral. Las cremas terapéuticas se pueden administrar por vía tópica. Las unidades de dosificación que se pueden implantar se pueden administrar de forma local, por ejemplo, en el sitio de un tumor, o se pueden implantar para la liberación sistémica de la composición terapéutica, por ejemplo, por vía subcutánea. Los ejemplos de composiciones líquidas incluyen formulaciones adaptadas para la inyección intramuscular, subcutánea, intravenosa, intraarterial, y formulaciones para la administración tópica e intraocular. Los ejemplos de formulaciones de aerosol incluyen formulaciones de inhalador para la administración en los pulmones.

35 Las composiciones se pueden administrar por vías de administración convencionales. En general, la composición se puede administrar por vía tópica, oral, rectal, nasal o parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea o intramuscular). Además, la composición se puede incorporar en matrices de liberación sostenida tales como polímeros biodegradables, implantándose los polímeros cerca de donde se desea el suministro, por ejemplo, en el sitio de un tumor. El método incluye la administración de una dosis individual, administración de dosis repetidas en intervalos de tiempo predeterminados y administración sostenida para un periodo de tiempo predeterminado.

40 Una matriz de liberación sostenida, como se usa en la presente memoria, es una matriz hecha de materiales, normalmente polímeros que son degradables por hidrólisis enzimática o ácida/básica o por disolución. Una vez insertada en el cuerpo, la matriz actúa sobre las enzimas y fluidos corporales. La matriz de liberación sostenida se elige convenientemente de materiales biocompatibles tales como liposomas, polilactidas (poli(ácido láctico)), poliglicólido (polímero de ácido glicólico), polilactida-co-glicólido (copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico), polianhidridos, poli(orto)ésteres, polipéptidos, ácido hialurónico, colágeno, sulfato de condroitina, ácidos carboxílicos, ácidos grasos, fosfolípidos, polisacáridos, ácidos nucleicos, poliaminoácidos, aminoácidos tales como fenilalanina, tirosina, isoleucina, polinucleótidos, poli(vinil-propileno), polivinilpirrolidona y silicona. Una matriz biodegradable preferida es una matriz de uno cualquiera de polilactida, poliglicólido o polilactida-co-glicólido (copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico).

La dosificación de la composición dependerá de la afección que se va a tratar, la composición particular usada y otros factores clínicos tales como el peso y estado del paciente y la vía de administración.

55 La composición se puede administrar en combinación con otras composiciones y procedimientos para el tratamiento de enfermedades. Por ejemplo, la proliferación celular no deseada se puede tratar de forma convencional con cirugía, radiación o quimioterapia en combinación con la administración de la composición, y posteriormente se pueden administrar dosis adicionales de la composición al paciente para estabilizar e inhibir el crecimiento de

potencian significativamente la exposición y accesibilidad de la secuencia peptídica. La presentación de antígeno se mejora y se potencia la sensibilidad a la conformación de los anticuerpos producidos. Otra ventaja de la presente invención es que se pueden usar secuencias de péptidos en diferentes conformaciones. La mayor distancia entre la secuencia y la superficie del liposoma asegura que la superficie no interaccione con la secuencia, por lo tanto, influye posiblemente en su conformación. Además, la antigenicidad de la construcción se hace significativamente mayor que la de las secuencias palmitoiladas reconstituidas en liposomas. Se obtienen valoraciones altas de anticuerpos comprendidas entre 1:5000 y 1:10000 en ratones, en unas semanas. Además, la afinidad de los anticuerpos por el antígeno aumenta significativamente. En el caso de la secuencia amiloide FRHDSGY (SEQ ID NO: 1), el anticuerpo producido por inyección ip o iv de la construcción, solubiliza eficazmente fibras $A\beta_{1-40}$ y fibras $A\beta_{1-42}$, protegiendo células PC12 in vitro contra la apoptosis e inhibición metabólica (reducción con MTT) inducida por fibras $A\beta_{1-42}$ y $A\beta_{1-40}$.

En una realización de la presente invención, se usa la secuencia FRHDSGY (SEQ ID NO: 1) de la proteína amiloide, sin embargo, se puede sustituir por cualquier otra secuencia de proteína amiloide. Los anticuerpos monoclonales obtenidos de ratones inmunizados con la construcción descrita presentan, además de las propiedades in vitro mencionadas antes para los anticuerpos policlonales, actividad biológica en ratones transgénicos FVB APP[V717I] para la enfermedad de Alzheimer humana. En estos ratones se observan niveles significativos de restauración de la memoria y de despertar de la curiosidad. Los mAb no inducen hemorragia en el cerebro de ratones transgénicos inmunizados.

Aunque sin querer estar ligados por la siguiente teoría, basándose en estudios in vitro de la interacción de mAb anti-amiloide (contra la secuencia 1-16, generada por los métodos de la presente invención) principalmente en la solubilización de fibras y espectros de CD, parece que los anticuerpos se unen con preferencia al β -amilode en su conformación de hélice α . Esto explicaría el efecto de solubilización de la fibra amiloide en términos termodinámicos. Puesto que el anticuerpo, al unirse con preferencia a la hélice α , elimina la hélice α del amiloide del equilibrio:



25 aumentando así las cantidades de β -amilode en conformación de lámina β , sufre una transición conformacional a la forma de hélice α soluble con el fin de restablecer el equilibrio. Las observaciones estequiométricas hechas apoyan la idea de que los mAb influyen directamente en el equilibrio de conformaciones.

Como estudió Selkoe (2002), la enfermedad de Alzheimer aparece como un fallo sináptico. En las primeras etapas de la enfermedad, la pérdida de memoria puede originar dicho fallo. Se cree que los oligómeros solubles $A\beta_{1-40}$, por ejemplo, pueden ser capaces de bloquear la sinapsis. Los anticuerpos monoclonales, generados por los métodos de la presente invención, se unen a oligómeros solubles $A\beta_{1-40}$. La medición de la conductividad de la sinapsis en presencia y ausencia de los anticuerpos, permite la determinación de la acción del anticuerpo en la sinapsis, en presencia de oligómeros solubles.

Los autores de la presente invención comprobaron la actividad de una serie de mAb obtenidos con los epítomos tales como $A\beta_{4-11}$ (SEQ ID NO: 2), $A\beta_{22-35}$ (SEQ ID NO: 3), y AP_{29-40} (SEQ ID NO: 4) incluidos en una construcción supramolecular (véase la figura 5). Se determinó que la secuencia 4-11 era el epítomo para el mAb producido por el antígeno $A\beta_{1-16}$ palmitoilado (SEQ ID NO: 5).

De acuerdo con los métodos de la presente invención, se usaron péptidos nuevos y modificados de forma única con el fin de producir mAb:

40 Restos 22-35: EDVGSNKGAIIGLM (SEQ ID NO: 3)

Se ha encontrado que las uniones entre los dominios extracelular y transmembrana (TM) son dirigidas por anticuerpos inhibidores (tales como anticuerpos anti-HER2/neu Herceptin-Trastuzumab), y en proteínas de TM de multiexpansión, para formar bolsillos que son dirigidos por inhibidores de peso molecular pequeño (Dragic et al., 2000). Aunque sin querer estar ligados por la siguiente teoría, es probable que esta secuencia sea crucial para la capacidad de oligomerización de $A\beta_{1-42}$ y $A\beta_{1-40}$, ya que representa la transición entre regiones polares e hidrófobas (en la que la frase "secuencia extracelular" se usa para referirse a las secuencia extracelulares en la secuencia amiloidogénica $A\beta_{1-42}$). La secuencia contiene los dos primeros motivos GXXXGXXXG de las secuencias $A\beta_{1-42}$ y $A\beta_{1-40}$. GXXXG son inductores clave de la oligomerización de secuencias hidrófobas (Russ y Engelmann, 2000). Es interesante que se predice que el primer motivo GXXXG es extracelular, mientras que los dos siguientes se predice que están situados en la membrana. Sin querer estar ligados por la teoría, se puede suponer, por analogía, que la oligomerización de los péptidos $A\beta$ es provocada específicamente por los motivos GXXXG.

Restos 29-40: GAIIGLMVGGW (SEQ ID NO: 4)

La secuencia hidrófoba de $A\beta_{1-42}$ y $A\beta_{1-40}$ contiene el motivo GXXXGXXXGG, que se ha encontrado que induce una fuerte oligomerización de las secuencias hidrófobas (Eilers et al., 2002; Leeds et al., 2001; Lemmon et al., 1994; Russ y Engelmann, 1999; Russ y Engelmann, 2000; Smith y Bormann, 1995). Este motivo se ve como un objetivo principal para los enfoques terapéuticos, puesto que puede tener una función principal en todos los procesos

- patógenos que conducen a la formación, oligomerización y acumulación de A β ₁₋₄₂ y A β ₁₋₄₀. En la secuencia intacta de la APP, es probable que este motivo termine la secuencia en la dirección secuencia abajo que necesitará para el desplegado para el procesamiento por la γ -secretasa, como se muestra para la escisión de SREBP (Ye et al., 2000). Esta secuencia no ha sido identificada previamente por nadie como importante para la oligomerización del amiloide.
- 5 Como se enseña en la presente memoria, los antígenos supramoleculares modificados (preferiblemente pegilados) de la presente invención tienen mayor antigenicidad y los anticuerpos producidos por estos tienen mayores afinidades. Además de A β ₁₋₁₆, las construcciones supramoleculares de la presente invención también incluyen péptidos representados por A β ₄₋₁₁ (SEQ ID NO: 2), A β ₂₂₋₃₅ (SEQ ID NO: 3), A β ₂₉₋₄₀ (SEQ ID NO: 4) para usar en vacunas.
- 10 Las metodologías para la monopegilación de péptidos en la posición N- α son conocidas y ampliamente usadas. La monopegilación específica de sitio en restos de aminoácidos internos, N- o C-terminales de péptidos de tamaño medio también se ha descrito siguiendo los procedimientos de fase sólida o injerto de péptido. Sin embargo, se ha mostrado que en los procedimientos sintéticos de fase sólida para péptidos dipegilados están muy obstaculizados por el impedimento estérico y al empezar este proyecto no se habían descrito metodologías sintéticas eficaces para dichos compuestos. Además, no se han descrito previamente péptidos derivatizados de forma específica del sitio en el extremo N y C tanto con un resto de PEG como de lípido. En la presente memoria, los autores de la presente invención describen una nueva metodología para la síntesis de dichos conjugados de péptidos A β .
- 15 Para llegar a la presente invención se intentaron varios procedimientos, la mayoría de los cuales no tuvieron éxito. Por ejemplo, el procedimiento inicial para la síntesis se centraba en el injerto en resina de conjugados de lípido-PEG que contenían grupos amino distales, en los péptidos con la cadena lateral protegida (A β ₄₋₁₁, 1-16, 22-35 y 29-40) que contenían restos de ácido glutámico terminales. No se observaron productos de acoplamiento en una amplia variedad de condiciones de reacción. Como se describe en el ejemplo 2 y se muestra en la figura 5, las construcciones supramoleculares descritas en la presente memoria se sintetizaron en general usando protecciones Fmoc/tBu de las cadenas laterales de los aminoácidos.
- 20 Este nuevo procedimiento para la síntesis de antígenos β -amiloide con lípido-PEG N y C-terminales usando péptidos protegidos, se puede aplicar a una amplia variedad de secuencias de péptidos incluyendo por ejemplo la proteína glicoproteína P de resistencia a múltiples fármacos.
- En un esfuerzo de evaluar la eficacia de los péptidos antigénicos descritos en la presente memoria, se llevaron a cabo experimentos para comparar la inmunogenicidad de antígenos PEGilados y palmitoilados usando ensayos ELISA y de desagregación (véase el ejemplo B y la figura 7). Los datos de ELISA mostraron que PEG-A β ₁₋₁₆ liposómico es significativamente más inmunogénico que A β ₁₋₁₆ palmitoilado. El ALUM adicional no potenciaba la inmunogenicidad de PEG-A β ₁₋₁₆ en los ratones. La respuesta de anticuerpos inducida por PEG-A β ₄₋₁₁ era más lenta en comparación con PEG-A β ₁₋₁₆.
- 30 Por lo tanto, en resumen, se proporcionan nuevos anticuerpos monoclonales contra antígenos supramoleculares que exponen diferentes secuencias de amiloide. En particular, se diseñaron rutas sintéticas originales con el fin de unir covalentemente dos cadenas de polietilenglicol (n=70) a secuencias de amiloide seleccionadas. En el extremo libre de la cadena de PEG se unió covalentemente fosfatidiletanolamina. Sin querer estar ligado por la siguiente teoría, se cree que su función es anclar la secuencia amiloide pegilada a la bicapa de liposomas. En la presente memoria se muestra que la pegilación aumenta la inmunogenicidad de los antígenos comparado con la palmitoilación.
- 35 Actualmente se están llevando a cabo en el laboratorio de los autores de la intención estudios de afinidad, determinación de epítomos, inducción de transición conformacional por estos anticuerpos monoclonales. La metodología de modificación única de la presente invención se puede aplicar a una variedad de péptidos y finalmente se puede usar en formulaciones terapéuticas y vacunas para enfermedades y trastornos incluyendo, pero sin limitar, la enfermedad de Alzheimer, cáncer y enfermedades infecciosas.
- 40 Como se describe en la presente memoria, las construcciones antigénicas supramoleculares de la presente invención comprenden péptidos modificados para potenciar el efecto antigénico, en el que dichos péptidos son modificados por pegilación (usando polietilenglicol o polietilenglicol modificado), o modificados por otros métodos tales como con ácido palmítico, poliaminoácidos (p. ej., poliglicina, polihistidina), polisacáridos (p. ej., poli(ácido galacturónico), poli(ácido láctico) poliglicólido, quitina, chitosán), polímeros sintéticos (poliamidas, poliuretanos, poliésteres) o copolímeros (p. ej., poli(ácido metacrílico) y N-(2-hidroxi)propilmetacrilamida) y similares. Para la intervención terapéutica en trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Alzheimer, la presente invención comprende la modificación de péptidos beta amiloide.
- 45
- 50

Resistencia 1 a múltiples fármacos (MDR1) en células cancerosas

- 55 La resistencia 1 a múltiples fármacos en células cancerosas es producida por el exceso de expresión de la glicoproteína P (P₁₇₀), una bomba de membrana que expulsa una gran variedad de agentes quimioterapéuticos no relacionados de las células cancerosas.

La inmunización con secuencias extracelulares palmitoiladas de P₁₇₀, reconstituidas en liposomas, conduce a la restauración del fenotipo sensible in vitro en células de leucemia de ratón MDR1 L₁₂₁₀ (3). Se han obtenido

resultados adicionales in vivo (Madoulet, Tosi, Nicolau et al., 2002, resultados no publicados) que indican un aumento de 70% de la semivida de supervivencia en ratones inmunizados, inoculados con células cancerosas MDR, sometidos a quimioterapia.

5 En la presente memoria se muestra que un antígeno que consiste en las secuencias extracelulares 1, 4 y 6 de P₁₇₀, construido de acuerdo con el método de la presente invención, es mucho más eficaz en la producción de anticuerpos que invierten en gran medida el fenotipo de MDR en el fenotipo sensible in vitro e in vivo.

10 Se sintetizaron los péptidos correspondientes a los bucles extracelulares 1, 4 y 6 de P₁₇₀ y después se unieron a lisinas pegiladas, una en cada extremo, que a su vez se unieron covalentemente a una molécula de dioleilfosfatidiletanolamina en cada extremo. Se puede usar cualquier ácido graso, mirístico, palmítico, esteárico o ácidos grasos poliinsaturados.

Estas 3 construcciones se reconstituyeron en liposomas que consistían en PC-PEA-PG-Colesterol (o cualquier otra combinación de fosfolípido y colesterol). Se añadió lípido A en una concentración de 40 µg/µmol de fosfolípidos. La relación de péptido:fosfolípido era 1:200 (se pueden usar otras relaciones).

15 La longitud de las cadenas de polietilenglicol variaba: cuanto más larga es la secuencia peptídica, mayor tiene que ser el número de moléculas de PEG en la cadena. Para las 3 secuencias usadas, la longitud de la cadena de PEG variaba de 10 a 5000. Se pueden usar otras longitudes de cadenas. La figura 3 proporciona un esquema representativo que muestra un antígeno P₁₇₀ múltiple.

La inoculación ip de este antígeno, seguida de 3 refuerzos en intervalos de 2 semanas produjo valoraciones altas de anticuerpos anti-P₁₇₀ (1:5000-1:10000) capaces de bloquear la actividad de bomba de P₁₇₀ in vitro e in vivo.

20 *Enfermedades priónicas*

Los priones causan enfermedades neurodegenerativas tales como la encefalopatía espongiforme ovina en ovejas, encefalopatía espongiforme bovina en el ganado y enfermedad de Creutzfeldt-Jacob en seres humanos. El único componente conocido de la partícula es la isoforma Scrapie de la proteína, PrP^{Sc}. Aunque los priones se multiplican, no hay pruebas de que contengan ácido nucleico. PrP^{Sc} deriva de la proteína celular no infecciosa PrP^C por un proceso postraducciona

25 La proteína Scrapie, PrP^{Sc}, tiene una función crítica en la degeneración neuronal y durante el desarrollo de la enfermedad sufre una transición de 3 etapas como sigue: PrP^C (isoforma celular normal de la proteína) - PrP^{Sc} forma infecciosa (isoforma Scrapie de la proteína) - proteína PrP²⁷⁻³⁰. Dicha cascada de sucesos se produce durante el desarrollo de la enfermedad de Creutzfeldt - Jacob (CJD), Kuru, síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS), insomnio familiar letal en el hombre, encefalopatía espongiforme en ovejas y cabras, encefalopatía en el visón y encefalopatía espongiforme bovina en el ganado.

30 La proteína celular no tóxica (PrP^C es una sialoglicoproteína de PM 33-35 K que es expresada predominantemente en las neuronas. En las enfermedades mencionadas antes, la PrP^C se convierte en la forma alterada (PrP^{Sc}), que se puede distinguir de su homóloga normal por su resistencia relativa a la digestión por proteasas. La PrP^{Sc} se acumula en el sistema nervioso central de los animales e individuos afectados y su núcleo resistente a proteasa se agrega extracelularmente. La base molecular de la patogénesis no se entiende.

Se hicieron observaciones muy interesantes en relación con la neurotoxicidad de un fragmento de la proteína, que pueden tener influencia en la comprensión del mecanismo de degeneración de células nerviosas que se produce en las encefalopatías relacionadas.

40 Basándose en la observación de que el fragmento β-amiloide responsable de la deposición extracelular de fibrillas y placa de amiloide en la enfermedad de Alzheimer es neurotóxico, se planteó la hipótesis de que la muerte neuronal en encefalopatías relacionadas se puede deber a efectos tóxicos de acumulación extracelular anómala de PrP^{Sc} y/o sus productos de degradación.

45 Se usaron péptidos sintéticos, homólogos de diferentes segmentos de PrP^{Sc} para investigar su influencia en la viabilidad de las neuronas primarias del hipocampo de rata (figura 4).

Los autores de la presente invención demostraron que la muerte neuronal se produce por la exposición crónica de cultivos de neuronas primarias de hipocampo de rata a concentraciones micromolares de un péptido que corresponde a los restos 106-126 de la secuencia de aminoácidos deducida del ADNc de PrP^C humana, de una forma dependiente de la concentración (ejemplo 1).

50 Como se detalla en el ejemplo 1, los autores de la invención mostraron que la muerte neuronal inducida por PrP^{Sc} 106-126 se producía por apoptosis de una forma dependiente de la dosis. En las etapas terminales de las encefalopatías subagudas, tales como la encefalopatía espongiforme ovina, la PrP^{Sc} alcanza concentraciones en todo el cerebro de 10 a 20 veces mayores que la PrP^C, que se asemeja notablemente a los datos listados en la tabla 1 para las 2 concentraciones de PrP^{Sc} 106-126.

El procedimiento de la muerte celular programada por PrP106-126 está asociado, entre otros, a la inducción del gen de mensaje 2 prostático inhibido por testosterona (TRPM-2). Se sabe si la apoptosis es activada in vivo en las encefalopatías relacionadas, pero la expresión del ARNm de TRPM-2 aumenta 10 veces en los hámsteres infectados por la encefalopatía espongiiforme ovina.

- 5 A partir de estos datos, parece que un mecanismo neurotóxico es posiblemente el responsable de la pérdida de células neuronales en las encefalopatías relacionadas y también podría ser importante en la enfermedad de Alzheimer.

El posible mecanismo de esta neurotoxicidad se investigó en un sistema modelo dirigido a detectar y analizar las formaciones de canales iónicos tras la interacción de péptidos o proteínas con bicapas lipídicas.

- 10 El pH bajo que favorece la formación del canal por la PrP106-126, también convierte este péptido de una conformación en hélice α a lámina β . Mientras que la cartografía del péptido de PrP^{Sc} con secuenciación de Edman y espectrometría de masas no puso de manifiesto diferencias entre su secuencia de aminoácidos y la predicha a partir de la secuencia génica de PrP^C; no se encontraron modificaciones químicas que pudieran distinguir PrP^{Sc} de PrP^P; sin embargo, la espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier y la espectroscopía de dicroísmo circular pusieron de manifiesto una diferencia conformacional significativa entre PrP^{Sc} y PrP^P.

La PrP^C es esencialmente hélice α con poco o nada de lámina β , mientras que PrP^{Sc} tiene un alto contenido de lámina β y menos estructura de hélice α .

- 20 La secuencia KTNMKHMAGAAAAGAVVGGGLG (PrP106-126) (SEQ ID NO: 6) no solo es muy hidrófoba, sino que también se convierte a pH bajo en la conformación de lámina β . Además, en disolución puede convertir otros péptidos a la conformación de lámina β .

Basándose en estas observaciones y mediante técnicas desarrolladas por los autores de la invención, se desarrolló una "vacuna" contra las enfermedades produciendo una fuerte respuesta inmunitaria humoral y celular en ratones a PrP106-126 neurotóxica, y después estimulando los ratones inmunizados con extractos de cerebro de ratones con encefalopatía espongiiforme ovina.

- 25 Como en los ejemplos previos, las lisinas pegiladas se unieron covalentemente a cada extremo de la secuencia de PrP106-126. La longitud de la cadena de PEG era 12 - 4000. Las cadenas de PEG se acoplaron cada una a una molécula de fosfatidiletanolamina y se reconstituyeron en liposomas de PG-PEA-cholesterol - lípido A.

- 30 Inyectadas en los ratones, estas construcciones antigénicas supramoleculares produjeron una respuesta inmunitaria humoral fuerte, dando anticuerpos con alta afinidad para la secuencia de PrP106-126, y que tenían efectos solubilizantes en esta.

Debe entenderse que lo anterior se refiere solo a realizaciones preferidas de la presente invención, y que se pueden hacer numerosas modificaciones o alteraciones de las mismas sin salirse del alcance de la invención como se expone en las reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLO 1

- 35 Los autores de la presente invención demostraron que la muerte neuronal se produce por la exposición crónica de cultivos primarios hipocámpicos de rata a concentraciones micromolares de un péptido que corresponde a los restos 106-126 de la secuencia de aminoácidos deducida del ADNc de PrP^C humana, de una forma dependiente de la concentración. Los datos se muestran en la tabla 1.

Tabla 1

Tratamiento crónico de neuronas de hipocampo durante 9 días		
Péptido	muerte celular % 20 μ m	80 μ m
PrP 106-126	18 \pm 8	100 \pm 8
PrP 57-64	0 \pm 5	3 \pm 4
PrP 89-106	5 \pm 2	2 \pm 6
PrP 106-114	0 \pm 3	12 \pm 6
PrP 127-135	3 \pm 6	15 \pm 9
PrP 127-147	1 \pm 7	18 \pm 7
PrP 106-126 desordenado	3 \pm 2	8 \pm 3

- 40 Los datos son las medias \pm E.T. de 6-10 determinaciones y están normalizados respecto al efecto tóxico de PrP106-126 (designado como 100% de respuesta).

Se mostró que la muerte neuronal inducida por PrP106-126 se producía por apoptosis de una forma dependiente de

la dosis. En las etapas terminales de las encefalopatías subagudas, tales como la encefalopatía espongiiforme ovina, PrP^{Sc} alcanza concentraciones en todo el cerebro de 10 a 20 veces mayores que PrP^C, que se asemeja notablemente a los datos listados en la tabla 1 para las 2 concentraciones de PrP106-126.

- 5 El procedimiento de la muerte celular programada por PrP106-126 está asociado, entre otros, a la inducción del gen de mensaje 2 prostático inhibido por testosterona (TRPM-2). Se sabe si la apoptosis es activada in vivo en las encefalopatías relacionadas, pero la expresión del ARNm de TRPM-2 aumenta 10 veces en los hámsteres infectados por la encefalopatía espongiiforme ovina.

EJEMPLO 2

Métodos para hacer construcciones antigénicas supramoleculares

- 10 Las construcciones supramoleculares descritas en la presente memoria se sintetizaron exclusivamente usando protecciones convencionales Fmoc/tBu de las cadenas laterales de los aminoácidos. Los péptidos que se modifican tanto en el extremo C como en el N mediante un resto de PEG-lípido no se han descrito previamente. Típicamente, la pegilación de los péptidos produce mezclas de regioisómeros. Los autores de la invención han demostrado en la presente memoria un método conveniente para la unión específica del sitio de un conjugado de PEG-lípido tanto en
15 el extremo C como en el N de A β usando péptidos parcialmente protegidos.

- Para las secuencias de péptidos que contienen restos de Lys o His internos (4-11, 1-16, 22-35), se añadió una Lys protegida ortogonalmente Lys(ivDde) en cada extremo. Se añadió una Gly adicional al extremo C para facilitar la síntesis. El grupo Fmoc se eliminó con piperidina al 20% en DMF y se N-acetiló usando anhídrido acético. La escisión selectiva de los grupos ivDde se logró con hidrato de hidrazina al 3% en DMF durante 1 h. Se favoreció la
20 resina de 2-clorotritilo frente a la resina de Wang más ampliamente usada, ya que la primera demostró ser mucho más resistente a la hidrazinólisis. Además, la resina de 2-clorotritilo es extremadamente sensible a ácidos y por lo tanto, a diferencia de la resina de Wang, permite el aislamiento de los péptidos protegidos. Realmente, era necesario llevar a cabo la reacción de acoplamiento en la fase de disolución ya que el acoplamiento de la resina-péptido unido al reactivo de lípido pegilado preactivado DSPE-PEG-SPA no dio lugar a ningún producto de acoplamiento. Por lo
25 tanto la escisión selectiva de la resina en condiciones suaves (ácido acético/trifluoroetanol/diclorometano, 1:1:8, 1 h, t.a.) dio los péptidos protegidos internamente (figura 5).

- Los acoplamientos en fase de disolución se lograron con éxito con los péptidos derivados de las secuencias A β ₄₋₁₁ (SEQ ID NO: 2), A β ₁₋₁₆ (SEQ ID NO: 5), A β ₂₂₋₃₅ (SEQ ID NO: 3), a DSPE-PEG-SPA en DMSO y base en exceso (Figura 6). Después las reacciones se inactivaron por la adición de exceso de etanolamina durante 2 h y la disolución se liofilizó. La purificación por HPLC (columna C₄ de fase inversa, semipreparativa) dio entre 50-70% de
30 pureza de los conjugados de PEG-lípido N y C-terminales, cuyas identidades se confirmaron por MALDI (ionización por desorción por láser asistida por matriz). Cada secuencia mostró una variación considerable en la facilidad de la reacción de acoplamiento y las condiciones se ajustaron en consecuencia (temperatura, número de equivalentes molares de DSPE-PEG-SPA, tiempo). La purificación por HPLC resultó excelente para la separación del exceso de
35 DSPE-PEG-SPA del producto deseado, sin embargo, puesto que el primero no muestra afinidad por la columna, la separación de los productos peptídicos con mono-PEG-lípido (tanto N como C-terminal) del producto deseado presentó dificultades. Los intentos de separar estos productos usando cromatografía de exclusión por tamaños también demostraron no ser satisfactorios, seguramente debido a su polidispersidad relativamente grande. No obstante, los autores de la presente invención usaron la cromatografía de intercambio catiónico para separar los
40 productos mono y diacoplados antes de las desprotecciones finales de las cadenas laterales. Las posteriores desprotecciones de las cadenas laterales de los péptidos y la separación del exceso de DSPE-PEG-SPA inactivado permiten aislar los conjugados deseados con mucha mayor pureza.

EJEMPLO 3

Comparación de la inmunogenicidad de antígenos PEGilados y Palmitoilados, ensayos ELISA y de desagregación

- 45 Se prepararon los antígenos liposómicos como se ha descrito antes. Las secuencias de PEG-A β ₁₋₁₆, -A β ₄₋₁₁ y -A β ₂₂₋₃₅ se reconstituyeron en una construcción que consistía en liposomas hechos de dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC), dimiristoil-fosfatidiletanolamina (DMPEA), dimiristoil-fosfatidilglicerol (DMPG) y colesterol (relaciones molares 0,9: 0,1: 0,1: 0,7) que contenían monofosforil-lípido A (fosfolípidos 40 mg/mM).

ELISA

- 50 Los antígenos y la A β ₁₋₁₆ palmitoílada se usaron para la inmunización de ratones C57BL/6 en intervalos de 2 semanas. Se inmunizaron 10-12 animales con cada antígeno. Se recogieron sueros 5 días después de los refuerzos y se llevó a cabo el análisis por ELISA con varias diluciones de los sueros. Los resultados comparativos que muestran la inmunogenicidad de los diferentes antígenos se presentan en la figura 7.

- Los datos de ELISA mostraban que PEG-A β ₁₋₁₆ liposómico es significativamente más inmuno génico que A β ₁₋₁₆ palmitoílado. El ALUM adicional no potenció la inmunogenicidad de A β ₁₋₁₆ en los ratones. La respuesta de anticuerpos inducida por PEG-A β ₄₋₁₁ era más lenta en comparación con PEG-A β ₁₋₁₆.

Ensayos de desagregación

Se usaron 9 sueros (dilución 1:100) de los animales inmunizados con PEG-A β_{4-11} -liposómico en un ensayo en el que se incubaron fibras de A β_{1-42} preformadas con los antisueros. El ensayo se llevó a cabo como se ha descrito (Nicolau et al., 2002).

- 5 Se observó la solubilización de las fibras A β_{1-42} por los diferentes sueros en un tiempo de incubación de 24 h (figura 8). Algunos de los sueros solubilizaron las fibras en una extensión de 75% (sueros de los ratones 5 y 6). Las células de bazo de estos ratones se usaron para la producción de anticuerpos monoclonales.

EJEMPLO 4

Ensayo de solubilización

- 10 A partir de 2 animales inmunizados con A β_{1-16} palmitoilado/liposomas/lípido A, se obtuvieron 25 líquidos sobrenadantes de los clones de hibridoma generados recientemente, que se mostró que eran específicos para los anticuerpos específicos de A β_{1-42} . Se ensayaron en un ensayo de solubilización de acuerdo con métodos y protocolos descritos en PNAS 2002, 99, 2332-2337. Los resultados se resumen en la figura 9.

- 15 Se encontró que los líquidos sobrenadantes de 5 clones de hibridoma eran capaces de solubilizar las fibras de β -amiloide in vitro en una extensión de hasta 75%. Se seleccionaron los dos clones mejores, 15 y 27, para la purificación de los anticuerpos monoclonales. Se usan para posteriores investigaciones como mAb de control positivo in vivo.

EJEMPLO 5

Investigación de la transición de lámina β a hélice α del péptido A β_{1-42} por espectroscopía de RMN de estado sólido.

- 20 Para evitar la pérdida de aminoácidos marcados con ^{13}C , la síntesis de A β_{1-42} por síntesis de péptido con Fmoc se verificó mediante una síntesis de ensayo sin aminoácidos marcados. La identidad del péptido A β_{1-42} obtenido se pudo verificar por espectroscopía de masas MALDI y se pudo establecer un procedimiento de purificación usando HPLC con una columna de fase inversa y un gradiente de acetonitrilo y agua tamponada con amoniaco⁴.

- 25 A la preparación satisfactoria de un protocolo para la síntesis y purificación del péptido β -amiloide le sigue la síntesis del péptido marcado que incluye una valina marcada con ^{13}C en la posición 12 (^{12}val) y una tirosina marcada con ^{13}C en la posición 10 (^{10}tyr).

- 30 El A β_{1-42} marcado se usó para generar fibras incubando la disolución de péptido en tampón PBS durante 1 semana a 37°C. Los espectros de RMN de ^{13}C de las fibras liofilizadas confirmaron la estructura de lámina β y están de acuerdo con los resultados publicados. La incubación de las fibras con anticuerpo específico de A β_{1-16} durante 2 días no mostró un cambio significativo del espectro de ^{13}C . La primera evaluación de las mediciones de RMN indica un cambio en la estructura secundaria (figura 10).

EJEMPLO 6

Anticuerpos producidos por construcciones antigénicas supramoleculares

- 35 *Fabricación de los mAb:* Los antígenos liposómicos se prepararon como se ha descrito (Nicolau et al., 2002, PNAS, 99, 2332-37). Las secuencias PEG-A β_{1-15} , -A β_{1-16} , A β_{4-11} -A β_{22-35} y A β_{29-40} se reconstituyeron en una construcción que consistía en liposomas hechos de dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC), dimiristoil-fosfatidiletanolamina (DMPEA), dimiristoil-fosfatidilglicerol (DMPG) y colesterol (relaciones molares 0,9: 0,1: 0,1: 0,7) que contenían monofosforil-lípido A (fosfolípidos 40 mg/mM). Estos antígenos y A β_{1-16} palmitoilado se usaron para la inmunización de ratones C57BL/6 en intervalos de 2 semanas. Se inmunizaron 10-12 animales con cada antígeno. Después de 3 a 6
40 refuerzos, se seleccionaron para una fusión los ratones con valoraciones terapéuticas (cuando una dilución 1:5.000 de los sueros era positiva en ELISA). La fusión de los linfocitos B de ratón de los bazos se llevó a cabo con la línea celular de mieloma SP2-0. Se seleccionaron los clones de hibridoma que producían IgG y se ensayó su unión específica al péptido A β_{1-42} por ELISA.

- 45 *Caracterización del mAb:* Los ensayos de desagregación, estudios de RMN, mediciones de QELS y SPR se usaron para la caracterización de los mAb. Los mAb mostraron una desagregación de las fibras de amiloide preformadas de hasta 80% (tabla 1). Se observó una transición de lámina β a hélice α inducida por los anticuerpos (figura 11, 12). Las mediciones de dispersión de la luz cuasielástica (QELS) mostraron que la incubación de las fibras de amiloide con los anticuerpos monoclonales producía fibras con un tamaño de 200 nm, (40 -60% de todas las fibras presentes) mientras que el amiloide solo daba agregados muy grandes (>4 μm).

Tabla 1

mAb obtenido por inmunización con PEG-A β ₁₋₁₅ , -A β ₄₋₁₁ y Palin-A β ₁₋₁₆			
Antígeno	Mab/hibridoma	desagregación [%]	constantes de disociación
PEG A β ₁₋₁₅	ET-1H6	75	nd
PEG A β ₁₋₁₅	ET-7E3	55	2×10^{-7}
PEG A β ₄₋₁₁	EN-4H7	80	nd
PEG A β ₄₋₁₁	EN-9H2	35	nd
Palm A β ₁₋₁₆	EJ-1A9	55	8×10^{-8}
Palm A β ₁₋₁₆	EJ-7H3	60	7×10^{-8}
Palm A β ₁₋₁₆	AN9C-E4	60	nd

Estudios de RMN: Con el fin de evaluar el efecto de los mAb en las fibras, se incubó una disolución de fibras A β con el anticuerpo durante 12 días. Se llevaron a cabo mediciones de difusión de espín dirigida por protón (PDSD) para medir un espectro de correlación de ^{13}C - ^{13}C 2D. Las figuras 11-13 proporcionan los datos y análisis de RMN: RMN: espectro de correlación de ^{13}C - ^{13}C de fibras del péptido β -amiloide antes y después de incubación con EN4H7, ET-1H6 o AN9C-E4 durante 12 días (A, B). Columna (D) y una fila (C) extraídas del espectro de correlación. El espectro (- anticuerpo) muestra un espectro de las fibras puras, mientras que (+ anticuerpo) muestra un espectro en presencia del mAb.

Los espectros de ^{13}C de las fibras liofilizadas permiten la asignación de las resonancias. Los valores de los desplazamientos químicos del C $_{\alpha}$ y C $_{\beta}$ de la Val12 y Tyr10 confirman la estructura de lámina β de las fibras puras (figura 11). Los desplazamientos de las resonancias de los núcleos de C $_{\alpha}$ y C $_{\beta}$ de la ^{12}Val indican claramente una transición de la lámina β a la hélice α . Por otra parte, el desplazamiento de la resonancia del C $_{\alpha}$ y C $_{\beta}$ de la Tyr 10 no indica claramente una transición de la estructura secundaria. El comportamiento de la resonancia de la Tyr 10 se puede explicar por un modelo en el que la Tyr10 está en la interfase entre una sección de lámina β y una sección de bucle del péptido A β en fibras de amiloide.

En un segundo experimento, se incubaron fibras enriquecidas en ^{13}C con los anticuerpos EN4H7 y ET1H6 (véase la tabla 1) durante 12 días. Las fibras incubadas presentan desplazamientos de las resonancias del núcleo de C $_{\beta}$ de la ^{12}Val de 32 ppm a 28 ppm, indicando una transición de la lámina β a la hélice α para una fracción significativa del péptido (figura 12 y 13) para ambos anticuerpos. Las resonancias del C $_{\alpha}$ y C $_{\beta}$ para la ^{10}Tyr se hacen anchas en presencia de los anticuerpos. Esto indica una transición a una conformación más bien no estructurada para la posición de la ^{10}Tyr .

EJEMPLO 7

Comparación de la inmunogenicidad de antígenos PEGilados y Palmitoilados ensayados en ELISA

Los datos de ELISA mostraban que PEG-A β ₁₋₁₆ liposómico es más inmunogénico que A β ₁₋₁₆ palmitoilado (figura 14). El ALUM adicional no potenciaba la inmunogenicidad de PEG-A β ₁₋₁₆ en los ratones. Con excepción de la respuesta de anticuerpos inducida por PEG-A β ₄₋₁₁ que era más lenta en comparación con PEG-A β ₁₋₁₆, en general parece que los péptidos pegilados son más inmunogénicos que los péptidos palmitoilados (figura 14).

EJEMPLO 8

Ensayos de comportamiento para evaluar la eficacia de anticuerpos

Con el fin de evaluar la eficacia de los anticuerpos producidos por los métodos descritos en la presente memoria, en concreto producidos por el uso de construcciones antigénicas supramoleculares que comprenden péptidos amiloide modificados (tales como péptidos amiloide pegilados), se tratarán y después se evaluarán los ratones usando los ensayos de comportamiento señalados a continuación.

Laberinto de agua Morris

La piscina (un recipiente circular blanco de 1 m de diámetro) contiene agua a 20°C con dióxido de titanio como aditivo no tóxico e inodoro para esconder la plataforma de escape (1 cm bajo el nivel del agua). Se graba en vídeo el nado de cada ratón y se analiza (Ethovision, Noldus information Technology, Wageningen, Países Bajos). Antes del entrenamiento, cada ratón se pone en la parte superior de la plataforma durante 15 s. Para las pruebas de navegación en el sitio, los ratones se entrenan para localizar la plataforma escondida en 5 bloques de 3 ensayos a lo largo de 3 días consecutivos. Cada ensayo consiste en una prueba de nado forzado de un máximo de 120 s, seguido de 60 s de reposo. Se mide el tiempo que necesita cada ratón para localizar la plataforma. Los 5 ensayos consecutivos dan una curva de aprendizaje.

24 horas después del último entrenamiento, cada animal tiene un ensayo de exploración con la plataforma retirada.

Se deja a los ratones que busquen durante 60 s y se miden el tiempo de búsqueda por cuadrante y los cruces de la posición original de la plataforma.

Los ratones que rehúyen nadar y buscar la plataforma, y en su lugar esperan hasta que el profesional los saque de la piscina, los llamados "flotadores" deben excluirse del análisis.

5 *Campo abierto*

Se usa para la prueba una caja de plexiglás de campo abierto (52x52x40 cm) con paredes verticales negras y un suelo transparente, débilmente iluminado mediante una lámpara puesta debajo de la caja. Se distribuyen diferentes áreas mediante un sistema computarizado (Ethovision, Noldus information Technology, Wageningen, Países Bajos): las esquinas (9 x 9 cm), los 4 lados de la caja (9 cm desde la pared) y el centro de la caja de campo abierto (43 x 43 cm). Se graba en vídeo cada ratón y se analiza la actividad (Ethovision) midiendo la distancia (cm) de la trayectoria, la velocidad (cm/s) del ratón, la duración/tiempo (s) pasado en el centro comparado con el borde (esquinas + lados) y la frecuencia (N) de cruces entre ambas áreas. Cada ratón se pone en el centro de la caja y se deja que explore la caja durante 10 min. Entre pruebas, la caja de campo abierto se limpia y seca antes de introducir un nuevo ratón.

Ensayo de reconocimiento de objeto nuevo

15 Los ratones se familiarizan durante 1 h con una caja de plexiglás de campo abierto (52x52x40 cm) con paredes verticales negras y un suelo transparente, débilmente iluminado mediante una lámpara puesta debajo de la caja. Al día siguiente, los animales se ponen en la misma caja y se someten a un ensayo de adquisición de 10 min. Durante este ensayo los ratones se ponen individualmente en el campo abierto en presencia del objeto A (bola azul o cubo rojo, de tamaños similares de ± 4 cm) y se registra la frecuencia de exploración del objeto A (cuando el hocico de los animales se dirige hacia el objeto a una distancia < 1 cm y los ratones olfatean activamente en la dirección del objeto) ($Frec_{AA}$). Durante un ensayo de retención de 10 min (segundo ensayo) que se realiza 3 h más tarde, se pone un objeto nuevo (objeto B, cubo rojo o bola azul) junto con el objeto familiar (objeto A) en el campo abierto. Se registra la frecuencia con la que el animal explora los dos objetos ($Frec_A$ y $Frec_B$).

25 El índice de reconocimiento (IR) definido como la relación de la frecuencia con la que exploran el nuevo objeto frente a la frecuencia con la que exploran ambos objetos [$Frec_B / (Frec_A + Frec_B) \times 100$] se usa para medir la memoria no espacial. La frecuencia con la que exploran el objeto A durante el ensayo de adquisición se usa para medir la curiosidad.

Referencias:

- 30 1. C. Nicolau, R. Greferath, T.S. Balaban, J. Lazarte y R. Hopkins (2002). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99,2332 - 2337.
2. Fluka AG (2002) nº cat. 79898.
3. P.-F. Tosi, D. Radu, y C. Nicolau (1995)., *Biochem. Biophys. Res. Chem.* 212, 494-500.
4. Fukuda H, Shimizu T, Nakajima M, Mori H, Shirasawa T., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1999; 9: 953-956.
- 35 5. Petkova AT, Ishii Y, Balbach JJ, Antzutkin ON, Leapman RD, Delaglio F, Tycko R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2002; 99: 16742-16747.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> AC Immune
- <120> Métodos y composiciones que comprenden construcciones supramoleculares
- <130> M2468 EP
- 40 <150> US 10/783.975
- <151> 2004-02-20
- <150> US 10/958.211
- <151> 2004-10-04
- <160> 12
- 45 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 7
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 50 <220>
- <223> fragmento de β -amiloide sintético (4-10)
- <400> 1

Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr
1 5

REIVINDICACIONES

- 1.- Una composición que comprende una construcción antigénica, en la que la construcción antigénica comprende
- 5 a) un péptido antigénico o fragmento activo del mismo, en el que el péptido antigénico o fragmento activo del mismo se modifica para tener un polietilenglicol unido covalentemente, uno en cada extremo, y
- b) en el que la construcción antigénica se reconstituye en liposomas; para potenciar la antigenicidad.
- 2.- La composición de la reivindicación 1, que comprende una construcción antigénica en la que la construcción antigénica comprende
- 10 a) un péptido antigénico o fragmento activo del mismo, en el que el péptido antigénico o fragmento activo del mismo se modifica para tener unida covalentemente una lisina pegilada, una en cada extremo, y
- b) en el que la construcción antigénica se reconstituye en liposomas; para potenciar la antigenicidad.
- 3.- La composición de la reivindicación 1 ó 2, en la que la construcción antigénica comprende: una secuencia de péptido, unida covalentemente a lisina pegilada, una en cada extremo; en el que el extremo PEG libre está unido covalentemente a una molécula de fosfatidiletanolamina.
- 15 4.- La composición de la reivindicación 1-3, en la que la construcción antigénica se reconstituye en liposomas que consisten en fosfolípidos y colesterol.
- 5.- La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el péptido antigénico comprende un péptido amiloide.
- 6.- La composición de la reivindicación 5, en la que el péptido amiloide comprende:
- 20 (a) PileArgHisAspSerGlyTyr;
 (b) PheArgHisAspSerGlyTyrGlu (A β 4-11);
 (c) GluAspValGlySerAsnLysGlyAlalalleGlyLeuMet (A β 22-35);
 (d) GlyAlalalleGlyLeuMetValGlyGlyValVal (A β 29-40); o
 (e) AspAlaGluPheArgHisAspSerGlyTyrGluValHisHisGlnLys (A β 1-16)
- 25 7.- La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el péptido antigénico es una proteína priónica que comprende
- LysThrAsnMetLysHisMetAlaGlyAlaAlaAlaAlaGlyAlaValValGlyGlyLeuGly
- 8.- La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que el polietilenglicol tiene una longitud de n=8-5000.
- 30 9.- La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que además comprende un vehículo farmacéutico.
- 10.- La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para usar en la reducción y prevención de la aparición de trastornos neurológicos.
- 11.- La composición de la reivindicación 10, en la que dicho trastorno comprende la enfermedad de Alzheimer.
- 12.- La composición de la reivindicación 10, en la que dicho trastorno comprende enfermedades priónicas.
- 35 13.- La composición de la reivindicación 1 ó 2, para usar en el tratamiento del cáncer resistente a múltiples fármacos.
- 14.- La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para inducir una respuesta inmunitaria en seres humanos o animales.
- 40 15.- La composición de la reivindicación 14, en la que dicha respuesta inmunitaria se produce contra manifestaciones patológicas en seres humanos o animales que comprenden anomalías tales como placas amiloides.
- 16.- Uso de una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para preparar un medicamento para usar para reducir y prevenir la aparición de
- a) un trastorno neurológico; o
- 45 b) trastornos que comprenden la enfermedad de Alzheimer, cáncer resistente a múltiples fármacos o enfermedad priónica.

Figura 1

Antígeno β -amiloide químicamente modificado

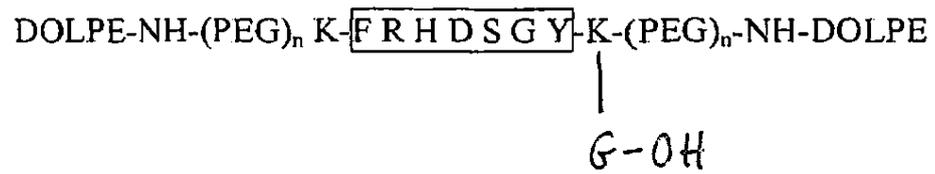


Figura 2

Antígeno amiloide químicamente modificado, reconstituido en liposoma

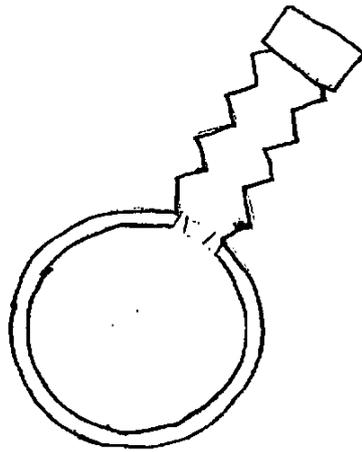


Figura 3
Antígeno P₁₇₀ múltiple

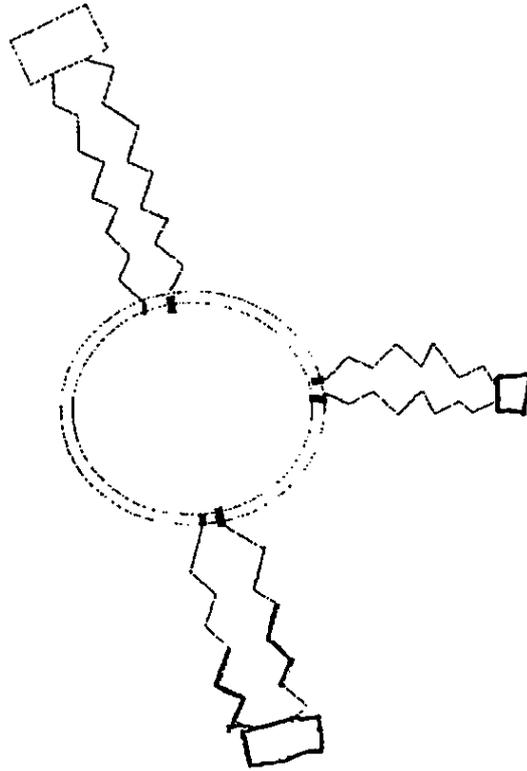


Figura 4
Péptidos sintéticos usados para este estudio



Fig. 4: Péptidos sintéticos usados para este estudio (código de aminoácidos de una letra)

a. PrP 57-64. WGQPHGGG b. PrP 89-106.
WGQGGGTHSQWNKPSKPK: c. PrP 106-140.
KTNMKHMAG: d. PrP 106-126.
KTNMKHMAGAAAAGAVVGGLG: e. PrP
127-135. GYMLGSAMS: f. PrP 127-147.
GYMLGSAMSRPIIIFGSDYED: g. PrP 106-
126 desordenado .
NGAKALMGGHGATKVMVGAAA: a-f.

secuencia de aminoácidos de péptidos homólogos de diferentes fragmentos de la proteína amiloide purificada de cerebros GSS (restos 58 a ~ 150)¹². g. Versión desordenada de PrP 106-126. El octapéptido "a" se repite 4 ó 5 veces en la secuencia de PrP.

A β 1-16

Ac-Lys-Asp(OtBu)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Arg(Pbf)-His(Trt)-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Gly-Tyr(tBu)-
Glu(OtBu)-Val-His(Trt)-His(Trt)-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Lys-Gly-OH

A β 22-35

Ac-Lys-Glu(OtBu)-Asp(OtBu)-Val-Gly-Ser(tBu)-Asn(Trt)-Lys(Boc)-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-
Met-Lys-Gly-OH

A β 29-40

Ac-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Lys-Gly-OH

FIGURA 5

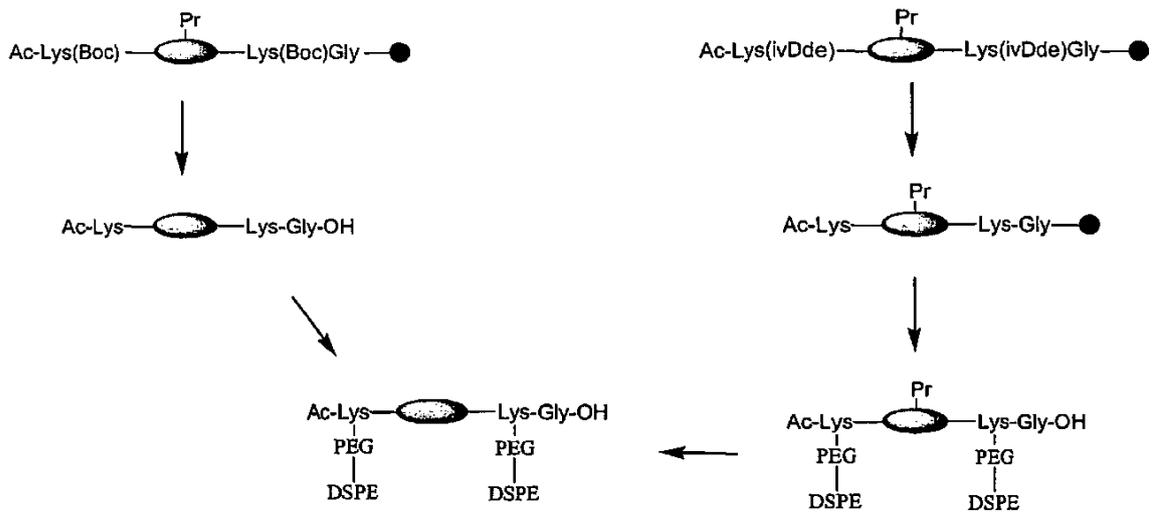


FIGURA 6

FIGURA 7

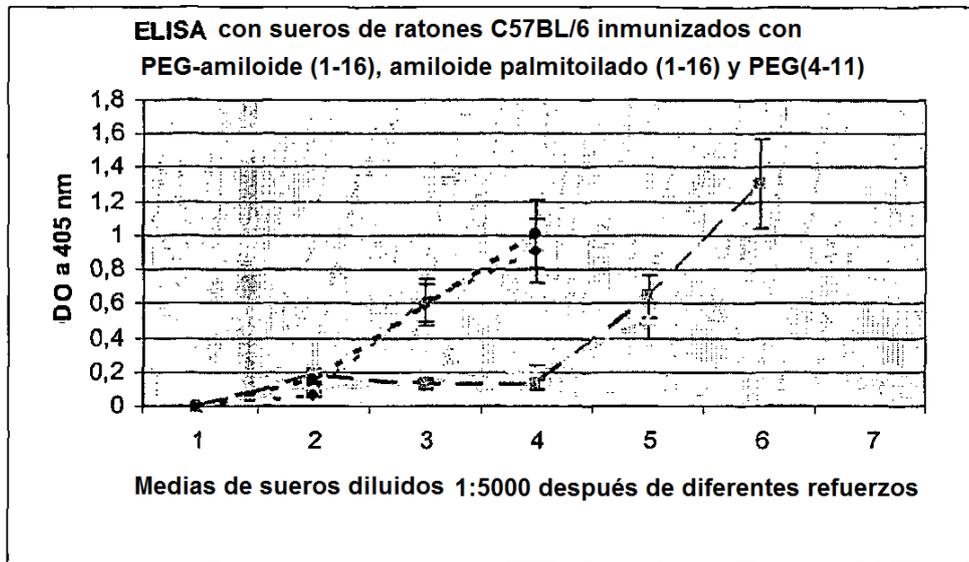


Figura 7: ELISA realizado con sueros diluidos 1:5000 de ratones C57BL/6 inmunizados con amiloide pegilado/liposomas/lípido A. PEG-A β_{1-16} (---negro), PEG-A β_{1-16} + ALUM (- -gris), PEG-A β_{4-11} (—gris). Se muestra la media de los valores de 10 ratones por antígeno; la media de los valores de 2 ratones para A β_{1-16} + ALUM. Como control se muestran los valores medios de 12 animales a los que se inyectó A β_{1-16} palmitoilado (---gris brillante) (publicado en 2002).

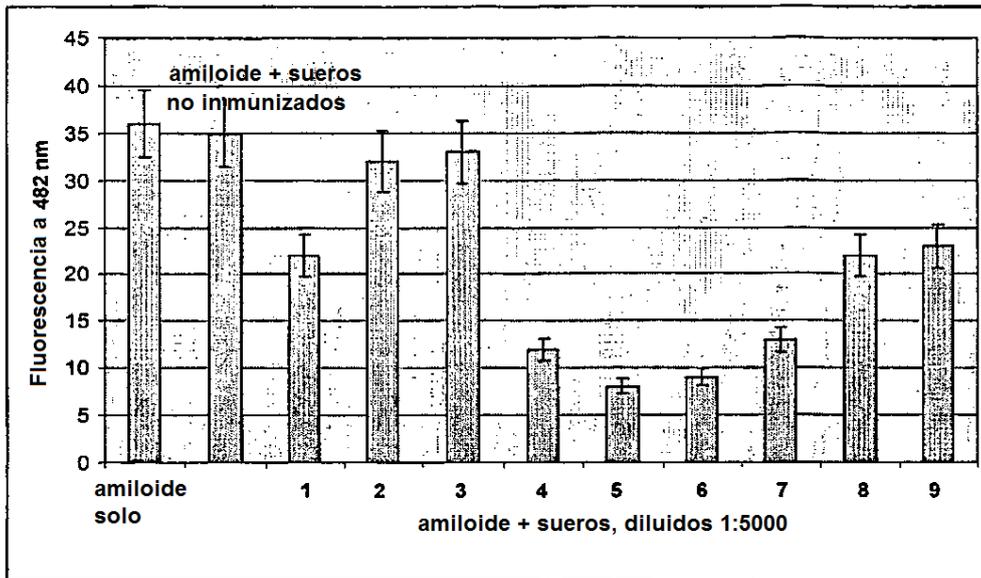


Figura 8

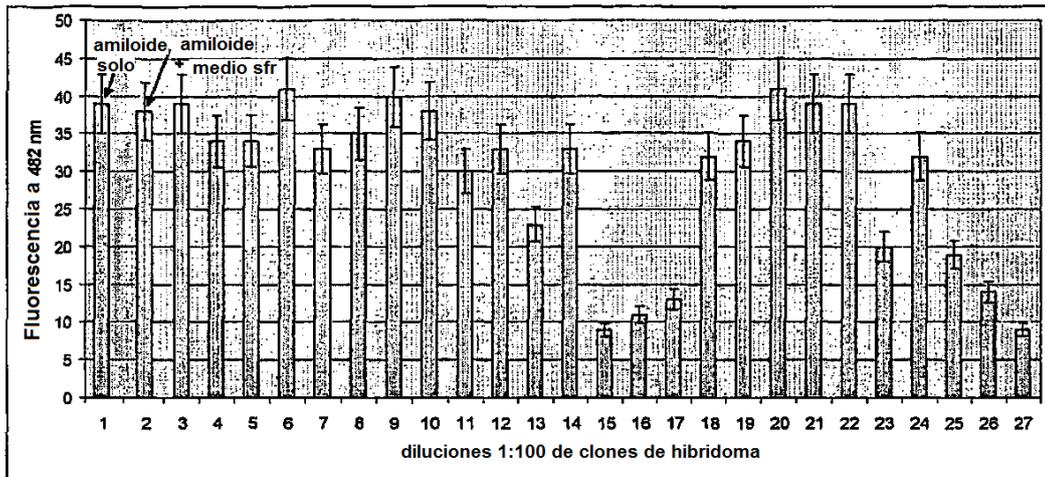


Figura 9

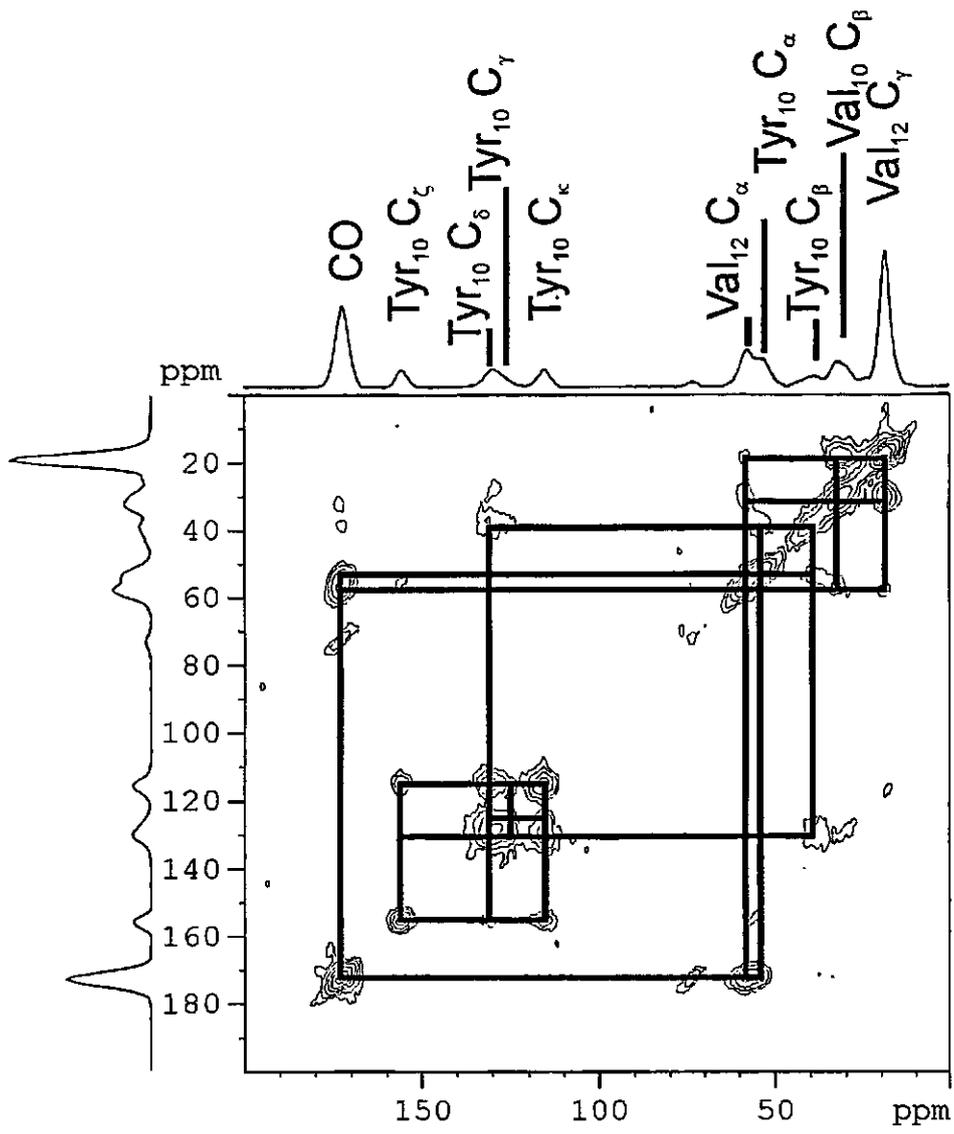


Figura 10

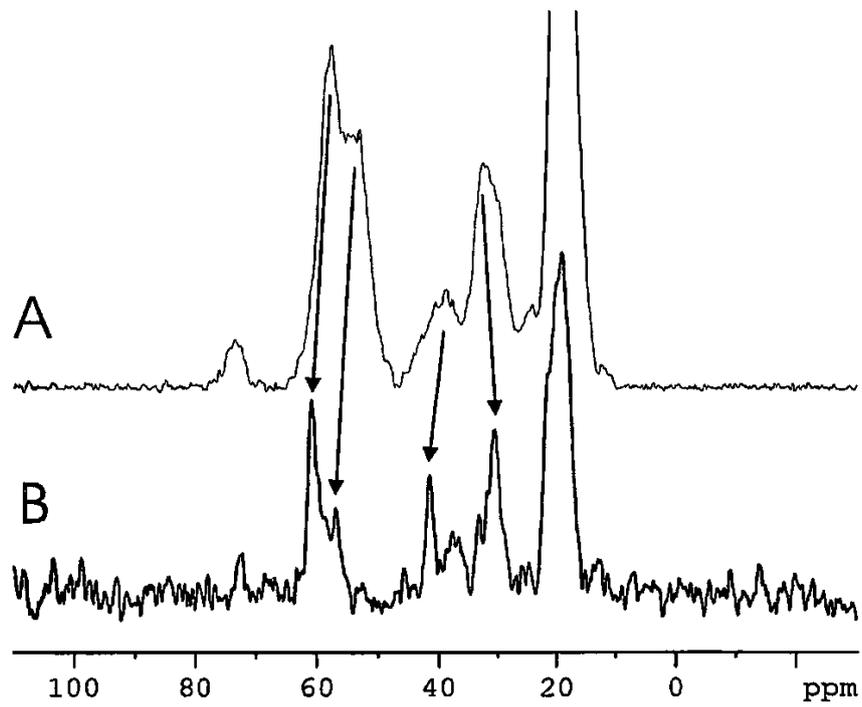
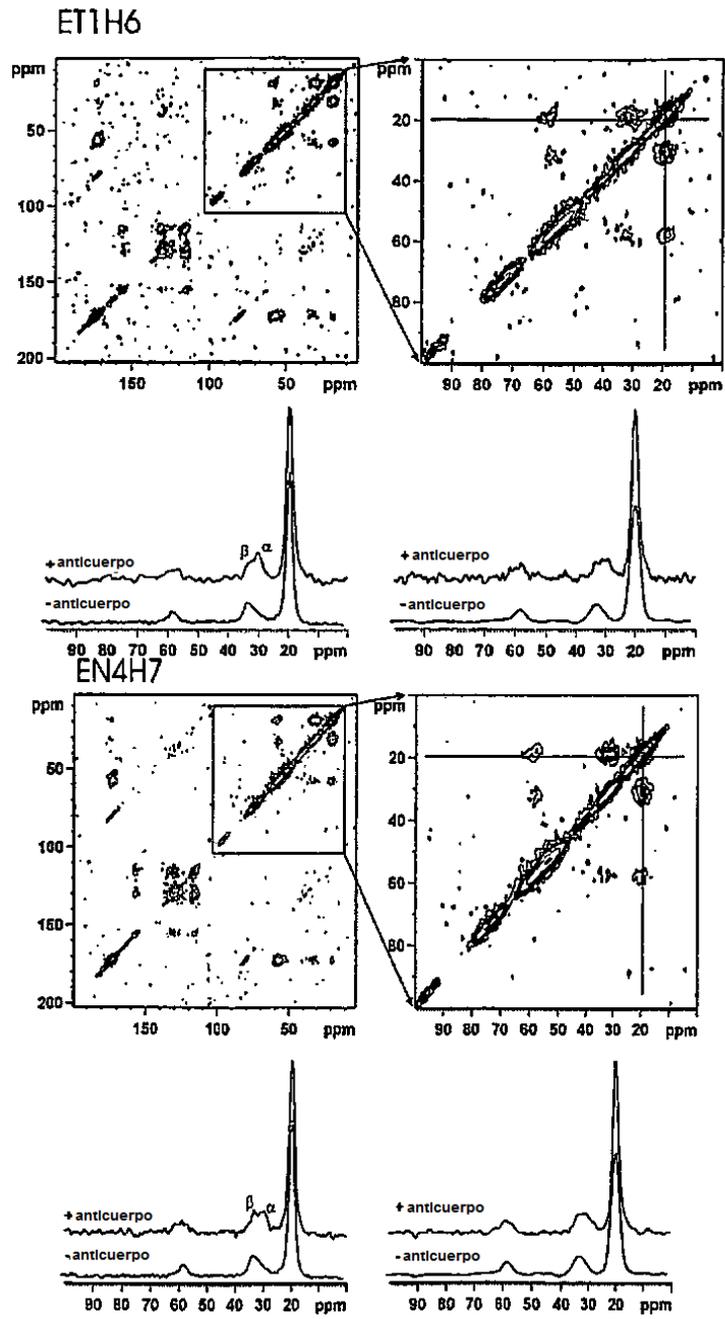


Figura 11

	Fibras de péptido β -amiloide	Fibras de péptido β -amiloide después de 12 días de incubación con el anticuerpo
$^{12}\text{Val C}_\alpha$	58 ppm	60 ppm
$^{12}\text{Val C}_\beta$	33 ppm	30 ppm
$^{10}\text{Tyr C}_\alpha$	54 ppm	56 ppm
$^{10}\text{Tyr C}_\beta$	38 ppm	41 ppm

FIGURA 12



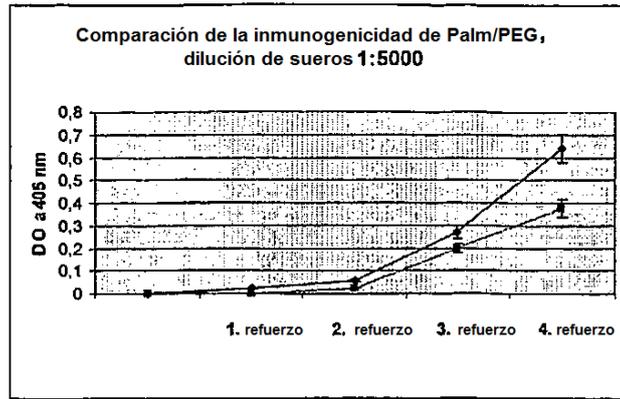


Figura 13: rosa: Palm.-A β_{1-16} , azul: PEG-A β_{1-16}

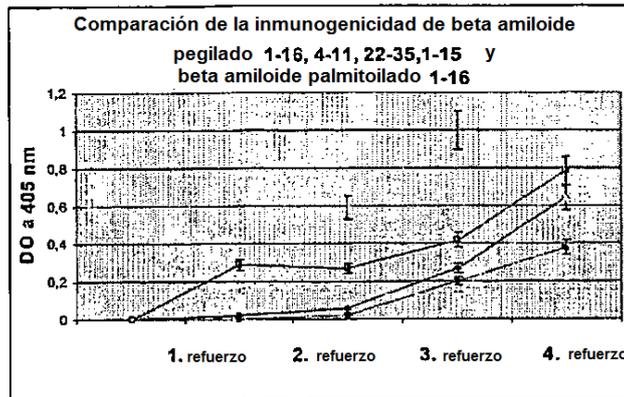


Figura 14: rosa: Palm.-Aβ₁₋₁₆, azul: PEG-Aβ₁₋₁₆,
 turquesa: PEG-Aβ₁₋₁₅, violeta: PEG-Aβ₂₂₋₃₅,
 amarillo: PEG-Aβ₄₋₁₁.