(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 414 872**

(51) Int. Cl.:

A61P 25/28 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)
A61M 1/34 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2005** **E 05767978 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2013** **EP 1765388**

(54) Título: **Terapia combinada para la prevención o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y kit correspondiente**

(30) Prioridad:

13.07.2004 AT 11852004

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.07.2013

(73) Titular/es:

AFFIRIS AG (100.0%)
Karl-Farkas-Gasse 22
1030 Wien , AT

(72) Inventor/es:

MATTNER, FRANCK y
SCHMIDT, WALTER

(74) Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 414 872 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

Terapia combinada para la prevención o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y kit correspondiente.

La invención se refiere a una terapia combinada para la prevención o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y a un kit para realizar dicha terapia combinada.

El péptido β-amiloide (Aβ) desempeña un papel central en la neuropatología de la enfermedad de Alzheimer (EA) (Roher *et al*., 1993: "β-Amyloid-(1-42) is a major component of cerebrovascular amyloid deposits: Implications for the pathology of Alzheimer's disease [β-Amiloide-(1-42) es un componente principal de los depósitos amiloide cerebrovasculares: Implicaciones para la patología de la enfermedad de Alzheimer]", PNAS 90:10836). Las formas familiares de la enfermedad se han correlacionado con mutaciones en la proteína precursora amiloide (amyloid precursor protein, APP) y los genes de preselinina. Las mutaciones en dichos genes relacionadas con dicha enfermedad dan lugar a una producción aumentada de la forma de aminoácido 42 (Aβ42) del péptido, que es la forma principal encontrada en las placas amiloide de la enfermedad de Alzheimer. Un modelo de animal de la enfermedad está disponible en el mercado. El ratón transgénico PDAPP, que sobreexpresa el APP humano mutante (siendo el aminoácido en la posición 717 F en lugar de V), desarrolla progresivamente muchas de las características neuropatológicas de la enfermedad de Alzheimer en función de la edad y del cerebro (Games *et al*., 1995: "Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F β-amyloid precursor protein [Patología del tipo Alzheimer en ratones transgénicos que sobreexpresan la proteína precursora β-amiloide V717F]", Nature 373: 523).

Se han realizado ya estudios de vacunación con una vacuna "normal" no basada en un mimótopo. Se inmunizaron animales transgénicos con un Aβ42 agregado o bien antes de iniciarse las neuropatologías típicas de la EA (6 semanas) o bien a una mayor edad (11 meses): La inmunización de los animales jóvenes impidió el desarrollo de la formación de placas, la distrofia neurítica y la astrogliosis. El tratamiento de los animales de mayor edad redujo claramente las neuropatologías típicas de la EA. Dicha vacuna experimental disparó el desarrollo de anticuerpos contra Aβ42, que eran capaces de traspasar la barrera de sangre/cerebro y atacar las placas amiloide (Schenk *et al*., 1999: Immunization with amyloid-β attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse [La inmunización con amiloide-β atenúa la patología similar a Alzheimer en el ratón PDAPP]", Nature 400: 173). A continuación, las placas se eliminan a través de varios mecanismos, incluida fagocitosis mediada por el receptor Fc (Bard *et al*., 2000: Peripherally administered antibodies against amyloid β-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease [Anticuerpos administrados periféricamente contra el péptido β-amiloide entran en el sistema nervioso central y reducen la patología en un modelo ratón de la enfermedad de Alzheimer]", Nature Med. 6: 916). Dicha vacuna era capaz también de retardar deficiencias de recuerdo (Janus *et al*., 2000: La inmunización del péptido Aβ reduce deficiencias de comportamiento y placas en un modelo de la enfermedad de Alzheimer]", Nature 408: 979).

Desde finales de 1999, una terapia de inmunización extremadamente prometedora para la EA se encuentra en la fase de prueba clínica. Se supone que la inmunización lleva al sistema inmune a atacar las placas y a eliminar dichos depósitos del cerebro humano involucrado, aunque el mecanismo exacto básico debe caracterizarse todavía con mayor detalle.

Dichos experimentos clínicos fueron llevados a cabo por la empresa farmacéutica Elan junto con su empresa asociada American Home Products (vacuna terapéutica AN-1792, QS21 como adyuvante). Los experimentos de la Fase I se completaron con éxito en el año 2000. Hacia finales de 2001, se iniciaron los experimentos de la Fase II, con el fin de probar su eficacia en un grupo de pacientes con una EA débil a media.

Ahora bien, dichos experimentos de la Fase II se interrumpían constantemente en varios pacientes, debido a inflamaciones nerviosas (Editorial 2002, "Insoluble problem? [¿Problema insoluble?]", Nature Med. 8: 191). Entre los síntomas, se incluía la meningoencefalitis aséptica, que dio lugar a una parada inmediata de dichos experimentos en todo el mundo. En el peor de los casos, se verá que los pacientes involucrados habrán desarrollado una respuesta autoinmune – un riesgo que conllevan muchas terapias inmunes. Debido a la presencia global de APP, debería haber sido posible prever las complicaciones autoinmunes, puesto que naturalmente la APP lleva determinantes antigénicos que tiene en común con su producto proteolítico. Desde entonces, estudios adicionales se han centrado en las propiedades de los anticuerpos inducidos por la inmunización de Aβ42 agregado (en humanos y ratones), y se ha demostrado que la mayoría de los anticuerpos reconocen un dominio pequeño entre el aminoácido 4 y 10 de Aβ42 (Aβ4-10). Los anticuerpos del ratón eran capaces de bloquear la fibrilogénesis Aβ y destrozaban las fibras Aβ ya presentes (McLaurin *et al*., 2002: Therapeutically effective antibodies against amyloid-β peptide target amyloid-β residues 4-10 and inhibit cytotoxicity and fibrillogenesis [Anticuerpos terapéuticamente eficaces contra el péptido amiloide-β apuntan a los residuos 4-10 de amiloide-β e inhiben la toxicidad y la fibrilogénesis]", Nature Med. 8: 1263). Es interesante que los anticuerpos humanos no reaccionen con el APP expuesto en la superficie de células o con cualquier otro producto proteolítico no agregado del precursor (Hock *et al*., 2002: Generation of antibodies specific for β-amyloid by vaccination of patients with Alzheimer disease [La generación de anticuerpos específicos para β-amiloide por vacunación de pacientes con la enfermedad de Alzheimer]", Nature Med. 8: 1270). Se observó una clara diferencia entre los sueros de humanos y ratones: Al contrario de los anticuerpos humanos, los

anticuerpos del ratón reconocen Aβ monomérico, oligomérico y fibrilar. Es de gran importancia y puede ser una precondición para su eficacia terapéutica, puesto que cada vez hay más indicios de que oligómeros pequeños de Aβ que no son reconocidos por anti-Aβ humano son los principales agentes tóxicos en la enfermedad (Walsh *et al*., 2002: Naturally secreted oligomers of amyloid-β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation *in vivo* [Oligómeros de β-amiloide secretados naturalmente inhiben de forma eficaz la potenciación a largo plazo en el hipocampo en vivo]", Nature 416: 535). Por tanto, existe una nueva estrategia potencial en la inmunización con una vacuna que contiene los aminoácidos 4-10 de β-amiloide (en lugar de Aβ42 agregado). A pesar de su eficacia todavía desconocida, dicha estrategia puede verse enfrentada a los problemas autoinmunes, puesto que el objetivo es inmunizar los pacientes directamente con un "auto"-epítope (de células B lineales).

A pesar de dichos desarrollos decepcionantes en las estrategias de vacunación de la EA más recientes, una vacuna Aβ es todavía el camino más prometedor en la lucha contra la EA. Sin embargo, se necesitan urgentemente mejoras y nuevas estrategias para la vacunación de la EA. En particular, una vacuna de este tipo no debería excitar células B y/o T autorreactivas.

Sin embargo, se desarrollan también cada vez más agentes terapéuticos de otro tipo que tienen por objetivo el de impedir la producción de β-amiloide, la agregación de β-amiloide o los eventos neurotóxicos causados por dichos agregados. Un resumen de las estrategias terapéuticas seguidas hasta la actualidad para la EA puede encontrarse en la reseña de Wolfe (Nature Reviews Drug Discovery 1 (2002) 859-866).

Las placas de β-amiloide se forman a partir de la denominada Amyloid-β Precursor Protein (AAP) (proteína precursora de β-amiloide), la cual es una proteína transmembrana integral (para la cual no se ha confirmado claramente una función fisiológica conocida; sin embargo, los resultados de investigación más recientes indican que APP funciona como un denominado receptor cargo de membrana para cinesina I). APP es disociado por proteólisis con las denominadas secretasas, formándose fisiológicamente en particular un péptido Aβ con una longitud de 40 aminoácidos (Aβ40). Se producen también otras formas de Aβ más cortas y más largas, en particular una versión de 42 aminoácidos (Aβ42), que presenta una alta capacidad de agregación. Por tanto, dicha forma Aβ42 es también la forma predominante en las placas amiloide. Por tanto, las secretasas responsables para dichas disociaciones distintas (secretasa α y en particular β y gamma) son las dianas primarias de ataque de una posible estrategia de tratamiento de la EA. Por tanto, se ha intentado utilizar moduladores o inhibidores para dichas enzimas en el tratamiento de la EA (tales como, por ejemplo, benzodiazepinas, sulfonamidas, benzocaprolactamas).

Otro gen asociado a la EA es la apolipoproteína E, para la cual existen tres variantes alelo (APOE2, APOE3 y APOE4). Se ha demostrado que las personas con una o dos copias de APOE4 presentan un mayor riesgo para la EA, mientras que los portadores de APOE2 presentan un menor riesgo en comparación con la población total. Se ha demostrado también que las personas que toman estatinas, es decir, medicamentos que inhiben la biosíntesis de colesterol, presentan un riesgo claramente reducido para la EA. Por tanto, otra estrategia para el tratamiento de la EA se centra en la inhibición de la biosíntesis de colesterol, justamente con por ejemplo estatinas.

Otro enfoque para el tratamiento de la EA se refiere a la inhibición de la agregación de amiloide en las placas cerebrales, que podría llevarse a cabo, entre otros, también por medio de inhibidores de secretasas. Además, se ha propuesto también reducir el contenido en cinc, puesto que el cinc en concentraciones fisiológicas relevantes puede inducir la agregación de Aβ.

Otras estrategias de tratamiento para la EA propuestas en el estado de la técnica se refieren a la prevención de la expresión de APP y el aumento del aclaramiento Aβ, buscándose en el primer caso sustancias que interactúen con la región de promotores de APP. Con relación al aclaramiento Aβ, se ha propuesto un aumento de la actividad de proteasas determinadas, tales como la enzima que degrada la insulina y neprolisina, o la aplicación periférica de anticuerpos anti-Aβ (DeMattos *et al*., PNAS 98 (15) (2001), 8850-8855). Sin embargo, los experimentos de este tipo han dado resultados contradictorios ya en el modelo ratón (Wolfe (2002)). Finalmente, se ha intentado también redisolver las placas de amiloide ya existentes, por ejemplo reduciendo el nivel de amiloide-β en el suero de los pacientes de la EA. En este contexto, se ha propuesto también reducir los depósitos de placas de las proteínas β-amiloide en el cerebro por medio de procesos de aféresis (US nº 6.551.266, en cuyo documento se propone eliminar las macromoléculas con un peso molecular de más de 500 kD por aféresis), sin que ello no haya podido demostrarse, sin embargo, efectivamente para la EA. Sin embargo, la disolución de las placas ya existentes en las células del cerebro por medio de procesos de aféresis no es posible directamente (la barrera de sangre/cerebro es insuperable para las placas y también para las moléculas con > 500 kD).

Tal como ya se ha mencionado, la presencia de las placas de β-amiloide (Aβ40 y Aβ42) es la característica clínica más vistosa de la EA. Por tanto, la reducción de Aβ es considerada como el objetivo farmacéutico primario de la profilaxis y terapia de la EA. A pesar de la eliminación de amiloide descrita por inducción de anticuerpos anti-Aβ por medio de inmunización activa, los experimentos clínicos de dicha inmunización han quedado sin éxito hasta la actualidad, debido a los graves efectos secundarios, que conducían a la cancelación del tratamiento. Los resultados preclínicos más recientes han demostrado que los anticuerpos pueden conducir (también) a la reducción periférica de Aβ y posiblemente cambiar de esta manera la dinámica de periferia/cerebro de Aβ.

Además, se ha demostrado que un tratamiento periférico con un agente que presenta una alta afinidad al Aβ (tal como por ejemplo gelsolina o GM1) reduce la cantidad de Aβ en el cerebro (Masouka *et al*., Journal of Neuroscience 2003: 29-33). Conforme a esto, se ha propuesto como abordaje general utilizar compuestos que pueden reducir el contenido de Aβ en el plasma, reducen o pueden impedir la amiloidosis en el cerebro. Esto podría dar lugar al desarrollo de nuevos agentes terapéuticos cuyo efecto no dependa de la superación de la barrera de sangre/cerebro.

Se ha demostrado que para dicha salida de Aβ del cerebro inducido por la secuestración del Aβ de plasma, existe un efecto sobre el contenido del Aβ de plasma en función del proceso: El contenido de Aβ en el plasma no fue reducido por gelsolina; en lugar de esto, la administración de gelsolina y la inmunización pasiva con anticuerpos anti-Aβ monoclonales conducían a un contenido de Aβ aumentado en el plasma. Sin embargo, la carga de Aβ en el cerebro fue reducida sólo cuando se utilizaban ratones APP transgénicos relativamente jóvenes; al utilizarse ratones con una edad de más de 6 meses, el tratamiento era sin efecto. Puede que esto se deba a la mayor insolubilidad de Aβ en el cerebro de ratones más viejos. Por otro lado, una duración de tratamiento más larga sí podría tener éxito, aunque ni la gelsolina o GM1 ni la inmunización pasiva son aptas para una administración a largo plazo.

El documento WO 2004/056318 describe terapias para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, incluidas la administración de sustancias de unión a Aβ así que la diálisis, incluidas la hemodiálisis y la perfusión del plasma.

Por tanto, el objetivo de la presente invención era proporcionar una nueva estrategia de tratamiento y prevención para la enfermedad de Alzheimer, en particular una estrategia que se base también en una inmunización exitosa.

Conforme a ello, la presente invención proporciona un kit tal como se ha definido en la reivindicación 1. Según la invención, se induce la salida de Aβ (por medio de agentes, tales como por ejemplo gelsolina, GM1, una vacuna activa o pasiva específica para Aβ), y dicha salida se mantiene mediante una aféresis de Aβ. En este contexto, incluso una inmunización única o doble con una vacuna que contiene Aβ, derivados de Aβ o mimótopos de Aβ es suficiente para inducir una secuestración de Aβ plasmático mediada por IgM y/o IgG.

Preferentemente, el soporte de aféresis utilizado en el kit es una columna estéril y libre de pirógeno.

En el kit, el agente para inducir una secuestración de amiloide β (Aβ) en el plasma se ha seleccionado preferentemente entre agentes con alta afinidad a Aβ, es decir, gelsolina o GM1, una vacuna activa o pasiva específica para Aβ o anticuerpos monoclonales humanizados específicos para Aβ.

Preferentemente, la vacuna activa específica para Aβ es un péptido según la reivindicación 3, denominado también mimótopo.

Los epítopos particularmente aptos se han seleccionado entre por lo menos uno de entre los siguientes epítopos: EIDYHR, ELDYHR, EVDYHR, DIDYHR, DLDYHR, DVDYHR, DIDYRR, DLDYRR, DVDYRR, DKELRI, DWELRI, YREFFI, YREFRI, YAEFRG, EAEFRG, DYEFRG, ELEFRG, DRELRI, DKELKI, DRELKI, GREFRN, EYEFRG, DWEFRDA, SWEFRT, DKELR, SFEFRG, DAEFRWP, DNEFRSP, GSEFRDY, GAEFRFT, SAEFRTQ, SAEFRAT, SWEFRNP, SWEFRLY, SWELRQA, SVEFRYH, SYEFRHH, SQEFRTP, SSEFRVS, DWEFRD, DAELRY, DWELRQ, SLEFRF, GPEFRW, GKEFRT, AYEFRH, DKE(Nle)R, DKE(Nva)R o DKE(Cha)R.

Según la invención, se utiliza un mimótopo de Aβ para la vacunación contra la EA: El mimótopo dispara la producción de anticuerpos contra Aβ42, pero no contra la PPP nativa. El mimótopo puede identificarse por medio de un anticuerpo (monoclonal) y bibliotecas de péptidos (disponibles en el mercado) (por ejemplo según Reineke *et al*., 2002: “Identification of distinct antibody epitopes and mimotopes from a peptide array of 5520 randomly generated sequences [Identificación de epítopos de anticuerpos y mimótopos distintos de una colección de péptidos de 5520 secuencias generadas aleatoriamente]”, J. Immunol. Methods, 267: 37). Se utiliza un anticuerpo (monoclonal) que no reconoce APP, pero sólo reconoce especies de Aβ distintas con ácido aspártico amino-terminal (un ejemplo de un anticuerpo de este tipo se ha descrito en Johnson-Wood *et al*., 1997: “Amyloid precursor protein processing and Aβ42 deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer disease [El procesamiento de proteínas precursoras de amiloide y depósito de Aβ42 en un modelo de ratón transgénico de la enfermedad de Alzheimer]”, PNAS 94: 1550). Durante el transcurso de la presente invención, un anticuerpo de este tipo ha mostrado ser una herramienta idónea para la identificación de mimótopos aptos para la vacunación. Aunque ha sido demostrado que anticuerpos monoclonales de este tipo presentan efectos positivos en un modelo ratón de la EA, si se administran directamente a los ratones (Bard *et al*., 2000: Peripherally administered antibodies against amyloid β-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease [Anticuerpos administrados periféricamente contra el péptido β-amiloide entran en el sistema nervioso central y reducen la patología en un modelo ratón de la enfermedad de Alzheimer]”, Nature Med. 6: 916), nunca se ha propuesto utilizar dichos anticuerpos como herramientas de búsqueda de mimótopos para el aislamiento de compuestos de vacuna para la EA.

En el estado de la técnica, todos los esfuerzos se han centrado en los péptidos de Aβ que ocurren naturalmente. Tal como se ha mencionado anteriormente, los experimentos clínicos con las vacunas de péptidos de Aβ se pararon,

debido a los eventos de inflamaciones nerviosas. Efectivamente, los programas de previsión de epítopos de células T (BIMAS para los epítopos limitados a la clase MHC I y TEPITOPE para los epítopos limitados a la clase MHC II) proponen un gran número de (auto-)epítopos dentro de la secuencia. Esto podría implicar que los eventos de inflamaciones nerviosas fueron disparados por reacciones autoinmunes, lo cual haría una vacuna de este tipo no apta para su aplicación general.

Al contrario a las vacunas de este tipo propuestas en el estado de la técnica, durante el tratamiento con una vacuna que contiene un mimótopo según la invención, no es de esperar que ocurran reacciones autoinmunes, puesto que el anticuerpo (monoclonal) utilizado según la invención para la identificación del mimótopo no reconoce APP y la secuencia de mimótopo es distinta de las autosecuencias derivadas de Aβ42 utilizadas hasta la actualidad en los experimentos o a ser utilizadas en los experimentos futuros.

El anticuerpo utilizado según la invención para la identificación de mimótopos reconoce la secuencia de aminoácidos DAEFRH (= epítopo original) derivada de Aβ con un ácido aspártico amino-terminal libre, pero no reconoce la APP nativa. El anticuerpo puede ser un preparado de anticuerpo monoclonal o policlonal o cualquier parte de anticuerpo o un derivado del mismo. El único prerrequisito es que la molécula de anticuerpo reconozca específicamente el epítope DAEFRH, es decir, que no se une a las formas extendidas naturales N-terminales de la proteína precursora de amiloide, lo cual significa que su capacidad de unión al epítope DAEFRH es por lo menos 100 veces, preferentemente por lo menos 1000 veces, de manera más preferida por lo menos 105 veces, más alta que a la molécula APP. El anticuerpo puede ser un anticuerpo que presenta la misma capacidad de unión o una capacidad de unión más alta a la secuencia DAEFRH que el anticuerpo descrito por Johnson-Wood *et al*. 1997. Naturalmente, pueden utilizarse también anticuerpos con una capacidad de unión más baja (> 10%, > 50% ó > 80% de la capacidad de unión del anticuerpo de Johnson-Wood *et al*.), aunque una capacidad de unión más alta es más preferida.

Los compuestos según la invención se unen a los anticuerpos con una especificidad comparable a la secuencia DAEFRH.

El mimótopo a utilizar según la invención puede estar presente en la vacuna de forma (peptídica) aislada o puede estar acoplado a otras moléculas o unido a las mismas en forma de un complejo, tales como sustancias portadoras farmacéuticas o estructuras de polipéptido, lípido o carbohidratos. Sin embargo, los mimótopos pueden estar unidos (de forma covalente o no covalente) a ligadores o portadores no específicos, en particular ligadores peptídicos o portadores de proteínas. Además, los ligadores peptídicos o portadores de proteínas pueden estar constituidos por epítopos de células T auxiliares o contener los mismos.

Preferentemente, el portador farmacéuticamente aceptable es KLH, toxoide tetánico, una proteína unida a albúmina, albúmina bovina de suero, un dendrímero (MAP; Biol. Chem. 358: 581) así como las sustancias adyuvantes descritas en Singh *et al*., Nat. Biotech. 17 (1999), 1075-1081 (en particular las citadas en la Tabla 1 de dicho documento) y O'Hagan *et al*., Nature Reviews, Drug Discovery 2 (9) (2003), 727-735 (en particular los compuestos endógenos inmunopotenciadores y sistemas de suministro descritos en dicho documento) o mezclas de los mismos. Además, la composición de vacunas puede contener hidróxido de aluminio.

Una vacuna que comprende el presente compuesto (mimótopo) y el vehículo farmacéuticamente aceptable puede administrarse por cualquier vía de aplicación adecuada, por ejemplo i.v., i.p., i.m., intranasal, oral, subcutánea, etc., y en cualquier dispositivo de suministro adecuado (O'Hagan *et al*., Nature Reviews Drug Discovery 2 (9), (2003), 727-735). Típicamente, la vacuna contiene el compuesto según la invención en una cantidad comprendida entre 0,1 ng y 10 mg, preferentemente entre 10 ng y 1 mg, en particular entre 100 ng y 100 µg o, como alternativa, por ejemplo entre 100 fmol y 10 µmol, preferentemente entre 10 pmol y 1 µmol, en particular entre 100 pmol y 100 nmol. La vacuna puede contener también adyuvantes típicos, por ejemplo tampones, estabilizantes, etc.

Según la presente invención, para mantener la salida de Aβ, tras iniciarse la misma dentro de la terapia combinada, se proporciona un dispositivo de aféresis, que comprende un soporte sólido que puede entrar en contacto con la sangre o el flujo plasmático y que presenta un receptor de unión a la proteína precursora amiloide-β (APP). El presente dispositivo de aféresis permite llevar a cabo, en los pacientes de EA o personas que presentan un riesgo de la EA, selectivamente un aclaramiento de APP o productos de degradación de APP por medio de aféresis, en particular de Aβ40 o Aβ42, manteniendo de esta manera el efecto de secuestración de Aβ en la primera etapa. Es conocido que existe un equilibrio dinámico de Aβ42 entre el sistema nervioso central (SNC) y el plasma. Ha podido demostrarse en el modelo ratón – tal como ya se ha mencionado – (DeMattos PNAS 2001, ver arriba) que la aplicación periférica de anticuerpos anti-Aβ influencia el SNC y el aclaramiento de Aβ42 en el plasma y reduce la carga de Aβ42 en el cerebro, sin que los anticuerpos anti-Aβ superen la barrera sangre/cerebro. Dichos resultados han sido confirmados por Matsuoka *et al*. (Journal of Neuroscience 2003: 29-33) por medio de la aplicación periférica de otras moléculas de unión a Aβ42 (gelsolina y GM1). Esto permite impedir el proceso de formación de las placas en el cerebro en un punto de muy buen acceso, es decir, ya en la sangre, lo cual significa que dichas proteínas y péptidos degradados ya no pueden volver al cerebro y no se agregan allí. Esto significa que el proceso de formación de las placas en el cerebro puede impedirse interceptando Aβ42 en la sangre. No es crítico si los receptores en el dispositivo de aféresis que entran en contacto con la sangre o el plasma son específicos para Aβ42 u otras formas

de degradación de APP. Lo único esencial es que dicha adsorción específica elimine APP y sus productos de degradación (proteolíticos), en particular Aβ42, de la sangre, de modo que no se produce una degradación de proteínas "equivocada" (es decir, formando Aβ42) o una formación de placas. De esta manera, la presente invención se basa en un abordaje de aplicación para la aféresis totalmente distinto del documento US 6 551 266, es decir, que se basa en la eliminación de los posibles elementos funcionales de las placas y no sólo de las placas mismas. Por cierto, la eliminación de las placas por medio de aféresis es excluida desde el principio como método eficaz para el tratamiento de la EA, puesto que la aféresis de sangre no puede alcanzar las regiones de la formación de placas en el cerebro de ningún modo.

Por otro lado, en comparación con los procedimientos que conducen a una concentración reducida de Aβ en el cuerpo mismo (tal como por ejemplo en DeMattos *et al*., PNAS 98 (15) (2001), 8850-8855 por medio de anticuerpos anti-Aβ periféricos) y que pueden llevarse a cabo durante un periodo prolongado, la terapia combinada según la invención presenta la ventaja decisiva de que no pueden dispararse respuestas autoinmunes. Además, según la invención, tampoco es necesario suministrar sustancias al paciente que sólo pueden actuar en el cuerpo mismo (posiblemente sólo después de haber sido transportadas a un punto determinado), sino que el patógeno es eliminado selectivamente. Esto significa que la causa de la enfermedad se elimina específicamente fuera del cuerpo, sin que fuera necesario eliminar los productos de reacción dentro del cuerpo.

Según la invención, los dispositivos de aféresis ya existentes y conocidos pueden adaptarse fácilmente a la presente invención en todas sus formas de realización. En particular, al seleccionar el soporte sólido (y el dispositivo de aféresis), debería asegurarse de su aptitud para fines médicos. Los soportes, procedimientos o dispositivos de este tipo se han descritos, entre otros, en las patentes US nº 5.476.715, nº 6.036.614, nº 5.817.528 ó nº 6.551.266. Los aparatos de aféresis comerciales adecuados son comercializados, entre otras, por las empresas Fresenius, Plasmaselect, ASAHI, Kaneka, Braun, etc., tales como por ejemplo el LDL-Therasorb®, el Immunosorba®, el Prosorba®, el Globafin®, el Ig-Therasorb®, el Immusorba®, el Liposorba®, el HELP®, el DALI®, el absorbente de bilirubina/ácido gállico BR-350, la detoxificación Prometheus®, el MARS®, el sistema ADAsorb de Medicap o el sistema plasma FLO. Todos estos sistemas – aunque en sus formas comerciales no dirigidos en primer lugar siempre a la eliminación específica de una sola proteína– pueden ser adaptados por los expertos en la materia de aféresis sin más a la presente invención, por ejemplo en forma de inmunoaféresis y/o instalando el soporte sólido según la invención (por ejemplo como columna) en el dispositivo de aféresis.

Los "receptores de unión al APP" según la invención son sustancias que presentan una afinidad para el ligando APP y sus productos secundarios biológicos, en particular Aβ42, y son capaces de eliminar dichos polipéptidos de la sangre o del plasma de pacientes de la EA o de personas con un alto riesgo para la EA.

Entre los ejemplos de los anticuerpos anti-APP, se incluyen 3D6 (Aβ1-5), 2H3 (Aβ1-12), 2G3 (Aβ33-40), 21F12 (Aβ33-42), 12H7 (Aβ33-42) (Johnson-Wood *et al*., PNAS 1997: 1550-1555), 10D5, 16C11 (Bard *et al*., Nature medicine 2000: 916-919), los anticuerpos (m266, m243) descritos por DeMattos *et al*. (2001) así como los anticuerpos de la misma especificidad. Los anticuerpos de este tipo se obtienen por ejemplo durante la inmunización de mamíferos con formulaciones de vacunas que contienen APP, Aβ42 o fragmentos o variantes de los mismos, seguido, si se desea, de fusión celular y protocolos de selección de clones (en el caso de anticuerpos monoclonales).

Gelsolina (Matsuoka *et al*. 2003, ver arriba), apoJ y apoE (DeMattos *et al*. 2001, ver arriba) son otros ejemplos de receptores proteínicos de unión a APP. GM1 es un ejemplo de un receptor gangliósido de unión a APP (Matsuoka *et al*. 2003, ver arriba).

Además, pueden utilizarse también los receptores de unión a APP a base de ácidos nucleicos ("aptámeros", pero también los oligodesoxinucleótidos "decoy" (ds-oligodesoxinucleótidos que, debido a su secuencia, representan sitios de unión para factores de transcripción), pudiendo detectarse los mismos también con una amplia gama de bibliotecas (de oligonucleótidos) (por ejemplo con 2-180 radicales de ácido nucleico) (por ejemplo Burgstaller *et al*., Curr. Opin. Drug Discov. Dev. 5 (5) (2002), 690-700; Famulok *et al*., Acc. Chem. Res. 33 (2000), 591-599; Mayer *et al*., PNAS 98 (2001), 4961-4965, y muchos más). La cadena principal de ácido nucleico puede detectarse por ejemplo por medio de los compuestos de fosforodiéster naturales, pero también por medio de fosforotioatos o combinaciones o variaciones químicas (por ejemplo como PNA), pudiendo utilizarse según la invención como bases en particular U, T, A, C, G, H y mC. Los radicales 2' de los nucleótidos que pueden utilizarse según la invención son preferentemente H, OH u otros grupos protectores y modificaciones en la posición 2', siendo posible también modificar los ácidos nucleicos, es decir, proveerlos por ejemplo con grupos protectores tal como los que se utilizan convencionalmente en la síntesis de oligonucleótidos. Por "grupo protector", se entiende una eterificación del átomo de oxígeno, mientras que en la modificación en 2' se reemplaza el grupo –OH con algo distinto. Para ambas variantes, existe una amplia gama de posibilidades en el estado de la técnica, de las que los grupos protectores particularmente preferidos son metilo, alilo, propilo y similares (es decir, por ejemplo 2'-OCH_3, 2'-O-$CH{=}CH_2$, etc.). Las modificaciones particularmente preferidas son 2'-desoxi, 2'-amino, 2'-fluoro, 2'-bromo, 2'-azido, pero también metales, tales como selenio, etc. Además, para proporcionar los ácidos nucleicos, pueden utilizarse también las técnicas de estabilización de oligonucleótidos desarrolladas para la tecnología antisense (ribozimas, RNAi (ARN de

interferencia), etc.) (ver por ejemplo las empresas líderes de esta técnica ISIS y Ribozyme Pharmaceuticals, en particular las memorias de patente y la página principal de Internet de las mismas).

Por tanto, para los fines de la presente invención, los aptámeros de unión a APP (entre los que se incluyen, según la definición citada anteriormente, también los aptámeros de unión a Aβ42) son también receptores de unión a APP preferidos.

Por tanto, según la invención, los receptores de unión a APP se utilizan sobre un material de soporte para la eliminación extracorporal de APP y de sus productos de degradación proteolíticos en los pacientes de la EA o con riesgo de la EA.

En la aplicación de la presente invención en la práctica médica rutinaria, es necesario que el soporte sea estéril y libre de pirógeno, con lo cual cada sustancia o cada combinación de receptor/soporte que cumple con dichas características es preferida según la invención (ver, por ejemplo, las patentes US nº 6.030.614 o US nº 5.476.715). Entre los ejemplos aptos, se incluyen homopolímeros porosos, co- o terpolímeros de monómeros que contienen vinilo (por ejemplo ácido acrílico, tales como por ejemplo TSK Toyopearl, Fractogel TSK), soportes con modificaciones (activaciones) con compuestos que contienen oxirano (por ejemplo epiclorhidrina) y, si se desea, otras reacciones con compuestos que contienen NH3, amino o carboxilo, o adsorbentes de CNBr o CNCl, tales como los que se han descrito en los documentos EP 110 409 A y DE 36 17 672 A. Los materiales de adsorción particularmente preferidos para fines terapéuticos son aptos para evitar una pérdida de células sanguíneas, no activan el sistema complementario o sólo en menor grado y retardan la formación de agregados en el circuito extracorpóreo en el mayor grado posible. Además, preferentemente los materiales de soporte utilizados deberían presentar una estabilidad suficiente, también en forma acoplada a un receptor, frente a las medidas de esterilización, en particular frente a la saturación con óxido de etileno, saturación con glutaraldehído, irradiación gamma, tratamiento con vapor, tratamiento con radiación ultravioleta, tratamiento con disolventes y/o tratamiento con detergentes, etc. Por ejemplo, pueden utilizarse también los productos a base de sefarosa, agarosa, acrilo, vinilo, dextrano, etc., que preferentemente presentan grupos funcionales ya disponibles en el mercado que son adecuados para la unión de los receptores de unión a APP. Entre otros soportes adecuados, se incluyen también monolitos (soportes a base de copolímero de metacrilato de glicidilo-dimetacrilato de etilenglicol).

Para el acoplado de los receptores a los soportes adecuados, puede utilizarse la química conocida por los expertos en la materia (por ejemplo Bioconjugate Techniques, Greg T Hermanson, Ed., Academic Press, Inc, San Diego, CA, 1995, 785pp).

Según otro aspecto, la presente invención se refiere también a la utilización del kit según la invención para proporcionar un tratamiento o un dispositivo de tratamiento de la enfermedad de Alzheimer para la prevención de una enfermedad de este tipo como parte de la terapia combinada según la invención, preparando el dispositivo de tal manera que es apto para el tratamiento del paciente en cuestión. El tratamiento se realiza conectando el paciente al aparato de aféresis durante un periodo de tiempo suficiente para la eliminación eficaz de los polipéptidos de APP, durante el cual el flujo sanguíneo o de plasma del paciente se pone en contacto con el soporte sólido que comprende el receptor de unión a APP, tras el cual APP y/o los productos de degradación proteolíticos de APP, en particular Aβ42, quedan unidos al receptor. Durante el transcurso del tratamiento de aféresis, naturalmente es necesario que se garanticen un acceso a las venas periféricas o centrales y/o fístulas arteriovenosas, igual que una anticoagulación suficiente así como que se graben los datos de cuantificación y medición requeridos. Además, en la mayoría de los procedimientos de aféresis, será necesario llevar a cabo una separación primaria entre el plasma y las células sanguíneas antes del tratamiento de plasma verdadero. Las personas especiales que requieren una medida preventiva son personas con antecedentes familiares, personas mayores (de >50, >60 ó >70 años) o personas con otro factor de riesgo para la EA, en particular factores genéticos.

A continuación, la invención se ilustrará con mayor detalle, haciendo referencia a los siguientes ejemplos, a los que naturalmente no estará limitada.

1. Preparación del soporte que lleva el receptor de APP

1.1 Columna monolítica

Una columna CIM® Epoxy Monolithic (BIA Separations, SI) se equilibra según las instrucciones del fabricante con un tampón de fosfato sódico 0,5 M a un pH de 8,0, y se activa un anticuerpo monoclonal contra el péptido Aβ también según las instrucciones del fabricante y se acopla a la columna CIM. La columna se lava varias veces con el tampón de fosfato (+ NaCl 1 M) y cualquier grupo epoxi todavía presente se bloquea.

El aseguramiento de la calidad se lleva a cabo por medio de un control en los eluatos de lavado y de equilibración, sometiéndose sólo las columnas sin grupos epoxi activos y sin fuga de anticuerpos en el eluato a un procesamiento ulterior e instalándolas en un dispositivo de aféresis.

1.2 Columna de sefarosa

Un material de agarosa en granel (sefarosa CL4B) se introduce asépticamente en un recipiente estéril y libre de pirógeno, y el material se lava asépticamente, secando el material completamente al vacío entre cada etapa de lavado. A continuación, la sefarosa se esteriliza con vapor en una autoclave a 115ºC durante 30 minutos.

Después de la esterilización, la sefarosa se introduce en un recipiente estéril en acetona/agua al 60% y la mezcla se activa von CNBr y trietilamina (14 g de CNBr por 96 ml de acetona; 30 ml de trietilamina en 66,2 ml de acetona al 87%). A continuación, se adiciona una solución de acetona/HCl (392 ml de agua estéril, libre de pirógeno; 16,3 ml de HCl 5 N, 408 ml de acetona). La sefarosa activada se lava y se adiciona a la reacción de acoplado dentro de 2 h, con el fin de impedir la hidrólisis de grupos activados.

Una solución de anticuerpos (m266 o m243) filtrada en condiciones estériles se introduce en el recipiente de reacción y se agita durante por lo menos 90 min. Finalmente, la solución de reacción se lava a fondo (con un tampón de fosfato isotónico) hasta que ya no se pueden detectarse productos de reacción en el eluato, y la sefarosa acoplada a los anticuerpos se introduce en columnas de vidrio estériles y despirogenizadas que contienen vidrio sinterizado y se somete a un control de calidad final (análisis del eluato con relación a los productos de reacción, metales pesados, etc.; análisis de partículas, pirogenicidad, esterilidad).

2. Modelo de animal para el tratamiento de los pacientes Alzheimer

Durante los últimos años, en el Instituto de Diabetes “Gerhardt Katsch” en Karlsburg, Alemania, se ha desarrollado un sistema especial extracorpóreo para la aféresis experimental en pequeños animales de libre movimiento. Esto permite realizar un tratamiento de aféresis repetidas veces en el mismo animal. Además de esto, los animales utilizados pueden incluirse también en estudios posteriores para la evaluación a largo plazo de la terapia de aféresis. La aplicación de dicho sistema de aféresis experimental se ha demostrado con éxito en varias cepas de ratas. Ratas con diabetes tipo 1 y artritis inducido por colágeno tipo II toleraban bien un tratamiento de aféresis repetido si su peso corporal era más de 250 g.

Antes del comienzo de la terapia de aféresis experimental, los animales son provistos de catéteres arteriales y venosos. En una primera etapa, durante la aféresis se separan inicialmente células sanguíneas del plasma mediante un filtro de plasma. Mientras que las células sanguíneas se reinfunden inmediatamente al animal (a través del catéter venoso), el plasma separado se pasa por el adsorbente preparado en el Ejemplo 1 (separándose los ligandos del plasma por unión a los receptores inmovilizados), antes de ser reintroducido al animal.

Alternativamente, puede realizarse también una aféresis de sangre total, repitiendo por ejemplo el procedimiento utilizado para la aféresis de DALI para LDL.

3. Terapia combinada según la invención en el modelo de animal:

La terapia combinada en el modelo de animal puede realizar en principio de tal forma que la salida de Aβ se realiza durante o después de la aféresis. Además, la frecuencia de la aplicación de las dos terapias puede variarse una respecto a otra.

REIVINDICACIONES

1. Kit destinado a ser utilizado para la prevención o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (EA), que comprende

- un agente para la inducción de una secuestración de β-amiloide (Aβ) en el plasma, estando seleccionado el agente para la inducción de una secuestración de Aβ en el plasma de entre el grupo constituido por gelsolina, GM1, anticuerpos específicos para Aβ o una vacuna activa o pasiva específica para Aβ y

- un dispositivo de aféresis, que comprende un soporte sólido que puede entrar en contacto con el flujo sanguíneo o de plasma, que presenta un receptor de unión a una proteína precursora de β-amiloide (APP), siendo el receptor de unión a APP seleccionado de entre el grupo constituido por anticuerpos anti-APP, anticuerpos anti-Aβ, en particular, anticuerpos anti-Aβ40 o anticuerpos anti-Aβ42, proteínas de unión a APP, gelsolina, apoJ o apoE, gangliósidos de unión a APP, en particular GM1, aptámeros de unión a APP, o mezclas de dichos receptores,

siendo el agente para la inducción de una secuestración de β-amiloide (Aβ) en el plasma administrado a una persona y siendo la persona tratada con el dispositivo de aféresis, que comprende un soporte sólido que puede entrar en contacto con el flujo sanguíneo o de plasma, que presenta un receptor de unión a una proteína precursora de β-amiloide (APP) en el circuito extracorporal, siendo la APP eliminada de la sangre del paciente mediante el dispositivo de aféresis.

2. Kit destinado a ser utilizado la reivindicación 1, caracterizado porque el soporte es una columna estéril y libre de pirógeno.

3. Kit destinado a ser utilizado según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque la vacuna específica para Aβ está constituida por un péptido seleccionado de entre el grupo constituido por DKELR, DAEFRWP, SAEFRAT, SYEFRHH, SLEFRF, GPEFRW, EIDHYR, ELDYHR, EVDYHR, DIDYHR, DLDYHR, DVDYHR, DIDYRR, DLDYRR, DVDYRR, DKELRI, DWELRI, YREFFI, YREFRI, YAEFRG, EAEFRG, DYEFRG, ELEFRG, DRELRI, DKELKI, DRELKI, GREFRN, EYEFRG, DWEFRDA, SWEFRT, DNEFRSP, SAEFRTQ, SWEFRNP, SWEFRLY, SWELRQA, SVEFRYH, SQEFRTP, SSEFRVS, DWEFRD, DAELRY, DWELRQ, GKEFRT o SFEFRG, o que comprende un péptido seleccionado de entre el grupo constituido por DKELR, DAEFRWP, SAEFRAT, SYEFRHH, SLEFRF, GPEFRW, EIDHYR, ELDYHR, EVDYHR, DIDYHR, DLDYHR, DVDYHR, DIDYRR, DLDYRR, DVDYRR, DKELRI, DWELRI, YREFFI, YREFRI, YAEFRG, EAEFRG, DYEFRG, ELEFRG, DRELRI, DKELKI, DRELKI, GREFRN, EYEFRG, DWEFRDA, SWEFRT, DNEFRSP, SAEFRTQ, SWEFRNP, SWEFRLY, SWELRQA, SVEFRYH, SQEFRTP, SSEFRVS, DWEFRD, DAELRY, DWELRQ, GKEFRT o SFEFRG.