

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 765**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/18** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.01.2004 E 04707166 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2015 EP 1594969**

54 Título: **Inmunización activa para generar anticuerpos para A-beta soluble**

30 Prioridad:

**01.02.2003 US 444150 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**15.09.2015**

73 Titular/es:

**JANSSEN SCIENCES IRELAND UC (50.0%)**  
**Eastgate Village, Eastgate**  
**Little Island, County Cork, IE y**  
**WYETH LLC (50.0%)**

72 Inventor/es:

**YEDNOCK, TED;**  
**VASQUEZ, NICKI;**  
**SEUBERT, PETER A. y**  
**BARD, FREDERIQUE**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 545 765 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

**Inmunización activa para generar anticuerpos para A-beta soluble**

## 5 CAMPO TÉCNICO

La invención se encuentra en los campos técnicos de la inmunología y la medicina.

## 10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad progresiva que produce demencia senil. Véase 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). Hablando  
15 ampliamente, la enfermedad se clasifica en dos categorías: aparición tardía, que se produce en la vejez (65 + años) y aparición temprana, que se desarrolla mucho antes del periodo senil, es decir, entre los 35 y los 60 años. En ambos tipos de enfermedad, la patología es la misma, pero las anomalías tienden a ser más graves y extendidas en casos que empiezan en la edad más temprana. La enfermedad se caracteriza por al menos dos tipos de lesiones en el cerebro, placas seniles y ovillos neurofibrilares. Las placas seniles son áreas de neuropilo desorganizado de hasta 150  $\mu\text{m}$  a través de los depósitos de amiloide extracelulares en el centro visibles por análisis microscópico de  
20 secciones de tejido cerebral. Los ovillos neurofibrilares son depósitos intracelulares de microtúbulos asociados a proteína tau que consisten en dos filamentos enrollados el uno sobre el otro en pares.

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

35 La inmunización de modelos de ratón transgénico de EA con inmunógenos derivados de péptido  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ ) produce una respuesta de anticuerpos que inhibe la formación y/o placas de amiloide claras en cerebros de los ratones (Schenk et al., (1999) Nature 400, 173-177; Janus et al., (2000) Nature 408, 979-982, Morgan et al. (2000) Nature 408, 982-985, Sigurdsson et al., (2001) Am. J. Pathol. 159, 439-447,1-4)). Los anticuerpos para A $\beta$   
40 pasivamente administrados han logrado efectos similares. Se ha propuesto la fagocitosis dependiente de Fc mediada por anticuerpos por células de la microglía y/o macrófagos como un mecanismo para la eliminación de placas de amiloide existentes (Bard et al., (2000) Nat. Med., 6, 916-919)). Esta propuesta se basa en el resultado de que ciertos anticuerpos periféricamente administrados contra A $\beta$  entran en el SNC de ratones transgénicos, decoran  
45 placas de amiloide e inducen la eliminación de placas. Por tanto, se ha informado de una fuerte correlación entre anticuerpos que fueron eficaces *in vivo* y en un ensayo *ex vivo* usando secciones de PDAPP o cerebro con enfermedad de Alzheimer (EA) para medir la actividad de eliminación de placas. Los receptores de Fc sobre las células de la microglía efectuaron la respuesta de eliminación en el ensayo *ex vivo*. Sin embargo, también se ha informado de que la eficacia de anticuerpos también puede obtenerse *in vivo* por mecanismos que son independientes de interacciones de Fc (Bacskai et al., (2002) J. Neurosci., 22, 7873-7878). Se informó que un anticuerpo dirigido contra la porción media de A $\beta$ , que no puede reconocer las placas de amiloide, se unía a A $\beta$   
50 soluble y reducía la deposición de placas (DeMattos et al., (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 8850-8855). También se ha informado del tratamiento a corto plazo con este anticuerpo para mejorar el rendimiento en una tarea de reconocimiento de objetos sin afectar la carga de amiloide (Dodart et al., (2002) Nat. Neurosci., 5, 452-457). Pallitto et al. (Biochemistry. 1999 Mar 23;38(12):3570-8) describe una estrategia modular para generar compuestos que inhiben la toxicidad de A $\beta$ , basada en enlazar un elemento de reconocimiento para A $\beta$  a un elemento de  
55 alteración diseñado para interferir con la agregación de A $\beta$ . El documento WO-A-02/096937 describe una vacuna 'no de auto' antigénica basada en estereoquímica para la prevención y/o tratamiento de Alzheimer y otras enfermedades relacionadas con amiloide. El documento US 2002/0162129 A1 describe el uso de una protofibrilla mutante o compuesto(s) con protofibrilla que forman actividad para la inmunización activa con el fin de tratar o prevenir EA. El documento US 2002/0094335 A1 desvela una vacuna "no de auto" antigénica basada en estereoquímica para la  
60 prevención y/o tratamiento de Alzheimer y otras enfermedades relacionadas con amiloide. Lemere, C.A. et al., (Neurobiology of aging. 2002 Nov/Dec 23(6) 991-1000) describe un protocolo de vacuna con A-beta en modelos de ratón con EA con la esperanza de que mayores títulos de anticuerpos para A-beta puedan ser más eficaces en reducir niveles de A-beta cerebrales.

65 La presente solicitud está relacionada con el documento WO 00/72880 presentado el 26 de mayo de 2000,

documento WO 99/27944 presentado el 30 de noviembre de 1998, solicitud de EE.UU. n° 60/067.740 presentada el 2 de diciembre de 1997, solicitud de EE.UU. n° 60/080.970 presentada el 7 de abril de 1998 y solicitud de EE.UU. n° 09/201.430 presentada el 30 de noviembre de 1998.

## 5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Fig. 1A-C. Anticuerpos producidos por inmunización con fragmentos del extremo N de A $\beta$  se unen a placas amiloides. Fig. 1A. Se usaron péptidos que engloban diversos dominios de A $\beta$ 1-42 (SEC ID N°: 1) (sintetizados contiguos al epítipo de linfocitos T derivado de ovoalbúmina) para inmunizar ratones PDAPP. Se usó un reversémero, A $\beta$ 5-1 (SEC ID N°: 2), como control negativo. Fig. 1B. Títulos de ELISA contra A $\beta$ 1-42 agregada fueron significativamente mayores a lo largo de la duración del estudio en los grupos A $\beta$ 5-11 y A $\beta$ 15-24 que en el grupo A $\beta$ 1-5 (1:14,457, p<0,01 y 1:12,257, p<0,05 frente a 1:3,647, respectivamente; ANOVA seguido de prueba de Tukey a posteriori). Fig. 1C. Se expusieron secciones de criostato sin fijar de cerebro de ratón PDAPP sin tratar a los sueros de ratones inmunizados con A $\beta$ 5-1, A $\beta$ 3-9, A $\beta$ 5-11 o A $\beta$ 15-24 (títulos normalizados a 1:1000 para tinción). Los anticuerpos para A $\beta$ 15-24 no se unieron a placas amiloides. La barra de escala representa 500  $\mu$ m.

Figs. 2A-C. La captura de A $\beta$ 1-42 soluble por anticuerpos no está asociada a carga de amiloide reducida o patología neurítica. Fig. 2A. Se examinaron sueros de ratones inmunizados con fragmentos de A $\beta$  para su capacidad para capturar A $\beta$ 1-42 soluble radiomarcado en un radioinmunoensayo. Sueros de todos los animales inmunizados con A $\beta$ 15-24 fueron capaces de capturar A $\beta$ 1-42 soluble (una muestra de suero tuvo un título superior a 1:1,350 y no se determinó un título preciso), en comparación con el 27 % de aquellos en el grupo A $\beta$ 1-5 y el 3 % del grupo A $\beta$ 3-9. Figs. 2B-C. Se evaluaron la carga de amiloide (Fig. 2B) y la patología neurítica (Fig. 2C) con análisis de imágenes por un microscopista cegado. Los valores se expresan como un porcentaje de la media del grupo de A $\beta$ 5-1 (péptido reversémero de control negativo). El grupo de A $\beta$ 5-11 se evaluó en un turno separado de los otros grupos, pero conjuntamente con el mismo grupo de control negativo que una referencia interna (segundo conjunto de reversémeros de A $\beta$ 5-1, a la izquierda). La carga de amiloide fue significativamente reducida en los grupos de A $\beta$ 1-5, A $\beta$ 3-9 y A $\beta$ 5-11 (p<0,001). Las barras representan valores medios y la línea horizontal discontinua indica el nivel de control. La carga neurítica fue significativamente reducida en los grupos de A $\beta$ 3-9 y A $\beta$ 5-11 (p<0,05). Ningún punto final estuvo significativamente alterado por inmunización con el grupo de A $\beta$ 15-24. Se realizó análisis estadístico con transformación por raíz cuadrada (para normalizar distribuciones no paramétricas) y se analizó con ANOVA. Entonces se usó una prueba de Dunnett para comparar los múltiples grupos los grupos de A $\beta$ 1-5, A $\beta$ 3-9, A $\beta$ 15-24 con su control de A $\beta$ 5-1, y Mann-Whitney para el grupo de A $\beta$ 5-11 con su control de reversémero de A $\beta$ 5-1 correspondiente.

## 35 DESCRIPCIÓN DETALLADA

### I. General

La invención proporciona un medicamento que comprende un fragmento de A $\beta$  que consiste en A $\beta$ 16-23 (KLVFFAED) en la forma de aminoácido humano natural, en el que el fragmento está ligado a una molécula portadora para formar un conjugado que ayuda a provocar una respuesta inmunitaria contra el fragmento, para efectuar la profilaxis o tratamiento de una enfermedad asociada a depósitos de amiloide de A $\beta$  en el cerebro de un paciente, por lo que los anticuerpos inducidos se unen específicamente a A $\beta$  soluble en el paciente, inhibiendo así la formación de depósitos de amiloide de A $\beta$  en el cerebro de A $\beta$  soluble y efectuando así el tratamiento o la profilaxis de la enfermedad.

### II. DEFINICIONES

Para los fines de clasificar sustituciones de aminoácidos como conservativas o no conservativas, los aminoácidos se agrupan del siguiente modo: 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. Sustituciones conservativas implican sustituciones entre aminoácidos en la misma clase. Sustituciones no conservativas constituyen intercambiar un miembro de una de estas clases por un miembro de otra.

El término "todos D" se refiere a péptidos que tienen  $\geq 75\%$ ,  $\geq 80\%$ ,  $\geq 85\%$ ,  $\geq 90\%$ ,  $\geq 95\%$  y  $100\%$  de aminoácidos de configuración D.

El término "agente" se usa para describir un compuesto que tiene o puede tener una actividad farmacológica. Los agentes incluyen compuestos que son fármacos conocidos, compuestos para los que la actividad farmacológica se ha identificado, pero que están sometidos a evaluación terapéutica adicional, y compuestos que son miembros de colecciones y bibliotecas que van a cribarse para una actividad farmacológica.

Los agentes terapéuticos desvelados en el presente documento están normalmente sustancialmente puros de contaminante no deseado. Mediante cualquier medio un agente normalmente tiene al menos aproximadamente el 50

% en peso/peso (p/p) de pureza, además de estar sustancialmente libre de proteínas interferentes y contaminantes. Algunas veces, los agentes tienen al menos aproximadamente el 80 % en peso/peso y, más preferentemente al menos el 90 o aproximadamente el 95 % en peso/peso de pureza. Sin embargo, usando técnicas de purificación de proteínas convencionales, pueden obtenerse péptidos homogéneos de al menos el 99 % en peso/peso. Los agentes terapéuticos desvelados en el presente documento pueden prevenir, efectuar la profilaxis o tratar una enfermedad asociada a depósitos de amiloide.

La unión específica entre dos entidades significa que las entidades tienen una afinidad mutua entre sí que es al menos 10, 100 ó 100 veces superior a la afinidad de cualquier entidad para un control, tal como antígeno sin relacionar o anticuerpo para un antígeno diferente. La afinidad mutua de las dos entidades entre sí es normalmente al menos  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  M<sup>-1</sup> o  $10^{10}$  M<sup>-1</sup>. Se prefieren afinidades superiores a  $10^8$  M<sup>-1</sup>. La unión específica de un anticuerpo policlonal a un epítipo dentro de A $\beta$  significa que los anticuerpos en la población de anticuerpos policlonales se unen específicamente a un epítipo de A $\beta$  sin unirse a otros epítipos de A $\beta$ .

El término "anticuerpo" o "inmunoglobulina" se usa para incluir anticuerpos intactos y fragmentos de unión de los mismos. Normalmente, los fragmentos compiten con el anticuerpo intacto del que se derivaron para la unión específica a un fragmento de antígeno que incluye cadenas pesadas separadas, cadenas ligeras, Fab, Fab' F(ab')<sub>2</sub>, Fabc y Fv. Los fragmentos se producen por técnicas de ADN recombinante, o por separación enzimática o química de inmunoglobulinas intactas. El término "anticuerpo" también incluye una o más cadenas de inmunoglobulina que están químicamente conjugadas con, o se expresan como, proteínas de fusión con otras proteínas. El término "anticuerpo" también incluye anticuerpo biespecífico. Un anticuerpo biespecífico o bifuncional es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadenas pesadas / ligeras diferentes y dos sitios de unión diferentes. Pueden producirse anticuerpos biespecíficos mediante una variedad de métodos que incluyen fusión de hibridomas o enlace de fragmentos de Fab'. Véase, por ejemplo, Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992).

A $\beta$ , también conocido como péptido amiloide  $\beta$ , o péptido A4 (véase 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 $\beta$  tienen varias formas que se producen naturalmente. Las formas humanas naturales de A $\beta$  se denominan A $\beta$ 39, A $\beta$ 40, A $\beta$ 41, A $\beta$ 42 y A $\beta$ 43. Las secuencias de estos péptidos y su relación con el precursor de APP se ilustran por la Fig. 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 (SEC ID NO:1).

A $\beta$ 41, A $\beta$ 40 y A $\beta$ 39 se diferencian de A $\beta$ 42 por la omisión de Ala, Ala-Ile y Ala-Ile-Val, respectivamente, del extremo C. A $\beta$ 43 se diferencia de A $\beta$ 42 por la presencia de un residuo de treonina en el extremo C.

APP<sup>695</sup>, APP<sup>751</sup> y APP<sup>770</sup> se refieren, respectivamente, a los polipéptidos de 695, 751 y 770 residuos de aminoácidos de longitud codificados por el gen APP humano. 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 asignan números según la secuencia de la isoforma de APP770. Términos tales como A $\beta$ 39, A $\beta$ 40, A $\beta$ 41, A $\beta$ 42 y A $\beta$ 43 se refieren a un péptido A $\beta$  que contiene los residuos de aminoácidos 1-39, 1-40, 1-41, 1-42 y 1-43, respectivamente.

A $\beta$  desagregado o fragmentos del mismo significa unidades de péptidos monoméricos. A $\beta$  desagregado o fragmentos del mismo son generalmente solubles, y pueden auto-agregarse para formar oligómeros solubles. Los oligómeros de A $\beta$  y fragmentos de los mismos son normalmente solubles y existen predominantemente como hélices alfa o bobinas al azar. Un método para preparar A $\beta$  monomérico es disolver péptido liofilizado en DMSO puro con sonicación. La disolución resultante se centrifuga para eliminar cualquier partícula insoluble. A $\beta$  agregado o fragmentos del mismo significa oligómeros de A $\beta$  o fragmentos inmunogénicos del mismo en los que las unidades monoméricas se mantienen juntas por enlaces no covalentes y se asocian en ensamblajes de hoja beta insolubles. A $\beta$  agregado o fragmentos del mismo también significa polímeros fibrilares. Las fibrillas son normalmente insolubles. Algunos anticuerpos se unen tanto a A $\beta$  soluble como a fragmentos del mismo o A $\beta$  agregado o fragmentos del mismo. Algunos anticuerpos se unen tanto a A $\beta$  soluble como a fragmentos del mismo y A $\beta$  agregado o fragmentos del mismo. Algunos anticuerpos se unen a A $\beta$  soluble sin unirse a placa.

Un "antígeno" es una entidad a la que un anticuerpo se une específicamente.

El término "epítope" o "determinante antigénico" se refiere a un sitio sobre un antígeno al que responden los linfocitos B y/o T. Pueden formarse epítopes de linfocitos B tanto a partir de aminoácidos contiguos como aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una proteína. Los epítopes formados a partir de aminoácidos contiguos normalmente son retenidos tras la exposición a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítopes formados por plegamiento terciario normalmente se pierden tras el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítope normalmente incluye al menos 3, y más normalmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Métodos de determinación de la conformación espacial de epítopes incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, Epítope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996). Los anticuerpos que reconocen el mismo epítope pueden identificarse en un simple inmunoensayo que muestra la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana. Los linfocitos T reconocen epítopes continuos de aproximadamente nueve aminoácidos para células CD8 o aproximadamente 13-15 aminoácidos para células CD4. Los linfocitos T que reconocen el epítope pueden identificarse por ensayos *in vitro* que miden la proliferación dependiente de antígeno, como se ha determinado por la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina por linfocitos T sensibilizados en respuesta a un epítope (Burke et al., J. Inf. Dis., 170, 1110-19 (1994)), por destrucción dependiente de antígeno (ensayo de linfocitos T citotóxicos, Tigges et al., J. Immunol., 156, 3901-3910) o por secreción de citocinas.

Un epítope del extremo N de Aβ significa un epítope con los residuos 1-11. Un epítope dentro de una región del extremo C significa un epítope dentro de los residuos 29-43, y un epítope dentro de una región central significa un epítope con los residuos 12-28.

El término respuesta "inmunológica" o "inmunitaria" es el desarrollo de una respuesta humoral (mediada por anticuerpo) y/o celular (mediada por linfocitos T específicos de antígeno o sus productos de secreción) beneficiosa dirigida contra un péptido amiloide en un paciente receptor. Una respuesta tal puede ser una respuesta activa inducida por la administración de inmunogén o una respuesta pasiva inducida por la administración de anticuerpo o linfocitos T sensibilizados. Una respuesta inmunitaria celular se provoca por la presentación de epítopes de polipéptido en asociación con moléculas del MHC de clase I o clase II para activar linfocitos T CD4<sup>+</sup> colaboradores y/o linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> específicos de antígeno. 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 célula puede determinarse por ensayos de proliferación (linfocitos T CD4<sup>+</sup>) o ensayos de CTL (linfocitos T citotóxicos) (véase Burke, arriba; Tigges, arriba). Las contribuciones relativas de respuestas humorales y celulares al efecto protector o terapéutico de un inmunogén pueden distinguirse aislando por separado anticuerpos y linfocitos T de un animal singénico inmunizado y midiendo el efecto protector o terapéutico en un segundo sujeto.

Un "agente inmunogénico" o "inmunogén" puede inducir una respuesta inmunológica contra sí mismo tras la administración a un mamífero, opcionalmente conjuntamente con un adyuvante.

El término "polinucleótido desnudo" se refiere a un polinucleótido no complejo con materiales coloidales. Los polinucleótidos desnudos se clonan algunas veces en un vector plasmídico.

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

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

La competición entre anticuerpos se determina por un ensayo en el que la inmunoglobulina de prueba inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común, tal como Aβ. Se conocen numerosos tipos de ensayos de unión competitiva, por ejemplo: radioinmunoensayo directo o indirecto (RIA) en fase sólida, enzimoimmunoensayo directo o indirecto (EIA) en fase sólida, ensayo de competición de sándwich (véase Stahl et al., Methods in Enzymology, 9:242-253 (1983)); EIA directo de biotina-avidina en fase sólida (véase Kirkland et al., J. Immunol. 137:3614-3619 (1986)); ensayo de marcado directo en fase sólida, ensayo de sándwich de marcado directo en fase sólida (véase Harlow y Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press (1988)); RIA de marca directa en fase sólida usando marca de I-125 (véase Morel et al., Molec. Immunol. 25(1):7-15 (1988)); EIA directo de biotina-avidina en fase sólida (Cheung et al., Virology, 176:546-552 (1990)); y RIA de marcado directo (Moldenhauer et al., Scand. J. Immunol., 32:77-82 (1990)). Normalmente, un ensayo tal implica el uso de antígeno purificado unido a una superficie sólida o células que llevan cualquiera de estos, una inmunoglobulina de prueba sin marcar y una inmunoglobulina de referencia marcada. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de marca unida a la superficie sólida o células en presencia de la inmunoglobulina de prueba. Normalmente, la inmunoglobulina de prueba está presente en exceso. Anticuerpos identificados por el ensayo de competición (anticuerpos de competición) incluyen anticuerpos que se unen al mismo epítope que el anticuerpo de referencia y anticuerpos que se unen a un epítope adyacente suficientemente proximal al epítope unido por el anticuerpo de

referencia para que se produzca impedimento estérico. Normalmente, cuando un anticuerpo de competencia está presente en exceso, inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común al menos el 50 o el 75 %.

5 Un anticuerpo que se une específicamente a A $\beta$  soluble significa un anticuerpo que se une a A $\beta$  soluble con una afinidad de al menos  $10^7 \text{ M}^{-1}$ . Algunos anticuerpos se unen a A $\beta$  soluble con afinidades entre  $10^8 \text{ M}^{-1}$  y  $10^{11} \text{ M}^{-1}$ .

10 Un anticuerpo que se une específicamente a A $\beta$  soluble sin unirse específicamente a placas significa un anticuerpo que se une a A $\beta$  soluble como se ha descrito anteriormente y tiene una afinidad de unión específica al menos diez veces y normalmente al menos 100 veces inferior por placas (es decir, A $\beta$  en forma de hoja plegada  $\beta$  agregada) de un cadáver de un antiguo paciente con Alzheimer o un modelo de animal transgénico. Por ejemplo, un anticuerpo tal podría unirse a A $\beta$  soluble con una afinidad de  $10^9 \text{ M}^{-1}$  y a placas con una afinidad inferior a  $10^7 \text{ M}^{-1}$ . La afinidad de tales anticuerpos por las placas es normalmente inferior a  $10^7$  ó  $10^6 \text{ M}^{-1}$ . Tales anticuerpos se definen adicionalmente o alternativamente por la intensidad de fluorescencia con respecto a un anticuerpo de control irrelevante (por ejemplo, un anticuerpo o mezcla de anticuerpos policlonales para un péptido A $\beta$  reversémero) cuando los anticuerpos se ponen en contacto con placas y la unión se evalúa por marcado fluorescente (como se describe en la sección de ejemplos). La intensidad de fluorescencia de anticuerpos que se unen al péptido A $\beta$  soluble sin unirse a placas está dentro de un factor de cinco, algunas veces dentro de un factor de dos y algunas veces es indistinguible dentro del error experimental de aquel del anticuerpo de control.

15 Composiciones o métodos "que comprenden" uno o más elementos citados pueden incluir otros elementos no específicamente citados. Por ejemplo, una composición que comprende péptido A $\beta$  engloba tanto un péptido A $\beta$  aislado como el péptido A $\beta$  como componente de una secuencia de polipéptidos mayor.

20 III. Péptidos A $\beta$  para inmunización activa

Los péptidos A $\beta$  para su uso en los métodos de la divulgación son péptidos inmunogénicos que tras la administración a un paciente humano o animal generan anticuerpos que se unen específicamente a uno o más epítopes entre los residuos 12 y 43 de A $\beta$  sin generar anticuerpos que se unen específicamente a uno o más epítopes dentro de los residuos 1-11 de A $\beta$ . Los anticuerpos que se unen específicamente a epítopes entre los residuos 12 y 43 se unen específicamente a A $\beta$  soluble sin unirse a placas de A $\beta$ . Estos tipos de anticuerpo pueden unirse específicamente a A $\beta$  soluble en la circulación de un paciente o amiloide modelo sin unirse específicamente a placas de depósitos de A $\beta$  en el cerebro del paciente o modelo. La unión específica de anticuerpos a A $\beta$  soluble inhibe que A $\beta$  se incorpore en placas, inhibiendo así tanto el desarrollo de las placas en un paciente como inhibiendo otro aumento en el tamaño o frecuencia de las placas si tales placas ya se han desarrollado antes de administrar el tratamiento.

35 Preferentemente, el fragmento de A $\beta$  administrado carece de un epítope que generaría una respuesta de linfocitos T al fragmento. Generalmente, los epítopes de linfocitos T son mayores de 10 aminoácidos contiguos. Por tanto, fragmentos de A $\beta$  preferidos son de tamaño 5-10 o preferentemente 7-10 aminoácidos contiguos; es decir, longitud suficiente para generar una respuesta de anticuerpos sin generar una respuesta de linfocitos T. Se prefiere la ausencia de epítopes de linfocitos T debido a que estos epítopes no se necesitan para la actividad inmunogénica de fragmentos, y puede producir una respuesta inflamatoria no deseada en un subconjunto de pacientes (Anderson et al., (2002) J. Immunol. 168, 3697-3701; Senior (2002) Lancet Neurol. 1, 3). En algunos de los métodos desvelados, el fragmento es un fragmento distinto de A $\beta$ 13-28, 17-28, 25-35, 35-40, 33-42 ó 35-42. La mayoría de los epítopes de linfocitos T se producen dentro de los aminoácidos 14-30 de A $\beta$ .

40 Se prefieren el fragmento A $\beta$ 15-24 y los subfragmentos de 7-9 aminoácidos contiguos del mismo debido a que estos péptidos generan coherentemente una alta respuesta inmunogénica al péptido A $\beta$ . Estos fragmentos incluyen A $\beta$ 15-21, A $\beta$ 16-22, A $\beta$ 17-23, A $\beta$ 18-24, A $\beta$ 19-25, A $\beta$ 15-22, A $\beta$ 16-23, A $\beta$ 17-24, A $\beta$ 18-25, A $\beta$ 115-23, A $\beta$ 16-24, A $\beta$ 17-25, A $\beta$ 18-26, A $\beta$ 15-24, A $\beta$ 16-25 y A $\beta$ 15-25. La invención se refiere a A $\beta$ 16-23. La designación A $\beta$ 15-21, por ejemplo, indica un fragmento que incluye los residuos 15-21 de A $\beta$  y que carece de otros residuos de A $\beta$ . También se desvelan fragmentos del extremo C de A $\beta$ 42 ó 43 de 5-10 y preferentemente 7-10 aminoácidos contiguos. Estos fragmentos pueden generar una respuesta de anticuerpos que incluye anticuerpos específicos del extremo. Estos anticuerpos son ventajosos en unirse específicamente a A $\beta$ 42 y A $\beta$ 43 sin unirse específicamente a A $\beta$ 39-41. Estos anticuerpos se unen a A $\beta$  soluble sin unirse a placa.

45 En algunos métodos, un fragmento de la región central o del extremo C de A $\beta$  se administra en una pauta que también incluye administrar un fragmento de la región del extremo N. En general, tales fragmentos inducen anticuerpos que se unen específicamente e inducen la eliminación de placas amiloides mediante células fagocíticas. Una respuesta tal es particularmente útil para eliminar depósitos existentes de A $\beta$ . Sin embargo, una vez se han eliminado los depósitos, es ventajoso el tratamiento adicional con un fragmento de la región central o del extremo C de A $\beta$  para inducir anticuerpos para A $\beta$  soluble para prevenir la deposición adicional de A $\beta$  sin riesgo de efectos secundarios inflamatorios en ciertos pacientes. Son particularmente preferidos los fragmentos del extremo N que empiezan en los residuos 1-3 de A $\beta$  y que terminan en los residuos 7-11 de A $\beta$ . Fragmentos del extremo N a modo de ejemplo incluyen A $\beta$ 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 3-7, 1-3 y 1-4.

- A menos que se indique lo contrario, referencia a A $\beta$  incluye las secuencias de aminoácidos humanas naturales indicadas anteriormente, además de análogos que incluyen variantes alélicas, de especies e inducidas. Los análogos de A $\beta$  inducen anticuerpos que se unen específicamente con un péptido A $\beta$  natural (por ejemplo, A $\beta$ 42).
- 5 Los análogos de A $\beta$  normalmente se diferencian de péptidos que se producen naturalmente en hasta el 30 % de posiciones de aminoácidos hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 cambios de posición. Cada delección o sustitución de un residuo de aminoácido natural se considera un cambio de posición, ya que es la inserción de un residuo sin sustitución. Las sustituciones de aminoácidos son frecuentemente sustituciones conservativas.
- 10 A menos que se indique lo contrario, referencia a fragmentos de A $\beta$  incluye fragmentos de las secuencias de aminoácidos humanas naturales indicadas anteriormente, además de análogos que incluyen variantes alélicas, de especies e inducidas. Los análogos de fragmentos de A $\beta$  inducen anticuerpos que se unen específicamente con un péptido A $\beta$  natural (por ejemplo, A $\beta$ 42). Los análogos de fragmentos de A $\beta$  normalmente se diferencian del
- 15 fragmento de péptido que se produce naturalmente en hasta aproximadamente el 30 % de posiciones de aminoácidos. Por ejemplo, un análogo de A $\beta$ 15-21 puede variar hasta 1, 2, 3 ó 4 10 cambios de posición. Cada delección o sustitución de un residuo de aminoácido natural se considera un cambio de posición, ya que es la inserción de un residuo sin sustitución. Las sustituciones de aminoácidos son frecuentemente sustituciones conservativas.
- 20 Algunos análogos de A $\beta$  o fragmentos de A $\beta$  también incluyen aminoácidos no naturales o modificaciones de aminoácidos del extremo N o C en uno, dos, cinco, diez o incluso todas las posiciones. Por ejemplo, el residuo de ácido aspártico natural en la posición 1 y/o 7 de A $\beta$  puede sustituirse con ácido iso-aspártico. Ejemplos de aminoácidos no naturales son aminoácidos D,alfa,alfa-disustituídos, N-alkil-aminoácidos, ácido láctico, 4-hidroxi-prolina, gamma-carboxiglutamato, épsilon-N,N,N-trimetil-lisina, épsilon-N-acetil-lisina, O-fosfo-serina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, omega-N-metilarginina,  $\beta$ -alanina, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, tiroxina, ácido gamma-aminobutírico, homoserina, citrulina y ácido isoaspártico. Algunos agentes terapéuticos desvelados en el presente documento son péptidos all-D, por ejemplo, all-D A $\beta$  o
- 25 fragmento de all-D A $\beta$ , y análogos de péptidos all-D. Los fragmentos y análogos pueden cribarse para eficacia profiláctica o terapéutica en modelos animales transgénicos en comparación con controles sin tratar o de placebo como se describe más adelante.
- 30 A $\beta$ , sus fragmentos y análogos pueden sintetizarse por síntesis de péptidos en fase sólida o expresión recombinante, o pueden obtenerse de fuentes naturales. Están comercialmente disponibles sintetizadores de péptidos automáticos de numerosos proveedores, tales como Applied Biosystems, Foster City, California. La expresión recombinante puede ser en bacterias, tales como *E. coli*, levadura, células de insecto o células de mamífero. Procedimientos para la expresión recombinante se describen por Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (C.S.H.P. Press, NY 2d ed., 1989). Algunas formas de péptido A $\beta$  también están comercialmente disponibles (por ejemplo, American Peptides Company, Inc., Sunnyvale, CA y California Peptide Research, Inc. Napa, CA).
- 35 Los agentes terapéuticos también incluyen polipéptidos más largos que incluyen, por ejemplo, un fragmento inmunogénico del péptido A $\beta$ , junto con uno o varios de otros aminoácidos que flanquean el péptido A $\beta$  uno o uno o ambos lados. Por ejemplo, agentes preferidos incluyen proteínas de fusión que comprenden un segmento de A $\beta$  fusionado con una secuencia de aminoácidos heteróloga que induce una respuesta de linfocitos T colaboradores
- 40 contra la secuencia de aminoácidos heteróloga y así una respuesta de linfocitos B contra el segmento A $\beta$ . También pueden usarse uno o más aminoácidos heterólogos flanqueantes para tapar un péptido A $\beta$  para protegerlo de la degradación en la fabricación, almacenamiento o uso. Tales polipéptidos pueden cribarse para eficacia profiláctica o terapéutica en modelos animales en comparación con controles sin tratar o de placebo como se describe más adelante. Agentes terapéuticos desvelados en el presente documento incluyen un fragmento inmunogénico de A $\beta$
- 45 flanqueado por secuencias de polilisina. Las secuencias de polilisina pueden fusionarse con el extremo N, el extremo C, o tanto el extremo N como el C, de A $\beta$  o un fragmento inmunogénico de A $\beta$ . El péptido A $\beta$ , análogo, fragmento activo u otro polipéptido puede administrarse en forma asociada o multimérica o en forma disociada. Los agentes terapéuticos también incluyen multímeros de agentes inmunogénicos monoméricos.
- 50 En otra variación, un fragmento inmunogénico de A $\beta$  puede presentarse por un virus o una bacteria como parte de una composición inmunogénica. Un ácido nucleico que codifica el péptido inmunogénico se incorpora en un genoma o episoma del virus o bacteria. Opcionalmente, el ácido nucleico se incorpora de tal manera que el péptido inmunogénico se exprese como una proteína secretada o como una proteína de fusión con una proteína de la superficie externa de un virus o una proteína transmembranaria de una bacteria de manera que el péptido se exprese. Virus o bacterias usados en tales métodos deben ser no patógenos o atenuados. Virus adecuados incluyen adenovirus, VHS, virus de la encefalitis equina venezolana y otros alfavirus, virus de la estomatitis vesicular y otros
- 55 rabdovirus, variolovacuna y viruela aviar. Bacterias adecuadas incluyen Salmonella y Shigella. La fusión de un péptido inmunogénico con HBsAg del VHB es particularmente adecuada.
- 60 Agentes terapéuticos de la divulgación también incluyen péptidos y otros compuestos que no tienen necesariamente una similitud de secuencias de aminoácidos significativa con A $\beta$ , pero sin embargo sirven de miméticos de A $\beta$  e
- 65

inducen una respuesta inmunitaria similar. Por ejemplo, cualquier péptido y proteína que forme hojas plegadas  $\beta$  puede cribarse para idoneidad. También pueden usarse anticuerpos antiidiotípicos contra anticuerpos monoclonales para A $\beta$  u otros péptidos amiloidogénicos. Tales anticuerpos anti-Id imitan el antígeno y generan una respuesta inmunitaria a él (véase *Essential Immunology* (Roit ed., Blackwell Scientific Publications, Palo Alto, 6th ed.), p. 181).

5 Agentes distintos de péptidos A $\beta$  deben inducir una respuesta inmunogénica contra uno o más de los segmentos de A $\beta$  preferidos enumerados anteriormente (por ejemplo, 15-24). Preferentemente, tales agentes inducen una respuesta inmunogénica que está específicamente dirigida a uno de estos segmentos sin dirigirse a otros segmentos de A $\beta$ .

10 También pueden cribarse bibliotecas al azar de péptidos u otros compuestos para idoneidad. Pueden producirse bibliotecas combinatorias para muchos tipos de compuestos que pueden sintetizarse en un modo etapa a etapa. Tales compuestos incluyen polipéptidos, miméticos de giro beta, polisacáridos, fosfolípidos, hormonas, prostaglandinas, esteroides, compuestos aromáticos, compuestos heterocíclicos, benzodiazepinas, glicinas N-sustituidas oligoméricas y oligocarbamatos. Pueden construirse bibliotecas combinatorias mayores de los  
15 compuestos por el método de bibliotecas sintéticas codificadas (ESL) descrito en Affymax, documento WO 95/12608, Affymax, documento WO 93/06121, Universidad de Columbia, documento WO 94/08051, Farmacopea, documento WO 95/35503 y Scripps, documento WO 95/30642. También pueden generarse bibliotecas de péptidos por métodos de expresión en fago. Véase, por ejemplo, Devlin, documento WO 91/18980.

20 Las bibliotecas combinatorias y otros compuestos se criban inicialmente para idoneidad determinando su capacidad para unirse específicamente a anticuerpos o linfocitos (B o T) conocidos por ser específicos para A $\beta$  u otros péptidos amiloidogénicos. Por ejemplo, pueden realizarse cribados iniciales con cualquier suero policlonal o anticuerpo monoclonal para A $\beta$  o un fragmento del mismo. Entonces, los compuestos pueden cribarse para unirse específicamente a un epítipo específico dentro de A $\beta$  (por ejemplo, 15-24). Los compuestos pueden probarse por  
25 los mismos procedimientos descritos para mapear especificidades de epítopes de anticuerpo. Entonces, los compuestos identificados por tales cribados se analizan adicionalmente para la capacidad para inducir anticuerpos o linfocitos reactivos para A $\beta$  o fragmentos de los mismos. Por ejemplo, pueden probarse múltiples diluciones de sueros sobre placas de microtitulación que se han recubierto previamente con A $\beta$  o un fragmento del mismo y puede realizarse un ELISA estándar para probar anticuerpos reactivos para A $\beta$  o el fragmento. Entonces, los compuestos  
30 pueden probarse para eficacia profiláctica y terapéutica en animales transgénicos predispuestos a una enfermedad amiloidogénica, como se describe en los ejemplos. Tales animales incluyen, por ejemplo, ratones que llevan una mutación 717 de APP descrita por Games et al., arriba, y ratones que llevan una mutación sueca 670/671 de APP tal como se describe por McConlogue et al., documento US 5.612.486 y Hsiao et al., *Science*, 274, 99 (1996); Staufenbiel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:13287-13292 (1997); Sturchler-Pierrat et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:13287-13292 (1997); Borchelt et al., *Neuron*, 19:939-945 (1997)). Puede usarse el mismo enfoque de  
35 cribado en otros posibles agentes análogos de A $\beta$  y péptidos más largos que incluyen fragmentos de A $\beta$ , descritos anteriormente.

#### 40 IV. Conjugados

Algunos agentes para inducir una respuesta inmunitaria contienen el epítipo apropiado para inducir una respuesta inmunitaria contra LB, pero son demasiado pequeños para ser inmunogénicos. En esta situación, un inmunógeno de péptido puede ligarse a una molécula portadora adecuada para formar un conjugado que ayuda a provocar una  
45 respuesta inmunitaria. Un único agente puede ligarse a un único vehículo, múltiples copias de un agente pueden ligarse a múltiples copias de un vehículo, que se ligan a su vez entre sí, múltiples copias de un agente pueden ligarse a una única copia de un vehículo, o una única copia de un agente puede ligarse a múltiples copias de un vehículo, o diferentes vehículos. Vehículos adecuados incluyen albúminas de suero, hemocianina de lapa californiana, moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovoalbúmina, toxoide tetánico, o un toxoide de otras bacterias patógenas, tales como difteria, *E. coli*, cólera o *H. pylori*, o un derivado de toxina atenuada. Los epítopes de  
50 linfocitos T también son moléculas portadoras adecuadas. Pueden formarse algunos conjugados enlazando agentes desvelados en el presente documento con una molécula de polímero inmunoestimulante (por ejemplo, tripalmitoil-S-glicerina-cisteína (Pam<sub>3</sub>Cys), manano (un polímero de manosa) o glucano (un polímero beta 1 $\rightarrow$ 2)), citocinas (por ejemplo, IL-1, péptidos alfa y beta de IL-1, IL-2, gamma-INF, IL-10, GM-CSF) y quimiocinas (por ejemplo, MIP1alfa y beta, y RANTES). También pueden ligarse agentes inmunogénicos a péptidos que potencian el transporte a través de tejidos, como se describe en O'Mahony, documentos WO 97/17613 y WO 97/17614. Pueden ligarse  
55 inmunógenos a los vehículos con o sin aminoácidos espaciadores (por ejemplo, gly-gly).

Pueden formarse algunos conjugados enlazando agentes desvelados en el presente documento a al menos un epítipo de linfocitos T. Algunos epítopes de linfocitos T son promiscuos, mientras que otros epítopes de linfocitos T son universales. Los epítopes de linfocitos T promiscuos pueden potenciar la inducción de la inmunidad de linfocitos T en una amplia variedad de sujetos que expresan diversos tipos de HLA. A diferencia de los epítopes de linfocitos T promiscuos, los epítopes de linfocitos T universales pueden potenciar la inducción de inmunidad de linfocitos T en un  
60 gran porcentaje, por ejemplo, al menos el 75 %, de sujetos que expresan diversas moléculas de HLA codificadas por diferentes alelos de HLA-DR.

65 Existe un gran número de epítopes de linfocitos T que se producen naturalmente, tales como toxoide tetánico (por



ejemplo, los epítopes P2 y P30), antígeno de superficie de la hepatitis B, pertussis, toxoide, proteína F del virus del sarampión, proteína de la membrana externa mayor de *Chlamydia trachomatis*, toxoide diftérico, circumsporozoito T de *Plasmodium falciparum*, antígeno CS de *Plasmodium falciparum*, triosa fosfato isomerasa de *Schistosoma mansoni*, TraT de *Escherichia coli* y hemaglutinina del virus de la gripe (HA). Los péptidos inmunogénicos desvelados en el presente documento también pueden conjugarse con los epítopes de linfocitos T descritos en Sinigaglia F. et al., Nature, 336:778-780 (1988); Chicz R.M. et al., J. Exp. Med., 178:27-47 (1993); Hammer J. et al., Cell 74:197-203 (1993); Falk K. et al., Immunogenetics, 39:230-242 (1994); documento WO 98/23635; y Southwood S. et al. J. Immunology, 160:3363-3373 (1998). Otros ejemplos incluyen:

10 Hemaglutinina de la gripe: HA<sub>307-319</sub>

CS de malaria: epítope T3 EKKIAKMEKASSVFNV (SEC ID N°: 4)

15 Antígeno de superficie de la hepatitis B: HBsAg<sub>19-28</sub> FLLTRILTI (SEC ID N°: 5)

Proteína 65 de choque térmico: hsp65<sub>153-171</sub> DQSIGDLIAEAMDKVNEG (SEC ID N°: 6)

Bacilo de Calmette-Guerin QVHFQPLPPAVVKL (SEC ID N°: 7)

20 Toxoide tetánico: TT<sub>830-844</sub> QYIKANSKFIGITEL (SEC ID N°: 8)

Toxoide tetánico: TT<sub>947-967</sub> FNNFTVSWFLRVPKVSASHLE (SEC ID N°: 9)

gp120 T1 del VIH: KQIINMWQEVGKAMYA (SEC ID N°: 10).

25 Alternativamente, los conjugados pueden formarse enlazando agentes desvelados en el presente documento con al menos un epítope de linfocitos T artificial que puede unirse a una gran proporción de moléculas de clase II del MHC, tales como el epítope pan DR ("PADRE"). PADRE se describe en los documentos US 5.736.141, WO 95/07707 y Alexander J et al., Immunity, 1:751-761 (1994). Un péptido PADRE preferido es **AKXVAAWTLKAAA** (SEC ID N°: 11) (residuos comunes en negrita) en el que X es preferentemente ciclohexilalanina tirosina o fenilalanina, siendo más preferida ciclohexilalanina.

Los agentes inmunogénicos pueden ligarse a vehículos por reticulación química. Técnicas para ligar un inmunogén a un vehículo incluyen la formación de enlaces disulfuro usando N-succinimidil-3-(2-piridil-tio)propionato (SPDP) y 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC) (si el péptido carece de un grupo sulfhidrilo, éste puede proporcionarse mediante la adición de un residuo de cisteína). Estos reactivos crean un enlace disulfuro entre ellos mismos y la cisteína del péptido reside sobre una proteína y un enlace amida mediante el épsilon-amino sobre una lisina, u otro grupo amino libre en otros aminoácidos. Una variedad de tales agentes formadores de disulfuro/amida se describe por Immun. Rev. 62, 185 (1982). Otros agentes de acoplamiento bifuncionales forman un tioéter en vez de un enlace disulfuro. Muchos de estos agentes formadores de tioéter están comercialmente disponibles 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 activarse combinándolos con succinimida o sal de sodio del ácido 1-hidroxil-2-nitro-4-sulfónico.

45 La inmunogenicidad puede mejorarse mediante la adición de residuos espaciadores (por ejemplo, Gly-Gly) entre el epítope T<sub>h</sub> y el inmunogén de péptido desvelado en el presente documento. Además de separar físicamente el epítope T<sub>h</sub> del epítope de linfocitos B (es decir, el inmunogén de péptido), los residuos de glicina pueden alterar cualquier estructura secundaria artificial creada por la unión del epítope T<sub>h</sub> con el inmunogén de péptido, y así eliminar la interferencia entre las respuestas de linfocitos T y/o B. La separación conformacional entre el epítope colaborador y el dominio que provoca el anticuerpo permite así interacciones más eficaces entre el inmunogén presentado y los linfocitos T<sub>h</sub> y B apropiados.

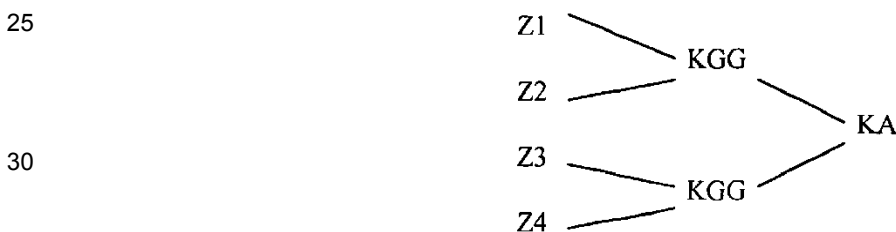
Para potenciar la inducción de inmunidad de linfocitos T en un gran porcentaje de sujetos que expresan diversos tipos de HLA para un agente de la presente invención, puede prepararse una mezcla de conjugados con diferentes epítopes de linfocitos T<sub>h</sub>. La mezcla puede contener una mezcla de al menos dos conjugados con diferentes epítopes de linfocitos T<sub>h</sub>, una mezcla de al menos tres conjugados con diferentes epítopes de linfocitos T<sub>h</sub>, o una mezcla de al menos cuatro conjugados con diferentes epítopes de linfocitos T<sub>h</sub>. La mezcla puede administrarse con un adyuvante.

60 También pueden expresarse péptidos inmunogénicos como proteínas de fusión con vehículos (es decir, péptidos heterólogos). El péptido inmunogénico puede ligarse en su extremo amino, su extremo carboxilo, o ambos, a un vehículo. Opcionalmente, pueden estar presentes múltiples repeticiones del péptido inmunogénico en la proteína de fusión. Opcionalmente, puede ligarse un péptido inmunogénico a múltiples copias de un péptido heterólogo, por ejemplo, en tanto los extremos N como C del péptido. Opcionalmente, pueden ligarse múltiples copias de un péptido inmunogénico a múltiples copias de un péptido heterólogo que están ligadas entre sí. Algunos péptidos portadores sirven para inducir una respuesta de linfocitos T colaboradores contra el péptido portador. Los linfocitos T

colaboradores inducidos inducen a su vez una respuesta de linfocitos B contra el péptido inmunogénico ligado al vehículo.

5 A continuación se muestran algunos ejemplos de proteínas de fusión adecuadas para su uso desveladas en el presente documento. Algunas de estas proteínas de fusión comprenden segmentos de A $\beta$  ligados a epítopes de toxoide tetánico tal como se describen en los documentos US 5.196.512, EP 378.881 y EP 427.347. Algunas proteínas de fusión comprenden segmentos de A $\beta$  ligados a al menos un péptido PADRE descrito en el documento US 5.736.142. Algunos péptidos heterólogos son epítopes de linfocitos T promiscuos, mientras que otros péptidos heterólogos son epítopes de linfocitos T universales. En algunos métodos, el agente para administración es simplemente una única proteína de fusión con un segmento A $\beta$  ligado a un segmento heterólogo en configuración lineal. Los agentes terapéuticos desvelados en el presente documento pueden representarse usando una fórmula. Por ejemplo, en algunos métodos, el agente es multímero de proteínas de fusión representadas por la fórmula 2<sup>x</sup>, en la que x es un número entero de 1-5. Preferentemente, x es 1, 2 ó 3, siendo 2 el más preferido. Si x es dos, un multímero tal tiene cuatro proteínas de fusión ligadas en una configuración preferida denominada MAP4 (véase el documento US 5.229.490).

La configuración de MAP4 se muestra a continuación, en la que estructuras ramificadas se producen iniciando la síntesis de péptidos en tanto el extremo N como las aminas de la cadena lateral de lisina. Dependiendo del número de veces que la lisina se incorpora en la secuencia y se deja que se ramifique, la estructura resultante presentará múltiples extremos N. En este ejemplo, se han producido cuatro extremos N idénticos sobre el núcleo que contiene lisina ramificada. Tal multiplicidad potencia enormemente la sensibilidad de linfocitos B relacionados. En los ejemplos más adelante, Z se refiere a un fragmento inmunogénico de A $\beta$ , y Z1-4 se refieren a fragmento(s) inmunogénico(s) de A $\beta$ . Los fragmentos pueden ser iguales entre sí o diferentes.



35 Otros ejemplos de proteínas de fusión incluyen:

Z-Toxoide tetánico 830-844 en una configuración de MAP4:  
Z-QYIKANSKFIGITEL (SEC ID N°: 12)

40 Z-Toxoide tetánico 947-967 en una configuración de MAP4:  
Z-FNNFTVSFWLRVVPKVSASHLE (SEC ID N°: 13)

45 Z-Toxoide tetánico 830-844 en una configuración de MAP4:  
Z-QYIKANSKFIGITEL (SEC ID N°: 14)

Z-Toxoide tetánico 830-844 + 947-967 en una configuración lineal:  
Z-QYIKANSKFIGITELFNNFTVSFWLRVVPKVSASHLE (SEC ID N°: 15)

50 Péptido PADRE (todos en configuraciones lineales), en la que X es preferentemente ciclohexilalanina, tirosina o fenilalanina, siendo la ciclohexilalanina la más preferida-Z: AKXVAAWTLKAAA-Z (SEC ID N°: 16)

**Z x 3-péptido PADRE:**

**Z-Z-Z-AKXVAAWTLKAAA (SEC ID N°: 17)**

55 **Z - ovoalbúmina 323-339 en una configuración lineal:**

**Z-ISQAVHAAHAEINEAGR (SEC ID N°: 20)**

60 Otros ejemplos de proteínas de fusión incluyen:

AKXVAAWTLKAAA-**Z-Z-Z-Z** (SEC ID N°: 18)

**Z-AKXVAAWTLKAAA** (SEC ID N°: 19)

PKYVKQNTLKLAT-**Z-Z-Z** (SEC ID N°: 21)

65 **Z-PKYVKQNTLKLAT-Z** (SEC ID N°: 22)

**Z-Z-Z-PKYVKQNTLKLAT** (SEC ID N°: 23)

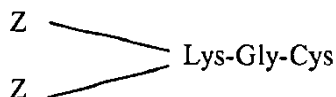
**Z-Z-PKYVKQNTLKLAT** (SEC ID N°: 24)

**Z-PKYVKQNTLKLAT-EKKIAKMEKASSVFNV-QYIKANSKFIGITEL-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-Z-Z-Z-Z-QYIKANSKFIGITEL-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE** (SEC ID N°: 25)

**Z-QYIKANSKFIGITELCFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-Z-**

**QYIKANSKFIGITELCFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-Z** (SEC ID N°: 26)

**Z-QYIKANSKFIGITEL** (SEC ID N°: 27) sobre una resina de 2 ramas: los fragmentos pueden ser iguales entre sí o diferentes.



Pueden usarse las mismas proteínas transportadoras o similares y métodos de enlace para generar inmunógenos que van a usarse en la generación de anticuerpos contra A $\beta$  o un fragmento inmunogénico de A $\beta$ . Por ejemplo, puede administrarse A $\beta$  o un fragmento inmunogénico de A $\beta$  ligado a un vehículo a un animal de laboratorio en la producción de anticuerpos monoclonales para A $\beta$  o un fragmento inmunogénico de A $\beta$ .

#### V. Agentes terapéuticos que codifican ácidos nucleicos

También pueden inducirse respuestas inmunitarias contra depósitos de amiloide por administración de ácidos nucleicos que codifican segmentos de péptido A $\beta$ , y fragmentos del mismo, otros inmunógenos de péptido, o anticuerpos y sus cadenas componentes usadas para inmunización pasivas. Tales ácidos nucleicos pueden ser ADN o ARN. Un segmento de ácido nucleico que codifica un inmunogén está normalmente ligado a elementos reguladores, tales como un promotor y potenciador, que permiten la expresión del segmento de ADN en las células diana previstas de un paciente. Para la expresión en glóbulos sanguíneos, como se desea para la inducción de una respuesta inmunitaria, elementos promotores y potenciadores de genes de inmunoglobulina de la cadena ligera o pesada o el promotor temprano intermedio principal del CMV y potenciador son adecuados para dirigir la expresión. Los elementos reguladores y secuencias codificantes ligados se clonan frecuentemente en un vector. Para la administración de anticuerpos bicatenarios, las dos cadenas pueden clonarse en el mismo vector o en vectores separados. Los ácidos nucleicos que codifican agentes terapéuticos desvelados en el presente documento también pueden codificar al menos un epítipo de linfocitos T. Las divulgaciones en el presente documento que se refieren al uso de adyuvantes y el uso de vehículos se aplican, cambiando lo que haya que cambiar, a su uso con los ácidos nucleicos que codifican los agentes terapéuticos desvelados en el presente documento.

Están disponibles varios sistemas de vectores virales que incluyen sistemas retrovirales (véase, por ejemplo, Lawrie y Tumin, Cur. Opin. Genet. Develop. 3, 102-109 (1993)); vectores adenovirales (véase, por ejemplo, Bett et al., J. Virol. 67, 5911 (1993)); vectores de virus adenoasociados (véase, por ejemplo, Zhou y col., J. Exp. Med. 179, 1867 (1994)), vectores virales de la familia de la viruela que incluyen virus de la variolovacuna y los virus de la viruela aviar, vectores virales del género de los alfa-virus tales como aquellos derivados del virus de Sindbis y del bosque de Semliki (véase, por ejemplo, Dubensky y col., J. Virol. 70, 508-519 (1996)), virus de la encefalitis equina venezolana (véase el documento US 5.643.576) y rhabdovirus, tales como virus de la estomatitis vesicular (véase el documento WO 96/34625) y virus del papiloma (Ohe et al., Human Gene Therapy 6, 325-333 (1995); Woo y col., documento WO 94/12629 y Xiao & Brandsma, Nucleic Acids. Res. 24, 2630-2622 (1996)).

El ADN que codifica un inmunogén, o un vector que contiene el mismo, puede encapsidarse en liposomas. Lípidos adecuados y análogos relacionados se describen por los documento US 5.208.036, 5.264.618, 5.279.833 y US 5.283.185. Los vectores y el ADN que codifica un inmunogén también pueden adsorberse a o asociarse a vehículos particulados, ejemplos de los cuales incluyen polímeros de poli(metacrilato de metilo) y polilactidas y poli(lactida-co-glicolidas), véase, por ejemplo, McGee y col., J. Micro Encap. (1996).

Pueden administrarse vectores de terapia génica o polipéptidos desnudos *in vivo* por administración a un paciente individual, normalmente por administración sistémica (por ejemplo, infusión intravenosa, intraperitoneal, nasal, gástrica, intradérmica, intramuscular, subdérmica o intracraneal) o administración tópica (véase, por ejemplo, el documento US 5.399.346). Tales vectores pueden incluir adicionalmente agentes facilitadores tales como bupivacina (documento US 5.593.970). También puede administrarse ADN usando una pistola de genes (véase Xiao & Brandsma, arriba). El ADN que codifica un inmunogén se precipita sobre la superficie de perlas metálicas microscópicas. Los microproyectiles son acelerados con una onda de choque o expandiendo gas helio, y penetran en los tejidos a una profundidad de varias capas de células. Por ejemplo, es adecuado The Accel™ Gene Delivery Device fabricado por Agracetus, Inc. Middleton WI. Alternativamente, el ADN desnudo puede pasar a través de la piel en la corriente sanguínea simplemente goteando el ADN sobre la piel con irritación química o mecánica (véase el documento WO 95/05853).

También desvelados en el presente documento, vectores que codifican inmunógenos pueden administrarse a células *ex vivo*, tales como células explantadas de un paciente individual (por ejemplo, linfocitos, aspirados de médula ósea, biopsia de tejido) o citoblastos hematopoyéticos de donante universal, seguido de reimplantación de las células en

un paciente, normalmente después de la selección de células que han incorporado el vector.

#### VI. Adyuvantes

5 Agentes inmunogénicos de la invención, tales como péptidos, se administran algunas veces en combinación con un adyuvante. El adyuvante aumenta el título de anticuerpos inducidos y/o la afinidad de unión de anticuerpos inducidos con respecto a la situación si el péptido se usara solo. Puede usarse una variedad de adyuvantes en combinación con un fragmento inmunogénico de A $\beta$ , para provocar una respuesta inmunitaria. Adyuvantes preferidos aumentan la respuesta intrínseca a un inmunogén sin causar cambios conformacionales en el inmunogén que afectan la forma cualitativa de la respuesta. Adyuvantes preferidos incluyen hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, monofosforil lípido A 3-des-O-acilado (MPL™) (véase el documento GB 2220211 (RIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton, Montana, ahora parte de Corixa). Stimulon™ QS-21 es un glucósido triterpénico o saponina aislada de la corteza del árbol Quillaja Saponaria Molina encontrado en América del Sur (véase Kensil et al., en Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); patente de EE.UU. n° 5.057.540), (Aquila BioPharmaceuticals, Framingham, MA). Otros adyuvantes son emulsiones de aceite en agua (tales como escualeno o aceite de cacahuete), opcionalmente en combinación con inmunoestimulantes, tales como monofosforil lípido A (véase Stoute et al., N. Engl. J. Med. 336, 86-91 (1997)), polímeros de Pluronic y micobacterias muertas. Otro adyuvante es CpG (documento WO 98/40100). Los adyuvantes pueden administrarse como un componente de una composición terapéutica con un agente activo o pueden administrarse por separado, antes, simultáneamente con, o después de la administración del agente terapéutico.

Una clase preferida de adyuvantes es sales de aluminio (alumbre), tales como hidróxido de alumbre, fosfato de alumbre, sulfato de alumbre. Tales adyuvantes pueden usarse con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como MPL o 3-DMP, QS-21, aminoácidos poliméricos o monoméricos tales como ácido poliglútamico o polilisina. Otra clase de adyuvantes es formulaciones de emulsión de aceite en agua. Tales adyuvantes pueden usarse con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como muramilpéptidos (por ejemplo, N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxi-fosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Al-D-isoglu-L-Ala-dipalmitoxipropilamida (DTP-DPP) theramide™), u otros componentes de la pared celular bacteriana. Las emulsiones de aceite en agua incluyen (a) MF59 (documento WO 90/14837), que contiene 5 % de escualeno, 0,5 % de Tween 80 y 0,5 % de Span 85 (que contiene opcionalmente diversas cantidades de MTP-PE) formulado en partículas submicrométricas usando un microfluidizador tal como el microfluidizador modelo 110Y (Microfluidics, Newton MA), (b) SAF, que contiene 10 % de escualeno, 0,4 % de Tween 80, 5 % de polímero L121 bloqueado con Pluronic y thr-MDP, tanto microfluidizado en una emulsión submicrométrica como agitado con vórtex para generar una emulsión de mayor tamaño de partícula, y (c) sistema de adyuvante Ribit™ (RAS), (Ribi ImmunoChem, Hamilton, MT) que contiene 2 % de escualeno, 0,2 % de Tween 80 y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforil lípido A (MPL), trehalosa dimicolato (TDM) y esqueleto de la pared celular (CWS), preferentemente MPL + CWS (Detox™).

Otra clase de adyuvantes preferidos es adyuvantes de saponina, tales como Stimulon™ (QS-21, Aquila, Framingham, MA) o partículas generadas a partir del mismo tales como ISCOM (complejos inmunoestimulantes) e ISCOMATRIX. Otros adyuvantes incluyen RC-529, GM-CSF y adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA). Otros adyuvantes incluyen citocinas, tales como interleucinas (por ejemplo, péptidos IL-1  $\alpha$  y  $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IL13 y IL-15), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), quimiocinas, tales como MIP1 $\alpha$  y  $\beta$  y RANTES. Otra clase de adyuvantes es análogos de glicolípidos que incluyen N-glicosilamidas, N-glicosilureas y N-glicosilcarbamatos, cada uno de los cuales está sustituido en el residuo de azúcar con un aminoácido, como inmunomoduladores o adyuvantes (véase la patente de EE.UU. n° 4.855.283). También pueden usarse proteínas de choque térmico, por ejemplo, HSP70 y HSP90, como adyuvantes.

Un adyuvante puede administrarse con un inmunogén como una única composición, o puede administrarse antes, simultáneamente con o después de la administración del inmunogén. El inmunogén y adyuvante pueden envasarse y suministrarse en el mismo vial o pueden envasarse en viales separados y mezclarse antes de uso. El inmunogén y el adyuvante normalmente están envasados con una etiqueta que indica la aplicación terapéutica prevista. Si el inmunogén y adyuvante se envasan por separado, el envase normalmente incluye instrucciones para mezclar antes de uso. La elección de un adyuvante y/o vehículo depende de la estabilidad de la formulación inmunogénica que contiene el adyuvante, la vía de administración, el programa de dosificación, la eficacia del adyuvante para las especies que se vacunan, y, en seres humanos, un adyuvante farmacéuticamente aceptable es uno que ha sido autorizado o es autorizabile para administración humana por organismos reguladores apropiados. Por ejemplo, el adyuvante completo de Freund no es adecuado para administración humana. Se prefieren alumbre, MPL y QS-21. Opcionalmente, pueden usarse simultáneamente dos o más adyuvantes diferentes. Combinaciones preferidas incluyen alumbre con MPL, alumbre con QS-21, MPL con QS-21, MPL o RC-529 con GM-CSF, y alumbre, QS-21 y MPL juntos. Por tanto, el adyuvante incompleto de Freund puede usarse (Chang et al., Advanced Drug Delivery Reviews 32, 173-186 (1998)), opcionalmente en combinación con cualquiera de alumbre, QS-21, y MPL y todas las combinaciones de los mismos.

## VII. Administración pasiva de anticuerpos

La inmunización activa con fragmentos de A $\beta$  puede combinarse con la administración pasiva de anticuerpos. Los anticuerpos usados para la administración pasiva pueden ser anticuerpos para epítopes del extremo N de A $\beta$  para la inducción de una respuesta de eliminación fagocítica de placas, o pueden ser anticuerpos para regiones centrales o del extremo C de A $\beta$  para la eliminación de A $\beta$  soluble. En algunos métodos, la administración pasiva con un anticuerpo para un epítipo de la región del extremo N se realiza primero para limpiar depósitos de amiloide existentes. Posteriormente, un fragmento de una región central o del extremo C de A $\beta$  se administra para prevenir la deposición adicional de depósitos de amiloide de A $\beta$  soluble. En otro método, la administración activa con un fragmento a una porción central o del extremo C de A $\beta$  se realiza primero para generar anticuerpos que eliminan A $\beta$  soluble. Entonces, cuando el nivel de anticuerpos en la sangre empieza a disminuir, se suministra una dosis adicional por administración pasiva de anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo central o del extremo C de A $\beta$ .

Anticuerpos adecuados para su uso en administración pasiva se describen en los documentos WO 00/72880 y WO 02/46237. Anticuerpos preferidos que se unen específicamente a un epítipo del extremo N de A $\beta$  se unen a un epítipo que empieza en los residuos 1-3 y que termina en los residuos 7-11 de A $\beta$ . Algunos anticuerpos preferidos se unen específicamente a epítopos dentro de los aminoácidos 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7 ó 3-7. Algunos anticuerpos preferidos se unen específicamente a un epítipo que empieza en los residuos 1-3 y que termina en los residuos 7-11 de A $\beta$ . Tales anticuerpos normalmente se unen específicamente a depósitos de amiloide, pero pueden o pueden no unirse a A $\beta$  soluble. Algunos anticuerpos preferidos que se unen específicamente a un epítipo del extremo C de A $\beta$  se unen específicamente a una forma larga que se produce naturalmente de A $\beta$  (es decir, A $\beta$ 42 y A $\beta$ 43 sin unirse específicamente a una forma corta que se produce naturalmente de A $\beta$  (es decir, A $\beta$ 39, 40 ó 41). Anticuerpos para epítopos del extremo C y centrales de normalmente específicamente se unen a soluble sin unión específica a depósitos de amiloide. Cuando se dice que un anticuerpo se une específicamente a un epítipo dentro de residuos especificados, tales como A $\beta$  1-5, por ejemplo, lo que se indica es que el anticuerpo se une específicamente a un polipéptido que contiene los residuos especificados (es decir, A $\beta$  1-5 en este ejemplo). Un anticuerpo tal no se pone necesariamente en contacto con cada residuo dentro de A $\beta$  1-5. Ni cada sustitución de un aminoácido único o delección en A $\beta$ 1-5 afecta necesariamente significativamente la afinidad de unión. La especificidad por epítipo de un anticuerpo puede determinarse, por ejemplo, como se describe por el documento WO 00/72880.

Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. Los sueros policlonales normalmente contienen poblaciones mixtas de anticuerpos que se unen específicamente a varios epítopos a lo largo de la longitud de A $\beta$ . Sin embargo, los sueros policlonales pueden ser específicos para un segmento de A $\beta$  particular, tal como A $\beta$ 1-10. Anticuerpos preferidos son quiméricos, humanizados (véase Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989) y los documentos WO 90/07861, US 5.693.762, US 5.693.761, US 5.585.089, US 5.530.101 y Winter, US 5.225.539) o humanos (Lonberg et al., documentos WO93/12227 (1993); US 5.877.397, US 5.874.299, US 5.814.318, US 5.789.650, US 5.770.429, US 5.661.016, US 5.633.425, US 5.625.126, US 5.569.825, US 5.545.806, Nature 148, 1547-1553 (1994), Nature Biotechnology 14, 826 (1996), Kucherlapati, documento WO 91/10741 (1991)). Están disponibles varios anticuerpos de ratón de diferentes especificidades de unión como materiales de partida para preparar anticuerpos humanizados. Se prefiere el isotipo IgG1 humano para anticuerpos para la región del extremo N debido a que tiene la mayor afinidad de isotipos humanos por el receptor de FcRI sobre células fagocíticas. Algunos anticuerpos se unen específicamente a A $\beta$  con una afinidad de unión superior o igual a aproximadamente  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  ó  $10^{10}$  M $^{-1}$ .

## VIII. Pacientes aceptados para el tratamiento

Los pacientes aceptados para el tratamiento incluyen individuos en riesgo de enfermedad, pero que no muestran síntomas, además de pacientes que presentemente muestran síntomas. En el caso de enfermedad de Alzheimer, prácticamente cualquiera está en riesgo de padecer enfermedad de Alzheimer si vive suficientemente. Por tanto, los presentes métodos pueden administrarse profilácticamente a la población general sin la necesidad de ninguna evaluación del riesgo del paciente sujeto. Los presentes métodos son especialmente útiles para individuos que tienen un riesgo genético conocido de enfermedad de Alzheimer. Tales individuos incluyen aquellos que tienen parientes que han sufrido esta enfermedad, y aquellos cuyo riesgo se determina por análisis de marcadores genéticos o bioquímicos. Los marcadores genéticos de riesgo hacia enfermedad de Alzheimer incluyen mutaciones en el gen APP, particularmente mutaciones en la posición 717 y las posiciones 670 y 671 denominadas las mutaciones de Hardy y suecas, respectivamente (véase Hardy, TINS, arriba). Otros marcadores de riesgo son mutaciones en los genes presenilina, PS1 y PS2, y ApoE4, historia familiar de EA, hipercolesterolemia o aterosclerosis. Los individuos que presentemente padecen enfermedad de Alzheimer pueden reconocerse de demencia característica, además de la presencia de factores de riesgo descritos anteriormente. Además, están disponibles varias pruebas de diagnóstico para identificar individuos que tienen EA. Estas incluyen medición de niveles de CSF tau y A $\beta$ 42. Niveles elevados de tau y disminuidos de A $\beta$ 42 significan la presencia de EA. También pueden diagnosticarse individuos que padecen enfermedad de Alzheimer por criterios de ADRDA como se ha tratado en el documento WO 00/72880.

En pacientes asintomáticos, el tratamiento puede empezar a cualquier edad (por ejemplo, 10, 20, 30). Normalmente,

sin embargo, no es necesario empezar el tratamiento hasta que un paciente llega a los 40, 50, 60 ó 70. El tratamiento normalmente implica múltiples dosificaciones durante un periodo de tiempo. El tratamiento puede monitorizarse ensayando anticuerpo, o respuestas de linfocitos T (un efecto secundario) o linfocitos B activados al agente terapéutico (por ejemplo, péptido A $\beta$ ) con el tiempo. Si la respuesta fracasa, se indica una dosificación de refuerzo. En el caso de posibles pacientes con síndrome de Down, el tratamiento puede empezar antenatalmente administrando agente terapéutico a la madre o poco después del nacimiento.

#### IX. Pautas de tratamiento

En general, las pautas de tratamiento implican administrar un agente eficaz para inducir una respuesta inmunogénica a A $\beta$ , preferentemente un fragmento inmunogénico de A $\beta$  a un paciente. En aplicaciones profilácticas, las composiciones farmacéuticas o medicamentos se administran a un paciente susceptible a, o de otro modo en riesgo de, enfermedad de Alzheimer en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo, reducir la gravedad o retrasar la aparición de la enfermedad, que incluye síntomas fisiológicos, bioquímicos, histológicos y/o de comportamiento de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. En aplicaciones terapéuticas, un agente se administra a un paciente que se sospecha que padece, o que ya padece, una enfermedad tal en una pauta que comprende una cantidad y frecuencia de administración del agente suficiente para curar, o al menos detener parcialmente, o inhibir el deterioro de los síntomas de la enfermedad (fisiológicos, bioquímicos, histológicos y/o de comportamiento), que incluye sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios en el desarrollo de la enfermedad. En algunos métodos, la administración del agente reduce o elimina el deterioro miocognitivo en pacientes que todavía no han desarrollado patología de Alzheimer característica. Una cantidad adecuada para realizar el tratamiento terapéutico o profiláctico se define como una dosis terapéuticamente o profilácticamente eficaz. Una combinación de cantidad y frecuencia de dosificación adecuada para realizar el tratamiento terapéutico o profiláctico se define como una pauta terapéuticamente o profilácticamente eficaz. En pautas profilácticas y terapéuticas, los agentes se administran normalmente en varias dosificaciones hasta que hayan logrado una respuesta inmunitaria suficiente. Una dosificación y frecuencia de administraciones adecuada para realizar tratamiento terapéutico o profiláctico se define como una pauta terapéuticamente o profilácticamente eficaz. Normalmente, la respuesta inmunitaria del paciente se monitoriza y se administran dosificaciones repetidas si la respuesta inmunitaria empieza a disminuir. La respuesta inmunitaria puede monitorizarse detectando anticuerpos para AB en la sangre en el paciente, detectando niveles de AB o placas en el cerebro o síntomas por una medida psicométrica, tal como MMSE, y ADAS, que es una escala completa para evaluar pacientes con estado y función de enfermedad de Alzheimer.

Dosis eficaces de los agentes y composiciones desvelados en el presente documento para el tratamiento de las afecciones anteriormente descritas varían dependiendo de muchos factores diferentes, que incluyen medios de administración, sitio diana, estado fisiológico del paciente, si el paciente es humano o un animal, otras medicaciones administradas y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Normalmente, el paciente es un ser humano, pero también pueden tratarse mamíferos no humanos que incluyen mamíferos transgénicos. Las dosificaciones de tratamiento necesitan valorarse para optimizar la seguridad y eficacia. La cantidad de inmunogén depende de si el adyuvante también se administra, requiriéndose mayores dosificaciones en ausencia de adyuvante. La cantidad de un inmunogén para administración varía algunas veces de 1-500  $\mu$ g por paciente y más normalmente de 5-500  $\mu$ g por inyección para administración humana. Ocasionalmente, se usa una dosis mayor de 1-2 mg por inyección. Normalmente se usan al menos 10, 20, 50 ó 100  $\mu$ g para cada inyección humana. La masa de inmunogén también depende de la relación molar de epítope inmunogénico dentro del inmunogén con respecto a la masa de inmunogén en conjunto. Normalmente, se usan  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  micromoles de epítope inmunogénico por microgramo de inmunogén. El momento preciso de las inyecciones puede variar significativamente de una vez al día, a una vez al año, a una vez a la década. En cualquier día dado que se administre una dosificación de inmunogén, la dosificación es mayor de 1  $\mu$ g/paciente y normalmente superior a 10  $\mu$ g/paciente si también se administra adyuvante, y superior a 10  $\mu$ g/paciente y normalmente superior a 100  $\mu$ g/paciente en ausencia de adyuvante. Una pauta típica consiste en una inmunización, seguida de inyecciones de refuerzo a intervalos de tiempo, tales como intervalos de 6 semanas. Otra pauta consiste en una inmunización, seguida de inyecciones de refuerzo 1, 2 y 12 meses después. Otro pauta implica una inyección cada dos meses durante toda la vida. Alternativamente, las inyecciones de refuerzo pueden ser irregulares como se indica monitorizando la respuesta inmunitaria.

En el presente documento se desvelan dosis para ácidos nucleicos que codifican inmunógenos que varían de aproximadamente 10 ng a 1 g, 100 ng a 100 mg, 1  $\mu$ g a 10 mg, o 30-300  $\mu$ g de ADN por paciente. Dosis para vectores virales infecciosos varían de 10-100, o más, viriones por dosis.

Para inmunización pasiva con un anticuerpo (en terapias de combinación), la dosificación oscila de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más normalmente 0,01 a 5 mg/kg, del peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser 1 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg o, en otras palabras, 70 mg o 700 mg o dentro del intervalo de 70-700 mg, respectivamente, para un paciente de 70 kg. Una pauta de tratamiento a modo de ejemplo implica la administración de una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. En algunos métodos, dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión se administran simultáneamente, en cuyo caso la dosificación de cada anticuerpo administrado entra dentro de los intervalos indicados. El anticuerpo se administra normalmente en

múltiples ocasiones. Intervalos entre dosificaciones individuales pueden ser semanalmente, mensualmente o anualmente. Los intervalos también pueden ser irregulares, como se indica midiendo los niveles en sangre de anticuerpo para A $\beta$  en el paciente. En algunos métodos, la dosificación se ajusta para lograr una concentración en plasma de anticuerpo de 1-1000  $\mu$ g/ml y en algunos métodos 25-300  $\mu$ g/ml. Alternativamente, el anticuerpo puede administrarse como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere administración menos frecuente. La dosificación y frecuencia varían dependiendo de la semivida del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la semivida más larga, seguido de los anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y anticuerpos no humanos. La dosificación y frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosificación relativamente baja a intervalos relativamente poco frecuentes durante un largo periodo de tiempo. Algunos pacientes continúan el tratamiento durante el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, algunas veces se requiere una dosificación relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que se reduce o termina la progresión de la enfermedad, y preferentemente hasta que el paciente muestra mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. A partir de aquí, al paciente puede administrársele una pauta profiláctica.

Los agentes para inducir una respuesta inmunitaria pueden administrarse por medios parenterales, tópicos, intravenosos, orales, subcutáneos, intrarteriales, intracraneales, intraperitoneales, intranasales o intramusculares para tratamiento profiláctico y/o terapéutico. La vía de administración más típica de un agente inmunogénico es subcutánea, aunque otras vías pueden ser igualmente eficaces. La siguiente vía más común es inyección intramuscular. Este tipo de inyección se realiza lo más normalmente en los músculos del brazo o la pierna. En algunos métodos, los agentes se inyectan directamente en un tejido particular en el que se han acumulado los depósitos, por ejemplo, inyección intracraneal. Se prefieren inyección intramuscular o infusión intravenosa para administración del anticuerpo (en terapias de combinación). En algunos métodos, anticuerpos terapéuticos particulares se inyectan directamente en el cráneo. En algunos métodos, los anticuerpos se administran como una composición de liberación sostenida o dispositivo, tal como un dispositivo Medipad™.

Los agentes descritos en el presente documento se administran frecuentemente como composiciones farmacéuticas que comprenden un agente terapéutico activo, es decir, y una variedad de otros componentes farmacéuticamente aceptables. Véase Remington's Pharmaceutical Science (15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania, 1980). La forma preferida depende del modo previsto de administración y 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 composiciones farmacéuticas para administración animal o humana. El diluyente se selecciona de manera que no afecte la actividad biológica de la combinación. Ejemplos de tales diluyentes son agua destilada, solución salina fisiológica tamponada con fosfato, disolución de Ringer, disolución de dextrosa y disolución de Hank. Además, la composición farmacéutica o formulación también puede incluir otros vehículos, adyuvantes o estabilizadores no tóxicos, no terapéuticos, no inmunogénicos y similares.

Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir macromoléculas grandes lentamente metabolizadas tales como proteínas, polisacáridos tales como quitosano, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos y copolímeros (tales como Sepharose(TM) funcionalizada con látex, agarosa, celulosa y similares), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y agregados de lípidos (tales como gotitas de aceite o liposomas). Adicionalmente, estos vehículos pueden servir de agentes inmunoestimulantes (es decir, adyuvantes).

Para administración parenteral, los agentes desvelados en el presente documento pueden administrarse como dosificaciones inyectables de una disolución 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, pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, tensioactivos, sustancias de tamponamiento del pH y similares en las composiciones. Otros componentes de composiciones farmacéuticas son aquellos de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja y aceite mineral. En general, glicoles tales como propilenglicol o polietilenglicol son vehículos líquidos preferidos, particularmente para disoluciones inyectables. Los anticuerpos pueden administrarse en forma de una inyección de liberación prolongada o preparación de implante que puede formularse de tal manera que se permita una liberación sostenida del principio activo. Una composición a modo de ejemplo comprende anticuerpo monoclonal a 5 mg/ml, formulado en tampón acuoso que consiste en L-histidina 50 mM, NaCl 150 mM, ajustado a pH 6,0 con HCl. Las composiciones para administración parenteral normalmente son sustancialmente estériles, isotónicas y se fabrican bajo condiciones de GMP de la FDA o agencia similar.

Normalmente, las composiciones se preparan como inyectables, tanto como disoluciones líquidas como suspensiones; 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, poliglicolida o copolímero para efecto adyuvante potenciado, como se trata anteriormente (véase Langer, Science 249, 1527 (1990) y Hanes Advanced Drug Delivery Reviews 28, 97-119 (1997)). Los agentes desvelados en el presente documento pueden administrarse en forma de una inyección de liberación prolongada o preparación de implante que puede formularse de tal manera que permita una liberación sostenida o pulsada del principio activo.

Formulaciones adicionales adecuadas para otros modos de administración incluyen formulaciones orales, intranasales y pulmonares, supositorios y aplicaciones transdérmicas.

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

15 La administración tópica puede producir administración transdérmica o intradérmica. La administración tópica puede facilitarse por la co-administración del agente con toxina del cólera o derivados desintoxicados o subunidades de los mismos u otras toxinas bacterianas similares (véase Glenn et al., Nature 391, 851 (1998)). La co-administración puede lograrse usando los componentes como una mezcla o como moléculas enlazadas obtenidas por reticulación química o expresión como una proteína de fusión.

20 Alternativamente, la administración transdérmica puede lograrse usando una trayectoria de la piel o usando transferosomas (Paul et al., Eur. J. Immunol. 25, 3521-24 (1995); Cevc et al., Biochem. Biophys. Acta 1368, 201-15 (1998)).

#### X. Métodos de monitorización

25 La divulgación proporciona métodos de detección de una respuesta de anticuerpos contra el péptido A $\beta$  en un paciente que padece o susceptible a una enfermedad amiloidogénica. Los métodos son particularmente útiles para monitorizar una evolución del tratamiento que se administra a un paciente. Los métodos pueden usarse para monitorizar tanto tratamiento terapéutico en pacientes sintomáticos como tratamiento profiláctico en pacientes asintomáticos. Algunos métodos conllevan determinar un valor de referencia de una respuesta de anticuerpos en un paciente antes administrar una dosificación de un agente inmunogénico, y comparar éste con un valor para la respuesta inmunitaria después del tratamiento. Un aumento significativo (es decir, superior al margen típico del error experimental en mediciones repetidas de la misma muestra, expresado como una desviación estándar de la media de tales mediciones) en el valor de la respuesta de anticuerpos señala un resultado del tratamiento positivo (es decir, que la administración del agente ha logrado o aumentado una respuesta inmunitaria). Si el valor para la respuesta de anticuerpos no cambia significativamente, o disminuye, se indica un resultado del tratamiento negativo.

35 En general, se espera que los pacientes que experimentan un ciclo inicial de tratamiento con un agente inmunogénico muestren un aumento en la respuesta de anticuerpos con dosificaciones sucesivas, que con el tiempo alcanza una meseta. La administración de agente continúa generalmente mientras que está aumentando la respuesta del anticuerpo. El logro de la meseta es un indicador de que el tratamiento administrado puede interrumpirse o reducirse en dosificación o frecuencia.

40 En otros métodos, un valor de control (es decir, una media y desviación estándar) de una respuesta de anticuerpos se determina para una población de control. Normalmente, los individuos en la población de control no han recibido tratamiento previo. Entonces, los valores medidos de la respuesta de anticuerpos en un paciente después de administrar un agente terapéutico se comparan con el valor de control. Un aumento significativo con respecto al valor de control (por ejemplo, superior a una desviación estándar de la media) señala un resultado del tratamiento positivo. Una falta de aumento significativo o una disminución señala un resultado del tratamiento negativo. La administración de agente continúa generalmente mientras que la respuesta de anticuerpos está aumentando con respecto al valor de control. Como antes, la obtención de una meseta con respecto a los valores de control es un indicador de que la administración de tratamiento puede interrumpirse o reducirse en dosificación o frecuencia.

50 En otros métodos, un valor de control de la respuesta de anticuerpos (por ejemplo, una media y desviación estándar) se determina a partir de una población de control de individuos que se han sometido a tratamiento con un agente terapéutico y cuyas respuestas de anticuerpos han alcanzado una meseta en respuesta al tratamiento. Los valores medidos de la respuesta de anticuerpos en un paciente se comparan con el valor de control. Si el nivel medido en un paciente no es significativamente diferente (por ejemplo, más de una desviación estándar) del valor de control, el tratamiento puede interrumpirse. Si el nivel en un paciente está significativamente por debajo del valor de control, se garantiza la administración continuada del agente. Si el nivel en el paciente continúa por debajo del valor de control, entonces puede indicarse un cambio en la pauta de tratamiento, por ejemplo, uso de un adyuvante diferente, fragmento o cambio a administración pasiva.

60 En otros métodos, un paciente que no está presentemente recibiendo tratamiento, pero ha experimentado un ciclo previo de tratamiento, se monitoriza para respuesta de anticuerpos para determinar si se requiere una reanudación del tratamiento. El valor medido de la respuesta de anticuerpos en el paciente puede compararse con un valor de respuesta de anticuerpos previamente logrado en el paciente después de un ciclo previo de tratamiento. Una disminución significativa con respecto a la medición previa (es decir, superior a un margen típico de error en mediciones repetidas de la misma muestra) es una indicación de que puede reanudarse el tratamiento.

65



Alternativamente, el valor medido en un paciente puede compararse con un valor de control (media más desviación estándar) determinado en una población de pacientes después de someterse a un ciclo de tratamiento. Alternativamente, el valor medido en un paciente puede compararse con un valor de control en poblaciones de pacientes profilácticamente tratados que siguen libres de síntomas de enfermedad, o poblaciones de pacientes terapéuticamente tratados que muestran mejora de las características de enfermedad. En todos estos casos, una disminución significativa con respecto al nivel de control (es decir, superior a una desviación estándar) es un indicador de que el tratamiento debe reanudarse en un paciente.

La muestra de tejido para análisis normalmente es sangre, plasma, suero, líquido mucoso o cefalorraquídeo del paciente. La muestra se analiza para la indicación de una respuesta inmunitaria a cualquier forma del péptido A $\beta$ , normalmente A $\beta$ 42 o el péptido usado para inmunización. La respuesta inmunitaria puede determinarse a partir de la presencia de anticuerpos que se unen específicamente al péptido A $\beta$ . Los anticuerpos pueden detectarse en un ensayo de unión a un ligando que se une específicamente a los anticuerpos. Normalmente, el ligando se inmoviliza. La unión puede detectarse usando un anticuerpo antiidiotípico marcado.

En pautas de combinación que emplean administración tanto activa como pasiva, pueden usarse enfoques análogos para monitorizar los niveles de anticuerpo resultantes de la administración pasiva como se describe en el documento WO 00/72880.

### Ejemplos

#### Materiales y métodos

**Fragmentos de A $\beta$ .** Péptidos correspondientes a A $\beta$ 1-5, A $\beta$ 3-9, A $\beta$ 5-11, A $\beta$ 15-24 y la secuencia inversa A $\beta$ 5-1 se sintetizaron contiguos a un epítipo de linfocitos T de 17 aminoácidos derivado de ovoalbúmina (aminoácidos 323-339 - ISQAVHAAHAEINEAGR (SEC ID N°: 3)) sobre una región estructural de péptido ramificado (núcleo de lisina triple con cuatro brazos de péptido) para producir un péptido multi-antigénico, como se describe por Tam, J. P. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5409-5413. Se produjeron anticuerpos policlonales (Pab) A $\beta$ 1-42 y se aisló la fracción de inmunoglobulina, como se ha descrito previamente por Bard, F. et al., (2000) Nat. Med. 6, 916-919. Se obtuvieron Pab-EL16, Pab-EL17 y Pab-EL20 policlonales de los sueros de ratones PDAPP inmunizados con péptidos correspondientes respectivamente a A $\beta$ 1-7, A $\beta$ 15-24 y A $\beta$ 3-9 que se habían sintetizado en una región estructural ramificada, como se ha descrito anteriormente. Pab-EL26 se obtuvo de los sueros de ratones inmunizados con A $\beta$ (7-1)-42. Los péptidos se sintetizaron por AnaSpec, San Jose, CA, EE.UU.

**Procedimientos de inmunización.** Se administraron 100  $\mu$ g de fragmento de A $\beta$  por inyección intraperitoneal en adyuvante completo de Freund, seguido de refuerzos con 100  $\mu$ g de péptido en adyuvante incompleto de Freund a las 2 y 4 semanas, y mensualmente a partir de aquí.

**Unión del anticuerpo a A $\beta$ 1-42 agregado y soluble.** Se realizaron títulos del suero (determinados por dilución sucesiva) y anticuerpo monoclonal que se une a A $\beta$ 1-42 sintético agregado por ELISA como se describe previamente por Schenk D. et al., (1999) Nature 400, 173-177. A $\beta$ 1-42 soluble se refiere al péptido A $\beta$ 1-42 sintético sonicado en sulfóxido de dimetilo. Se incubaron diluciones sucesivas de anticuerpo con 50.000 cpm de <sup>125</sup>I-A $\beta$ 1-42 durante la noche a temperatura ambiente. Se incubaron 50  $\mu$ l de una suspensión que contenía 75 mg/ml de proteína A-Sepharose (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia)/200  $\mu$ g de conejo anti-IgG de ratón (H+L) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, EE.UU.) con los anticuerpos diluidos durante 1 h a temperatura ambiente, se lavaron dos veces y se contaron en un contador gamma Wallac (PerkinElmer Life Science, Grove, IL, EE.UU.). Todas las etapas se realizaron en tampón de radioinmunoensayo que consiste en Tris 10 mM, NaCl 0,5 M, 1 mg/ml de gelatina y 0,5 % de Nonidet P-40, pH 8,0.

#### Resultados

Se compararon una serie de péptidos para su capacidad para desencadenar una respuesta eficaz de anticuerpos *in vivo*. Se inmunizaron ratones PDAPP de doce a trece meses de edad con uno de los tres fragmentos de péptido del extremo N (A $\beta$ 1-5, A $\beta$ 3-9 o A $\beta$ 5-11) o un fragmento derivado de una región interna del péptido (A $\beta$ 15-24) (Fig 1a). El péptido interno A $\beta$ 15-24 engloba el epítipo del anticuerpo 266, que presenta alta afinidad por A $\beta$  soluble (Seubert et al., (1992) Nature 359, 325-327), no reconoce placas en secciones de tejido de EA o PDAPP sin fijar. Así, era de interés determinar si una respuesta policlonal dirigida contra este péptido podría producir anticuerpos capaces del reconocimiento de placa, o si la reactividad con A $\beta$  soluble solo era suficiente o no para proporcionar eficacia. En estos estudios, un péptido con secuencia inversa, A $\beta$ 5-1, sirvió de control negativo. Los péptidos se sintetizaron contiguos a un epítipo de linfocitos T de 17 aminoácidos derivado de ovoalbúmina y se presentaron en una configuración multivalente idéntica (véase Materiales y métodos). Todos los péptidos (excepto el reversémero A $\beta$ 5-1) produjeron sueros que reconocieron A $\beta$ 1-42 sintético agregado por ELISA, aunque A $\beta$ 1-11 y A $\beta$ 15-24 produjeron títulos significativamente mayores que A $\beta$ 1-5 ( $p < 0,01$  y  $p < 0,05$ , respectivamente) (Fig. 1b). A diferencia, solo los sueros contra los péptidos del extremo N fueron capaces de reconocer A $\beta$  dentro de placas; los antisueros contra A $\beta$ 15-24 no se unieron a placas a pesar de la fuerte reactividad con el péptido agregado sintético (Fig. 1c). También hubo diferencias entre los grupos de suero en su capacidad para capturar A $\beta$  soluble (Fig. 2a). Menos del 30 % de los sueros de ratones inmunizados con A $\beta$ 1-5 o A $\beta$ 3-9 capturaron el péptido soluble (27 % y 5 %, respectivamente).

A diferencia, los sueros de aproximadamente la mitad de los animales inmunizados con A $\beta$ 5-11, y todos de aquellos inmunizados con A $\beta$ 15-24, capturaron A $\beta$ 1-42 soluble.

Debido a que el grado de deposición de A $\beta$  puede variar enormemente a medida que envejecen los ratones PDAPP, el estudio *in vivo* se diseñó con al menos 30 animales por grupo. Se muestran datos de eficacia para ratones individuales y se expresaron como el porcentaje de tanto la carga de amiloide como la distrofia neurítica con respecto a la media del control (fijada al 100 %). La inmunización con cada uno de los tres péptidos del extremo N redujo significativamente la carga de amiloide (46-61 %,  $p < 0,002$ ) (Fig. 2b). Además, A $\beta$ 3-9 y A $\beta$ 5-11 redujeron significativamente la patología neurítica (34 % y 41 %, respectivamente,  $p < 0,05$ ), (Fig 2c). La inmunización con A $\beta$ 15-24 no proporcionó protección contra ni la carga de amiloide ni la patología neurítica. Estos resultados soportan la unión de placa como un mecanismo para la eficacia de anticuerpos. También indican que la captura de A $\beta$  soluble no se requiere para la reducción de patología neurítica, ya que la respuesta de anticuerpos contra A $\beta$ 3-9 proporcionó fuerte reactividad de la placa y el mayor nivel de protección contra distrofia neuronal, aunque presentó la capacidad más débil para el reconocimiento de péptido soluble. Los anticuerpos que se unen a A $\beta$  soluble sin unirse a placas pueden también tener tal actividad si se administran a mayores títulos o durante periodos de tiempo más largos. Los anticuerpos que se unen a A $\beta$  soluble sin unirse a placas también pueden ser útiles en prevenir la formación y/o deposición adicional de A $\beta$ . El alto título de anticuerpos generado por inmunización con A $\beta$ 15-24 indica que este fragmento y subfragmentos de los mismos son particularmente útiles para generar altos títulos de anticuerpos solubles para este fin.

Aunque la anterior invención se ha descrito en detalle para fines de claridad de entendimiento, será obvio que ciertas modificaciones pueden ponerse en práctica dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. A menos que sea de otro modo evidente del contexto, cada elemento, característica o realización de la invención puede usarse en combinación entre sí.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un medicamento que comprende un fragmento de A $\beta$  que consiste en A $\beta$ 16-23 (KLVFFAED) en la forma de aminoácido humano natural; en el que el fragmento está ligado a una molécula de vehículo para formar un conjugado que ayuda a provocar una respuesta inmunitaria contra el fragmento; para efectuar el tratamiento o profilaxis de una enfermedad asociada a depósitos de amiloide de A $\beta$  en el cerebro de un paciente, por lo que los anticuerpos inducidos se unen específicamente a A $\beta$  soluble en el paciente, inhibiendo así la formación de depósitos de amiloide de A $\beta$  en el cerebro de A $\beta$  soluble y efectuando así el tratamiento o profilaxis de la enfermedad.
- 10 2. El medicamento de la reivindicación 1, en el que tratar o efectuar la profilaxis de la enfermedad comprende administrar en combinación con dicho medicamento un fragmento de A $\beta$  que induce anticuerpos que se unen específicamente a A $\beta$  en uno o más epítopes dentro de A $\beta$ 1-11.
- 15 3. El medicamento de la reivindicación 2, en el que el fragmento de A $\beta$  que induce anticuerpos que se unen específicamente a A $\beta$  en un epítope dentro de A $\beta$ 1-11 es adecuado para administración antes del fragmento de A $\beta$ 16-23.
- 20 4. El medicamento de la reivindicación 1, el que tratar o efectuar la profilaxis de la enfermedad comprende administrar en combinación con dicho medicamento un anticuerpo que se une específicamente a A $\beta$  en un epítope con A $\beta$ 1-11.
- 25 5. El medicamento de la reivindicación 4, en el que el anticuerpo que se une específicamente a A $\beta$  en un epítope dentro de A $\beta$ 1-11 es adecuado para administración antes del fragmento de A $\beta$ 16-23.
- 30 6. El medicamento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la enfermedad se caracteriza por deterioro cognitivo.
- 30 7. El medicamento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la enfermedad está seleccionada del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down y deterioro cognitivo leve.
- 35 8. El medicamento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que tratar o efectuar la profilaxis de la enfermedad comprende monitorizar los anticuerpos inducidos en el paciente.
- 35 9. El medicamento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el paciente es asintomático.
- 40 10. El medicamento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el paciente es sintomático y el medicamento inhibe el deterioro de los síntomas del paciente.
- 40 11. El medicamento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el paciente tiene menos de 50 años de edad.
- 45 12. El medicamento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el paciente tiene un factor de riesgo heredado que indica susceptibilidad a enfermedad de Alzheimer.
- 45 13. El medicamento de la reivindicación 9, en el que el paciente no desarrolla síntomas detectables durante cinco años después de realizarse por primera vez el tratamiento o profilaxis.
- 50 14. El medicamento de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 y 13, en el que el paciente no tiene factores de riesgo conocidos para enfermedad de Alzheimer.
- 50 15. El medicamento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es adecuado para administración a una dosificación de al menos 50 microgramos del fragmento durante una pluralidad de días.
- 55 16. El medicamento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es adecuado para administración en múltiples dosificaciones durante un periodo de al menos tres meses.
- 55 17. El medicamento de la reivindicación 16, en el que las dosificaciones son al menos 50 microgramos.
- 60 18. El medicamento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además un adyuvante que aumenta el nivel de anticuerpos inducidos por el fragmento.
- 60 19. El medicamento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es adecuado para administración intraperitoneal, oral, intranasal, subcutánea, intramuscular, tópica o intravenosa.
- 65 20. El medicamento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que tratar o efectuar la profilaxis de la

enfermedad comprende además monitorizar el paciente para nivel de anticuerpos inducidos en la sangre del paciente.

- 5 21. El medicamento de la reivindicación 1, en el que el vehículo es un polipéptido heterólogo.
22. El medicamento de la reivindicación 1, en el que múltiples copias del fragmento están ligadas a una molécula de vehículo para formar un conjugado.
- 10 23. El medicamento de la reivindicación 1, en el que múltiples copias del fragmento están ligadas a múltiples copias de la molécula de vehículo, que están ligadas entre sí.
24. El medicamento de la reivindicación 21, en el que el polipéptido heterólogo comprende QYIKANSKFIGITEL (SEC ID N°: 8).
- 15 25. El medicamento de la reivindicación 21, en el que el polipéptido heterólogo comprende la secuencia de aminoácidos AKXVAAWTLKAAA (SEC ID N°: 11).
- 20 26. El medicamento de la reivindicación 21, en el que el polipéptido induce una respuesta de linfocitos T contra el polipéptido heterólogo y así una respuesta de linfocitos B contra el fragmento.
27. El medicamento de la reivindicación 1, en el que tratar o efectuar la profilaxis comprende además administrar un adyuvante que potencia el título y/o afinidad de unión de los anticuerpos inducidos con respecto al título y/o afinidad de unión de los anticuerpos inducidos por el fragmento solo.
- 25 28. El medicamento de la reivindicación 27, que comprende el adyuvante y el fragmento.
29. El medicamento de la reivindicación 27, en el que el adyuvante es adecuado para administración antes del fragmento.
- 30 30. El medicamento de la reivindicación 27, en el que el adyuvante es adecuado para administración después del fragmento.
31. El medicamento de la reivindicación 27, en el que el adyuvante está seleccionado del grupo que consiste en alumbre, MPL, QS-21 y adyuvante incompleto de Freund.
- 35 32. El medicamento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende el fragmento a una dosificación superior a 10 microgramos.

40

45

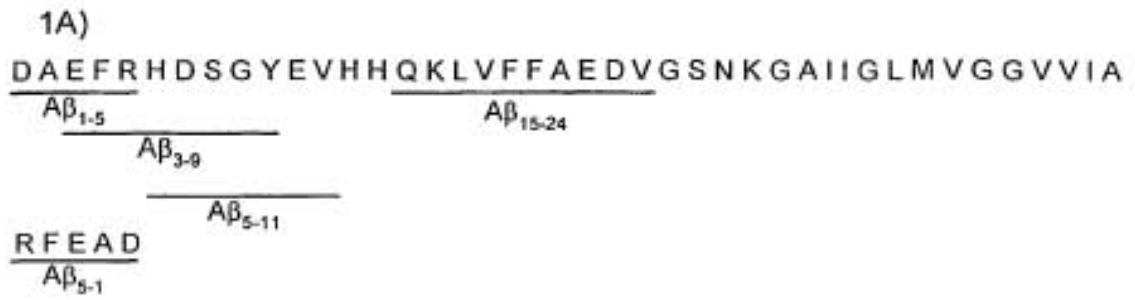
50

55

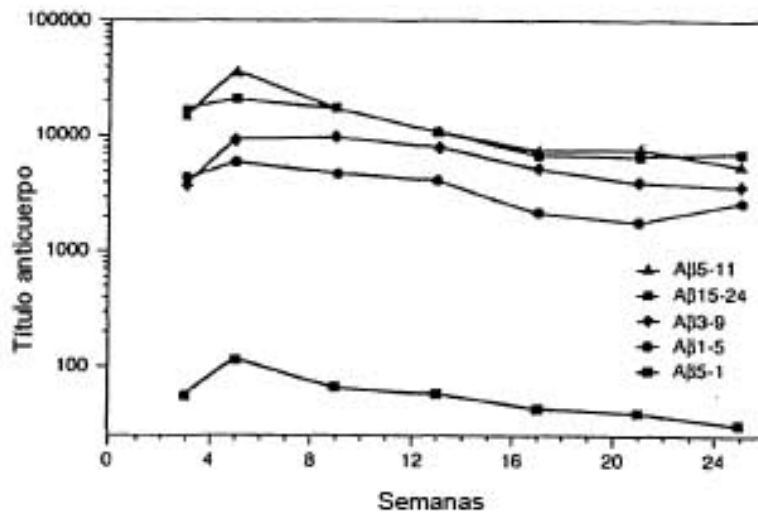
60

65

# Figura 1



1B)



1C)

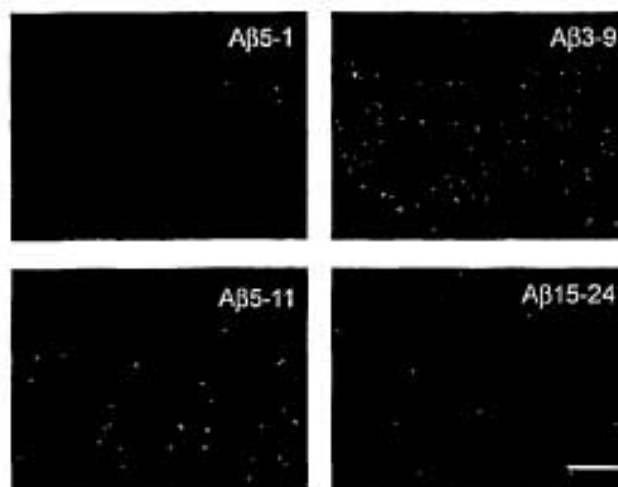
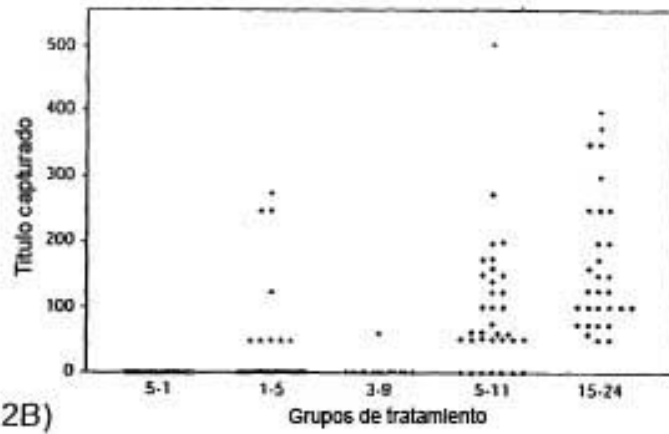
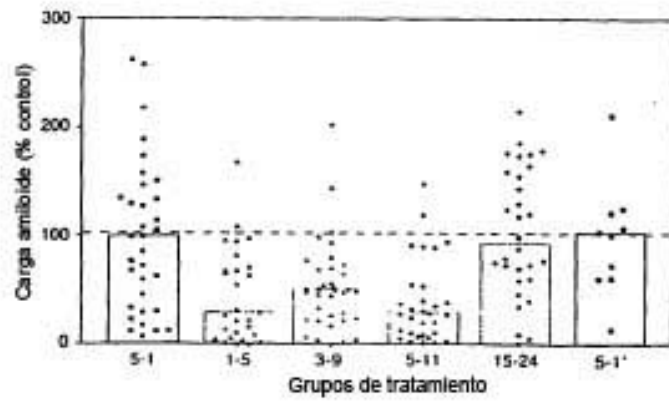


Figura 2

2A)



2B)



2C)

