

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 247**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/00** (2006.01)

**A61K 38/04** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61K 39/40** (2006.01)

**A61K 39/42** (2006.01)

**C07K 16/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03744143 .3**

96 Fecha de presentación: **04.03.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1480666**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.2004**

54 Título: **Compuesto inmunizante y método para inducir una respuesta inmune contra el sitio de escisión de la beta-secretasa de la proteína precursora de amiloide**

30 Prioridad:

**05.03.2002 US 361344 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

**07.12.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

**07.12.2012**

73 Titular/es:

**RAMOT AT TEL-AVIV UNIVERSITY LTD. (100.0%)  
P.O. BOX 39296  
61392 TEL AVIV, IL**

72 Inventor/es:

**SOLOMON, BEKA**

74 Agente/Representante:

**TRIGO PECES, José Ramón**

ES 2 392 247 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

Compuesto inmunizante y método para inducir una respuesta inmune contra el sitio de escisión de la  $\beta$ -secretasa de la proteína precursora de amiloide.

5

**Sector de la técnica**

[0001] La presente invención hace referencia a compuesto inmunizante y a un método para inducir una respuesta inmune contra el sitio de escisión de la  $\beta$ -secretasa de la proteína precursora de amiloide. La presente invención también hace referencia a anticuerpos cultivados o generados contra el sitio de escisión de la  $\beta$ -secretasa de la proteína precursora de amiloide y los anticuerpos a ser utilizados en inmunización pasiva.

10

**Estado de la técnica**

15

**Proteína Precursora de Amiloide y  $\beta$ -Secretasa:**

[0002] Se considera que la deposición extracelular de péptidos amiloides cortos en los cerebros de pacientes es un acontecimiento fundamental en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. Las pruebas de que los amiloides pueden desempeñar un papel importante en la patogénesis inicial de la EA proceden principalmente de estudios realizados en individuos afectados por la forma familiar de Alzheimer (EFA) o por el síndrome de Down. La generación de péptidos  $\beta$ -amiloides ( $A\beta$ ) se produce a través de una cascada regulada de escisiones en su proteína precursora,  $A\beta$ PP (proteína precursora de amiloide). Al menos tres enzimas son responsables de la proteólisis de la  $A\beta$ PP y han sido provisionalmente denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$  secretasa. La reciente identificación de varias de estas secretasas es un salto importante en la comprensión de cómo regulan estas secretasas la formación de péptidos de amiloide. Una de las principales metas terapéuticas es la inhibición de secretasas que producen  $A\beta$  a partir de la gran proteína precursora. La especificidad teórica y tratabilidad de las proteasas hacen pensar que debería ser posible generar inhibidores de proteasa específicos de la secretasa que penetren en la barrera sanguínea cerebral. Ya se están realizando muchos estudios que utilizan los nuevos conocimientos de la capacidad de la enzima  $\beta$ -secretasa (BACE) para identificar inhibidores mediante métodos de cribado o de diseño racional (Patente U.S. Nos. 5,744,346; 5,942,400; 6,221,645 B1; 6,313,268 B1; y solicitudes PCT publicadas WO 00/47618, WO 98/21589, y WO 96/40885). En este momento, no existen pruebas de funciones adicionales del  $A\beta$ , por lo que no existen preocupaciones serias por la reducción de este metabolito. Tanto la  $\beta$ - y la  $\gamma$ - secretasas están presentes en muchas células diferentes del cuerpo y es razonable suponer que tienen substratos además de la  $A\beta$ PP. Por consiguiente, la completa inhibición de una de estas enzimas puede tener como resultado problemas de toxicidad, en particular en las condiciones de tratamiento crónico que presumiblemente serían necesarias. A nivel del mRNA, la BACE se expresa ampliamente en el cerebro humano. La expresión es también elevada en el páncreas, aunque la actividad enzimática en este tejido es baja. Aparte de la escisión de la  $A\beta$ PP, no se conoce si BACE posee otra actividad y por lo tanto es demasiado pronto para predecir qué toxicidad pueden tener los inhibidores de  $\beta$ -secretasa.

20

25

30

35

40

[0003] El procesado proteolítico de la proteína precursora de amiloide ( $A\beta$ PP) genera el péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) que está considerado ser la causa de la patología y subsiguiente declive cognitivo en la enfermedad de Alzheimer. Para comenzar la formación de  $A\beta$ , la  $\beta$ -secretasa escinde la  $A\beta$ PP en el N-terminal de  $A\beta$  para liberar APPs $\beta$ , un fragmento N-terminal aproximadamente de 100-kD soluble, y C99, un fragmento C-terminal 12-kD que permanece unido a la membrana. El sitio exacto de la escisión de la  $\beta$ -secretasa ha sido determinado (Fig. 1). La placa de amiloides  $A\beta$  comienza en Asp1 y este sitio de escisión es por lo tanto del mayor interés. La escisión por  $\beta$ -secretasa en el término amino de la secuencia del péptido  $\beta$ -amiloide, entre los residuos 671 y 672 de  $A\beta$ PP, conduce a la generación y liberación extracelular de la  $A\beta$ PP soluble  $\beta$ -escindida, y su correspondiente fragmento carboxi-terminal asociado a células.

45

50

[0004] WO 99/27944; Morgan et al (en "A $\beta$  peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease", Nature, vol. 408, 28 Diciembre 2000, páginas 982 - 985); y DeMattos et al (en "Peripheral anti-A $\beta$  antibody alters CNS and plasma A $\beta$  clearance and decreases brain A $\beta$  burden in a mouse model of Alzheimer's disease", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 98, no. 15, 17 Julio 2001, páginas 8850-8855) describen la inmunización con el péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), o partes del mismo, a fin de reducir la deposición de amiloides.

55

[0005] La Patente US 5,229,490 describe múltiples sistemas de péptidos de antígenos que proporcionan una elevada concentración de antígenos en un bajo volumen molecular.

60

[0006] Se demostró que una de las familias de la EA familiar tiene una mutación de la  $A\beta$ PP que coincidía con el sitio de escisión previsto de la  $\beta$ -secretasa. Esta doble mutación, identificada por primera vez en un linaje sueco, resultó producir también un exceso de péptidos  $\beta$ -amiloides con relación a la secuencia salvaje cuando fue transfecionada en células, haciendo pensar que era un mejor sustrato para la enzima  $\beta$ -secretasa. Esta predicción ha sido recientemente considerada verdadera. La sustitución de metionina por leucina en la posición P1 de APP, encontrada en la mutación de la EA familiar "sueca" que provoca una aparición temprana de la EA, mejora espectacularmente la escisión de  $\beta$ -secretasa, pero muchas otras sustituciones (por ejemplo, Metionina por Valina) reducen la escisión de  $\beta$ -secretasa. Estos hallazgos demostraron la presencia de una actividad de  $\beta$ -secretasa

65

responsable de una escisión que liberaba el N-terminal de péptido A $\beta$  y mostraron que el proceso era secretor en lugar de lisosómico, la hipótesis sostenida en aquel momento.

**Barrera cerebral sanguínea:**

5

[0007] La barrera cerebral sanguínea (BBB) (Johansson, 1992; Ermisch, 1992; Schlosshauer, 1993) está formada por una monocapa de células endoteliales microvasculares estrechamente conectadas con cargas aniónicas. Esta capa separa dos compartimentos que contienen fluidos: el plasma sanguíneo (BP) y el fluido extracelular (ECF) del parénquima cerebral, y está rodeado por células astrogiales del cerebro. Una de las principales funciones de la BBB es regular la transferencia de componentes entre el BP y el ECF. La BBB limita el libre paso de moléculas de agentes de la sangre a las células cerebrales.

10

15

[0008] En general, las grandes moléculas de elevada polaridad, como péptidos, proteínas, (por ejemplo, enzimas, factores de crecimiento y sus conjugados, oligonucleótidos, vectores genéticos y otros) no cruzan la BBB. Por lo tanto, el deficiente suministro de agentes al Sistema Nervioso Central limita la aplicabilidad de dichas macromoléculas para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos y enfermedades neurológicas.

20

[0009] Varios métodos de suministro de agentes terapéuticos al cerebro evitan el SNC. Dichos métodos utilizan inyecciones intratecales, implantes quirúrgicos (Ommaya, 1984 y Patente U.S. No. 5,222,982) e infusión intersticial (Bobo *et al.*, 1994). Estas estrategias suministran un agente al SNC por administración directa al fluido cerebroespinal (CSF) o al parénquima cerebral (ECF).

25

30

[0010] El suministro de medicamentos al sistema nervioso central a través del fluido cerebroespinal se consigue por medio de un dispositivo implantable subduralmente que lleva el nombre de su inventor, el "depósito de Ommaya". El depósito se utiliza fundamentalmente para el suministro localizado postoperatorio de agentes quimioterapéuticos en cánceres. El medicamento se inyecta en el dispositivo y se va liberando posteriormente al fluido cerebroespinal que rodea el cerebro. Puede ser dirigido hacia zonas específicas del tejido cerebral expuesto que luego absorbe el medicamento. Esta absorción es limitada ya que el medicamento no se desplaza libremente. Un dispositivo modificado desarrollado por Ayub Ommaya, en el que el depósito es implantado en la cavidad abdominal y el medicamento inyectado es transportado por fluido cerebroespinal (tomado de y devuelto a la espina dorsal) por todo el espacio ventricular del cerebro, es utilizado para la administración de agentes.

35

40

[0011] La difusión de macromoléculas a diversas áreas del cerebro por liberación mejorada por convección es otro método de administración que evita la BBB. Este método implica: a) crear un gradiente de presión durante la infusión intersticial en sustancia blanca para generar un aumento de flujo a través del intersticio cerebral (la convección complementa la difusión simple); b) mantener el gradiente de presión durante un periodo prolongado de tiempo (24 a 48 horas) para permitir la penetración radial de los compuestos migratorios (como: factores neurotróficos, anticuerpos, factores de crecimiento, vectores genéticos, enzimas, etc.) en la sustancia gris; y c) incrementar las concentraciones de medicamentos en órdenes de magnitud sobre los niveles sistémicos. A través de su infusión directa en el parénquima cerebral, los complejos biomoleculares específicos de la Patente EE UU No. 6,005,004 suministran el agente a células neuronales o gliales, según las necesidades, y serán retenidos por esas células. Además, los complejos específicos para un sitio que contienen medios de internalización o de targeting neuronal son capaces de penetrar la membrana neuronal e internalizar el agente.

45

50

[0012] Otra estrategia para mejorar el suministro del agente al SNC es aumentando la absorción del agente (absorción y transporte) a través de la BBB y su ingesta por las células (Broadwell, 1989; Pardridge *et al.*, 1990; Banks *et al.*, 1992; y Pardridge, editado por Vranic *et al.*, 1991). El paso de agentes a través de la BBB al cerebro puede ser facilitado mejorando o bien la permeabilidad del propio agente o bien alterando las características de la BBB. Por lo tanto, el paso del agente puede ser facilitado incrementando su solubilidad en lípidos del agente a través de la modificación química, y/o mediante su acoplamiento a un portador catiónico, o incluso por su acoplamiento covalente a un vector de péptido capaz de transportar el agente a través de la BBB. Los vectores que transportan péptidos se conocen también como compuestos permeabilizadores de la BBB (Patente U.S. No. 5,268,164).

55

60

65

**Exposición de fagos:**

[0013] Las bibliotecas combinatorias de péptidos de exposición de fagos proporcionan un medio eficaz para estudiar las proteínas: interacciones de proteínas. Esta tecnología se basa en la producción de grupos muy grandes de péptidos aleatorios asociados con sus correspondientes improntas genéticas (Scott *et al.*, 1990; Dower, 1992; Lane *et al.*, 1993; Cortese *et al.*, 1994; Cortese *et al.*, 1995; Cortese *et al.*, 1996). La presentación de los péptidos aleatorios se realiza a menudo construyendo proteínas quiméricas expresadas en la superficie externa de bacteriófagos filamentosos como M13, fd y f1. Esta presentación hace que los repertorios sean susceptibles de ensayos de fijación y de programas de filtrado especializados (denominados ciclos de selección de fagos por afinidad o biopanning (Parmley *et al.*, 1988)) conducentes al aislamiento e identificación por afinidad de péptidos con las propiedades de fijación deseadas. De este modo se han seleccionado de forma eficiente péptidos que se fijan a receptores (Koivunen *et al.*, 1995; Wrighton *et al.*, 1996; Sparks *et al.*, 1994; Rasqualini *et al.*, 1996), enzimas (Matthews *et al.*, 1993; Schmitz *et al.*, 1996) o anticuerpos (Scott *et al.*, 1990; Cwirla *et al.*, 1990; Felici *et al.*, 1991;

Luzzago *et al.*, 1993; Hoess *et al.*, 1993; Bonnycastle *et al.*, 1996).

[0014] Los bacteriófagos filamentosos son bacteriófagos específicos masculinos, no líticos que infectan células *Escherichia coli* que portan un F-episoma (para revisión, ver Model *et al.*, 1988). Las partículas de fago filamentosos aparecen como delgadas estructuras tubulares de 900 nm de largo y 10 nm de espesor que contienen un genoma de ADN monocatenario circular (la cadena +). El ciclo vital del fago entraña la fijación del fago al F-pilus de la bacteria seguida de la entrada del genoma ADN monocatenario en el huésped. El ADN monocatenario circular es reconocido por la maquinaria de replicación del huésped y la síntesis de la segunda cadena de ADN complementaria es iniciada en la estructura ori(+) del fago. La forma replicante del ADN de doble cadena es la plantilla para la síntesis de genomas de fago circulares de ADN monocatenario, iniciándose en la estructura ori(+). Éstos quedan en última instancia agrupados en viriones y las partículas de fago son extruidas de la bacteria sin causar lisis ni daños aparentes al huésped.

[0015] Los sistemas de exposición de péptidos han aprovechado dos proteínas estructurales del fago; la proteína pIII y la proteína pVIII. La proteína pIII existe en 5 copias por fago y se encuentra exclusivamente en una punta del virión (Goldsmith *et al.*, 1977). El dominio N-terminal de la proteína pIII forma una estructura protuberante que es necesaria para el proceso de infección (Gray *et al.*, 1981). Permite la absorción del fago en la punta del F-pilus y posteriormente la penetración y translocación del ADN de fago monocatenario en la célula huésped bacteriana (Holliger *et al.*, 1997). La proteína pIII puede tolerar amplias modificaciones y por lo tanto ha sido utilizada para expresar péptidos en su N-terminal. Los péptidos extraños han sido de hasta 65 residuos de aminoácidos de largo (Bluthner *et al.*, 1996; Kay *et al.*, 1993) y en algunos casos incluso tan grandes como proteínas de longitud completa (McCafferty *et al.*, 1990; McCafferty *et al.*, 1992) sin afectar de forma visible la función pIII.

[0016] La envoltura proteínica cilíndrica que rodea el ADN del fago monocatenario se compone de 2700 copias de la proteína de envoltura principal, pVIII, una subunidad alfa-helicoidal que consiste en 50 residuos de aminoácidos. Las propias proteínas pVIII están dispuestas en patrón helicoidal, con la hélice alfa de la proteína orientada en un ángulo inclinado con el eje largo del virión (Marvin *et al.*, 1994). La estructura primaria de esta proteína contiene tres dominios separados: (1) la parte N-terminal, enriquecida con aminoácidos ácidos y expuesta al entorno exterior; (2) un dominio hidrofóbico central responsable de: (i) subunidad: interacciones de la subunidad en la partícula de fago y (ii) funciones de transmembrana en la célula huésped; y (3) el tercer dominio que contiene aminoácidos básicos, agrupados en el C-terminal, que está enterrado en el interior del fago y está asociado al ADN-fago. La pVIII se sintetiza como una proteína preenvoltura que contiene un péptido-líder de 23 aminoácidos, que es escindido por translocación entre la membrana interna de la bacteria para producir la proteína madura trans-membrana de 50 residuos (Sugimoto *et al.*, 1977). El uso de pVIII como un andamio de exposición se ve obstaculizado por el hecho de que puede tolerar la adición de péptidos no más largos de 6 residuos en su N-terminal (Greenwood *et al.*, 1991; Iannolo *et al.*, 1995). Insertos más grandes interfieren en el ensamblaje del fago. Sin embargo, la introducción de péptidos más grandes es posible en sistemas en los que los fagos mosaicos son producidos mezclando in vivo las proteínas pVIII recombinantes, que contienen péptidos con pVIII de tipo salvaje (Felici *et al.*, 1991; Greenwood *et al.*, 1991; Willis *et al.*, 1993). Ello permite la incorporación de proteínas pVIII quiméricas a baja densidad (decenas a cientos de copias por partícula) en la superficie del fago intercaladas con proteínas de envoltura de tipo salvaje durante el ensamblaje de partículas de fago. Se han utilizado dos sistemas que permiten la generación de fagos mosaico; los sistemas "tipo 8+8" y "tipo 88" tal como los denomina Smith (Smith, 1993).

[0017] El sistema "tipo 8+8" se basa en poner los dos genes pVIII situados por separado en dos unidades genéticas diferentes (Felici *et al.*, 1991; Greenwood *et al.*, 1991; Willis *et al.*, 1993). El gen pVIII recombinante está situado en un fagomida, un plásmida que contiene, además de su propio origen de replicación, los orígenes de replicación del fago y la señal de empaquetamiento. La proteína pVIII de tipo salvaje se obtiene superinfectando bacterias que esconden fagémidas con un fago ayudante. Además, el fago ayudante proporciona la replicación del fago y la maquinaria de ensamblaje que empaquetan los genomas del fagémida y el ayudante en viriones. Por lo tanto, dos son los tipos de partículas secretadas por tales bacterias, ayudante y fagémida, las cuales incorporan una mezcla de proteínas pVIII de tipo salvaje y recombinante.

[0018] El sistema "tipo 88" se beneficia de contener los dos genes pVIII en un único e infeccioso genoma de fago. Por lo tanto, evita la necesidad de un fago ayudante y la superinfección. Además, solo se produce un tipo de fago mosaico.

[0019] El genoma de fago codifica 10 proteínas (pI a pX) todas las cuales son esenciales para producir una progenie infecciosa (Felici *et al.*, 1991). Los genes para las proteínas se organizan en dos unidades transcripcionales estrechamente agrupadas separadas por dos regiones sin codificación (Van Wezenbeek *et al.*, 1980). Una región sin codificación, llamada la "región intergénica" (definida como situada entre los genes pIV y pII) contiene los orígenes (+) y (-) de replicación de ADN y la señal de empaquetamiento del fago, permitiendo el inicio de la formación de cápsidas. Partes de esta región intergénica son prescindibles (Kim *et al.*, 1981; Dotto *et al.*, 1984). Además, se ha descubierto que esta región puede tolerar la inserción de ADNs extraños en varios sitios (Messing, 1983; Moses *et al.*, 1980; Zacher *et al.*, 1980). La segunda región sin codificación del fago está situada entre los genes pVIII y pIII, y también ha sido utilizada para incorporar genes extraños recombinantes tal como fue ilustrado por Pluckthun (Krebber *et al.*, 1995).

**Inmunización con exposición de fago:**

[0020] Pequeños péptidos sintéticos, compuestos de epítomos, son por lo general malos antígenos que requieren la síntesis química de un péptido y necesitan ser acoplados a un portador grande, pero incluso así pueden inducir una respuesta inmunitaria de baja afinidad. Un procedimiento de inmunización para aumentar los anticuerpos anti-AβP, utilizando como antígeno los fagos filamentosos que presentan solamente el péptido EFRH, ha sido desarrollado en el laboratorio del presente inventor (Frenkel *et al.*, 2000 y 2001). En los últimos años se ha hecho un extenso uso de bacteriófagos filamentosos para la 'exposición' en su superficie de grandes repertorios de péptidos generados clonando oligonucleótidos aleatorios en el extremo 5' de los genes que codifican la proteína de cubierta del fago (Scott and Smith, 1990; Scott, 1992). Como se ha indicado recientemente, los bacteriófagos filamentosos son excelentes vehículos para la expresión y presentación de péptidos extraños en una variedad de sustancias biológicas (Greenwood *et al.*, 1993; Medynski, 1994). La administración de fagos filamentosos induce una fuerte respuesta inmunológica en los sistemas de efectos de los fagos (Willis *et al.*, 1993; Meola *et al.*, 1995). Las proteínas de cubierta del fago pIII y pVIII mencionadas más arriba son proteínas que han sido utilizadas a menudo para la exposición de fagos. El método del fago filamentosos recombinante para obtener antígenos de péptidos específicos tiene una gran ventaja sobre la síntesis química, ya que los productos obtenidos son resultado de la fidelidad biológica de la maquinaria traslacional y no están sujetos a los niveles de pureza del 70-94% comunes en la síntesis de fase sólida de los péptidos. El fago presenta una fuente fácilmente renovable de antígenos, ya que se puede obtener material adicional mediante el desarrollo de cultivos bacterianos.

[0021] La inmunización con el epítomo EFRH (SEQ ID NO: 2) que expone fagos puede, en un corto periodo de tiempo, elevar la alta concentración de anticuerpos de alta afinidad (IgG) capaces de impedir la formación de β-amiloide y minimizar otros efectos tóxicos. Se descubrió que el nivel de anticuerpos en el suero sanguíneo estaba relacionado con el número de copias de péptido por fago (Frenkel *et al.*, 2000b).

[0022] Los anticuerpos resultantes de la inmunización por fagos EFRH (SEQ ID NO: 2) son similares con respecto a las propiedades lógicas a los anticuerpos cultivados por inyección directa con β-amiloide completo (Tabla 1). Estos anticuerpos reconocen el péptido β-amiloide de tamaño completo (1-40) y exhiben propiedades anti-agregantes como los anticuerpos cultivados contra péptidos β-amiloides completos y/o amiloides β (Frenkel *et al.*, 2000b, 2001). La elevada inmunogenicidad de los fagos filamentosos permite el cultivo de anticuerpos contra auto-antígenos. La inmunización de conejillos de indias con fago EFRH (SEQ ID NO: 2) como antígeno, en el que la secuencia del péptido Aβ es idéntica a la de los humanos, tuvo como resultado la producción de auto-anticuerpos (Frenkel *et al.*, 2001).

Tabla 1: Inhibición competitiva por varios péptidos en β-amiloide de anticuerpo de suero cultivados contra f88-EFRH comparado con anticuerpo anti-agregación de amiloides\*.

PÉPTIDO	RESIDUOS	SUERO DE RATONES	Anticuerpo de anti-agregación*.
FRH	(residuos 4-6 de Aβ)	~10 <sup>-3</sup> M	3x10 <sup>-3</sup> M
EFRH	(residuos 3-6 de Aβ; SEQ ID NO:2)	6.0x10 <sup>-6</sup> M	3x10 <sup>-6</sup> M
DAEFRH	(residuos 1-6 de Aβ; residuos 1-6 de SEQ ID NO:3)	3.0x10 <sup>-6</sup> M	8x10 <sup>-7</sup> M
DAEFRHD	(residuos 1-7 de Aβ; residuos 1-7 de SEQ ID NO:3)	5.0x10 <sup>-6</sup> M	9x10 <sup>-7</sup> M
DAEFRHDSG	(residuos 1-9 de Aβ; SEQ ID NO:3)	5.0x10 <sup>-6</sup> M	1x10 <sup>-6</sup> M
Aβ (1-40)		3-0x10 <sup>-6</sup> M	8x10 <sup>-7</sup> M
WVLD	(SEQ ID NO:4)	Nd**	Nd**

\* Frenkel *et al.* 1998

\*\* Valor IC50 inferior a 10<sup>-2</sup> M que no puede ser detectado por ensayo ELISA.

[0023] Los datos anteriores demostraron que un bacteriófago recombinante que muestra un auto-epítomo puede ser utilizado como vacuna para inducir autoanticuerpos para el tratamiento de enfermedades. Los fagos filamentosos se cultivan normalmente utilizando una cadena de laboratorio de *E. coli*, y aunque la cadena que se produce de forma natural puede ser diferente, es razonable asumir que el suministro de fagos en el intestino tendrá como resultado la infección de la flora intestinal. El laboratorio del presente inventor ha descubierto que fagos desactivados por UV son tan inmunogénicos como sus homólogos infecciosos. Hay pruebas de fagos filamentosos de larga duración en los intestinos de animales inmunizados que pueden explicar la respuesta inmune de larga duración encontrada en ratones inmunizados con la proteína pIII (Zuercher *et al.*, 2000).

[0024] Debido a la elevada antigenicidad del fago, la administración puede hacerse por vía intranasal, que es la forma de inmunización más sencilla sin tener que utilizar adyuvante. Dado que se supone que los cambios olfatorios desempeñan un papel en la enfermedad de Alzheimer (Murphy, 1999) la inmunización mucosal es una eficaz inducción de anticuerpos específicos IgA β-amiloides para prevenir el efecto patológico local de la enfermedad.

[0025] La eficacia del antígeno fago-EFRH en el cultivo de anticuerpos  $\beta$ -amiloides anti-agregación (Solomon y Frenkel, 2000) en comparación con  $\beta$ -amiloides completos muestra que:

- 5           a. la elevada inmunogenicidad del fago permite la producción de un alto título de anticuerpos IgG en un corto periodo de semanas sin necesidad de administración de adyuvante;
- b. la auto-expresión del antígeno provocó una inmunización duradera;
- 10           c. el papel clave del epítipo EFRH en la formación de  $\beta$ -amiloides y su elevada inmunogenicidad provocó la formación de anticuerpos antiagregantes que reconocen péptidos  $\beta$ -amiloides completos, sustituyendo el uso de fibrilos  $\beta$ -amiloides.

#### **Ingeniería de anticuerpos:**

15           [0026] Se aplicaron métodos de ingeniería de anticuerpos para minimizar el tamaño de mAbs (1 35-900 kDa) sin que perdieran su actividad biológica (Winter *et al.*, 1994). Estas tecnologías y la aplicación de la tecnología PCR para crear grandes repertorios de genes de anticuerpos hacen de la exposición de fagos de anticuerpos una herramienta versátil para el aislamiento y caracterización de anticuerpos Fv de cadena sencilla (scFv) (Hoogenboom *et al.*, 1998). Los scFvs pueden ser visualizados en la superficie del fago para su posterior manipulación o pueden ser liberados como un fragmento scFv (~25 kd) soluble.

20           [0027] El laboratorio del presente inventor preparó un scFv que exhibe propiedades anti-agregantes similares a la molécula de IgM parental (Frenkel *et al.*, 2000a). Para la construcción del scFv, se clonaron los genes de anticuerpo del hibridoma de IgM 508 anti-A $\beta$ P. El anticuerpo secretado mostró una actividad específica hacia la molécula A $\beta$ P en prevenir sus efectos tóxicos en células PC 12 cultivadas. Los anticuerpos Fv de cadena sencilla dirigidos a un sitio son el primer paso hacia enviar anticuerpos terapéuticos al cerebro a través de métodos intracelulares o extracelulares.

25           [0028] La cita de cualquier documento no implica su aceptación como pertinente al estado de la técnica ni se considera importante para la patentabilidad de cualquier reivindicación de la presente solicitud. Cualquier afirmación con respecto al contenido o a una fecha de cualquier documento está basada en la información a disposición del solicitante en el momento de presentar la solicitud y no constituye su aceptación.

#### **Descripción breve de la invención**

35           [0029] La presente invención proporciona un compuesto inmunizante que contiene una cantidad efectiva inmunizante de un producto antigénico que induce una respuesta inmune contra un epítipo que abarca el sitio de escisión por  $\beta$ -secretasa de la proteína precursora de amiloides (A $\beta$ PP) que bloquea la escisión de A $\beta$ PP por  $\beta$ -secretasa.

40           [0030] Un método para inducir una respuesta inmune contra el sitio de escisión por  $\beta$ -secretasa de A $\beta$ PP implica la administración del compuesto inmunizante de acuerdo con la presente invención a un sujeto/paciente que lo necesite.

45           [0031] La presente invención también proporciona una molécula que bloquea la escisión de A $\beta$ PP por  $\beta$ -secretasa y comprende la porción que se fija al antígeno de un anticuerpo contra un epítipo que abarca el sitio de escisión por  $\beta$ -secretasa de la proteína precursora de amiloides (A $\beta$ PP).

50           [0032] Una realización preferida de la molécula de acuerdo con la presente invención es un anticuerpo de cadena sencilla, que cuando es visualizado en la superficie de un vehículo de exposición de un bacteriófago filamentoso puede ser utilizado como método para inhibir la formación de  $\beta$ -amiloides.

55           [0033] En otro aspecto, la presente invención se refiere al compuesto inmunizante de acuerdo con la invención para su uso como medicamento. En otros aspectos, la presente invención se refiere al uso del compuesto inmunizante de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, y al compuesto inmunizante para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

60           [0034] La presente invención también proporciona un vehículo de exposición del bacteriófago filamentoso que muestra en su superficie la molécula de acuerdo con la presente invención que es un anticuerpo de cadena sencilla. Y la presente invención también proporciona un compuesto farmacéutico, que comprende el vehículo de exposición del bacteriófago filamentoso y un portador, excipiente, diluyente, o agente auxiliar farmacéuticamente aceptables.

65           [0035] En otro aspecto más, la presente invención se refiere al vehículo de exposición del bacteriófago filamentoso de acuerdo con la invención para su uso como medicamento. Y en otros aspectos más, la presente invención se refiere al uso del vehículo de exposición del bacteriófago filamentoso de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, y al vehículo de exposición del bacteriófago filamentoso para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

[0036] La presente invención también proporciona la molécula de acuerdo con la invención para su uso como medicamento. En otros aspectos todavía, la presente invención se refiere al uso de la molécula de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, y la molécula para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

#### Descripción breve de las figuras

[0037] La Figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 1) que rodea el sitio de escisión de la p-secretasa en A $\beta$ PP, donde la escisión se produce entre Met (M) y Asp (D), residuos designados 0 y 1 basados en el sitio de escisión y donde el residuo 0 (posición P<sub>1</sub>) es normalmente Metionina pero resulta ser Leucina en la mutación AD familiar "sueca".

[0038] Las Figuras 2A-2C muestran representaciones esquemáticas de realizaciones de péptidos antigénicos múltiples (MAP) en resina de Wang homo octa-ramificada de acuerdo con la presente invención. La flecha representa el sitio de escisión y el ISEVK-MDA (residuos 1 a 8 de SEQ ID NO: 1, donde el residuo 6 es Met; Fig. 2A), ISEVKLDA (residuos 1 a 8 de SEQ ID NO: 1, donde el residuo 6 es Leu; Fig. 2B), VKMDAEFRH (SEQ ID NO: 5; Fig. 2C) secuencia de péptidos antigénicos.

[0039] La Figura 3 es un gráfico que muestra la respuesta inmune después de inmunización con MAP-ISEVKLDA (residuos 1-8 de SEQ ID NO: 1, donde el residuo 6 es Leu).

[0040] La Figura 4 es un gráfico que muestra la inhibición de la secreción de péptidos  $\beta$  amiloides (A $\beta$ ) en medios cultivados después de 48 hrs según medición ELISA.

[0041] La Figura es un gráfico que muestra la inhibición de acumulación intracelular de péptidos 1-42 A $\beta$  después de 5 días de incubación según medición ELISA.

[0042] La Figura es una imagen de microscopio confocal que muestra la co-localización en la región perinuclear de los anticuerpos del sitio de escisión anti- $\beta$  secretasa de acuerdo con la presente invención y anticuerpos BACE cultivados contra la propia enzima  $\beta$ -secretasa.

[0043] Las Figuras 7A y 7B son imágenes de células permeabilizadas (Fig. 7A) y de control (Fig. 7B) inmunotintadas con el sitio de escisión de anti- $\beta$  secretasa en anticuerpo de APP y un anticuerpo secundario.

[0044] La Figura 8 es un gráfico que muestra la reducción del número de placas en ratones transgénicos inmunizados con el antígeno, en comparación con ratones no tratados.

#### Descripción detallada de la invención

[0045] La escisión por  $\beta$ -secretasa genera el N-terminal libre de A $\beta$  y está por lo tanto considerado como el primer paso crítico en la formación de amiloides. Para evitar los posibles problemas de inhibir la enzima per se, lo cual podría provocar efectos "desconocidos", el presente inventor ha desarrollado un nuevo método para bloquear la escisión por  $\beta$ -secretasa de la A $\beta$ PP generando anticuerpos anti- A $\beta$ PP capaces de bloquear el sitio de escisión de la  $\beta$ -secretasa en la A $\beta$ PP para inhibir la formación in vivo de A $\beta$  e inhibir o impedir por lo tanto el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.

[0046] La presente invención está dirigida hacia una vacuna, a la que también se hace referencia aquí como a un compuesto inmunizante que contiene una cantidad efectiva de producto antigénico que induce una respuesta inmune contra un epítipo que recubre el sitio de escisión de la  $\beta$ -secretasa de la A $\beta$ PP que bloquea la escisión de la A $\beta$ PP por la  $\beta$ -secretasa. Un método utiliza este compuesto inmunizante para inducir una respuesta inmune contra el sitio de escisión de la  $\beta$ -secretada de la A $\beta$ PP. Este método para inducir una respuesta inmune contra el sitio de escisión de la  $\beta$ -secretada de la A $\beta$ PP implica la administración del compuesto inmunizante de acuerdo con la presente invención a un sujeto/paciente que lo necesite.

[0047] Un método para la inmunización pasiva comprende la administración de un vehículo de exposición viral que expone en su superficie al menos una parte (inmunológica) de unión al antígeno de un anticuerpo que puede fijarse a un epítipo de la A $\beta$ PP que recubre el sitio de escisión de la  $\beta$ -secretasa de la A $\beta$ PP para inhibir la formación de A $\beta$  bloqueando la escisión de la  $\beta$ -secretasa de la A $\beta$ PP. Esta inmunidad pasiva puede ser de una duración excepcionalmente larga si el vehículo de exposición empleado es capaz de replicarse dentro del receptor/paciente.

[0048] A efectos de esta especificación y las reivindicaciones que la acompañan, los términos "paciente", "sujeto" y "receptor" se utilizan de manera intercambiable. Incluyen humanos y otros mamíferos que son objeto de tratamiento profiláctico, experimental, o terapéutico. Igualmente los términos péptido amiloide- $\beta$ , y "péptido  $\beta$ -amiloide" son sinónimos de "péptido  $\beta$ -amiloide", " $\beta$ AP", " $\beta$ A", y "A $\beta$ ". Todos estos términos hacen referencia al péptido que forma placas derivado de la proteína precursora de amiloides (A $\beta$ PP).

[0049] Tal como se utiliza aquí, el término "tratamiento" incluye sustancialmente inhibir, retardar o invertir la progresión de una enfermedad, mejorando de manera sustancial los síntomas clínicos o impidiendo sustancialmente la aparición de síntomas clínicos de una enfermedad.

[0050] El término "respuesta inmune" o su equivalente "respuesta inmunológica" hace referencia al desarrollo de una respuesta beneficiosa humoral (favorecida por anticuerpos) y/o celular (favorecida por células T antígeno-específicas o los productos que segregan) dirigida contra un epítipo de la A $\beta$ PP que recubre el sitio de escisión de la  $\beta$ -secretasa de la A $\beta$ PP en un paciente receptor. Dicha respuesta puede ser una respuesta activa inducida por la administración de un inmunógeno o una respuesta pasiva inducida por la administración de anticuerpos. Una respuesta inmune celular es suscitada por la presentación de epítipos en polipéptidos en asociación con moléculas MHC de Clase I o Clase II, para activar las células T ayudantes CD4<sup>+</sup> antígeno-específicas y/o las células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas. La respuesta también puede implicar la activación de monocitos, macrófagos, células NK, basófilos, células dendríticas, astrocitos, células microglía, eosinófilos u otros componentes de inmunidad innata.

[0051] Tal como se utiliza aquí la "inmunidad activa" hace referencia a cualquier inmunidad conferida a un sujeto por administración de un antígeno.

[0052] Tal como se utiliza aquí la "inmunidad pasiva" hace referencia a cualquier inmunidad conferida a un sujeto sin la administración de un antígeno. La "inmunidad pasiva" incluye por lo tanto, sin limitarse a ello, la administración de un vehículo de exposición replicante que incluye una parte inmunológica/que se fija a un antígeno presentada en su superficie a un receptor. Aunque la recepción de dicho vehículo es activa, la respuesta inmune es pasiva desde el punto de vista del receptor.

[0053] A efectos de esta especificación y las reivindicaciones que la acompañan, los términos "epítipo" y "determinante antigénico" se utilizan de manera intercambiable para hacer referencia a un sitio en un antígeno al que responden las células T y/o B. Se pueden formar epítipos de células-B tanto a partir de aminoácidos contiguos como no contiguos yuxtapuestos por el plegamiento terciario de una proteína. Los epítipos formados a partir de aminoácidos contiguos se conservan normalmente tras exposición a disolventes desnaturizantes mientras que los epítipos formados por plegamiento terciario se suelen perder durante su tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítipo incluye normalmente al menos 3, y de manera más general, al menos 5 o 8-10 aminoácidos en una única conformación espacial. Entre los métodos para determinar la conformación espacial de epítipos se encuentran, por ejemplo, la cristalografía por rayos x y la resonancia magnética nuclear bidimensional. Ver por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996). Los anticuerpos que reconocen el mismo epítipo pueden ser identificados en un sencillo inmuno-ensayo que muestre la capacidad de un anticuerpo de bloquear la fijación de otro anticuerpo a un antígeno de destino. Las células T reconocen epítipos continuos de aproximadamente 9 aminoácidos para células CD8 o de aproximadamente 13-15 aminoácidos para células CD4. Las células T que reconocen el epítipo pueden ser identificadas en ensayos *in vitro* que miden la proliferación antígeno-dependiente, determinada por la incorporación de 3H-timidina por células T cebadas en respuesta a un epítipo (Burke *et al.*, 1994), por asesinato antígeno-dependiente (ensayo linfocitos T citotóxicos, Tigges *et al.*) o por secreción de citoquina.

[0054] Las realizaciones preferentes del producto antigénico utilizado en el compuesto inmunizante de acuerdo con la presente invención para inducir una respuesta inmune contra el sitio de escisión de la  $\beta$ -secretasa de la A $\beta$ PP incluyen (1) un antígeno estructuralmente basado en sistema de péptidos de antígenos múltiples (MAPs), un sistema de polímeros dendríticos, en el que los péptidos antigénicos que representan los sitios de escisión de la  $\beta$ -secretasa están covalentemente unidos a las ramificaciones que irradian de una molécula nuclear, y (2) un vehículo de exposición viral que muestra un epítipo de la A $\beta$ PP que recubre el sitio de escisión de la  $\beta$ -secretasa de la A $\beta$ PP en su superficie.

[0055] El producto antigénico utilizado en una realización preferente de la presente invención que está estructuralmente basado en un polímero dendrítico se caracteriza por una mayor concentración de grupos funcionales por unidad de volumen molecular que los polímeros ordinarios. Por lo general, los polímeros dendríticos están basados en dos o más ramificaciones idénticas que se originan a partir de una molécula nuclear que tiene al menos dos grupos funciones. Dichos polímeros han sido descritos por Denkwalter *et al.* en la Patente U.S. No. 4,289,872 y por Tomalia *et al.* en varias Patentes U.S., incluyendo las Patentes U.S. Nos. 4,599,400 y 4,507,466. Otros polímeros de esta clase han sido descritos por Erickson en la Patente U.S. No. 4,515,920. Los polímeros suelen ser denominados a menudo polímeros dendríticos porque su estructura puede ser representada como un árbol con un tronco principal y varias ramas. A diferencia de un árbol, sin embargo, las ramas de los polímeros dendríticos son todas sustancialmente idénticas. Este sistema de dendritas ha sido denominado sistema de péptidos de antígenos múltiples (MAPS), que es el nombre comúnmente utilizado para un soporte de combinación antígeno/antígeno que se compone de dos o más moléculas antigénicas, generalmente idénticas, covalentemente unidas a un núcleo dendrítico que se componen de unidades principales que son al menos bifuncionales. Cada unidad bifuncional de una rama proporciona una base para seguir creciendo. El núcleo dendrítico de un sistema de péptidos de múltiples antígenos puede estar compuesto de moléculas de lisina y confiere una elevada inmunogenicidad a todo el antígeno. Por ejemplo, una lisina está unida por medio de enlaces peptídicos a través de



5 cada uno de sus grupos amino a dos lisinas adicionales. Esta molécula de segunda generación tiene cuatro grupos amino libres cada uno de los cuales puede ser covalentemente unido a una lisina adicional para formar un molécula de tercera generación con ocho grupos amino libres. Un péptido puede estar fijado a cada uno de estos grupos libres para formar un MAP octavalente (MAP; Fig. 2). El proceso puede ser repetido para formar una cuarta o incluso más generaciones de moléculas. Con cada generación, el número de grupos de amino libres incrementa geométricamente y puede ser representado por  $2^n$ , donde n es el número de la generación. Alternativamente, la molécula de segunda generación que tiene cuatro grupos amino libres puede ser utilizada para formar un MAP tetravalente, es decir, un MAP que tiene cuatro péptidos covalentemente unidos al núcleo. Muchas otras moléculas, incluyendo por ejemplo, el ácido aspártico y el ácido glutámico, que tienen ambos dos grupos carboxilos y un grupo amino para producir ácidos poliaspárticos o poliglutámicos con grupos carboxilos libres  $2^n$ , pueden ser utilizadas para formar el núcleo dendrítico de un sistema de péptidos de múltiples antígenos.

10 [0056] Como resultará evidente en la explicación que sigue, algunas de las moléculas portadoras o nucleares utilizadas para formar el producto de la presente invención tienen un peso molecular tal que por lo general pueden no ser consideradas polímeros. Sin embargo, dado que su estructura básica es similar a los polímeros dendríticos, es conveniente describirlas como tales. Por lo tanto el término "polímero dendrítico" será utilizado aquí a veces para definir el producto de la invención. El término incluye moléculas portadoras que son lo suficientemente grandes como para ser consideradas polímeros así como aquellas pueden contener tan solo tres monómeros.

15 [0057] Los procesos químicos necesarios para realizar la síntesis de polímeros dendríticos son conocidos y están disponibles. Con aminoácidos, los procesos químicos para bloquear grupos funcionales que no deberían reaccionar y eliminar a continuación los grupos de bloqueo cuando se desea que los grupos funcionales reaccionen han sido descritos con detalle en numerosas patentes y artículos de la literatura técnica. Los polímeros dendríticos y todo el MAP pueden ser producidos en una resina como en la síntesis de Merrifield que se retira luego del polímero. Tomalia utilizó amoniaco o etilendiamina como molécula nuclear. En este procedimiento, la molécula nuclear reacciona con un éster de acrilato por adición de Michael y los grupos de ésteres son eliminados por hidrólisis. Las moléculas resultantes de primera generación contienen tres grupos carboxilos libres en el caso del amoniaco y cuatro grupos carboxilos libres cuando se emplea etilendiamina. Tomalia amplía el polímero dendrítico con etilendiamina seguido de otro monómero de éster acrílico y repite la secuencia hasta que se alcanza el peso molecular deseado. Resultará sin embargo evidente para alguien familiarizado con la técnica que cada rama del polímero dendrítico puede ser alargada por cualquiera de una serie de procedimientos seleccionados. Por ejemplo, cada rama puede ser ampliada por reacciones múltiples con moléculas de lisina.

20 [0058] Erickson utilizó la técnica de Merrifield clásica en la que se cultiva un polipéptido de sustancialmente cualquier peso molecular deseado a partir de un soporte de resina sólido. Dado que la técnica se utiliza para la preparación de polímeros dendríticos, la molécula de enlace que une el polímero al soporte de resina es trifuncional. Uno de los grupos funcionales está implicado en la unión con la resina, y los otros dos grupos funcionales actúan como punto de partida para el crecimiento del polímero. El polímero es retirado de la resina cuando se ha alcanzado el peso molecular deseado. Un procedimiento estándar de escisión es el tratamiento con fluoruro de hidrógeno líquido a 0°C. durante una hora. Otro procedimiento más satisfactorio es utilizar un complejo de fluoruro de hidrógeno y dimetilsulfuro (HF:DMF) como se describe en Tam et al (1983). Este procedimiento minimiza en gran medida los efectos colaterales y la pérdida de péptidos.

25 [0059] Denkewalter, en un ejemplo de su proceso, utiliza lisina como la molécula nuclear. Los grupos amino de la molécula nuclear quedan bloqueados por conversión en grupos de uretanos. El grupo carboxilo es bloqueado por reacción con benzidrilamina. La hidrólisis de los grupos uretano genera un benzidrilamida de lisina con dos grupos amino libres que sirven como puntos de partida para el cultivo del polímero dendrítico. Este breve esbozo de tres de los procedimientos disponibles para producir polímeros dendríticos debería ser adecuado para mostrar a aquellos experimentados en la técnica los principios básicos de la tecnología actual. También mostrará a los técnicos experimentados las características más notables de los polímeros, siendo una de las más importantes que proporcionan un gran número de grupos funcionales disponibles en un pequeño volumen molecular. El resultado es que se puede lograr una elevada concentración de antígenos en un pequeño volumen uniendo el antígeno a los grupos funcionales disponibles. Además, el producto molecular resultante contiene una elevada proporción de antígeno en un soporte relativamente pequeño, es decir, la relación entre el antígeno y el soporte es muy alta. Ello contrasta con los productos convencionales utilizados como base para vacunas. Estos productos convencionales suelen estar compuestos de una pequeña cantidad de antígeno en una gran cantidad de soporte.

30 [0060] Otras características importantes del polímero dendrítico como soporte del antígeno son que la estructura exacta es conocida; no existen contaminantes que puedan ser en sí mismos antigénicos, producir irritación de los tejidos u otras reacciones indeseables; la concentración exacta del antígeno conocida; el antígeno está simétricamente distribuido en el soporte; y el soporte puede ser utilizado como base para más de un antígeno de modo que se pueden producir vacunas multivalentes. La principal ventaja de MAPS como base para vacunas es que a diferencia de otros sistemas que utilizan soportes naturales como la hemocianina de lapa californiana, toxoide tetánico y albúmina de suero bovino, los polímeros dendríticos del MAPS como soportes son entidades químicas plenamente definidas en las que los antígenos están dispersos en concentraciones conocidas. De manera adicional,

el antígeno comprende una gran parte de la molécula, no una proporción indefinida y relativamente pequeña de la molécula, con en el caso de los soportes naturales.

[0061] Cuando se va a emplear el MAPS para producir una vacuna, a la que aquí se hace referencia también como compuesto inmunizante, es preferible que la molécula nuclear sea un aminoácido que se produce de forma natural como la lisina para que el cuerpo pueda asimilarla utilizando las vías metabólicas habituales. Sin embargo, como se explicará con más detalle a continuación, los aminoácidos que no se producen de forma natural, incluso aquellos que no son  $\alpha$ -amino también pueden ser empleados. Los ácidos, o cualesquiera otras moléculas asimétricas utilizadas en la creación de la molécula nuclear pueden ser en forma D o L.

[0062] Aunque los polímeros dendríticos han sido principalmente descritos más arriba como polímeros poliamidas, resultará rápidamente evidente que los soportes de esta invención no se limitan a los poliamidas dendríticos. Cualquiera de una amplia variedad de moléculas que tengan al menos dos grupos funcionales puede servir como moléculas nucleares. El propilenglicol, por ejemplo, puede servir como base para un polímero dendrítico de poliéster. El ácido succínico con glicoles o aminas seleccionados puede servir como molécula nuclear para generar poliésteres o poliamidas. Los diisocianatos pueden ser utilizados para generar poliuretanos. Lo importante es que la molécula nuclear tenga al menos dos grupos funcionales disponibles a partir de los cuales pueden generarse dos ramas idénticas mediante reacciones de tipo de andamiaje secuencial con moléculas adicionales que también tienen al menos dos grupos de anclaje o funcionales disponibles en cada rama. En el caso más sencillo en el que la molécula nuclear tiene dos grupos funcionales disponibles y cada generación sucesiva tiene dos grupos funcionales disponibles, el número de sitios de anclaje a los que se pueden fijar las moléculas de antígenos es expresado por  $2^n$ , donde n es el número de la generación.

[0063] Para una discusión más completa de los procesos químicos de los polímeros dendríticos, recomendamos consultar Tomalia *et al.* (1985), Aharoni *et al.* (1982), y las siguientes Patentes EE UU Nos. 4,289,872; 4,558,120; 4,376,861; 4,568,737; 4,507,466; 4,587,329; 4,515,920; 4,599,400; 4,517,122; y 4,600,535.

[0064] El producto antigénico utilizado en el compuesto inmunizante de la presente invención, en una realización actualmente preferida, proporciona un sistema de péptidos de múltiples antígenos que comprende una base de polímeros dendríticos con una pluralidad de sitios de anclaje covalentemente unidos a moléculas antigénicas que pueden ser iguales o diferentes. Los polímeros comprenden una molécula nuclear central que tiene al menos dos grupos funcionales a los que están unidas covalentemente ramificaciones moleculares que tienen grupos funcionales terminales. Los grupos funcionales terminales en las ramificaciones están covalentemente unidos a moléculas antigénicas, principalmente descritas aquí como antígenos peptídicos.

[0065] El antígeno seleccionado puede ser sintetizado por separado u obtenido de otro modo y unido al soporte. De manera alternativa, el antígeno puede ser sintetizado en el soporte. Por ejemplo, si el antígeno es un oligopéptido o un polipéptido de peso molecular relativamente bajo, y los grupos funcionales disponibles en el polímero son grupos amino o grupos carboxilo, el antígeno puede ser sintetizado prolongando cada rama del polímero utilizando técnicas de síntesis de péptidos conocidas.

[0066] Las figuras 2A-2C muestran las estructuras de tres realizaciones de polímeros dendríticos MAP en una resina que pueden ser empleados en la práctica de la presente invención. Como puede verse, son productos de polilisina dendrítica de tercera generación. Pueden ser obtenidos comercialmente, por ejemplo, como resina de Wang octa-ramificada o tetra-ramificada con un núcleo MAP de una serie de proveedores, por ej., Advanced ChemTech, Inc. Louisville, KY, o pueden ser producidos por técnicas de fase sólida convencionales generando el polímero en una resina Pam o Pop. Ver Mitchell *et al.*, (1978) y Tam *et al.*, (1980). El polímero es separado a continuación de la resina utilizando preferentemente HF:DMS. La polilisina dendrítica, fue creada a partir de un enlace de alanina originalmente unido a la resina. También pueden emplearse otros enlaces como la glicina. Evidentemente, el enlace puede ser omitido, o se pueden utilizar una pluralidad de moléculas de enlace.

[0067] Antígenos peptídicos que tengan o bien residuos 1-8 de SEQ ID NO: 1 donde el residuo 6 es Met (Fig. 2A), residuos 1-8 de SEQ ID NO: 1 donde el residuo 6 es Leu (Fig. 2B), o SEQ ID NO: 5 (Fig. 2C) unidos directamente a cada uno de los grupos funcionales disponibles en cada porción lisina terminal están indicados en las Figs. 2A-2C. En el caso en que el antígeno es un péptido relativamente corto, por ej. 6 a 14 residuos, puede ser conveniente prolongar la polilisina mediante un enlace como un simple tri- o tetrapéptido de glicina, alanina o  $\beta$ -alanina. Sin embargo, para péptidos antigénicos con más de 14 residuos, el enlace es normalmente innecesario.

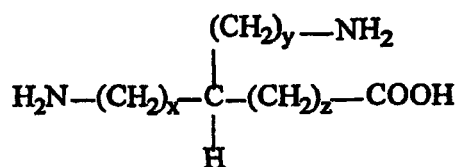
[0068] Preferentemente los antígenos peptídicos fijados a cada uno de los grupos funcionales disponibles en la porción terminal para formar un MAP octavalente MAP son como sigue:

(MAP) - ISEVKMDA (residuos 1-8 de SEQ ID NO: 1 donde el residuo 6 es Met) contiene un epítipo que recubre el sitio de escisión de la  $\beta$ -secretasa de la A $\beta$ PP en personas normales; y

(MAP) - ISEVKLDA (residuos 1-8 de SEQ ID NO: 1 donde el residuo 6 es Leu) contiene un epítipo que recubre el sitio de escisión de la  $\beta$ -secretasa de la A $\beta$ PP en la mutación sueca de EA.

[0069] Los antígenos peptídicos serán sintetizados (creciendo a partir del C-terminal al N-terminal) en, por ejemplo, resina de Wang octa-ramificada, resina- $\beta$ -Ala-Lys-2Lys-4Lys-4 Fmoc, que es una resina de núcleo MAP. La resina de Wang octa-ramificada puede obtenerse en el proveedor Advanced ChemTech, Inc., Louisville, MY ([www.peptide.com](http://www.peptide.com)) y tiene una parte escindible consistente en  $\beta$ -alanina a la que se fijan siete lisinas, ramificadas como un árbol. Las ramas terminan en cuatro lisinas con dos grupos Emoc cada una para un total de ocho grupos Fmoc. La síntesis de MAP puede realizarse de acuerdo con las instrucciones del proveedor o según cualquiera de los protocolos de síntesis de péptidos, tal como se enuncia en la Patente US 5,229,490 y Tam *et al.* (1989).

[0070] Una realización preferente de la presente invención ha sido descrita para facilitar la lectura, principalmente aplicada a productos fabricados con lisina como la molécula nuclear. De hecho, las moléculas de lisina y similares a la lisina como la ornitina, nor-lisina y amino alanina son las moléculas preferentes para crear el producto de esta invención porque son relativamente fáciles de obtener, son fáciles de trabajar con ellos, y producen buenos resultados. Dichas moléculas nucleares pueden ser representadas por la fórmula general:



[0071] donde x, y y z son números enteros de 0 a 10, preferentemente 0 a 4 siempre y cuando al menos uno de ellos sea 1 y los grupos amino no pueden ser fijados al mismo átomo de carbono. En las moléculas más preferentes, el total de x, y y z es de 2 a 6 y los grupos amino están separados por al menos dos grupos metileno.

[0072] Otras moléculas nucleares preferentes incluyen etilendiamina y moléculas similares con cadenas más largas tales como propilendiamina y butilendiamina. Dichas moléculas pueden estar representadas por la fórmula general:



donde n es un número entero de 0 a 10, preferentemente 0 a 3. El amoníaco también puede ser empleado como molécula nuclear.

[0073] El desarrollo de vacunas sintéticas contra un gran número de enfermedades se ha acelerado en gran medida por el reconocimiento de que una vacuna no tiene que estar basada en una proteína nativa, sino que puede estar basada en un segmento de bajo peso molecular de la proteína nativa. Estos segmentos, normalmente denominados determinantes inmunogénicos o epítomos son capaces de estimular la producción de anticuerpos que protegerán contra, por ejemplo, la infección por un vector infeccioso del antígeno proteico nativo. Los determinantes inmunogénicos suelen ser péptidos de bajo peso molecular que pueden ser convenientemente sintetizados. Si no pueden ser sintetizados, pueden ser separados en forma pura de la propia proteína nativa. En lo sucesivo, estos inmunostimulantes antigénicos serán denominados péptidos antigénicos.

[0074] Una realización principal utilizada en la presente invención puede ser ampliamente definida como un producto antigénico que comprende una molécula nuclear dendrítica o polímero al que una pluralidad de antígenos como péptidos antigénicos que contienen epítomos del sitio de escisión de la  $\beta$ -secretasa en la A $\beta$ PP están covalentemente unidos a los grupos funcionales disponibles. Los antígenos o epítomos pueden ser diferentes, aunque de manera preferente son los mismos.

[0075] De manera más específica, una realización principal utilizada en la presente invención puede ser definida como un producto antigénico o un sistema de soporte que comprende una base de polímero dendrítico que es una molécula nuclear central que tiene al menos dos grupos funcionales disponibles a los que se unen ramas de longitudes seleccionadas. Cada rama de la molécula termina con al menos un grupo funcional de anclaje disponible, una pluralidad de los cuales está covalentemente fijada a moléculas antigénicas.

[0076] El péptido antigénico que está covalentemente unido a los grupos funcionales terminales disponibles en el polímero dendrítico contiene al menos una copia de un epítomo que recubre el sitio de escisión de la  $\beta$ -secretasa de la A $\beta$ PP. Cuando más de una copia de un epítomo, como por ejemplo dos o tres copias, está presente en el péptido antigénico, un espaciador de 2-8 residuos aminoácidos, preferentemente 2-4 residuos, separa las copias múltiples del epítomo.

[0077] En una realización preferente utilizada en la presente invención, el epítomo es ISEVKMDA o ISEVKLDA (residuos 1-8 de SEQ ID NO: 1). Para pequeños péptidos antigénicos, como los que tienen 6-12 residuos, es preferible un polímero dendrítico octa-ramificado (ocho grupos funcionales terminales) como la resina de Wang octa-ramificada MAP. Sin embargo, para péptidos más grandes, de la gama de aproximadamente 20 residuos aminoácidos o mayores, es preferible un polímero dendrítico tetra-ramificado, como la resina de Wang MAP tetra-

ramificada.

5 [0078] Una ventaja del polímero dendrítico es que puede servir como soporte para dos o más antígenos diferentes, si se desea. Por ejemplo, (MAP)-VKMDAEFRH (SEQ ID NO: 5) representa una combinación de los dos epítomos diferentes clave de la A $\beta$ PP, el sitio de escisión Met-Asp de la  $\beta$ -secretasa y el sitio de agregación EFRH del A $\beta$ . Una realización del producto antigénico utilizado en la presente invención está basada en el uso de una polilisina dendrítica u otra molécula estructuralmente similar que emplee diferentes grupos de bloqueo amino, uno de los cuales es estable a la hidrólisis ácida, y el otro es estable a la hidrólisis alcalina. Ello hace posible proteger cualquiera de los grupos amino de lisina por el método de protección ortogonal.

10 [0079] El fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) es un grupo protector lábil base y es completamente estable a la desprotección ácida. El grupo de bloqueo t-butoxicarbonilo (Boc) es estable en condiciones básicas pero no lo es en condiciones ligeramente ácidas como en ácido trifluoroacético al 50%. Eligiendo Boc-lys (Boc)-OH, Boc-lys (Fmoc)-OH, Fmoc-lys (Boc)-OH o Fmoc-lys (Fmoc)-OH, es posible colocar una serie de antígenos en el grupo alfa amino de la lisina y otro en el grupo omega amino. Aquellos que estén experimentados en la síntesis de péptidos pueden diseñar fácilmente métodos para lograr los mismos tipos de productos utilizando diversos grupos de bloqueo y otros polímeros dendríticos.

15 [0080] Unas cuantas observaciones generales aplicables a la síntesis de MAPS serán de ayuda para aquellos conocedores de la técnica. Son las siguientes:

20 [0081] 1. Las síntesis requieren por lo general un largo tiempo de acoplamiento (2-4 horas).

25 [0082] 2. El dimetilformamida es por lo general un disolvente más adecuado que el dicloruro de metileno.

[0083] 3. La resina peptídica no debe ser secada durante ninguna etapa de la síntesis ya que la re-disolución es extremadamente difícil.

30 [0084] 4. El acoplamiento debe ser atentamente controlado y realizado mediante el método cuantitativo de la ninhidrina.

[0085] 5. El MAPS se escinde mejor a partir de la resina mediante el método de desprotección ácida mejorado ya sea con HF o TFMSA (Tam, *et al.*, 1983 and 1986) en sulfuro de dimetil para evitar fuertes reacciones secundarias catalizadas por ácidos.

35 [0086] 6. El MAPS tiende a una fuerte agregación después de la escisión del soporte de resina. La purificación se realiza mejor mediante diálisis extensiva en condiciones básicas y de fuerte desnaturalización en medio de diálisis que es 8M en urea y mercaptoetanol para eliminar aditivos aromáticos indeseables de las reacciones de escisión tales como p-cresol y tiocresol. Si se desea se puede proceder a mayor purificación utilizando cromatografía de intercambio iónico o de permeación en gel de alto rendimiento. En la mayoría de casos, el MAPS podría ser utilizado directamente sin más purificación.

40 [0087] Resultará evidente para aquellos familiarizados con la técnica que son posibles muchas variaciones de las estructuras mostradas y tratadas aquí. Todas esas variaciones se incluyen específicamente en el alcance de esta invención. Por ejemplo, ver la Patente U.S. 5,229,490.

45 [0088] El producto antigénico utilizado en la presente invención puede incluir una sección de anclaje de membrana lipofílica que confiere propiedades adyuvantes entre sus ventajas. Una sección de anclaje de membrana lipofílica en el terminal carboxilo de MAP posibilita una mayor amplificación no-covalente por un liposoma o forma micelar. Por consiguiente, el compuesto inmunizante de la presente invención, que contiene producto antigénico, puede ser preparado con una variedad de vehículos, incluyendo la encapsulación en liposomas, para mayor eficiencia del suministro y, de manera concomitante, para reducción de la dosis. La preparación de liposomas es bien conocida por la técnica.

50 [0089] Tripalmitoil-S-gliceril cisteína (P3C) y palmitoil lisina (PL) son ejemplos no exhaustivos de secciones lipofílicas adecuadas para el producto antigénico utilizado en la presente invención. P3C, que es un ácido lipoamino de *Escherichia coli*, es un mitógeno de célula B que ha demostrado ser especialmente útil como adyuvante no tóxico. Ver la Patente U.S. no. 5,580,563 y DeFoort *et al.*, (1992).

55 [0090] Dado que el MAPs utilizado en esta invención como producto antigénico proporciona una elevada concentración de antígenos en un pequeño volumen molecular, la vacuna/compuesto inmunizante de la invención puede utilizarse en muchos casos sin adyuvantes. Sin embargo, si se utiliza un adyuvante, puede ser seleccionado de entre cualquiera de aquellos normalmente empleados para estimular los sistemas inmunológicos de los mamíferos.

60 [0091] Tal como se utiliza aquí el término "adyuvante" se refiere a un compuesto que, cuando se administra junto

con un antígeno, aumenta la respuesta inmune al antígeno, pero cuando se administra solo no genera una respuesta inmune al antígeno. Los adyuvantes pueden aumentar la respuesta inmune mediante varios mecanismos incluyendo el reclutamiento de linfocitos, la estimulación de células B y/o T, y la estimulación de macrófagos.

5 [0092] El vehículo de exposición viral como un producto antigénico utilizado en el compuesto inmunizante de acuerdo con la presente invención puede ser un virus de ADN bicatenario, virus de ADN monocatenario, un virus de ARN (cadena positiva o negativa). Preferentemente, el vehículo de exposición es un bacteriófago filamentosos como fd, f88, f1, y M13. Debido a su estructura lineal, el fago filamentosos tiene una elevada permeabilidad a diferentes clases de membranas (Scott *et al.*, 1990) y siguiendo el tracto olfatorio, llega a la zona del hipocampo a través del sistema límbico para actuar en los sitios afectados. El tratamiento del fago filamentosos con cloroformo cambia la estructura lineal en circular, lo cual impide el suministro del fago al cerebro.

10 [0093] Aunque el fago filamentosos fd es una secuencia de fago particularmente preferente para su uso en la presente invención, debe tenerse en cuenta que todos los fagos filamentosos son muy similares y tienen la misma organización genética (Model *et al.*, 1988). Por lo tanto, los principios de la presente invención pueden aplicarse a cualquiera de los fagos filamentosos, como M13, f1 y otros.

15 [0094] Preferentemente, el vehículo de exposición es capaz de propagación en el destinatario. Por lo tanto, un vehículo de exposición de bacteriófago puede propagarse en la flora bacteriana, como *Escherichia coli* residente en el cuerpo del destinatario. Alternativamente, el vehículo de exposición puede ser una partícula no-propagable in vivo. Aunque se ha expresado la preocupación por la posible infección de la flora intestinal natural (Delmastro *et al.*, 1997; Willis *et al.*, 1993; y Poul *et al.*, 1999), la inactivación mediante UV del fago demostró (Delmastro *et al.*, 1997) que son tan inmunogénicos como sus homólogos infecciosos. El uso de fago desactivado puede impedir la incorporación de transgenes codificados del fago en el núcleo para la subsiguiente expresión en células huésped (Larocca *et al.*, 1998), una importante consideración práctica. Por lo tanto, de acuerdo con realizaciones alternativas preferentes, los vehículos de exposición empleados en la presente invención pueden ser replicantes y no replicantes.

20 [0095] La exposición de fago o virus implica la expresión de clones cADN como proteínas de fusión con fago o proteínas de envoltura de virus. Si los cADNs seleccionados para expresión codifican antígenos, el fago o virus puede ser empleado como un vehículo que presenta un antígeno, el cual puede opcionalmente replicar en el destinatario.

25 [0096] Los antígenos expuestos por un fago o virus pueden ser utilizados directamente para vacunación, sin purificación del antígeno. En este caso, el grueso de las proteínas de envoltura sirve para estimular una respuesta inmune general porque son "exógenas" con respecto al sujeto vacunado. La fusión de la proteína de envoltura-antígeno suscita un anticuerpo específico contra epítopos en el producto genético cADN expuesto.

30 [0097] De acuerdo con una realización preferente del producto antigénico utilizado en el compuesto inmunizante de acuerdo con la presente invención, el vehículo de exposición se selecciona de manera que menos de 30 días después de la introducción de una triple dosis de 10<sup>10</sup> unidades del mismo al destinatario, el título de anticuerpos en el destinatario es superior a 1:50.000, según ensayo ELISA.

35 [0098] Las vacunas/compuesto inmunizante de la invención pueden ser definidos como que comprenden un soporte, excipiente, adyuvante o agente auxiliar farmacéuticamente aceptable, junto con una cantidad de producto antigénico de la invención que es suficiente para producir una respuesta inmunológica. Una cantidad efectiva puede ser muy pequeña. Como se sabe, variará con el antígeno. Con el producto antigénico MAPS de esta invención, debido a la alta concentración de antígeno en un pequeño volumen molecular, será más baja que con las vacunas ordinarias que emplean los mismos antígenos. La cantidad que constituye una cantidad efectiva puede variar dependiendo de si la vacuna está pensada como primer tratamiento o como tratamiento de refuerzo.

40 [0099] Puede ser conveniente proporcionar los productos de esta invención en forma de polvo liofilizado listo para ser reconstituido con un soporte farmacéuticamente aceptable justo antes del uso.

45 [0100] En aplicaciones profilácticas, el compuesto inmunizante de la presente invención se administra a un sujeto/paciente susceptible de contraer, o con riesgo de contraer la enfermedad de Alzheimer, en una cantidad suficiente al principio de la enfermedad, incluyendo síntomas bioquímicos, histológicos y/o conductuales de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. Los individuos que tienen un riesgo genético conocido de enfermedad de Alzheimer incluyen aquellos que tienen parientes que han sufrido esta enfermedad y aquellos cuyo riesgo viene determinado por el análisis de marcadores genéticos o bioquímicos. Los marcadores genéticos de riesgo de enfermedad de Alzheimer incluyen mutaciones en el gen de la PPA, particularmente las mutaciones en las posiciones 717 y posiciones 670 y 671, conocidas como las mutaciones de Hardy y mutaciones suecas, respectivamente. En aplicaciones terapéuticas, el compuesto inmunizante de la invención se administra a un paciente del que se sospecha que sufre, o que ya está sufriendo la enfermedad de Alzheimer en una cantidad suficiente como para al menos detener los síntomas de la enfermedad de Alzheimer (bioquímicos, histológicos y/o conductuales), incluyendo sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Una cantidad adecuada para bloquear la

escisión de  $\beta$ -secretasa de la A $\beta$ PP e inhibir la formación de A $\beta$  está considerada una dosis efectiva. En el método para inducir una respuesta inmune contra el sitio de escisión de la  $\beta$ -secretasa de la A $\beta$ PP, el compuesto inmunizante de la presente invención se administra generalmente en varias dosis hasta que se ha alcanzado una respuesta inmune suficiente. Normalmente, se hace un seguimiento de la respuesta inmune y se repiten las dosis si la respuesta inmune comienza a disminuir.

[0101] Las dosis efectivas del compuesto inmunizante de la presente invención para inducir una respuesta inmune contra el sitio de escisión de la  $\beta$ -secretasa de la A $\beta$ PP varían en función de muchos factores diferentes, incluyendo los medios de administración, el sitio de destino, el estado fisiológico del paciente, si el paciente es humano o un animal, otras medicaciones administradas, y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Por lo general, el paciente es un humano, pero mamíferos no humanos incluyendo mamíferos transgénicos también pueden ser tratados. Las dosis de tratamiento necesitan ser tituladas para optimizar la seguridad y la eficacia. La cantidad de inmunógeno depende de si se administra también adyuvante, siendo probable que se necesiten dosis más altas si no hay adyuvante. La cantidad de 1-500  $\mu$ g por paciente y de manera más general de 5-500  $\mu$ g por inyección es lo utilizado para administración a humanos. Ocasionalmente, se utiliza una dosis más alta de 1-2 mg por inyección. Normalmente, se utiliza aproximadamente 10, 20, 50 o 100  $\mu$ g para cada inyección para humanos. La masa de inmunógeno también depende de la relación entre la masa del epítipo inmunogénico en el inmunógeno y la masa del inmunógeno en su totalidad. El calendario de inyecciones puede variar en gran medida desde una al día, a una al año, y una a la década. En cualquier día dado que se administra una dosis de inmunógeno, la dosis es mayor de 1  $\mu$ g/paciente y por lo general mayor de 10  $\mu$ g/paciente si también se administra adyuvante, y puede ser mayor de 10-100  $\mu$ g/paciente en ausencia de adyuvante. Un régimen típico consiste en una inmunización seguida de inyecciones de refuerzo a intervalos establecidos, como seis semanas. Otro régimen consiste en una inmunización seguida de inyecciones de refuerzo 1, 2 y 12 meses más tarde. Otro régimen entraña una inyección cada dos meses durante toda la vida. Alternativamente, se pueden aplicar inyecciones de refuerzo de manera irregular controlando la respuesta inmune.

[0102] El compuesto inmunizante de la presente invención para inducir/suscitar una respuesta inmune puede ser administrado por vía parenteral, tópica, intravenosa, oral, subcutánea, intra-arterial, intracraneal, intraperitoneal, intranasal o intramuscular para tratamiento profiláctico y/o terapéutico. La vía más típica de administración de un agente inmunogénico es la subcutánea aunque otras rutas pueden ser igual de efectivas. La siguiente vía más común es la inyección intramuscular. Este tipo de inyección se aplica normalmente en el brazo o en los músculos de la pierna.

[0103] El compuesto inmunizante de la invención puede a veces ser administrado en combinación con un adyuvante. Se puede utilizar una variedad de adyuvantes en combinación con el producto antigénico de la invención para suscitar una respuesta inmune. Los adyuvantes preferentes aumentan la respuesta intrínseca a un inmunógeno sin provocar cambios conformacionales en el mismo que afecten a la forma cualitativa de la respuesta. Los adyuvantes preferentes incluyen el hidróxido de aluminio y el fosfato de aluminio, monofosforil lípido A 3-de-O-acilato A (MPLTM) (ver GB 2220211, RIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton, Montana, ahora parte de Corixa). Stimulon<sup>TM</sup> QS-21 es un triterpeno glucósido o saponino aislado a partir de la corteza del árbol Quillaja Saponaria Molina que se encuentra en Sudamérica (ver Kensil *et al.*, 1995); Patente US No. 5,057,540 (Aquila BioPharmaceuticals, Framingham, MA). Otros adyuvantes son aceite en emulsiones de agua (como escualeno o aceite de cacahuete), opcionalmente en combinación con estimulantes inmunes, tales como monofosforil lípido A (ver Stoute *et al.*, 1997). Otro adyuvante es CpG (WO 98/401 00). De manera alternativa, el producto antigénico puede acoplarse a un adyuvante. Sin embargo, dicho acoplamiento no debería cambiar sustancialmente la conformación del epítipo como para afectar a la naturaleza de la respuesta inmune del mismo. Los adyuvantes pueden ser administrados como un componente de un compuesto inmunizante con el producto antigénico de la invención administrado por separado, antes, al mismo tiempo, o después de la administración del adyuvante.

[0104] Una clase preferente de adyuvante son las sales de aluminio (alum), como el hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, y sulfato de aluminio. Dichos adyuvantes pueden ser utilizados con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos como MPL o 3-DMP, QS-21, aminoácidos poliméricos o monoméricos como el ácido poliglútamico o polilisina. Otra clase de adyuvantes son las formulas de emulsiones aceite en agua. Dichos adyuvantes pueden ser utilizados con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos como muramil péptidos (por ej. N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina (tr-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutarninil-L-alanina-2-(1'-2'dipalmitoil-sn-glice-ro-3-hidroxfosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Al-D-isoglu-L-Ala-dipalmitoxi propilamida (DTP-DPP) teramida<sup>TM</sup>), u otros componentes de la pared celular bacteriana. Las emulsiones aceite en agua incluyen (a) MF59 (WO 90/14837), conteniendo 5% Escualeno, 0.5% Tween 80, y 0.5% Span 85 (opcionalmente contienen diversas cantidades de MTP-PE) formulado en partículas submicrónicas utilizando un microfluidizador como el microfluidizador Modelo 1 10Y (Microfluidics, Newton MA), (b) SAF, conteniendo 10% Escualeno, 0.4% Tween 80, 5% polímero plurónico bloqueado L121, y thr-MDP, o bien microfluidizado en una emulsión submicrónica o agitada para generar una emulsión de partículas más grandes, y (c) sistema adyuvante Ribit<sup>TM</sup> (RAS) (Ribi ImmunoChem, Hamilton, MT) conteniendo 2% Escualeno, 0.2% Tween 80, y uno o más componentes de la pared celular bacteriana a partir del grupo que consisten en 5 monofosforilípidos A (MPL), dimicolato de tiehalosa (TDM), y esqueleto de la pared celular (CWS), preferentemente MPL + CWS (Detox<sup>TM</sup>). Otra clase de adyuvantes preferentes es la de los adyuvantes saponinos, como Stimulon<sup>TM</sup> (QS-21,

Aquila, Framingham, MA) o partículas generadas a partir de ellos como ISCOMs (complejos inmunoestimulantes) e ISCOMATRIX. Otros adyuvantes incluyen el Adyuvante de Freund Completo (CFA), el Adyuvante de Freund Incompleto (IFA) y citoquinas, como interleucinas (IL-1, IL-2, and IL-12), factor estimulante de la colonia de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF).

[0105] Un adyuvante puede ser administrado con un inmunógeno como compuesto simple, o puede ser administrado antes, al mismo tiempo o después de la administración del inmunógeno. Inmunógeno y adyuvante pueden ser envasados y suministrados en el mismo vial o pueden ser envasados en viales separados y mezclados antes del uso. Inmunógeno y adyuvante son normalmente envasados con una etiqueta que indica la aplicación prevista. Si Inmunógeno y adyuvante son envasados por separado, el envase incluye normalmente instrucciones de mezcla antes del uso. La elección de un adyuvante y/o soporte depende de la estabilidad de la fórmula inmunogénica que contiene el adyuvante, la ruta de administración, el programa de dosificación, la eficacia del adyuvante para la especie que está siendo vacunada, y, en humanos, un adyuvante farmacéuticamente aceptable es uno que haya sido autorizado o sea autorizabile para administración a humanos por los organismos reguladores pertinentes. Por ejemplo, el Adyuvante de Freund Completo no es adecuado para su administración a humanos. Son preferibles Alum, MPL y QS-21. Opcionalmente, se pueden utilizar dos o más adyuvantes diferentes simultáneamente. Entre las combinaciones preferentes se incluyen alum con MPL, alum con QS-21, MPL con QS-21, y alum, QS-21 y MPL juntos. Igualmente, se puede utilizar el Adyuvante de Freund Incompleto (Chang *et al.*, 1998), de manera opcional en combinación con cualquiera de los presentes en QS-2, y WPL y todas las combinaciones de los mismos.

[0106] El producto antigénico de la presente invención se administra a menudo como compuestos farmacéuticos que comprenden un agente activo, es decir, el producto antigénico, y una variedad de otros componentes farmacéuticamente aceptables. Ver Remington's Pharmaceutical Science (15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1980). La forma preferente depende del modo previsto de administración y de aplicación terapéutica. Las composiciones también pueden incluir dependiendo de la fórmula deseada, soportes o diluyentes no tóxicos, farmacéuticamente aceptables, que se definen como vehículos normalmente utilizados para formular compuestos farmacéuticos para administración animal o humana. El diluyente se selecciona para que no afecte la actividad biológica de la combinación. Ejemplos de dichos diluyentes son agua destilada, solución salina fisiológica tamponada con fosfato, solución de Ringer, solución de dextrosa, y solución de Hank. Además, el compuesto o fórmula farmacéutica puede incluir también otros soportes, adyuvantes, o agentes auxiliares o estabilizadores no tóxicos, no terapéuticos, no inmunogénicos.

[0107] Los compuestos farmacéuticos pueden incluir también macromoléculas grandes lentamente metabolizadas como proteínas, polisacáridos como el quitosán, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos y copolímeros (como sefarsa funcionalizada con latex<sup>TM</sup>, agarosa, celulosa), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, y agregados lípidos (como gotitas de aceite o liposomas). Adicionalmente, estos soportes pueden funcionar como agentes inmunoestimulantes (es decir, adyuvantes).

[0108] Para administración parenteral, el producto antigénico de la presente invención puede ser administrado como dosis inyectables de una solución o suspensión de la sustancia en un diluyente fisiológicamente aceptable con un soporte farmacéutico que puede ser un líquido estéril como aceites en agua, salino, glicerol, o etanol. Adicionalmente, sustancias auxiliares, como agentes humidificantes o emulsionantes, surfactantes, sustancias amortiguadoras del pH pueden estar presentes en las composiciones. Otros componentes de compuestos farmacéuticos son los de origen animal, vegetal, sintético o derivados del petróleo, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de semillas de soja, y aceite mineral. En general, los glicoles como el propilen glicol o polietilenglicol son soportes líquidos preferentes, particularmente para inyecciones inyectables.

[0109] Normalmente, los compuestos se preparan como inyectables, bien como soluciones líquidas o como suspensiones; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección. El preparado también puede ser emulsionado o encapsulado en liposomas o micropartículas como ácido poliláctico, poliglicolatos o copolímeros para aumentar el efecto adyuvante como se ha tratado anteriormente (ver Langer, 1990 y Hanes, 1997).

[0110] Los pacientes susceptibles de tratamiento incluyen a los individuos con riesgo de padecer la enfermedad de Alzheimer pero que no muestran síntomas, así como pacientes que actualmente muestran síntomas. Prácticamente todo el mundo corre el riesgo de padecer la enfermedad de Alzheimer si vive largo tiempo. Por lo tanto, el presente producto antigénico puede ser administrado de manera profiláctica a la población en general sin necesidad de ninguna evaluación de riesgo en el paciente. Los presentes métodos son especialmente útiles para individuos que tienen un riesgo conocido de enfermedad de Alzheimer. Dichos individuos incluyen aquellos que tienen pacientes que han sufrido esta enfermedad y aquellos cuyo riesgo se determina por análisis de marcadores genéticos o bioquímicos. Los marcadores genéticos de riesgo de enfermedad de Alzheimer incluyen mutaciones en el gen APP, en particular mutaciones en la posición 717 y posiciones 670 y 671 denominadas mutaciones de Hardy mutación EA familiar sueca respectivamente. Otros marcadores de riesgo son mutaciones en los genes presenilinas, PS1 y PS2, y ApoE4, historial familiar con EA, hipercolesterolemia o aterosclerosis. Los individuos que actualmente sufren de la EA pueden ser reconocidos por las características de demencia, así como por la presencia de factores de riesgo descritos arriba. Además, existe una serie de pruebas de diagnóstico para identificar individuos que tienen EA. Esta

incluyen la medición de la tau en el fluido cerebroespinal y los niveles A $\beta$ 42. Una tau elevada y niveles bajos de A $\beta$ 42 significan la presencia de EA. Los individuos que sufren de la enfermedad de Alzheimer también pueden ser diagnosticados mediante los criterios ADRDA.

5 [0111] En pacientes asintomáticos, el tratamiento puede comenzar a cualquier edad (por ej., 10, 20, 30). Sin embargo, por lo general, no es necesario comenzar el tratamiento hasta que un paciente alcanza la edad de 40, 50, 60 o 70. El tratamiento entraña de manera general múltiples dosis durante un periodo de tiempo. El tratamiento puede ser controlado mediante el ensayo de anticuerpos, o respuestas de las células B al producto antigénico de la presente invención a lo largo del tiempo. Si la respuesta declina, lo indicado es aplicar una dosis de refuerzo. En el caso de pacientes con síndrome de Down potencial, el tratamiento puede comenzar antenatalmente administrando agente terapéutico a la madre o poco después del nacimiento.

10 [0112] Se suministran métodos para detectar una respuesta inmune contra el sitio de escisión de la  $\beta$ -secretasa de la A $\beta$ PP en un paciente que sufre de o es susceptible de padecer la EA. Los métodos son particularmente útiles para controlar un tratamiento que está siendo administrado a un paciente. Los métodos pueden ser utilizados para controlar tanto el tratamiento terapéutico en pacientes sintomáticos y el tratamiento profiláctico en pacientes asintomáticos controlando los anticuerpos producidos en respuesta a la administración de un inmunógeno.

15 [0113] Algunos métodos entrañan determinar un valor de referencia de una respuesta inmune en un paciente antes de administrar una dosis del producto antigénico, y compararlo con el valor de la respuesta inmune después del tratamiento. El incremento significativo (es decir, mayor que el margen típico de error experimental en mediciones repetidas de la misma muestra, expresado como una desviación estándar de la media de dichas mediciones) del valor de la respuesta inmune es señal de un resultado positivo del tratamiento (es decir, que la administración del agente ha alcanzado o aumentado la respuesta inmune). Si el valor de la respuesta inmune no cambia significativamente, o disminuye, es señal de un resultado negativo del tratamiento. En general, se espera que los pacientes sometidos a un tratamiento inicial con un agente inmunogénico muestren un incremento de la respuesta inmune tras dosis sucesivas, hasta alcanzar finalmente un punto muerto. La administración del agente suele continuar mientras aumenta la respuesta inmune. Alcanzar el punto muerto es un indicador de que la administración del inmunógeno puede ser interrumpida o reducida en dosis o frecuencia.

20 [0114] En otros métodos, se determina un valor de control (es decir, una media y una desviación estándar) de la respuesta inmune para la población de control. Normalmente, los individuos de la población de control no han recibido un tratamiento previo. Los valores medidos de respuesta inmune en un paciente después de administrarle el producto antigénico se comparan a continuación con el valor de control. Un incremento significativo relativo al valor de control (por ejemplo, mayor que una desviación estándar de la media) indica un resultado positivo del tratamiento. La falta de incremento significativo o un descenso indica un resultado negativo del tratamiento. La administración del agente continúa por lo general mientras la respuesta inmune aumenta con relación al valor de control. Como antes, alcanzar un punto muerto con relación a los valores de control es un indicador de que la administración del tratamiento puede ser interrumpida o reducida su dosis o su frecuencia.

25 [0115] En otros métodos, se determina un valor de control de la respuesta inmune (por ejemplo, una media y una desviación estándar) a partir de una población de control de individuos que han sido sometidos al tratamiento con el producto antigénico y cuyas respuestas inmunes han alcanzado un punto muerto en respuesta al tratamiento. Los valores medidos de la respuesta inmune en un paciente son comparados con el valor de control. Si el nivel medio en un paciente no es significativamente diferente (por ej. más de una desviación estándar) del valor de control, el tratamiento puede ser interrumpido. Si el nivel en un paciente se encuentra significativamente por debajo del valor de control, la continuación de la administración está garantizada. Si el nivel en el paciente sigue estando por debajo del valor de control, puede estar indicado un cambio en el régimen del tratamiento, por ejemplo, el uso de un adyuvante diferente.

30 [0116] En otros métodos, se controla la respuesta inmune en un paciente que no está actualmente recibiendo tratamiento pero ha sufrido un tratamiento anterior para determinar si es necesario reanudar el tratamiento. El valor medido de la respuesta inmune en el paciente puede ser comparada con el valor de la respuesta inmune previamente alcanzado en el paciente después de un tratamiento previo. Un descenso significativo con respecto a la medición anterior (es decir, mayor que un margen típico de error en mediciones repetidas de la misma muestra) es una indicación de que el tratamiento puede ser reanudado. Alternativamente, el valor medido en un paciente puede ser comparado con un valor de control (media más desviación estándar) determinado en una población de pacientes después de ser sometidos al tratamiento. Alternativamente, el valor medido en un paciente puede ser comparado con un valor de control en poblaciones de pacientes tratados profilácticamente que permanece libre de síntomas de enfermedad, o poblaciones de pacientes tratados terapéuticamente que muestran una mejora de las características de la enfermedad. En todos estos casos, una disminución significativa con respecto al nivel de control (es decir, más de una desviación estándar) es un indicador de que el tratamiento debería ser reanudado en un paciente.

35 [0117] La muestra de tejido para análisis es normalmente sangre, plasma, suero, mucosa o fluido cerebrospinal del paciente. La muestra es analizada como indicación de una respuesta inmune al producto antigénico. La respuesta inmune puede ser determinada a partir de la presencia de anticuerpos que se unen específicamente al sitio de



escisión de la  $\beta$ -secretasa de la A $\beta$ PP, es decir, ELISA.

5 [0118] Otro aspecto de la presente invención hace referencia a los anticuerpos cultivados contra el epítipo de la A $\beta$ PP que recubre el sitio de escisión de la  $\beta$ -secretasa de la A $\beta$ PP transportados en el compuesto inmunizante de acuerdo con la presente invención y a las moléculas que incluyen la porción que se une al antígeno de dichos anticuerpos.

10 [0119] Debe quedara entendido que cuando se utiliza el término "anticuerpos" con respecto a las realizaciones de anticuerpos de la presente invención, se pretende incluir anticuerpos intactos, como anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales (mAbs), así como fragmentos proteolíticos de los mismos como fragmentos Fab o F(ab')<sub>2</sub>. Además, el ADN que codifica la región variable del anticuerpo puede ser insertado en otros anticuerpos para producir anticuerpos quiméricos (ver, por ejemplo, Patente U.S. 4,816,567) o en receptores de células T para producir células T con la misma especificidad (ver Eshhar, *et al.*, 1990 y Gross *et al.*, 1989). También pueden ser producidos y utilizados anticuerpos monocatenarios. Los anticuerpos monocatenarios pueden ser polipéptidos compuestos monocatenarios que tienen capacidad de unirse a antígenos y comprenden un par de secuencias de aminoácidos homólogas o análogas a las regiones variables de una cadena pesada y ligera de inmunoglobulina (VH-VL enlazado o FV monocatenario). Ambos VH y VL pueden copiar secuencias de anticuerpos monoclonales naturales o una o ambas cadenas pueden comprender un constructo CDR-FR del tipo descrito en la Patente U.S. 5,091,513. Los polipéptidos separados análogos a las regiones variables de las cadenas ligera y pesada son mantenidos juntos por un enlace polipéptido. Se pueden diseñar métodos de producción de dichos anticuerpos monocatenarios, particularmente cuando se conocen las estructuras polipeptídicas que codifican ADN de las cadenas VH y VL de acuerdo con los métodos descritos, por ejemplo en las Patentes U.S. 4,946,778, 5,091,513 and 5,096,815.

25 [0120] Se dice que un anticuerpo es "capaz de unir" una molécula si es capaz de reaccionar específicamente con la molécula para con ello unir la molécula al anticuerpo. El término "epítipo" se refiere a que es parte de cualquier molécula capaz de ser enlazada por un anticuerpo que puede también ser reconocida por ese anticuerpo. Epitopos o "determinantes antigénicos" consisten por lo general en agrupamientos de superficie químicamente activa de moléculas tales como cadenas laterales de azúcares o aminoácidos y tienen características tridimensionales específicas así como características específicas de carga.

30 [0121] Los anticuerpos policlonales son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpos derivadas del suero de animales inmunizados con un antígeno.

35 [0122] Los anticuerpos monoclonales (mAbs) son una población sustancialmente homogénea de anticuerpos para antígenos específicos. Los MAb pueden obtenerse por métodos conocidos para los expertos en la técnica. Ver por ejemplo Kohler *et al.*, (1975); Patente U.S. No. 4,376,110; Harlow *et al.*, (1988); y Colligan *et al.*, (2001). Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, y cualquier subclase de ellos. El hibridoma que produce los mAbs de esta invención puede ser cultivado *in vitro* o *in vivo*. Se pueden obtener títulos elevados de mAbs por producción *in vivo* donde células de hibridomas individuales son inyectadas intraperitonealmente en ratones Balb/c estimulados con pristano para producir líquido ascítico que contiene elevadas concentraciones de los mAbs deseados. Isotipos de MAb IgM o IgG pueden ser purificados de tales líquidos ascíticos o a partir de sobrenadantes, utilizando métodos de cromatografía de columna bien conocidos por los expertos en la técnica.

50 [0123] Los anticuerpos quiméricos son moléculas, cuyas diferentes porciones derivan de diferentes especies animales, como las que tienen una región variable derivada de un mAb de murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos quiméricos se utilizan fundamentalmente para reducir la inmunogenicidad durante la aplicación y para incrementar las cantidades de producción, por ejemplo, donde los mAbs de murinos tienen producciones más altas de hibridomas pero mayor inmunogenicidad en humanos, por lo que se utilizan esos mAbs quiméricos o humanizados de murino/humano. Anticuerpos quiméricos y humanizados y métodos para su producción son bien conocidos en la técnica, como Cabilly *et al* (1984), Morrison *et al* (1984), Boulianne *et al* (1984), Cabilly *et al.*, Patente Europea 0 125 023 (1984), Neuberger *et al* (1985), Taniguchi *et al.*, Patente Europea 0 171 496 (1985), Morrison *et al.*, Patente Europea 0 173 494 (1986), Neuberger *et al.*, WO 8601533 (1986), Kudo *et al.*, Patente Europea 0 184 187 (1986), Sahagan *et al* (1986); Robinson *et al.*, WO 9702671 (1987), Liu *et al* (1987), Sun *et al* (1987), Better *et al* (1988), y Harlow *et al* (1988).

60 [0124] Una "molécula que incluye la porción de unión al antígeno de un anticuerpo," tiene la finalidad de incluir no solo moléculas de inmunoglobulina intacta de cualquier isótopo y generadas por cualquier línea celular o microorganismo, o generadas *in vitro*, como por tecnología de exposición de fagos para construir anticuerpos recombinantes, sino también la fracción reactiva de unión al antígeno de las mismas, incluyendo no exhaustivamente, el fragmento Fab, el fragmento Fab', el fragmento F(ab')<sub>2</sub>, la porción variable de sus cadenas ligeras y/o pesadas, y anticuerpos quiméricos o monocatenarios que incorporan dicha fracción reactiva, o moléculas desarrolladas para suministrar porciones terapéuticas por medio de una parte de la molécula que contiene dicha fracción reactiva. Dichas moléculas pueden ser suministradas por cualquier técnica conocida, incluyendo, aunque no

de manera exhaustiva, escisión enzimática, síntesis de péptidos o técnicas recombinantes.

5 [0125] Un creciente corpus de pruebas muestra que los déficits olfativos y cambios degenerativos en las vías olfativas se producen en fases tempranas del curso clínico de la EA. Además, los patrones anatómicos implicados en la EA sugieren que la vía olfatoria puede ser la etapa inicial en el desarrollo de la EA.

10 [0126] Las neuronas receptoras olfatorias son células bipolares que residen en el revestimiento epitelial de la cavidad nasal. Sus axones atraviesan la placa cribiforme y se proyectan en la primera sinapsis de la vía olfatoria en el bulbo olfatorio del cerebro. Los axones de neuronas olfatorias del epitelio nasal forman haces de 1000 fibras amielínicas. Esta configuración las convierte en una autopista por la que los virus y otras sustancias transportadas pueden acceder al SNC a través de la barrera sanguínea cerebral.

15 [0127] En las etapas tempranas de la EA, la barrera sanguínea cerebral puede limitar la entrada de anticuerpos circulando por la periferia del SNC. En cambio, anticuerpos o moléculas monocatenarios que tengan una parte de un anticuerpo que se fija a antígenos dirigida contra un epítipo que recubre el sitio de escisión de la  $\beta$ -secretasa de la A $\beta$ PP, los cuales anticuerpos o moléculas expuestos en una superficie de fago tienen el potencial no sólo de ser directamente suministrados al SNC por administración intranasal sino también de prevenir el daño permanente olfatorio por A $\beta$  en los pacientes. Como se ha indicado previamente, la administración intranasal (Mathison *et al.*, 1998; Chou *et al.*, 1997 y Draghia *et al.*, 1995) posibilita la entrada directa de virus y macromoléculas en el fluido cerebroespinal o en el sistema nervioso central.

20

[0128] El empleo de neuronas receptoras olfatorias como punto de suministro de un vector adenoviral al cerebro está recogido en la literatura. Según se dice este método provoca la expresión de un gen reportero en el cerebro durante 12 días sin toxicidad aparente (Draghia *et al.*, 1995).

25

[0129] Por lo tanto, de acuerdo con el método de inmunización pasiva se suministra a través de esta ruta al cerebro un vehículo que expone una parte inmunológica que se fija a antígenos de un anticuerpo capaz de bloquear el sitio de escisión de la  $\beta$ -secretasa de la A $\beta$ PP.

30 [0130] Como los A $\beta$  son producidos continuamente por células en tejidos periféricos que atraviesan la barrera sanguínea cerebral (BBB) produciendo efectos tóxicos localizados en poblaciones neuronales específicas, la administración intranasal de dicho vehículo puede prevenir también la progresión de la enfermedad minimizando la cantidad de A $\beta$  periféricos disponibles para formar placas.

35 [0131] La exposición de anticuerpos en virus o fagos se realiza, por ejemplo, fusionando la secuencia de codificación de las regiones variables del anticuerpo a una proteína de envoltura de virus o fago. Para ello, el mRNA de regiones (V) variables (VH y VL) aislado a partir de células que producen anticuerpos es transcrito inversamente en el cADN, y cadenas ligeras y pesadas montadas aleatoriamente para codificar Fv monocatenario (scFv). Estas cassettes son clonadas directamente en un vector adecuado como un vector fagómida para expresión y exposición en la superficie del fago o del virus. Esta conexión entre genotipo y fenotipo de anticuerpo permite el enriquecimiento del fago específico de antígenos o anticuerpos virales, utilizando antígenos etiquetados o inmovilizados. Fagos o virus que exponen un anticuerpo relevante serán retenidos en una superficie revestida con antígeno, mientras que fagos o virus no adherentes serán eliminados. Los virus o fagos fijados pueden ser recuperados de la superficie, re infectados en células huésped adecuadas y re-cultivados para seguir enriqueciéndolos y finalmente para análisis de fijación.

40

45

[0132] El éxito de la exposición de anticuerpos en virus o en fagos radica en la combinación de este método de exposición y enriquecimiento. Los genes de anticuerpos en virus o fagos pueden ser secuenciados, mutados y filtrados para mejorar la fijación de antígenos.

50

[0133] Es posible reordenar los genes que codifican las diversas regiones de una molécula de anticuerpo de manera que su especificidad y afinidad para un antígeno se alteren. El anticuerpo puede ser mantenido en la superficie del fago o virus para posterior manipulación o ser liberado como fragmento scFv (~25 kDa) soluble.

55 [0134] Desde su invención a principios de la década de 1990, la exposición de fagos para seleccionar anticuerpos ha revolucionado la generación de anticuerpos monoclonales y su fabricación. Esto se debe a que la exposición de fagos permite que los anticuerpos sean fabricados completamente *in vitro*, evitando el sistema inmune y el procedimiento de inmunización y permitiendo el diseño *in vitro* de la afinidad y especificidad del anticuerpo. Está por lo tanto previsto que las estrategias más eficientes para el desarrollo de nuevas vacunas empleen esta tecnología.

60

[0135] Se puede añadir características adicionales al vector para garantizar su seguridad y/o mejorar su eficacia terapéutica. Dichas características incluyen, por ejemplo, marcadores que pueden ser utilizados para seleccionar negativamente células infectadas con el virus recombinante como la sensibilidad antibiótica. La selección negativa es por lo tanto un medio por el que la infección puede ser controlada porque proporciona el suicidio inducible mediante la adición de antibiótico. Dicha protección garantiza que si, por ejemplo, surgen mutaciones que producen formas alteradas del vector viral o secuencia recombinante, no se producirá la transformación celular. También

65

pueden incluirse características que limiten la expresión a tipos particulares de células. Dichas características incluyen, por ejemplo, elementos reguladores y promotores que son específicos para el tipo de célula deseado.

5 [0136] Los virus son agentes infecciosos muy especializados que han evolucionado, en muchos casos, para eludir los mecanismos de defensa del huésped. Normalmente, los virus infectan y se propagan en tipos de células específicos. La especificidad de focalización de vectores virales utiliza su célula infectada.

10 [0137] El suministro directo al cerebro de anticuerpos logra cruzar la barrera cerebral sanguínea utilizando neuronas olfatorias como transportadoras al cerebro. En el epitelio olfatorio, las dendritas de las neuronas olfatorias primarias están en contacto con el lumen nasal, y a través de los axones, estas neuronas están también conectadas a los bulbos olfatorios del cerebro. Los fagos que entran en contacto con el epitelio olfatorio pueden ser recogidos en las neuronas olfatorias primarias y ser transportados a los bulbos olfatorios e incluso más allá a otras áreas del cerebro.

15 [0138] Otro aspecto de la presente invención proporciona un compuesto farmacéutico que contiene un soporte, excipiente, diluyente o agente auxiliar farmacéuticamente aceptable y el vehículo de exposición viral que muestra en su superficie un anticuerpo monocatenario dirigido contra un epítipo que recubre el sitio de escisión de la  $\beta$ -secretasa de la A $\beta$ PP.

20 [0139] Habiendo descrito la invención de manera general, la misma será más fácilmente comprendida haciendo referencia al siguiente ejemplo.

### Ejemplo

#### Materiales y resultados

25

#### Inmunización:

[0140] 3 grupos de ratones Balb/c fueron inyectados con 3 péptidos conjugados con MAP (octa-ramificados):

30 ISEVKMDA (residuos 1-8 de SEQ ID NO:1, donde el residuo 6 es Met), VKMDAEFRH (SEQ ID NO:5) e ISEVKLDA (residuos 1-8 de SEQ ID NO:1, donde el residuo 6 es Leu). La solución madre (2 mg/ml) se prepara como sigue: 1000  $\mu$ l de agua destilada doble (DDW), 665  $\mu$ l de adyuvante de Freund (adyuvante de Freund completo en la primera inyección y el adyuvante de Freund incompleto en las inyecciones siguientes) y 335  $\mu$ l de solución madre de péptido. 300  $\mu$ l de la solución de vacunación (compuesto inmunizante) fueron inyectados en cada ratón cada dos semanas después de la inyección inicial. La respuesta inmune más elevada obtenida contra MAP-ISEVKLDA está indicada en la Fig. 3.

35

#### Procedimiento ELISA para cuantificación del título de IgG:

40 [0141] Placas ELISA de 96 pocillos fueron revestidas con solución madre de péptido a 50  $\mu$ l/pocillo a una dilución de 1:500 en solución tampón de revestimiento (0,1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 9,6) e incubadas durante la noche a 4 °C. Las placas fueron lavadas con 2xPBS (0,05% TWEEN) y 2xPBS, bloqueadas con 180  $\mu$ l/pocillo en leche/PBS al 3% e incubadas durante 1,5 hr a 37 °C. Diluciones de suero en 50  $\mu$ l/pocillo en leche/PBS al 1% fueron incubadas durante 1 hr a 37 °C, luego lavadas de nuevo con 50  $\mu$ l/pocillo de IgG de ratón  $\alpha$  (H+L)HRP conjugadas con dilución de 1:5000 en leche/PBS al 1% incubadas durante 1 hr a 37 °C. Lavados adicionales contenían PBS (0,05% TWEEN) y finalmente el tiempo fue de 5 - 10 minutos y luego fueron detenidos por la adición de 4 M HCl 25  $\mu$ l/pocillo.

45

#### Línea de células:

50 [0142] Se cultivaron células (CHO) de ovario de hámster chino-cultivo celular en medio de Eagle modificado de Dulbecco (F-12) conteniendo suero fetal de ternero al 10% (FCS) y 2,5mM L-glutamina. Se generaron líneas de células CHO establemente transfectadas expresando la A $\beta$ PP 751 de tipo salvaje con vector de expresión pCMV751 utilizando transfección mediada por Lipofectina (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) y seleccionadas por resistencia a G418. Luego se sembró una placa de 6 pocillos con 2,5 x 10<sup>6</sup> a 4 x 10<sup>6</sup> de células de cada línea de células transfectada. Después de incubarla durante toda la noche, se añadió medio libre de suero a cada pocillo y luego las células fueron incubadas en una solución del sitio de escisión de anti- $\beta$ -secretasa en suero de A $\beta$ PP y suero de ratón no inyectado como control, luego incubada durante 48 h. Se recogieron medios de cada pocillo y se sometieron a ELISA.

55

#### ELISA sándwich de dos sitios:

60 [0143] Se utilizó un ELISA sándwich-dos sitios para medir la producción y secreción de  $\beta$ -amiloides de las células antes indicadas tratadas y no tratadas con suero. El anticuerpo anti-A $\beta$  monoclonal 266 fue utilizado como anticuerpo de captura. Placas de 96 pocillos fueron revestidas con una solución de 266 (0,1  $\mu$ g/pocillo) y tampón carbonato 0,1M (0,1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 9,6), e incubadas durante la noche a 4 °C. Las placas fueron lavadas con 2xPBSt (0,05% TWEEN) y 2xPBS, y posteriormente bloqueadas con BSA/PBS al 3% 180  $\mu$ l/pocillo e incubadas durante

65

2,5 hr a 37°C, luego lavadas como se ha indicado arriba. Para detección se utilizó anticuerpo 6C6 anti-A $\beta$  monoclonal biotinilado (125 ng/pocillo) para los A $\beta$  totales y anticuerpo 8G7 anti-A $\beta$ 1-42 monoclonal biotinilado (25 ng/pocillo) para A $\beta$ 1-42 específicos, ambos en BSA/PBS al 1%. Se lavaron las placas y se añadió fosfatasa alcalina conjugada con avidina (Sigma, St. Louis, MO) (1 $\mu$ g/pocillo) durante 2 hr a temperatura ambiente, luego se lavaron en 3xPBSt (0.05% TWEEN) y 4xPBS. Se utilizó el sustrato p-nitrofenilfosfato (PnPP: Sigma) como sistema reportero. La reacción se hizo con 50  $\mu$ l/pocillo (15 ml) de tampón dietanolamina con PnPP 30 mg. Se examinó la fluorescencia de PnPP a una longitud de onda de 405 nm. Para la construcción de curvas estándar se preparó el estándar de A $\beta$  (1-28) y estándar A $\beta$  (1-42) en presencia de inhibidores de proteasa y BSA al 1% en medio libre de suero o tampón de extracción (Fig. 4). La Fig. 4 muestra la inhibición de la secreción total de péptidos  $\beta$  amiloides (A $\beta$ ) a los medios de cultivo medida por ELISA.

#### Cuantificación de A $\beta$ intracelulares (1-42)

[0144] Se recogieron células CHO de cada pocillo utilizando raspador de células en sus medios de cultivo. Los medios recogidos fueron centrifugados a 3000g durante 2 min, las células recogidas fueron lavadas con PBS y centrifugadas dos veces. Las células fueron suspendidas en 100  $\mu$ l de ácido fórmico al 70% y sonicadas durante 10 segundos con sonicador de sonda. La solución fue centrifugada a 100,000g durante 20 min a 4°C para eliminar el material insoluble; el sobrenadante fue neutralizado con 1,9 ml de 1 M TRIS. Se diluyeron muestras de esta solución 1:3 en H<sub>2</sub>O y 300  $\mu$ l de ella fueron añadidos para el ELISA, como se describe arriba. Solo después de 5 días de incubación, se encontró una considerable inhibición de la acumulación de A $\beta$  (1-42), según se midió con ELISA (Fig. 5).

#### Microscopia confocal para co-localización del complejo A $\beta$ PP anticuerpos en suero con BACE ( $\beta$ -secretasa) en las células:

[0145] Se cultivaron células CHO expresando un exceso de A $\beta$ PP 751 durante 24 hr en placas de 6 pocillos, lavadas con 3xPBS y fijadas con paraformaldehído al 4% (en PBS) durante 30 min a temperatura ambiente. Se lavaron las células como se ha indicado arriba y se permeabilizaron añadiendo TRITON-100 al 0,3 % en BSA/PBS al 1% durante 5 min, y se lavaron luego con 3x(BSA/PBS) al 0,5%. La fijación no específica con suero de conejo 1:150 durante 2 horas fue seguida del lavado tal como se describe más arriba. Se añadió sitio de escisión de anti- $\beta$ -secretasa en suero de A $\beta$ PP o  $\alpha$ -BACE1 (obtenido contra la propia enzima de la  $\beta$ -secretasa y suministrado por Calbiochem, San Diego, CA), en dilución de 1:2000, seguido de incubación durante 2 horas, lavado tal como se describe arriba y sujeto a anticuerpo secundario, como sigue: Cy3-ratón- $\alpha$  para sitio anti- $\beta$ -secretasa en suero de A $\beta$ PP y/o FITC-conejo- $\alpha$  para  $\alpha$ -BACE1. En la Fig. 6, la microscopia confocal del sitio de escisión de anti- $\beta$ -secretasa en anticuerpos A $\beta$ PP y anticuerpos BACE mostraron co-localización (puntos claros) en la región perinuclear celular.

#### Microscopia de inmunofluorescencia para ensayo de internalización de anticuerpos contra el sitio de escisión de la $\beta$ -secretasa:

[0146] Se cultivaron células CHO expresando un exceso de A $\beta$ PP 751 durante 24 hr en placas de 6 pocillos. Después del lavado, se añadieron nuevos medios conteniendo sitio de escisión de anti- $\beta$ -secretasa en suero de A $\beta$ PP en dilución de 1:500. Se incubaron células durante 30 min y se lavaron luego con 3xPBS y fijaron con paraformaldehído al 4% (en PBS) durante 30 min a temperatura ambiente. Las células se lavaron como se ha indicado más arriba y dividieron en células permeabilizadas añadiendo TRITON-100 al 0,3 % en BSA/PBS al 1% e incubaron durante 5 min. Como control, se lavaron células no tratadas con 3x(BSA/PBS) al 0,5%. La etapa de bloqueo se realizó con BSA al 3% durante 2 hr seguida de la etapa de lavado como se indica arriba. Se incubaron anticuerpos secundarios durante 1 hr a temperatura ambiente en la oscuridad, después de lo cual fueron lavados con 3xPBS y montados con el kit anti-fade ProLong (Sondas Moleculares, Eugene, OR). La Fig. 7A muestra la inmunotinción del anticuerpo de la A $\beta$ PP del sitio de escisión de anti- $\beta$ -secretasa después de fijación y permeabilización. La Fig. 7B es el control.

#### Inhibición de la formación de placas en ratones transgénicos para la A $\beta$ PP:

[0147] 6 ratones fueron inmunizados como se describe más arriba y 3 ratones fueron utilizados como control. Después de cinco meses de inmunización, los ratones fueron sacrificados y cortes del cerebro fueron sometidos a tinción de placas protocolo ThS estándar. Se contó el número de placas mediante examen microscópico y se observó una reducción del número de placas en ratones transgénicos inmunizados con el antígeno en comparación con ratones no tratados (Fig. 8)

#### **Referencias**

[0148]

Banks *et al.*, "Bidirectional passage of peptides across the blood-brain barrier", *Prog Brain Res.* 91:139-148 (1992)

- Better *et al.*, "Escherichia coli secretion of an active chimeric antibody fragment", *Science* 240:1041-1 043 (1988)
- 5 Bluthner *et al.*, "Mapping of epitopes recognized by PM/Sc1 autoantibodies with gene-fragment phage display libraries", *J Immunol Methods* 198:187-1 98 (1996)
- Bobo *et al.*, "Convection-enhanced delivery of macromolecules in the brain", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91:2076-2080 (1994)
- 10 Bonnycastle *et al.*, "Probing the basis of antibody reactivity with a panel of constrained peptide libraries displayed by filamentous phage. *J Mol Biol.*, 24;258(5):747-62 (1996)
- 15 Broadwell, "Transcytosis of macromolecules through the blood-brain barrier: a cell biological perspective and critical appraisal", *Acta Neuropathol.*, 79: 117-128 (1989)
- Cabilly *et al.*, "Generation of antibody activity from immunoglobulin polypeptide chains produced in *Escherichia coli.*" *Proc Natl Acad Sci USA* 81:3273-3277 (1984)
- 20 Chang *et al.*, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 32:173-1 86 (1998)
- Colligan *et al.*, *Current Protocols in Immunology*, Green Publishing Assoc., and Wiley Interscience, New York (2001)
- 25 Cortese *et al.*, "Epitope discovery using peptide libraries displayed on phage", *Trends Biotechnol* 12:262-267 (1994)
- Cortese *et al.*, "Identification of biologically active peptides using random libraries displayed on phage", *Curr Opin Biotechnol* 6:73-80 (1995)
- 30 Cortese *et al.*, "Selection of biologically active peptides by phage display of random peptide libraries. *Curr Opin Biotechnol* 7:616-621 (1996)
- 35 Cwirla *et al.*, "peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands", *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 6378-6382 (1990)
- DeFoort *et al.*, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 40:214-221 (1992)
- 40 Dotto *et al.*, "The functional origin of bacteriophage f1 DNA replication: Its Signal and domains", *J Mol Biol* 172: 507-521 (1984)
- Dower WJ, "Phage power", *Curr Biol* 2:251-253 (1992)
- 45 Ermisch, "Peptide receptors of the blood-brain barrier and substrate transport into the brain", *Progress in Brain Research*, 91:155-161 (1992)
- Eshhar *et al.*, "Chimeric T cell receptor which incorporates the anti-tumour specificity of a monoclonal antibody with the cytolytic activity of T cells: a model system for immunotherapeutical approach", *Br J Cancer Suppl*, 10:27-29 (1990)
- 50 Felici *et al.*, "Selection of antibody ligands from a large library of oligopeptides expressed on a multivalent exposition vector", *J Mol Biol* 222:301-310 (1991)
- 55 Frenkel D., "N-terminal EFRH sequence of Alzheimer's  $\beta$ -amiloide peptide represents the epitope of its anti-aggregating antibodies", *J. Neuroimmunol.*, 88:85 90 (1998)
- Frenkel, D., Solomon, B. and Benhar, I. Modulation of Alzheimer's  $\beta$ -amiloide neurotoxicidad by site-directed single-chain antibody. *J Neuroimmunol*, 106:23-31 (2000a).
- 60 Frenkel, D., Katz, O. and Solomon, B. Immunization against Alzheimer's  $\beta$ -amiloide plaques via EFRH phage administration. *PNAS* 97, 21, 11455-11459 (2000b).
- Frenkel, D., Kariv, N. and Solomon, B. Generation of autoantibodies towards Alzheimer's disease vaccination. *Vaccine* 19, 2615-2619 (2001).
- 65 Goldsmith *et al.*, "Adsorption protein of bacteriophage fd: Isolation, molecular properties, and location in

- virus", *Biochemistry* 16:2686-2694 (1977)
- Gray et al "Adsorption complex of filamentous fd virus", *J Mol Biol* 146:621-627 (1981)
- 5 Greenwood *et al.*, "Multiple display of foreign peptides on a filamentous bacteriophage", *J Mol Biol* 220:821-827 (1991)
- Gross *et al.*, "Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity", *Proc Natl Acad Sci USA*, 86:10024-10028 (1989)
- 10 Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1988)
- Hoess *et al.*, "Identification of a peptide which binds to the carbohydrate-specific monoclonal antibody B3", *Gene* 128:43-49 (1993)
- 15 Holliger *et al.*, "A conserved infection pathway for filamentous bacteriophages is suggested by the structure of the membrane penetration domain of the minor coat protein g3p from fago fd", *Structure* 5:265-275 (1997)
- 20 Iannolo *et al.*, "Modifying filamentous phage capsid: limits in the size of the major capsid protein", *J. Mol. Biol.*, May 1 2;248(4):835-44 (1995)
- Johansson, "Experimental models of altering the blood-brain barrier", *Progress in Brain Research*, 91:171-175 (1992)
- 25 Kay *et al.*, "An M13 phage library displaying 38-amino-acid peptides as a source of novel sequences with affinity to selected targets", *Gene* 128:59-65 (1993)
- Kensil *et al.*, *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (1995)
- 30 Kim *et al.*, "Viable deletions of the M13 complementary strand origin", *Proc Natl Acad Sci USA* 78:6784-6788 (1981)
- Kohler *et al.*, "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity", *Nature* 256:495-497 (1975)
- 35 Koivunen *et al.*, "Phage libraries displaying cyclic peptides with different ring sizes: ligand specificities of the RGD-directed integrins", *Biotechnology* 13:265-270 (1995)
- 40 Krebber *et al.*, "Co-selection of cognate-antigen pairs by selectively-infective phages", *FEBS Lett* 377:227-231 (1995)
- Lane *et al.*, "Epitope mapping using bacteriophage peptide libraries", *Curr Opin Immunol* 5:268-271 (1993)
- 45 Langer, "New methods of drug delivery", *Science*, 249:1527 (1990)
- Liu *et al.*, "Chimeric mouse-human IgG1 antibody that can mediate lysis of cancer cells", *Proc Natl Acad Sci USA* 84(1 0):3439-3443 (1987)
- 50 Luzzago *et al.*, "Mimicking of discontinuous epitopes by phage displayed peptides. \_ Epitope mapping of human H ferritin using a phage library of constrained peptides ", *Gene* 128:51-57 (1993)
- Marvin *et al.*, "Molecular model and structural comparisons of native and mutant class \_ filamentous bacteriophages Ff (fd, f1, M13), \_f1 and \_Ke", *J Mol Biol* 235:260-286 (1994)
- 55 Matthews *et al.*, "Substrate phage: selection of protease substrates by monovalent phage display", *Science*, 260:1113-1116 (1993)
- 60 McCafferty *et al.*, "Phage enzymes: expression and affinity chromatography of functional alkaline phosphatase on the surface of bacteriophage", *Protein Eng* 4:955-961 (1992)
- McCafferty *et al.*, Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, 348(6301):552-4 (1990)
- 65 Medynski, D. Phage display: all dressed up and ready to role. *Biol Technol* 12, 1134-1136 (1994).

- Meola, A., Delmastro, P., Monaci, P. *et al.* Derivation of vaccines from mimotopes: Immunological properties of human B virus surface antigen mimotopes displayed on filamentous phage. *J Immuno* 154, 31 62-3172 (1995).
- 5 Messing J, "New M13 vectors for cloning", *Methods Enzymol* 101:20-78 (1983) Mitchell *et al.*, *J. Org. Chem.* (1978)
- Model *et al.*, "Filamentous Bacteriophage", in *The Bacteriophages*, Calendar R (ed.), Plenum Press, New York and London, Vol. 2, p. 375 (1988)
- 10 Morrison *et al.*, "Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains". *Proc Natl Acad Sci USA* 81:6851-6855 (1984)
- Moses *et al.*, "Restructuring the bacteriophage f1 genome: Expression of gene VIII in the intergenic space", *Virology* 104:267-278 (1980)
- 15 Murphy, C. Loss of olfactory function in dementing disease. *Physiol. Behav.* 66, 177-182 (1999).
- Neuberger *et al.*, "A hapten-specific chimaeric IgE antibody with human physiological effector function", *Nature* 314: 268-270 (1985)
- 20 Ommaya, "Implantable devices for chronic access and drug delivery to the central nervous system", *Cancer Drug Delivery*, 1(2):169-178 (1984)
- Pardridge *et al.*, "Evaluation of cationized rat albumin as a potential blood-brain barrier drug transport vector", *J. Pharmacol. Experim. Therapeutics*, 255(2):893-899 (1990)
- 25 Pardridge, "Fuel Homeostasis and the Nervous System", Edited by Vranic *et al.*, Plenum Press, New York, 43-53 (1991)
- 30 Parmley *et al.*, "Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes", *Gene* 73:305-318 (1988)
- Rasqualini *et al.*, " Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries", *Nature* 380:364-366 (1996)
- 35 Sahagan *et al.*, "A genetically engineered murine/human chimeric antibody retains specificity for human tumor-associated antigen" *J Immunol* 137:1066-1 074 (1986)
- Schlosshauer, "The blood-brain barrier: morphology molecules, and neurothelin", *BioEssays*, 15(5):341-346 (1993)
- 40 Schmitz *et al.*, "Catalytic specificity of phosphotyrosine kinases Blk, Lyn, c-Src and Syk as assessed by phage display", *Mol Biol* 260:664-677 (1996)
- 45 Scott *et al.*, "Searching for peptide ligands with an epitope library", *Science* 249:386-390 (1990)
- Smith GP "Surface display and peptide libraries", *Gene* 128:1-2 (1993)
- 50 Solomon, B. and Frenkel, D. Vaccination for the prevention and treatment of Alzheimer's disease..*Drugs of Today*, 36(9), 655-663 (2000).
- Sparks *et al.*, "Identification and characterization of Src SH3 ligands from phage-displayed random peptide libraries", *J Biol Chem* 269:23853-23856 (1994)
- 55 Sugimoto *et al.*, "Studies on bacteriophage fd DNA. IV. The sequence of messenger RNA for the major coat protein gene", *J Mol Biol* 111:487-507 (1977)
- Sun *et al.*, "Chimeric antibody with human constant regions and mouse variable regions directed against carcinoma-associated antigen 17-1A", *Proc Natl Acad Sci USA* 84:214-2 18 (1987)
- 60 Tam et a., *J. Am. Chem. Soc.*, 102:6117 (1980)
- Van Wezenbeek *et al.*, "Nucleotide sequence of the filamentous bacteriophage M1 3 DNA genome: comparison with fago fd", *Gene* 11:129-148 (1980)
- 65 Willis et al ., "Immunological properties of foreign peptides in multiple display on a filamentous

bacteriophage", Gene 128:79-83 (1993)

Wrighton *et al.*, "Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin", Science 273:458-463 (1996)

Zacher *et al.*, "A new filamentous phage cloning vector: fd-tet", Gene 9:127-140 (1980)

Zuercher, A.W., Miescher, S.M., Voge, M., Rudolf, M.P., Stadler, M.B. and Stadler, B.M. Oral anti-IgE immunization with epitope-displaying phage. Eur. J. Immunol. 30, 128-135 (2000).

**Listado de secuencias**

[0149]

<110> SOLOMON, Beka

<120> COMPUESTO INMUNIZANTE Y MÉTODO PARA INDUCIR UNA RESPUESTA INMUNE CONTRA EL SITIO DE ESCISIÓN DE LA B-SECRETASA DE LA PROTEÍNA PRECURSORA DE AMILOIDE

<130> SOLOMON=6A

<140> 10/506, 665

<141> 2004-09-07

<150> PCT/US03/006388

<151> 2003-03-04

<150> 60/361, 344

<151> 2002-03-05

<160> 5

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is Met or Leu.

<400> 1

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

Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe  
20 25

<210> 2

<211> 4 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 2

Glu Phe Arg His  
1



ES 2 392 247 T3

5 <210> 3  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Sintético

<400> 3

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly  
1 5

15 <210> 4  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Sintético

<400> 4

Trp Val Leu Asp  
1

25 <210> 5  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

30 <400> 5

Val Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg His  
1 5

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un compuesto inmunizante que comprende una cantidad de efecto inmunizante de un producto antigénico que induce una respuesta inmunitaria contra un epítipo que recubre el sitio de escisión de la  $\beta$ -secretasa de la proteína precursora de amiloide (A $\beta$ PP), que bloquea la escisión de la A $\beta$ PP por la  $\beta$ -secretasa, y un soporte, un diluyente, un excipiente, un adyuvante o un agente auxiliar farmacéuticamente aceptables.
- 10 2. El compuesto inmunizante de la reivindicación 1, en el que dicho producto antigénico comprende un polímero dendrítico, construido sobre una molécula de núcleo, que es al menos disfuncional para suministrar una ramificación, y que contiene hasta 16 grupos funcionales terminales a los que está conectado por enlaces covalentes un péptido antigénico que comprende un epítipo de la A $\beta$ PP que recubre el sitio de escisión de la  $\beta$ -secretasa.
- 15 3. El compuesto inmunizante de la reivindicación 2, donde dicho polímero dendrítico contiene ocho grupos funcionales terminales a los que está conectado un péptido antigénico.
- 20 4. El compuesto inmunizante de la reivindicación 1 o 2, donde dicho epítipo de la A $\beta$ PP que recubre el sitio de escisión de la  $\beta$ -secretasa comprende residuos 1 a 8 de SEQ ID NO: 1.
- 25 5. El compuesto inmunizante de la reivindicación 1 o 2, donde dicho epítipo de la A $\beta$ PP que recubre el sitio de escisión de la  $\beta$ -secretasa comprende la SEQ ID NO: 5.
- 30 6. El compuesto inmunizante de la reivindicación 2, donde dicha molécula nuclear es lisina.
- 35 7. El compuesto inmunizante de la reivindicación 2, que comprende además una molécula que tiene propiedades adyuvantes unida a dicho polímero dendrítico.
- 40 8. El compuesto inmunizante de la reivindicación 2, donde dicho producto antigénico está encapsulado en un liposoma.
- 45 9. El compuesto inmunizante de la reivindicación 1, donde dicho producto antigénico comprende un vehículo de exposición viral que muestra en su superficie epítipo de la A $\beta$ PP que recubre el sitio de escisión de la  $\beta$ -secretasa de la A $\beta$ PP.
- 50 10. El compuesto inmunizante de la reivindicación 9, donde dicho vehículo de exposición viral es un bacteriófago filamentosos.
- 55 11. El compuesto inmunizante de la reivindicación 9, donde dicho epítipo de la A $\beta$ PP que recubre el sitio de escisión de la  $\beta$ -secretasa de la A $\beta$ PP comprende los residuos 1 a 8 of SEQ ID NO: 1.
- 60 12. El compuesto inmunizante de la reivindicación 9, donde dicho epítipo de la A $\beta$ PP que recubre el sitio de escisión de la  $\beta$ -secretasa de la A $\beta$ PP comprende la SEQ ID NO: 5.
- 65 13. El compuesto inmunizante de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, donde el sitio de escisión está rodeado por SEQ ID NO: 1, y la escisión tiene lugar entre Xaa y Asp (D).
14. El compuesto inmunizante de la reivindicación 1 para su uso como medicamento.
15. Uso del compuesto inmunizante de la reivindicación 1 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.
16. El compuesto inmunizante de la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.
17. Una molécula que bloquea la escisión de la A $\beta$ PP por la  $\beta$ -secretasa y que comprende la parte de unión al antígeno de un anticuerpo contra un epítipo que recubre el sitio de escisión de la  $\beta$ -secretasa de la A $\beta$ PP.
18. La molécula de la reivindicación 17, donde el sitio de escisión está rodeado por SEQ ID NO: 1, y la escisión tiene lugar entre Xaa y Asp (D).
19. La molécula de la reivindicación 17 que es un anticuerpo monoclonal.
20. La molécula de la reivindicación 17 que es un anticuerpo monocatenario.
21. Vehículo de exposición bacteriófago filamentosos que expone la molécula de la reivindicación 20 en su superficie.
22. Un compuesto farmacéutico, que comprende el vehículo de exposición bacteriófago filamentosos de la reivindicación 21 y un soporte, un diluyente, un excipiente, un adyuvante o un agente auxiliar farmacéuticamente

aceptable.

23. El vehículo de exposición bacteriófago filamentosos de la reivindicación 21 para su uso como medicamento.

5 24. Uso del vehículo de exposición bacteriófago filamentosos de la reivindicación 21 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

25. El vehículo de exposición bacteriófago filamentosos de la reivindicación 21 para su uso el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

10

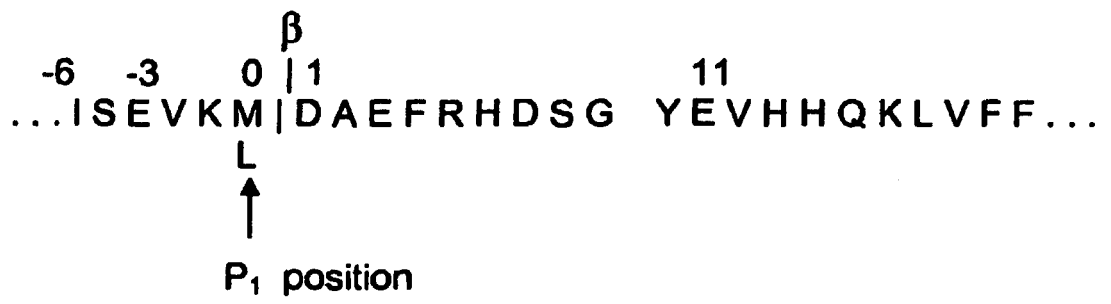
26. La molécula de la reivindicación 17 para su uso como medicamento.

27. Uso de la molécula de la reivindicación 17 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

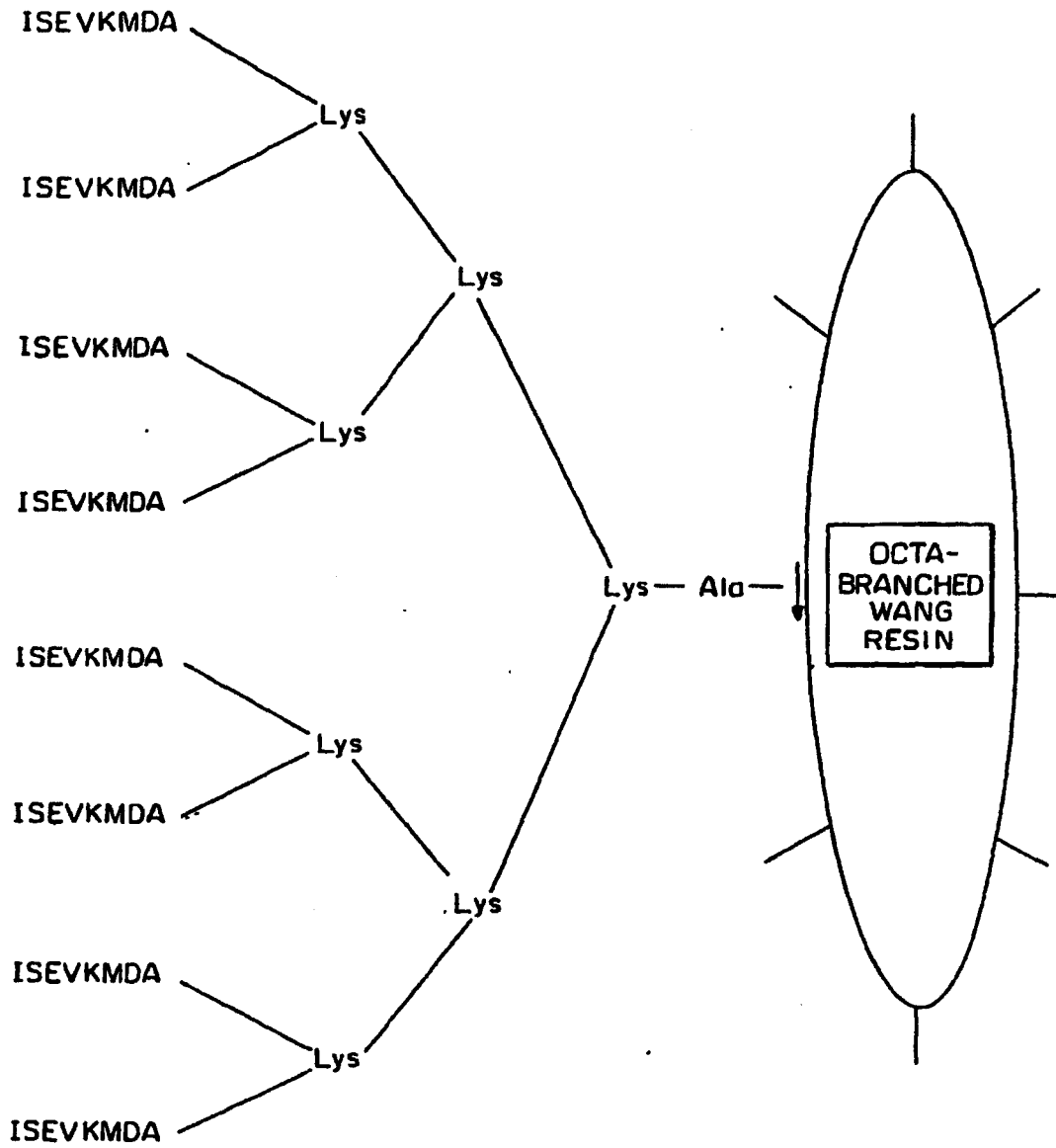
15

28. La molécula de la reivindicación 17 para su utilización en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

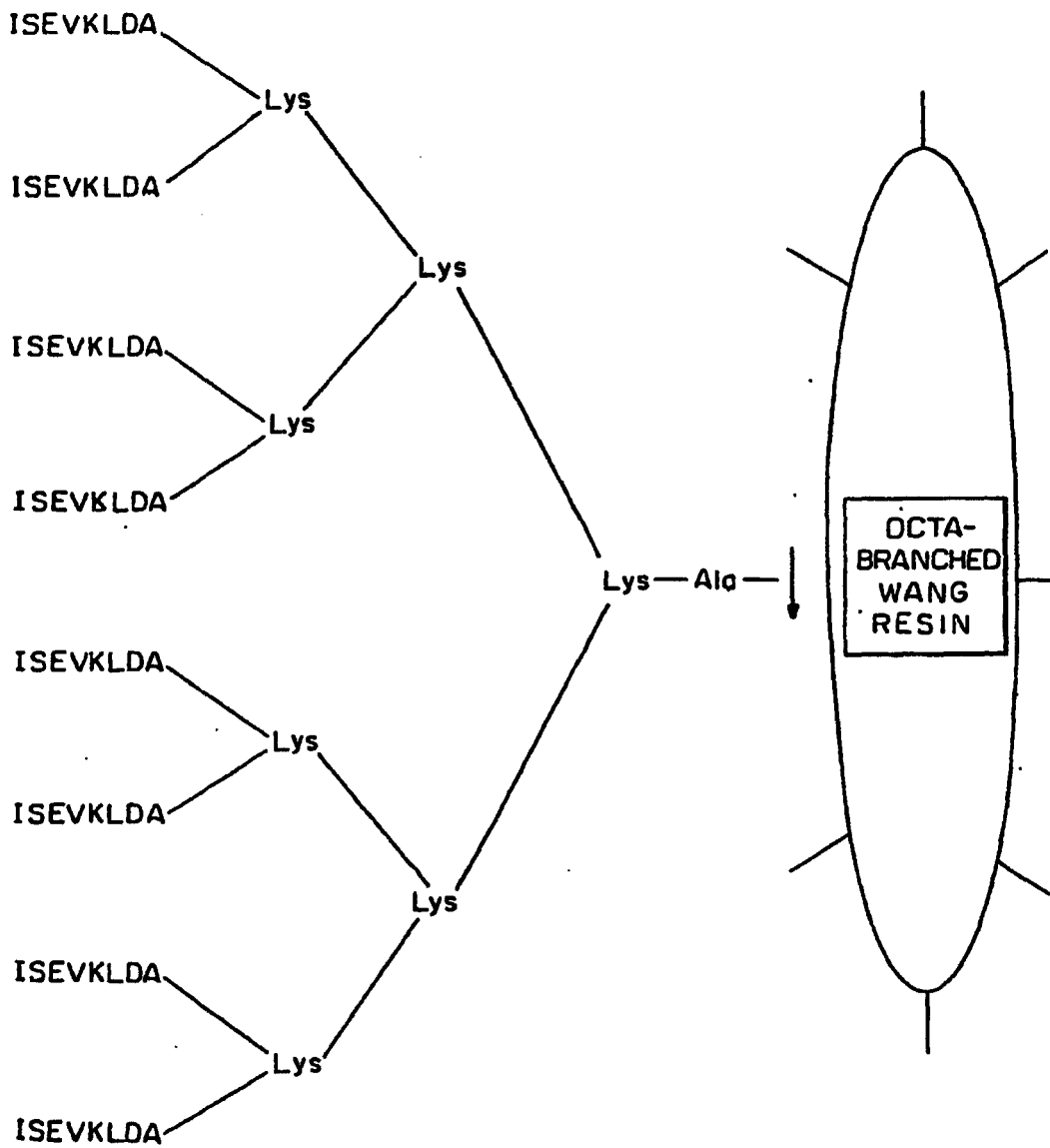
**FIG. 1**



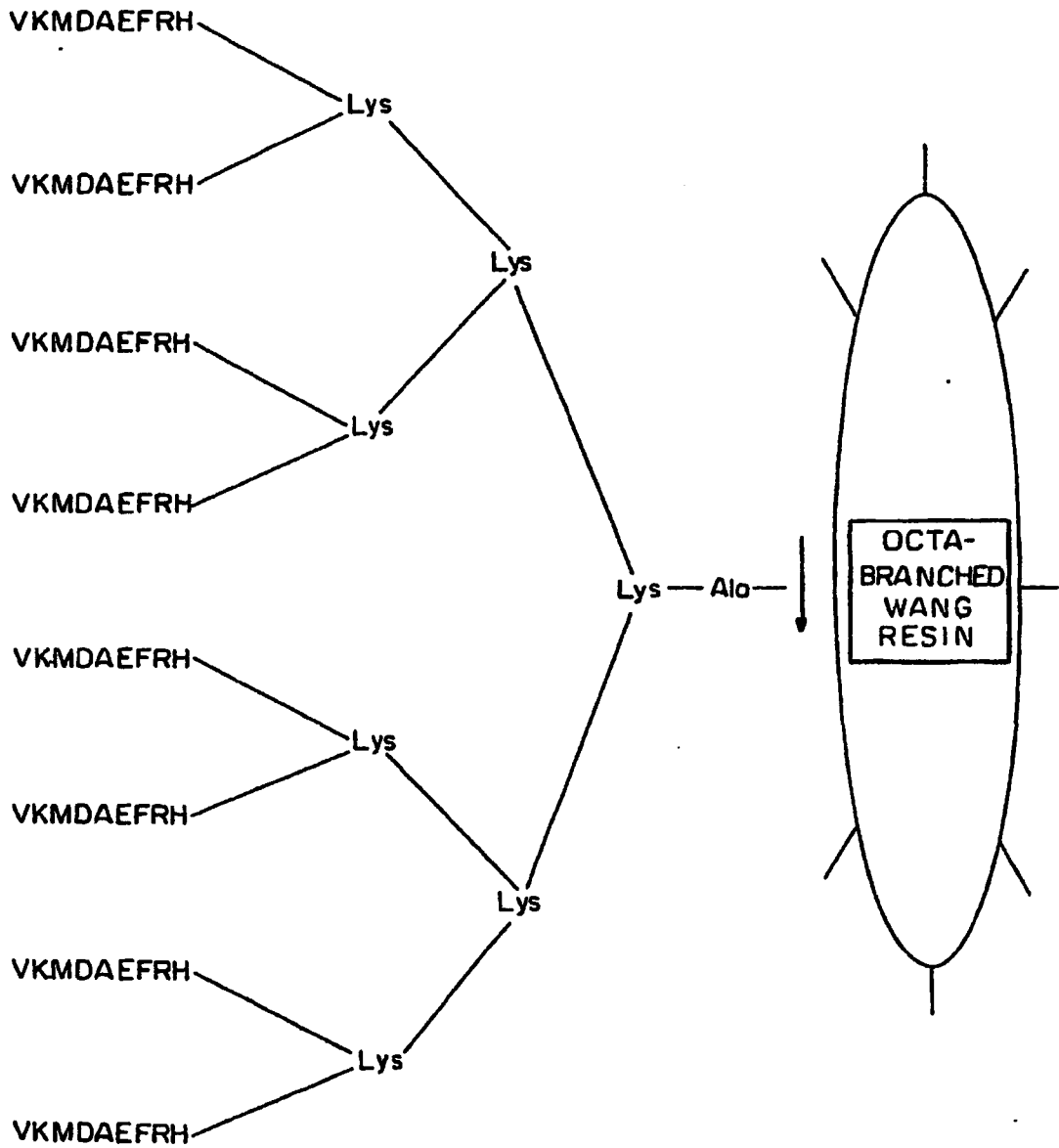
**FIG.2A**



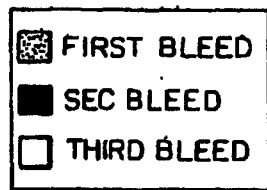
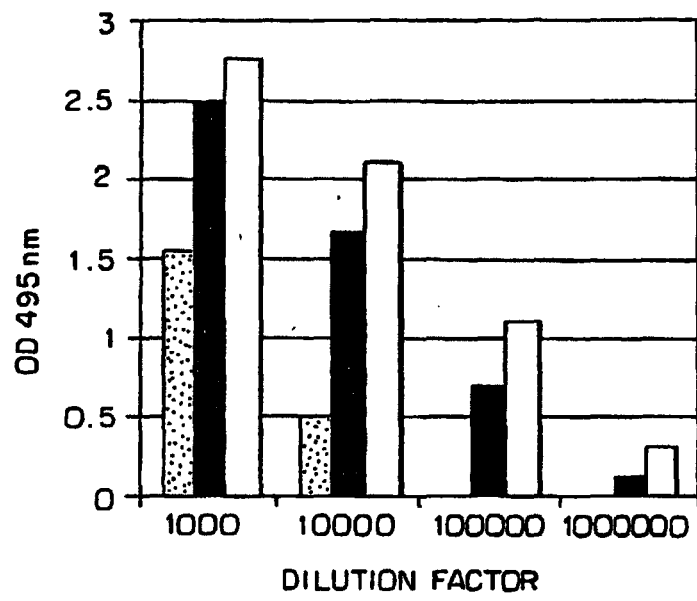
**FIG. 2B**



**FIG. 2C**

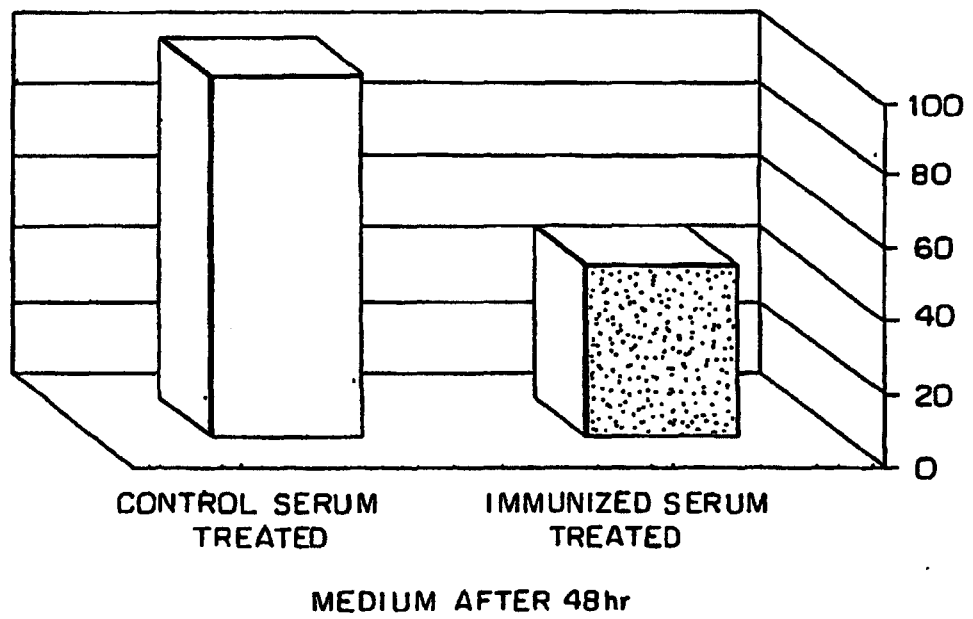


*FIG. 3*

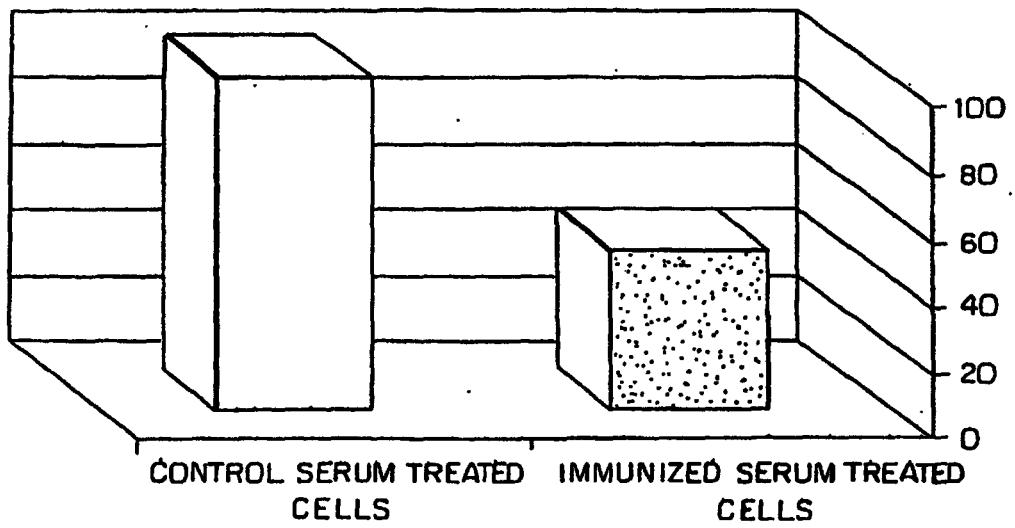


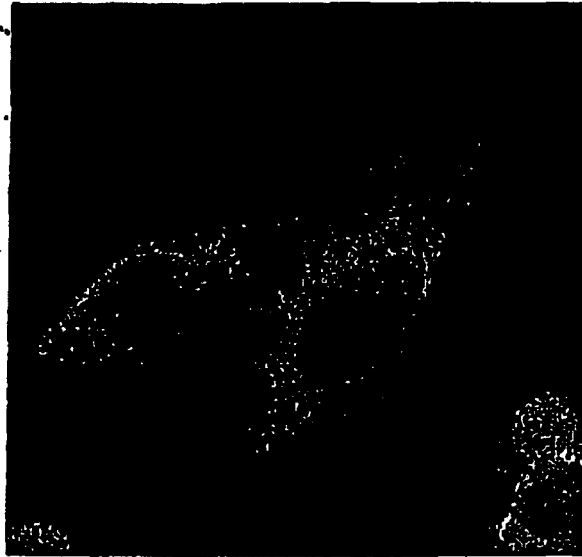


*FIG. 4*



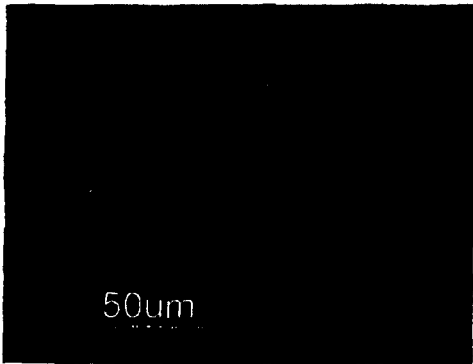
*FIG. 5*





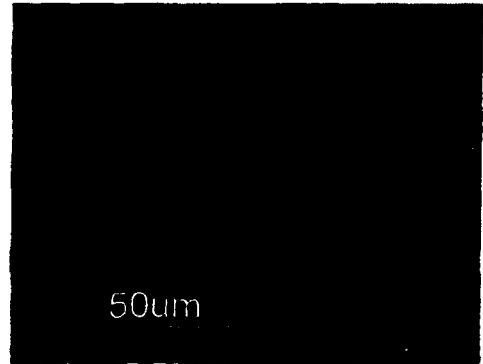
**Fig. 6**

**Permeabilized cells**



**Fig. 7A**

**Control**



**Fig. 7B**

**FIG. 8**

