

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 428 740**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/00** (2006.01)

**A61K 38/28** (2006.01)

**A61K 9/26** (2006.01)

**A61K 33/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.1998 E 10182575 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2013 EP 2305282**

54 Título: **Prevención y tratamiento de enfermedad amiloidogénica**

30 Prioridad:

**02.12.1997 US 67740 P**

**07.04.1998 US 80970 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.11.2013**

73 Titular/es:

**JANSSEN ALZHEIMER IMMUNOTHERAPY  
(100.0%)**

**Airton Road, Tallaght  
Dublin 24, IE**

72 Inventor/es:

**SCHENK, DALE B.**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO FACES, José**

**ES 2 428 740 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

Prevención y tratamiento de enfermedad amiloidogénica

## 5 CAMPO TÉCNICO

La invención se refiere a los campos técnicos de inmunología y medicina.

## 10 ANTECEDENTES

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad progresiva que da como resultado demencia senil. Véanse generalmente Selkoe, TINS 16, 403-409 (1993); Hardy et al., documento WO 92/13069; Selkoe, J. Neuropathol. Exp. Neurol. 53, 438-447 (1994); Duff et al., Nature 373, 476-477 (1995); Games et al., Nature 373, 523 (1995). En líneas generales, la enfermedad cae dentro de dos categorías: comienzo tardío, que se produce en ancianos (65 o más años de edad) y comienzo temprano, que se desarrolla mucho antes del periodo senil, es decir, entre los 35 y los 60 años de edad. En ambos tipos de enfermedad, la patología es la misma, pero las anomalías tienden a ser más graves y extendidas en los casos que comienzan en una edad más temprana. La enfermedad está caracterizada por dos tipos de lesiones en el cerebro, placas seniles y ovillos neurofibrilares. Las placas seniles son zonas de neuróplios desorganizados de hasta 150  $\mu\text{m}$  de ancho con depósitos amiloides extracelulares en el centro visibles mediante análisis microscópico de cortes de tejido cerebral. Los ovillos neurofibrilares son depósitos intracelulares de la proteína tau que consiste en dos filamentos enrollados uno alrededor del otro en pares.

El constituyente principal de las placas es un péptido denominado péptido A $\beta$  o  $\beta$ -amiloide. El péptido A $\beta$  es un fragmento interno de 39-43 aminoácidos de una proteína precursora denominada proteína precursora de amiloide (APP). Varias mutaciones dentro de la proteína APP se han correlacionado con la presencia de la enfermedad de Alzheimer. Véanse, por ejemplo, Goate et al., Nature 349, 704 (1991) (de valina<sup>717</sup> a isoleucina); Chartier Harlan et al. Nature 353, 844 (1991) (de valina<sup>717</sup> a glicina); Murrell et al., Science 254, 97 (1991) (de valina<sup>717</sup> a fenilalanina); Mullan et al., Nature Genet. 1, 345 (1992) (una mutación doble que cambia de lisina<sup>595</sup>-metionina<sup>596</sup> a asparagina<sup>595</sup>-leucina<sup>596</sup>). Se cree que tales mutaciones producen la enfermedad de Alzheimer aumentando o alterando el procesamiento de APP en A $\beta$ , particularmente el procesamiento de APP a cantidades crecientes de la forma larga de A $\beta$  (es decir, A $\beta$ 1-42 y A $\beta$ 1-43). Se cree que las mutaciones en otros genes, tales como los genes de presenilina, PS1 y PS2, afectan indirectamente al procesamiento de APP para generar cantidades crecientes de la forma larga A $\beta$  (véase Hardy, TINS 20, 154 (1997)). Estas observaciones indican que A $\beta$ , y particularmente su forma larga, es un elemento causante de la enfermedad de Alzheimer.

La EP-A-0683234 divulga anticuerpos que tienen especificidad de enlace para la  $\beta$ -amiloide. Combinar estos anticuerpos proporciona un método de ensayo por el que la  $\beta$ -amiloide puede ser determinada específicamente con una alta sensibilidad. Este método es útil para diagnosticar enfermedades en las que participa la  $\beta$ -amiloide o un derivado, como la enfermedad de Alzheimer, y los anticuerpos son útiles para desarrollar agentes preventivos o terapéuticos para la enfermedad de Alzheimer.

La WO-A-91/16819 describe un método y composición para el alivio de estados de enfermedad asociados con la acumulación anormal y/o la organización molecular de la proteína beta amiloide, como las manifestadas en la enfermedad de Alzheimer y otros trastornos amiloides del SNC. La invención comprende la administración de un nivel bajo de proteína beta amiloide, o un derivado de la misma, que ralentiza o revierte la pérdida o función neuronal.

La WO-A-95/23166 describe análogos de epítomos de células T sintéticos de epítomos de células T naturales que están parcial o completamente modificados de forma inversa o retro-inversa respecto al epítomo de células T natural mostrados como efectivos como epítomos de células T. Estos análogos de epítomos de células T estimulan la receptividad inmune cuando se usan en lugar de sus contrapartidas de epítomos de células T naturales en vacunas. La invención además describe el uso de estos análogos de epítomos de células T, a vacunas que comprenden los análogos de epítomos de células T, a métodos de preparar vacunas que comprenden estos análogos de epítomos de células T, y a anticuerpos generados usando estos análogos de epítomos de células T.

Johnson-Wood y otros (Proc Natl Acad Sci USA 1997 Feb 18;94(4):1550-5) midió los niveles de APP y sus metabolitos amiloidogénicos en regiones cerebrales de ratones transgénicos PDAPP (que sobreexpresan la proteína precursora amiloide humana APP717V ->F) entre 4 y 18 meses de edad. Los autores concluyeron que las similitudes observadas entre los ratones PDAPP y la enfermedad de Alzheimer humana, con respecto a la deposición A $\beta$ 42 que tiene lugar de una forma temporal y regionalmente específica, además validan el uso del modelo PDAPP para entender los procesos relacionados con la enfermedad.

McMichael, documento EP 526.511, propone la administración de dosificaciones homeopáticas (inferiores a o iguales a 10<sup>-2</sup> mg/día) de A $\beta$  a pacientes con EA establecida previamente. En un ser humano típico con aproximadamente 5 litros de plasma, podría esperarse que incluso el límite superior de esta dosificación generase una concentración no superior a 2 pg/ml. La concentración normal de A $\beta$  en el plasma humano normalmente está en

el intervalo de 50-200 pg/ml (Seubert et al., Nature 359, 325-327 (1992)). Dado que la dosificación propuesta del documento EP 526.511 apenas alteraría el nivel de A $\beta$  circulante endógeno y dado que el documento EP 526.511 no recomienda el uso de un adyuvante, no parece plausible que pudiera resultar ningún beneficio terapéutico.

5 En contraposición, la presente invención se refiere al tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y de otras enfermedades amiloidogénicas mediante la administración de un anticuerpo para A $\beta$  a un paciente en condiciones que generen una respuesta inmunitaria beneficiosa en el paciente. La invención cumple así una necesidad que viene de antiguo de regímenes terapéuticos para evitar o mejorar la neuropatología de la enfermedad de Alzheimer.

## 10 SUMARIO DE LA INVENCIÓN REIVINDICADA

15 En un aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica como se define en la reivindicación 1, para el uso en terapia. La composición farmacéutica es útil en los métodos de prevención o tratamiento de una enfermedad caracterizada por depósito amiloide en un paciente. Tales métodos incluyen inducir una respuesta inmunitaria contra un componente peptídico de un depósito amiloide en el paciente. Dicha inducción puede ser activa por la administración de un inmunógeno o pasiva por la administración de un anticuerpo. En algunos pacientes, el depósito amiloide es el péptido A $\beta$  agregado y la enfermedad es la enfermedad de Alzheimer. En algunos métodos, el paciente es asintomático. En algunos métodos, el paciente es menor de 50 años de edad. En algunos métodos, el paciente tiene factores de riesgo heredados que indican propensión a la enfermedad de Alzheimer. Tales factores de riesgo incluyen alelos variantes en el gen de la presenilina PS1 o PS2 y formas variantes de APP. En otros métodos, el paciente no tiene factores de riesgo conocidos para la enfermedad de Alzheimer.

25 Para el tratamiento de pacientes que sufren de enfermedad de Alzheimer, un régimen de tratamiento implica administrar una dosis de péptido A $\beta$  al paciente para inducir la respuesta inmune. En algunos métodos, el péptido A $\beta$  es administrado con un adyuvante que potencia la respuesta inmune al péptido A $\beta$ . En algunos métodos, el adyuvante es alumbre. En algunos métodos el adyuvante es MPL. La dosis de péptido A $\beta$  administrada al paciente es típicamente de al menos 10  $\mu$ g, si se administra con adyuvante, y al menos 50  $\mu$ g si se administra sin adyuvante. En algunos métodos, la dosis es de al menos 100  $\mu$ g.

30 En algunos métodos, el péptido A $\beta$  es A $\beta$ 1-42. En algunos métodos, el péptido A $\beta$  es administrado de forma agregada. En otros métodos, el péptido A $\beta$  se administra de forma disociada.

35 En algunos métodos, la respuesta inmunitaria se dirige al péptido A $\beta$  agregado sin dirigirse al péptido A $\beta$  disociado. Por ejemplo, la respuesta inmune puede comprender anticuerpos que enlazan con el péptido A $\beta$  agregado sin enlazar con el péptido A $\beta$  disociado. En algunos métodos, la respuesta inmune comprende células T que enlazan con la A $\beta$  complicado con células MCH1 o MHCII o CD8 o CD4. En otros métodos, la respuesta inmune es inducida administrando un anticuerpo a A $\beta$  al paciente.

40 El agente terapéutico normalmente se administra por vía oral, intranasal, intradérmica, subcutánea, intramuscular, tópica o intravenosa. En algunos métodos, el paciente se controla tras la administración para evaluar la respuesta inmunitaria. Si el control indica una reducción de la respuesta inmunitaria a lo largo del tiempo, puede administrarse al paciente una o más dosis adicionales del anticuerpo.

45 Se describen las composiciones farmacéuticas que comprenden A $\beta$  y un excipiente adecuado para administración oral y otras vías de administración. También se describen las composiciones farmacéuticas que comprenden un agente efectivo para inducir una respuesta inmunogénica contra A $\beta$  en un paciente, y un adyuvante farmacéuticamente aceptable. En algunas de dichas composiciones, el agente es A $\beta$  o un fragmento activo de la misma. En algunas composiciones, el adyuvante comprende alumbre. En algunas composiciones, el adyuvante comprende una emulsión de aceite en agua. En algunas composiciones, la A $\beta$  o fragmento activo es un componente de copolímero poliglicólido poliláctido (PLPG) u otra partícula. La invención además proporciona composiciones que comprenden A $\beta$  o un fragmento activo ligado a una molécula conjugada que promueve la administración de A $\beta$  al flujo sanguíneo de un paciente y/o promueve una respuesta inmune contra A $\beta$ . Por ejemplo, el conjugado puede servir para promover una respuesta inmune contra A $\beta$ . En algunas composiciones, el conjugado es toxina de cólera. 50 en algunas composiciones, el conjugado es inmunoglobulina. en algunas composiciones, el conjugado es toxina de difteria atenuada CRM 197 (Gupta, *Vaccine* 15, 1341-3 (1997).

55 También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden un efecto de agente para inducir una respuesta inmunogénica contra A $\beta$  en un paciente con la condición de que la composición este libre del adyuvante Completo de Freund.

60 Las composiciones de la invención son útiles en métodos de evitar o tratar la enfermedad de Alzheimer. En dichos métodos, una dosis efectiva del péptido A $\beta$  se administra a un paciente. La divulgación además estipula el uso de A $\beta$ , o un anticuerpo del mismo, en la fabricación de un medicamento para la prevención o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

65

En otro aspecto, la divulgación proporciona métodos de evaluar la eficacia de un método de tratamiento de Alzheimer en un paciente. En estos métodos, se determina una cantidad de línea de base de anticuerpo específico para el péptido A $\beta$  en una muestra de tejido del paciente antes del tratamiento con un agente. Una cantidad de anticuerpo específico para el péptido A $\beta$  en la muestra de tejido del paciente después del tratamiento con el agente se compara con la cantidad de la línea de base del anticuerpo específico del péptido A $\beta$ . Una cantidad del anticuerpo específico del péptido A $\beta$  medida después del tratamiento que es significativamente mayor que la cantidad de la línea de base del anticuerpo específico del péptido A $\beta$  indica un resultado de tratamiento positivo.

En otros métodos descritos de evaluar la eficacia de un método de tratamiento del Alzheimer en un paciente, se determina una cantidad de línea de base de anticuerpo específico para el péptido A $\beta$  en una muestra de tejido de un paciente antes del tratamiento con un agente. Una cantidad de anticuerpo específico para el péptido A $\beta$  en la muestra de tejido del sujeto después del tratamiento con el agente se compara con la cantidad de la línea de base del anticuerpo específico del péptido A $\beta$ . Una reducción o falta de diferencia significativa entre la cantidad de anticuerpo específico del péptido A $\beta$  medida después del tratamiento en comparación con la cantidad de la línea de base del anticuerpo específico del péptido A $\beta$  indica un resultado del tratamiento negativo.

En otros métodos descritos de evaluar la eficacia de un método de tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en un paciente se determina una cantidad de control de anticuerpo específico para el péptido A $\beta$  en muestras de tejido de una población de control. Una cantidad de anticuerpo específico para el péptido A $\beta$  en una muestra de tejido del paciente después de administrar un agente se compara con la cantidad de control del anticuerpo específico del péptido A $\beta$ . Una cantidad de anticuerpo específico del péptido A $\beta$  medida después del tratamiento que es significativamente mayor que la cantidad de control del anticuerpo específico del péptido A $\beta$  indica un resultado del tratamiento positivo.

En otros métodos descritos de evaluar la eficacia de un método de tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en un paciente, se determina una cantidad de control de anticuerpo específico para el péptido A $\beta$  en muestras de tejido de una población de control. Una cantidad de anticuerpo específico para el péptido A $\beta$  en una muestra de tejido del paciente después de administrar un agente se compara con la cantidad de control del anticuerpo específico del péptido A $\beta$ . Una falta de diferencia significativa entre la cantidad de anticuerpo específico del péptido A $\beta$  medida después de comenzar dicho tratamiento comparada con la cantidad de control del anticuerpo específico del péptido A $\beta$  indica un resultado del tratamiento negativo.

Otros métodos descritos de monitorizar la enfermedad de Alzheimer o la susceptibilidad a la misma en un paciente, comprenden detectar una respuesta inmune contra el péptido A $\beta$  en una muestra del paciente. En algunos de dichos métodos, al paciente se le está administrando un agente efectivo para tratar o prevenir la enfermedad de Alzheimer, y el nivel de la respuesta determina el régimen de tratamiento futuro del paciente.

En otros métodos descritos de evaluar la eficacia de un método de tratamiento del Alzheimer en un paciente se determina un valor para la cantidad de anticuerpo específico para el péptido A $\beta$  en la muestra de tejido de un paciente que ha sido tratado con un agente. El valor se compara con un valor de control determinado de una población de pacientes que experimenta mejoría de, o libertad de, síntomas de la enfermedad de Alzheimer debido al tratamiento con el agente. Un valor en el paciente al menos igual al valor de control indica una respuesta positiva al tratamiento.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Título de anticuerpos tras la inyección a ratones transgénicos con A $\beta$ 1-42.

Figura 2: Carga de amiloide en el hipocampo. Se determinó el porcentaje de la zona de la región del hipocampo ocupada por placas amiloides, definido mediante la reactividad con el mA $\beta$  3D6 específico para A $\beta$ , mediante el análisis de imágenes cuantitativo asistido por ordenador de cortes de cerebro inmunorreactivo. Se muestran los valores para los ratones individuales clasificados por grupo de tratamiento. La línea horizontal para cada agrupación indica el valor de mediana de la distribución.

Figura 3: Distrofia neurítica en el hipocampo. Se determinó el porcentaje de la zona de la región del hipocampo ocupada por neuritas distróficas, definido por su reactividad con el mA $\beta$  8E5 específico para la APP humana mediante el análisis de imágenes cuantitativo asistido por ordenador de cortes de cerebro inmunorreactivo. Se muestran los valores para los ratones individuales para el grupo tratado con AN1792 y el grupo control tratado con PBS. La línea horizontal para cada agrupación indica el valor de mediana de la distribución.

Figura 4: Astrocitosis en la corteza retrosplenial. Se determinó el porcentaje de la zona de la región cortical ocupada por astrocitos positivos para la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP) mediante el análisis de imágenes cuantitativo asistido por ordenador de cortes de cerebro inmunorreactivo. Los valores para los ratones individuales se muestran clasificados por grupo de tratamiento y los valores de mediana de los grupos se indican mediante líneas horizontales.

Figura 5: Títulos de anticuerpos en media geométrica frente a A $\beta$ 1-42 tras inmunización con un intervalo de ocho dosis de AN1792 que contienen 0,14, 0,4, 1,2, 3,7, 11, 33, 100 ó 300  $\mu$ g.

Figura 6: Cinéticas de respuesta de anticuerpos frente a inmunización con AN1792. Los títulos se expresan

como las medias geométricas de los valores para los 6 animales en cada grupo.

Figura 7: Análisis de imágenes cuantitativo de la carga de amiloide cortical en ratones tratados con PBS y AN1792.

5 Figura 8: Análisis de imágenes cuantitativo de la carga de placas neuríticas en ratones tratados con PBS y AN1792.

Figura 9: Análisis de imágenes cuantitativo del porcentaje de la corteza retrosplenial ocupada por astrocitosis en ratones tratados con PBS y AN1792.

10 Figura 10: Ensayo de proliferación de linfocitos en células de bazo de tratados con AN1792 (panel superior) o tratados con PBS (panel inferior)).

Figura 11: Niveles totales de A $\beta$  en la corteza. Un diagrama de dispersión de perfiles individuales de A $\beta$  en ratones inmunizados con derivados de APP o A $\beta$  combinados con adyuvante de Freund.

15 Figura 12: Se determinó la carga de amiloide en la corteza mediante análisis de imágenes cuantitativo de cortes de cerebro inmunorreactivo para ratones inmunizados con los conjugados A $\beta$ 1-5, A $\beta$ 1-12, y A $\beta$ 13-28 del péptido A $\beta$ ; el grupo control tratado con PBS y con los agregados de A $\beta$  de longitud completa AN1792 (A $\beta$ 1-42) y AN1528 (A $\beta$ 1-40).

Figura 13: Títulos en media geométrica del anticuerpo específico para A $\beta$  para grupos de ratones inmunizados con derivados de APP o A $\beta$  combinados con adyuvante de Freund.

Figura 14: Títulos en media geométrica del anticuerpo específico para A $\beta$  para grupos de cobayas inmunizados con AN1792, o un derivado palmitoilado del mismo, combinado con diversos adyuvantes.

20 Figuras 15: Niveles de A $\beta$  en la corteza de ratones PDAPP de 12 meses de edad tratados con AN1792 o AN1528 con diferentes adyuvantes.

## DEFINICIONES

25 La expresión "identidad sustancial" significa que dos secuencias peptídicas, cuando están alineadas óptimamente, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT que usan valores de hueco por defecto, compartan al menos una identidad de secuencia del 65 por ciento, preferiblemente al menos una identidad de secuencia del 80 o el 90 por ciento, más preferiblemente al menos una identidad de secuencia del 95 por ciento o más (por ejemplo, una identidad de secuencia del 99 por ciento o superior). Preferiblemente, las posiciones de residuos que no son  
30 idénticas difieren en sustituciones conservativas de aminoácidos.

Para la comparación de secuencias, normalmente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, se introducen en un ordenador las secuencias de prueba y de referencia, se diseñan las coordenadas de subsecuencia,  
35 si es necesario, y se diseñan los parámetros del programa de algoritmos de secuencia. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces la identidad de secuencia en porcentaje para la(s) secuencia(s) de prueba con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros diseñados del programa.

40 La alineación óptima de las secuencias para su comparación puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineación por homología de Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), mediante el procedimiento de búsqueda de similitud de Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), mediante implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el paquete de programa Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección  
45 visual (véase generalmente Ausubel et al., citado anteriormente). Un ejemplo de algoritmo que es adecuado para determinar el tanto por ciento de identidad de secuencia y la similitud de secuencia es el algoritmo de BLAST, que se describe en Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990). El programa para realizar los análisis de BLAST está públicamente disponible a través del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Normalmente, pueden usarse los parámetros del programa por defecto para realizar la comparación de las  
50 secuencias, aunque también pueden usarse parámetros personalizados. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10915 (1989)).

55 Para el fin de clasificar las sustituciones de aminoácidos como conservativas o no conservativas, los aminoácidos se agrupan tal como sigue: Grupo I (cadenas laterales hidrófobas): norleucina, met, ala, val, leu, ile; Grupo II (cadenas laterales hidrófilas neutras): cys, ser, thr; Grupo III (cadenas laterales ácidas): asp, glu; Grupo IV (cadenas laterales básicas): asn, gln, his, lys, arg; Grupo V (residuos que influyen en la orientación de la cadena): gly, pro; y Grupo VI (cadenas laterales aromáticas): trp, tyr, phe. Las sustituciones conservativas implican sustituciones entre aminoácidos de la misma clase. Las sustituciones no conservativas constituyen el intercambio de  
60 un miembro de una de estas clases por un miembro de otra.

Los agentes terapéuticos de la invención normalmente son sustancialmente puros. Esto significa que un agente normalmente tiene al menos aproximadamente el 50% p/p (peso/peso) de pureza, así como que está sustancialmente libre de proteínas y contaminantes que interfieren. En ocasiones los agentes tienen al menos  
65 aproximadamente el 80% p/p y, más preferiblemente al menos el 90% p/p o aproximadamente el 95% p/p de pureza. Sin embargo, usando técnicas convencionales de purificación de proteínas pueden obtenerse péptidos homogéneos

de al menos el 99% p/p.

La unión específica entre dos entidades significa una afinidad de al menos  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  M<sup>-1</sup> o  $10^{10}$  M<sup>-1</sup>. Se prefieren las afinidades mayores que  $10^8$  M<sup>-1</sup>.

El término "anticuerpo" se usa para incluir anticuerpos intactos y fragmentos de enlace de los mismos. Típicamente, los fragmentos compiten con el anticuerpo intacto del que están derivados para el enlace específico con un antígeno. Opcionalmente, los anticuerpos o fragmentos de enlace de los mismos pueden estar químicamente conjugados a, o expresarse como, proteínas de fusión con otras proteínas.

APP<sup>695</sup>, APP<sup>751</sup> y APP<sup>770</sup> se refieren, respectivamente, a los polipéptidos largos de 695, 751 y 770 residuos de aminoácidos codificados por el gen de la APP humana. Véanse Kang et al., Nature 325, 773 (1987); Ponte et al., Nature 331, 525 (1988); y Kitaguchi et al., Nature 331, 530 (1988). A los aminoácidos dentro de la proteína precursora de amiloide (APP) humana se les asignan números según la secuencia de la isoforma APP770. Los términos tales como Aβ39, Aβ40, Aβ41, Aβ42 y Aβ43 se refieren a un péptido Aβ que contiene 1-39, 1-40, 1-41, 1-42 y 1-43 residuos de aminoácidos.

El término "epítipo" o "determinante antigénico" se refiere a un sitio en un antígeno al que responden las células B y/o T. Los epítipos para las células B pueden estar formados por aminoácidos contiguos o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos mediante el plegamiento terciario de una proteína. Los epítipos formados a partir de aminoácidos contiguos normalmente se conservan con la exposición a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítipos formados por el plegamiento terciario normalmente se pierden con el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Normalmente un epítipo incluye al menos 3, y más habitualmente, al menos 5 ó 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Los procedimientos de determinación de la conformación espacial de los epítipos incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols en Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996). Los anticuerpos que reconocen el mismo epítipo pueden identificarse en un inmunoensayo sencillo que muestra la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana. Las células T reconocen epítipos continuos de aproximadamente nueve aminoácidos para las células CD8 o aproximadamente 13-15 aminoácidos para las células CD4. Las células T que reconocen el epítipo pueden identificarse mediante ensayos *in vitro* que miden la proliferación dependiente de antígeno, tal como se determina mediante la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina por las células T cebadas en respuesta a un epítipo (Burke et al., J. Inf. Dis. 170, 1110-19 (1994)), mediante la eliminación dependiente de antígeno (ensayo de linfocitos T citotóxicos, Tigges et al., J. Immunol. 156, 3901-3910) o mediante la secreción de citocinas.

La expresión respuesta "inmunológica" o "inmunitaria" es el desarrollo de una respuesta beneficiosa humoral (mediada por anticuerpos) y/o celular (mediada por células T específicas de antígeno o por sus productos de secreción) dirigida frente a un péptido amiloide en un paciente receptor. Una respuesta de este tipo puede ser una respuesta activa inducida mediante la administración de inmunógenos o una respuesta pasiva inducida mediante la administración de anticuerpos o células T cebadas. Una respuesta inmunitaria celular está provocada por la presentación de epítipos polipeptídicos en asociación con moléculas del CMH de Clase I o de Clase II para activar a las células T cooperadoras CD4<sup>+</sup> específicas de antígeno y/o a las células T citotóxicas CD8<sup>+</sup>. La respuesta también puede implicar la activación de monocitos, macrófagos, células NK, basófilos, células dendríticas, astrocitos, células de la microglía, eosinófilos u otros componentes de inmunidad innata. La presencia de una respuesta inmunológica mediada por células puede determinarse mediante ensayos de proliferación (células T CD4<sup>+</sup>) o ensayos de CTL (linfocitos T citotóxicos) (véanse Burke, citado anteriormente; Tigges, citado anteriormente). Las contribuciones relativas de las respuestas humoral y celular al efecto protector o terapéutico de un inmunógeno pueden distinguirse aislando separadamente IgG y células T de un animal singénico inmunizado y midiendo el efecto protector o terapéutico en un segundo sujeto.

Un "agente inmunogénico" o "inmunógeno" puede inducir una respuesta inmunológica frente a sí mismo con la administración a un paciente, opcionalmente junto con un adyuvante.

La expresión "polinucleótido desnudo" se refiere a un polinucleótido no complejo con materiales coloidales. Los polinucleótidos desnudos se clonan a veces en un vector de plásmido.

El término "adyuvante" se refiere a un compuesto que cuando se administra junto con un antígeno aumenta la respuesta inmunitaria al antígeno, pero que cuando se administra sólo no genera una respuesta inmunitaria al antígeno. Los adyuvantes pueden aumentar una respuesta inmunitaria mediante varios mecanismos que incluyen el reclutamiento de linfocitos, la estimulación de células B y/o T y la estimulación de macrófagos.

El término "paciente" incluye sujetos humanos y otros mamíferos que reciben tratamiento profiláctico o bien terapéutico.

Aβ disgregado o monomérico significa unidades peptídicas monoméricas solubles de Aβ. Un procedimiento para preparar Aβ monomérico es disolver el péptido liofilizado en DMSO puro con sonicación. La solución resultante

se centrifuga para eliminar cualquier material particulado no soluble. El A $\beta$  agregado es una mezcla de oligómeros en los que las unidades monoméricas se mantienen juntas mediante enlaces no covalentes.

5 Las composiciones o los procedimientos "que comprenden" uno o más de los elementos nombrados pueden incluir otros elementos no nombrados específicamente. Por ejemplo, una composición que comprende el péptido A $\beta$  engloba un péptido A $\beta$  aislado y un péptido A $\beta$  como componente de una secuencia polipeptídica más grande.

## 10 DESCRIPCIÓN DETALLADA

### I. General

15 La invención proporciona composiciones farmacéuticas para uso en terapia que son útiles en los métodos para el tratamiento profiláctico y terapéutico de enfermedades caracterizadas por la acumulación de depósitos amiloides. Los depósitos amiloides comprenden un péptido agregado a una masa insoluble. La naturaleza del péptido varía en las diferentes enfermedades, pero en la mayoría de los casos, el agregado tiene una estructura en lámina  $\beta$  plegada y se tiñe con colorante rojo Congo. Las enfermedades caracterizadas por depósitos amiloides incluyen la enfermedad de Alzheimer (EA), de comienzo tardío y temprano. En ambas enfermedades, el depósito amiloide comprende un péptido denominado A $\beta$ , que se acumula en el cerebro de los individuos afectados. Los ejemplos de algunas de otras enfermedades caracterizadas por depósitos amiloides son amiloidosis por SAA, síndrome islándico hereditario, mieloma múltiple y encefalopatías espongiiformes, incluyendo la enfermedad de las vacas locas, la enfermedad de Creutzfeldt Jakob, encefalopatía espongiiforme ovina y encefalopatía espongiiforme del visón (véanse Weissmann et al., Curr. Opin. Neurobiol. 7, 695-700 (1997); Smits et al., Veterinary Quarterly 19, 101-105 (1997); Nathanson et al., Am. J. Epidemiol. 145, 959-969 (1997)). Los péptidos que forman los agregados en esas enfermedades son amiloide sérico A, cistatina C, cadena ligera kappa de la IgG, respectivamente para las tres primeras, y proteína priónica para las otras.

### II. Agentes terapéuticos

#### 30 1. Enfermedad de Alzheimer

Los agentes terapéuticos para su uso en la presente invención inducen una respuesta inmunitaria frente al péptido A $\beta$ . Estos agentes incluyen el mismo péptido A $\beta$  y fragmentos del mismo, y anticuerpos intactos reactivos con el péptido A $\beta$ . La inducción de una respuesta inmune puede ser activa como cuando un inmunógeno se administra para inducir anticuerpos o células T reactivas con A $\beta$  en un paciente, o pasiva, como cuando un anticuerpo se administra que enlaza el mismo con A $\beta$  en el paciente.

40 A $\beta$ , también conocido como péptido  $\beta$ -amiloide, o péptido A4 (véanse el documento US 4.666.829; Glenner & Wong, Biochem. Biophys. Res. Commun. 120, 1131 (1984)), es un péptido de 39-43 aminoácidos, que es el principal componente de las placas características de la enfermedad de Alzheimer. A $\beta$  se genera mediante el procesamiento de una proteína más grande, APP, mediante dos enzimas denominadas  $\beta$  y  $\gamma$ -secretasas (véase Hardy, TINS 20, 154 (1997)). Se producen mutaciones conocidas en APP asociadas con la enfermedad de Alzheimer próximas al sitio de  $\beta$  o  $\gamma$ -secretasa, o dentro de A $\beta$ . Por ejemplo, la posición 717 está próxima al sitio de escisión de  $\gamma$ -secretasa de APP en su procesamiento a A $\beta$ , y las posiciones 670/671 están próximas al sitio de escisión de  $\beta$ -secretasa. Se cree que las mutaciones producen la enfermedad EA mediante la interacción con reacciones de escisión mediante las cuales se forma A $\beta$ , de modo que se aumenta la cantidad de la forma de 42/43 aminoácidos del A $\beta$  generado.

50 A $\beta$  tiene la propiedad inusual de que puede fijarse y activar las cascadas del complemento clásica y alternativa. En particular, se une a C1q y en última instancia a C3bi. Esta asociación facilita la unión a macrófagos, lo que conduce a la activación de las células B. Además, C3bi se rompe adicionalmente y entonces se une a CR2 en las células B de una manera dependiente de células T, lo que conduce a un aumento de 10.000 en la activación de estas células. Este mecanismo hace que A $\beta$  genere una respuesta inmunitaria en exceso de la de otros antígenos.

55 El agente terapéutico usado en los métodos reivindicados puede ser cualquiera de las formas de origen natural del péptido A $\beta$ , y particularmente las formas humanas (es decir, A $\beta$ 39, A $\beta$ 40, A $\beta$ 41, A $\beta$ 42 o A $\beta$ 43). Las secuencias de estos péptidos y su relación con el precursor APP se ilustran mediante la figura 1 de Hardy et al., TINS 20, 155-158 (1997). Por ejemplo, A $\beta$ 42 tiene la secuencia: H<sub>2</sub>N-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala-OH.

60 A $\beta$ 41, A $\beta$ 40 y A $\beta$ 39 difieren de A $\beta$ 42 por la omisión de Ala, Ala-Ile y Ala-Ile-Val, respectivamente, del extremo C-terminal. A $\beta$ 43 difiere de A $\beta$ 42 por la presencia de un residuo de treonina en el extremo C-terminal. El agente terapéutico puede ser también un fragmento activo de un péptido A $\beta$  natural que contiene un epítipo que induce una respuesta inmune protectora o terapéutica similar en la administración a un humano. Los fragmentos inmunogénicos típicamente tienen una secuencia de al menos 3, 5, 6, 10 ó 20 aminoácidos contiguos de un péptido

natural. Los fragmentos inmunogénicos incluyen A $\beta$  1-5, 1-6, 1-12, 13-28, 17-28, 25-25, 35-40 y 35-42. Los fragmentos de la mitad N-terminal de A $\beta$  se prefieren en algunos métodos. Los análogos incluyen alélicos, especies y variantes inducidas. Los análogos difieren típicamente de los péptidos de origen natural en una o unas pocas posiciones, a menudo por virtud de sustituciones conservadoras. Los análogos típicamente muestran al menos un 80 ó 90% de identidad de secuencia con los péptidos naturales. Algunos análogos también incluyen aminoácidos no naturales o modificaciones de los aminoácidos N o C terminales. Ejemplos de aminoácidos no naturales son  $\alpha$ , aminoácidos  $\alpha$ -disustituidos, aminoácidos N-alquilo, ácido láctico, 4-hidroxiprolina,  $\gamma$ -carboxiglutamato,  $\epsilon$ -N,N,N-trimetilisina,  $\epsilon$ -N-acetilisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmimetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina,  $\omega$ -N-metilarginina. Los fragmentos pueden ser cribados para eficacia profiláctica o terapéutica en modelos de animales transgénicos como se describe a continuación.

A $\beta$  y sus fragmentos pueden ser sintetizados por síntesis de péptidos en fase sólida o expresión recombinante, o pueden ser obtenidos de fuentes naturales. Los sintetizadores de péptidos automáticos están disponibles comercialmente de numerosos proveedores, tales como Applied Biosystems, Foster City, California. La expresión recombinante puede ser en bacterias, tales como *E. coli*, levaduras, células de insectos o células de mamíferos. Los procedimientos para la expresión recombinante se describen por Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (C.S.H.P. Press, NY 2<sup>a</sup> ed., 1989). Algunas formas del péptido A $\beta$  también están disponibles comercialmente (por ejemplo, American Peptides Company, Inc., Sunnyvale, CA y California Peptide Research, Inc. Napa, CA).

El péptido A $\beta$  o fragmento activo puede ser administrado de forma asociada (es decir, como un péptido amiloide) o de forma disociada. Los agentes terapéuticos también incluyen agentes inmunogénicos multímeros o monoméricos.

Los fragmentos de A $\beta$  pueden ser cribados inicialmente para la idoneidad determinando su capacidad de enlazar con anticuerpos o linfocitos (B o T) conocidos de ser específicos para A $\beta$  u otros péptidos amiloidogénicos. Por ejemplo, los cribados iniciales pueden ser realizados con cualquier suero policlonal o anticuerpo monoclonal para A $\beta$  u otro péptido amiloidogénico. Los fragmentos identificados por dichos cribados son entonces analizados adicionalmente para la capacidad de inducir anticuerpos o linfocitos reactivos para A $\beta$  u otro péptido amiloidogénico. Por ejemplo, se pueden probar diluciones múltiples de suero en placas de microtitulación que han sido pre-recubiertas con péptido A $\beta$  y se puede realizar un ELISA estándar para probar para anticuerpos reactivos a A $\beta$ . Los fragmentos pueden ser después probados para la eficacia profiláctica y terapéutica en animales transgénicos predispuestos a una enfermedad amiloidogénica, como se describe en los Ejemplos. Dichos animales incluyen, por ejemplo, ratones que llevan la mutación 717 de APP descritos por Games y otros, supra, y ratones que llevan una mutación sueca de APP como se describe por McConlogue y otros, US 5.612.486 y Hsiao y otros, *Science* 274, 99 (1996); Staufenbiel y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13287-13292 (1997); Sturchler-Pierrat y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13287-13292 (1997); Borchelt y otros, *Neuron* 19, 939-945 (1997)).

Los agentes terapéuticos de la invención incluyen anticuerpos IgG1 humanos que se unen específicamente a A $\beta$ . Tales anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales. Algunos de tales anticuerpos se unen específicamente a la forma agregada de A $\beta$  sin unirse a la forma disociada. Algunos se unen específicamente a la forma disociada sin unirse a la forma agregada. Algunos se unen a las formas tanto agregadas como disociadas. La producción de anticuerpos monoclonales no humanos, por ejemplo, murinos o de rata, se puede conseguir, por ejemplo, inmunizando el animal con A $\beta$ . Véase Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (CSHP NY, 1988). Tal inmunógeno se puede obtener a partir de una fuente natural, mediante síntesis de péptidos o mediante expresión recombinante.

Las formas humanizadas de anticuerpos de ratón se pueden generar uniendo las regiones CDR de anticuerpos no humanos a regiones constantes humanas mediante técnicas de ADN recombinante. Véase Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 10029-10033 (1989) y documento WO 90/07861.

Los anticuerpos humanos se pueden obtener usando métodos de presentación en fago. Véase, por ejemplo, Dower et al., documento WO 91/17271; McCafferty et al., documento WO 92/01047. En estos métodos se producen bibliotecas de fagos en los que los miembros presentan diferentes anticuerpos sobre sus superficies externas. Los anticuerpos se presentan habitualmente como fragmentos Fv o Fab. Los anticuerpos que presentan fagos con una especificidad deseada se seleccionan mediante enriquecimiento de afinidad para A $\beta$  o fragmentos del mismo. Los anticuerpos humanos frente a A $\beta$  también se pueden producir a partir de mamíferos transgénicos no humanos que tienen transgenes que codifican al menos un segmento del locus de la inmunoglobulina humana y un locus de inmunoglobulina endógeno inactivado. Véase, por ejemplo, Lonberg et al., documento 93/12227 (1993); Kucherlapati, documento WO 91/10741 (1991). Los anticuerpos humanos se pueden seleccionar mediante experimentos de unión competitiva, o de otro modo, para tener la misma especificidad de epítipo que un anticuerpo de ratón particular. Tales anticuerpos probablemente comparten de forma particular las propiedades funcionales útiles de los anticuerpos de ratón. Los anticuerpos policlonales humanos también se pueden proporcionar en forma de suero de seres humanos inmunizados con un agente inmunógeno. Opcionalmente, tales anticuerpos policlonales se pueden concentrar mediante purificación por afinidad usando A $\beta$  u otro péptido amiloide como un reactivo de

afinidad.

Los anticuerpos humanos o humanizados se pueden diseñar para tener una región constante de IgG, IgD, IgA e IgE y cualquier isotipo, incluyendo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Los anticuerpos se pueden expresar como tetrámeros que contienen dos cadenas ligeras y dos pesadas, como cadenas pesadas separadas, cadenas ligeras, como Fab, Fab' F(ab')<sub>2</sub> y Fv o como anticuerpos de cadena sencilla en los que los dominios variables de cadena pesada y ligera están unidos entre sí mediante un espaciador.

## 2. Otras enfermedades

Los mismos principios u otros análogos determinan la producción de agentes terapéuticos para el tratamiento de otras enfermedades amiloidogénicas. En general, los agentes apuntados anteriormente para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer también pueden usarse para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer de comienzo temprano asociada con el síndrome de Down. En la enfermedad de las vacas locas, péptido priónico, fragmentos activos y análogos y anticuerpos para el péptido priónico se usan en lugar del péptido A $\beta$ , fragmentos activos, análogos y anticuerpos para el péptido A $\beta$  en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. En el tratamiento de mieloma múltiple se usa la cadena ligera de IgG y análogos y anticuerpos de la misma y así sucesivamente en otras enfermedades.

## 3. Proteínas Portadoras

Algunos agentes para inducir una respuesta inmune contienen el epítipo apropiado para inducir una respuesta inmune contra los depósitos amiloides pero son demasiado pequeños para ser inmunogénicos. En esta situación, un inmunógeno péptido puede ser ligado a un portador adecuado para ayudar a provocar una respuesta inmune. Los portadores adecuados incluyen albúminas de suero, hemocianina de lapa californiana, moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovalbúmina, toxoide tetánico, o un toxoide de otra bacteria patógena, como la difteria, *E. coli*, cólera, o *H. pylori*, o un derivado de toxina atenuado. Otros portadores para estimular o potenciar una respuesta inmune incluyen citocinas como IL-1, péptidos  $\alpha$  y  $\beta$  de IL-1, IL-2,  $\gamma$ INF, IL-10, GM-CSF, y quimiocinas, como la M1P1 $\alpha$  y  $\beta$  y RANTES. Los agentes inmunogénicos pueden también ser ligados a péptidos que potencian el transporte a través de los tejidos, como se describe en O'Mahony, WO 97/17613 y WO 97/17614.

Los agentes inmunogénicos pueden ser ligados por reticulación química. Las técnicas para ligar un inmunógeno a un portador incluyen la formación de ligamientos de disulfuro usando propionato de N-succinimidil-3-(2-piridil-tio) (SPDP) y succinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC) (si el péptido carece de un grupo sulfhidrilo, este puede ser proporcionado por la adición de un residuo de cisteína). Estos reactivos crean un ligamiento de disulfuro entre ellos mismos y los residuos de cisteína del péptido en una proteína y un ligamiento de amida a través del  $\epsilon$ -amino en una lisina, u otro grupo amino libre en otros aminoácidos. Se describen una variedad de tales agentes de formación de amida/disulfuro por *Immun. Rev.* 62, 185 (1982). Otros agentes de acoplamiento bifuncionales forman un tioéter en lugar de un ligamiento de disulfuro. Muchos de estos agentes formadores de tioéter están disponibles comercialmente e incluyen ésteres reactivos de ácido 6-maleimidocaproico, ácido 2-bromoacético, y ácido 2-yodoacético, ácido 4-(N-maleimido-metil)ciclohexano-1-carboxílico. Los grupos carboxilo pueden ser activados combinándolos con succinimida o ácido 1-hidroxil-2-nitro-4-sulfónico, sal de sodio.

Los péptidos inmunógenos pueden ser también expresados como proteínas de fusión con portadores. El péptido inmunógeno puede estar ligado en el término amino, el término carboxilo, o internamente al portador. Opcionalmente, pueden estar presentes repeticiones múltiples del péptido inmunógeno en la proteína de fusión.

## III. Pacientes en los que se puede aplicar el tratamiento

Los pacientes en los que se puede aplicar el tratamiento incluyen individuos en riesgo de padecer la enfermedad pero que no muestran síntomas, así como pacientes que muestran los síntomas actualmente. En el caso de la enfermedad de Alzheimer, prácticamente cualquiera está en riesgo de padecer la enfermedad de Alzheimer si vive lo suficiente. Por tanto, los presentes procedimientos pueden administrarse profilácticamente a la población general sin ninguna evaluación del riesgo del paciente. Los presentes procedimientos son especialmente útiles para individuos que sí tienen un riesgo genético conocido de padecer la enfermedad de Alzheimer. Tales individuos incluyen los que tienen parientes que han experimentado esta enfermedad y aquellos cuyo riesgo se determina mediante el análisis de marcadores genéticos o bioquímicos. Los marcadores genéticos del riesgo hacia la enfermedad de Alzheimer incluyen mutaciones en el gen de APP, particularmente mutaciones en la posición 717 y en las posiciones 670 y 671 denominadas las mutaciones de Hardy y sueca, respectivamente (véase Hardy, TINS, citado anteriormente). Otros marcadores de riesgo son las mutaciones en los genes de presenilina, PS1 y PS2, y ApoE4, historia familiar de EA, hipercolesterolemia o aterosclerosis. Los individuos que padecen actualmente la enfermedad de Alzheimer pueden reconocerse por su demencia característica, así como por la presencia de los factores de riesgo descritos anteriormente. Además, están disponibles varias pruebas diagnósticas para identificar individuos que tienen EA. Éstas incluyen la medición de los niveles de CSF tau y A $\beta$ 42. Los niveles elevados de tau y disminuidos de A $\beta$ 42 significan la presencia de EA. Los individuos que padecen la enfermedad de Alzheimer también pueden diagnosticarse mediante los criterios de MMSE o ADRDA tal como se trata en la sección de

ejemplos.

En los pacientes asintomáticos, el tratamiento puede comenzar a cualquier edad (por ejemplo, 10, 20, 30). Habitualmente, sin embargo, no es necesario comenzar el tratamiento hasta que un paciente alcanza los 40, 50, 60 ó 70 años. Normalmente, el tratamiento supone múltiples dosificaciones durante un periodo de tiempo. El tratamiento puede controlarse mediante ensayos de anticuerpos, o respuestas de células T o células B activadas al agente terapéutico (por ejemplo, el péptido Aβ) a lo largo del tiempo. Si la respuesta falla, está indicada una dosificación de refuerzo. En el caso de pacientes potenciales con síndrome de Down, puede comenzarse el tratamiento de manera prenatal mediante la administración del agente terapéutico a la madre o poco después del nacimiento.

#### IV. Regímenes de tratamiento

En las aplicaciones profilácticas, las composiciones farmacéuticas o los medicamentos se administran a un paciente propenso a, o en cualquier caso en riesgo de, padecer una enfermedad particular en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo o para retrasar el comienzo de la enfermedad. En las aplicaciones terapéuticas, las composiciones o los medicamentos se administran a un paciente que se sospecha que padece, o que ya está padeciendo tal enfermedad en una cantidad suficiente para curar, o al menos para detener parcialmente, los síntomas de la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para conseguir esto se define como una dosis terapéutica o farmacéuticamente eficaz. En regímenes profiláctico y terapéutico, los agentes habitualmente se administran en varias dosificaciones hasta que se ha logrado una respuesta inmunitaria suficiente. Normalmente, se controla la respuesta inmunitaria y se administran dosis repetidas si la respuesta inmunitaria comienza a desaparecer.

Las dosis eficaces de las composiciones de la presente invención, para el tratamiento de las afecciones descritas anteriormente varían dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo los medios de administración, el sitio diana, el estado fisiológico del paciente, si el paciente es un ser humano o un animal, de otros medicamentos administrados y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Habitualmente, el paciente es un ser humano, pero en algunas enfermedades, tales como la enfermedad de las vacas locas, el paciente puede ser un mamífero no humano, tal como un bovino. Es necesario ajustar las dosificaciones del tratamiento para optimizar la seguridad y la eficacia. La cantidad de inmunógeno depende de si también se administra un adyuvante, requiriéndose dosificaciones superiores en ausencia del adyuvante. La cantidad de un inmunógeno para su administración en ocasiones varía desde 1 µg hasta 500 µg por paciente y más habitualmente desde 5 µg hasta 500 µg por inyección para la administración a seres humanos. Ocasionalmente, se usa una dosis superior de 1 mg - 2 mg por inyección. Normalmente se usan aproximadamente 10, 20, 50 ó 100 µg para cada inyección a seres humanos. Las veces de aplicación de las inyecciones pueden variar significativamente desde una vez al día, una vez al año, hasta una vez cada diez años. Cada día en que se administra una dosificación de inmunógeno, la dosificación es mayor que 1 µg/paciente y habitualmente mayor que 10 µg/paciente si también se administra adyuvante, y mayor que 10 µg/paciente y habitualmente mayor que 100 µg/paciente en ausencia de adyuvante. Un régimen típico está constituido por una inmunización seguida por inyecciones de refuerzo a intervalos de 6 semanas. Otro régimen está constituido por una inmunización seguida por inyecciones de refuerzo 1, 2 y 12 meses después. Otro régimen supone una inyección cada dos meses a lo largo de la vida. Alternativamente, las inyecciones de refuerzo pueden realizarse de manera irregular según se indique mediante el control de la respuesta inmunitaria. Para la inmunización pasiva con un anticuerpo, la dosificación varía desde aproximadamente 0,0001 hasta 100 mg/kg, y más habitualmente de 0,01 a 5 mg/kg del peso corporal del huésped.

Los agentes para inducir una respuesta inmunitaria pueden administrarse mediante medios parenterales, tópicos, intravenosos, orales, subcutáneos, intraperitoneales, intranasales o intramusculares para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico. La vía de administración más típica es la subcutánea, aunque otras pueden ser igualmente eficaces. La siguiente vía más común es la inyección intramuscular. Este tipo de inyección se realiza lo más normalmente en los músculos de la pierna o el brazo. Las inyecciones intravenosas, así como las inyecciones intraperitoneales, las inyecciones intraarteriales, intracraneales o intradérmicas también son eficaces en la generación de una respuesta inmunitaria. En algunos métodos, los agentes se inyectan directamente en un tejido particular en el que se han acumulado los depósitos.

Los agentes de la invención pueden administrarse opcionalmente en combinación con otros agentes que son al menos parcialmente eficaces en el tratamiento de la enfermedad amiloidogénica. En el caso de la enfermedad de Alzheimer y el síndrome de Down, en los que los depósitos amiloides se producen en el cerebro, los agentes de la invención también pueden administrarse junto con otros agentes que aumentan el paso de los agentes de la invención a través de la barrera hematoencefálica.

Los agentes inmunogénicos de la invención, como los péptidos son a veces administrados en combinación con un adyuvante. Se pueden usar una variedad de adyuvantes en combinación con un péptido, como el Aβ, para provocar una respuesta inmune. Los adyuvantes preferidos aumentan la respuesta intrínseca a un inmunógeno sin causar cambios conformacionales en el inmunógeno que afectan a la forma cualitativa de la respuesta. Los adyuvantes preferidos incluyen alumbre, lípido 3 De-Oacilado monofosforil A (MPL) ver GB 2220211). EL QS21 es un triterpeno glucósido o saponina aislado de la corteza del árbol Quillaja Saponaria Molina que se encuentra en

Sudamérica (ver Kensil y otros, *in Vaccine Desing: The Subunit and Ajuvant Approach* (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); la Patente US N° 5.057.540). Otros adyuvantes son emulsiones de aceite en agua (como escualeno o aceite de cacahuete) opcionalmente en combinación con estimulantes inmunes, como lípido A monofosforilo (ver Stoute y otros, *N. Engl.J. Med.* 336, 86-91 (1997)). Otro adyuvante es el CpG (*Bioworld Today*, 15 de Noviembre de 1998). Alternativamente, la A $\beta$  puede estar acoplado con un adyuvante. Por ejemplo, una versión lipopéptida de A $\beta$  se puede preparar acoplando ácido palmítico u otros lípidos directamente con el término N de A $\beta$  como se describe para la vacunación del antígeno de la hepatitis B (Livingston, *J. Immunol.* 159, 1383-1392 (1997)). Sin embargo dicho acoplamiento no debe cambiar sustancialmente la conformación de A $\beta$  con el fin de afectar a la naturaleza de la respuesta inmune al mismos. Los adyuvantes pueden ser administrado como un componente de una composición terapéutica con un agente activo o pueden ser administrados separadamente, antes concurrentemente con, o después de la administración del agente terapéutico.

Una clase preferida de adyuvantes son las sales de aluminio (alumbre), como el hidróxido de aluminio, el fosfato de aluminio, el sulfato de aluminio. Dichos adyuvantes pueden ser usados con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos como el MPL o 3-DMP, QS21, aminoácidos poliméricos o monoméricos como el ácido poliglútamico o la polilisina. Otra clase de adyuvantes son formulaciones de emulsiones de aceite en agua. Dichos adyuvantes pueden ser usados con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos como péptidos de muramil (por ejemplo, N-acetilmuramil-Ltreonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-S-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), N-acetilglucosaminil-N-acerilmuramil-L-Al-D-isoglu-L-Ala-dipalmitoxi propilamida (DTP-DPP) teramida<sup>TM</sup>), u otros componentes de paredes de células bacterianas. Las emulsiones de aceite en agua incluyen (a) MF59 (WO 90/14837), que contiene un 5% de Escualeno, 0,5% de Tween 80, y un 0,5% de Span 85 (conteniendo opcionalmente varias cantidades de MTP-PE) formulada en partículas de submicras usando un microfluidificador como el microfluidificador Modelo 110Y (Microfluidics, Newton MA), (b) SAF, que contiene un 10% de Escualeno, 0,4% de Tween 80, un 5% de polímero L121 plurónico-bloqueado, y thr-MDP, ya sea microfluidificado en una emulsión de submicras o agitado para generar una emulsión de tamaño de partícula más grande, y (c) sistema adyuvante Ribit<sup>TM</sup> (RAS, (Ribi Immunochem, Hamilton, MT). que contiene un 2% de escualeno, un 0,2% de Tween 80, y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo consistente de monofosforilipido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM), y esqueleto de la pared celular (CWS), preferiblemente MPL 6 CWS (Detox<sup>TM</sup>). Otra clase de adyuvantes preferidos son los adyuvantes de saponina, como el Stimulon<sup>TM</sup> (QS21, Aquila, Worcester, MA) o partículas generadas de los mismos como las ISCOMs (complejos inmunoestimulantes) y la ISCOMATRIX. Otros adyuvantes incluyen Adyuvante Completo de Freund (CFA) y Adyuvante Incompleto de Freund (IFA). Otros adyuvantes incluyen citocinas, como interleucinas (IL-1, IL-2, e IL-12), factor estimulante de la colonia de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF).

Una adyuvante puede ser administrado con un inmunógeno como una composición individual, o puede ser administrado antes, concurrente con o después de la administración del inmunógeno. El inmunógeno y el adyuvante pueden ser envasados y administrados en la misma ampolla o pueden ser envasados en ampollas separadas y mezclados antes del uso. El inmunógeno y el adyuvante son típicamente envasados con una etiqueta que indica la aplicación terapéutica pretendida. Si el inmunógeno y el adyuvante son envasados de forma separada, el envase incluirá típicamente instrucciones para el mezclado antes del uso. La elección de un adyuvante y/o portador depende de la estabilidad de la vacuna que contiene el adyuvante, la vía de administración, el esquema de dosificación, la eficacia del adyuvante para las especies que están siendo vacunadas, y, en humanos, un adyuvante farmacéuticamente aceptable es uno que ha sido aprobado o es autorizabile para la administración humana por los cuerpos reguladores pertinentes. Por ejemplo, el adyuvante Completo de Freund no es adecuado para la administración humana. Se prefieren el alumbre, MPL y QS21. Opcionalmente, se pueden usar simultáneamente dos o más adyuvantes diferentes. Las combinaciones preferidas incluyen alumbre con MPL, alumbre con QS21, MPL con QS21, y alumbre, QS21 y MPL juntos. También se puede usar el adyuvante Incompleto de Freund (Chang y otros., *Advanced Drug Delivery Reviews* 32, 173-186 (1998)), opcionalmente en combinación con cualquiera de alumbre, QS21, y MPL y todas las combinaciones de los mismos.

Los agentes de la invención se administran a menudo como composiciones farmacéuticas que comprenden un agente terapéuticamente activo, es decir, y una variedad de otros componentes farmacéuticamente aceptables. Véase Remington's Pharmaceutical Science (15ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania, 1980). La forma preferida depende del modo deseado de administración y de la aplicación terapéutica. Las composiciones también pueden incluir, dependiendo de la formulación deseada, vehículos o diluyentes no tóxicos, farmacéuticamente aceptables, que se definen como vehículos comúnmente usados para formular las composiciones farmacéuticas para la administración a animales o seres humanos. El diluyente se selecciona de manera que no afecte a la actividad biológica de la combinación. Los ejemplos de tales diluyentes son agua destilada, solución salina fisiológica tamponada con fosfato, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. Además, la composición farmacéutica o formulación también puede incluir otros vehículos, adyuvantes o estabilizadores no tóxicos, no terapéuticos, no inmunogénicos y similares. Sin embargo, algunos reactivos adecuados para su administración a animales, tales como el adyuvante completo de Freund normalmente no se incluyen en las composiciones para su uso en seres humanos.

Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir macromoléculas grandes, de metabolización lenta

tales como proteínas, polisacáridos, poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos) y copolímeros (tales como celulosa, agarosa, Sepharose funcionalizados con látex, y similares), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y agregados lipídicos (tales como gotitas de aceite o liposomas). Adicionalmente, estos vehículos pueden funcionar como agentes inmunoestimuladores (es decir, adyuvantes).

5 Para la administración parenteral, los agentes de la invención pueden administrarse como dosificaciones inyectables de una solución o suspensión de la sustancia en un diluyente fisiológicamente aceptable con un vehículo farmacéutico que puede ser un líquido estéril, tal como aceites en agua, solución salina, glicerol o etanol. Adicionalmente, también pueden estar presentes en las composiciones sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, tensioactivos, sustancias tamponantes de pH y similares. Otros componentes de las composiciones farmacéuticas son los de origen sintético, vegetal, animal o de petróleo, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de semillas de soja y aceite mineral. En general, los glicoles tales como propilenglicol o polietilenglicol son vehículos líquidos preferidos, particularmente para soluciones inyectables.

15 Normalmente, las composiciones se preparan como composiciones inyectables, como suspensiones o bien como soluciones líquidas; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para disolución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse o encapsularse en liposomas o micropartículas tales como polilactida, poliglicólido o copolímero para un efecto del adyuvante potenciado, tal como se trató anteriormente (véanse Langer, *Science* 249, 1527 (1990) y Hanes, *Advanced Drug Delivery Reviews* 28, 97-119 (1997)). Los agentes de esta invención pueden administrarse en la forma de una preparación de implante o inyección de liberación prolongada que puede formularse de una manera tal que permita una liberación sostenida o pulsátil del principio activo.

25 Las formulaciones adicionales adecuadas para otros modos de administración incluyen las formulaciones orales, intranasales y pulmonares, los supositorios y las aplicaciones transdérmicas.

30 Para los supositorios, los aglutinantes y los vehículos incluyen, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; tales supositorios puede formarse a partir de mezclas que contienen el principio activo en el intervalo del 0,5% al 10%, preferiblemente el 1%-2%. Las formulaciones orales incluyen excipientes, tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa y carbonato de magnesio. Estas composiciones adquieren la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y contienen el 10%-95% del principio activo, preferiblemente el 25%-70%.

35 La aplicación tópica puede dar como resultado la administración transdérmica o intradérmica. La administración tópica puede facilitarse mediante la coadministración del agente con la toxina colérica o derivados destoxificados o subunidades de la misma u otras toxinas bacterianas similares (véase Glenn et al., *Nature* 391, 851 (1998)). La coadministración puede lograrse mediante el uso de los componentes como una mezcla o como moléculas unidas obtenidas mediante reticulación química o expresión como una proteína de fusión.

40 Alternativamente, la administración transdérmica puede lograrse usando un parche cutáneo o usando transferosomas (Paul et al., *Eur. J. Immunol.* 25, 3521-24 (1995); Cevc et al., *Biochem. Biophys. Acta* 1368, 201-15 (1998)).

#### 45 V. Diagnóstico

50 La descripción proporciona procedimientos de detección de una respuesta inmunitaria frente al péptido A $\beta$  en un paciente que padece o es propenso a la enfermedad de Alzheimer. Los procedimientos son particularmente útiles para controlar un ciclo de tratamiento que está administrándose a un paciente. Los procedimientos pueden utilizarse para controlar el tratamiento terapéutico en pacientes sintomáticos y el tratamiento profiláctico en pacientes asintomáticos.

55 Algunos procedimientos implican determinar un valor inicial de una respuesta inmunitaria en un paciente antes de administrar una dosificación del agente, y comparar éste con un valor para la respuesta inmunitaria tras el tratamiento. Un aumento significativo (es decir, mayor que el margen de error experimental típico en mediciones repetidas de la misma muestra, expresado como una desviación estándar de la media de tales mediciones) en el valor de la respuesta inmunitaria señala un desenlace de tratamiento positivo (es decir, que la administración del agente ha logrado o aumentado una respuesta inmunitaria). Si el valor para la respuesta inmunitaria no cambia significativamente, o disminuye, se indica un desenlace de tratamiento negativo. En general, se espera que los pacientes que se someten a un ciclo inicial de tratamiento con un agente muestren un aumento en la respuesta inmunitaria con dosificaciones sucesivas, que finalmente alcanza una meseta. La administración del agente generalmente se continúa mientras la respuesta inmunitaria está aumentando. El logro de la meseta es un indicador de que puede interrumpirse o reducirse la administración del tratamiento en su dosificación o en su frecuencia.

65 En otros métodos, se determina un valor control (es decir, una media y desviación estándar) de la respuesta inmunitaria para una población control. Normalmente, los individuos en la población control no han recibido

tratamiento anterior. Entonces se comparan los valores medidos de la respuesta inmunitaria en un paciente tras la administración de un agente terapéutico con el valor control. Un aumento significativo con respecto al valor control (por ejemplo, mayor que una desviación estándar de la media) señala un desenlace de tratamiento positivo. Una ausencia de aumento significativo o una disminución señala un desenlace de tratamiento negativo. La administración del agente generalmente se continúa mientras que la respuesta inmunitaria está aumentando con respecto al valor control. Al igual que anteriormente, el logro de una meseta con respecto a los valores control es un indicador de que puede interrumpirse o reducirse la administración del tratamiento en su dosificación o en su frecuencia.

En otros métodos, se determina un valor control de la respuesta inmunitaria (por ejemplo, una media y desviación estándar) de una población control de individuos que se han sometido a tratamiento con un agente terapéutico y cuyas respuestas inmunitarias han alcanzado una meseta en respuesta al tratamiento. Se comparan los valores medidos de la respuesta inmunitaria en un paciente con el valor control. Si el nivel medido en un paciente no es significativamente diferente (por ejemplo, más de una desviación estándar) del valor control, puede interrumpirse el tratamiento. Si el nivel en un paciente es significativamente inferior al valor control, está justificada la administración continuada del agente. Si el nivel en el paciente persiste por debajo del valor control, entonces puede estar indicado un cambio en el régimen de tratamiento, por ejemplo, el uso de un adyuvante diferente.

En otros métodos, un paciente que no está recibiendo tratamiento actualmente pero que se ha sometido a un ciclo anterior de tratamiento se controla para determinar la respuesta inmunitaria para determinar si se requiere una reanudación del tratamiento. Puede compararse el valor medido de la respuesta inmunitaria en el paciente con un valor de la respuesta inmunitaria logrado anteriormente en el paciente tras un ciclo anterior de tratamiento. Una disminución significativa con respecto a la medición anterior (es decir, mayor que un margen de error típico en mediciones repetidas de la misma muestra) es una indicación de que puede reanudarse el tratamiento. Como alternativa, puede compararse el valor medido en el paciente con un valor control (media más desviación estándar) determinado en la población de pacientes tras someterse a un ciclo de tratamiento. Como alternativa, puede compararse el valor medido en un paciente con un valor control en poblaciones de pacientes tratados profilácticamente que siguen libres de síntomas de la enfermedad, o poblaciones de pacientes tratados terapéuticamente que muestran una mejora de las características de la enfermedad. En todos estos casos, una disminución significativamente con respecto al nivel control (es decir, más de una desviación estándar) es un indicador de que debe reanudarse el tratamiento en un paciente.

La muestra de tejido para su análisis normalmente es sangre, plasma, suero, moco o líquido cefalorraquídeo del paciente. La muestra se analiza para determinar indicios de una respuesta inmunitaria frente a cualquier forma del péptido A $\beta$ , normalmente A $\beta$ 42. La respuesta inmunitaria puede determinarse a partir de la presencia de, por ejemplo, anticuerpos o células T que se unen específicamente al péptido A $\beta$ . En la sección de ejemplos se describen procedimientos de ELISA para detectar anticuerpos específicos frente a A $\beta$ . Los procedimientos para detectar células T reactivas se han descrito anteriormente (véase Definiciones).

## EJEMPLOS

### I. Eficacia profiláctica de A $\beta$ frente a la EA

Estos ejemplos describen la administración del péptido A $\beta$ 42 a ratones transgénicos que sobreexpresan APP con una mutación en la posición 717 (APP<sub>717V→F</sub>) que los predispone a desarrollar una neuropatología similar al Alzheimer. La producción y las características de estos ratones (ratones PDAPP) se describen en Games et al., Nature, citado anteriormente. Estos animales, en su forma heterocigota, comienzan a depositar A $\beta$  a los seis meses de edad en adelante. Hacia los quince meses de edad, muestran niveles de deposición de A $\beta$  equivalentes a los observados en la enfermedad de Alzheimer. Se inyectaron a ratones PDAPP, A $\beta$ <sub>42</sub> agregado (A $\beta$ <sub>42</sub> agregado) o solución salina tamponada con fosfato. Se escogió A $\beta$ <sub>42</sub> agregado debido a su capacidad para inducir anticuerpos frente a múltiples epítopos de A $\beta$ .

#### A. Métodos

##### 1. Fuente de ratones

Se dividieron aleatoriamente treinta ratones hembra heterogénicos PDAPP en los siguientes grupos: 10 ratones para inyectarles A $\beta$ <sub>42</sub> agregado (uno murió en el tránsito), 5 ratones para inyectarles PBS/adyuvante o PBS y 10 controles sin inyección. A cinco ratones se les inyectó proteína amiloide sérica (SAP).

##### 2. Preparación de los inmunógenos

Preparación del A $\beta$ <sub>42</sub> agregado: se disolvieron dos miligramos de A $\beta$ 42 (US Peptides Inc, lote K-42-12) en 0,9 ml de agua y se constituyeron hasta 1 ml añadiendo 0,1 ml de 10 x PBS. Esto se agitó con vórtex y se dejó incubar durante la noche a 37°C, condiciones en las que se agregó el péptido. Cualquier A $\beta$  no usado se almacenó como un polvo liofilizado seco a -20°C hasta la siguiente inyección.

### 3. Preparación de las inyecciones

Se emulsionaron 100 µg de Aβ<sub>42</sub> agregado en PBS por ratón 1:1 con adyuvante completo de Freund (CFA) en un volumen final de 400 µl de emulsión para la primera inmunización, seguido por una administración de refuerzo de la misma cantidad de inmunógeno en adyuvante incompleto de Freund (IFA) a las 2 semanas. Se administraron dos dosis adicionales en IFA a intervalos mensuales. Las inmunizaciones posteriores se realizaron a intervalos mensuales en 500 µl de PBS. Las inyecciones se administraron por vía intraperitoneal (i.p.).

Se practicaron inyecciones de PBS que seguían el mismo programa y se inyectó a los ratones una mezcla 1:1 de PBS/adyuvante a 400 µl por ratón, o 500 µl de PBS por ratón. De la misma manera, las inyecciones de SAP siguieron el mismo programa usando una dosis de 100 µg por inyección.

### 4. Titulación de extracciones de sangre de ratón, preparación de tejidos e inmunohistoquímica

Los métodos anteriores se describen más adelante en Materiales generales y métodos.

#### B. Resultados

Se inyectó a ratones PDAPP, Aβ<sub>42</sub> agregado (Aβ<sub>42</sub> agregado), péptidos SAP o bien solución salina tamponada con fosfato. También se dejó sin inyectar un grupo de ratones PDAPP, los controles positivos. Se controlaron los títulos de los ratones para Aβ<sub>42</sub> agregado un mes sí y otro no desde la cuarta administración de refuerzo hasta que los ratones tuvieron un año de edad. Se sacrificaron los ratones a los 13 meses. En todos los puntos de tiempo examinados, ocho de los nueve ratones con Aβ<sub>42</sub> agregado desarrollaron un alto título de anticuerpos, que permaneció alto a lo largo de la serie de inyecciones (títulos mayores de 1/10000). El noveno ratón tuvo un título bajo pero medible de aproximadamente 1/1000 (figura 1, tabla 1). Los ratones a los que se inyectó SAPP tenían títulos de 1:1.000 a 1:30.000 para este inmunógeno superando sólo un único ratón 1:10.0000.

Se tituló a los ratones tratados con PBS frente a Aβ<sub>42</sub> agregado a los seis, diez y doce meses. A una dilución de 1/100, cuando se tituló a los ratones con PBS frente a Aβ<sub>42</sub> agregado sólo superaron en 4 veces el fondo en un punto de datos, aparte de esto, fueron inferiores a 4 veces el fondo en todos los puntos de tiempo (tabla 1). La respuesta específica de SAP fue insignificante en estos puntos de tiempo con todos los títulos inferiores a 300.

Siete de los nueve ratones en el grupo de Aβ<sub>1-42</sub> agregado no tuvieron amiloide detectable en sus cerebros. En contraposición, el tejido cerebral de los ratones en los grupos de SAP y PBS contenía numerosos depósitos amiloides positivos para 3D6 en el hipocampo, así como en las cortezas frontal y cingulada. El patrón de la deposición fue similar al de los controles no tratados, con implicación característica de subregiones vulnerables, tales como la capa molecular externa del giro dentado del hipocampo. Un ratón del grupo al que se inyectó Aβ<sub>1-42</sub> tuvo una carga de amiloide enormemente reducida, confinada en el hipocampo. Se identificó una placa aislada en otro ratón tratado con Aβ<sub>1-42</sub>.

Los análisis de imágenes cuantitativos de la carga de amiloide en el hipocampo verificaron la espectacular reducción lograda en los animales tratados con AN1792 (figura 2). Los valores de mediana de la carga de amiloide para el grupo con PBS (2,22%) y para el grupo control no tratado (2,65%) fueron significativamente mayores que los de los inmunizados con AN1792 (0,00%, p = 0,0005). En contraposición, el valor de mediana para el grupo inmunizado con péptidos SAP (SAPP) fue del 5,74%. El tejido cerebral de los ratones control no tratados contenía numerosos depósitos amiloides de Aβ visualizados con el anticuerpo monoclonal (Acm) específico para Aβ 3D6 en el hipocampo, así como en la corteza retrosplenial. También se observó un patrón similar de deposición amiloide en ratones inmunizados con SAPP o PBS (figura 2). Además, en estos últimos tres grupos hubo una implicación característica de subregiones vulnerables del cerebro observada clásicamente en la EA, tal como la capa molecular externa del giro dentado del hipocampo, en los tres grupos.

Los cerebros que no contenían depósitos de Aβ también estaban desprovistos de las placas neuríticas que normalmente se visualizan en ratones PDAPP con el anticuerpo anti-APP humano, 8E5. Todos los cerebros de los grupos restantes (ratones a los que se inyectó SAP, PBS y no inyectados) tenían numerosas placas neuríticas típicas de los ratones PDAPP no tratados. Un pequeño número de placas neuríticas estaba presente en un ratón tratado con AN1792 y se encontró una única agrupación de neuritas distróficas en un segundo ratón tratado con AN1792. Los análisis de imágenes del hipocampo, y que se muestran en la figura 3, demostraron la práctica eliminación de las neuritas distróficas en los ratones tratados con AN1792 (mediana del 0,00%) en comparación con los que recibieron PBS (mediana del 0,28%, p = 0,0005).

La astrocitosis característica de la inflamación asociada con las placas también estuvo ausente en los cerebros del grupo al que se inyectó Aβ<sub>1-42</sub>. Los cerebros de los ratones en los otros grupos contenían astrocitos positivos para GFAP agrupados y abundantes típicos de la gliosis asociada con las placas de Aβ. Un subconjunto de los portaobjetos que reaccionaron con GFAP se contratiñeron con tioflavina S para localizar los depósitos de Aβ. Los astrocitos positivos para GFAP estaban asociados con las placas de Aβ en los ratones tratados con SAP, PBS y en los controles no tratados. No se encontró tal asociación en los ratones tratados con Aβ<sub>1-42</sub> negativos para placas,

mientras que se identificó una gliosis asociada con las placas mínima en un ratón tratado con AN1792.

Los análisis de imágenes, mostrados en la figura 4 para la corteza retroesplénica, verificaron que la reducción en la astrocitosis fue significativa con un valor de mediana del 1,56% para los ratones tratados con AN1792 frente a valores de mediana mayores del 6% para los grupos inmunizados con péptidos SAP, PBS o no tratados ( $p = 0,0017$ ).

La evidencia a partir de un subconjunto de ratones a los que se inyectó A $\beta$ 1-42 y PBS indicó que la inmunorreactividad del CMH II asociada con las placas estaba ausente en los ratones a los que inyectó A $\beta$ 1-42, lo que era consecuente con la ausencia de una respuesta inflamatoria relacionada con A $\beta$ .

También se hicieron reaccionar cortes de cerebro de ratón con un mAb específico para MAC-1, una proteína de la superficie celular. MAC-1 (CD11b) es un miembro de la familia de las integrinas y existe como heterodímero con CD18. El complejo CD11b/CD18 está presente en monocitos, macrófagos, neutrófilos y linfocitos citotóxicos naturales (Mak y Simard). Es probable que el tipo de célula reactiva con MAC-1 residente en el cerebro sea microglía basándose en la morfología fenotípica similar en secciones que inmunorreaccionan con MAC-1. El marcaje de MAC-1 asociado con las placas fue inferior en los cerebros de los ratones tratados con AN1792 en comparación con el grupo control con PBS, un hallazgo que es consecuente con la ausencia de respuesta inflamatoria inducida por A $\beta$ .

### C. Conclusión

La ausencia de placas de A $\beta$  y cambios glióticos y neuronales reactivos en los cerebros de los ratones a los que se inyectó A $\beta$ 1-42 indica que no se depositó o se depositó extremadamente poco amiloide en sus cerebros, y que había ausencia de consecuencias patológicas, tales como gliosis y patología neurítica. Los ratones PDAPP tratados con A $\beta$ 1-42 muestran esencialmente la misma ausencia de patología que los ratones no transgénicos control. Por tanto, las inyecciones de A $\beta$ 1-42 son sumamente eficaces en la prevención de la deposición o en el aclaramiento de A $\beta$  humano del tejido cerebral, y en la eliminación de cambios degenerativos inflamatorios y neuronales posteriores. Así, la administración del péptido A $\beta$  tiene un beneficio terapéutico en la prevención de la EA.

### II. Estudio de respuesta a la dosis

Se inmunizaron grupos de ratones Swiss Webster hembra de cinco semanas de edad ( $N = 6$  por grupo) con 300, 100, 33, 11, 3,7, 1,2, 0,4 ó 0,13  $\mu$ g de A $\beta$  formulado en CFA/IFA administrado por vía intraperitoneal. Se administraron tres dosis a intervalos bisemanales seguido por una cuarta dosis un mes más tarde. La primera dosis se emulsionó con CFA y las dosis restantes se emulsionaron con IFA. Se extrajo sangre de los animales 4 - 7 días tras cada inmunización comenzando tras la segunda dosis para la medición de los títulos de anticuerpos. A los animales en un subconjunto de tres grupos, los inmunizados con 11, 33 ó 300  $\mu$ g de antígeno, se les extrajo adicionalmente sangre aproximadamente a intervalos mensuales durante cuatro meses tras la cuarta inmunización para controlar la disminución de la respuesta de los anticuerpos a través de una variedad de dosis de vacuna. Estos animales recibieron una quinta inmunización final a los siete meses tras el inicio del estudio. Se sacrificaron una semana más tarde para medir la respuesta de los anticuerpos a AN1792 y para realizar análisis toxicológicos.

Se observó una disminución de la respuesta a la dosis desde 300  $\mu$ g hasta 3,7  $\mu$ g con ausencia de respuesta en las dos dosis inferiores. Los títulos medios de anticuerpos son de aproximadamente 1:1000 tras 3 dosis y de aproximadamente 1:10,000 tras 4 dosis de 11-300  $\mu$ g de antígeno (véase la figura 5).

Los títulos de anticuerpos aumentaron espectacularmente para todos excepto para el grupo de dosis inferior tras la tercera inmunización, oscilando los aumentos en GMT entre 5 veces y 25 veces. Entonces fueron detectables las respuestas de anticuerpos bajas incluso para los que recibieron 0,4  $\mu$ g. Los grupos de 1,2 y 3,7  $\mu$ g tenían títulos comparables con GMT de aproximadamente 1000 y las cuatro dosis superiores agrupadas juntas con GMT de aproximadamente 25.000, con la excepción del grupo de dosis de 33  $\mu$ g con un GMT inferior de 3000. Tras la cuarta inmunización, el aumento del título fue más modesto para la mayoría de los grupos. Hubo una clara respuesta a la dosis a través de los grupos de dosis de antígeno inferior desde 0,14  $\mu$ g hasta 11  $\mu$ g oscilando entre anticuerpos no detectables para los que recibieron 0,14  $\mu$ g y un GMT de 36.000 para los que recibieron 11  $\mu$ g. De nuevo, se agruparon juntos los títulos para los cuatro grupos de dosis superiores de 11  $\mu$ g a 300  $\mu$ g. Así, tras dos inmunizaciones, el título de anticuerpos fue dependiente de la dosis de antígeno a través del amplio intervalo desde 0,4  $\mu$ g hasta 300  $\mu$ g. Para la tercera inmunización, los títulos para las cuatro dosis superiores fueron todos comparables y se mantuvieron en una meseta tras una inmunización adicional.

Un mes tras la cuarta inmunización, los títulos fueron de 2 a 3 veces superiores en el grupo de 300  $\mu$ g a los medidos a partir de la sangre extraída cinco días tras la inmunización (figura 6). Esta observación sugiere que la respuesta anamnésica máxima de los anticuerpos se produjo más tarde de 5 días tras la inmunización. Esta vez se observó un aumento más modesto (50%) en el grupo de 33  $\mu$ g. En el grupo de dosis de 300  $\mu$ g a los dos meses tras la última dosis, los GMT disminuyeron abruptamente en aproximadamente el 70%. Tras otro mes, la disminución fue

menos pronunciada al 45% (100 µg) y de aproximadamente el 14% para las dosis de 33 µg y 11 µg. Así, la tasa de disminución en los títulos de anticuerpos circulantes tras el cese de la inmunización parece ser bifásica con una disminución pronunciada en el primer mes tras la respuesta máxima seguido por una tasa más modesta de disminución a partir de entonces.

Los títulos de anticuerpos y las cinéticas de la respuesta de estos ratones Swiss Webster son similares a los de ratones transgénicos PDAPP heterocigotos jóvenes inmunizados de una manera paralela. Las dosificaciones eficaces para inducir una respuesta inmunitaria en seres humanos normalmente son similares a las dosificaciones eficaces en ratones.

### III. Examen para determinar la eficacia terapéutica frente a la EA establecida

Este ensayo está diseñado para someter a prueba agentes inmunogénicos para determinar su actividad en la detención o la reversión de las características neuropatológicas de la EA en animales de más edad. Se comenzaron las inmunizaciones con Aβ de 42 aminoácidos de longitud (AN1792) en un punto de tiempo en el que ya estaban presentes placas amiloides en los cerebros de los ratones PDAPP.

A lo largo del curso de tiempo usado en este estudio, los ratones PDAPP no tratados desarrollaron varios cambios neurodegenerativos que se asemejaron a los encontrados en la EA (Games et al., citado anteriormente y Johnson-Wood et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 1550-1555 (1997)). La deposición de Aβ en placas amiloides está asociada con una respuesta neuronal degenerativa constituida por elementos dendríticos y axonales aberrantes, denominados neuritas distróficas. Los depósitos amiloides que están rodeados por y que contienen neuritas distróficas se denominan placas neuríticas. En ratones EA y PDAPP, las neuritas distróficas tienen una estructura globular distintiva, son inmunorreactivas con un panel de anticuerpos que reconocen APP y componentes del citoesqueleto y muestran cambios degenerativos subcelulares complejos en el nivel ultraestructural. Estas características permiten mediciones relevantes para la enfermedad, selectivas y reproducibles de la formación de placas neuríticas en los cerebros de PDAPP. El componente neuronal distrófico de las placas neuríticas de PDAPP se visualiza fácilmente con un anticuerpo específico para el APP humano (mAβ 8E5), y puede medirse fácilmente mediante análisis de imágenes asistido por ordenador. Por tanto, además de medir los efectos de AN1792 en la formación de la placa amiloide, se controlaron los efectos de este tratamiento en el desarrollo de la distrofia neurítica.

Los astrocitos y la microglía son células no neuronales que responden y reflejan el grado de lesión neuronal. Los astrocitos positivos para GFAP y la microglía positiva para CMH II se observan comúnmente en la EA y su activación aumenta con la gravedad de la enfermedad. Por tanto, también se controló el desarrollo de astrocitosis y microgliosis reactivas en los ratones tratados con AN1792.

#### A. Materiales y métodos

Se dividieron aleatoriamente cuarenta y ocho ratones PDAPP hembra heterocigotos, de 11 a 11,5 meses de edad, obtenidos de Charles River, en dos grupos: 24 ratones para inmunizarse con 100 µg de AN1792 y 24 ratones para inmunizarse con PBS, cada uno combinado con adyuvante de Freund. Los grupos con AN1792 y PBS se dividieron de nuevo cuando alcanzaron ~15 meses de edad. A los 15 meses de edad, se sacrificó aproximadamente la mitad de cada grupo de los animales tratados con AN1792 y PBS (n = 10 y 9, respectivamente), el resto continuó recibiendo inmunizaciones hasta la finalización a ~ 18 meses (n = 9 y 12, respectivamente). Un total de 8 animales (5 con AN1792, 3 con PBS) murieron durante el estudio. Además de los animales inmunizados, se incluyeron ratones PDAPP no tratados de un año de edad (n = 10), 15 meses de edad (n = 10) y 18 meses de edad (n = 10) para comparación en los ELISA para medir los niveles de Aβ y APP en el cerebro; también se incluyeron los animales de un año de edad en los análisis inmunohistoquímicos.

La metodología fue como la del ejemplo 1, a menos que se indique lo contrario. Se utilizó el lote 12 de US Peptides y el lote ME0339 de AN1792 de California Peptides para preparar el antígeno para las seis inmunizaciones administradas antes del punto de tiempo de 15 meses. Se usaron los lotes ME0339 y ME0439 de California Peptides para las tres inmunizaciones adicionales administradas entre los 15 y los 18 meses.

Para las inmunizaciones, se emulsionaron 100 µg de AN1792 en 200 µl de PBS o PBS solo 1:1 (vol:vol) con adyuvante completo de Freund (CFA) o adyuvante incompleto de Freund (IFA) o PBS en un volumen final de 400 µl. La primera inmunización se administró con CFA como adyuvante, las cuatro dosis siguientes se administraron con IFA y las cuatro dosis finales con PBS solo sin adyuvante añadido. Se administró un total de nueve inmunizaciones a lo largo de un periodo de tiempo de siete meses en un programa de dos semanas para las tres primeras dosis seguido por un intervalo de cuatro semanas para las inyecciones restantes. El grupo de tratamiento de cuatro meses, que se sacrificó a los 15 meses de edad, recibió sólo las 6 primeras inmunizaciones.

#### B. Resultados

##### 1. Efectos del tratamiento con AN1792 en la carga de amiloide

En la figura 7 se muestran los resultados del tratamiento con AN1792 sobre la carga de amiloide cortical determinada mediante el análisis de imágenes cuantitativo. El valor de mediana de la carga de amiloide cortical fue del 0,28% en un grupo de ratones PDAPP de 12 meses de edad no tratados, un valor representativo de la carga de placa en ratones al inicio del estudio. A los 18 meses, la carga de amiloide aumentó más de 17 veces hasta el 4,87% en los ratones tratados con PBS, mientras que los ratones tratados con AN1792 tenían una carga de amiloide enormemente reducida de tan sólo el 0,01%, notablemente inferior que los no tratados de 12 meses y los grupos tratados con PBS de 15 y 18 meses. La carga de amiloide se redujo significativamente en los que recibieron AN1792 a los 15 (reducción del 96%;  $p = 0,003$ ) y 18 (reducción >99%;  $p = 0,0002$ ) meses.

Normalmente, la deposición amiloide cortical en ratones PDAPP se inicia en las cortezas frontal y retrosplenial (RSC) y progresa en un sentido ventral-lateral para implicar a las cortezas temporal y entorrinal (EC). Se encontró poco o nada de amiloide en la EC de los ratones de 12 meses de edad, la edad aproximada a la que se administró AN1792 por primera vez. Tras 4 meses de tratamiento con AN1792, la deposición amiloide disminuyó enormemente en la RSC y se eliminó completamente la implicación progresiva de la EC mediante el tratamiento con AN1792. Esta última observación demostró que AN1792 detuvo completamente la progresión del amiloide que normalmente invadiría las cortezas temporal y ventral, así como detuvo o posiblemente revertió la deposición en la RSC.

Los profundos efectos del tratamiento con AN1792 en la carga de amiloide cortical en desarrollo en los ratones PDAPP se demuestran además mediante el grupo de 18 meses, que se había tratado durante siete meses. Se encontró una ausencia casi completa de amiloide cortical en los ratones tratados con AN1792, con una ausencia total de plaques difusas, así como una reducción en los depósitos compactados

## 2. Cambios celulares y morfológicos asociados con el tratamiento con AN1792

Se encontró una población de células positivas para A $\beta$  en regiones de cerebro que normalmente contienen depósitos amiloides. Notablemente, en varios cerebros que recibieron AN1792, se encontraron muy pocas o ninguna placa amiloide cortical extracelular. La mayoría de la inmunorreactividad con A $\beta$  pareció estar contenida dentro de las células con un soma lobular o aglutinado grande. Fenotípicamente, estas células parecían microglía o monocitos activados. Eran inmunorreactivas con anticuerpos que reconocen ligandos expresados por la microglía y los monocitos activados (CMH II y CD11b) y ocasionalmente estaban asociadas con la pared o la luz de los vasos sanguíneos. La comparación de secciones casi adyacentes marcadas con anticuerpos específicos frente a A $\beta$  y CMH II reveló que ambas clases de anticuerpos reconocían patrones similares de estas células. El examen detallado de los cerebros tratados con AN1792 reveló que las células positivas para CMH II estaban limitadas a las proximidades del amiloide limitado que quedaba en estos animales. Con las condiciones de fijación empleadas, las células no eran inmunorreactivas con anticuerpos que reconocen ligandos de células T (CD3, CD3e) o células B (CD45RA, CD45RB) o el antígeno común de leucocitos (CD45), pero eran reactivas con un anticuerpo que reconoce leucosialina (CD43) que experimenta una reacción cruzada con los monocitos. No se encontró ninguna de estas células en ninguno de los ratones tratados con PBS.

Los ratones PDAPP desarrollan invariablemente una densa deposición amiloide en la capa molecular externa del giro dentado del hipocampo. La deposición forma una línea definida dentro de la vía perforante, una subregión que contiene clásicamente placas amiloides en la EA. El aspecto característico de estos depósitos en los ratones tratados con PBS se parecía a la caracterizada anteriormente en los ratones PDAPP no tratados. La deposición amiloide estaba constituida por placas difusas y compactadas en una banda continua. En contraposición, en varios cerebros de ratones tratados con AN1792, este patrón estaba drásticamente alterado. La deposición amiloide en el hipocampo ya no contenía amiloide difuso y el patrón en bandas estaba completamente afectado. En cambio, estaban presentes varias estructuras punteadas inusuales que eran reactivas con anticuerpos anti-A $\beta$ , varias de las cuales parecían ser células que contenían amiloide.

Se observaron frecuentemente células positivas para CMH II en las proximidades del amiloide extracelular en animales tratados con AN1792. El patrón de asociación de las células positivas para A $\beta$  con amiloide fue muy similar en varios cerebros de ratones tratados con AN1792. La distribución de estas células monocíticas estaba limitada a la proximidad del amiloide depositado y estaba completamente ausente de otras regiones cerebrales desprovistas de placas de A $\beta$ .

El análisis de imágenes cuantitativo de secciones marcadas para CMH II y MAC I reveló una tendencia hacia un aumento de la inmunorreactividad en la RSC y en el hipocampo de ratones tratados con AN1792 en comparación con el grupo con PBS que alcanzó significación con la medición de la reactividad de MAC-1 en el hipocampo.

Estos resultados son indicativos de una eliminación de amiloide mediada por células, activa, en regiones del cerebro que portan placas.

3. Efectos de AN1792 en los niveles de Aβ: determinaciones mediante ELISA

(a) Niveles corticales

5 En ratones PDAPP no tratados, el nivel de mediana de Aβ total en la corteza a los 12 meses fue de 1.600 ng/g, que aumentó hasta 8.700 ng/g hacia los 15 meses (tabla 2). A los 18 meses, el valor fue de 22.000 ng/g, un aumento de más de 10 veces durante el transcurso de tiempo del experimento. Los animales tratados con PBS tuvieron 8.600 ng/g de Aβ total a los 15 meses que aumentó hasta 19.000 ng/g a los 18 meses. En contraposición, los animales tratados con AN1792 tuvieron un 81% menos de Aβ total a los 15 meses (1.600 ng/g) que el grupo inmunizado con PBS. Se encontró significativamente menos Aβ total ( $p = 0,0001$ ) (5.200 ng/g) a los 18 meses cuando se compararon los grupos con AN1792 y con PBS (tabla 2), lo que representa una reducción del 72% en Aβ que en caso contrario estaría presente. Se obtuvieron resultados similares cuando se compararon los niveles corticales de Aβ42, concretamente que el grupo tratado con AN1792 contenía mucho menos Aβ42, pero en este caso las diferencias entre los grupos con AN1792 y con PBS fueron significativas a los 15 meses ( $p = 0,04$ ) y 18 meses ( $p = 0,0001$ , tabla 2).

Tabla 2: Niveles de mediana de Aβ (ng/g) en la corteza

Edad	NO TRATADOS			PBS			AN1792		
	Aβ Total	Aβ42	(n)	Aβ Total	Aβ42	(n)	Total	Aβ42	(n)
12	1.600	1.300	(10)						
15	8.700	8.300	(10)	8.600	7.200	(9)	1.600	1.300*	(10)
18	22.200	18.500	(10)	19.000	15.900	(12)	5.200**	4.000**	(9)
							*p = 0,00412		
							**p = 0,0001		

(b) Niveles en el hipocampo

35 En ratones PDAPP no tratados, los niveles de mediana en el hipocampo de Aβ total a los doce meses de edad fueron de 15.000 ng/g que aumentaron hasta 51.000 ng/g a los 15 meses y adicionalmente hasta 81.000 ng/g a los 18 meses (tabla 3). De manera similar, los ratones inmunizados con PBS mostraron valores de 40.000 ng/g y 65.000 ng/g a los 15 meses y a los 18 meses, respectivamente. Los animales inmunizados con AN1792 mostraron menos Aβ total, específicamente 25.000 ng/g y 51.000 ng/g en los puntos de tiempo respectivos de 15 meses y 18 meses. El valor del grupo tratado con AN1792 a los 18 meses fue significativamente inferior que el del grupo tratado con PBS ( $p = 0,0105$ ; tabla 3). La medición de Aβ42 dio el mismo patrón de resultados, concretamente que los niveles en el grupo tratado con AN1792 fueron significativamente inferiores que en el grupo con PBS (39.000 ng/g frente a 57.000 ng/g, respectivamente;  $p = 0,0022$ ) en la evaluación a los 18 meses (tabla 3).

Tabla 3: Niveles de mediana de Aβ (ng/g) en el hipocampo

Edad	NO TRATADOS			PBS			AN1792		
	Aβ Total	Aβ42	(n)	Aβ Total	Aβ42	(n)	Total	Aβ42	(n)
12	15.500	11.100	(10)						
15	51.500	44.400	(10)	40.100	35.700	(9)	24.500	22.100	(10)
18	80.800	64.200	(10)	65.400	57.100	(12)	50.900*	38.900**	(9)
							*p = 0,0105		
							**p = 0,0022		

(c) Niveles cerebelares

65 En ratones PDAPP no tratados de 12 meses, el nivel de mediana cerebelar de Aβ total fue de 15 ng/g (tabla 4). A los 15 meses, esta mediana aumentó hasta 28 ng/g y hacia los 18 meses había aumentado hasta 35 ng/g. Los animales tratados con PBS mostraron valores de mediana de Aβ total de 21 ng/g a los 15 meses y de 43 ng/g a los

18 meses. Se encontró que los animales tratados con AN1792 tenían 22 ng/g de A $\beta$  total a los 15 meses y significativamente menos ( $p = 0,002$ ) A $\beta$  total a los 18 meses (25 ng/g) que el grupo con PBS correspondiente (tabla 4).

Tabla 4: Niveles de mediana de A $\beta$  (ng/g) en el cerebelo

Edad (meses)	NO TRATADOS		PBS		AN1792	
	A $\beta$	(n)	A $\beta$	(n)	A $\beta$	(n)
	Total		Total		Total	
12	15,6	(10)				
15	27,7	(10)	20,8	(9)	21,7	(10)
18	35,0	(10)	43,1	(12)	24,8*	(9)
* $p = 0,0018$						

#### 4. Efectos del tratamiento con AN1792 en los niveles de APP

APP- $\alpha$  y la molécula de APP de longitud completa contienen ambas toda o parte de la secuencia de A $\beta$  y así podrían resultar potencialmente afectadas por la generación de una respuesta inmunitaria dirigida frente a AN1792. En los estudios realizados hasta la fecha, se ha observado un ligero aumento en los niveles de APP como aumentos neuropatológicos en los ratones PDAPP. En la corteza, los niveles de APP- $\alpha$ /FL (longitud completa) o bien APP- $\alpha$  no cambiaron esencialmente por el tratamiento con la excepción de que APP- $\alpha$  se redujo en un 19% en el punto de tiempo de 18 meses en el grupo tratado con AN1792 frente al grupo tratado con PBS. Los valores de APP del grupo tratado con AN1792 a los 18 meses no fueron significativamente diferentes de los valores de los grupos no tratados a los 12 meses y a los 15 meses y tratado con PBS a los 15 meses. En todos los casos, los valores APP permanecieron dentro de los intervalos que se encuentran normalmente en los ratones PDAPP.

#### 5. Efectos del tratamiento con AN1792 en la patología gliótica y neurodegenerativa

La carga de placas neuríticas se redujo significativamente en la corteza frontal de ratones tratados con AN1792 en comparación con el grupo con PBS a los 15 (84%;  $p = 0,03$ ) y a los 18 (55%;  $p = 0,01$ ) meses de edad (figura 8). El valor de mediana de la carga de placas neuríticas aumentó desde el 0,32% hasta el 0,49% en el grupo con PBS entre los 15 y los 18 meses de edad. Esto contrastó con el desarrollo enormemente reducido de placas neuríticas en el grupo con AN1792, con valores de mediana de carga de placas neuríticas del 0,05% y el 0,22%, en los grupos de 15 y 18 meses, respectivamente.

Las inmunizaciones con AN1792 parecieron tolerarse bien y se también se redujo significativamente la astrocitosis reactiva en la RSC de ratones tratados con AN1792 cuando se comparó con el grupo con PBS a los 15 (56%;  $p = 0,011$ ) y los 18 (39%;  $p = 0,028$ ) meses de edad (figura 9). Los valores de mediana del porcentaje de astrocitosis en el grupo con PBS aumentaron entre los 15 y los 18 meses desde el 4,26% hasta el 5,21%. El tratamiento con AN1792 suprimió el desarrollo de astrocitosis en ambos puntos de tiempo hasta el 1,89% y el 3,2%, respectivamente. Esto sugiere que el neurópilo no estaba resultando dañado por el proceso de aclaramiento.

#### 6. Respuestas de anticuerpos

Tal como se describió anteriormente, ratones PDAPP heterocigotos, de once meses de edad ( $N = 24$ ) recibieron una serie de 5 inmunizaciones de 100  $\mu$ g de AN1792 emulsionado con adyuvante de Freund y se administraron por vía intraperitoneal en las semanas 0, 2, 4, 8 y 12, y una sexta inmunización con PBS solo (sin adyuvante de Freund) en la semana 16. Como control negativo, un conjunto paralelo de 24 ratones transgénicos de edad correspondiente recibió inmunizaciones de PBS emulsionado con los mismos adyuvantes y se administraron con el mismo programa. Se extrajo sangre de los animales en el plazo de tres a siete días tras cada inmunización comenzando tras la segunda dosis. Se midieron las respuestas de anticuerpos frente a AN1792 mediante ELISA. Los títulos en media geométrica (GMT) para los animales que se inmunizaron con AN1792 fueron de aproximadamente 1.900, 7.600 y 45.000 tras la segunda, tercera y última (sexta) dosis, respectivamente. No se midió ningún anticuerpo específico para A $\beta$  en los animales control tras la sexta inmunización.

Se trató aproximadamente la mitad de los animales durante tres meses más, recibiendo inmunizaciones aproximadamente a las 20, 24 y 27 semanas. Cada una de estas dosis se administró en vehículo de PBS solo sin adyuvante de Freund. Los títulos medios de anticuerpos permanecieron sin cambios durante este periodo de tiempo. De hecho, los títulos de anticuerpos parecieron permanecer estables desde la cuarta hasta la octava extracción de sangre, correspondiendo a un periodo que cubre de la quinta a la novena inyecciones.

Para determinar si los anticuerpos específicos para A $\beta$  provocados mediante la inmunización que se detectaron en los sueros de ratones tratados con AN1792 también estaban asociados con el amiloide depositado del cerebro, se hizo reaccionar un subconjunto de cortes de los ratones tratados con AN1792 y con PBS con un anticuerpo específico para IgG de ratón. En contraposición con el grupo con PBS, las placas de A $\beta$  en los cerebros tratados con AN1792 se cubrieron con IgG endógena. Esta diferencia entre los dos grupos se observó en grupos de 15 y 18 meses. Particularmente sorprendente fue la ausencia de marcaje en el grupo con PBS, a pesar de la presencia de una densa carga de amiloide en estos ratones. Estos resultados muestran que la inmunización con una proteína A $\beta$  sintética genera anticuerpos que reconocen y se unen *in vivo* a A $\beta$  en las placas amiloides.

#### 7. Respuestas inmunitarias mediadas por células

Se extrajeron bazos de nueve ratones PDAPP inmunizados con AN1792 y 12 inmunizados con PBS de 18 meses de edad, 7 días después de la novena inmunización. Se aislaron los esplenocitos y se hicieron crecer en cultivo durante 72 h en presencia de A $\beta$ 40, A $\beta$ 42 o A $\beta$ 40-1 (proteína de orden inverso). El mitógeno Con A sirvió como control positivo. Se obtuvieron respuestas óptimas con >1,7  $\mu$ M de la proteína. Las células de los nueve animales tratados con AN1792 proliferaron en respuesta a la proteína A $\beta$ 1-40 o bien a la A $\beta$ 1-42, con niveles iguales de incorporación de ambas proteínas (figura 10, panel superior). No hubo respuesta a la proteína inversa A $\beta$ 40-1. Las células de los animales control no respondieron a ninguna de las proteínas A $\beta$  (figura 10, panel inferior).

#### C. Conclusión

Los resultados de este estudio muestran que la inmunización con AN1792 de ratones PDAPP que poseen depósitos amiloides existentes ralentiza y evita la deposición amiloide progresiva y retrasa los cambios neuropatológicos consecuentes en el cerebro de ratones PDAPP de más edad. Las inmunizaciones con AN1792 detuvieron esencialmente el desarrollo de amiloide en estructuras que normalmente sucumbirían a la amiloidosis. Así, la administración del péptido A $\beta$  tiene beneficio terapéutico en el tratamiento de la EA.

#### IV. Examen de fragmentos de A $\beta$

Se inmunizaron 100 ratones PDAPP con edades comprendidas entre los 9 meses y los 11 meses con 9 regiones diferentes de APP y A $\beta$  para determinar qué epítomos transmiten la respuesta. Los 9 inmunógenos diferentes y un control se inyectaron por vía i.p. tal como se describió anteriormente. Los inmunógenos incluyen cuatro conjugados de péptido A $\beta$  humano 1-12, 13-28, 32-42, 1-5, todos ellos acoplados a IgG de oveja anti-ratón mediante un enlace de cistina; los aminoácidos 592-695 de un polipéptido APP, A $\beta$ 1-40 humano agregado y A $\beta$ 25-35 humano agregado, y A $\beta$ 42 de roedor agregado. Se usaron como controles A $\beta$ 42 agregado y PBS. Se usaron diez ratones por grupo de tratamiento. Los títulos se controlaron igual que anteriormente y los ratones se sacrificaron al final de los 4 meses de inyecciones. Se determinó la histoquímica, los niveles de A $\beta$  y la toxicología post-mortem.

#### A. Materiales y métodos

##### 1. Preparación de los inmunógenos

Preparación de péptidos A $\beta$  acoplados: se prepararon cuatro conjugados de péptido A $\beta$  humano (residuos de aminoácidos 1-5, 1-12, 13-28 y 33-42, cada uno conjugado a IgG de oveja anti-ratón) mediante acoplamiento a través de una cisteína artificial añadida al péptido A $\beta$  usando el reactivo de reticulación sulfo-EMCS. Se sintetizaron los derivados del péptido A $\beta$  con las siguientes secuencias de aminoácidos finales. En cada caso, la ubicación del residuo de cisteína insertado está indicada mediante subrayado. Al derivado de péptido A $\beta$ 13-28 también se le añadieron dos residuos de glicina antes de la cisteína del extremo carboxilo terminal, tal como se indica.

Péptido A $\beta$ 1-12	NH <sub>2</sub> -DAEFRHDSGYEVC COOH
Péptido A $\beta$ 1-5	NH <sub>2</sub> -DAEFRC COOH
Péptido A $\beta$ 33-42	NH <sub>2</sub> -C-ácido aminoheptanoico-GLMVGGVVIA COOH
Péptido A $\beta$ 13-28	Ac-NH-HHQLVFFAEDVGSNKGCC-COOH

Para preparar la reacción de acoplamiento, se dializaron diez mg de IgG de oveja anti-ratón (Jackson ImmunoResearch Laboratories) durante la noche frente a tampón borato de sodio 10 mM, pH 8,5. El anticuerpo dializado se concentró entonces hasta un volumen de 2 ml utilizando un tubo Centriprep de Amicon. Se disolvieron diez mg de sulfo-EMCS [N( $\epsilon$ -maleimidocaproiloxi)succinimida] (Molecular Sciences Co.) en un ml de agua desionizada. Se añadió un exceso molar de 40 veces de sulfo-EMCS gota a gota con agitación a la IgG de oveja anti-ratón y entonces se agitó la solución durante diez min adicionales. La IgG de oveja anti-ratón activada se purificó y se intercambió con tampón mediante el paso a través de una columna de filtración en gel de 10 ml (Pierce Presto Column, obtenida de Pierce Chemicals) equilibrada con NaPO<sub>4</sub> 0,1 M, EDTA 5 mM, pH 6,5. Las fracciones que contenían el anticuerpo, identificadas mediante absorbancia a 280 nm, se reunieron y se diluyeron hasta una

concentración de aproximadamente 1 mg/ml, usando 1,4 mg por DO como coeficiente de extinción. Se disolvió un exceso molar de 40 veces del péptido A $\beta$  en 20 ml de NaPO<sub>4</sub> 10 mM, pH 8,0, con la excepción del péptido A $\beta$ 33-42 para el que se disolvieron en primer lugar 10 mg en 0,5 ml de DMSO y después se diluyeron hasta 20 ml con el tampón NaPO<sub>4</sub> 10 mM. Las soluciones del péptido se añadieron cada una a 10 ml de la IgG de oveja anti-ratón activada y se agitaron a temperatura ambiente durante 4 h. Los conjugados resultantes se concentraron hasta un volumen final inferior a 10 ml usando un tubo Centriprep de Amicon y entonces se dializaron frente a PBS para realizar el intercambio de tampón y eliminar el péptido libre. Los conjugados se hicieron pasar a través de filtros de 0,22  $\mu$  de tamaño de poro para su esterilización y después se tomaron alícuotas en fracciones de 1 mg y se almacenaron congeladas a -20°C. Se determinaron las concentraciones de los conjugados usando el ensayo de proteínas de BCA (Pierce Chemicals) con IgG de caballo para la curva patrón. Se documentó la conjugación mediante el aumento del peso molecular de los péptidos conjugados con respecto al de la IgG de oveja anti-ratón activada. El conjugado de anticuerpo de oveja anti-ratón frente a A $\beta$ 1-5 fue un conjunto de dos conjugaciones, el resto procedía de una preparación única.

## 2. Preparación de péptidos A $\beta$ agregados

Se solubilizaron en fresco los péptidos 1-40 humano (AN1528; California Peptides Inc., Lote ME0541), 1-42 humano (AN1792; California Peptides Inc., Lotes ME0339 y ME0439), 25-35 humano y 1-42 de roedor (California Peptides Inc., Lote ME0218) para la preparación de cada conjunto de inyecciones de polvos liofilizados que se habían almacenado desecados a -20°C. Para este fin, se añadieron dos mg de péptido a 0,9 ml de agua desionizada y la mezcla se agitó con vórtex para generar una suspensión o solución relativamente uniforme. De los cuatro, AN1528 fue el único péptido soluble en esta etapa. Entonces se añadió una alícuota de 100  $\mu$ l de 10X PBS (1X PBS: NaCl 0,15 M, fosfato de sodio 0,01 M, pH 7,5) punto en el que AN1528 comenzó a precipitar. Se agitó de nuevo la suspensión con vórtex y se incubó durante la noche a 37°C para su uso al día siguiente.

Preparación de la proteína pBx6: Se construyó un plásmido de expresión que codifica pBx6, una proteína de fusión constituida por la secuencia líder N-terminal de la polimerasa del bacteriófago MS-2 de 100 aminoácidos seguido por los aminoácidos 592-695 de APP ( $\beta$ APP) tal como se describe por Oltersdorf *et al*, J. Biol. Chem. 265, 4492-4497 (1990). Se transfectó el plásmido en *E. coli* y se expresó la proteína tras la inducción del promotor. Se lisaron las bacterias en urea 8 M y se purificó parcialmente pBx6 mediante SDS PAGE preparativa. Las fracciones que contenían pBx6 se purificaron mediante transferencia de Western usando anticuerpo policlonal de conejo anti-pBx6, se reunieron, se concentraron usando un tubo Centriprep de Amicon y se dializaron frente a PBS. La pureza de la preparación, estimada mediante SDS PAGE teñida con azul de Coomassie, fue de aproximadamente del 5% al 10%.

## B. Resultados y discusión

### 1. Diseño del estudio

Se obtuvieron cien ratones PDAPP transgénicos machos y hembras, heterocigotos de nueve a once meses de edad, de Charles River Laboratory y Taconic Laboratory. Los ratones se clasificaron en diez grupos para inmunizarse con diferentes regiones de A $\beta$  o APP combinadas con adyuvante de Freund. Se distribuyeron los animales para que se produjera una correspondencia lo más próxima posible en el sexo, la edad, el linaje y la fuente de los animales dentro de los grupos. Los inmunógenos incluyeron cuatro péptidos A $\beta$  derivados de la secuencia humana, 1-5, 1-12, 13-28 y 33-42, conjugados cada uno con la IgG de oveja anti-ratón; cuatro péptidos A $\beta$  agregados, 1-40 humano (AN1528), 1-42 humano (AN1792), 25-35 humano y 1-42 de roedor; y un polipéptido de fusión, denominado pBx6, que contiene los residuos de aminoácidos 592-695 de APP. Se inmunizó un décimo grupo con PBS combinado con adyuvante como control.

Para cada inmunización se emulsionaron 100  $\mu$ g de cada péptido A $\beta$  en 200  $\mu$ l de PBS o 200  $\mu$ g del derivado de APP pBx6 en el mismo volumen de PBS o PBS solo con adyuvante completo de Freund (CFA) en un volumen final de 400  $\mu$ l para la primera inmunización, seguido por una administración de refuerzo de la misma cantidad de inmunógeno en adyuvante incompleto de Freund (IFA) para las cuatro dosis posteriores y con PBS para la dosis final. Las inmunizaciones se administraron por vía intraperitoneal en un programa bisemanal para las tres primeras dosis, y después en un programa mensual. Se extrajo sangre de los animales cuatro a siete días tras cada inmunización comenzando tras la segunda dosis para la medición de los títulos de anticuerpos. Se sacrificaron los animales aproximadamente una semana tras la dosis final.

### 2. Niveles de A $\beta$ y APP en el cerebro

Tras aproximadamente cuatro meses de inmunización con los diversos péptidos A $\beta$  o el derivado de APP, se extrajeron los cerebros de los animales con perfusión de solución salina. Se preparó un hemisferio para el análisis inmunohistoquímico y se usó el segundo para la cuantificación de los niveles de A $\beta$  y APP. Para medir las concentraciones de las diversas formas del péptido beta amiloide y de la proteína precursora de amiloide, se diseccionó el hemisferio y se prepararon homogeneizados de regiones del hipocampo, la corteza y el cerebelo en

guanidina 5 M. Éstos se diluyeron y se cuantificó el nivel de amiloide o APP mediante la comparación con una serie de diluciones de patrones del péptido A $\beta$  o APP de concentraciones conocidas en un formato ELISA.

5 La mediana de la concentración de A $\beta$  total para el grupo control inmunizado con PBS fue 5,8 veces superior en el hipocampo que en la corteza (mediana de 24.318 ng/g en el tejido de hipocampo en comparación con 4.221 ng/g para la corteza). El nivel de mediana en el cerebelo del grupo control (23,4 ng/g de tejido) fue aproximadamente 1.000 veces inferior que en el hipocampo. Estos niveles son similares a los que se han notificado anteriormente para los ratones PDAPP transgénicos heterocigotos de esta edad (Johnson-Woods *et al*, 1997, citado anteriormente).

10 Para la corteza, un subconjunto de grupos de tratamiento tuvo unos niveles de mediana de A $\beta$  total y A $\beta$ 1-42 que difirieron significativamente de los del grupo control ( $p < 0,05$ ), de los animales que recibieron AN1792, A $\beta$ 1-42 de roedor o el conjugado de péptido A $\beta$ 1-5, tal como se muestra en la figura 11. Los niveles de mediana de A $\beta$  total se redujeron en el 75%, el 79% y el 61%, respectivamente, en comparación con el control para estos grupos de tratamiento. No hubo correlaciones discernibles entre los títulos de anticuerpos específicos frente a A $\beta$  y los niveles de A $\beta$  en la región cortical del cerebro para ninguno de los grupos.

15 En el hipocampo, la mediana de la reducción de A $\beta$  total asociada con el tratamiento con AN1792 (46%,  $p = 0,0543$ ) no fue tan grande como la observada en la corteza (75%,  $p = 0,0021$ ). Sin embargo, la magnitud de la reducción fue mucho mayor en el hipocampo que en la corteza, una reducción neta de 11.186 ng/g de tejido en el hipocampo frente a 3,171 ng/g de tejido en la corteza. Para los grupos de animales que recibieron A $\beta$ 1-42 de roedor o A $\beta$ 1-5, los niveles de mediana de A $\beta$  total se redujeron en el 36% y el 26%, respectivamente. Sin embargo, dados los pequeños tamaños de los grupos y la alta variabilidad de los niveles de péptido amiloide de un animal a otro dentro de ambos grupos, estas reducciones no fueron significativas. Cuando se midieron los niveles de A $\beta$ 1-42 en el hipocampo, ninguna de las reducciones inducidas por el tratamiento alcanzó significación. Así, debido a la menor carga de A $\beta$  en la corteza, los cambios en esta región constituyen un indicador más sensible de los efectos del tratamiento. Los cambios en los niveles de A $\beta$  medidos mediante ELISA en la corteza son similares, pero no idénticos, a los resultados de los análisis inmunohistoquímicos (véase más adelante).

20 También se midió A $\beta$  total en el cerebelo, una región normalmente no afectada en la patología de la EA. Ninguno de los valores de mediana de las concentraciones de A $\beta$  de cualquiera de los grupos inmunizados con los diversos péptidos A $\beta$  o el derivado de APP difirieron de los del grupo control en esta región del cerebro. Este resultado sugiere que los niveles de A $\beta$  no patológicos no resultan afectados por el tratamiento.

25 También se determinó la concentración de APP mediante ELISA en la corteza y el cerebelo de ratones tratados y control. Se utilizaron dos ensayos de APP diferentes. El primero, denominado APP- $\alpha$ /FL, reconoce APP-alfa ( $\alpha$ , la forma secretada de APP que se ha roto dentro de la secuencia de A $\beta$ ) y las formas de longitud completa (FL) de APP, mientras que el segundo reconoce sólo APP- $\alpha$ . En contraposición a la disminución asociada con el tratamiento de A $\beta$  en un subconjunto de los grupos de tratamiento, los niveles de APP no cambiaron en todos los animales tratados en comparación con los control. Estos resultados indican que las inmunizaciones con péptidos A $\beta$  no están reduciendo APP; en cambio, el efecto del tratamiento es específico frente a A $\beta$ .

30 En resumen, los niveles de A $\beta$  total y A $\beta$ 1-42 se redujeron significativamente en la corteza mediante el tratamiento con AN1792, A $\beta$ 1-42 de roedor o conjugado de A $\beta$ 1-5. En el hipocampo, A $\beta$  total se redujo significativamente sólo mediante el tratamiento con AN1792. Ningún otro cambio asociado con el tratamiento en los niveles de A $\beta$  o APP en las regiones del hipocampo, la corteza o el cerebelo fue significativo.

## 2. Análisis histoquímicos

35 Se prepararon los cerebros de un subconjunto de seis grupos para el análisis inmunohistoquímico, tres grupos inmunizados con conjugados del péptido A $\beta$ , A $\beta$ 1-5, A $\beta$ 1-12 y A $\beta$ 13-28; dos grupos inmunizados con los agregados de A $\beta$  de longitud completa AN1792 y AN1528 y el grupo control tratado con PBS. En la figura 12 se muestran los resultados de los análisis de imágenes de la carga de amiloide en cortes de cerebro de estos grupos. Hubo reducciones significativas de la carga de amiloide en las regiones corticales de tres de los grupos de tratamiento frente a los animales control. La mayor reducción de la carga de amiloide se observó en el grupo que recibió AN1792, en el que el valor medio se redujo en un 97% ( $p = 0,001$ ). También se observaron reducciones significativas para los animales tratados con AN1528 (95%,  $p = 0,005$ ) y el conjugado de péptido A $\beta$ 1-5 (67%,  $p = 0,02$ ).

40 Los resultados obtenidos mediante la cuantificación de A $\beta$  total o A $\beta$ 1-42 mediante ELISA y la carga de amiloide mediante el análisis de imágenes difieren en cierto grado. El tratamiento con AN1528 tuvo un efecto significativo en el nivel de carga de amiloide cortical cuando se midió mediante el análisis de imágenes cuantitativo pero no en la concentración de A $\beta$  total en la misma región cuando se midió mediante ELISA. Es probable que la diferencia entre estos dos resultados se deba a las especificidades de los ensayos. El análisis de imágenes mide

sólo A $\beta$  insoluble agregado en placas. En contraposición, el ELISA mide todas las formas de A $\beta$ , soluble e insoluble, monomérica y agregada. Dado que se cree que la patología de la enfermedad está asociada con la forma asociada en placas insoluble de A $\beta$ , la técnica del análisis de imágenes puede tener más sensibilidad para revelar los efectos del tratamiento. Sin embargo dado que el ELISA es un ensayo más rápido y más fácil, es muy útil para fines de examen. Además, puede revelar que la reducción asociada con el tratamiento de A $\beta$  es mayor para el asociado en placas que para A $\beta$  total.

Para determinar si los anticuerpos específicos frente a A $\beta$  provocados mediante la inmunización en los animales tratados reaccionaron con el amiloide depositado del cerebro, se hizo reaccionar un subconjunto de cortes de los animales tratados y los ratones control con un anticuerpo específico frente a la IgG de ratón. En contraposición al grupo con PBS, las placas que contenían A $\beta$  se recubrieron con IgG endógenas para los animales inmunizados con los conjugados del péptido A $\beta$ , A $\beta$ 1-5, A $\beta$ 1-12 y A $\beta$ 13-28; y los agregados de A $\beta$  de longitud completa, AN1792 y AN1528. No se analizaron mediante este ensayo los cerebros de los animales inmunizados con otros péptidos A $\beta$  o el péptido de APP pBx6.

### 3. Medición de los títulos de anticuerpos

Se extrajo sangre de los ratones cuatro a siete días tras cada inmunización comenzando tras la segunda inmunización, para un total de cinco extracciones de sangre. Se midieron los títulos de anticuerpos como el anticuerpo de unión a A $\beta$ 1-42 usando un ELISA tipo sándwich con placas de plástico de múltiples pocillos recubiertas con A $\beta$ 1-42. Tal como se muestra en la figura 13, se obtuvieron títulos de anticuerpos máximos tras la cuarta dosis para las cuatro vacunas que provocaron los títulos superiores de anticuerpos específicos frente a AN1792: AN1792 (GMT máximo: 94.647), AN1528 (GMT máximo: 88.231), conjugado de A $\beta$ 1-12 (GMT máximo: 47.216) y A $\beta$ 1-42 de roedor (GMT máximo: 10.766). Los títulos para estos grupos disminuyeron algo tras la quinta y sexta dosis. Para los cinco inmunógenos restantes, se alcanzaron los títulos máximos tras la quinta o la sexta dosis y fueron de magnitud muy inferior a los de los cuatro grupos de título superior: conjugado de A $\beta$ 1-5 (GMT máximo: 2.356), pBx6 (GMT máximo: 1.986), conjugado de A $\beta$ 13-28 (GMT máximo: 1.183), conjugado de A $\beta$ 33-42 (GMT máximo: 658), A $\beta$ 25-35 (GMT máximo: 125). También se midieron los títulos de anticuerpos frente a los péptidos homólogos usando el mismo formato de ELISA tipo sándwich para un subconjunto de los inmunógenos, los grupos inmunizados con A $\beta$ 1-5, A $\beta$ 13-28, A $\beta$ 25-35, A $\beta$ 33-42 o A $\beta$ 1-42 de roedor. Estos títulos fueron aproximadamente los mismos que los medidos frente a A $\beta$ 1-42, excepto para el inmunógeno A $\beta$ 1-42 de roedor en cuyo caso los títulos de anticuerpos frente al inmunógeno homólogo fueron aproximadamente dos veces superiores. La magnitud del título de anticuerpos específicos frente a AN1792 de los animales individuales o los valores medios de los grupos de tratamiento no se correlacionó con la eficacia medida como la reducción de A $\beta$  en la corteza.

### 4. Respuestas linfoproliferativas

Se midió la linfoproliferación dependiente de A $\beta$  usando células de bazo recogidas aproximadamente una semana tras la sexta inmunización final. Se cultivaron células recogidas en fresco,  $10^5$  por pocillo durante 5 días en presencia de A $\beta$ 1-40 a una concentración de 5  $\mu$ M para estimulación. También se cultivaron células procedentes de un subconjunto de siete de los diez grupos en presencia del péptido inverso, A $\beta$ 40-1. Como control positivo, se cultivaron células adicionales con el mitógeno de células T, PHA, y como control negativo, se cultivaron células sin péptido añadido.

Los linfocitos de una mayoría de los animales proliferaron en respuesta a PHA. No hubo respuestas significativas al péptido inverso A $\beta$ 40-1. Las células procedentes de animales inmunizados con los péptidos A $\beta$  agregados más grandes, AN1792, A $\beta$ 1-42 de roedor y AN1528 proliferaron mucho cuando se estimularon con A $\beta$ 1-40 obteniéndose la mayor cantidad de cpm en los que recibieron AN1792. Un animal en cada uno de los grupos inmunizados con conjugado de A $\beta$ 1-12, conjugado de A $\beta$ 13-28 y A $\beta$ 25-35 proliferó en respuesta a A $\beta$ 1-40. Los grupos restantes que recibieron conjugado de A $\beta$ 1-5, conjugado de A $\beta$ 33-42 pBx6 o PBS no tuvieron animales con respuesta estimulada por A $\beta$ . Estos resultados se resumen en la tabla 5 a continuación.

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

Tabla 5			
Inmunógeno	Conjugado	Aminoácidos de Aβ	Respondedores
Aβ1-5	sí	5-mero	0/7
Aβ1-12	sí	12-mero	1/8
Aβ13-28	sí	16-mero	1/9
Aβ25-35		11-mero	1/9
Aβ33-42	sí	10-mero	0/10
Aβ1-40		40-mero	5/8
Aβ1-42		42-mero	9/9
r Aβ1-42		42-mero	8/8
pBx6			0/8
PBS		0-mero	0/8

Estos resultados muestran que AN1792 y AN1528 estimulan respuestas fuertes de células T, más probablemente del fenotipo CD4<sup>+</sup>. La ausencia de una respuesta de células T específica frente a Aβ en los animales inmunizados con Aβ1-5 no es sorprendente, dado que los epítopos peptídicos reconocidos por las células T CD4<sup>+</sup> habitualmente tienen aproximadamente 15 aminoácidos de longitud, aunque a veces pueden funcionar péptidos más cortos con menos eficacia. Así, es probable que la mayoría de los epítopos de las células T cooperadoras para los cuatro péptidos del conjugado resida en la pareja del conjugado de IgG, no en la región de Aβ. Esta hipótesis está apoyada por la incidencia muy baja de respuestas proliferativas para los animales en cada uno de estos grupos de tratamiento. Dado que el conjugado de Aβ1-5 fue eficaz en reducir significativamente el nivel de Aβ en el cerebro, en la ausencia aparente de células T específicas frente a Aβ, la respuesta inmunitaria efectora clave inducida por la inmunización con este péptido parece ser los anticuerpos.

La ausencia de células T y la baja respuesta de anticuerpos del péptido de fusión pBx6, que engloba los aminoácidos 592-695 de APP incluyendo todos los residuos de Aβ puede deberse a la escasa inmunogenicidad de esta preparación particular. La escasa inmunogenicidad del agregado de Aβ25-35 se debe probablemente a que el péptido es demasiado pequeño para que sea probable que contenga un buen epítipo de células T para ayudar a la inducción de una respuesta de anticuerpos. Si este péptido estuviera conjugado a una proteína vehículo, probablemente sería más inmunogénico.

V. Preparación de Anticuerpos Policlonales para la Protección Pasiva

Se inmunizan 20 ratones no transgénicos con Aβ u otro inmunógeno, opcionalmente más adyuvante, y se eutanasian a los 4-5 meses. Se recoge sangre de ratones inmunizados. Opcionalmente, se separa IgG de otros componentes de la sangre. El anticuerpo específico para el inmunógeno puede purificarse parcialmente mediante cromatografía de afinidad. Se obtiene un promedio de aproximadamente 0,5-1 mg de anticuerpo específico de inmunógeno por ratón, dando un total de 5-10 mg.

VI. Inmunización Pasiva con Anticuerpos para Aβ

Se inyecta a grupos de ratones PDAPP de 7-9 meses de edad 0,5 mg en PBS de anti-Aβ policlonaal o monoclonales anti-Aβ específicos como se muestra a continuación. Todas las preparaciones de anticuerpo se purifican para tener bajos niveles de endotoxina. Los monoclonales se pueden preparar frente a un fragmento inyectando el fragmento o una forma más larga de Aβ en un ratón, preparando hibridomas y explorando los hibridomas para un anticuerpo que se une específicamente a un fragmento deseado de Aβ sin unirse a otros fragmentos no solapantes de Aβ.

Tabla 6

Anticuerpo	Epítipo
2H3	A $\beta$ 1-12
10D5	A $\beta$ 1-12
266	A $\beta$ 13-28
21F12	A $\beta$ 33-42
Anti-A $\beta$ 42 humano policlonal de ratón	Anti-A $\beta$ 42 agregado

Se inyecta ip a los ratones cuando sea necesario a lo largo de un periodo de 4 meses para mantener una concentración de anticuerpos circulante medida mediante el título de ELISA de más de 1/1000 definido por ELISA para A $\beta$ 42 u otro inmunógeno. Los títulos se controlan como anteriormente y los ratones se eutanasian al final de 4 meses de inyecciones. Se realizan histoquímica, niveles de A $\beta$  y toxicología post-mortem. Se usan diez ratones por grupo.

#### VII. Comparación de adyuvantes diferentes

Este ejemplo compara CFA, alumbre, una emulsión de aceite en agua y MPL para determinar su capacidad para estimular una respuesta inmunitaria.

#### A. Materiales y métodos

##### 1. Diseño del estudio

Se clasificaron cien cobayas de la variedad Hartley hembra, de seis semanas de edad, obtenidas de Elm Hill, en diez grupos para inmunizarse con AN1792 o un derivado de palmitoílo del mismo combinado con diversos adyuvantes. Siete grupos recibieron inyecciones de AN1792 (33  $\mu$ g a menos que se especifique lo contrario) combinado con a) PBS, b) adyuvante de Freund, c) MPL, d) escualeno, e) MPL/escualeno f) alumbre a dosis baja, o g) alumbre a dosis alta (300  $\mu$ g de AN1792). Dos grupos recibieron inyecciones de un derivado de palmitoílo de AN1792 (33  $\mu$ g) combinado con a) PBS o b) escualeno. Un décimo grupo final recibió PBS solo sin antígeno ni adyuvante adicional. Para el grupo que recibió adyuvante de Freund, la primera dosis se emulsionó con CFA y las cuatro dosis restantes con IFA. Se administró el antígeno a una dosis de 33  $\mu$ g para todos los grupos excepto para el grupo con alumbre a dosis alta, que recibió 300  $\mu$ g de AN1792. Se administraron las inyecciones por vía intraperitoneal para CFA/IFA y por vía intramuscular en los cuádriceps de las extremidades traseras alternativamente en el lado derecho e izquierdo de los otros grupos. Las tres primeras dosis se administraron en un programa bisemanal seguido por dos dosis en un intervalo mensual. Se extrajo sangre seis a siete días tras cada inmunización, comenzando tras la segunda dosis, para la medición de los títulos de anticuerpos.

##### 2. Preparación de los inmunógenos

Se añadieron dos mg de A $\beta$ 42 (California Peptide, Lote ME0339) a 0,9 ml de agua desionizada y la mezcla se agitó con vórtex para generar una suspensión relativamente uniforme. Se añadió una alícuota de 100  $\mu$ l de 10X PBS (1X PBS, NaCl 0,15 M, fosfato de sodio 0,01 M, pH 7,5). Se agitó de nuevo la suspensión con vórtex y se incubó durante la noche a 37°C para su uso al día siguiente. Se almacenó el A $\beta$ 1-42 no utilizado con desecante como un polvo liofilizado a -20°C.

Se preparó un derivado de palmitoílo de AN1792 mediante el acoplamiento de anhídrido palmítico, disuelto en dimetilformamida, al residuo amino terminal de AN1792 antes de la eliminación del péptido naciente de la resina mediante tratamiento con ácido fluorhídrico.

Para preparar las dosis de vacuna con adyuvante completo de Freund (CFA) (grupo 2), se emulsionaron 1:1 (vol:vol) 33  $\mu$ g de AN1792 en 200  $\mu$ l de PBS con CFA en un volumen final de 400  $\mu$ l para la primera inmunización. Para las inmunizaciones posteriores, el antígeno se emulsionó de manera similar con adyuvante incompleto de Freund (IFA).

Para preparar las dosis de vacuna con MPL para los grupos 5 y 8, se añadió polvo liofilizado (Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MT) a trietilamina acuosa al 0,2% hasta una concentración final de 1 mg/ml y se agitó con vórtex. La mezcla se calentó hasta de 65°C a 70°C durante 30 s para crear una suspensión uniforme ligeramente opaca de micelas. La solución se preparó en fresco para cada conjunto de inyecciones. Para cada

inyección en el grupo 5, se mezclaron 33 µg de AN1792 en 16,5 µl de PBS, 50 µg de MPL (50 µl) y 162 µl de PBS en un tubo de borosilicato inmediatamente antes de su uso.

5 Para preparar las dosis de vacuna con la emulsión de aceite en agua baja, se añadió AN1792 en PBS a escualeno al 5%, Tween 80 al 0,5%, Span 85 al 0,5% en PBS para alcanzar una concentración final de dosis única de 33 µg de AN1792 en 250 µl (grupo 6). La mezcla se emulsionó haciéndola pasar a través de un dispositivo de  
10 mano de dos cámaras de 15 a 20 veces hasta que las gotitas de la emulsión parecieron ser de diámetro aproximadamente igual a perlas de látex convencionales de 1,0 µm de diámetro cuando se observaron al microscopio. La suspensión resultante era de color blanco lechoso opalescente. Las emulsiones se prepararon en fresco para cada serie de inyecciones. Para el grupo 8, se añadió MPL en trietilamina al 0,2% a una concentración de 50 µg por dosis de la mezcla de detergente y escualeno para la emulsión tal como se observó anteriormente. Para el derivado de palmitoilo (grupo 7), se añadieron 33 µg por dosis de palmitoil-NH-Aβ1-42 al escualeno y se agitó con vórtex. Entonces se añadieron Tween 80 y Span 85 con agitación con vórtex. Esta mezcla se añadió al PBS para alcanzar concentraciones finales de escualeno al 5%, Tween 80 al 0,5%, Span 85 al 0,5% y la mezcla se emulsionó tal como se observó anteriormente.

Para preparar las dosis de vacuna con alumbre (grupos 9 y 10), se añadió AN1792 en PBS a Alhydrogel (gel de hidróxido de aluminio, Accurate, Westbury, NY) hasta alcanzar concentraciones de 33 µg (dosis baja, grupo 9) o 300 µg (dosis alta, grupo 10) AN1792 por 5 mg de alumbre en un volumen de dosis final de 250 µl. La suspensión se mezcló suavemente durante 4 h a TA.

### 3. Medición de los títulos de anticuerpos

25 Se extrajo sangre de cobayas seis a siete días tras inmunización comenzando tras la segunda inmunización para un total de cuatro extracciones de sangre. Se midieron los títulos de anticuerpos frente a Aβ42 mediante ELISA tal como se describe en Materiales generales y procedimientos.

### 4. Preparación del tejido

30 Tras aproximadamente 14 semanas, se administró CO<sub>2</sub> a todos los cobayas. Se recogió el líquido cefalorraquídeo y se extrajeron los cerebros y se diseccionaron tres regiones del cerebro (hipocampo, corteza y cerebelo) y se usaron para medir la concentración de proteína Aβ total usando ELISA.

## B. Resultados

### 35 1. Respuestas de anticuerpos

40 Hubo una amplia variedad en la potencia de los diversos adyuvantes cuando se midió como la respuesta de anticuerpos a AN1792 tras la inmunización. Tal como se muestra en la figura 14, cuando se administró AN1792 en PBS, no se detectaron anticuerpos tras dos o tres inmunizaciones y se detectaron respuestas insignificantes tras la cuarta y la quinta dosis con títulos en media geométrica (GMT) de sólo aproximadamente 45. La emulsión de o/w indujo títulos modestos tras la tercera dosis (GMT 255) que se mantuvieron tras la cuarta dosis (GMT 301) y disminuyeron con la dosis final (GMT 54). Hubo una clara respuesta a la dosis de antígeno para AN1792 unido a alumbre, siendo 300 µg más inmunogénico en todos los puntos de tiempo que 33 µg. En el nivel máximo de la  
45 respuesta de anticuerpos, tras la cuarta inmunización, la diferencia entre las dos dosis fue del 43% con GMT de aproximadamente 1940 (33 µg) y 3400 (300 µg). La respuesta de anticuerpos a 33 µg de AN1792 más MPL fue muy similar a la generada con una dosis casi diez veces superior de antígeno (300 µg) unido a alumbre. La adición de MPL a una emulsión de o/w redujo la potencia de la vacuna con respecto a con MPL como el único adyuvante en hasta el 75%. Un derivado de palmitoilo de AN1792 fue completamente no inmunogénico cuando se administró en PBS y produjo títulos modestos cuando se presentó en una emulsión de o/w con GMT de 340 y 105 para la tercera y la cuarta extracciones de sangre. Los títulos de anticuerpos superiores se generaron con adyuvante de Freund con un GMT máximo de aproximadamente 87.000, un valor casi 30 veces mayor que los GMT de las siguientes dos vacunas más potentes, MPL y AN1792/alumbre a dosis alta.

55 Los adyuvantes más prometedores identificados en este estudio son MPL y alumbre. De estos dos, MPL parece ser preferible debido a que se requirió una dosis de antígeno 10 veces inferior para generar la misma respuesta de anticuerpos que la obtenida con alumbre. La respuesta puede aumentarse mediante el aumento de la dosis de antígeno y/o de adyuvante y mediante la optimización del programa de inmunización. La emulsión de o/w fue un adyuvante muy débil para AN1792 y la adición de una emulsión de o/w al adyuvante MPL disminuyó la actividad intrínseca del adyuvante de MPL solo.

### 60 2. Niveles de Aβ en el cerebro

65 Aproximadamente a las 14 semanas, se anestesiaron los cobayas profundamente, se extrajo el líquido cefalorraquídeo (CSF) y se extirparon los cerebros de los animales en un subconjunto de los grupos, los inmunizados con adyuvante de Freund (grupo 2), MPL (grupo 5), alumbre a dosis alta, 300 pg, de AN1792 (grupo

10) y el grupo control inmunizado con PBS (grupo 3). Para medir el nivel de péptido A $\beta$ , se diseccionó un hemisferio y se prepararon homogeneizados de regiones del hipocampo, la corteza y el cerebelo en guanidina 5 M. Éstos se diluyeron y se cuantificaron mediante comparación con una serie de diluciones de la proteína patrón A $\beta$  de concentraciones conocidas en un formato de ELISA. Los niveles de la proteína A $\beta$  en el hipocampo, la corteza y el cerebelo fueron muy similares para los cuatro grupos a pesar del amplio intervalo de respuestas de anticuerpos a A $\beta$  provocadas por estas vacunas. Se midieron niveles medios de A $\beta$  de aproximadamente 25 ng/g de tejido en el hipocampo, 21 ng/g en la corteza y 12 ng/g en el cerebelo. Así, la presencia de un alto título de anticuerpos circulante frente a A $\beta$ , durante casi tres meses en algunos de estos animales no alteró los niveles totales de A $\beta$  en sus cerebros. Los niveles de A $\beta$  en el CSF también fueron bastante similares entre los grupos. La ausencia de un gran efecto de inmunización con AN1792 en A $\beta$  endógeno indica que la respuesta inmunitaria se centra en las formaciones patológicas de A $\beta$ .

#### VIII. Respuesta inmunitaria a diferentes adyuvantes en ratones

15 Para este estudio se utilizaron ratones Swiss Webster hembra de seis semanas de edad con 10-13 animales por grupo. Las inmunizaciones se administraron en los días 0, 14, 28, 60, 90 y 20 administradas por vía subcutánea en un volumen de dosis de 200  $\mu$ l. Se usó PBS como el tampón para todas las formulaciones. Se extrajo sangre de los animales siete días tras cada inmunización comenzando tras la segunda dosis para el análisis de los títulos de anticuerpos mediante ELISA. En la tabla 7 se resume el régimen de tratamiento de cada grupo.

Tabla 7

Diseño experimental del estudio Betabloc 010					
Grupo	N <sup>a</sup>	Adyuvante <sup>b</sup>	Dosis	Antígeno	Dosis ( $\mu$ g)
1	10	MPL	12,5 $\mu$ g	AN1792	33
2	10	MPL	25 $\mu$ g	AN1792	33
3	10	MPL	50 $\mu$ g	AN1792	33
4	13	MPL	125 $\mu$ g	AN1792	33
5	13	MPL	50 $\mu$ g	AN1792	150
6	13	MPL	50 $\mu$ g	AN1528	33
7	10	PBS		AN1792	33
8	10	PBS		ninguno	
9	10	Escualeno emulsionado	5%	AN1792	33
10	10	Escualeno mezclado	5%	AN1792	33
11	10	Alumbre	2 mg	AN1792	33
12	13	MPL + Alumbre	50 $\mu$ g/2 mg	AN1792	33
13	10	QS21	5 $\mu$ g	AN1792	33
14	10	QS21	10 $\mu$ g	AN1792	33
15	10	QS21	25 $\mu$ g	AN1792	33
16	13	QS21	25 $\mu$ g	AN1792	150
17	13	QS21	25 $\mu$ g	AN1528	33
18	13	QS21 + MPL	25 $\mu$ g /50 $\mu$ g	AN1792	33
19	13	QS21 + Alumbre	25 $\mu$ g/2 mg	AN1792	33

Notas al pie:

<sup>a</sup> Número de ratones en cada grupo al inicio del experimento.

<sup>b</sup> Se anotan los adyuvantes. El tampón para todas estas formulaciones fue PBS. Para el grupo 8, no hubo adyuvante ni antígeno.

En la tabla 8 a continuación se muestran los títulos de anticuerpos del ELISA frente a A $\beta$ 42 en cada grupo.

Tabla 8

Títulos en media geométrica de anticuerpos					
Semana de extracción de sangre					
Grupo de tratamiento	2,9	5,0	8,7	12,9	16,7
1	248	1797	2577	6180	4177
2	598	3114	3984	5287	6878
3	1372	5000	7159	12333	12781
4	1278	20791	14368	20097	25631
5	3288	26242	13229	9315	23742
6	61	2536	2301	1442	4504
7	37	395	484	972	2149
8	25	25	25	25	25
9	25	183	744	952	1823
10	25	89	311	513	817
11	29	708	2618	2165	3666
12	198	1458	1079	612	797
13	38	433	566	1080	626
14	104	541	3247	1609	838
15	212	2630	2472	1224	1496
16	183	2616	6680	2085	1631
17	28	201	375	222	1540
18	31699	15544	23095	6412	9059
19	63	243	554	299	441

La tabla muestra que los títulos superiores se obtuvieron para los grupos 4, 5 y 18, en los que los adyuvantes fueron 125  $\mu$ g de MPL, 50  $\mu$ g de MPL y QS21 más MPL.

5 IX. Eficacia terapéutica de diferentes adyuvantes

10 Se llevó a cabo un estudio de la eficacia terapéutica en ratones PDAPP transgénicos con un conjunto de adyuvantes adecuados para su uso en seres humanos para determinar su capacidad para potenciar respuestas inmunitarias a A $\beta$  y para inducir el aclaramiento mediado por el sistema inmunitario de los depósitos amiloides en el cerebro.

15 Se obtuvieron ciento ochenta ratones PDAPP transgénicos heterocigotos machos y hembras, de 7,5 a 8,5 meses de edad de Charles River Laboratories. Se clasificaron los ratones en nueve grupos que contenían de 15 a 23 animales por grupo para inmunizarse con AN1792 o AN1528 combinados con diversos adyuvantes. Se distribuyeron los animales para que se produjera una correspondencia lo más próxima posible en el sexo, la edad y el linaje de los animales dentro de los grupos. Los adyuvantes incluyeron alumbre, MPL y QS21, cada uno combinado con ambos antígenos y adyuvante de Freund (FA) combinado sólo con AN1792. Se inmunizó un grupo adicional con AN1792 formulado en tampón PBS más el conservante timerosal sin adyuvante. Se inmunizó un noveno grupo con PBS solo

como control negativo.

Preparación de péptidos A $\beta$  agregados: se solubilizaron en fresco los péptidos A $\beta$ 1-40 humano (AN1528; California Peptides Inc., Napa, CA; Lote ME0541) y A $\beta$ 1-42 humano (AN1792; California Peptides Inc., Lote ME0439) para la preparación de cada conjunto de inyecciones a partir de polvos liofilizados que se habían almacenado desecados a -20°C. Para este fin, se añadieron dos mg de péptido a 0,9 ml de agua desionizada y la mezcla se agitó con vórtex para generar una suspensión o solución relativamente uniforme. AN1528 era soluble en esta etapa, en contraposición con AN1792. Entonces se añadió una alícuota de 100  $\mu$ l de 10X PBS (1X PBS: NaCl 0,15 M, fosfato de sodio 0,01 M, pH 7,5), punto en el que AN1528 comenzó a precipitar. Las suspensiones se agitaron en vórtex de nuevo y se incubaron durante la noche a 37°C para su uso al día siguiente.

Para preparar las dosis de vacuna con alumbre (grupos 1 y 5), se añadió el péptido A $\beta$  en PBS a Alhydrogel (gel de hidróxido de aluminio acuoso al dos por ciento, Sargeant, Inc., Clifton, NJ) hasta alcanzar concentraciones de 100  $\mu$ g de péptido A $\beta$  por 1 mg de alumbre. Se añadió 10X PBS hasta un volumen de dosis final de 200  $\mu$ l en 1X PBS. Entonces se mezcló suavemente la suspensión durante aproximadamente 4 h a TA antes de la inyección.

Para preparar las dosis de vacuna con MPL (grupos 2 y 6), se añadió polvo liofilizado (Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MT; Lote 67039-E0896B) a trietilamina acuosa al 0,2% hasta una concentración final de 1 mg/ml y se agitó con vórtex. La mezcla se calentó hasta 65°C a 70°C durante 30 s para crear una suspensión uniforme ligeramente opaca de micelas. La disolución se almacenó a 4°C. Para cada conjunto de inyecciones, se mezclaron 100  $\mu$ g de péptido por dosis en 50  $\mu$ l de PBS, 50  $\mu$ g de MPL por dosis (50  $\mu$ l) y 100  $\mu$ l de PBS por dosis en un tubo de borosilicato inmediatamente antes de su uso.

Para preparar las dosis de vacuna con QS21 (grupos 3 y 7), se añadió polvo liofilizado (Aquila, Framingham, MA; Lote A7018R) a PBS, pH 6,6-6,7 hasta una concentración final de 1 mg/ml y se agitó con vórtex. La solución se almacenó a -20°C. Para cada conjunto de inyecciones, se mezclaron 100  $\mu$ g de péptido por dosis en 50  $\mu$ l de PBS, 25  $\mu$ g de QS21 por dosis en 25  $\mu$ l de PBS y 125  $\mu$ l de PBS por dosis en un tubo de borosilicato inmediatamente antes de su uso.

Para preparar las dosis de vacuna con adyuvante de Freund (grupo 4), se emulsionaron 1:1 (vol:vol) 100  $\mu$ g de AN1792 en 200  $\mu$ l de PBS con adyuvante completo de Freund (CFA) en un volumen final de 400  $\mu$ l para la primera inmunización. Para las inmunizaciones posteriores, el antígeno se emulsionó de manera similar con adyuvante incompleto de Freund (IFA). Para las vacunas que contienen los adyuvantes alumbre, MPL o QS21, se combinaron 100  $\mu$ g por dosis de AN1792 o de AN1528 con alumbre (1 mg por dosis) o MPL (50  $\mu$ g por dosis) o QS21 (25  $\mu$ g por dosis) en un volumen final de 200  $\mu$ l de PBS y se administraron mediante inoculación subcutánea en la espalda entre los omóplatos. Para el grupo que recibió FA, se emulsionaron 1: 1 (vol:vol) 100  $\mu$ g de AN1792 con adyuvante completo de Freund (CFA) en un volumen final de 400  $\mu$ l y se administraron por vía intraperitoneal para la primera inmunización, seguido por una administración de refuerzo de la misma cantidad de inmunógeno en adyuvante incompleto de Freund (IFA) para las cinco dosis posteriores. Para el grupo que recibió AN1792 sin adyuvante, se combinaron 10  $\mu$ g de AN1792 con 5  $\mu$ g de timerosal en un volumen final de 50  $\mu$ l de PBS y se administraron por vía subcutánea. El noveno grupo control recibió sólo 200  $\mu$ l de PBS administrados por vía subcutánea. Las inmunizaciones se administraron en un programa bisemanal para las primeras tres dosis, después en un programa mensual en los días 0, 16, 28, 56, 85 y 112. Se extrajo sangre de los animales seis a siete días tras cada inmunización comenzando tras la segunda dosis para la medición de los títulos de anticuerpos. Se sacrificaron los animales aproximadamente una semana tras la dosis final. Los desenlaces se midieron mediante ensayo de ELISA de los niveles de A $\beta$  y APP en el cerebro y mediante la evaluación inmunohistoquímica de la presencia de placas amiloides en cortes de cerebro. Además, se determinaron los títulos de anticuerpos específicos frente a A $\beta$  y las respuestas de citocina y proliferativa dependientes de A $\beta$ .

La tabla 9 muestra que los máximos títulos de anticuerpos frente a A $\beta$ 1-42 se obtuvieron con FA y AN1792, títulos que alcanzaron un máximo tras la cuarta inmunización (GMT máximo: 75.386) y después disminuyeron en un 59% tras la sexta inmunización final. El título medio máximo obtenido mediante MPL con AN1792 fue un 62% inferior al generado con FA (GMT máximo: 28.867) y también se alcanzó pronto en el esquema de inmunización, tras 3 dosis, seguido por una disminución hasta el 28% del valor máximo tras la sexta inmunización. El título medio máximo generado con QS21 combinado con AN1792 (GMT: 1.511) fue aproximadamente 5 veces inferior que el obtenido con MPL. Además, las cinéticas de la respuesta fueron más lentas, ya que se requirió una inmunización adicional para alcanzar la respuesta máxima. Los títulos generados por AN1792 unido a alumbre fueron ligeramente mayores que los obtenidos con QS21 y las respuestas cinéticas fueron más rápidas. Para AN1792 administrado en PBS con timerosal, la frecuencia y el tamaño de los títulos fueron apenas mayores que para el PBS solo. Los títulos máximos generados con MPL y AN1528 (GMT máximo 3099) fueron aproximadamente 9 veces inferiores a los obtenidos con AN1792. El AN1528 unido a alumbre fue muy escasamente inmunogénico con títulos bajos generados sólo en algunos de los animales. No se observaron respuestas de anticuerpos en los animales control inmunizados con PBS solo.

Tabla 9

Títulos en media geométrica de anticuerpos <sup>a</sup>					
Semana de extracción de sangre					
Tratamiento	3,3	5,0	9,0	13,0	17,0
Alumbre/ AN1792	102 (12/21) <sup>b</sup>	1.081 (17/20)	2.366 (21/21)	1.083 (19/21)	572 (18/21)
MPL/ AN1792	6241 (21/21)	28.867 (21/21)	1.1242 (21/21)	5.665 (20/20)	8.204 (20/20)
QS21/ AN1792	30 (1/20)	227 (10/19)	327 (10/19)	1.511 (17/18)	1.188 (14/18)
CFA/ AN1792	10.076 (15/15)	61.279 (15/15)	75.386 (15/15)	41.628 (15/15)	30.574 (15/15)
Alumbre/ AN1528	25 (0/21)	33 (1/21)	39 (3/20)	37 (1/20)	31 (2/20)
MPL/ AN1528	184 (15/21)	2.591 (20/21)	1.653 (21/21)	1.156 (20/20)	3.099 (20/20)
QS21/ AN1528	29 (1/22)	221 (13/22)	51 (4/22)	820 (20/22)	2,994 (21/22)
PBS más timerosal	25 (0/16)	33 (2/16)	39 (4/16)	37 (3/16)	47 (4/16)
PBS	25 (0/16)	25 (0/16)	25 (0/15)	25 (0/12)	25 (0/16)

Notas al pie:

<sup>a</sup> Títulos en media geométrica de anticuerpos medidos frente a A $\beta$ 1-42

<sup>b</sup> Número de animales que responden por grupo

5 En la figura 15 se muestran los resultados del tratamiento con AN1792 o AN1592 con diversos adyuvantes, o timerosal en la carga de amiloide cortical en ratones de 12 meses de edad determinados mediante ELISA. En ratones PDAPP control con PBS, el nivel de mediana de A $\beta$  total en la corteza a los 12 meses fue de 1.817 ng/g. Se observaron niveles notablemente reducidos de A $\beta$  en ratones tratados con AN1792 más CFA/IFA, AN1792 más alumbre, AN1792 más MPL y QS21 más AN1792. La reducción alcanzó significación estadística ( $p < 0,05$ ) sólo para AN1792 más CFA/IFA. Sin embargo, tal como se muestra en los ejemplos I y III, los efectos de la inmunización en la reducción de los niveles de A $\beta$  se hicieron sustancialmente mayores en ratones de 15 meses y 18 meses de edad. Así, se espera que al menos las composiciones de AN1792 más alumbre, AN1792 más MPL y AN1792 más QS21 lograrán significación estadística en el tratamiento de los ratones de más edad. En contraposición, AN1792 más el conservante timerosal mostró un nivel de mediana de A $\beta$  aproximadamente igual al de los ratones tratados con PBS. Se obtuvieron resultados similares cuando se compararon los niveles corticales de A $\beta$ 42. El nivel de mediana de A $\beta$ 42 en los controles con PBS fue de 1624 ng/g. Se observaron niveles de mediana notablemente reducidos de 403, 1149, 620 y 714 en los ratones tratados con AN1792 más CFA/IFA, AN1792 más alumbre, AN1792 más MPL y AN1792 más QS21, respectivamente, logrando la reducción de la significación estadística ( $p = 0,05$ ) para el grupo de tratamiento con AN1792 CFA/IFA. El nivel de mediana en los ratones tratados con AN1792-timerosal fue de 1619 ng/g de A $\beta$ 42.

10

15

## X. Análisis de toxicidad

Se recogieron tejidos para el examen histopatológico a la finalización de los estudios descritos en los ejemplos 2, 3 y 7. Además, se llevaron a cabo análisis de hematología y bioquímica clínica en las muestras de sangre terminales de los ejemplos 3 y 7. Se evaluó la mayoría de los órganos principales incluyendo cerebro, pulmones, tejido linfático, sistema gastrointestinal, hígado, riñones, glándulas suprarrenales y gónadas. Aunque se observaron lesiones esporádicas en los animales del estudio, no hubo diferencias obvias, ni en los tejidos afectados ni en la gravedad de las lesiones, entre los animales tratados con AN1792 y no tratados. No hubo lesiones histopatológicas únicas observadas en los animales inmunizados con AN-1782 en comparación con los animales tratados con PBS o no tratados. Tampoco hubo diferencias en el perfil de análisis de bioquímica clínica entre los grupos con adyuvante y los animales tratados con PBS en el ejemplo 7. Aunque hubo aumentos significativos en varios de los parámetros de hematología entre los animales tratados con AN1792 y adyuvante de Freund en el ejemplo 7 con respecto a los animales tratados con PBS, se esperan estos tipos de efectos a partir del tratamiento con adyuvante de Freund y la peritonitis que acompaña y no indican ningún efecto adverso del tratamiento con AN1792. Aunque no formó parte de la evaluación toxicológica, se examinó extensamente la patología del cerebro de ratón PDAPP como parte de los criterios de valoración de eficacia. No se observaron signos de efectos adversos relacionados con el tratamiento en la morfología del cerebro en ninguno de los estudios. Estos resultados indican que el tratamiento con AN1792 se tolera bien y está al menos sustancialmente libre de efectos secundarios.

## XI. Prevención y tratamiento de los sujetos

Se lleva a cabo un ensayo de fase I de dosis única para determinar la seguridad. Se administra un agente terapéutico en dosificaciones crecientes a diferentes pacientes comenzando desde aproximadamente el nivel de eficacia supuesta de 0,01 y aumentando en un factor de tres hasta alcanzar un nivel de aproximadamente 10 veces la dosificación eficaz en el ratón.

Se lleva a cabo un ensayo de fase II para determinar la eficacia terapéutica. Se seleccionan pacientes con enfermedad de Alzheimer de temprana a media definida usando los criterios de la Alzheimer's disease and Related Disorders Association (ADFDA) (Asociación de la enfermedad de Alzheimer y trastornos relacionados) por EA probable. Los pacientes adecuados puntúan en el intervalo 12-26 en el Mini-Mental State Exam (MMSE) (examen de estado mini-mental). Otros criterios de selección son que es probable que los pacientes sobrevivan durante la duración del estudio y la ausencia de problemas de complicación tales como el uso de medicaciones concomitantes que pueden interferir. Las evaluaciones en el nivel inicial de la función del paciente se realizan usando medidas psicométricas clásicas, tales como MMSE, y ADAS, que es una escala exhaustiva para evaluar pacientes con estado y función de enfermedad de Alzheimer. Estas escalas psicométricas proporcionan una medida de la progresión de la afección de Alzheimer. También pueden usarse escalas de vida cualitativas adecuadas para controlar el tratamiento. También puede controlarse la progresión de la enfermedad mediante RMN. También pueden controlarse los perfiles sanguíneos de los pacientes incluyendo ensayos de respuestas de células T y anticuerpos específicos frente al inmunógeno.

Tras las medidas del nivel inicial, los pacientes comenzaron a recibir el tratamiento. Se aleatorizaron y se trataron con el agente terapéutico o bien placebo de una forma enmascarada. Los pacientes se controlaron al menos cada seis meses. La eficacia se determina mediante una reducción significativa en la progresión de un grupo de tratamiento con respecto a un grupo placebo.

Se lleva a cabo un segundo ensayo de fase II para evaluar la conversión de los pacientes desde pérdida de memoria temprana sin enfermedad de Alzheimer, denominada en ocasiones alteración de la memoria asociada con la edad (AAMI), hasta enfermedad de Alzheimer probable tal como se define mediante los criterios de la ADRDA. Los pacientes con alto riesgo de conversión a la enfermedad de Alzheimer se seleccionan de una población no clínica examinando las poblaciones de referencia para determinar signos tempranos de pérdida de memoria u otras dificultades asociadas con sintomatología previa al Alzheimer, una historia familiar de enfermedad de Alzheimer, factores de riesgo genéticos, edad, sexo y otras características encontradas para predecir un alto riesgo en la enfermedad de Alzheimer. Se recogen las puntuaciones de nivel inicial en las métricas adecuadas incluyendo MMSE y ADAS junto con otras métricas diseñadas para evaluar una población más normal. Estas poblaciones de pacientes se dividieron en grupos adecuados con comparación de placebo frente a alternativas de dosificación con el agente. Se realizaron seguimientos de estas poblaciones de pacientes a intervalos de aproximadamente seis meses, y el criterio de valoración para cada paciente es si se convierte o no en enfermedad de Alzheimer probable tal como se define por los criterios de ADRDA al final de la observación.

## XII. Métodos y materiales generales

### 1. Medición de los títulos de anticuerpos

Se extrajo sangre de ratones realizando un pequeño corte en la vena de la cola y recogiendo aproximadamente 200 µl de sangre en un tubo de microcentrífuga. Se extrajo sangre de cobayas afeitando en primer lugar la zona posterior del corvejón y después usando una aguja de calibre 18 para cortar la vena

metatarsiana y recogiendo la sangre en tubos de microcentrífuga. Se dejó coagular la sangre durante una h a temperatura ambiente (TA), se agitó con vórtex, después se centrifugó a 14.000 x g durante 10 min para separar el coágulo del suero. Entonces se transfirió el suero a un tubo de microcentrífuga limpio y se almacenó a 4°C hasta que se tituló.

5 Se midieron los títulos de anticuerpos mediante ELISA. Se recubrieron placas de microtitulación de 96 pocillos (placas de EIA Costar) con 100 µl de una solución que contenía 10 µg/ml de Aβ42 o SAPP o bien otros antígenos tal como se observa en cada uno de los informes individuales en tampón de recubrimiento de pocillos (fosfato de sodio 0,1 M, pH 8,5, azida sódica 0,1%) y se mantuvieron durante la noche a TA. Se aspiraron los pocillos y se añadieron los sueros a los pocillos comenzando a una dilución de 1/100 en diluyente de muestras (fosfato de sodio 0,014 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, albúmina sérica bovina al 0,6%, timerosal al 0,05%). Se realizaron siete diluciones en serie de las muestras directamente en las placas en etapas de tres veces hasta alcanzar una dilución final de 1/218.700. Se incubaron las diluciones en los pocillos de las placas recubiertos durante una h a TA. Entonces se lavaron las placas cuatro veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,05%. Se añadió a los pocillos el segundo anticuerpo, una Ig de cabra anti-ratón conjugada con peroxidasa de rábano blanco (obtenida de Boehringer Mannheim), como 100 µl de una dilución 1/3000 en diluyente de muestras y se incubó durante una h a TA. Las placas se lavaron de nuevo cuatro veces en PBS, Tween 20. Para desarrollar el cromógeno, se añadieron 100 µl de Slow TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina obtenida de Pierce Chemicals) a cada pocillo y se incubó durante 15 min a TA. Se detuvo la reacción mediante la adición de 25 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M. Entonces se leyó la intensidad del color en un Vmax de Molecular Devices a (450 nm - 650 nm).

25 Se definieron los títulos como el recíproco de la dilución de suero que da la mitad de la DO máxima. La DO máxima generalmente se tomó de una dilución 1/100 inicial, excepto en los casos con títulos muy altos, en cuyo caso fue necesaria una dilución inicial superior para establecer la DO máxima. Si el punto al 50% cayó entre dos diluciones, se realizó una extrapolación lineal para calcular el título final. Para calcular los títulos en media geométrica de anticuerpos, se asignaron arbitrariamente a los títulos inferiores a 100 un valor de título de 25.

## 2. Ensayo de proliferación de linfocitos

30 Se anestesiaron los ratones con isoflurano. Se extrajeron los bazos y se enjuagaron dos veces con 5 ml de PBS que contenía suero bovino fetal inactivado con calor al 10% (PBS-FBS) y después se homogeneizaron en una unidad Centricon de 50 µ (Dako A/S, Dinamarca) en 1,5 ml de PBS-FBS durante 10 s a 100 rpm en un sistema Medimachine (Dako) seguido por filtración a través de una malla de nailon de tamaño de poro 100 µ. Se lavaron los esplenocitos una vez con 15 ml de PBS-FBS, después se hicieron sedimentar mediante centrifugación a 200 x g durante 5 min. Se lisaron los glóbulos rojos resuspendiendo el sedimento en 5 ml de tampón que contenía NH<sub>4</sub>Cl 0,15 M, KHCO<sub>3</sub> 1 M, NaEDTA 0,1 M, pH 7,4 durante cinco min a TA. Entonces se lavaron los leucocitos como anteriormente. Se cultivaron células de bazo aisladas en fresco (10<sup>5</sup> células por pocillo) en conjuntos por triplicado en placas de microtitulación tratadas para cultivo tisular con fondo en forma de U de 96 pocillos (Corning, Cambridge, MA) en medio RPMI 1640 (JRH Biosciences, Lenexa, KS) complementado con L-glutamina 2,05 mM, penicilina/estreptomina al 1% y FBS inactivado con calor al 10% durante 96 h a 37°C. También se añadieron diversos péptidos Aβ, Aβ1-16, Aβ1-40, Aβ1-42 o la proteína de secuencia inversa Aβ40-1 a dosis que oscilaban desde 5 µM hasta 0,18 µM en cuatro etapas. Las células en los pocillos control se cultivaron con concanavalina A (Con A) (Sigma, n° de catálogo C-5275, a 1 µg/ml) sin proteína añadida. Se pulsaron las células durante las 24 h finales con <sup>3</sup>H-timidina (1 µCi/pocillo obtenida de Amersham Corp., Arlington Heights IL). Entonces se recogieron las células en placas UniFilter y se contaron en un contador de centelleo de microplacas Top Count (Packard Instruments, Downers Grove, IL). Los resultados se expresan como cuentas por minuto (cpm) de la radiactividad incorporada en las macromoléculas insolubles.

## 4. Preparación del tejido cerebral

50 Tras sacrificar los animales, se extrajeron los cerebros y se preparó un hemisferio para el análisis inmunohistoquímico, mientras que se diseccionaron tres regiones del cerebro (hipocampo, corteza y cerebelo) del otro hemisferio y se usaron para medir la concentración de diversas proteínas Aβ y formas de APP usando ELISA específicos (Johnson-Wood *et al*, citado anteriormente).

55 Se homogeneizaron los tejidos destinados para ELISA en 10 volúmenes de tampón guanidina enfriado con hielo (guanidina-HCl 5,0 M, Tris-HCl 50 mM, pH 8,0). Se mezclaron los homogeneizados mediante agitación suave usando una Adams Nutator (Fisher) durante tres a cuatro h a TA, entonces se almacenaron a -20°C antes de la cuantificación de Aβ y APP. Los experimentos anteriores han demostrado que los analitos eran estables en estas condiciones de almacenamiento y que la proteína Aβ sintética (Bachem) podía recuperarse cuantitativamente cuando se añadía de manera conocida a los homogeneizados de tejido cerebral control de crías de ratón (Johnson-Wood *et al*, citado anteriormente).

## 5. Medición de los niveles de Aβ

65

Se diluyeron los homogeneizados de cerebro 1:10 con diluyente de caseína enfriado con hielo (caseína al 0,25%, PBS, azida sódica al 0,05%, aprotinina 20 µg/ml, EDTA 5 mM pH 8,0, leupeptina 10 µg/ml) y después se centrifugaron a 16.000 x g durante 20 min a 4°C. Se prepararon los patrones de proteína Aβ sintética (1-42 aminoácidos) y los patrones de APP para que incluyeran guanidina 0,5 M y albúmina sérica bovina al 0,1% (BSA) en la composición final. El ELISA tipo sándwich para Aβ "total" utiliza el anticuerpo monoclonal (mAβ) 266, específico para los aminoácidos 13-28 de Aβ (Seubert, *et al*), como el anticuerpo de captura y el mAβ 3D6 biotinilado específico para los aminoácidos 1-5 de Aβ (Johnson-Wood, *et al*), como el anticuerpo indicador. El mAβ 3D6 no reconoce APP secretado ni APP de longitud completa, sino que sólo detecta especies de Aβ con un ácido aspártico amino-terminal. Este ensayo tiene un límite inferior de sensibilidad de ~50 pg/ml (11 pM) y muestra que no hay reactividad cruzada con la proteína Aβ murina endógena a concentraciones de hasta 1 ng/ml (Johnson-Wood *et al*, citado anteriormente).

El ELISA tipo sándwich específico para Aβ1-42 emplea el mAβ 21F12, específico para los aminoácidos 33-42 de Aβ (Johnson-Wood, *et al*), como el anticuerpo de captura. En este ensayo, mAβ 3D6 biotinilado también es el anticuerpo indicador que tiene un límite inferior de sensibilidad de aproximadamente 125 pg/ml (28 pM, Johnson-Wood *et al*). Para los ELISA de A/3, se recubrieron 100 µl de mAβ 266 (a 10 µg/ml) o bien mAβ 21F12 a (5 µg/ml) en los pocillos de placas de inmunoensayo de 96 pocillos (Costar) mediante incubación durante la noche a TA. Se extrajo la disolución mediante aspiración y se bloquearon los pocillos mediante la adición de 200 µl de albúmina sérica humana al 0,25% en tampón PBS durante al menos 1 h a TA. Se extrajo la solución de bloqueo y se almacenaron las placas desecadas a 4°C hasta su uso. Se rehidrataron las placas con tampón de lavado [solución salina tamponada con Tris (NaCl 0,15 M, Tris-HCl 0,01 M, pH 7,5), más Tween 20 al 0,05%] antes de su uso. Se añadieron las muestras y los patrones en alícuotas por triplicado de 100 µl por pocillo y después se incubaron durante la noche a 4°C. Se lavaron las placas al menos tres veces con tampón de lavado entre cada etapa del ensayo. Se añadió el mAβ 3D6 biotinilado, diluido hasta 0,5 µg/ml en tampón de ensayo de caseína (caseína al 0,25%, PBS, Tween 20 al 0,05% 20, pH 7,4) y se incubó en los pocillos durante 1 h a TA. Se añadió a los pocillos un conjugado de avidina-peroxidasa de rábano blanco, (Avidina-HRP obtenida de Vector, Burlingame, CA), diluido 1:4000 en tampón de ensayo de caseína, durante 1 h a TA. Se añadió el sustrato colorimétrico, Slow TMB-ELISA (Pierce) y se dejó reaccionar durante 15 minutos a TA, tras lo que se detuvo la reacción enzimática mediante la adición de 25 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N. Se cuantificó el producto de la reacción usando un Vmax de Molecular Devices que mide la diferencia en la absorbancia a 450 nm y 650 nm.

#### 6. Medición de los niveles de APP

Se utilizaron dos ensayos de APP diferentes. El primero, denominado APP-α/FL, reconoce APP-alfa (α) y las formas de longitud completa (FL) de APP. El segundo ensayo es específico para APP-α. El ensayo APP-α/FL reconoce la APP secretada incluyendo los primeros 12 aminoácidos de Aβ. Dado que el anticuerpo indicador (2H3) no es específico frente al sitio clip α, que se produce entre los aminoácidos 612-613 de APP695 (Esch et al., Science 248, 1122-1124 (1990)); este ensayo también reconoce APP de longitud completa (APP-FL). Los experimentos preliminares que utilizaban anticuerpos de APP inmovilizados frente a la cola citoplasmática de APP-FL para reducir los homogeneizados en cerebro de APP-FL sugieren que aproximadamente el 30%-40% del APP-α/APP FL es FL (datos no mostrados). El anticuerpo de captura para ensayos de APP-α/FL y APP-α es mAβ 8E5, obtenido frente a los aminoácidos 444 a 592 de la forma APP695 (Games et al., citado anteriormente). El mAβ indicador para el ensayo de APP-α/FL es mAβ 2H3, específico para los aminoácidos 597-608 de APP695 (Johnson-Wood et al., citado anteriormente) y el anticuerpo indicador para el ensayo de APP-α es un derivado biotinilado de mAβ 16H9, obtenido frente a los aminoácidos 605 a 611 de APP. El límite inferior de sensibilidad del ensayo de APP-α/FL es de aproximadamente 11 ng/ml (150 pM) (Johnson-Wood et al.) y el del ensayo específico para APP-α es de 22 ng/ml (0,3 nM). Para ambos ensayos de APP, mAβ 8E5 se recubrió en los pocillos de placas de EIA de 96 pocillos tal como se describió anteriormente para mAβ 266. Se usó APP-α recombinante, purificado, como el patrón de referencia para el ensayo de APP-α y el ensayo de APP-α/FL (Esch et al., citado anteriormente). Se diluyeron 1:10 las muestras de homogenizado de cerebro en guanidina 5 M en diluyente de muestras para ELISA (tampón fosfato 0,014 M, pH 7,4, albúmina sérica bovina al 0,6%, timerosal al 0,05%, NaCl 0,5 M, NP40 al 0,1%). Después se diluyeron 1:4 en diluyente de muestras que contenía guanidina 0,5 M. Entonces se centrifugaron los homogeneizados diluidos a 16.000 x g durante 15 segundos a TA. Se añadieron las muestras y los patrones de APP a la placa en alícuotas por duplicado y se incubaron durante 1,5 h a TA. Se incubó el anticuerpo 2H3 o 16H9 indicador biotinilado con las muestras durante 1 h a TA. Se incubó estreptavidina-fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim), diluida 1:1000 en diluyente de muestras en los pocillos durante 1 h a TA. Se añadió el sustrato fluorescente 4-metil-umbeliferil-fosfato para incubación durante 30 min a TA y se leyeron las placas en un fluorímetro Cytofluor tm 2350 (Millipore) a excitación de 365 nm y a emisión de 450 nm.

#### 7. Inmunohistoquímica

Se fijaron los cerebros durante tres días a 4°C en paraformaldehído al 4% en PBS y después se almacenaron desde uno hasta siete días a 4°C en paraformaldehído al 1%, PBS hasta que se realizaron los cortes. Se practicaron cortes coronales de cuarenta micrómetros de espesor con un vibratomo a TA y se almacenaron en crioprotector (glicerol al 30%, etilenglicol al 30% en tampón fosfato) a -20°C antes del tratamiento

5 inmunohistoquímico. Para cada cerebro se incubaron durante la noche seis cortes en el nivel del hipocampo dorsal, cada uno separado mediante intervalos consecutivos de 240  $\mu\text{m}$ , con uno de los siguientes anticuerpos: (1) un anti-A $\beta$  biotinilado (mA $\beta$ , 3D6, específico para el A $\beta$  humano) diluido hasta una concentración de 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en PBS y suero de caballo al 1%; o (2) un mA $\beta$  biotinilado específico para el APP humano, 8E5, diluido hasta una concentración de 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en PBS y suero de caballo al 1,0%; o (3) un mA $\beta$  específico para la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP; Sigma Chemical Co.) diluida 1:500 con Triton X-100 al 0,25% y suero de caballo al 1%, en solución salina tamponada con Tris, pH 7,4 (TBS); o (4) un mA $\beta$  específico para CD11b, el antígeno de MAC-1, (Chemicon International) diluido 1:100 con Triton X-100 al 0,25% y suero de conejo al 1% en TBS; o (5) un mA $\beta$  específico para el antígeno del CMH II, (Pharmingen) diluido 1:100 con Triton X-100 al 0,25% y suero de conejo al 1% en TBS; o (6) un mA $\beta$  de rata específico para CD 43 (Pharmingen) diluido 1:100 con suero de conejo al 1% en PBS o (7) un mA $\beta$  de rata específico para CD 45RA (Pharmingen) diluido 1:100 con suero de conejo al 1% en PBS; o (8) un A $\beta$  monoclonal de rata específico para CD 45RB (Pharmingen) diluido 1:100 con suero de conejo al 1% en PBS; o (9) un A $\beta$  monoclonal de rata específico para CD 45 (Pharmingen) diluido 1:100 con suero de conejo al 1% en PBS; o (10) un A $\beta$  de hámster policlonal biotinilado específico para CD3e (Pharmingen) diluido 1:100 con suero de conejo al 1% en PBS o (11) un mA $\beta$  de rata específico para CD3 (Serotec) diluido 1:200 con suero de conejo al 1% en PBS; o con (12) una solución de PBS que carece de un anticuerpo primario que contiene suero de caballo normal al 1%.

20 Los cortes que se habían hecho reaccionar con las soluciones de anticuerpo enumeradas en 1,2 y 6-12 anteriormente se pretrataron con Triton X-100 al 1,0%, peróxido de hidrógeno al 0,4% en PBS durante 20 min a TA para bloquear la peroxidasa endógena. A continuación se incubaron durante la noche a 4°C con anticuerpo primario. Los cortes que se habían hecho reaccionar con los mA $\beta$  3D6 o 8E5 o CD3e se hicieron reaccionar entonces durante 1 h a TA con un complejo peroxidasa de rábano blanco-avidina-biotina con los componentes del kit "A" y "B" diluidos 1:75 en PBS (kit patrón Vector Elite, Vector Labs, Burlingame, CA.). Los cortes que se habían hecho reaccionar con anticuerpos específicos para CD 45RA, CD 45RB, CD 45, CD3 y la solución de PBS desprovista del anticuerpo primario se incubaron durante 1 hora a TA con IgG anti-rata biotinilada (Vector) diluida 1:75 en PBS o IgG anti-ratón biotinilada (Vector) diluida 1:75 en PBS, respectivamente. Los cortes se hicieron reaccionar entonces durante una h a TA con un complejo peroxidasa de rábano blanco-avidina-biotina con los componentes del kit "A" y "B" diluidos 1:75 en PBS (kit patrón Vector Elite Kit, Vector Labs, Burlingame, CA.).

30 Se desarrollaron los cortes en peróxido de hidrógeno al 0,01%, 3,3'-diaminobencidina (DAB) al 0,05% a TA. Los cortes destinados a la incubación con los anticuerpos específicos frente a GFAP, MAC-1 y CMH II se pretrataron con peróxido de hidrógeno al 0,6% a TA para bloquear la peroxidasa endógena, después se incubaron durante la noche con el anticuerpo primario a 4°C. Los cortes que se habían hecho reaccionar con el anticuerpo frente a GFAP se incubaron durante 1 h a TA con la IgG anti-ratón biotinilada obtenida en caballo (Vector Laboratories; kit de vectastaina Elite ABC) diluida 1:200 con TBS. Entonces se hicieron reaccionar los cortes durante una h con un complejo avidina-biotina-peroxidasa (Vector Laboratories; kit de vectastaina Elite ABC) diluido 1:1000 con TBS. Los cortes incubados con los mA $\beta$  específicos frente a MAC-1 o CMH II, como los anticuerpos primarios, se hicieron reaccionar posteriormente durante 1 h a TA con IgG anti-rata biotinilada obtenida en conejo diluida 1:200 con TBS, seguido por la incubación durante una h con el complejo avidina-biotina-peroxidasa diluido 1:1000 con TBS. Los cortes incubados con anticuerpos específicos frente a GFAP, MAC-1 y CMH II se visualizaron entonces mediante tratamiento a TA con DAB al 0,05%, peróxido de hidrógeno al 0,01%, cloruro de níquel al 0,04%, TBS durante 4 y 11 min, respectivamente.

45 Los cortes marcados inmunológicamente se montaron en portaobjetos de vidrio (VWR, portaobjetos Superfrost), se secaron al aire durante la noche, se sumergieron en Propar (Anatech) y se recubrieron con cubreobjetos usando Permount (Fisher) como medio de montaje.

50 Para contrateñir las placas con A $\beta$ , se montó un subconjunto de los cortes positivos para GFAP en portaobjetos Superfrost y se incubó en tioflavina S acuosa al 1% (Sigma) durante 7 min tras el tratamiento inmunohistoquímico. Entonces se deshidrataron los cortes y se aclararon en Propar, después se recubrieron con cubreobjetos montados con Permount.

#### 8. Análisis de imágenes

55 Se utilizó un sistema de análisis de imágenes Videometric 150 (Oncor, Inc., Gaithersburg, MD) asociado a un microscopio Microphot-FX de Nikon a través de una cámara de vídeo CCD y un monitor Triniton de Sony para la cuantificación de los portaobjetos inmunorreactivos. Se almacenó la imagen del corte en un tampón de vídeo y se determinó un umbral basado en el color y la saturación para seleccionar y calcular el área de píxel total ocupada por las estructuras marcadas inmunológicamente. Para cada corte, se realizó un perfil manual del hipocampo y se calculó el área de píxel total ocupada por el hipocampo. El porcentaje de carga de amiloide se midió como: (la fracción del área del hipocampo que contiene depósitos de A $\beta$  inmunorreactivos con mA $\beta$  3D6) x 100. De manera similar, se midió el porcentaje de carga neurítica como: (la fracción del área del hipocampo que contiene neuritas distróficas reactivas con mA $\beta$  8E5) x100. El sistema C-Imaging (Compix, Inc., Cranberry Township, PA) que opera con el programa de aplicación Simple 32 se asoció con un microscopio Microphot-FX de Nikon a través de una cámara Optronics y se usó para cuantificar el porcentaje de la corteza retrosplenial ocupada por astrocitos positivos para GFAP y microglía positiva para MAC-1 y CMH II. Se almacenó la imagen del corte que había reaccionado



## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende un agente efectivo para inducir una respuesta inmune contra la A $\beta$  en un paciente, para el uso en terapia, en donde el agente es:
- (i) A $\beta$  o un fragmento de la misma, en donde el fragmento está ligado a un portador que ayuda a producir la respuesta inmune y/o la A $\beta$  o un fragmento de la misma es administrada en combinación con un adyuvante que potencia la respuesta inmune;
- 10 (ii) un multímero de (i); o  
(iii) un anticuerpo intacto a A $\beta$ .
2. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 (iii), para el uso de esa reivindicación, en donde la composición comprende un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.
- 15 3. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 (iii), para el uso de esa reivindicación, en donde la composición comprende un anticuerpo humanizado o anticuerpo humano para A $\beta$ , el anticuerpo humanizado o humano teniendo un isotipo IgG1.
- 20 4. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1(i), para el uso de esa reivindicación, en donde un adyuvante se administra antes o después de la composición farmacéutica.
5. la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 (i), para el uso de esa reivindicación, en donde el fragmento de la A $\beta$  comprende al menos 5 aminoácidos contiguos de un péptido de la A $\beta$  natural.
- 25 6. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, para el uso de esa reivindicación, en donde el fragmento de A $\beta$  es A $\beta$ 1-5 o A $\beta$ 1-6.
- 30 7. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1(i), para el uso de esa reivindicación, en donde el fragmento de A $\beta$  está ligado al portador por reticulación química o está expresado como una proteína de fusión con el portador.
- 35 8. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 (i), para el uso de esa reivindicación, en donde el portador es albúmina sérica, hemocianina de lapa californiana, una molécula de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovalbúmina, o un toxoide de una bacteria patógena, opcionalmente en donde la proteína portadora es toxina de difteria atenuada CRM 197, toxoide tetánico, toxoide de difteria, toxoide de *E. coli* o toxoide de *H. pylori*.
9. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 (i), para el uso de esa reivindicación, en donde el adyuvante es alumbre, MPL, QS-21, o adyuvante Incompleto de Freund.
- 40 10. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 (iii), para el uso de esa reivindicación, en donde el anticuerpo enlaza:
- (i) específicamente con la forma agregada del péptido A $\beta$  sin enlazar con la forma disociada;
- 45 (ii) específicamente con la forma disociada del péptido A $\beta$  sin enlazar con la forma agregada; o  
(iii) con tanto las formas agregada como disociada del péptido A $\beta$ .
11. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para el uso de esa reivindicación, en donde:
- 50 (i) el paciente es un humano; y/o  
(ii) la terapia evita o trata una enfermedad asociada con depósitos amiloides de A $\beta$ , opcionalmente enfermedad de Alzheimer, opcionalmente en donde el paciente es menor de 50, y/o tiene factores de riesgo heredados que indican susceptibilidad a la enfermedad de Alzheimer.
- 55 12. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para el uso de esa reivindicación, en donde la composición se administra oralmente, subcutáneamente, intramuscularmente, tópicamente o intravenosamente.
- 60 13. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, para el uso de esa reivindicación, en donde:
- (i) se administra una dosis de más de 10  $\mu$ g de la A $\beta$  o fragmento de la misma, o  
(ii) el anticuerpo se administra en una dosificación de desde alrededor de 0,01 a 5 mg/kg del peso del cuerpo del huésped.
- 65 14. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, para el uso de esa reivindicación, en donde la composición se administra por una primera inmunización seguido por refuerzos a intervalos de 6 semanas, o que se

administra por una primera inmunización seguido por refuerzos a 1, 2 y 12 meses después, o que se administra cada dos meses de por vida.

- 5 15. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 (i), para el uso de esa reivindicación, en donde el agente es A $\beta$  o un fragmento de la misma y la respuesta inmune es una respuesta humoral (mediada por anticuerpos) beneficiosa.

FIGURA 1

TÍTULO DE RATONES PDAPP A LOS QUE SE INYECTÓ  $A\beta_{42}$  AGREGADO A LO LARGO DEL TIEMPO

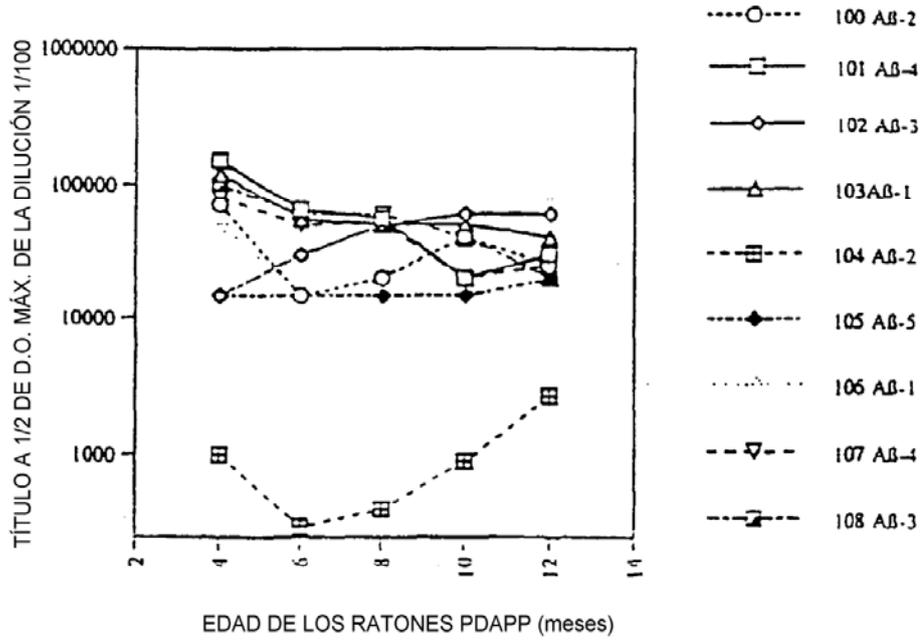


Figura 2  
ESTUDIO 001  
CARGA DE AMILOIDE EN EL HIPOCAMPO

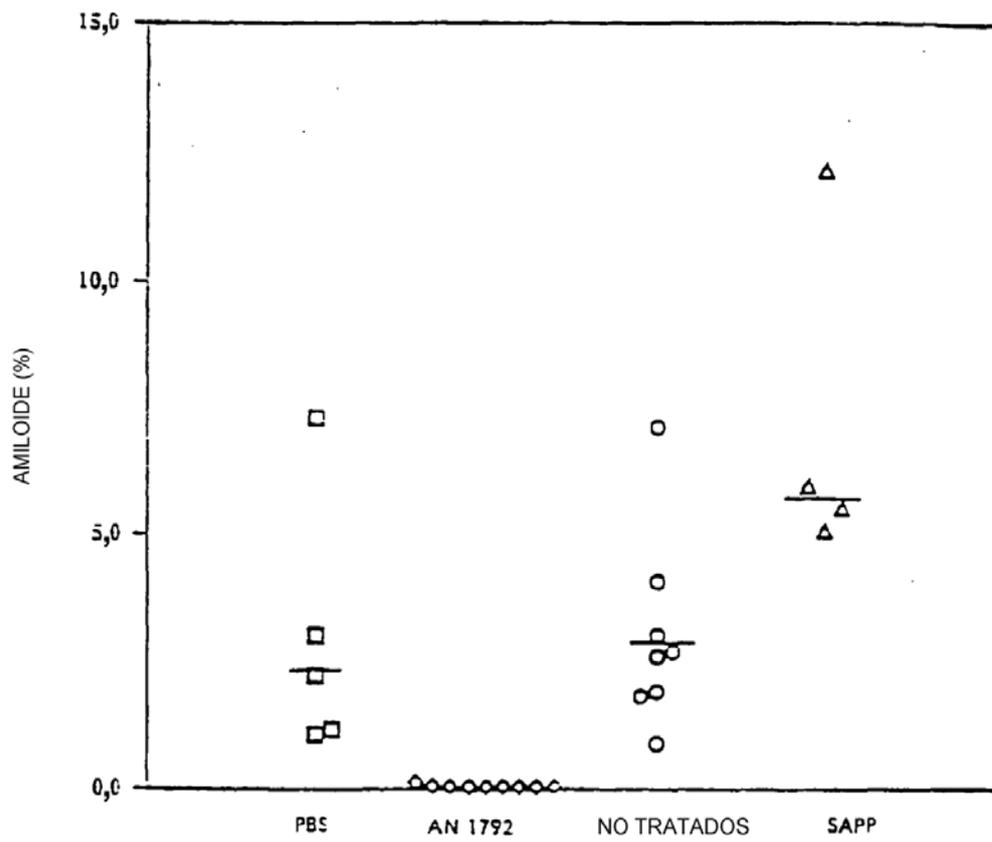


Figura 3  
ESTUDIO 001  
CARGA DE PLACAS NEURÍTICAS EN EL HIPOCAMPO

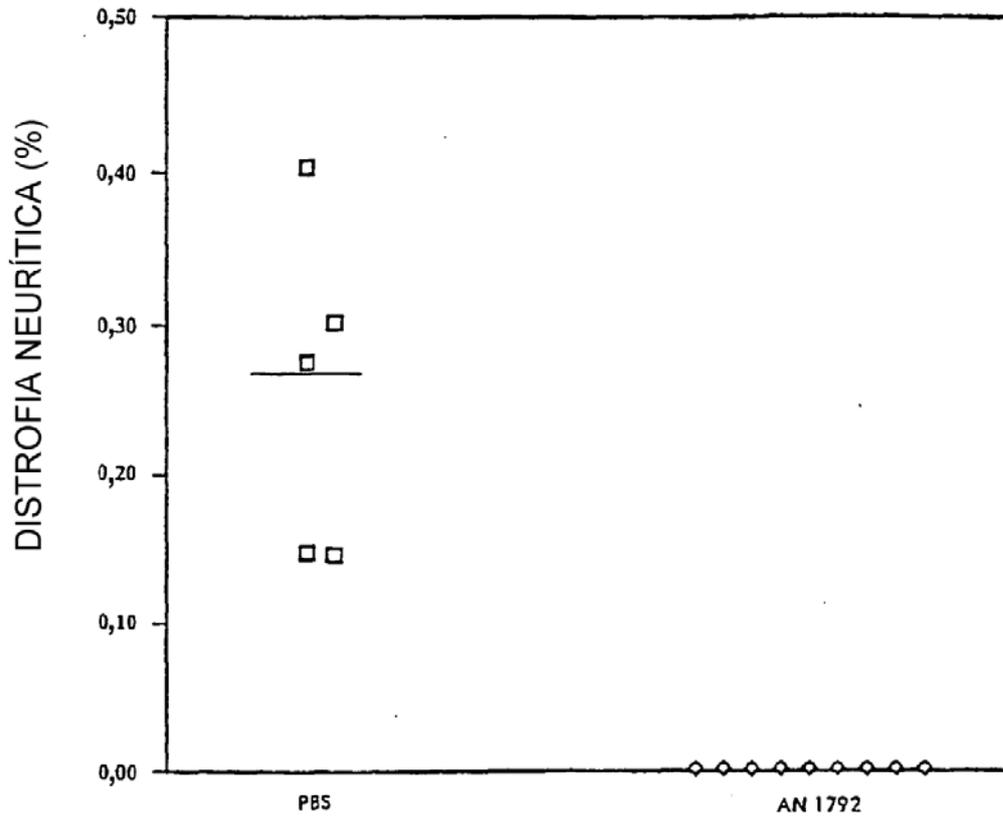


Figura 4

ESTUDIO 001  
ASTROCITOSIS EN LA CORTEZA RETROESPLENIAL

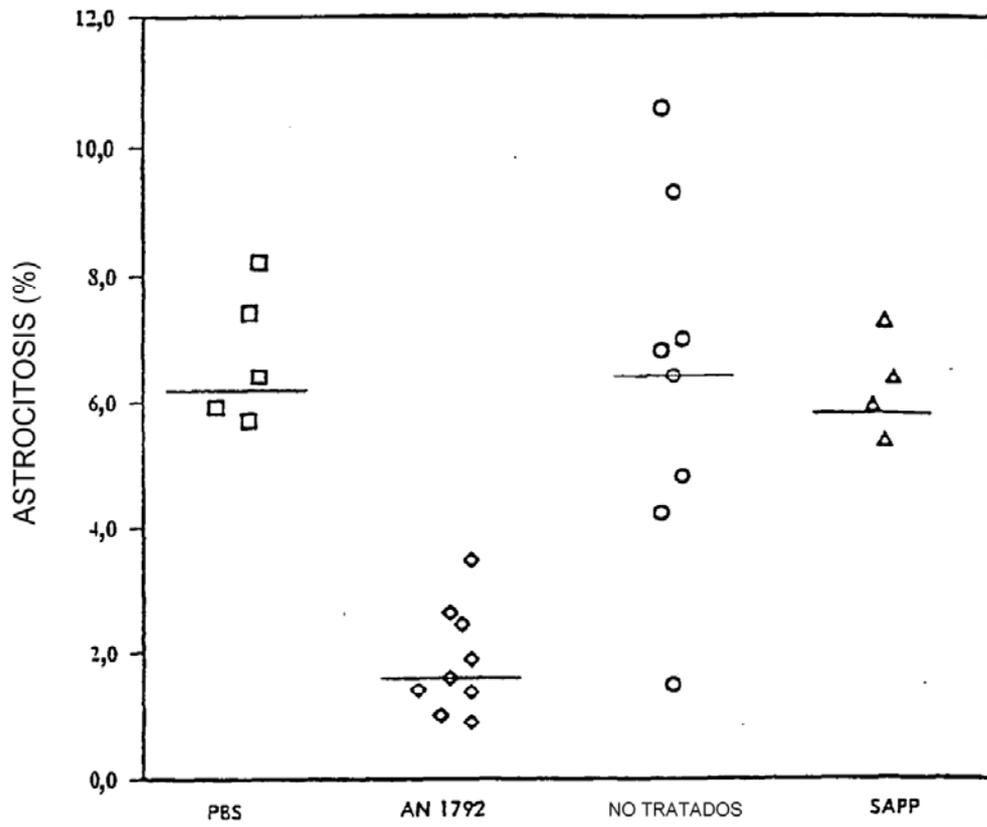


Figura 5

Título de Anticuerpos en Respuesta a Diversas dosis de AN 1792 tras 2, 3 y 4 Inmunizaciones

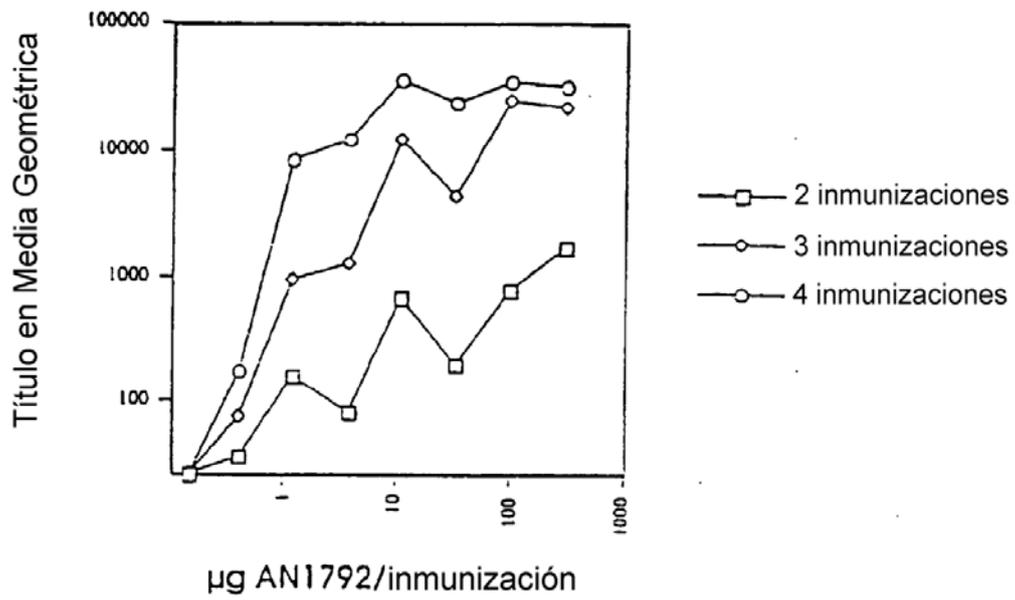


Figura 6

Cinéticas de anticuerpos en respuesta a AN1792

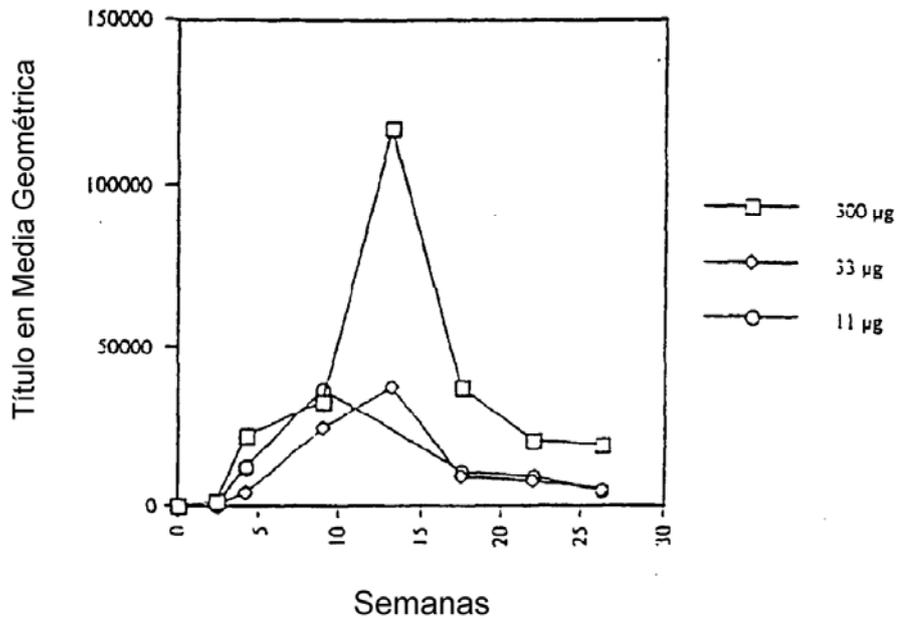


Figura 7

ESTUDIO 002  
CARGA DE AMILOIDE CORTICAL

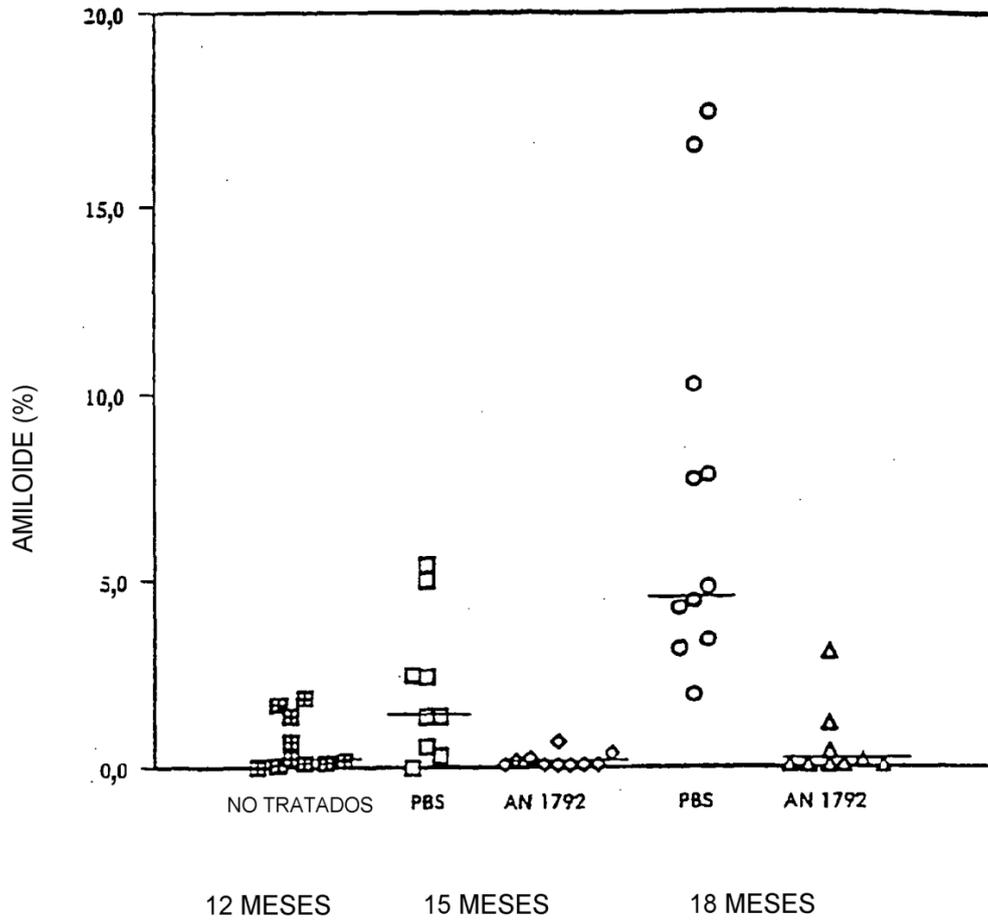


Figura 8  
ESTUDIO 002  
CARGA DE PLACAS NEURÍTICAS CORTICAL

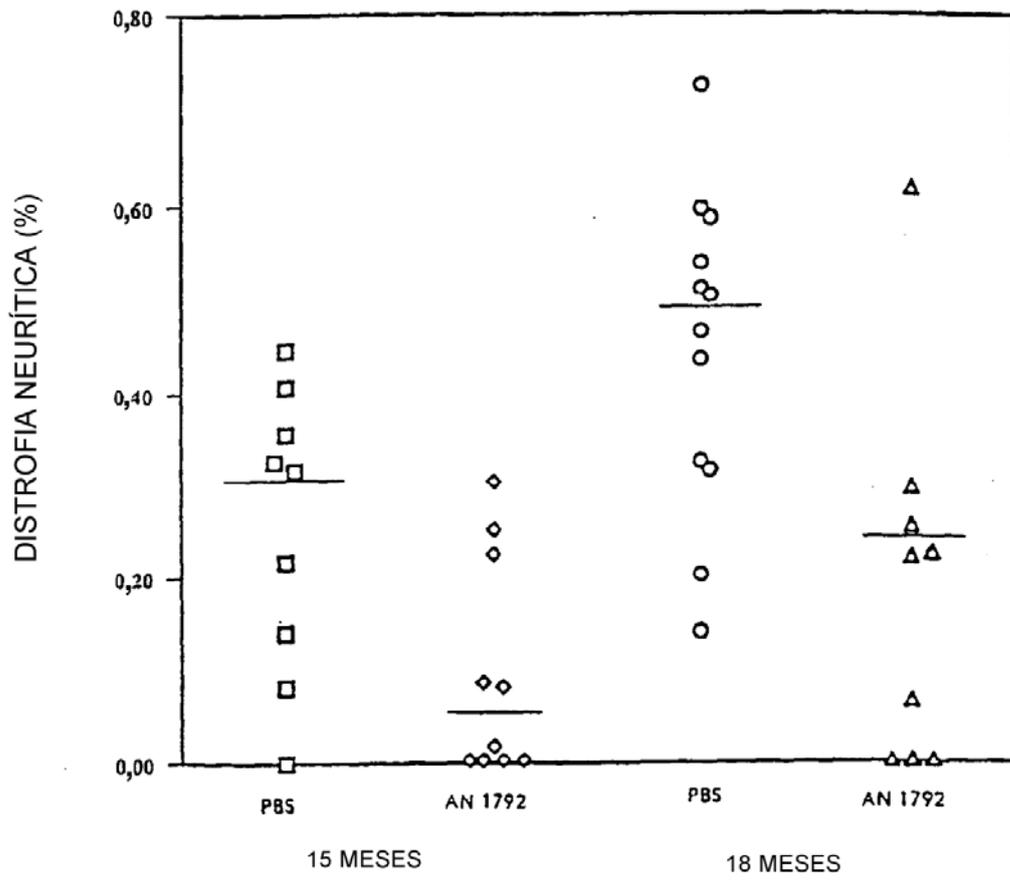


Figura 9

ESTUDIO 002  
ASTROCITOSIS EN LA CORTEZA RETROESPLENIAL

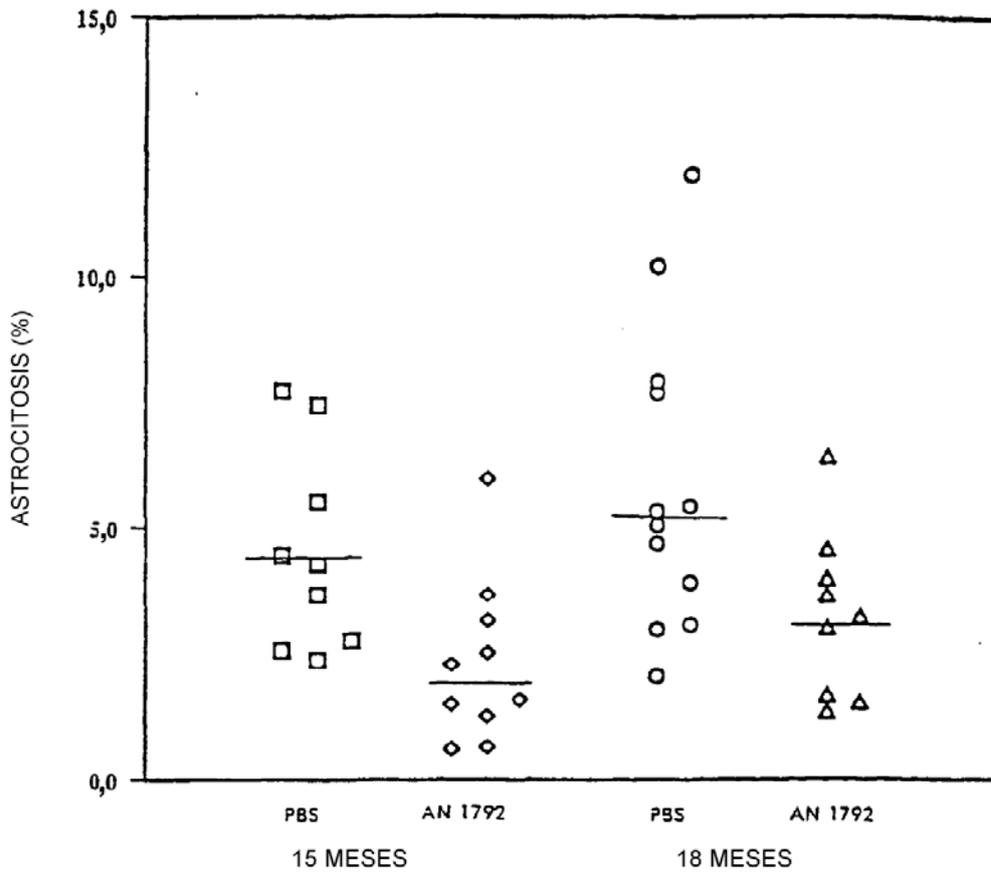


Figura 10

Estudio 002: Ensayo de Proliferación de Esplenocitos

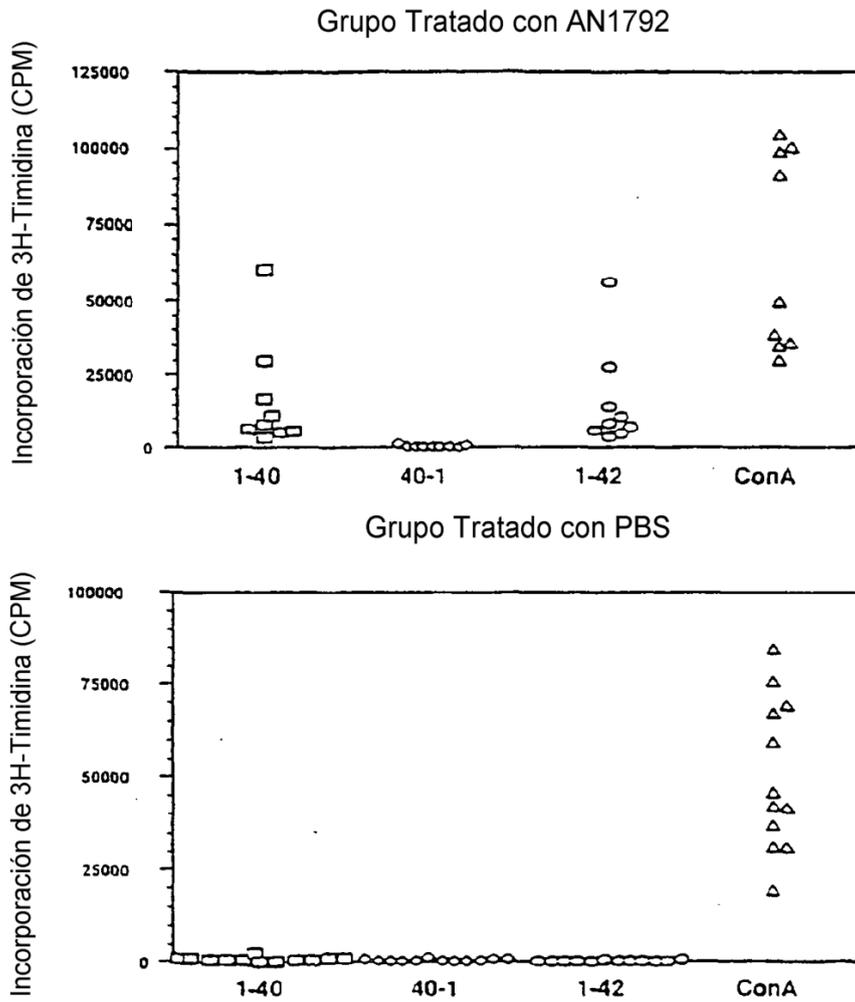


Figura 11

Eficacia terapéutica de los fragmentos de A $\beta$   
datos corticales de A $\beta$  total

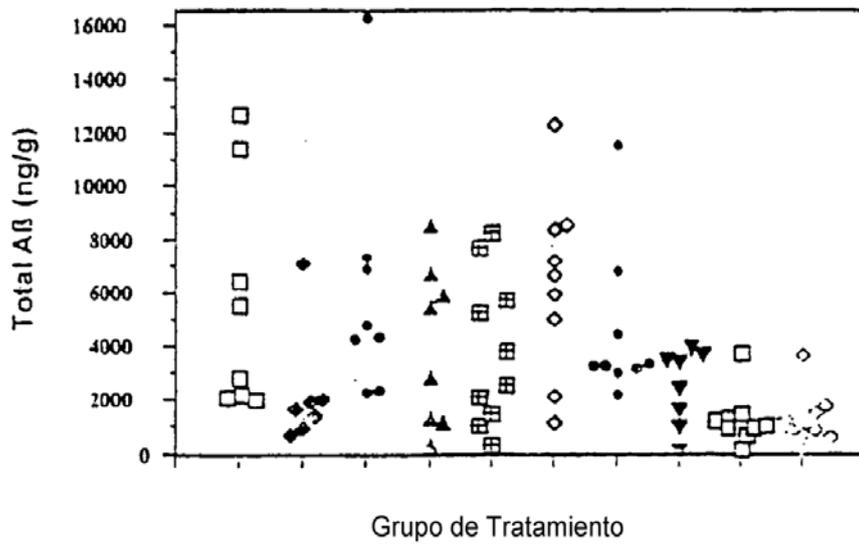




Figura 13

Estudio 006

Títulos de Anticuerpos que se unen a AB1-42

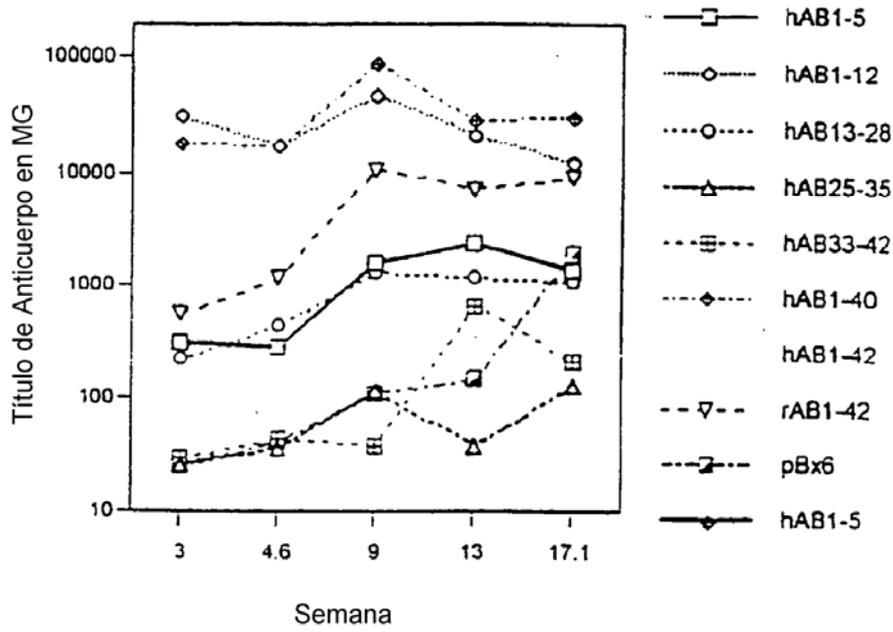
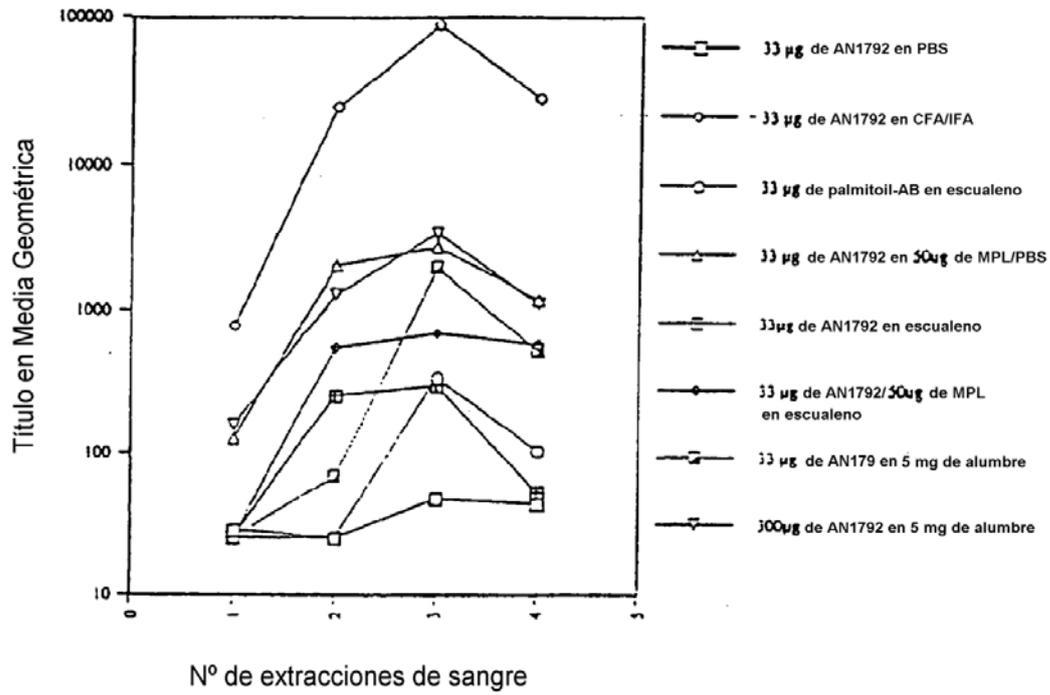


Figura 14

Respuestas de Anticuerpos frente a AN1792 con diferentes adyuvantes



**CORTEZA**

<b>CONTROLES CON PBS</b>		<b>CONTROLES NO TRATADOS</b>	
624-165	272	764-181	3470
625-166	1802	785-182	171
626-167	62	766-183	91
633-168	4696	767-184	6692
634-169	3090	768-185	1353
671-170	2417	771-186	1153
672-171	2840	772-187	3800
829-172	3320	780-188	3740
830-173	1833	843-189	163
831-174	416	844-190	122
792-175	126	845-191	427
793-176	2559	846-192	2674
794-177	289	887-193	453
732-178	179	888-194	2996
733-179	1329	889-195	1075
734-180	5665		
<b>MEDIANA</b>	<b>1817</b>	<b>MEDIANA</b>	<b>1153</b>
<b>VALOR DE p (M-W)</b>		<b>VALOR DE p (M-W)</b>	
<b>MEDIA</b>	<b>1931</b>	<b>MEDIA</b>	<b>1825</b>
<b>DEV. EST.</b>	<b>1718</b>	<b>DEV. EST.</b>	<b>1769</b>
<b>% CV</b>	<b>89</b>	<b>% CV</b>	<b>97</b>
<b>VALOR DE p</b>		<b>VALOR DE p</b>	
<b>(PRUEBA DE LA t)</b>	<b>n=16</b>	<b>(PRUEBA DE LA t)</b>	<b>n=15</b>

**FIG. 15A**

**CORTEZA**

2 mg DE ALUMBRE 100 µg DE AN1528		50 µg DE MPL 100 µg DE AN1528	
660-083	295	643-105	385
661-084	3180	644-106	2640
662-085	2480	645-107	2403
663-086	3014	654-108	1741
664-087	5870	655-109	3053
665-088	5978	656-110	5990
693-089	1620	678-111	3360
694-090	35	679-112	1230
695-091	3400	704-114	2680
697-092	2630	705-115	78
698-093	983	706-116	1290
699-094	5327	729-117	3180
701-095	1862	730-118	1833
702-096	1849	731-119	4590
703-097	2239	736-120	1112
739-098	806	737-121	1653
740-099	5303	757-122	992
741-100	459	758-123	4692
800-103	154	808-124	785
801-104	852	809-125	244
		810-126	32
<b>MEDIANA</b>	2051	<b>MEDIANA</b>	1741
<b>VALOR DE p (M-W)</b>		<b>VALOR DE p (M-W)</b>	
<b>MEDIA</b>	2407	<b>MEDIA</b>	2140
<b>DEV. EST.</b>	1913	<b>DEV. EST.</b>	1659
<b>% CV</b>	79	<b>% CV</b>	78
<b>VALOR DE p</b>		<b>VALOR DE p</b>	
<b>(PRUEBA DE LA t)</b>	n=20	<b>(PRUEBA DE LA t)</b>	n=21

*FIG. 15B*

**CORTEZA**

25 µg DE QS21 100 µg DE AN1528		CEA/IFA 100 µg DE AN1792	
615-128	1257	539-068	693
616-129	361	640-069	508
617-130	1008	641-070	440
536-131	3290	642-071	467
637-132	2520	690-072	42
638-133	3880	691-073	2491
744-134	627	692-074	121
745-135	58	795-075	137
746-136	2610	796-076	822
747-137	1509	797-077	475
769-138	1788	748-087	600
770-139	988	749-079	78
773-140	1199	750-080	1267
774-141	339	751-081	1351
775-142	402	761-082	69
776-143	537		
840-144	1119		
841-145	194		
821-146	1259		
822-147	5413		
823-148	2233		
<b>MEDIANA</b>	<b>1199</b>	<b>MEDIANA</b>	<b>475</b>
<b>VALOR DE p (M-W)</b>		<b>VALOR DE p (M-W)</b>	<b>0,0481</b>
<b>MEDIA</b>	<b>1552</b>	<b>MEDIA</b>	<b>637</b>
<b>DEV. EST.</b>	<b>1364</b>	<b>DEV. EST.</b>	<b>655</b>
<b>% CV</b>	<b>88</b>	<b>% CV</b>	<b>103</b>
<b>VALOR DE p</b>		<b>VALOR DE p</b>	<b>0,0106</b>
<b>(PRUEBA DE LA t)</b>	<b>n=21</b>	<b>(PRUEBA DE LA t)</b>	<b>n=15</b>

FIG. 15C

**CORTEZA**

5 µg DE TÍMEROSAL/PBS 10 µg DE AN1792		2 µg DE ALUMBRE 100 µg DE AN1792	
635-149	1337	610-001	432
669-150	4644	611-002	1012
670-151	6335	612-003	3607
673-152	3700	613-004	508
674-153	2750	620-005	465
676-154	1687	621-006	16
681-156	185	622-007	28
682-157	8031	623-008	217
683-158	3450	708-009	2738
754-159	157	709-010	927
755-160	6857	710-011	1609
756-161	482	716-012	1608
805-162	524	784-014	3890
806-163	397	785-015	1614
807-164	234	786-018	285
		787-017	3102
		788-018	1617
		789-019	1474
		815-020	424
		816-021	1375
		817-022	2323
<b>MEDIANA</b>	<b>1687</b>	<b>MEDIANA</b>	<b>1375</b>
<b>VALOR DE p (M-W)</b>		<b>VALOR DE p (M-W)</b>	<b>0,5000</b>
<b>MEDIA</b>	<b>2718</b>	<b>MEDIA</b>	<b>1394</b>
<b>DEV. EST.</b>	<b>2685</b>	<b>DEV. EST.</b>	<b>1166</b>
<b>% CV</b>	<b>99</b>	<b>% CV</b>	<b>84</b>
<b>VALOR DE p</b>		<b>VALOR DE p</b>	<b>0,2650</b>
<b>(PRUEBA DE LA t)</b>	<b>n=15</b>	<b>(PRUEBA DE LA t)</b>	<b>n=21</b>

*FIG. 15D*

**CORTEZA**

50 µg DE MPL 100 µg DE AN1792		25 µg DE QS21 100 µg DE AN1792	
646-023	2002	627-045	91
647-024	147	628-046	3397
648-025	1304	631-049	3702
649-026	34	632-050	1776
650-027	980	667-052	1832
651-028	1282	668-053	3023
726-030	1966	686-054	189
727-031	733	687-055	891
720-032	2563	688-056	240
721-033	5563	689-057	110
802-034	113	712-059	3311
803-035	671	825-061	1009
804-036	51	826-082	18165
811-037	613	827-063	73
812-038	332	828-064	78
813-039	1454	837-065	1051
814-040	2441	838-066	270
833-014	742	839-067	371
834-042	40		
836-044	807		
<b>MEDIANA</b>	<b>774</b>	<b>MEDIANA</b>	<b>950</b>
<b>VALOR DE p (M-W)</b>	<b>0, 1710</b>	<b>VALOR DE p (M-W)</b>	<b>0,4076</b>
<b>MEDIA</b>	<b>1192</b>	<b>MEDIA</b>	<b>2199</b>
<b>DEV. EST.</b>	<b>1299</b>	<b>DEV. EST.</b>	<b>4187</b>
<b>% CV</b>	<b>109</b>	<b>% CV</b>	<b>190</b>
<b>VALOR DE p</b>	<b>0,1506</b>	<b>VALOR DE p</b>	<b>0,8131</b>
<b>(PRUEBA DE LA t)</b>	<b>n=21</b>	<b>(PRUEBA DE LA t)</b>	<b>n=18</b>

**FIG. 15E**