

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 175**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 39/38** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2004** **E 04814839 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2015** **EP 1701968**

54 Título: **Conjugados transportadores de péptidos inmunogénicos y métodos para producirlos**

30 Prioridad:

**17.12.2003 US 530480 P**

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

**21.09.2015**

73 Titular/es:

**WYETH LLC (100.0%)**  
**235 East 42nd Street**  
**New York, NY 10017, US**

72 Inventor/es:

**ARUMUGHAM, RASAPPA G. y**  
**PRASAD, A. KRISHNA**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 546 175 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).

## Conjugados transportadores de péptidos inmunogénicos y métodos para producirlos

### Descripción

#### 5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La esencia de la inmunidad adaptativa es la capacidad de un organismo para reaccionar ante la presencia de sustancias extrañas y producir componentes (anticuerpos y células) capaces de interactuar específicamente con y proteger al hospedador frente a la invasión. Un "*antígeno*" o "*inmunógeno*" es una sustancia capaz de inducir este tipo de respuesta inmunitaria y también capaz de interactuar con los anticuerpos y células sensibilizadas que se generan en su contra.

Los antígenos o inmunógenos son normalmente macromoléculas que contienen sitios antigénicos o "*epítomos*" distintos que son reconocidos e interactúan con los diversos componentes del sistema inmunitario. Pueden existir como moléculas individuales o compuestas por productos químicos sintéticos orgánicos, proteínas, lipoproteínas, glicoproteínas, ARN, ADN o polisacáridos, o pueden ser partes de estructuras celulares (bacterias u hongos) o virus (Harlow y Lane 1988a, b, c; Male *et al.*, 1987).

Las moléculas pequeñas tales como péptidos cortos, aunque normalmente capaces de interactuar con los productos de una respuesta inmunitaria, con frecuencia no pueden inducir una respuesta por sí solos. Estos inmunógenos peptídicos o "*haptenos*" como también se denominan, son en realidad antígenos incompletos, y, aunque no son capaces por sí mismos de provocar la inmunogenicidad o inducir la producción de anticuerpos, pueden hacerse inmunogénicos acoplándolos a un transportador adecuado. Los transportadores son por lo general antígenos proteicos de mayor peso molecular que son capaces de inducir una respuesta inmunitaria cuando se administran *in vivo*.

En una respuesta inmunitaria, los anticuerpos son producidos y secretados por los linfocitos B junto con los linfocitos T cooperadores ( $T_H$ ). En la mayoría de los sistemas hapteno-transportador, los linfocitos B producen anticuerpos que son específicos tanto para el hapteno como para el transportador. En estos casos, los linfocitos T tendrán dominios de unión específicos en el transportador, pero no reconocerán al hapteno en solitario. En una especie de sinergia, los linfocitos B y T cooperan para inducir una respuesta de anticuerpos específica de hapteno. Después de producirse una respuesta inmunitaria de este tipo, si el hospedador es posteriormente provocado con sólo el hapteno, responderá normalmente produciendo anticuerpos específicos de hapteno a partir de células de memoria formadas después de la inmunización inicial.

Con frecuencia, haptenos sintéticos que imitan algunas estructuras epitópicas críticas en macromoléculas más grandes se conjugan con transportadores para crear una respuesta inmunitaria contra la molécula "parental" más grande. Por ejemplo, pueden sintetizarse segmentos de péptidos cortos a partir de la secuencia conocida de una proteína y acoplarse a un transportador para inducir inmunogenicidad contra la proteína nativa. Este tipo de enfoque sintético para la producción de inmunógenos se ha convertido en la base de gran parte de la investigación actual en la creación de vacunas. Sin embargo, en muchos casos, la mera creación de una respuesta de linfocitos B utilizando conjugados péptido-transportador sintéticos, aunque bien diseñados, no siempre garantizará la inmunidad protectora completa contra un antígeno intacto. La respuesta inmunitaria generada por un epítipo peptídico corto de una célula bacteriana o partícula viral más grande solamente puede ser suficiente para generar memoria a nivel de linfocitos B. En estos casos está generalmente aceptado actualmente que una respuesta citotóxica de linfocitos T es un indicador más importante de inmunidad protectora. El diseño de inmunógenos peptídicos con los sitios de unión epitópicos adecuados para el reconocimiento tanto de linfocitos B como de linfocitos T es una de las áreas de investigación en inmunología más desafiantes hoy en día.

El enfoque para aumentar la inmunogenicidad de moléculas pequeñas o escasamente inmunogénicas conjugando estas moléculas con moléculas "transportadoras" grandes se ha utilizado con éxito durante décadas (véase, por ejemplo, Goebel *et al.* (1939) J. Exp. Med. 69: 53). Por ejemplo, se han descrito muchas composiciones inmunogénicas en las que se han conjugado polímeros capsulares purificados con proteínas transportadoras para crear composiciones inmunogénicas más eficaces aprovechando este "efecto transportador" (Schneerson *et al.* (1984) Infect. Immun. 45: 582-591). La conjugación también ha demostrado eludir la escasa respuesta de anticuerpos que suele observarse en lactantes cuando son inmunizados con un polisacárido libre (Anderson *et al.* (1985) J. Pediatr. 107: 346; Insel *et al.* (1986) J. Exp. Med. 158: 294).

Se han generado con éxito conjugados hapteno-transportador utilizando diversos reactivos de entrecruzamiento/acoplamiento tales como entrecruzadores homobifuncionales, heterobifuncionales o de longitud cero. Se dispone en la actualidad de muchos de tales métodos para el acoplamiento de sacáridos, proteínas y péptidos a transportadores peptídicos. La mayoría de los métodos crean enlaces amina, amida, uretano, isotiurea o disulfuro, o en algunos casos tioéteres. Una desventaja con el uso de reactivos de acoplamiento, que introducen sitios reactivos en las cadenas laterales de las moléculas de aminoácido reactivas en las moléculas de transportador y/o de hapteno, es que si no se neutralizan los sitios reactivos, pueden reaccionar con cualquier molécula no deseada, ya sea *in vitro* (perjudicando así a la funcionalidad o la estabilidad del conjugado o conjugados) o *in vivo* (lo

que entraña un riesgo potencial de reacciones adversas en personas o animales inmunizados con las preparaciones). Tales sitios reactivos en exceso pueden hacerse reaccionar o "protegerse (be capped)", para inactivar estos sitios, utilizando diversas reacciones químicas conocidas, pero estas reacciones pueden ser perjudiciales de otro modo para la funcionalidad de los conjugados. Esto puede resultar especialmente problemático cuando se intenta crear un conjugado introduciendo los sitios reactivos en la molécula transportadora, ya que su mayor tamaño y estructura más compleja (con respecto al hapteno) pueden hacerla más vulnerable a los efectos perjudiciales del tratamiento químico. De hecho, no se conocen ejemplos de métodos mediante los que producir un conjugado activando en primer lugar el transportador, haciéndolo reaccionar a continuación con el hapteno en una reacción de conjugación y finalmente "protegiendo (capping)" los sitios reactivos restantes, al tiempo que se preserva la capacidad del conjugado resultante para actuar como composición inmunogénica con las propiedades deseadas de "efecto transportador". El documento WO-A-93/15760 se refiere a un constructo inmunogénico transportador doble que consiste en al menos un transportador primario que comprende una molécula de gran peso molecular superior a un peso molecular de 70 kD y al menos un transportador secundario que comprende un antígeno dependiente de T conjugado con una transportador primario. En el documento EP 0941738 se describe un método para conjugar un polisacárido con una proteína transportadora.

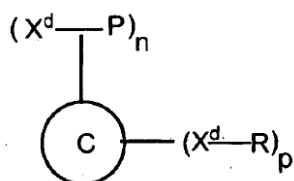
#### BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método para conjugar un inmunógeno peptídico mediante un grupo reactivo de un resto aminoácido del inmunógeno peptídico con un transportador proteico/poli-peptídico que tiene uno o más grupos funcionales, comprendiendo el método las etapas de:

(a) derivatizar uno o más de los grupos funcionales del transportador proteico/poli-peptídico para generar un transportador derivatizado con sitios reactivos, en el que el transportador está seleccionado del grupo que consiste en CRM<sub>197</sub>, ORF1224 de *Streptococcus pyogenes*, ORF1664 de *Streptococcus pyogenes*, ORF2452 de *Streptococcus pyogenes* y ORF T858 de *Chlamydia pneumoniae*;

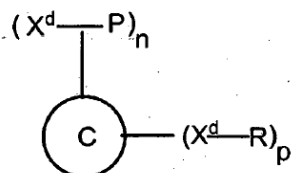
(b) hacer reaccionar el transportador proteico/poli-peptídico derivatizado de la etapa (a) con un grupo reactivo de un aminoácido del inmunógeno peptídico en condiciones de reacción tales que el inmunógeno peptídico se conjuga con el transportador proteico/poli-peptídico derivatizado mediante los grupos funcionales; y

(c) hacer reaccionar adicionalmente el conjugado con N-acetilcisteamina para inactivar los grupos funcionales libres reactivos sin reaccionar en el transportador proteico/poli-peptídico derivatizado, preservando así la funcionalidad del transportador, de manera que conserve su capacidad para inducir las respuestas inmunitarias deseadas contra el inmunógeno peptídico que de otra manera no se producirían sin un transportador, en el que el conjugado tiene la fórmula:



en la que C es el transportador proteico/poli-peptídico,  $X^d$  es un grupo funcional derivatizado del transportador proteico/poli-peptídico, P es el inmunógeno peptídico, R es una molécula de protección, n es un número entero superior a 0, pero inferior o igual a 85, y p es un número entero superior a 0, pero inferior o igual a 85.

La presente invención también se refiere a un conjugado inmunógeno peptídico-transportador proteico/poli-peptídico que tiene la fórmula:



en la que,

C es el transportador proteico/poli-peptídico seleccionado del grupo que consiste en CRM<sub>197</sub>, ORF1224 de *Streptococcus pyogenes*, ORF1664 de *Streptococcus pyogenes*, ORF2452 de *Streptococcus pyogenes* y ORF T858 de *Chlamydia pneumoniae*,

$X^d$  es un grupo funcional derivatizado de un resto aminoácido del transportador proteico/poli-peptídico,

P es una molécula de inmunógeno peptídico fijada covalentemente al grupo funcional derivatizado del resto aminoacídico del transportador proteico/polipeptídico,

R es una molécula de protección formada por la reacción del conjugado con N-acetilcisteamina fijada covalentemente al grupo funcional derivatizado de un resto aminoacídico del transportador proteico/polipeptídico, preservando así la funcionalidad del transportador de manera que conserve su capacidad para inducir las respuestas inmunitarias deseadas contra el inmunógeno peptídico que de otra manera no se producirían sin un transportador,

n es un número entero superior a 0, pero inferior o igual a 85, y

p es un número entero superior a 0, pero inferior o igual a 85.

La descripción proporciona métodos de producción de un conjugado inmunogénico de un inmunógeno peptídico con un transportador proteico/polipeptídico, en el que el inmunógeno peptídico está conjugado con el transportador mediante grupos funcionales derivatizados de restos aminoacídicos del transportador, tales como restos lisina, y en el que cualquier grupo funcional derivatizado no conjugado de los restos aminoacídicos se inactiva mediante protección para bloquearlos y evitar que reaccionen con otras moléculas, incluidas proteínas/polipéptidos, preservando así la funcionalidad del transportador, de manera que conserve su capacidad para inducir las respuestas inmunitarias deseadas contra el inmunógeno peptídico que de otra manera no se producirían sin un transportador. Además, la invención se refiere también a conjugados producidos mediante los métodos anteriormente indicados, y a composiciones inmunogénicas que contienen tales conjugados.

La descripción proporciona un primer método para conjugar un inmunógeno peptídico mediante un grupo reactivo de un resto aminoacídico del inmunógeno peptídico con un transportador proteico/polipeptídico que tiene uno o más grupos funcionales, comprendiendo el método las etapas de: (a) derivatizar uno o más de los grupos funcionales del transportador proteico/polipeptídico para generar una molécula derivatizada con sitios reactivos; (b) hacer reaccionar el transportador proteico/polipeptídico derivatizado de la etapa (a) con un grupo reactivo de un resto aminoacídico del inmunógeno peptídico en condiciones de reacción tales que el inmunógeno peptídico se conjugue con el transportador proteico/polipeptídico derivatizado mediante los grupos funcionales; y (c) hacer reaccionar adicionalmente el conjugado con un reactivo de protección para inactivar los grupos funcionales reactivos libres en el transportador proteico/polipeptídico activado, preservando así la funcionalidad del transportador contra el inmunógeno peptídico que de otra manera no se produciría sin un transportador.

El transportador proteico/polipeptídico de la presente descripción puede seleccionarse del grupo que consiste en seroalbúmina humana, hemocianina de lapa californiana, moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovoalbúmina, hemaglutinina de la gripe, péptido de unión a PAN-DR (polipéptido PADRE), proteína de circumsporozoito (CS) de la malaria, antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg<sub>19-28</sub>), proteína de choque térmico (HSP) 65, bacilo Calmette-Guerin (BCG), toxina del cólera, mutantes de la toxina del cólera con toxicidad reducida, toxina diftérica, proteína CRM<sub>197</sub> que presenta reactividad cruzada con la toxina diftérica, peptidasa C5a estreptocócica recombinante, ORF1224 de *Streptococcus pyogenes*, ORF1664 de *Streptococcus pyogenes*, ORF 2452 de *Streptococcus pyogenes*, ORF T367 de *Chlamydia pneumoniae*, ORF T858 de *Chlamydia pneumoniae*, toxoide tetánico, T1 de gp120 del VIH, componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas adhesivas de la matriz de (MSCRAMM), hormona/factor de crecimiento, citocinas y quimiocinas.

El transportador proteico/polipeptídico de la presente invención puede contener un epítipo de linfocitos T.

El transportador proteico/polipeptídico de la presente descripción puede ser un toxoide bacteriano tal como un toxoide tetánico, toxina del cólera o mutante de la toxina del cólera como se ha descrito anteriormente. En una forma de realización preferente de la presente invención, el transportador proteico/polipeptídico es CRM<sub>197</sub>.

El transportador proteico/polipeptídico de la presente descripción puede ser una hemaglutinina de la gripe, un polipéptido PADRE, una proteína CS de la malaria, un antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg<sub>19-28</sub>), una proteína de choque térmico 65 (HSP 65) o un polipéptido de *Mycobacterium tuberculosis* (BCG).

La divulgación describe que el transportador proteico/polipeptídico está seleccionado de entre la peptidasa rC5a estreptocócica, ORF1224 de *Streptococcus pyogenes*, ORF 1664 de *Streptococcus pyogenes* u ORF2452 de *Streptococcus pyogenes*, ORF T367 de *Chlamydia pneumoniae* y ORF T858 de *Chlamydia pneumoniae*.

En una parte de la presente descripción, el transportador proteico/polipeptídico es una hormona o factor de crecimiento que estimula o potencia la respuesta inmunitaria y que está seleccionado del grupo que consiste en IL-1, IL-2, interferón- $\gamma$ , IL-10, GM-CSF, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  y RANTES.

El inmunógeno peptídico puede seleccionarse de entre una proteína bacteriana, una proteína viral y una proteína eucariota.

El inmunógeno peptídico puede derivarse de un antígeno proteico bacteriano de *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella enterobacter*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae*,

*Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, especies de *Pseudomonas*, *Salmonella typhimurium*, *Borrelia burgdorferi*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii*, *Shigella dysenteriae*, *Alloicoccus otitidis* y estreptococos del grupo B.

5 Como alternativa, el inmunógeno peptídico puede derivarse de un antígeno proteico de un virus seleccionado del grupo que consiste en virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus del herpes simple (HSV), virus del papiloma humano (HPV), virus de la parainfluenza (PIV), virus de la estomatitis vesicular (VSV), virus respiratorio sincicial (RSV), virus de Epstein-Barr (EBV), coronavirus, virus vaccinia, rotavirus, virus de la rabia, virus de la hepatitis C (HCV) y virus de la hepatitis B (HBV).

10 El inmunógeno peptídico también puede derivarse de un antígeno proteico de un hongo seleccionado de una especie de *Candida*, una especie de *Cryptococcus*, una especie de *Coccidioides*, una especie de *Histoplasma* y una especie de *Aspergillus*.

15 El inmunógeno peptídico también puede derivarse de un antígeno proteico de un parásito seleccionado de entre un plasmodio, un tripanosoma, un esquistosoma y una leishmania.

Como alternativa, el inmunógeno peptídico puede derivarse de un antígeno proteico de un eucariota. Preferentemente, el eucariota es un ser humano.

20 El inmunógeno peptídico del ser humano puede derivarse preferentemente de un tumor maligno. Más preferentemente, el inmunógeno peptídico es de un antígeno tumoral de un carcinoma de células renales, un carcinoma de mama, un melanoma y un carcinoma de próstata. Como alternativa, el antígeno peptídico puede derivarse preferentemente del antígeno tumoral antígeno carcinoembrionario (CEA).

25 La descripción proporciona un inmunógeno peptídico que comprende el péptido A $\beta$  o fragmentos de A $\beta$  o análogos del mismo, que induce una respuesta inmunogénica contra determinados epítopos dentro de A $\beta$ . Los péptidos inmunogénicos para su uso según la invención incluyen péptidos heterólogos inmunogénicos. En algunos péptidos inmunogénicos, un fragmento de A $\beta$  se une a un transportador para formar un péptido heterólogo inmunogénico, y a continuación este péptido heterólogo se une a un transportador utilizando un método de la presente invención para formar un conjugado.

30 El inmunógeno peptídico puede ser un polipéptido que comprende un segmento N-terminal de al menos los restos 1-5 de A $\beta$ , siendo el primer resto de A $\beta$  el resto N-terminal del polipéptido, en el que el polipéptido carece de un segmento C-terminal de A $\beta$ . Como alternativa, el inmunógeno peptídico puede ser un polipéptido que comprende un segmento N-terminal de A $\beta$ , comenzando el segmento en el resto 1-3 de A $\beta$  y terminando en los restos 7-11 de A $\beta$ . El inmunógeno peptídico también puede ser un agente que induce una respuesta inmunogénica contra un segmento N-terminal de A $\beta$ , comenzando el segmento en el resto 1-3 de A $\beta$  y terminando en los restos 7-11 de A $\beta$  sin inducir una respuesta inmunogénica contra un epítopo dentro de los restos 12-43 de A $\beta$ 43. También se describe que el inmunógeno peptídico puede ser un polipéptido heterólogo que comprende un segmento de A $\beta$  unido a una secuencia de aminoácidos heteróloga que induce una respuesta de linfocitos T cooperadores contra la secuencia de aminoácidos heteróloga y, de ese modo, una respuesta de linfocitos B contra el segmento N-terminal.

35 En algunos inmunógenos peptídicos, el segmento N-terminal de A $\beta$  está unido en su extremo C-terminal a un polipéptido heterólogo. En algunos inmunógenos peptídicos, el segmento N-terminal de A $\beta$  está unido en su extremo N-terminal a un polipéptido heterólogo. En algunos inmunógenos peptídicos, el segmento N-terminal de A $\beta$  está unido en sus extremos N-terminal y C-terminal a unos polipéptidos heterólogos primero y segundo. En algunos inmunógenos peptídicos, el segmento N-terminal de A $\beta$  está unido en su extremo N-terminal a un polipéptido heterólogo, y en su extremo C-terminal a al menos una copia adicional del segmento N-terminal. En algunos inmunógenos peptídicos, el polipéptido comprende del extremo N-terminal al C-terminal, el segmento N-terminal de A $\beta$ , una pluralidad de copias adicionales del segmento N-terminal, y el segmento de aminoácidos heterólogo.

45 En algunos de los inmunógenos peptídicos anteriormente indicados, el polipéptido comprende adicionalmente al menos una copia adicional del segmento N-terminal. En algunos de los inmunógenos peptídicos anteriormente indicados, el fragmento carece de al menos los 5 aminoácidos C-terminales en A $\beta$ 43.

50 En algunos aspectos de los inmunógenos peptídicos anteriormente indicados, el fragmento comprende hasta 10 aminoácidos contiguos de A $\beta$ .

55 En otro aspecto, el inmunógeno peptídico que comprende el péptido A $\beta$  o fragmentos de A $\beta$  o análogos del mismo que induce una respuesta inmunogénica contra determinados epítopos dentro de A $\beta$  puede estar en una configuración conocida como configuración de péptidos antigénicos múltiples (MAP).

60 En algunos de los aspectos anteriores, el inmunógeno peptídico es de la mitad N-terminal de A $\beta$ . En algunos aspectos, el inmunógeno peptídico es un fragmento de A $\beta$  seleccionado del grupo que consiste en A $\beta$ 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-11, 1-12, 1-16, 3-6 y 3-7. En algunos de los aspectos anteriores, el inmunógeno peptídico es de la región interna de A $\beta$ . En algunos aspectos, el inmunógeno peptídico es un fragmento de A $\beta$  seleccionado del

grupo que consiste en A $\beta$ 13-28, 15-24, 17-28 y 25-35. En algunos de los aspectos anteriores, el inmunógeno peptídico es del extremo C-terminal de A $\beta$ . En algunos aspectos, el inmunógeno peptídico es un fragmento de A $\beta$  seleccionado del grupo que consiste en A $\beta$ 33-42, 35-40 y 35-42. En algunos aspectos, el inmunógeno peptídico es un fragmento de A $\beta$  seleccionado del grupo que consiste en A $\beta$ -3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-11, 1-12, 1-16, 1-28, 3-6, 3-7, 13-28, 15-24, 17-28, 25-35, 33-42, 35-40 y 35-42. En algunos aspectos, el inmunógeno peptídico es un fragmento de A $\beta$  seleccionado del grupo que consiste en A $\beta$ 1-5, A $\beta$ 1-7, A $\beta$ 1-9 y A $\beta$ 1-12. En algunos aspectos, el inmunógeno peptídico es un fragmento de A $\beta$  seleccionado del grupo que consiste en A $\beta$ 1-5-L, A $\beta$ 1-7-L, A $\beta$ 1-9-L y A $\beta$ 1-12-L, en los que L es un conector. En algunos aspectos, el inmunógeno peptídico es un fragmento de A $\beta$  seleccionado del grupo que consiste en A $\beta$ 1-5-L-C, A $\beta$ 1-7-L-C, A $\beta$ 1-9-L-C y A $\beta$ 1-12-L-C, en los que C es un resto aminoácido cisteína.

En algunos aspectos, el inmunógeno peptídico es un fragmento de A $\beta$  seleccionado del grupo que consiste en A $\beta$ 16-22, A $\beta$ 16-23, A $\beta$ 17-23, A $\beta$ 17-24, A $\beta$ 18-24 y A $\beta$ 18-25. En algunos aspectos, el inmunógeno peptídico es un fragmento de A $\beta$  seleccionado del grupo que consiste en A $\beta$ 16-22-C, A $\beta$ 16-23-C, A $\beta$ 17-23-C, A $\beta$ 17-24-C, A $\beta$ 18-24-C y A $\beta$ 18-25-C, en los que C es un resto aminoácido cisteína. En otros aspectos, el inmunógeno peptídico es un fragmento de A $\beta$  seleccionado del grupo que consiste en C-A $\beta$ 16-22, C-A $\beta$ 16-23, C-A $\beta$ 17-23, C-A $\beta$ 17-24, C-A $\beta$ 18-24 y C-A $\beta$ 18-25, en los que C es un resto aminoácido cisteína.

En algunos de los inmunógenos peptídicos anteriormente indicados, el polipéptido heterólogo está seleccionado del grupo que consiste en péptidos que tienen un epítipo de linfocito T, un epítipo de linfocito B y combinaciones de los mismos.

En la presente invención, el grupo funcional de una o más moléculas de aminoácido del transportador proteico/polipeptídico o del conector polipeptídico opcionalmente fijado se derivatiza utilizando un reactivo de entrecruzamiento. En una forma de realización, el reactivo de derivatización es un reactivo de entrecruzamiento de longitud cero. En otra forma de realización, el reactivo de derivatización es un reactivo de entrecruzamiento homobifuncional. En aún otra forma de realización, el reactivo de derivatización es un reactivo de entrecruzamiento heterobifuncional.

En una forma de realización preferente, el reactivo heterobifuncional es un reactivo que reacciona con un grupo funcional primario o  $\epsilon$ -amina de una o más moléculas de aminoácido del transportador proteico/polipeptídico y un grupo tiol colgante de una o más moléculas de aminoácido del inmunógeno peptídico. En una forma de realización, el reactivo heterobifuncional es bromoacetato de N-succinimidilo.

En otra forma de realización, el grupo funcional primario o  $\epsilon$ -amina es lisina. En aún otra forma de realización, la derivatización del grupo funcional primario o  $\epsilon$ -amina de la lisina del transportador proteico/polipeptídico con el bromoacetato de N-succinimidilo da como resultado la bromoacetilación de los restos primario o  $\epsilon$ -amina en las moléculas de lisina en el transportador proteico/polipeptídico. En una forma de realización más preferente, el grupo tiol colgante es un resto cisteína del inmunógeno peptídico, que puede estar situado en el extremo amino terminal del inmunógeno peptídico, en el extremo carboxilo terminal del inmunógeno peptídico o internamente en el inmunógeno peptídico.

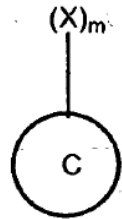
En otra forma de realización, el grupo tiol colgante es generado por un reactivo de tiolación tal como N-acetil homocisteína tiolactona, el reactivo de Traut (2-iminotilano), SATA (S-acetiltioacetato de N-succinimidilo), SMPT (4-Succinimidiloxycarbonil-metil-2-piridilditio tolueno), sulfo LC SPDP (sulfo succinimidil piridil ditio propionamido hexanoato), SPDP (succinimidil piridil ditio propionato). En una forma de realización preferente, el reactivo de protección que se utiliza para inactivar los grupos funcionales reactivos libres en el transportador proteico/polipeptídico activado está seleccionado del grupo reactivo que consiste en cisteamina, N-acetilcisteamina y etanolamina.

En una forma de realización particularmente preferente, el reactivo de protección que se utiliza para inactivar los grupos funcionales reactivos libres en el transportador proteico/polipeptídico activado está seleccionado del grupo reactivo que consiste en hidróxido sódico, carbonato sódico, bicarbonato de amonio y amoníaco.

En una forma de realización, el grupo reactivo del resto aminoácido del inmunógeno peptídico es un grupo sulfhidrilo libre.

En otra forma de realización, uno o más de los grupos funcionales están en un conector, que está opcionalmente fijado al transportador proteico/polipeptídico. En una forma de realización preferente, el conector es un conector peptídico. En una forma de realización más preferente, el conector peptídico es polilisina.

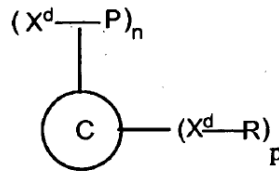
La descripción también proporciona un segundo método para conjugar un inmunógeno peptídico, de una proteína/polipéptido con un transportador proteico/polipeptídico que tiene la estructura:



en la que,

C es un transportador proteico/polipeptídico y X es un grupo funcional derivatizable de un resto aminoacídico en el transportador proteico/polipeptídico u opcionalmente de un resto aminoacídico de un péptido conector fijado covalentemente al transportador proteico/polipeptídico, y en el que m es un número entero superior a 0, pero inferior o igual a 85, comprendiendo el método las etapas de:

- (a) derivatizar uno o más de los grupos funcionales del transportador proteico/polipeptídico o de la molécula de conector opcionalmente fijado para generar una molécula derivatizada con sitios reactivos;
- (b) hacer reaccionar el transportador proteico/polipeptídico derivatizado de la etapa (a) con un grupo reactivo de un resto aminoacídico del inmunógeno peptídico para formar un conjugado inmunógeno peptídico-transportador proteico/polipeptídico acoplado covalentemente; y
- (c) hacer reaccionar adicionalmente el dicho conjugado con un reactivo de protección para inactivar los grupos funcionales reactivos libres en el transportador proteico/polipeptídico activado, de manera que los grupos protegidos no puedan reaccionar con otras moléculas, incluidas proteínas/polipéptidos, preservando así la funcionalidad del transportador, de manera que conserve su capacidad para inducir las respuestas inmunitarias deseadas contra el inmunógeno peptídico que de otra manera no se producirían sin un transportador, para generar un conjugado inmunógeno peptídico-transportador proteico/polipeptídico protegido que tiene la fórmula:



en la que,

C es el transportador proteico/polipeptídico y  $X^d$  es un grupo funcional derivatizado de un resto aminoacídico del transportador proteico/polipeptídico u opcionalmente de un resto aminoacídico de un péptido conector fijado covalentemente al transportador proteico/polipeptídico, y, en la que, P es la molécula de inmunógeno peptídico fijada covalentemente al grupo funcional derivatizado en el resto aminoacídico en la proteína transportadora u opcionalmente en un resto aminoacídico en un péptido conector fijado covalentemente a un transportador proteico/polipeptídico, R es una molécula de protección fijada covalentemente al grupo funcional derivatizado en un resto aminoacídico en el transportador proteico/polipeptídico u opcionalmente en un resto aminoacídico en un péptido conector fijado covalentemente a un transportador proteico/polipeptídico, n es un número entero superior a 0, pero inferior o igual a 85, y p es un número entero superior a 0, pero inferior a 85.

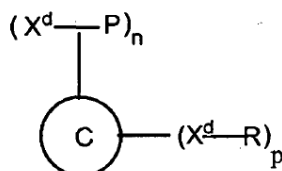
Las formas de realización detalladas para el primer método descrito anteriormente también son aplicables a los conjugados que acaban de describirse preparados mediante el segundo método.

La descripción proporciona conjugados inmunógeno peptídico-transportador proteico/polipeptídico en los que el transportador proteico/polipeptídico tiene la fórmula:



en la que,

C es un transportador proteico/polipeptídico y X es un grupo funcional derivatizable de un resto aminoacídico en el transportador proteico/polipeptídico u opcionalmente de un resto aminoacídico de un péptido conector fijado covalentemente al transportador proteico/polipeptídico, y, en la que, m es un número entero superior a 0, pero inferior o igual a 85, y en la que el conjugado inmunógeno peptídico-transportador proteico/polipeptídico protegido tiene la fórmula:

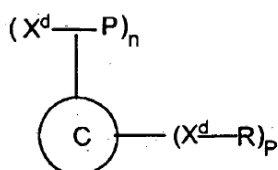


en la que,

C es el transportador proteico/polipeptídico y  $X^d$  es un grupo funcional derivatizado de un resto aminoacídico del transportador proteico/polipeptídico u opcionalmente de un resto aminoacídico de un péptido conector fijado covalentemente al transportador proteico/polipeptídico, y, en la que P es la molécula de inmunógeno peptídico fijada covalentemente al grupo funcional derivatizado del resto aminoacídico de la proteína transportadora u opcionalmente de un resto aminoacídico de un péptido conector fijado covalentemente a un transportador proteico/polipeptídico, R es una molécula de protección fijada covalentemente al grupo funcional derivatizado de un resto aminoacídico del transportador proteico/polipeptídico u opcionalmente de un resto aminoacídico de un péptido conector fijado covalentemente a un transportador proteico/polipeptídico, preservando así la funcionalidad del transportador, de manera que conserve su capacidad para inducir las respuestas inmunitarias deseadas contra el inmunógeno peptídico que de otra manera no se producirían sin un transportador, n es un número entero superior a 0, pero inferior o igual a 85, y p es un número entero superior a 0, pero inferior a 85.

Las formas de realización detalladas para los métodos primero y segundo descritos anteriormente también son aplicables a los conjugados que acaban de describirse.

La descripción también proporciona conjugados inmunógeno peptídico-transportador proteico/polipeptídico generados según el segundo método de la descripción y que tienen la fórmula:



en la que,

C es el transportador proteico/polipeptídico y  $X^d$  es un grupo funcional derivatizado de un resto aminoacídico del transportador proteico/polipeptídico u opcionalmente de un resto aminoacídico de un péptido conector fijado covalentemente al transportador proteico/polipeptídico, y, en la que P es la molécula de inmunógeno peptídico fijada covalentemente al grupo funcional derivatizado del resto aminoacídico de la proteína transportadora u opcionalmente de un resto aminoacídico de un péptido conector fijado covalentemente a un transportador proteico/polipeptídico, R es una molécula de protección fijada covalentemente al grupo funcional derivatizado de un resto aminoacídico del transportador proteico/polipeptídico u opcionalmente de un resto aminoacídico de un péptido conector fijado covalentemente a un transportador proteico/polipeptídico, preservando así la funcionalidad del transportador, de manera que conserve su capacidad para inducir las respuestas inmunitarias deseadas contra el inmunógeno peptídico que de otra manera no se producirían sin un transportador, n es un número entero superior a 0, pero inferior o igual a 85, y p es un número entero superior a 0, pero inferior a 85.

Las formas de realización detalladas para el segundo método descrito anteriormente también son aplicables a los conjugados generados mediante el segundo método, como acaba de describirse. La descripción proporciona



composiciones inmunogénicas que comprenden un conjugado de un inmunógeno peptídico con un transportador proteico/polipeptídico generado mediante el segundo método de la invención, junto con uno o más excipientes, diluyentes y adyuvantes farmacéuticamente aceptables.

Las formas de realización detalladas para el segundo método y los conjugados generados de ese modo descritos anteriormente también son aplicables a composiciones inmunogénicas que contienen esos conjugados como acaban de describirse. La descripción proporciona un método para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto mamífero, que comprende administrar una cantidad eficaz de una composición inmunogénica de la presente invención al sujeto.

Las formas de realización detalladas aplicables a la composición inmunogénica que contiene los conjugados de la presente invención también son aplicables al método de uso de estas composiciones inmunogénicas.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1: Diagrama de flujo que representa la química del proceso utilizada para la conjugación de los fragmentos de péptido A $\beta$  con el transportador proteico/polipeptídico CRM<sub>197</sub> para formar el conjugado A $\beta$ /CRM<sub>197</sub>.

Figura 2: Diagrama de flujo que representa la química de hidrólisis ácida utilizada para la determinación cuantitativa de S-carboximetilcisteína y S-carboximetilcisteamina como evaluación del grado de conjugación de los conjugados inmunógeno peptídico-transportador proteico/polipeptídico tal como el conjugado A $\beta$ /CRM<sub>197</sub>.

Figura 3: Esta figura representa la dependencia del pH de la reacción de conjugación péptido A $\beta$ /CRM.

Figura 4: Esta figura representa la dependencia de la conjugación péptido A $\beta$ /CRM sobre la relación péptido:CRM.

Figura 5: Verificación del proceso de protección para la conjugación A $\beta$ 1-7/CRM. El pH de la reacción fue 9,15. El tiempo de reacción con el péptido fue de 16 horas, la protección con N-acetilcisteamina fue de 8 horas.

Figura 6: Conjugación y protección con el péptido con diversas relaciones péptido:CRM. El pH de la reacción fue 9,0. El tiempo de reacción con el péptido fue de 16 horas, la protección con N-acetilcisteamina fue de 8 horas.

Figura 7: Títulos de sueros de primate el día 36 después de la inmunización de los primates con los conjugados de péptido A $\beta$  con diversos adyuvantes.

Figura 8: Títulos de sueros de primate el día 36 después de la inmunización de los primates con conjugados de péptido A $\beta$  con diversos adyuvantes.

Figura 9: Títulos por día de los primates y grupo de tratamiento. Se inmunizó a los primates con conjugados A $\beta$  1-7 o 1-5 A $\beta$  CRM<sub>197</sub> con alumbre o 529 como adyuvantes y los títulos de anticuerpos anti-A $\beta$  se midieron el día 29, 36, 57 y 54.

Figura 10: Los conjugados péptido-proteína se caracterizaron mediante análisis de SDS-PAGE/transferencia de western con un gel prefabricado de tris-tricina. Las calles son: marcador (calle 1); L-28375 24/01 (calle 2); L-28375 24/02 (calle 3); L-28375 24/03 (calle 4); L-28375 24/04 (calle 5); L-28375 24/05 (calle 6); L-28375 24/06 (calle 7); L-28375 24/07 (calle 8); L-28375 24/08 (calle 9); L-28375 24/09 (Simulado) (calle 10); y BrAcCRM<sub>197</sub> (calle 11).

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

SEQ ID NO:	Secuencia	Descripción
1	DAEFR-C	Aβ1-5-C
2	DAEFRHD-C	Aβ1-7-C
3	DAEFRHDSG-C	Aβ1-9-C
4	DAEFRHDSGYEV-C	Aβ1-12-C
5	DAEFR-GAGA-C	Aβ1-5-L-C
6	DAEFRHD-GAGA-C	Aβ1-7-L-C
7	DAEFRHDSG-GAGA-C	Aβ1-9-L-C
8	DAEFRHDSGYEV-GAGA-C	Aβ1-12-L-C
9	VEYGSDHRFEAD-C	Aβ12-1-C
10	GAGA	Péptido conector
11	PKYVKQNTLKLAT	Hemaglutinina de la gripe : HA <sub>307-319</sub>
12	AKXVAAWTLKAAA	Péptido PAN-DR (Péptido PADRE )
13	EKKIAKMEKASSVFN	CS de la Malaria : epitopo T3
14	FELLTRILTI	Antígeno de superficie de la hepatitis B: HB <sub>s</sub> Ag <sub>19-28</sub>
15	DQSIGDLIAEAMDKVGN	Prot. choque térmico 65: hsp65 <sub>153-171</sub>
16	QVHFQPLPPAVKL	Bacillus Calmette-Guerin (BCG)
17	QYIKANSKFIGITEL	Toxide tetánico: TT <sub>830-844</sub>
18	FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE	Toxide tetánico : TT <sub>947-967</sub>
19	KQIINMWQEVGKAMY	T1 de gp120 del VIH
20	DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL-C-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-DAEFRHD	Aβ <sub>1-7</sub> /TT <sub>830-844</sub> /C/TT <sub>947-967</sub> /Aβ <sub>1-7</sub>
21	DAEFRHDSGYEVHHQKL VFFAEDVGSN KGAIIGLMVGGVIA	Aβ <sub>1-42</sub>
22	DAEFRHQYIKANSKFIGITEL	AN90549: Aβ <sub>1-7</sub> /TT <sub>830-844</sub> (utilizado en una configuración MAP4)

SEQ ID NO:	Secuencia	Descripción
23	DAEFRHDFNNFTVSFWRVPKVSASHLE	AN90550: A $\beta$ <sub>1-7</sub> /TT <sub>947-967</sub> (utilizado en una configuración MAP4)
24	DAEFRHD-QYIKANSKFIGITELFNNFTVSFWRVPK VSASHLE	AN90542: A $\beta$ <sub>1-7</sub> /TT <sub>830-844</sub> + TT <sub>947-967</sub> (utilizado en una config. lineal)
25	EFHD SG-QYIKANSKFIGITEL	AN90576: A $\beta$ <sub>3-9</sub> /TT <sub>830-844</sub> (utilizado en una configuración MAP4)
26	AKXVAAWTLKAAA-DAEFRHD	AN90562: A $\beta$ <sub>1-7</sub> /PADRE
27	DAEFRHD-DAEFRHDD-AEFRHDAKXVAAWTLKAAA	AN90543: A $\beta$ <sub>1-7</sub> x 3/PADRE
28	AKXVAAWTLKAAA-DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD	PADRE/A $\beta$ <sub>1-7</sub> x 3
29	DAEFRHD-AKXVAAWTLKAAA	A $\beta$ <sub>1-7</sub> x 3/PADRE
30	DAEFRHD-ISQAVHAAHAEINEAGR	A $\beta$ <sub>1-7</sub> /fragmento de albúmina
31	FRHDSGY-ISQAVHAAHAEINEAGR	A $\beta$ <sub>4-10</sub> /fragmento de albúmina
32	EFHD SG-ISQAVHAAHAEINEAGR	A $\beta$ <sub>3-9</sub> /fragmento de albúmina
33	PKYVKQNTLKLAT-DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD	HA <sub>307-319</sub> /A $\beta$ <sub>1-7</sub> x 3
34	DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT-DAEFRHD	A $\beta$ <sub>1-7</sub> /HA <sub>307-319</sub> /A $\beta$ <sub>1-7</sub>
35	DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT	A $\beta$ <sub>1-7</sub> x 3/HA <sub>307-319</sub>
36	DAEFRHD-DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT	A $\beta$ <sub>1-7</sub> x 2/ HA <sub>307-319</sub>
37	DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT-EKKIAKMEKASSVFNV-QYIKANSKFIGITEL-FNNFTVSFWRVPKVSASHLE-DAEFRHD	A $\beta$ <sub>1-7</sub> /HA <sub>307-319</sub> /CS de Malaria/TT <sub>830-844</sub> /TT <sub>947-967</sub> /A $\beta$ <sub>1-7</sub>
38	DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL-C-FNNFTVSFWRVPKVSASHLE	A $\beta$ <sub>1-7</sub> x 3/TT <sub>830-844</sub> /C/TT <sub>947-967</sub>
39	DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL-C-FNNFTVSFWRVPKVSASHLE	A $\beta$ <sub>1-7</sub> /TT <sub>830-844</sub> /C/TT <sub>947-967</sub>

SEQ ID NO:	Secuencia	Descripción
40	GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPGY VDSIQKGIQPKSGTQGNYYDDDWKEFY STDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVV KVTPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLS LTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLS LPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEIN FETRGRGQDAMYEMYMAQACAGNRVR RSVGSSLSCLNDWDVIRDKTKTKIESLK EHGPIKNKMSEPNKTVSEKAKQYLEE FHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGAN YAAWAVNVVAQVIDSETADNLEKTTAAL SILPGIGSVMGADGAVHHNTEEIVAQSI ALSSLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYNFV ESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPFL HDGYAVSWNTVEDSIIRTFQGEGSGHDI KITAENTPLPIAGVLLPTIPGKLDVKNKS THISVNGRKIRMCRAIDGDVTFCRPKSP VYVGNGVHANLHVAFHRSSSEKIHSEI SSDSIGVLGYQKTVVDHTKVNSKLSLFFEI KS	CRMβ <sub>197</sub>
41	ISQAVHAAHAEINEAGR	fragmento de albúmina
42	DAEFGHDSGFVRRHQKL VFFAEDVGSN KGAIIGLMVGGGVIA	Aβ <sub>1-42</sub> murino
43	VFFAEDVG-C	Aβ <sub>18-25</sub> -C
44	LVFFAEDV-C	Aβ <sub>17-24</sub> -C
45	KLVFFAED-C	Aβ <sub>16-23</sub> -C
46	C-VFFAEDVG	C-Aβ <sub>18-25</sub>

SEQ ID NO:	Secuencia	Descripción
47	C-LVFFAEDV	C-Aβ <sub>17-24</sub>
48	C-KLVFFAED	C-Aβ <sub>16-23</sub>
49	VFFAEDV-C	Aβ <sub>18-24</sub> -C
50	LVFFAED-C	Aβ <sub>17-23</sub> -C
51	KLVFFAE-C	Aβ <sub>16-22</sub> -C
52	C-VFFAEDV	C-Aβ <sub>18-24</sub>
53	C-LVFFAED	C-Aβ <sub>17-23</sub>
54	C-KLVFFAE	C-Aβ <sub>16-22</sub>

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al método reivindicado de generación de conjugados inmunógeno peptídico-transportador en el que los grupos funcionales activos sin reaccionar en el transportador que se generan durante la activación se inactivan utilizando reactivos de protección tales como *N*-acetilcisteamina con el fin de evitar que reaccionen adicionalmente. La presente invención también se refiere a los conjugados transportador-inmunógeno peptídico protegidos reivindicados generados mediante ese método y a composiciones inmunogénicas que comprenden dichos conjugados.

Durante décadas, se ha utilizado con éxito el enfoque de aumentar la inmunogenicidad de moléculas pequeñas o escasamente inmunogénicas, tales como los sacáridos, mediante la conjugación (véase, por ejemplo, Goebel *et al.* (1939) *J. Exp. Med.* 69: 53), y se han descrito muchas composiciones inmunogénicas en las que se han conjugado polímeros capsulares purificados con proteínas transportadoras para crear composiciones inmunogénicas más eficaces aprovechando este "efecto transportador". Por ejemplo, Schneerson *et al.* (*J. Exp. Med.* 152: 361-376; 1980), describen conjugados polisacárido de *Haemophilus influenzae* b-proteína que confieren inmunidad contra las enfermedades invasivas provocadas por ese microorganismo. Los conjugados de PRP (fosfato de polirribosilribitol, un polímero capsular de *H. influenzae* b) han demostrado ser más eficaces que las composiciones inmunogénicas basadas en el polisacárido en solitario (Chu *et al.*, (1983) *Infect. Immun.* 40: 245; Schneerson *et al.* (1984), *Infect. Immun.* 45: 582-591). La conjugación también ha demostrado eludir la escasa respuesta de anticuerpos que suele observarse en lactantes cuando son inmunizados con un polisacárido libre (Anderson *et al.* (1985) *J. Pediatr.* 107: 346; Insel *et al.* (1986) *J. Exp. Med.* 158: 294).

Una ventaja adicional de utilizar como transportador proteico un toxoide o toxina bacteriana contra la que la inmunización sistemática en seres humanos (por ejemplo, tétanos o difteria) es una práctica convencional es que se induce una inmunidad deseada contra la toxina o el toxoide junto con la inmunidad contra los patógenos asociados con el polímero capsular.

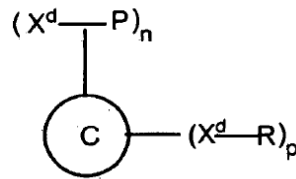
También se están utilizando conjugados determinante antigénico/hapteno-transportador para producir anticuerpos monoclonales altamente específicos que pueden reconocer epítomos químicos discretos en el hapteno acoplado. Los anticuerpos monoclonales resultantes se utilizan con frecuencia para investigar la estructura epitópica y las interacciones entre proteínas nativas. En muchos casos, los determinantes antigénicos/haptenos utilizados para generar estos anticuerpos monoclonales son pequeños segmentos peptídicos que representan sitios antigénicos cruciales en la superficie de proteínas más grandes. Los criterios para un transportador exitoso a utilizar en la generación de un conjugado determinante antigénico/hapteno-transportador son el potencial de inmunogenicidad, la presencia de grupos funcionales adecuados para la conjugación con un determinante antigénico/hapteno, unas propiedades de solubilidad razonables incluso después de la derivatización y la ausencia de toxicidad *in vivo*.

Los conjugados generados mediante los métodos de la presente descripción satisfacen estos criterios. Los conjugados pueden ser cualquier conjugado inmunógeno peptídico-transportador estable generado utilizando el proceso de conjugación descrito en el presente documento. Los conjugados se generan utilizando un proceso de la presente invención en el que un transportador proteico/polipeptídico que tiene la siguiente estructura:



se fija covalentemente a un transportador proteico/polipeptídico, en el que,

C es un transportador proteico/polipeptídico y X es un grupo funcional derivatizable en un resto aminoacídico en el transportador proteico/polipeptídico u opcionalmente en un resto aminoacídico en un péptido conector fijado covalentemente al transportador proteico/polipeptídico, y en el que m es un número entero superior a 0, pero inferior o igual a 85, está fijado covalentemente a un inmunógeno peptídico y en el que el conjugado inmunógeno peptídico-transportador proteico/polipeptídico está representado por la siguiente fórmula:



en la que,

C es el transportador proteico/polipeptídico y  $X^d$  es un grupo funcional derivatizado en un resto aminoacídico en el transportador proteico/polipeptídico u opcionalmente en un resto aminoacídico en un péptido conector fijado covalentemente al transportador proteico/polipeptídico, P es un inmunógeno peptídico fijado covalentemente al grupo funcional derivatizado en el resto aminoacídico en el transportador proteico/polipeptídico u opcionalmente en un resto aminoacídico en un péptido conector fijado covalentemente a un transportador proteico/polipeptídico, R es una molécula de protección fijada covalentemente al grupo funcional derivatizado en un resto aminoacídico en el transportador proteico/polipeptídico u opcionalmente en un resto aminoacídico en un péptido conector fijado covalentemente a un transportador proteico/polipeptídico, preservando así la funcionalidad del transportador, de manera que conserve su capacidad para inducir las respuestas inmunitarias deseadas contra el inmunógeno peptídico que de otra manera no se producirían sin un transportador, n es un número entero superior a 0, pero inferior o igual a 85, y p es un número entero superior a 0, pero inferior a 85.

#### Selección de transportadores

Algunos inmunógenos peptídicos contienen el epítipo apropiado para inducir una respuesta inmunitaria, pero son demasiado pequeños para ser inmunogénicos. En esta situación, los inmunógenos peptídicos se unen a un transportador adecuado para ayudar a inducir una respuesta inmunitaria. En la representación esquemática anterior del conjugado péptidos inmunógenos-transportador generado mediante un proceso de la presente invención, C es un transportador proteico/polipeptídico con el que se conjugan inmunógenos peptídicos directamente mediante grupos funcionales derivatizados en los restos aminoacídicos en los propios transportadores o indirectamente a través grupos funcionales derivatizados en conectores peptídicos fijados covalentemente a los transportadores. Los transportadores proteicos/polipeptídicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, albúmina (incluida la seroalbúmina humana), hemocianina de lapa californiana, moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovoalbúmina, toxoide tetánico o un toxoide de otras bacterias patógenas con toxicidad reducida, incluidos mutantes, tales como difteria, *E. coli*, cólera o *H. pylori*, o un derivado de toxina atenuada. Uno de tales transportadores es la proteína CRM<sub>197</sub> (SEQ ID NO: 40) que presenta reactividad cruzada con la toxina diftérica.

Otros transportadores incluyen epítipos de linfocitos T que se unen a múltiples alelos del MHC, por ejemplo, al menos un 75% de todos los alelos del MHC humano. Tales transportadores se conocen a veces en la técnica como "epítipos universales de linfocitos T". Los transportadores ejemplares con epítipos universales de linfocitos T incluyen:

Hemaglutinina de la gripe: HA <sub>307-319</sub>	PKYVKQNTLKLAT (SEQ ID NO: 11)
Péptido PAN-DR (péptido PADRE)	AKXVAAWTLKAAA (SEQ ID NO: 12)
CS de la malaria: epítipo T3	EKKIAKMEKASSVFNV (SEQ ID NO: 13)
Antígeno de superficie de la hepatitis B: HB <sub>s</sub> Ag <sub>19-28</sub>	FELLTRILTI (SEQ ID NO: 14)
Proteína de choque térmico 65: hsp65 <sub>153-171</sub>	QSIGDLIAEAMDKVGNEG (SEQ ID NO: 15)
Bacilo Calmette-Guerin (BCG)	QVHFQPLPPAVVKL (SEQ ID NO: 16)
Toxoide tetánico: TT <sub>830-844</sub>	QYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO: 17)
Toxoide tetánico: TT <sub>947-967</sub>	NNFTVSFWRVLPKVSASHLE (SEQ ID NO: 18)
T1 de gp120 del VIH:	KQIINMWQEVGKAMY (SEQ ID NO: 19)
CRM <sub>197</sub>	Véase Breve descripción de las secuencias (SEQ ID NO: 40)
Fragmento de albúmina	ISQAVHIAAHAEINEAGR (SEQ ID NO: 41)

Otros transportadores para estimular o potenciar una respuesta inmunitaria y con los que puede conjugarse un inmunógeno peptídico o un hapteno incluyen citocinas tales como IL-1, péptidos  $\alpha$  y  $\beta$  de IL-1, IL-2,  $\gamma$ INF, IL-10, GM-CSF, y quimiocinas, tales como MIP-1  $\alpha$  y  $\beta$  y RANTES. Los péptidos inmunogénicos también pueden unirse a transportadores proteicos/peptídicos que potencian el transporte a través de los tejidos, tal como se describe en O'Mahony, WO 97/17163 y WO 97/17614.

Todavía otros transportadores incluyen peptidasa C5a estreptocócica recombinante, los ORF 1224, 1664 y 2452 de *Streptococcus pyogenes*, los ORF T367 y T858 de *Chlamydia pneumoniae*, factores de crecimiento y hormonas.

En una forma de realización preferente de la presente invención, la proteína transportadora es CRM<sub>197</sub>, un mutante no tóxico de la toxina diftérica con un cambio de un aminoácido en su secuencia primaria. La glicina presente en la posición de aminoácido 52 de la molécula está reemplazada con un ácido glutámico debido a un único cambio de codón del ácido nucleico. Debido a este cambio, la proteína carece de actividad ADP-ribosil transferasa y se vuelve no tóxica. Tiene un peso molecular de 58.408 Da. CRM<sub>197</sub> se produce en grandes cantidades mediante expresión recombinante según la patente de EE.UU. 5.614.382. Las conjugaciones de sacáridos así como de péptidos con CRM<sub>197</sub> se llevan a cabo por unión mediante los grupos ε-amino de los restos lisina. Ha quedado bien establecido mediante varios productos comerciales que CRM<sub>197</sub> es un transportador excelente y seguro para los epítomos de linfocitos B.

#### Péptidos inmunogénicos

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "*inmunógeno peptídico*" o el término "*hapteno*" es cualquier proteína o estructura subunitaria/fragmento/análogo derivado de la misma que puede inducir, facilitar o ser inducida a producir una respuesta inmunitaria al administrarse a un mamífero. En particular, el término se utiliza para referirse a un determinante antigénico polipeptídico procedente de cualquier fuente (bacteria, virus o eucariota), que puede acoplarse a un transportador utilizando un método descrito en el presente documento. Tales inmunógenos polipeptídicos/determinantes antigénicos pueden proceder de virus, bacterias o células eucariotas.

Los inmunógenos peptídicos procedentes de una célula bacteriana incluyen los derivados de proteínas secretadas o de la superficie celular bacteriana, que pueden utilizarse en composiciones inmunogénicas a base de proteínas. Las cepas bacterianas ejemplares incluyen *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Alloicoccus otiditis* y estreptococos del grupo B.

Los inmunógenos peptídicos ejemplares procedentes de virus incluyen los derivados del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus del herpes simple (HSV), virus del papiloma humano (HPV), virus de la parainfluenza (PIV), virus de la estomatitis vesicular (VSV), virus respiratorio sincicial (RSV), virus de Epstein-Barr (EBV), coronavirus, virus vaccinia, virus de la rabia, virus de la hepatitis C (HCV) y virus de la hepatitis B (HBV), por mencionar algunos.

Los inmunógenos peptídicos fúngicos ejemplares incluyen los derivados de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides* spp., *Histoplasma* spp. y *Aspergillus* spp. Los antígenos parasitarios incluyen los derivados de *Plasmodium* spp., *Trypanosoma* spp., *Schistosoma* spp., *Leishmania* spp. y similares.

Los inmunógenos peptídicos eucariotas ejemplares que pueden conjugarse con un transportador para su uso como agente inmunoterapéutico en la prevención, tratamiento, profilaxis o mejora de diversas enfermedades humanas incluyen los asociados con células tumorales, los derivados de Aβ, un péptido de 39-43 aminoácidos, preferentemente de 42 aminoácidos, que es el componente principal de las placas características de la enfermedad de Alzheimer (AD) (véase el documento US 4.666.829; Glenner y Wong (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 120: 1131, Hardy (1984) TINS 20: 1131; Hardy (1977) TINS 20: 154), los derivados de péptidos amiloides de la amilina, un material polipeptídico producido por las células de los islotes pancreáticos que está relacionado con la diabetes tipo II, péptidos derivados de productos génicos de lipoproteínas de baja densidad, que están relacionados con la aterosclerosis y péptidos antigénicos derivados de citocinas inflamatorias y factores de crecimiento tales como la interleucina 6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral α (TNF-α) y GDF-8. Tales inmunógenos peptídicos eucariotas pueden incluir un epítipo de linfocitos T (CTL) o de linfocitos B.

Un "epítipo CTL" es uno derivado de regiones epitópicas seleccionadas de antígenos diana potenciales, tales como antígenos asociados a tumores, incluidos, pero no limitados a, carcinoma de células renales, cáncer de mama, antígenos carcinoembrionarios, antígenos de melanoma (MAGE) y antígenos específicos del cáncer de próstata tales como el antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA) y el antígeno de células madre de próstata (PSCA), antígenos de la hepatitis C.

Aβ, también conocido como péptido β-amiloide, o péptido A4 (véase el documento US 4.666.829; Glenner y Wong, Biochem. Biophys. Res. Commun., 120,1131 (1984)), es un péptido de 39-43 amino ácidos, que es el principal componente de las placas características de la enfermedad de Alzheimer. Aβ es generado por el procesamiento de una proteína mayor APP por dos enzimas, denominadas secretasas β y γ (véase Hardy, TINS 20, 154 (1997)). Se producen mutaciones conocidas en APP asociadas con la enfermedad de Alzheimer próximas al sitio de la secretasa β o γ, o dentro de Aβ. Por ejemplo, la posición 717 está próxima al sitio de escisión de la secretasa γ de APP en su procesamiento a Aβ, y las posiciones 670/671 están próximas al sitio de escisión de la secretasa β. Se cree que las mutaciones provocan AD al interaccionar con las reacciones de escisión mediante las cuales se forma Aβ para aumentar la cantidad de la forma de aminoácido 42/43 de Aβ generada.

Aβ tiene la propiedad inusual de poder fijar y activar las cascadas del complemento clásica y alternativa. En particular, se une a Clq y en última instancia a C3bi. Esta asociación facilita la unión a macrófagos que conduce a la activación de los linfocitos B. Además, C3bi se descompone adicionalmente y a continuación se une a CR2 en los



linfocitos B de una manera dependiente de los linfocitos T que conduce a un aumento de 10.000 veces en la activación de estas células. Este mecanismo hace que A $\beta$  genere una respuesta inmunitaria superior a la de otros antígenos.

A $\beta$  tiene varias formas naturales. Las formas humanas de A $\beta$  se conocen como 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 APP se ilustran mediante la Figura 1 de Hardy *et al.*, TINS 20, 155-158 (1997). Por ejemplo, A $\beta$ 42 tiene la secuencia:

H<sub>2</sub>N-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala-OH (SEQ ID NO. 21).

A $\beta$ 41, A $\beta$ 40 y A $\beta$ 39 difieren de A $\beta$ 42 por la omisión de Ala, Ala-Ile y Ala-Ile-Val, respectivamente, del extremo C-terminal. A $\beta$ 43 difiere de A $\beta$ 42 por la presencia de un resto treonina en el extremo C-terminal.

Los inmunógenos peptídicos que son fragmentos de A $\beta$  son ventajosos en comparación con la molécula intacta para su uso en los métodos de la presente invención por varias razones. En primer lugar, porque sólo determinados epítomos dentro de A $\beta$  inducen una respuesta inmunogénica útil para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, una dosificación igual de masa de un fragmento que contiene tales epítomos proporciona una mayor concentración molar de los epítomos inmunogénicos útiles que una dosis de A $\beta$  intacto. En segundo lugar, determinados inmunógenos peptídicos de A $\beta$  generan una respuesta inmunogénica contra depósitos de amiloide sin generar una respuesta inmunogénica significativa contra la proteína APP de la cual se deriva A $\beta$ . En tercer lugar, los inmunógenos peptídicos de A $\beta$  son más fáciles de fabricar que el A $\beta$  intacto debido a su menor tamaño. En cuarto lugar, los inmunógenos peptídicos de A $\beta$  no se agregan de la misma manera que el A $\beta$  intacto, lo que simplifica la preparación de conjugados con transportadores.

Algunos inmunógenos peptídicos de A $\beta$  tienen una secuencia de al menos 2, 3, 5, 6, 10 ó 20 aminoácidos contiguos de un péptido natural. Algunos inmunógenos peptídicos no tienen más de 10, 9, 8, 7, 5 ó 3 restos contiguos de A $\beta$ . En una forma de realización preferente, se utilizan inmunógenos peptídicos de la mitad N-terminal de A $\beta$  para preparar conjugados. Los inmunógenos peptídicos preferentes incluyen A $\beta$ 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-11, 3-7, 1-3 y 1-4. La denominación A $\beta$ 1-5 por ejemplo, indica un fragmento N-terminal que incluye los restos 1-5 de A $\beta$ . Los fragmentos de A $\beta$  que comienzan en el extremo N-terminal y que termina en un resto dentro de los restos 7-11 de A $\beta$  son particularmente preferentes. También puede utilizarse el fragmento A $\beta$ 1-12, pero es menos preferente. En algunos métodos, el fragmento es un fragmento N-terminal distinto de A $\beta$ 1-10. Otros fragmentos preferentes incluyen A $\beta$ 13-28, 15-24, 1-28, 25-35, 35-40, 35-42 y otros fragmentos internos y fragmentos C-terminales.

Algunos péptidos A $\beta$  para su uso en la invención son péptidos inmunogénicos que al administrarse a un paciente humano o animal generan anticuerpos que se unen específicamente a uno o más epítomos entre los restos 16 y 25 de A $\beta$ . Los fragmentos preferentes incluyen A $\beta$ 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24 y 18-25. Los anticuerpos que se unen específicamente a epítomos entre los restos 16 y 25 se unen específicamente al A $\beta$  soluble sin unirse a las placas de A $\beta$ . Estos tipos de anticuerpos pueden unirse específicamente al A $\beta$  soluble en la circulación de un paciente o modelo animal sin unirse específicamente a las placas de depósitos de A $\beta$  en el cerebro del paciente o modelo. La unión específica de anticuerpos al A $\beta$  soluble inhibe la incorporación del A $\beta$  a las placas, inhibiendo así el desarrollo de las placas en un paciente o inhibiendo un aumento adicional del tamaño o la frecuencia de las placas si ya se han desarrollado tales placas antes de administrar el tratamiento.

Preferentemente, el fragmento de A $\beta$  carece de un epítomo que generaría una respuesta de linfocitos T contra el fragmento. Generalmente, los epítomos de linfocitos T tienen más de 10 aminoácidos contiguos. Por lo tanto, los fragmentos preferentes de A $\beta$  tienen un tamaño de 5-10 o preferentemente de 7-10 aminoácidos contiguos o lo más preferentemente de 7 aminoácidos contiguos; es decir, la longitud suficiente para generar una respuesta de anticuerpos sin generar una respuesta de linfocitos T. Resulta preferente la ausencia de epítomos de linfocitos T ya que estos epítomos no son necesarios para la actividad inmunogénica de los fragmentos, y pueden inducir 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).

Por lo tanto, resultan preferentes el fragmento A $\beta$ 15-25 y los subfragmentos de 7-8 aminoácidos contiguos ya que estos péptidos generan sistemáticamente una alta respuesta inmunogénica contra el péptido A $\beta$ . Estos fragmentos incluyen A $\beta$ 16-22, A $\beta$ 16-23, A $\beta$ 16-24, A $\beta$ 17-23, A $\beta$ 17-24, A $\beta$ 18-24 y A $\beta$ 18-25. Los subfragmentos A $\beta$ 15-25 particularmente preferentes tienen una longitud de 7 aminoácidos contiguos. La denominación A $\beta$ 15-21 por ejemplo, indica un fragmento que incluye los restos 15-21 de A $\beta$  y que carece de otros restos de A $\beta$  y preferentemente 7-10 aminoácidos contiguos. Estos fragmentos pueden generar una respuesta de anticuerpos que incluye anticuerpos específicos de extremo.

Los inmunógenos peptídicos de los A $\beta$  requieren la detección de la actividad para la eliminación o prevención de los depósitos de amiloide (véase el documento WO 00/72880). La administración de fragmentos N-terminales de A $\beta$  induce la producción de anticuerpos que reconocen los depósitos de A $\beta$  *in vivo* e *in vitro*. En algunos métodos se utilizan fragmentos que carecen de al menos uno, y algunas veces al menos 5 ó 10

aminoácidos C-terminales presentes en las formas naturales de A $\beta$ . Por ejemplo, un fragmento que carece de 5 aminoácidos del extremo C-terminal de A $\beta$ 43 incluye los primeros 38 aminoácidos del extremo N-terminal de A $\beta$ .

A menos que se indique lo contrario, la referencia a A $\beta$  incluye las secuencias de aminoácidos humanas naturales indicadas anteriormente, así como análogos, incluidas variantes alélicas, de especie e inducidas. Los análogos difieren por lo general de los péptidos naturales en una, dos o unas pocas posiciones, con frecuencia en virtud de sustituciones conservadoras. Los análogos presentan por lo general al menos un 80% o un 90% de identidad de secuencia con los péptidos naturales. Algunos análogos también incluyen aminoácidos no naturales o modificaciones de aminoácidos N-terminales o C-terminales en una, dos, o unas pocas posiciones. Por ejemplo, puede sustituirse el resto ácido aspártico natural en la posición 1 y/o 7 de A $\beta$  con ácido isoaspártico.

Los ejemplos de aminoácidos no naturales son D, alfa, aminoácidos alfa-disustituidos, aminoácidos N-alquilo, ácido láctico, 4-hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato, épsilon-N,N,N-trimetilisina, épsilon-N-acetilisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmietionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, omega-N-metilarginina,  $\beta$ -alanina, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, tiroxina, ácido gamma-aminobutírico, homoserina, citrulina y ácido isoaspártico. Los péptidos inmunogénicos también incluyen análogos de A $\beta$  y fragmentos de los mismos. Algunos agentes terapéuticos de la invención son péptidos todo-D, por ejemplo, A $\beta$  todo-D, fragmento de A $\beta$  todo-D o análogos de A $\beta$  todo-D o fragmento de A $\beta$  todo-D. Los fragmentos y análogos pueden cribarse para la eficacia profiláctica o terapéutica en modelos de animales transgénicos en comparación con los controles no tratados o placebo como se describe en el documento WO 00/72880.

Los inmunógenos peptídicos también incluyen polipéptidos más largos que incluyen, por ejemplo, un segmento inmunogénico del péptido A $\beta$ , junto con otros aminoácidos. Por ejemplo, los péptidos inmunogénicos preferentes incluyen proteínas de fusión que comprenden un segmento de A $\beta$  unido a una secuencia de aminoácidos heteróloga que induce una respuesta de linfocitos T cooperadores contra la secuencia de aminoácidos heteróloga y por lo tanto una respuesta de linfocitos B contra el segmento de A $\beta$ . Tales polipéptidos pueden cribarse para la eficacia profiláctica o terapéutica en modelos animales en comparación con los controles no tratados o placebo como se describe en el documento WO 00/72880.

El péptido A $\beta$ , análogo, fragmento inmunogénico u otro polipéptido puede administrarse en forma desagregada o agregada. A $\beta$  desagregado o fragmentos del mismo se refiere a unidades peptídicas monoméricas. El A $\beta$  desagregado o los fragmentos del mismo son por lo general solubles, y susceptibles de autoagregación para formar oligómeros solubles, protofibrillas y ADDL. Los oligómeros de A $\beta$  y fragmentos de los mismos son normalmente solubles y existen predominantemente como hélices alfa o enrollamientos aleatorios. A $\beta$  agregado o fragmentos del mismo se refiere a oligómeros de A $\beta$  o fragmentos de los mismos que se han asociado en grupos de láminas beta insolubles. A $\beta$  agregado o fragmentos del mismo también se refiere a polímeros fibrilares. Las fibrillas son por lo general insolubles. Algunos anticuerpos se unen a A $\beta$  soluble o fragmentos del mismo o a A $\beta$  agregado o fragmentos del mismo. Algunos anticuerpos se unen tanto a A $\beta$  soluble o fragmentos del mismo como a A $\beta$  agregado o fragmentos del mismo.

Los péptidos inmunogénicos también incluyen multímeros de péptidos inmunogénicos monoméricos. Los péptidos inmunogénicos distintos de los péptidos A $\beta$  deberían inducir una respuesta inmunogénica contra uno o más de los fragmentos preferentes de A $\beta$  enumerados anteriormente (por ejemplo, A $\beta$ 1-3, 1-7, 1-10 y 3-7).

Los péptidos inmunogénicos para su uso en la presente invención se unen a un transportador utilizando un método de la presente invención para formar un conjugado. El péptido inmunogénico puede unirse en su extremo amino terminal, su extremo carboxilo terminal, o ambos, a un transportador para formar un conjugado. Opcionalmente, puede haber en el conjugado múltiples repeticiones del péptido inmunogénico.

Puede unirse un fragmento N-terminal de A $\beta$  en su extremo C-terminal a un péptido transportador para formar un conjugado. En tales conjugados, el resto N-terminal del fragmento de A $\beta$  constituye el resto N-terminal del conjugado. Por consiguiente, tales conjugados son eficaces para inducir anticuerpos que se unen a un epítipo que requiere que el resto N-terminal de A $\beta$  esté en forma libre. Algunos péptidos inmunogénicos de la invención comprenden una pluralidad de repeticiones de un segmento N-terminal de A $\beta$  unido en el extremo C-terminal a una o más copias de un péptido transportador para formar un conjugado. El fragmento N-terminal de A $\beta$  incorporado en tales conjugados comienza a veces en A $\beta$ 1-3 y termina en A $\beta$ 7-11. A $\beta$ 1-7, 1-3, 1-4, 1-5 y 3-7 resultan fragmentos N-terminales de A $\beta$  preferentes. Algunos conjugados comprenden diferentes segmentos N-terminales de A $\beta$  en tándem. Por ejemplo, un conjugado puede comprender A $\beta$ 1-7 seguido de A $\beta$ 1-3 unido a un transportador.

En algunos conjugados, se une un segmento N-terminal de A $\beta$  en su extremo N-terminal a un péptido transportador. Puede utilizarse la misma variedad de segmentos N-terminales de A $\beta$  como con el enlace C-terminal. Algunos conjugados comprenden un péptido transportador unido al extremo N-terminal de un segmento N-terminal de A $\beta$ , que a su vez está unido a uno o más segmentos N-terminales adicionales de A $\beta$  en tándem. Preferentemente, tales fragmentos de A $\beta$  inmunogénicos, una vez conjugados con un transportador apropiado, inducen una respuesta inmunogénica que se dirige específicamente contra el fragmento de A $\beta$  sin dirigirse contra otros fragmentos de A $\beta$ .

Los péptidos inmunogénicos para su uso en la invención incluyen péptidos heterólogos inmunogénicos. En algunos péptidos inmunogénicos, se une un fragmento de A $\beta$  a un transportador para formar un péptido heterólogo inmunogénico. Este péptido heterólogo se une a un transportador utilizando un método de la presente invención para formar un conjugado. Algunos de estos péptidos heterólogos inmunogénicos comprenden fragmentos de A $\beta$  unidos a epítomos del toxoide tetánico tal como se describe en los documentos US 5.196.512, EP 378.881 y EP 427.347. Opcionalmente, puede unirse un péptido inmunogénico a una o varias copias de un transportador, por ejemplo, en los extremos N y C terminales del transportador para formar un péptido heterólogo inmunogénico. Otros de estos péptidos heterólogos inmunogénicos comprenden fragmentos de A $\beta$  unidos a los péptidos transportadores descritos en el documento US 5.736.142. Por ejemplo, un péptido heterólogo inmunogénico puede comprender A $\beta$ 1-7 seguido de A $\beta$ 1-3 seguido de un transportador. Los ejemplos de tales péptidos heterólogos inmunogénicos incluyen:

Ap 1-7/toxoide tetánico 830-844 + 947-967 en una configuración lineal

DAEFRHD-QYIKANSKFIGITELFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO: 24)

Los péptidos descritos en el documento US 5.736.142 (todos en configuraciones lineales):

PADRE/Ap 1-7:

AKXVAAWTLKAAA-DAEFRHD (SEQ ID NO: 26)

A $\beta$ 1-7 x 3/PADRE:

DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-AKXVAAWTLKAAA (SEQ ID NO: 27)

PADRE/A $\beta$ 1-7x3:

AKXVAAWTLKAAA-DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD (SEQ ID NO: 28)

A $\beta$ 1-7/PADRE:

DAEFRHD-AKXVAAWTLKAAA (SEQ ID NO: 29)

A $\beta$ 1-7/fragmento de albúmina:

DAEFRHD-ISQAVHAAHAEINEAGR (SEQ ID NO: 30)

A $\beta$ 4-10/fragmento de albúmina:

FRHDSGY-ISQAVHAAHAEINEAGR (SEQ ID NO: 31)

A $\beta$ 3-9/fragmento de albúmina:

EFRHDSG-ISQAVHAAHAEINEAGR (SEQ ID NO: 32)

HA<sub>307-319</sub>/AP<sub>1-7</sub> x 3:

PKYVKQNTLKLAT-DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD (SEQ ID NO: 33)

A $\beta$ 1-7/HA<sub>307-319</sub>/A $\beta$ 1-7:

DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT-DAEFRHD (SEQ ID NO: 34)

A $\beta$ 1-7x 3/HA<sub>307-319</sub>:

DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT (SEQ ID NO: 35)

A $\beta$ 1-7x 2/HA<sub>307-319</sub>:

DAEFRHD-DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT (SEQ ID NO: 36)

A $\beta$ 1-7/HA<sub>307-319</sub>/CS de la malaria /TT<sub>830-844</sub>/TT<sub>947-967</sub>/A $\beta$ 1-7

**DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT-EKKIAKMEKASSVFNV-QYIKANSKFIGITEL-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-DAEFRHD (SEQ ID NO.:37)**

$A\beta_{1-7} \times 3/TT_{830-844}/C/TT_{947-967}$

5

**DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL-C-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO.:38)**

10

$A\beta_{1-7}/TT_{830-844}/C/TT_{947-967}$

DAEFRHD-QYIKANSKFIGITELCFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO: 39)

$A\beta_{1-7}/TT_{830-844}/C/TT_{947-967}/A\beta_{1-7}$

15

DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL-C-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-DAEFRHD (SEQ ID NO: 20)

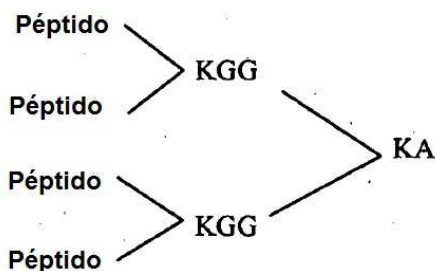
Algunos péptidos heterólogos inmunogénicos comprenden un multímero de péptidos inmunogénicos representado por la fórmula  $2^x$ , en la que x es un número entero de 1-5. Preferentemente x es 1, 2 ó 3, siendo 2 el más preferente. Cuando x es dos, un multímero de este tipo tiene cuatro péptidos inmunogénicos unidos en una configuración preferente denominada MAP4 (véase el documento US 5.229.490). Tales péptidos inmunogénicos se unen a continuación a un transportador utilizando un método de la presente invención para formar un conjugado.

20

Más adelante se muestra la configuración MAP4, en la que se producen estructuras ramificadas iniciando la síntesis del péptido en las aminas N-terminal y de la cadena lateral de la lisina. Dependiendo del número de veces que se incorpora la lisina en la secuencia y se permite que se ramifique, la estructura resultante presentará múltiples extremos N-terminales. En este ejemplo, se han producido cuatro extremos N-terminales idénticos en el núcleo que contiene la lisina ramificada. Tal multiplicidad potencia en gran medida la capacidad de respuesta de los linfocitos B afines.

25

30



35

40

Los ejemplos de tales péptidos heterólogos inmunogénicos incluyen:

Ap 1-7/toxoide tetánico 830-844 en una configuración MAP4:

DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO: 22)

45

Ap 1-7/toxoide tetánico 947-967 en una configuración MAP4:

DAEFRHD-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO: 23)

50

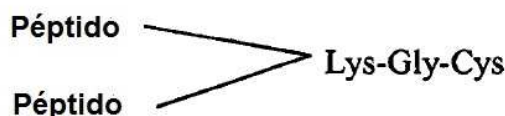
Ap 3-9/toxoide tetánico 830-844 en una configuración MAP4:

EFRHDSG-QYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO: 25)

55

DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL en una resina con 2 ramificaciones

60



65

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. Los agentes distintos de los péptidos  $A\beta$  deberían inducir una respuesta inmunogénica contra uno o más de los fragmentos preferentes de  $A\beta$  enumerados anteriormente (por ejemplo, 1-10, 1-7, 1-3 y 3-7), y también

pueden conjugarse con un transportador utilizando un método de la presente invención. Preferentemente, tales agentes, una vez conjugados con un transportador apropiado, inducen una respuesta inmunogénica que se dirige específicamente contra uno de estos fragmentos sin dirigirse contra otros fragmentos de AB. Para facilitar la conjugación de un inmunógeno peptídico con un transportador, pueden añadirse aminoácidos adicionales a los extremos terminales de los determinantes antigénicos. También pueden utilizarse restos adicionales para modificar las propiedades físicas o químicas del inmunógeno peptídico. Pueden introducirse aminoácidos tales como tirosina, cisteína, lisina, ácido glutámico o ácido aspártico, o similares, en el extremo C-terminal o N-terminal del inmunógeno peptídico. Además, también pueden introducirse conectores peptídicos que contienen aminoácidos, tales como glicina y alanina. Además, los determinantes antigénicos pueden diferir de la secuencia natural al modificarse mediante acilación del grupo NH<sub>2</sub> terminal, por ejemplo, mediante acetilación con alcanilo (C1-C20) o tioglicilo, amidación carboxilo terminal, por ejemplo, amoniaco, metilamina, etc. En algunos casos, estas modificaciones pueden proporcionar sitios para la unión a un soporte u otra molécula.

Los inmunógenos peptídicos utilizados para generar conjugados de la presente invención mediante un proceso descrito en el presente documento pueden combinarse mediante enlace para formar polímeros (multímeros), o pueden formularse en una composición sin enlace, como una mezcla. Cuando un péptido se une a un péptido idéntico, formando así un homopolímero, se presenta una pluralidad de unidades epitópicas de repetición. Por ejemplo, se utiliza la tecnología de péptidos antigénicos múltiples (MAP) para construir polímeros que contienen tanto péptidos de anticuerpos y/o CTL como péptidos. Cuando los péptidos difieren, por ejemplo, un cóctel que representa diferentes subtipos virales, diferentes epítomos dentro de un subtipo, diferentes especificidades de restricción HLA o péptidos que contienen epítomos de T cooperadores, se proporcionan heteropolímeros con unidades de repetición. Además de enlaces covalentes, también se contemplan enlaces no covalentes capaces de formar enlaces intermoleculares e intraestructurales.

Tales inmunógenos peptídicos y sus análogos se sintetizan mediante síntesis de péptidos en fase sólida o expresión recombinante, o se obtienen de fuentes naturales. Se dispone en el mercado de sintetizadores automáticos de péptidos de numerosos proveedores, tales como Applied Biosystems, Foster City, California.

La expresión recombinante puede darse en bacterias (tales como *E. coli*), levadura, células de insecto o células de mamífero. Los procedimientos para la expresión recombinante se describen en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, NY, segunda ed., 1989). También se dispone en el mercado de algunos péptidos inmunogénicos (por ejemplo, American Peptides Company, Inc., Sunnyvale, CA y California Peptide Research, Inc., Napa, CA).

También pueden cribarse genotecas aleatorias de péptidos u otros compuestos para la idoneidad como inmunógeno peptídico. Pueden producirse genotecas combinatorias para muchos tipos de compuestos que pueden sintetizarse paso a paso. Tales compuestos incluyen polipéptidos, miméticos de vuelta beta, hormonas, glicinas *N*-sustituidas oligoméricas, y oligocarbamatos y similares. Pueden construirse grandes genotecas combinatorias de los compuestos mediante el método de genotecas sintéticas codificadas (ESL) descrito en los documentos WO 95/12608, WO 93/06121, WO 94/08051, WO 95/35503 y WO 95/30642. También pueden generarse genotecas de péptidos mediante métodos de presentación en fagos (véase, por ejemplo, Devlin, documento WO 91/18980).

#### Derivatización y conjugación de un péptido inmunogénico con un transportador proteico

El sitio de fijación de un inmunógeno peptídico a un transportador proteico/polipeptídico, y la naturaleza del agente de entrecruzamiento que se utiliza para fijar un inmunógeno peptídico al transportador son importantes para la especificidad del anticuerpo resultante generado contra él. Para el reconocimiento apropiado, el inmunógeno peptídico debe acoplarse al transportador con la orientación apropiada. Para que un anticuerpo reconozca posteriormente los inmunógenos peptídicos libres sin transportador, el conjugado inmunógeno peptídico-transportador proteico/polipeptídico debe presentar los inmunógenos peptídicos de forma expuesta y accesible. La orientación óptima se consigue con frecuencia dirigiendo la reacción de entrecruzamiento a sitios específicos en los inmunógenos peptídicos. Una forma de conseguir esto con un inmunógeno peptídico es fijando un resto cisteína terminal durante la síntesis de péptidos. Esto proporciona un grupo sulfhidrilo en un extremo del péptido para la conjugación con el transportador. El entrecruzamiento mediante este grupo proporciona la fijación del inmunógeno peptídico solamente en un extremo, asegurando así la orientación coherente.

En la conjugación inmunógeno peptídico-transportador, el objetivo no es mantener el estado nativo o la estabilidad del transportador, sino presentar el hapteno de la mejor manera posible al sistema inmunitario. Para alcanzar este objetivo, la elección de la química de conjugación puede controlar el título, la afinidad y la especificidad resultante de los anticuerpos generados contra el hapteno. En algunos casos puede ser importante elegir un agente de entrecruzamiento que contenga un brazo espaciador suficientemente largo para presentar el antígeno de manera ilimitada. También puede ser importante controlar la densidad del inmunógeno peptídico en la superficie del transportador. Demasiada poca sustitución de inmunógeno peptídico puede dar como resultado escasa o nula respuesta. Una densidad demasiado alta de inmunógeno peptídico puede provocar de hecho la supresión inmunológica y disminuir la respuesta. Además, el propio entrecruzador puede generar una respuesta inmunitaria no deseada. Deben tomarse en cuenta estas cuestiones a la hora de seleccionar no sólo los reactivos de

entrecruzamiento adecuados, sino también las relaciones adecuadas entre transportador proteico/polipeptídico e inmunógeno peptídico.

5 Son posibles diversos medios para fijar los transportadores proteicos/peptídicos a los inmunógenos peptídicos. Son posibles interacciones iónicas a través de los extremos o a través del grupo  $\epsilon$ -amino de la lisina. También son posibles enlaces de hidrógeno entre los grupos laterales de los restos y el inmunógeno peptídico. Finalmente, las interacciones de conformación entre los transportadores proteicos/peptídicos y el péptido inmunogénico pueden dar lugar a una fijación estable.

10 Se han generado con éxito conjugados inmunógenos peptídicos-transportador utilizando diversos reactivos de entrecruzamiento, tales como de longitud cero, entrecruzadores homobifuncionales o heterobifuncionales. Los sistemas de reactivos disponibles más pequeños para la bioconjugación son los denominados entrecruzadores de longitud cero. Estos compuestos intervienen en la conjugación de dos moléculas formando un enlace que no contiene átomos adicionales. Por lo tanto, el espaciador es un átomo de una molécula. En muchos esquemas de conjugación, el complejo final queda unido mediante componentes químicos que añaden estructuras ajenas a las sustancias a entrecruzar. En algunas aplicaciones, la presencia de estos conectores intermedios puede ser perjudicial para el uso previsto. Por ejemplo, en la preparación de los conjugados inmunógeno peptídico-transportador el complejo se forma con la intención de generar una respuesta inmunitaria contra el hapteno fijado. De vez en cuando, una porción de los anticuerpos producidos por esta respuesta tendrán especificidad para el agente de entrecruzamiento utilizado en el procedimiento de conjugación. Los agentes de entrecruzamiento de longitud cero eliminan la posibilidad de este tipo de reactividad cruzada al mediar en un enlace directo entre dos sustancias.

25 Los reactivos homobifuncionales, que fueron los primeros reactivos de entrecruzamiento utilizados para la modificación y conjugación de macromoléculas, consistían en compuestos birreactivos que contenían el mismo grupo funcional en ambos extremos (Hartman y Wold, 1966). Estos reactivos podían ligar una proteína a otra reaccionando covalentemente con los mismos grupos comunes en ambas moléculas. Por lo tanto, las  $\epsilon$ -aminas o aminas N-terminales de la lisina de una proteína podían entrecruzarse con los mismos grupos funcionales en una segunda proteína simplemente mezclando las dos en presencia del reactivo homobifuncional.

30 Los reactivos de conjugación heterobifuncionales contienen dos grupos reactivos diferentes que pueden acoplarse a dos dianas funcionales diferentes en proteínas y otras macromoléculas. Por ejemplo, una parte de un entrecruzador puede contener un grupo amino reactivo, mientras que otra porción puede consistir en un grupo sulfhidrilo reactivo. El resultado es la capacidad de dirigir la reacción de entrecruzamiento a partes seleccionadas de las moléculas diana, obteniendo así un mejor control sobre el proceso de conjugación.

35 Se utilizan reactivos heterobifuncionales para entrecruzar proteínas y otras moléculas en un proceso de dos o tres etapas que limita el grado de polimerización que se obtiene con frecuencia mediante entrecruzadores homobifuncionales.

40 Actualmente se dispone de muchos métodos para acoplar inmunógenos peptídicos a transportadores proteicos/polipeptídicos utilizando entrecruzadores de longitud cero, homobifuncionales o heterobifuncionales. La mayoría de los métodos crean enlaces amina, amida, uretano, isotiourea o disulfuro, o en algunos casos tioéteres. El método más general de acoplamiento de proteínas o péptidos utiliza reactivos de entrecruzamiento bifuncionales. Estos son moléculas espaciadoras pequeñas que tienen grupos activos en cada extremo. Las moléculas espaciadoras pueden tener grupos activos idénticos o diferentes en cada extremo. Las funcionalidades activas, grupos de acoplamiento y enlaces más comunes formados son:

1. Aldehído - amino  $\rightarrow$  amina secundaria
2. Maleimido - sulfhidrilo  $\rightarrow$  tioéter
3. Succinimido - amino  $\rightarrow$  amida
4. Ésteres de imidato - amino  $\rightarrow$  - amida
5. Fenilazidas - amino  $\rightarrow$  fenilamina
6. Haluro de acilo - sulfhidrilo  $\rightarrow$  tioéter
7. Piridildisulfuros - sulfhidrilo  $\rightarrow$  disulfuro
8. Isotiocianato - amino  $\rightarrow$  isotiourea.

60 La reactividad de una determinada proteína transportadora, en términos de su capacidad para ser modificada por un agente de entrecruzamiento de manera que pueda conjugarse con un inmunógeno peptídico, viene determinada por su composición de aminoácidos y el lugar de los aminoácidos individuales en la secuencia en la estructura tridimensional de la molécula, así como por la composición de aminoácidos del inmunógeno peptídico.

65 En el caso de conectores ("L") entre los transportadores proteicos/peptídicos y otros péptidos (por ejemplo, un transportador proteico/peptídico y un inmunógeno peptídico), los espaciadores se seleccionan por lo general de entre Ala, Gly, u otros espaciadores neutros de aminoácidos no polares o aminoácidos polares neutros. En determinadas formas de realización, el espaciador neutro es Ala. Se entenderá que el espaciador opcionalmente

presente no tiene que estar compuesto por los mismos restos y por lo tanto puede ser un homo-oligómero o hetero-oligómero. Los espaciadores ejemplares incluyen homo-oligómeros de Ala. Cuando está presente, el espaciador será por lo general de al menos uno o dos restos, más generalmente de tres a seis restos. En otras formas de realización, el transportador proteico/polipeptídico se conjuga con un inmunógeno peptídico, preferentemente con el transportador proteico/peptídico situado en el extremo amino terminal. El péptido puede unirse mediante un conector neutro, tal como Ala-Ala-Ala o similares, y preferentemente contiene adicionalmente un resto lipídico tal como ácido palmítico o similar que está fijado a grupos amino en posición alfa y épsilon de un resto Lys ((PAM)<sub>2</sub>Lys), que está fijado al extremo amino terminal del péptido, conjugado, por lo general mediante un enlace Ser-Ser o similar.

El inmunógeno peptídico puede ser un fragmento de A $\beta$  seleccionado del grupo que consiste en A $\beta$ 1-5-L, A $\beta$ 1-7-L, A $\beta$ 1-9-L y A $\beta$ 1-12-L. En algunos aspectos el conector es GAGA (SEQ ID NO: 10).

Para facilitar la conjugación de un inmunógeno peptídico con un transportador, pueden añadirse aminoácidos adicionales a los extremos terminales de los determinantes antigénicos. También pueden utilizarse restos adicionales para modificar las propiedades físicas o químicas del inmunógeno peptídico. Pueden introducirse aminoácidos tales como tirosina, cisteína, lisina, ácido glutámico o ácido aspártico, o similares, en el extremo C-terminal o N-terminal del inmunógeno peptídico. Además, también pueden introducirse conectores peptídicos que contienen aminoácidos tales como glicina y alanina. Además, los determinantes antigénicos pueden diferir de la secuencia natural al modificarse mediante acilación del grupo NH<sub>2</sub> terminal, por ejemplo, mediante acetilación con alcanilo (C1-C20) o tioglicoilo, amidación carboxilo terminal, por ejemplo, amoniaco, metilamina, etc. En algunos casos, estas modificaciones pueden proporcionar sitios para la unión a un soporte u otra molécula.

El inmunógeno peptídico puede ser un fragmento de A $\beta$  seleccionado del grupo que consiste en A $\beta$ 1-5-C, A $\beta$ 1-7-C, A $\beta$ 1-9-C y A $\beta$ 1-12-C, en los que C es un resto aminoacídico cisteína. En algunos aspectos, el inmunógeno peptídico puede ser un fragmento de A $\beta$  seleccionado del grupo que consiste en A $\beta$ 1-5-L-C, A $\beta$ 1-7-L-C, A $\beta$ 1-9-L-C y A $\beta$ 1-12-L-C.

El inmunógeno peptídico se une al transportador proteico/peptídico directamente o mediante un conector, ya sea en el extremo amino terminal o en el carboxilo terminal del inmunógeno peptídico. Puede acilarse el extremo amino terminal del inmunógeno peptídico o del transportador proteico/peptídico. Además, el conjugado inmunógeno peptídico-transportador proteico/peptídico puede unirse a determinados lípidos alcanilo (C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>) mediante uno o más restos de enlace tales como Gly, Gly-Gly, Ser, Ser-Ser como se describe más adelante. Otros restos lipídicos útiles incluyen colesterol, ácidos grasos, y similares.

Los inmunógenos peptídicos pueden unirse a un transportador mediante entrecruzamiento químico. Las técnicas para unir un inmunógeno a un transportador incluyen la formación de enlaces disulfuro utilizando *N*-succinimidil-3-(2-piridil-tio) propionato (SPDP) (Carlsson, J *et al.* (1978) Biochem J, 173: 723,) y 4-(*N*-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC) (si el péptido carece de un grupo sulfhidrilo, éste puede proporcionarse añadiendo un resto cisteína al hapteno). Estos reactivos crean un enlace disulfuro entre ellos y los restos cisteína del péptido en una proteína y un enlace amida mediante la  $\epsilon$ -amina en una lisina, u otro grupo amino libre en otros aminoácidos. Se describen diversos de tales agentes formadores de amida/disulfuro en Immune. Rev. 62: 85 (1982). Otros agentes de acoplamiento bifuncionales forman un tioéter en vez de un enlace disulfuro. Los agentes formadores de tioéter incluyen éster reactivo 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 ácido 1-hidroxi-2-nitro-4-sulfónico, sal sódica.

Con mayor frecuencia, los restos lisina son los restos aminoacídicos más abundantes que se encuentran en las proteínas transportadoras, y estos restos se modifican utilizando reactivos de entrecruzamiento para generar sitios nucleófilos que a continuación se acoplan a un hapteno. Este acoplamiento se consigue mediante cualquiera de las cadenas laterales hidrófilas en las moléculas de hapteno que son químicamente activas. Estas incluyen el grupo guanidilo de la arginina, los grupos carboxilo del glutamato y el ácido aspártico, el grupo sulfhidrilo de la cisteína y el grupo  $\epsilon$ -amino de la lisina, por mencionar algunos. La modificación de proteínas de manera que ya puedan acoplarse a otros restos se consigue utilizando reactivos de entrecruzamiento, que reaccionan con cualquiera de las cadenas laterales en el transportador proteico o las moléculas de hapteno.

La proteína transportadora con o sin una molécula de conector se funcionaliza (derivatiza) con un reactivo que introduce sitios reactivos en la molécula de proteína transportadora que son susceptibles de modificación adicional para introducir grupos nucleófilos. En una forma de realización, se hace reaccionar el transportador con un reactivo de haloacetilación, que reacciona preferentemente con varios grupos funcionales en los restos aminoacídicos de las proteínas tal como el grupo sulfhidrilo de la cisteína, el grupo  $\epsilon$ -amina primario del resto de lisina, el  $\alpha$ -terminal de las  $\alpha$ -aminas, el tioéter de la metionina y ambos nitrógenos de la cadena lateral imidazol de la histidina (Gurd, 1967). En una forma de realización preferente, los grupos  $\epsilon$ -amino primarios en los restos lisina de la proteína transportadora se derivatizan con bromoacetato de *N*-hidroxisuccinimidilo para generar un transportador bromoacetilado. La conjugación del inmunógeno peptídico y el transportador proteico activado se llevó a cabo añadiendo lentamente el transportador activado a la solución que contenía el inmunógeno peptídico.

Mediante el proceso de la presente invención, los inmunógenos peptídicos analizados en la sección B, anterior, pueden conjugarse con cualquiera de los transportadores indicados en la reivindicación 1. Los conjugados resultantes del proceso de la presente invención pueden utilizarse como inmunógenos para la generación de anticuerpos contra A $\beta$  para su uso en la inmunoterapia pasiva/activa. Además, puede administrarse a un animal de laboratorio A $\beta$  o un fragmento de A $\beta$  unido a un transportador para producir anticuerpos monoclonales contra A $\beta$ .

En un aspecto de la invención, el conjugado es un conjugado seleccionado del grupo que consiste en A $\beta$ 1-7-CRM<sub>197</sub>, (A $\beta$ 1-7 x 3)-CRM<sub>197</sub> y (A $\beta$ 1-7 x 5)-CRM<sub>197</sub>. En un aspecto de la invención, el conjugado es un conjugado seleccionado del grupo que consiste en CRM<sub>197</sub>-A $\beta$ 1-5, CRM<sub>197</sub>-A $\beta$ 1-7, CRM<sub>197</sub>-A $\beta$ 1-9 y CRM<sub>197</sub>-A $\beta$ 1-12. En otro aspecto de la invención, el conjugado es un conjugado seleccionado del grupo que consiste en A $\beta$ 1-5-C-CRM<sub>197</sub>, A $\beta$ 1-7-C-CRM<sub>197</sub>, A $\beta$ 1-9-C-CRM<sub>197</sub>, y A $\beta$ 1-12-C-CRM<sub>197</sub>, A $\beta$ 16-23-C-CRM<sub>197</sub>, A $\beta$ 17-24-C-CRM<sub>197</sub>, A $\beta$ 18-25-C-CRM<sub>197</sub>, CRM<sub>197</sub>-C-A $\beta$ 16-23, CRM<sub>197</sub>-C-A $\beta$ 17-24, CRM<sub>197</sub>-C-A $\beta$ 18-25, A $\beta$ 16-22-C-CRM<sub>197</sub>, A $\beta$ 17-23-C-CRM<sub>197</sub>, A $\beta$ 18-24-C-CRM<sub>197</sub>, CRM<sub>197</sub>-C-A $\beta$ 16-22, CRM<sub>197</sub>-C-A $\beta$ 17-23 y CRM<sub>197</sub>-C-A $\beta$ 18-24. En aún otro aspecto de la invención, el conjugado es un conjugado seleccionado del grupo que consiste en A $\beta$ 1-5-L-C-CRM<sub>197</sub>, A $\beta$ 1-7-L-C-CRM<sub>197</sub>, A $\beta$ 1-9-L-C-CRM<sub>197</sub> y A $\beta$ 1-12-L-C-CRM<sub>197</sub>.

#### Protección

Una desventaja del uso de reactivos de acoplamiento, que introducen sitios reactivos en las cadenas laterales de las moléculas de aminoácido reactivas en el transportador y/o las moléculas de hapteno, es que si no se neutralizan los sitios reactivos pueden reaccionar con cualquier molécula no deseada, ya sea *in vitro* o *in vivo*. En el proceso de la presente invención, la protección de los grupos funcionales sin reaccionar se logra por reacción de los conjugados con grupos reactivos colgantes con N-acetilcisteamina que inactiva/protege los grupos reactivos. Otros reactivos de inactivación/protección ejemplares de la descripción incluyen cisteamina y etanolamina. Como alternativa, la protección puede lograrse por reacción con amoníaco o bicarbonato de amonio, cualquiera de los cuales convierte los grupos haloacetilo en grupos aminoacetilo. la protección también se logra a pH alcalino (9,0-9,8) utilizando hidróxido sódico o carbonato sódico, que convierte los grupos haloacetilo en grupos hidroxiacetilo. Una posible ventaja de convertir los grupos haloacetilo en grupos aminoacetilo o hidroxiacetilo, en vez de la reacción con derivados cisteamina, etanolamina, etc., es la introducción de funcionalidades químicas de tamaño relativamente menor, por reacción con amoníaco o hidróxido/carbonato. Los grupos funcionales protegidos resultantes, por ejemplo, aminoacetilo o hidroxiacetilo, proporcionan relativamente menos perturbación en la porción de proteína transportadora del conjugado. El conjugado péptido inmunógeno-proteína transportadora protegido puede purificarse según sea necesario utilizando métodos conocidos, tales como la cromatografía (filtración en gel, intercambio iónico, interacción hidrófoba o de afinidad), diálisis, ultrafiltración-diafiltración, precipitación selectiva con sulfato de amonio o alcohol, y similares.

#### Conjugados y composiciones inmunogénicas

Los conjugados de proteína péptido inmunógeno-transportador protegidos se encuentran en una composición inmunogénica para la administración a mamíferos, particularmente seres humanos, con fines profilácticos y/o terapéuticos. Los conjugados de la presente invención se utilizan para inducir y/o potenciar las respuestas inmunitarias contra inmunógenos. Por ejemplo, los conjugados de CTL-transportador se utilizan para tratar y/o prevenir la infección viral, las enfermedades amiloidogénicas, el cáncer etc. Como alternativa, también pueden utilizarse conjugados inmunógeno polipeptídico-transportador, que inducen respuestas de anticuerpos. Los ejemplos de enfermedades que pueden tratarse utilizando los conjugados de la presente invención, incluyen diversas infecciones bacterianas, infecciones virales, infecciones fúngicas, infecciones parasitarias y el cáncer.

En las aplicaciones terapéuticas, puede administrarse un conjugado de la presente invención a un individuo que ya padece una enfermedad amiloidogénica tal como la enfermedad de Alzheimer, el cáncer, o infectado con un microorganismo patógeno. Los que están en la fase de incubación o en la fase aguda de la enfermedad pueden tratarse con el conjugado de la presente invención por separado o junto con otros tratamientos, según resulte apropiado.

En las aplicaciones terapéuticas, puede administrarse a un paciente una composición inmunogénica de la presente invención en una cantidad suficiente para inducir una respuesta de CTL o respuesta humoral eficaz contra el microorganismo, la placa de amiloide o contra un antígeno tumoral expresado en una célula cancerosa, y para curar, o al menos detener parcialmente la evolución, los síntomas y/o las complicaciones de la enfermedad. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para este uso dependerán en parte de la composición peptídica, la forma de administración, la etapa y gravedad de la enfermedad que se está tratando, el peso y el estado general de salud del paciente, y el juicio del médico prescriptor.

Las cantidades terapéuticamente eficaces de las composiciones inmunogénicas de la presente invención varían generalmente para la inmunización inicial para la administración terapéutica o profiláctica, entre aproximadamente 0,1  $\mu$ g y aproximadamente 10.000  $\mu$ g de péptido para un paciente de 70 kg, por lo general de aproximadamente 0,1  $\mu$ g a aproximadamente 8.000  $\mu$ g, preferentemente entre aproximadamente 0,1  $\mu$ g y



aproximadamente 5.000 µg, y lo más preferentemente entre 0,1 µg y aproximadamente 1.000 µg. Estas dosis van seguidas de dosificaciones de refuerzo de aproximadamente 0,1 µg a aproximadamente 1.000 µg de péptido conforme a un régimen de refuerzo durante semanas a meses, dependiendo de la respuesta del paciente y la afección, midiendo las respuestas inmunitarias específicas.

Además, una composición inmunogénica de la presente invención puede utilizarse profilácticamente para prevenir y/o mejorar infecciones bacterianas, infecciones virales, infecciones fúngicas, infecciones parasitarias, la enfermedad amiloidogénica o el cáncer. Las cantidades eficaces son como se ha descrito anteriormente. Además, un experto en la materia también sabrá cómo ajustar o modificar los tratamientos profilácticos, según resulte apropiado, por ejemplo reforzando y ajustando las dosificaciones y regímenes de dosificación.

La administración terapéutica puede comenzar al primer signo de enfermedad o la detección o eliminación quirúrgica de tumores o poco después del diagnóstico en caso de infección aguda. Esto va seguido de dosis de refuerzo hasta detener o revertir la evolución de la enfermedad o reducir sustancialmente los síntomas y durante un período de entonces. En una infección crónica, pueden ser necesarias dosis iniciales altas seguidas de dosis de refuerzo.

El tratamiento de un individuo infectado con las composiciones de la invención puede acelerar la resolución de la infección en los individuos con infección aguda. Para aquellos individuos susceptibles (o predispuestos) a desarrollar una infección crónica, las composiciones son particularmente útiles en métodos para prevenir la evolución desde la infección aguda a la crónica. Cuando se identifica a los individuos susceptibles antes de o durante la infección, por ejemplo, como se describe en el presente documento, la composición puede dirigirse a ellos, minimizando la necesidad de ser administrada a una población mayor.

Los conjugados de la presente invención también pueden utilizarse para el tratamiento de la infección crónica y para estimular el sistema inmunitario para que elimine células infectadas por virus en los individuos con infecciones latentes. Es importante proporcionar una cantidad de la composición inmunogénica de la presente invención en una formulación y un modo de administración suficientes para inducir y/o potenciar eficazmente una respuesta inmunitaria. Por lo tanto, para el tratamiento de una infección crónica, una dosis representativa se encuentra en el intervalo comprendido entre aproximadamente 0,1 µg y aproximadamente 10.000 µg de péptido, por lo general entre aproximadamente 0,1 µg y aproximadamente 8.000 µg, preferentemente entre aproximadamente 0,1 µg y aproximadamente 5.000 µg, y lo más preferentemente entre 0,1 µg y aproximadamente 1.000 µg para un paciente de 70 kg por dosis. Pueden ser necesarias dosis de inmunización seguidas de dosis de refuerzo a intervalos establecidos, por ejemplo, de una a cuatro semanas, posiblemente durante un período de tiempo prolongado para inmunizar eficazmente a un individuo. En caso de infección crónica, la administración debe continuar hasta que al menos los síntomas clínicos o las pruebas de laboratorio indiquen que la infección viral se ha eliminado o reducido sustancialmente y durante un período a partir de entonces.

Las composiciones inmunogénicas de la presente invención para el tratamiento terapéutico o profiláctico pueden administrarse por vía parenteral, tópica, intravenosa, oral, subcutánea, intraarterial, intracraneal, intraperitoneal, intranasal o intramuscular para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico. Una vía de administración típica de un agente inmunogénico es la subcutánea, aunque pueden ser igualmente eficaces otras vías. Otra vía común es la inyección intramuscular. Este tipo de inyección se realiza casi siempre en los músculos del brazo o la pierna. En algunos métodos, los agentes se inyectan directamente en un tejido concreto en el que se han acumulado depósitos, por ejemplo, la inyección intracraneal. Para la administración del anticuerpo resulta preferente la inyección intramuscular o la infusión intravenosa. En algunos métodos, se inyectan directamente en el cráneo anticuerpos terapéuticos particulares. Debido a la facilidad de administración, las composiciones inmunogénicas de la invención son especialmente adecuadas para la administración oral. La invención proporciona adicionalmente composiciones inmunogénicas para la administración parenteral, que comprenden una solución de los conjugados, disueltos o suspendidos en un vehículo aceptable, preferentemente un vehículo acuoso.

Pueden utilizarse diversos diluyentes, excipientes y tampones, por ejemplo, agua, agua tamponada, solución salina tamponada con fosfato, glicina al 0,3%, ácido hialurónico y similares. Estas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas, o pueden esterilizarse por filtración. Las soluciones acuosas resultantes pueden envasarse para su uso tal como están, o liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con una solución estéril antes de la administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según sea necesario para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como amortiguadores de pH, reguladores de la tonicidad, humectantes y similares, por ejemplo, acetato sódico, lactato sódico, cloruro sódico, cloruro potásico, cloruro cálcico, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina, etc.

Para las composiciones sólidas, pueden utilizarse vehículos sólidos no tóxicos convencionales. Estos pueden incluir, por ejemplo, manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio, y similares, de calidad farmacéutica. Para la administración oral, se forma una composición no tóxica farmacéuticamente aceptable incorporando cualquiera de los excipientes empleados normalmente, tales como los vehículos enumerados anteriormente, y generalmente un 10%-95% de

principio activo, es decir, uno o más conjugados de la invención, y más preferentemente a una concentración del 25%-75%.

La concentración de las composiciones inmunogénicas de la presente invención en las formulaciones farmacéuticas puede variar ampliamente, es decir, desde menos de aproximadamente un 0,1%, normalmente un 0,1% a menos aproximadamente un 2%, hasta un 20% a 50% o más en peso, y se seleccionará principalmente por volúmenes de líquido, viscosidades, etc., según el modo particular de administración seleccionado.

Los conjugados de la presente invención también pueden administrarse mediante liposomas, que sirven para dirigir los conjugados a un tejido particular, tal como el tejido linfoide, o dirigirlos selectivamente a las células infectadas, así como aumentar la semivida de la composición peptídica. Los liposomas incluyen emulsiones, espumas, micelas, monocapas insolubles, cristales líquidos, dispersiones de fosfolípidos, capas laminares y similares. En estas preparaciones la composición a liberar se incorpora como parte de un liposoma, en solitario o junto con una molécula, que se une, por ejemplo, a un receptor frecuente entre las células linfoides. Estas moléculas incluirían anticuerpos monoclonales, que se unen al antígeno CD45, o con otras composiciones terapéuticas o inmunogénicas. Por lo tanto, los liposomas rellenos de una composición deseada de la presente invención pueden dirigirse al sitio de las células linfoides, donde a continuación los liposomas liberarán las composiciones peptídicas terapéuticas/inmunogénicas seleccionadas. Los liposomas para su uso con los conjugados de la invención se forman a partir de lípidos formadores de vesículas convencionales, que generalmente incluyen fosfolípidos neutros y cargados negativamente y un esteroide, tal como colesterol. La selección de lípidos se orienta generalmente teniendo en cuenta el tamaño del liposoma, la labilidad en medio ácido y la estabilidad de los liposomas en el torrente sanguíneo. Se dispone de diversos métodos para preparar liposomas, como se describe en, por ejemplo, Szoka, *et al.*, Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467 (1980), las patentes de EE.UU. N° 4.235.871, N° 4.501.728, N° 4.837.028 y N° 5.019.369.

Para dirigirse a las células inmunitarias, un ligando a incorporar en el liposoma puede incluir anticuerpos o fragmentos de los mismos específicos para los determinantes de la superficie celular de las células deseadas del sistema inmunitario. Puede administrarse una suspensión de liposomas que contiene una composición de la presente invención por vía intravenosa, a nivel local, por vía tópica, etc., en una dosis que varía según, entre otras cosas, la forma de administración, la composición a administrar y la fase de la enfermedad a tratar.

Para la administración en aerosol, las composiciones de la presente invención se suministran preferentemente en forma finamente dividida junto con un tensioactivo y propulsor. Los porcentajes típicos de la composición son del 0,01%-20% en peso, preferentemente del 1%-10%. Por supuesto, el tensioactivo no será tóxico, y preferentemente será soluble en el propulsor. Son representativos de tales agentes los ésteres o ésteres parciales de ácidos grasos que contienen de 6 a 22 átomos de carbono, tales como los ácidos caproico, octanoico, láurico, palmítico, esteárico, linoleico, linolénico, olestérico y oleico con un alcohol polihídrico alifático o su anhídrido cíclico. Pueden emplearse ésteres mixtos, tales como glicéridos mixtos o naturales. El tensioactivo puede constituir el 0,1%-20% en peso de la composición, preferentemente el 0,25%-5%. El resto de la composición es generalmente propulsor. Si se desea, también puede incluirse un vehículo, como con lecitina para la administración intranasal.

Las composiciones de la presente invención también pueden utilizarse para fabricar anticuerpos monoclonales. Tales anticuerpos pueden ser útiles como potenciales agentes terapéuticos o de diagnóstico.

Las composiciones de la presente invención también pueden utilizarse como reactivos de diagnóstico. Por ejemplo, puede utilizarse una composición de la invención para determinar la susceptibilidad de un individuo particular a un régimen de tratamiento, que emplea los inmunógenos polipeptídicos, y por lo tanto puede ser útil en la modificación de un protocolo de tratamiento existente o en la determinación de un pronóstico para un individuo afectado. Además, las composiciones de la presente invención también pueden utilizarse para predecir qué individuos corren un riesgo considerable de desarrollar una infección crónica.

Los conjugados de la presente invención puede administrarse opcionalmente en combinación con otros agentes que son al menos parcialmente eficaces en el tratamiento y/o la mejora de una enfermedad y/o sus síntomas. En el caso del Alzheimer y el síndrome de Down, en los que se producen depósitos de amiloide en el cerebro, los conjugados de la invención pueden administrarse junto con otros agentes que aumentan el paso de los agentes de la invención a través de la barrera hematoencefálica.

La composición inmunogénica contiene por lo general un adyuvante. Un adyuvante es una sustancia que potencia la respuesta inmunitaria cuando se administra junto con un inmunógeno o antígeno. Varias citocinas o linfocinas han demostrado tener actividad moduladora del sistema inmunitario, y por lo tanto pueden utilizarse como adyuvantes, incluidas, pero no limitadas a, las interleucinas 1- $\alpha$ ,  $\beta$ -1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.723.127), 13, 14, 15, 16, 17 y 18 (y sus formas mutantes), los interferones  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , el factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.078.996), el factor estimulador de colonias de macrófagos, el factor estimulador de colonias de granulocitos, GSF y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  y  $\beta$ . Aún otros adyuvantes útiles en la presente invención incluyen una quimiocina, incluidas sin limitación, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  y RANTES. También pueden ser útiles como

adyuvantes las moléculas de adhesión, tales como una selectina, por ejemplo, L-selectina, P-selectina y E-selectina. Aún otros adyuvantes útiles incluyen, sin limitación, una molécula similar a la mucina, por ejemplo, CD34, GlyCAM-1 y MadCAM-1, un miembro de la familia de las integrinas tal como LFA-1, VLA-1, Mac-1 y p150.95, un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, tal como PECAM, los ICAM, por ejemplo, ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-3, CD2 y LFA-3, moléculas coestimuladoras tales como CD40 y CD40L, factores de crecimiento incluidos el factor de crecimiento vascular, el factor de crecimiento nervioso, el factor de crecimiento de fibroblastos, el factor de crecimiento epidérmico, B7.2, PDGF, BL-1 y el factor de crecimiento del endotelio vascular, moléculas receptoras incluidas Fas, el receptor de TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2 y DR6. Aún otra molécula adyuvante incluye Caspasa (ICE). Véase también las publicaciones de patente internacional N° WO98/17799 y N° WO99/43839.

Los adyuvantes adecuados utilizados para potenciar una respuesta inmunitaria incluyen, sin limitación, MPL™ (monofosforil lípido A 3-O-desacilado; Corixa, Hamilton, MT), que se describe en la patente de EE.UU. N° 4.912.094. También resultan adecuados para su uso como adyuvantes los análogos sintéticos del lípido A o compuestos de fosfato de aminoalquil glucosamina (AGP), o derivados o análogos de los mismos, que están disponibles en Corixa (Hamilton, MT), y que se describen en la patente de EE.UU. N° 6.113.918. Uno de tales AGP es 2-[(R)-3-Tetradecanoiloxitetradecancilamino] etil 2-Desoxi-4-O-fosfono-3-O-[(S)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-2-[(R)-3-tetradecanoiloxi-tetradecanoil-amino]-b-D-glicopiranosido, conocido como 529 (también conocido como RC529; Corixa). Este adyuvante 529 está formulado como una forma acuosa (529 AF) o como una emulsión estable (529 SE).

Aún otros adyuvantes incluyen emulsiones de aceite mineral y agua, sales de calcio tales como fosfato cálcico, sales de aluminio (alumbre), tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, etc., Amphigen, Avridina, L121/escualeno, D-lactida-polilactida/glucósido, ácidos plurónicos, polioles, dipéptido muramilo, *Bordetella* muerta, saponinas, tales como Stimulon™ QS-21 (Antigenics, Framingham, MA), que se describe en la patente de EE.UU. N° 5.057.540, y partículas generadas a partir de los mismos tales como los ISCOM (complejos inmunoestimuladores), *Mycobacterium tuberculosis*, lipopolisacáridos bacterianos, polinucleótidos sintéticos tales como oligonucleótidos que contienen un motivo CpG (patente de EE.UU. N° 6.207.646), una toxina de pertussis (PT), o una toxina termolábil de *E. coli* (LT), particularmente LT-K63, LT-R72, PT-K9/G129; véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente internacional N° WO 93/13302 y N° WO 92/19265.

También son útiles como adyuvantes las toxinas del cólera y mutantes de las mismas, incluidos los descritos en la solicitud de patente internacional publicada número WO 00/18434 (en la que el ácido glutámico en la posición de aminoácido 29 se sustituye por otro aminoácido (distinto del ácido aspártico, preferentemente una histidina). Se describen toxinas CT o mutantes similares en la solicitud de patente internacional publicada número WO 02/098368 (en la que la isoleucina en la posición de aminoácido 16 se sustituye por otro aminoácido, ya sea en solitario o en combinación con la sustitución de la serina en la posición de aminoácido 68 por otro aminoácido; y/o en la que la valina en la posición de aminoácido 72 se sustituye por otro aminoácido). Se describen otras toxinas CT en la solicitud de patente internacional publicada número WO 02/098369 (en la que la arginina en la posición de aminoácido 25 se sustituye por otro aminoácido; y/o se inserta un aminoácido en la posición de aminoácido 49; y/o se insertan dos aminoácidos en la posición de aminoácido 35 y 36).

Debe entenderse que la referencia a lo largo de toda la presente memoria a cualquier teoría para explicar los resultados descritos no limita el alcance de la invención. Con independencia del método mediante el que actúe la invención, los resultados y las ventajas descritos en el presente documento pueden conseguirse por referencia a los siguientes ejemplos de la invención.

Será evidente para un experto en la materia que pueden realizarse muchos cambios y modificaciones en la misma sin alejarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

## EJEMPLO 1

### Conjugación de CRM<sub>197</sub> con péptido Aβ

Se llevó a cabo la conjugación de haptenos/péptidos antigénicos haciendo reaccionar el transportador CRM<sub>197</sub> activado, que tiene treinta y nueve restos lisina, con un hapteno/péptido antigénico que tiene un grupo tiol colgante utilizando el método que se describe más adelante (Figura 1). Todos los péptidos Aβ contenían un resto cisteína en el extremo carboxilo terminal para facilitar la conjugación de estos péptidos mediante el grupo sulfhidrilo del cisteinilo con la proteína transportadora. Estos péptidos se produjeron mediante síntesis en fase sólida.

### I. Activación

Se bromoacetilaron los grupos amino libres de CRM<sub>197</sub> por reacción con un exceso de éster de *N*-hidroxisuccinimida del ácido bromoacético (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (Bernatowicz y Matsueda, 1986). A una solución enfriada en hielo de CRM<sub>197</sub> (~15 mg), se añadió NaHCO<sub>3</sub> 1,0 M al 10% (v/v) (pH 8,4). Se disolvió éster de *N*-hidroxisuccinimida del ácido bromoacético, igual en peso al del CRM<sub>197</sub> utilizado, en 200 µl de dimetilformamida

(DMF), añadido lentamente al CRM<sub>197</sub>, y se mezcló suavemente a temperatura ambiente en oscuridad durante 1 hora. La proteína bromoacetilada (activada) resultante se purificó haciéndola pasar por una columna de desalado (P6-DG) utilizando como eluyente PBS/EDTA 1 mM (pH 7,0). Después de la purificación, se combinaron las fracciones correspondientes al CRM<sub>197</sub> activado y se realizó la estimación de la concentración de proteína mediante el ensayo de proteínas BCA. Los grupos amino de la proteína, antes y después del tratamiento con éster de N-hidroxisuccinimida del ácido bromoacético, se hicieron reaccionar con ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBSA), que hizo de indicador de bromoacetilación (Means *et al.*, 1972).

## II. Conjugación

Antes de la conjugación, se hicieron reaccionar los péptidos con 5,5'-ditio-bis(ácido 2-nitrobenzoico) [reactivo de Ellman] para verificar el contenido de grupos SH libres (reducidos entre un 62%-88%). Para los primeros cuatro péptidos A $\beta$  (aminoácidos 1-7 sin conector, aminoácidos 1-12 con conector GAGAC, aminoácidos 1-9 con conector GAGAC, y aminoácidos 1-7 con conector GAGAC), se disolvieron aproximadamente 8,0 mg-10,0 mg de péptido en agua destilada estéril hasta una concentración aproximada de 20 mg/ml. Se añadió lentamente el péptido al CRM<sub>197</sub> activado frío en una relación 1:1 (p/p) y se ajustó el pH a aproximadamente 7,0-7,2 con la adición de 20  $\mu$ l-36  $\mu$ l de NaOH 1 N. El material resultante se mezcló suavemente durante la noche a 4°C en oscuridad seguido de diálisis en oscuridad frente a dos cambios de 1 litro de PBS, pH 7,2. Para los siguientes cuatro péptidos A $\beta$  (aminoácidos 1-5 sin conector, aminoácidos 1-9 sin conector, aminoácidos 1-12 sin conector, y aminoácidos 1-5 con conector), se utilizó una reacción con reactivo de Ellman para verificar la grupos SH libres. El CRM<sub>197</sub> se bromoacetiló, se purificó y se hizo reaccionar con TNBSA como se ha descrito anteriormente. El pH de cada péptido se ajustó a 7,0 con la adición de NaPO<sub>4</sub> 0,1 M (pH 8,5) a 2,2x el volumen del péptido disuelto. Se añadió lentamente el péptido al CRM<sub>197</sub> activado frío en una relación 1:1 y se dejó reaccionar durante la noche a 4°C en oscuridad. El material resultante se sometió a diálisis. Se conjugó un péptido de control final (1-12mero en orientación inversa) con CRM<sub>197</sub> como se ha descrito anteriormente con la siguiente modificación. En vez de ajustar el pH del péptido a 7,0, se ajustó el pH del CRM<sub>197</sub> activado a aproximadamente 7,5 con la adición de NaPO<sub>4</sub> 0,5 M al 20% (v/v) (pH 8,0). Se transfirió cada conjugado, después de la diálisis, a un tubo de polipropileno de 15 ml estéril, envuelto en papel de aluminio, y se almacenó a 4°C. Se verificó posteriormente la activación de los restos amino reactivos en el transportador mediante espectrometría de masas.

Conjugado	Péptido inmunogénico
A $\beta$ 1-5-C-CRM <sub>197</sub>	DAEFR-C (SEQ ID NO:1)
A $\beta$ 1-7-C-CRM <sub>197</sub>	DAEFRHD-C (SEQ ID NO:2)
A $\beta$ 1-9-C-CRM <sub>197</sub>	DAEFRHDSG-C (SEQ ID NO:3)
A $\beta$ 1-12-C-CRM <sub>197</sub>	DAEFRHDSGYEV-C (SEQ ID NO:4)
A $\beta$ 1-5-L-C-CRM <sub>197</sub>	DAEFR-GAGA-C (SEQ ID NO:5)
A $\beta$ 1-7-L-C-CRM <sub>197</sub>	DAEFRHD-GAGA-C (SEQ ID NO:6)
A $\beta$ 1-9-L-C-CRM <sub>197</sub>	DAEFRHDSG-GAGA-C (SEQ ID NO:7)
A $\beta$ 1-12-L-C-CRM <sub>197</sub>	DAEFRHDSGYEV-GAGA-C (SEQ ID NO:8)
A $\beta$ 12-1-C-CRM <sub>197</sub> (CONTROL NEGATIVO)	VEYGS DHRFEAD-C (SEQ ID NO: 9)
L = conector (GAGA) (SEQ ID NO:10)	

## EJEMPLO 2

### Preparación de conjugado péptido A $\beta$ -CRM<sub>197</sub> y purificación mediante ultrafiltración bromoacetilación de CRM<sub>197</sub>

Se hizo reaccionar CRM<sub>197</sub> (100 mg) en tampón fosfato sódico 0,01 M, NaCl al 0,9%, pH 7,0, con éster de N-hidroxisuccinimida del ácido bromoacético (disuelto hasta 20 mg/ml en DMSO) en una relación ponderal de 1:1 en atmósfera de argón. La reacción se tituló según fue necesario para mantener el pH a 7,0. La mezcla se agitó en oscuridad durante 1,5 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró a 1,2  $\mu$ m en el depósito de material retenido de un sistema UF/DF (Millipore Labscale TFF, Billerica, MA). La purificación se realizó utilizando una membrana UF de 30K o 10K mediante diafiltración (30 veces) frente a 0,01 M de tampón fosfato sódico/NaCl al 0,9%, pH 7,0. El CRM<sub>197</sub> bromoacetilado se filtró haciéndolo pasar por un filtro de 0,2  $\mu$ m. El grado de bromoacetilación se determinó haciendo reaccionar el CRM<sub>197</sub> activado con cisteína, seguido de análisis de aminoácidos y cuantificación de la carboximetilcisteína resultante (CMC).

### Conjugación de péptido A $\beta$ y CRM<sub>197</sub> bromoacetilado y protegido con N-acetilcisteamina

Se transfirió CRM<sub>197</sub> bromoacetilado (50 mg) a un recipiente de reacción. A la solución agitada, mantenida a 2°C-8°C, se añadió carbonato sódico/bicarbonato sódico 1 M. Se realizó la titulación para conseguir un pH objetivo de 9,0, en atmósfera de argón. Por separado, se pesaron 50 mg de péptido A $\beta$  y se disolvieron en agua para inyectables (WFI) a 20 mg/ml. A esta solución se añadió carbonato sódico/bicarbonato sódico 1 M hasta lograr un pH de 9,0. Se añadió la solución de péptido a la solución de CRM<sub>197</sub> bromoacetilado, y se agitó la mezcla a 2°C-8°C

durante 14-18 horas. Los grupos bromoacetilo restantes se protegieron con un exceso molar de 20 veces de *N*-acetilcisteamina durante 3-6 horas a 2°C-8°C.

La mezcla de reacción se filtró a través de un filtro de 1,2 µm en el depósito de material retenido de un sistema UF/DF (Millipore XL), y el conjugado se purificó a temperatura ambiente mediante diafiltración, 30 veces, en una membrana MWCO de 30K o 10K (Millipore) mediante diafiltración frente a 0,01 M de tampón fosfato sódico/NaCl al 0,9%, pH 7,0. El material retenido se recogió y se filtró a 0,2 µm y se analizó para el contenido de proteína (ensayo colorimétrico de Lowry o Micro-BCA), mediante SDS-PAGE, mediante análisis de aminoácidos, y para la inmunogenicidad en ratones.

### EJEMPLO 3

#### Conversión mediante protección de los grupos bromoacetilo sin reaccionar en grupos aminoacetilo

Se transfirió a un recipiente de reacción CRM<sub>197</sub> bromoacetilado (50 mg), preparado como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 2. A la solución agitada, mantenida a 2°C-8°C, se añadió carbonato sódico/bicarbonato sódico 1M. Se realizó la titulación para conseguir un pH objetivo de 9,0, en atmósfera de argón. Por separado, se pesaron 50 mg de péptido Aß y se disolvieron en WFI hasta 20 mg/ml. A esta solución se añadió carbonato sódico/bicarbonato sódico 1 M hasta lograr un pH de 9,0. Se añadió la solución de péptido a la solución del CRM<sub>197</sub> bromoacetilado, y la mezcla se agitó a 2°C-8°C durante 14-18 horas. Los grupos bromoacetilo restantes se protegieron utilizando una solución de bicarbonato de amonio al 8% durante 4 horas a 2°C-8°C.

La mezcla de reacción se filtró a 1,2 µm en el depósito de material retenido de un sistema UF/DF (Millipore XL), y el conjugado se purificó a temperatura ambiente mediante diafiltración, 30 veces, en una membrana MWCO de 10K o 30K mediante diafiltración frente a 0,01 M de tampón fosfato sódico/NaCl al 0,9%, pH 7,0. El material retenido se recogió y se filtró a 0,2 µm y se analizó para el contenido de proteína (ensayo colorimétrico de Lowry o Micro-BCA), mediante SDS-PAGE, mediante análisis de aminoácidos, y para la inmunogenicidad en ratones.

### EJEMPLO 4

#### Determinación cuantitativa de S-carboximetilcisteína y S-carboximetilcisteamina como evaluación del grado de conjugación y protección de los conjugados inmunógeno peptídico-proteína/polipéptido

La hidrólisis ácida de los conjugados proteína-péptido generados utilizando la química de activación con bromoacetilo dio como resultado la formación de S-carboximetilcisteína (CMC) estable en medio ácido a partir de las cisteínas en los sitios conjugados y la formación de S-carboximetilcisteamina (CMCA) estable en medio ácido a partir de la cisteamina en los sitios protegidos (Figura 2). Todas las lisinas conjugadas y protegidas se volvieron a convertir en lisina y se detectaron como tal. Todos los demás aminoácidos se volvieron a hidrolizar a aminoácidos libres a excepción del triptófano y la cisteína, que fueron destruidos por las condiciones de hidrólisis. La asparagina y la glutamina se convirtieron en ácido aspártico y ácido glutámico, respectivamente.

Las muestras de conjugado se diluyeron con agua desionizada hasta una concentración total de proteína inferior a 1 mg/ml. Se secaron dos alícuotas de 10 microgramos de cada conjugado y se resuspendieron en 100 µl de HCl 6N [Pierce], 5 µl de fenol fundido [Sigma-Aldrich], y 1 µl de 2-mercaptoetanol [Sigma-Aldrich]. A continuación, se incubaron las muestras al vacío (100 mT) a 110°C durante 22 horas. Los hidrolizados resultantes se secaron, se resuspendieron en 250 µl de tampón de dilución de muestras de citrato sódico Beckman Na-S (pH 2,2) [Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA], y se filtraron utilizando filtros de boquilla de jeringa de nailon de 0,2 µm Whatman y jeringas de 1 ml.

A continuación, se cargó cada muestra en un bucle de muestreo de un analizador de aminoácidos Beckman 6300 y se colocó en el analizador. Los aminoácidos de cada muestra hidrolizada y control se separaron utilizando cromatografía de intercambio iónico seguida de la reacción con una solución de Ninhydrin NinRX de Beckman a 135°C. A continuación, los aminoácidos derivatizados se detectaron en el alcance visible a 570 nm y 440 nm (véase la Tabla 1). Se procesó un conjunto convencional de aminoácidos [Pierce Amino Acid Standard H] que contenía 500 picomoles de cada aminoácido junto con las muestras y los controles para cada conjunto de análisis. Se añadió S-carboximetilcisteína [Sigma-Aldrich] al patrón.

Tabla 1

Tiempos de retención para los aminoácidos utilizando el Programa de Gradiente 1 en el analizador de aminoácidos Beckman 6300			
Tiempo de retención (min.)	Aminoácido	Longitud de onda utilizada para la detección	
8,3	Carboximetilcisteína	CMC	570
9,6	Ácido aspártico y asparagina	Asx	570
11,3	Treonina	Thr	570
12,2	Serina	Ser	570
15,8	Ácido glutámico y glutamina	Glx	570 y 440
18,5	Prolina	Pro	440
21,8	Glicina	Gly	570

23,3	Alanina	Ala	570
29,0	Valina	Val	570
32,8	Metionina	Met	570
35,5	Isoleucina	Ile	570
36,8	Leucina	Leu	570
40,5	Tirosina	Tyr	570
42,3	Fenilalanina	Phe	570
45,4	Carboximetilcisteamina	CMCA	570
48,8	Histidina	His	570
53,6	Lisina	Lys	570
70,8	Arginina	Arg	570

Las áreas de cada pico patrón se utilizaron como equivalencia cuantitativa para la evaluación proporcional de cada muestra. La prolina se determinó a partir de 440 nm y se convirtió en una equivalencia en 570 nm utilizando ácido glutámico, el aminoácido más cercano.

Cada uno de estos valores de picomol se convirtió en una relación molar de restos aminoacídicos utilizando una comparación de los picomoles de lisina con el valor teórico de la lisina presente en la proteína. Se eligió la lisina para esta evaluación en base a su fijación covalente a la cisteína y la cisteamina y la hidrólisis similar esperada. A continuación, los números resultantes de moles de aminoácidos se compararon con la composición de aminoácidos de la proteína y se presentaron junto con los valores de CMC y CMCA. El valor de CMC se utilizó directamente para la evaluación del grado de conjugación y el valor de CMCA se utilizó directamente para la evaluación del grado de protección.

#### EJEMPLO 5

##### Caracterización y optimización de los conjugados peptídicos A $\beta$ -CRM<sub>197</sub>

Para verificar la conjugación, se analizaron todos los conjugados péptido-CRM<sub>197</sub> mediante análisis de aminoácidos y espectrometría de masas de tiempo de vuelo con desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI-TOF). Para cada conjugado, se determinaron los moles de péptido conjugados con cada mol de CRM<sub>197</sub> mediante análisis de aminoácidos (número de restos S-carboximetilcisteína) y espectrometría de masas MALDI-TOF. Los valores determinados mediante cada método estuvieron en general en concordancia.

#### I. Cromatografía de exclusión por tamaño:

Se sacaron del almacenamiento muestras de concentrado por lotes y se dejaron calentar a temperatura ambiente. La muestra de conjugado de péptido A $\beta$  se mezcló suavemente para garantizar una preparación homogénea. La muestra de conjugado de péptido A $\beta$  se centrifugó en una microcentrífuga Eppendorf para eliminar cualquier partícula. El sobrenadante se extrajo para la cromatografía TosoHaas TSK-Gel G3000SW (TosoHaas, Stuttgart, Alemania). Se conectó una columna TosoHaas TSK-Gel G3000SW a un sistema de HPLC y se ajustó el límite de presión a 1,4 MPa. La columna se equilibró con al menos 30 ml de PBS (fosfato sódico 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,2  $\pm$  0,1) a un caudal de 0,75 ml/min. La muestra de conjugado de péptido A $\beta$  se cargó en la columna TosoHaas TSK-Gel G3000SW utilizando los siguientes parámetros:

Concentración de la muestra de conjugado de péptido A $\beta$ : 1,5  $\pm$  1,0 mg/ml  
Caudal: 0,75 ml/min  
Volumen de muestra: 0,1 ml  
Tiempo de proceso: 30 minutos

La absorbancia se monitorizó a 280 nm y a 210 nm. Para el almacenamiento a largo plazo, se equilibró la columna TosoHaas TSK-Gel G3000SW con al menos 50 ml de etanol al 20% a un caudal de 0,5 ml/min - 1,0 ml/min.

## 5 II. PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida):

10 El CRM<sub>197</sub> activado (bromoacetilado) y los conjugados péptido Aβ-CRM<sub>197</sub> se examinaron mediante geles de SDS utilizando una electroforesis NuPAGE Bis-Tris (Novex, Frankfurt, Alemania) con un pH neutro, un sistema de minigel prefabricado de poliacrilamida y tampón de electroforesis NuPAGE MES SDS. Se mezcló una alícuota de 8 ug de cada conjugado o CRM activado con tampón de muestra reductor y se calentó a 100°C durante 5 minutos. Se cargaron los conjugados y los patrones de peso molecular (PM) (Invitrogen, Carlsbad, CA) en un gel NuPage (Novex) al 10% (p/v, acrilamida) en base a un sistema tamponado con Bis-Tris-HCl y se procesaron en tampón de electroforesis MES SDS-PAGE (Laemmli). Después del SDS-PAGE, se tiñó el gel con Pierce Gel Code Blue (Pierce, Rockford, IL). El conjugado péptido Aβ-CRM<sub>197</sub> estuvo representado por una banda principal de aproximadamente 66 kDa, por encima de la banda de CRM nativo y una banda de dímero de aproximadamente 120 kDa, junto con bandas de multímeros menores (datos no mostrados).

## III. Análisis mediante espectrometría de masas MALDI-TOF de los conjugados péptido-CRM<sub>197</sub>:

20 Se utilizó la espectrometría de masas para la aproximación inmediata del grado de conjugación. Se analizaron alícuotas adecuadas de muestras de conjugado y CRM<sub>197</sub> activado mediante espectrometría de masas MALDI-TOF utilizando como matriz ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxi-cinámico (ácido sinapínico). Se descubrió que el peso molecular del CRM<sub>197</sub> activado determinado mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (espectrómetro de masas Finnigan MAT Lasermat 2000, Ringoes, NY) estaba en torno a 60,5 kDa y para los conjugados variaba de 65 kDa a 74kDa dependiendo del grado de conjugación (datos no mostrados). Se descubrió que hasta 22 de las lisinas (~50%) en CRM<sub>197</sub> estaban modificadas en una relación 1:1.

## IV. Experimentos de optimización:

30 El grado de activación y conjugación están en función de la relación reactivo:proteína, la temperatura de la reacción y el pH del tampón de reacción. Más adelante se proporcionan algunos ejemplos para ilustrar las condiciones de conjugación óptimas llevadas a cabo para identificar las condiciones óptimas de pH con el fin de tener parámetros de control de proceso reproducibles para las reacciones de conjugación. Los resultados (Figura 3) demostraron que la reacción de conjugación con Aβ 5-mero (DAEFRC) (SEQ ID NO: 1), así como Aβ 7-mero (DAEFRHDC) (SEQ ID NO: 2) depende del pH y produce un mayor grado de modificación/conjugación cuando se aumenta el pH de las condiciones de reacción. Utilizando la sal de TFA de péptidos 5-meros y 7-meros, se evaluó el grado de conjugación a pH 9,0 con cantidades variables de carga de péptido (Figura 4). Resulta evidente a partir de estos resultados que pueden generarse conjugados peptídicos con un número definido de copias de péptido por molécula de CRM cambiando la relación péptido/CRM activado durante el proceso de conjugación. Se realizaron experimentos similares utilizando sal de acetato del péptido Aβ 7-mero.

45 Para la conjugación Aβ1-7/CRM, el proceso de protección se evaluó comparando los moles de CMCA por CRM con los moles de CMC por CRM. Puesto que el total de CMC y CMCA fue constante para cada relación péptido:CRM ensayada, se supuso que el proceso de protección estaba terminado (Figura 5). La modificación total en el conjugado se mantuvo entre 19 y 21, comparable al número de lisinas bromoacetiladas (Figura 5). Estos experimentos se realizaron con TFA como contraión para el péptido. Se repitió la conjugación Aβ1-7/CRM utilizando la sal de acetato del péptido en vez de la sal de TFA, y estos datos se muestran en la Figura 5 y 6. El proceso de protección pareció llegar a su término, manteniéndose el total de la CMC y CMCA para cada punto entre 20 y 22. Las condiciones para la reacción de conjugación Aβ-CRM se optimizaron a pH 9,0, controlándose el grado de conjugación mediante la relación entre péptido y CRM en la reacción. Cambiando la relación de 0,1 a 1,5, puede modificarse el grado de conjugación (Figura 6).

55 El grado de activación y conjugación están en función de la relación reactivo:proteína, la temperatura de la reacción y el pH del tampón de reacción. El grado de modificación (conjugación) para cada conjugado se calculó restando el valor de la masa de CRM<sub>197</sub> activado del valor de la masa de cada conjugado y dividiendo por la masa del péptido utilizado para preparar el conjugado. El grado de modificación (conjugación) para todos los conjugados se describe en la Tabla 2.

60 El grado de conjugación también se comparó con los valores determinados por la cantidad estimada de restos S-carboximetilcisteína formados por mol de CRM<sub>197</sub> (también se muestra en la Tabla 2).

65

Tabla 2

Grado de modificación: Comparación de datos de MALDI-TOF y AAA			
Muestra	Da (de la espectrometría de masas)	Grado de conjugación (de la espectrometría de masas)	Grado de conjugación (del análisis CMC-aminoácidos)
CRM <sub>197</sub>	58.408	----	----
BrAc-CRM	60.752	19	----
Aβ1-7/CRM	74.463	14	15
Aβ1-7/CRM	72.375	12	14
Aβ1-5/CRM	75.425	20	21
Aβ1-5/CRM	71.690	15	18

## EJEMPLO 6

Estudios de inmunogenicidad de los conjugados de péptido Aβ

Se utilizaron péptidos que abarcan los restos N-terminales 1-5, 1-7, 1-9 y 1-12 de Aβ (con y sin la secuencia conectora GAGAC) y un péptido que corresponde al extremo N-terminal de Aβ en secuencia inversa desde el aminoácido doce hasta el aminoácido uno (1-12mero en secuencia inversa), cada uno conjugado con CRM<sub>197</sub>, para inmunizar ratones junto con un péptido Aβ 112-mero no conjugado en una formulación con STIMULON™ QS-21. Se inmunizó a cada grupo de ratones por vía subcutánea con una dosis de 30 µg ó 5 µg de una de las muestras formulada con 20 µg del adyuvante STIMULON™ QS-21, al comienzo del estudio (semana 0) y, posteriormente, las semanas 3 y 6. El protocolo del estudio se ilustra en la Tabla 3.

Como se muestra en la Tabla 3, se utilizaron péptidos que abarcan los restos N-terminales 1-5, 1-7, 1-9 y 1-12 de Aβ (con y sin la secuencia conectora GAGAC) y un péptido correspondiente a la secuencia N-terminal de Aβ en secuencia inversa desde el aminoácido doce hasta el aminoácido uno (1-12 mero a la inversa) conjugado con CRM<sub>197</sub> para inmunizar ratones junto con un péptido Aβ 1-12 mero no conjugado en una formulación con QS-21. Se vacunó a cada grupo de ratones por vía subcutánea con una dosis de 30 µg ó 5 µg de una de las muestras formulada con 20 µg del adyuvante QS-21, al comienzo del estudio (semana 0) y, posteriormente, las semanas 3 y 6. Se utilizaron ratones Swiss Webster para todo el estudio, habiendo 5 ratones en cada grupo. Volumen de inyección = 100 µl; B = extraer sangre; V = vacunar; E = exanguinar.

Se midieron los títulos de anti-Aβ mediante ELISA contra Aβ<sub>1-42</sub> y CRM<sub>197</sub> como se describe más adelante. En resumen, se recubrieron placas de 96 pocillos Costar (#3591) durante la noche a temperatura ambiente con 2 µg/ml de Aβ1-42 en tampón carbonato/bicarbonato estéril, pH 9,6. Las placas se vaciaron y se bloquearon durante dos horas a temperatura ambiente con 200 µl/pocillo de BSA al 0,05% en 1X PBS/Tween 20 al 0,05%. Las placas bloqueadas se vaciaron y se lavaron con un lavaplaques que contenía tampón de lavado TBS, Brij-35 al 0,1% (sin azida). Se sometieron a dilución en serie todos los antisueros primarios con BSA al 0,05% en 1X PBS que contenía Tween 20 al 0,05%/azida al 0,02% y, a continuación, se transfirieron 100 µl de cada dilución a los pocillos de placa apropiados y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. A continuación, las placas se vaciaron/lavaron como se ha descrito anteriormente. Se diluyó 1:1.000 anticuerpo secundario IgG de cabra anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina de Southern Biotech (Birmingham, AL), con BSA al 0,05% en PBS que contenía Tween 20 al 0,05%/azida al 0,02% y se añadieron 100 µl a cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, las placas se vaciaron/lavaron como se ha descrito anteriormente y finalmente se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora con 100 µl/pocillo de una solución de 1 mg/ml de sustrato de p-nitrofenil fosfato preparado en dietanolamina/MgCl<sub>2</sub>, pH 9,8. Se detuvo el desarrollo de color con la adición de 50 µl/pocillo de NaOH 3 N. Las placas se leyeron a 405 nm con una referencia de 690 nM. Los títulos del punto final se calcularon a una D.O. de 0,1 UA.



Tabla 3

Protocolo del estudio de inmunización de ratones								
Código de grupo	Descripción	Dosis (µg)	Sem. 0	Sem. 3	Sem. 6	Sem. 8	Sem. 13	Sem. 16
AE488	CRM/1-7 sin conector	30	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE489	CRM/1-12 con conector	30	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE490	CRM/1-9 con conector	30	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE491	CRM/1-7 con conector	30	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE492	CRM/1-5 sin conector	30	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE493	CRM/1-9 sin conector	30	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE494	CRM/1-12 sin conector	30	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE495	CRM/1-5 con conector	30	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE496	CRM/1-7 sin conector	5	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE497	CRM/1-12 con conector	5	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE498	CRM/1-9 con conector	5	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE499	CRM/1-7 con conector	5	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE500	CRM/1-5 sin conector	5	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE501	CRM/1-9 sin conector	5	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE502	CRM/1-12 sin conector	5	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE503	CRM/1-5 con conector	5	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE504	CRM <sub>197</sub> C1-6151	30	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE505	CRM <sub>197</sub> C1-6151	5	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE506	CRM/12-1mero	30	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE507	CRM/12-1mero	5	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE508	péptido 1-12mero	30	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE509	péptido 1-12mero	5	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE510	Ac	30	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE511	Ac	5	B, V	B, V	B, V	B	B	E

#### ELISA de CRM<sub>197</sub>

Se recubrieron placas de 96 pocillos Greiner (# 650011) a 37°C durante 90 minutos con 5,0 µg/ml (100 µl/pocillo) de CRM<sub>197</sub> en tampón carbonato/bicarbonato estéril, pH 9,6. Las placas se vaciaron y se lavaron con un lavaplacas que contenía 1X de tampón de lavado TBS, Brij-35 al 0,1%. Se sometieron a dilución en serie todos los antisueros primarios con 1X PBS que contenía Tween 20 al 0,3%/EDTA y, a continuación, se transfirieron 100 µl de cada dilución a los pocillos de placa apropiados y se incubaron a 37°C durante 1 hora. A continuación, las placas se vaciaron/lavaron como se ha descrito anteriormente. Se diluyó 1:1.000 anticuerpo secundario IgG de cabra anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina de Southern Biotech con 1X PBS que contenía Tween 20 al 0,05%/azida al 0,02% y se añadieron 100 µl a cada pocillo y se incubaron a 37°C durante 1 hora. A continuación, las placas se vaciaron/lavaron como se ha descrito anteriormente y finalmente se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora con 100 µl/pocillo de una solución de 1 mg/ml de sustrato de p-nitrofenil fosfato preparado en dietanolamina/MgCl<sub>2</sub>, pH 9,8. El desarrollo se detuvo con la adición de 50 µl/pocillo de NaOH 3 N. Las placas se leyeron a 405 nm con una referencia de 690 nm. Los títulos del punto final se calcularon a una D.O. de 0,1 UA.

Las Tablas 4-6 ilustran títulos del ELISA del punto final contra Aβ. Después de la inmunización primaria, los ocho conjugados (excluyendo el control negativo) indujeron respuestas inmunitarias de IgG anti-Aβ medibles. Sin embargo, la dosis de 30 µg, pero no la dosis de 5 µg, de Aβ dio una respuesta positiva la semana 3 después de la inmunización primaria. Entre todos los conjugados, parece que el conjugado de péptido Aβ 1-7 sin conector indujo una respuesta tan buena o mejor que otros conjugados estudiados. A una dosis de 5 µg, Aβ1-5C funcionó mejor las semanas 8-16. Aβ 1-7C fue el mejor a dosis de 30 µg. El análisis de los títulos de anticuerpos después de la segunda y tercera inmunización con una dosis de 5 µg ó 30 µg indica que la respuesta inmunitaria máxima contra Aβ para la mayoría de los conjugados se observaba después de la segunda inmunización. Al menos en ratones, la tercera inmunización no pareció potenciar la respuesta inmunitaria. Sin embargo, el péptido Aβ necesitó tres inmunizaciones con la dosis de 30 µg para alcanzar la respuesta inmunitaria máxima contra el péptido (Tabla 5). En términos de disminución de los anticuerpos durante un periodo prolongado de tiempo, el nivel de anticuerpos de los grupos inmunizados con los conjugados se redujo entre 2 y 3 veces en comparación con el nivel más alto dentro de ese grupo. Se analizaron muestras individuales de las semanas 6 y 8 para calcular las GMT contra Aβ para cada uno de los grupo (Tabla 6) para ver si algún grupo de conjugado era sustancialmente mejor que los demás. El análisis estadístico de los títulos de la semana 6 de los conjugados de Aβ1-5C, Aβ 1-7C y Aβ 1-9C indicó que el conjugado de Aβ 1-7 inducía un título significativamente mayor. También resulta evidente a partir de este experimento que la secuencia conectora GAGAC no contribuía a potenciar la respuesta inmunitaria contra el péptido.

**Tabla 4**

Grupo		Semana 3	Semana 6	Semana 8	Semana 13	Semana 16
1-5C	<100	14.960	687.691	882.012	625.208	771.828
1-7C	<100	51.253	1.280.181	860.463	520.060	571.043
1-9C	<100	18.615	1.008.872	622.325	348.967	380.755
1-12C	<100	615	132.009	390.624	166.162	184.170
1-5LC	<100	4.999	458.075	454.631	237.573	220.091
1-7LC	<100	17.693	849.170	842.402	446.089	400.536
1-9LC	<100	18.544	1.465.115	1.180.347	571.127	579.477
1-12LC	<100	12.664	908.360	598.867	368.101	316.075
CRM <sub>197</sub>	<100	<100	<100	<100	<100	<100
1-42	<100	<100	<100	<100	<100	<100
1-12	<100	<100	<100	<100	<100	<100
12-1C	<100	<100	<100	<100	<100	<100

**Tabla 4.** Títulos del punto final del ELISA las semanas 0, 3, 6, 8, 13 y 16 contra Aβ utilizando antisuero de la dosis de 5 µg de conjugados peptídicos que abarcan diferentes longitudes del extremo N-terminal del péptido amiloide Aβ. Ref: policlonal hiperinmunizador de Elan #592 = 3.073.307. Punto final a D.O. 0,1 UA. Se inmunizó a ratones Swiss Webster SC-N con 5 µg de los antígenos anteriormente indicados formulados con 20 µg de STIMULON™ QS-21 las semanas 0, 3 y 6.

**Tabla 5**

Grupo	Semana 0	Semana 3	Semana 6	Semana 8	Semana 13	Semana 16
1-5C	<100	18.150	590.355	332.832	204.645	176.159
1-7C	<100	100.672	1.840.741	647.470	592.638	779.072
1-9C	<100	18.520	1.184.696	713.494	363.459	327.065
1-12C	<100	7.837	1.325.725	1.126.389	681.268	577.604
1-5LC	<100	16.347	469.191	184.077	177.358	164.680
1-7LC	<100	47.866	971.229	462.200	463.466	529.726
1-9LC	<100	59.002	921.544	787.273	405.023	500.468
1-12LC	<100	27.348	697.150	483.320	284.800	397.816
CRM <sub>197</sub>	<100	<100	<100	<100	<100	<100
1-42	<100	160	3.327	109.718	48.646	27.901
1-12	<100	<100	<100	<100	<100	<100
12-1C	<100	<100	<100	<100	<100	<100

**Tabla 5.** Títulos del punto final del ELISA las semanas 0, 3, 6, 8, 13 y 16 contra Aβ utilizando antisuero de la dosis de 30 µg de conjugados peptídicos que abarcan diferentes longitudes del extremo N-terminal del péptido amiloide Aβ. Ref: policlonal hiperinmunizador de Elan #592 = 3.073.307. Punto final a D.O. 0,1 UA. Se inmunizó a ratones Swiss Webster SC-N con 30 µg de los antígenos anteriormente indicados formulados con 20 µg de STIMULON™ QS-21 las semanas 0, 3 y 6.

**Tabla 6**

Grupo	Semana 6	Semana 8
1-5C	237.668 <sup>a</sup>	161.671 <sup>b</sup>
1-7C	1.866.702 <sup>a</sup>	881.146 <sup>b</sup>
1-9C	963.323 <sup>a</sup>	595.414 <sup>b</sup>
1-12C	940.260	955.470
1-5LC	395.553	141.084
1-7LC	516.921	394.521
1-9LC	826.773	562.458
1-12LC	544.768	376.952
1-42	365	4.565

**Tabla 6.** GMT del punto final del ELISA las semanas 6 y 8 contra Aβ utilizando antisueros de la dosis de 30 µg de los conjugados peptídicos que abarcan diferentes longitudes del extremo N-terminal del amiloide Aβ. Ref: policlonal hiperinmunizador de Elan #592 = 3.073.307. Punto final a D.O. 0,1 UA. Se inmunizó a ratones Swiss Webster SC-N con 30 µg de los antígenos anteriormente indicados formulados con 20 µg de STIMULON™ QS-21 las semanas 0, 3 y 6

a. El análisis estadístico de los títulos de la semana 6 de 1-5C, 1-7C y 1-9C utilizando Tukey-Kramer mostró una diferencia estadística entre 1-5C frente a 1-7C solamente, mientras que, el análisis mediante la t de Student muestra una diferencia estadística entre 1-5C frente a 1-7C y 1-5C frente a 1-9C.

b. El análisis estadístico de los títulos de la semana 8 de 1-5C, 1-7C y 1-9C no muestra una diferencia estadística entre los tres grupos. Sin embargo, parece que hay una tendencia que puede indicar una diferencia entre 1-5C frente a 1-7C.

#### Tinción de tejido cerebral de ratones PDAPP

El ensayo de tinción de tejido cerebral de PDAPP proporciona una indicación de la funcionalidad de los conjugados de péptido A $\beta$  y/o antisuero A $\beta$  1-42. Se analizaron por separado muestras de suero de grupos individuales de ratones para su capacidad de reconocer las placas en el tejido cerebral de ratones PDAPP que contenían péptido amiloide. Los resultados se muestran en la Tabla 7A y 7B. A excepción de los antisueros de conjugado de A $\beta$  5-mero, hubo una respuesta relacionada con la dosis en el reconocimiento de las placas. Con independencia del conector, los antisueros inducidos por 30  $\mu$ g de conjugado tenían mejores patrones de reactividad en comparación con los de los antisueros de 5  $\mu$ g de conjugado. Sin embargo, con el antisuero de conjugado de A $\beta$  5-mero, parece haber una reactividad similar o mejor para el grupo de 5  $\mu$ g. Al comparar todos estos resultados, se concluye que los conjugados hechos de A $\beta$  1-5 mero a A $\beta$  1-9 mero son suficientes para inducir una respuesta inmunitaria en ratones que reconoce las placas y que la presencia de conector no es esencial. Pueden sacarse las siguientes conclusiones de este estudio: (a) Todos los conjugados peptídicos inducían un antisuero de alta titulación contra la proteína transportadora CRM<sub>197</sub> a niveles iguales o ligeramente superiores en comparación con el control CRM<sub>197</sub> no conjugado (no mostrado). (b) Los conjugados con el conector GAGAC no potenciaban la inmunogenicidad o la funcionalidad en comparación con los conjugados sin el conector: (c) Los datos de inmunogenicidad y la tinción de tejido cerebral de PDAPP (una indicación inicial de anticuerpo funcional) muestran que los conjugados de A $\beta$  1-5-mero y A $\beta$  1-7-mero parecían ser los inmunógenos preferentes para un desarrollo posterior.

**Tabla 7A. Tinción de tejido cerebral de ratones PDAPP**

Dosis de 5 $\mu$ g					
Sin conector			Con conector		
Vacuna	Nº de animal	Tinción PDAPP	Vacuna	Nº de animal	Tinción PDAPP
CRM/ A $\beta$ 1-5	1	+(no difuso)	CRM/ A $\beta$ 1-5	1	-
	2	++/+++		2	-
	3	++/+++		3	$\pm$
	4	++		4	$\pm$
	5	++		5	$\pm$
CRM/ A $\beta$ 1-7	1	++	CRM/ A $\beta$ 1-7	1	+
	2	++		2	++
	3	++		3	++
	4	++		4	+
	5	++		5	++
CRM/A $\beta$ 1-9	1	+	CRM/ A $\beta$ 1-9	1	++
	2	+/++		2	++
	3	$\pm$		3	+
	4	$\pm$		4	+
	5	$\pm$		5	+
CRM/ A $\beta$ 1-12	1	-	CRM/ A $\beta$ 1-12	1	+
	2	?		2	+
	3	$\pm$		3	++
	4	-		4	-
	5	$\pm$		5	$\pm$
CRM/ A $\beta$ 12-1mero	1	-	A $\beta$ 42	1	-
	2	-		2	-
	3	$\pm$		3	-
	4	-		4	-
	5	-		5	-

Todo el antisuero se diluyó 1:1.000 para el procedimiento de tinción.

Tabla 7B. Tinción de tejido cerebral de ratones PDAPP

Dosis de 30 µg					
Sin conector			Con conector		
Vacuna	Nº de animal	Tinción PDAPP	Vacuna	Nº de animal	Tinción PDAPP
CRM/ Aβ 1-5	1	-	CRM/ Aβ 1-5	1	+
	2	+ / ++		2	-
	3	-		3	-
	4	±		4	±
	5	++		5	-
CRM/ Aβ1-7	1	+ / ++	CRM/ Aβ 1-7	1	+
	2	++		2	± / +
	3	++		3	+ / ++
	4	++		4	± / +
	5	++ / +++		5	+ / ++
CRM/ Aβ 1-9	1	++ / +++	CRM/ Aβ 1-9	1	+ / ++
	2	++		2	++
	3	++		3	++
	4	+		4	±
	5	+		5	+ / ++
CRM/ Aβ 1-12	1		CRM/ Aβ 1-12	1	+ / ++
	2	+ / ++		2	+
	3	+ / ++		3	-
	4	±		4	+ / ++
	5	±		5	+
CRM/ Aβ 12-1mero	1	-	Aβ42	1	±
	2	-		2	-
	3	-		3	-
	4	-		4	-
	5	-		5	-

Todo el antisero se diluyó 1:1.000 para el procedimiento de tinción.

### 35 EJEMPLO 7

#### Estudios de inmunogenicidad en monos

40 Grupos de 6 monos recibieron 30 µg de conjugado 7-mero (conjugado total) adyuvado con STIMULON™, QS-21, alumbre o formulación RC529 SE los días 0, 29 y 58. Los grupos adicionales incluidos fueron 30 µg de conjugado 5-mero con alumbre (Al(OH)<sub>3</sub>) o RC529 SE, 75 µg y 300 µg de Aβ con STIMULON™ QS-21 como controles positivos. Se inmunizó a los controles positivos cada dos semanas. El día 36 y 64 se determinaron los títulos de anticuerpos anti-Aβ (Figuras 7-9). El día 36, los conjugados de 7-mero/CRM con STIMULON™ QS-21, alumbre y RC529 SE indujeron títulos GMT de 10.110, 13.330 y 17.090, respectivamente (Figura 7). Por el contrario, Aβ 1-42 más STIMULON™ QS-21 indujo una GMT de 223 y 1734 a niveles de dosis de 75 µg y 300 µg, respectivamente. El conjugado de Aβ 5-mero indujo un título de 2.134 con alumbre y de 15.980 con RC529 SE. El día 64, es decir, después de 3 dosis de conjugados con STIMULON™ QS21 o con RC-529 SE indujo títulos sustancialmente más altos que después de la segunda dosis (GMT 69.910 para 7-mero/RC-529 SE; 21.640 para Aβ 5-mero/RC-529 SE y 30.310 para Aβ 7-mero/STIMULON™ QS-21) (Figura 8). Los conjugados con alumbre indujeron títulos reducidos después de la tercera inmunización en comparación con después de la segunda inmunización. Parece ser que el conjugado de Aβ 7-mero inducía una mejor respuesta en comparación con el conjugado de Aβ 5-mero. En los monos; adyugar el conjugado de Aβ 7-mero con RC-529 SE o STIMULON™ QS-21 inducía la mayor respuesta (Figura 9). La respuesta contra el conjugado de Aβ 7-mero conjugado con alumbre fue moderada y similar a la de 300 µg de Aβ 1-42 con STIMULON™ QS-21.

55 Pueden sacarse varias conclusiones del ejemplo actual. En primer lugar, ambos conjugados son muy inmunogénicos en las especies de primates. En segundo lugar, la presencia de adyuvantes en la formulación de inmunización influye significativamente en la respuesta inmunitaria. En tercer lugar, a excepción del adyuvante de aluminio, RC-529 SE y STIMULON™ QS-21 potencian la respuesta inmunitaria después de cada dosis de inmunización al menos hasta tres dosis (Figuras 9). En general, el conjugado de Aβ 7-mero indujo mayor respuesta de anticuerpos en presencia de 529, seguido de STIMULON™ QS-21 (véase la Figura 9).

### 60 EJEMPLO 8

#### Preparación de conjugados de péptidos antigénicos múltiples (MAP) y su estudio de inmunogenicidad

Se dispone de varios métodos para generar sitios antigénicos múltiples en los transportadores. En los ejemplos anteriores, cada sitio antigénico se conjuga por separado con el transportador mediante las químicas de conjugación definida y de protección. En este ejemplo, se construyen sitios antigénicos múltiples mediante síntesis en fase sólida de repeticiones en tándem de Aβ1-7 mero. Como alternativa, estas repeticiones en tándem pueden acoplarse con epítomos de linfocitos T con o sin enlace mediante un núcleo de lisina como se describe en otro lugar. Estos péptidos antigénicos múltiples se sintetizaron con un resto cisteinilo adicional para la conjugación con la proteína transportadora. Se sintetizaron péptidos que contenían una unidad de repetición (1-7), tres unidades de repetición (1-7)<sub>3</sub> y cinco unidades de repetición (1-7)<sub>5</sub> con un resto cisteinilo adicional en el carboxilo terminal. Estos péptidos se fijaron covalentemente a CRM bromoacetilado durante la noche mediante sus restos cisteína C-terminales. La reacción se llevó a cabo a pH 9,0-9,2 con unas relaciones péptido:CRM sumadas como se resume en la Tabla 8. Los grupos bromoacetilo, que no reaccionaron con el péptido, se protegieron con N-acetilcisteamina. Estos lotes representan los conjugados que contienen una sola copia, tres copias en tándem, y cinco copias en tándem del péptido Aβ1-7 conjugado con CRM, respectivamente. Tabla 8 resume brevemente las propiedades de las muestras.

Tabla 8

Muestras de conjugado de péptidos antigénicos múltiples (MAP)		
Conjugado	Péptido:CRM (p/p)	pH de la reacción
Ab(1-7) <sub>1</sub> /CRM	0,37	8,99
Ab(1-7) <sub>3</sub> /CRM	1,02	8,95
Ab(1-7) <sub>5</sub> /CRM	1,67	9,17

La carga de péptido (el número medio de péptidos Aβ 1-7 por transportador) y los números de protección (Tabla 9) son los números de aminoácidos únicos (CMC o CMCA) por transportador según se determina mediante análisis de aminoácidos. Los valores de CMC y CMCA se referenciaron a la lisina.

Tabla 9

Grado de conjugación y protección de cada conjugado		
CONJUGADO	Carga de péptido (CMC)	Protección (CMCA)
Ab(1-7) <sub>1</sub> /CRM	12,5	11,7
Ab(1-7) <sub>3</sub> /CRM	10,4	15,2
Ab(1-7) <sub>5</sub> /CRM	9,8	15,9

Se inmunizó a ratones Swiss-Webster (10 por grupo) por vía subcutánea con 1 µg ó 0,1 µg de péptido conjugado Aβ/CRM. Se inmunizó a la mitad de los ratones con la composición formulada con 100 µg del adyuvante Al(OH)<sub>3</sub>, y se inmunizó a la mitad sin adyuvante. Las inmunizaciones se programaron las semanas 0 y 3. Las extracciones de sangre se programaron para las semanas 0, 3 y 6. Las muestras de suero se analizaron para la respuesta de anticuerpos contra el péptido Aβ1-42 mero. Los resultados se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10

Títulos del punto final de anti-Aβ para los conjugado de péptidos antigénicos múltiples (MAP)					
Código de grupo	Descripción de la muestra	Adyuvante	Combinación sem. 0	GMT sem. 3	GMT sem. 6
AG332	1 µg Aβ (1-7) <sub>1</sub> /CRM	Al(OH) <sub>3</sub>	<100	18.096	100.279
AG333	1 µg Aβ (1-7) <sub>3</sub> /CRM	Al(OH) <sub>3</sub>	<100	44.911	420.235
AG334	1 µg Aβ (1-7) <sub>5</sub> /CRM	Al(OH) <sub>3</sub>	<100	27.032	394.488
AG335	0,1 µg Aβ (1-7) <sub>1</sub> /CRM	Al(OH) <sub>3</sub>	<100	19.350	66.834
AG336	0,1 µg Aβ (1-7) <sub>3</sub> /CRM	Al(OH) <sub>3</sub>	<100	13.307	208.272
AG337	0,1 µg Aβ (1-7) <sub>5</sub> /CRM	Al(OH) <sub>3</sub>	<100	1.196	22.665
AG338	1 µg Aβ (1-7) <sub>1</sub> /CRM	Ninguno	<100	5.273	370.980
AG339	1 µg Aβ (1-7) <sub>3</sub> /CRM	Ninguno	<100	9.299	541.093
AG340	1 µg Aβ (1-7) <sub>5</sub> /CRM	Ninguno	<100	3.100	185.272
AG341	0,1 µg Aβ (1-7) <sub>1</sub> /CRM	Ninguno	<100	340	25.839
AG342	0,1 µg Aβ (1-7) <sub>3</sub> /CRM	Ninguno	<100	128	5.553
AG343	0,1 µg Aβ (1-7) <sub>5</sub> /CRM	Ninguno	<100	668	2.098

Todos los conjugados indujeron un título de anticuerpos anti-Aβ 1-42 después de la inmunización primaria y los niveles aumentaron sustancialmente después de la dosis de refuerzo. En ausencia de adyuvante de aluminio, las diferencias en la respuesta a la dosis fueron evidentes en las extracciones de sangre la semana 3 y la semana 6. La

dosis más alta indujo una respuesta de anticuerpos de alta titulación. El adyuvante de aluminio indujo una respuesta de anticuerpos sustancialmente mayor la semana 3 a ambos niveles de dosis (0,1 µg y 1 µg) en comparación con los grupos sin adyuvante. Después de la inmunización secundaria, los conjugados proporcionados a una dosis de 1 µg indujeron un aumento de 5 a 10 veces de los niveles de anticuerpos. A este nivel de dosis, los conjugados peptídicos con 3 y 5 repeticiones indujeron mayor respuesta de anticuerpos que un conjugado que contenía una sola repetición. También se determinaron los títulos contra el transportador CRM, y éstos se enumeran en la Tabla 11.

Tabla 11

Títulos del punto final anti- CRM para los conjugado de péptidos antigénicos múltiples (MAP)					
Código de grupo	Descripción de la muestra	Adyuvante	Combinación sem. 0	GMT sem. 3	GMT sem. 6
AG332	1 µg de Aβ (1-7) <sub>1</sub> /CRM	Al(OH) <sub>3</sub>	<50	10.531	114.602
AG333	1 µg de Aβ (1-7) <sub>3</sub> /CRM	Al(OH) <sub>3</sub>	<50	4.274	83.065
AG334	1 µg de Aβ (1-7) <sub>5</sub> /CRM	Al(OH) <sub>3</sub>	<50	1.680	49.320
AG335	0,1 µg de Aβ (1-7) <sub>1</sub> /CRM	Al(OH) <sub>3</sub>	<50	1.114	13.231
AG336	0,1 µg de Aβ (1-7) <sub>3</sub> /CRM	Al(OH) <sub>3</sub>	<50	197	1.484
AG337	0,1 µg de Aβ (1-7) <sub>5</sub> /CRM	Al(OH) <sub>3</sub>	<50	65	222
AG338	1 µg de Aβ (1-7) <sub>1</sub> /CRM	Ninguno	<50	35	309
AG339	1 µg de Aβ (1-7) <sub>3</sub> /CRM	Ninguno	<50	29	1.085
AG340	1 µg de Aβ (1-7) <sub>5</sub> /CRM	Ninguno	<50	29	542
AG341	0,1 µg de Aβ (1-7) <sub>1</sub> /CRM	Ninguno	<50	25	55
AG342	0,1 µg de Aβ (1-7) <sub>3</sub> /CRM	Ninguno	<50	25	34
AG343	0,1 µg de Aβ (1-7) <sub>5</sub> /CRM	Ninguno	<50	29	ND

Se inmunizó a los animales las semanas 0 y 3, y se les extrajo sangre las semanas 0, 3 y 6.  
Adyuvante: 100 µg de Al(OH)<sub>3</sub> o ninguno. ND = No determinado.

Los datos de la Tabla 11 indican que los grupos sin adyuvante inducían niveles muy bajos de respuesta de anticuerpos anti-CRM a niveles de dosis tanto de 1 µg como de 0,1 µg incluso después de dos inmunizaciones. Sin embargo, los conjugados con adyuvante hidróxido de aluminio indujeron niveles sustanciales de respuesta de anticuerpos anti-CRM a dosis de 1 µg y una respuesta muy inferior a dosis de 0,1 µg. En presencia del adyuvante, los títulos de CRM fueron los más altos para el conjugado con una sola repetición, intermedios para el conjugado con repetición triple, y los más bajos para el conjugado con repetición quintuple. Esto es como se esperaba, ya que la dosis de CRM por dosis de péptido es la más baja para Aβ(1-7)<sub>5</sub>/CRM, y la más alta para Aβ(1-7)<sub>1</sub>/CRM. Las diferencias sólo fueron estadísticamente significativas la semana 6 para la dosis de 0,1 µg.

El objetivo de la presente invención es inducir una respuesta inmunogénica de alta titulación contra el hapteno antigénico y no necesariamente contra la proteína transportadora. En determinadas circunstancias es deseable inducir una respuesta inmunitaria óptima contra el determinante antigénico hapteno con la menor o ninguna respuesta inmunitaria contra la proteína transportadora. Para tales aplicaciones, los conjugados con repeticiones en tándem de determinantes antigénicos múltiples con la formulación sin adyuvante satisfarán la necesidad.

#### EJEMPLO 9

##### Preparación de conjugados de péptido Aβ con diversas proteínas transportadoras y su inmunogenicidad

En este ejemplo se compara la inmunogenicidad de los conjugados utilizando seis proteínas transportadoras diferentes. Se añadió la sal de acetato de Aβ1-7 a los transportadores bromoacetilados en una relación 1:1 en peso a pH 9. Todos los conjugados excepto Aβ1-7/rC5ap se protegieron con N-acetilcisteína. Todos los transportadores alternativos son proteínas bacterianas recombinantes, incluidas CRM (toxóide diftérico), peptidasa C5a recombinante (rC5ap; clonada a partir de *Streptococcus agalactiae*, incluye las mutaciones D130A y S512A), los ORF 1224, 1664, 2452 (todos clonados a partir de *Streptococcus pyogenes*), y T367, T858 (cada uno clonado a partir de *Chlamydia pneumoniae*). En la Tabla 12 se encuentra un resumen de los transportadores utilizados. El grado de conjugación y protección de cada conjugado de Aβ 1-7 con estos transportadores se presentan en la Tabla 13.

Este estudio mostró que el conjugado de peptidasa C5a recombinante inducía títulos más altos contra Aβ que la mayoría de los demás transportadores analizados, incluido CRM. Esta diferencia fue estadísticamente significativa para los títulos de la semana 6 de los grupos que recibieron hidróxido de aluminio. Además, el conjugado Aβ1-7/T858 fue significativamente más inmunogénico que la mayoría de los demás conjugados en ausencia de adyuvante. El único conjugado que obtuvo malos resultados en comparación con el conjugado de control CRM fue Aβ1-7/T367, un conjugado que tampoco reaccionó con un anticuerpo monoclonal específico de Aβ mediante transferencia de western. Este estudio confirma que pueden utilizarse con éxito otros muchos transportadores para la inmunización contra el péptido Aβ.

Tabla 12

Lista de transportadores y propiedades del conjugado		
PROTEÍNA TRANSPORTADORA	PM del transportador (Da)	Nº de lisinas
CRM	58.408	39
rC5ap	108.560	85
ORF1224	30.950	18
ORF1664	31.270	38
ORF2452	31.790	29
T367	49.700	29
T858	37.190	23

Tabla 13

Grado de conjugación y protección de cada conjugado		
CONJUGADO	Carga de péptido (CMC)	Protección (CMCA)
Aβ1-7/rC5ap	25,9	-
Aβ1-7/ORF1224	12,8	5,7
Aβ1-7/ORF1664	13,4	10,8
Aβ1-7/ORF2452	12,03	10,5
Aβ1-7/T367	13,2	8,2
Aβ1-7/T858	5,2	1,7

Resultados de la conjugación: La carga de péptido (el número medio de péptidos Aβ1-7 por transportador) y el número de protección son los números de aminoácidos únicos (CMC o CMCA) por transportador según se determina mediante análisis de aminoácidos. Los valores de CMC y CMCA se referenciaron a la lisina.

#### Resultados de la inmunización

En la Tabla 14 se enumera la media geométrica de los títulos para cada grupo en este estudio. La semana 3, independientemente de la presencia de adyuvante, Aβ1-7/rC5ap indujo títulos anti-Aβ significativamente más altos que los correspondientes conjugados preparados con los ORF 1224, 1664, 2452 de *Streptococcus pyogenes*, o los ORF T367 y T858 de *Chlamydia pneumoniae*. La semana 3, en ausencia de adyuvante, Aβ1-7/rC5ap también fue más inmunogénico que todos los demás conjugados excepto Aβ1-7/T858. El conjugado T858 sin Al(OH)<sub>3</sub> indujo títulos más altos que los conjugados ORF1224, ORF1664, ORF2452 y CRM sin adyuvante. El único conjugado que fue significativamente menos inmunogénico que Aβ1-7/CRM fue Aβ1-7/T367 ( $p < 0,00002$ ). El transportador T367 obtuvo malos resultados con o sin adyuvante en ambas semanas 3 y 6. La semana 6, el conjugado rC5ap con hidróxido de aluminio fue más inmunogénico ( $p < 0,04$ ) que todos los demás conjugados excepto Aβ 1-7/ORF2452. En ausencia de adyuvante, tanto Aβ1-7/rC5ap como Aβ1-7/T858 indujeron títulos significativamente más altos que los conjugados ORF1224, ORF1664 o T367. Aβ1-7/CRM sin hidróxido de aluminio indujo títulos más altos que Aβ1-7/ORF1664 o Aβ1-7/T367.

Tabla 14

Títulos del punto final de anti-Aβ1-42					
CÓDIGO DE GRUPO	DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA	ADYUVANTE	COMBINACIÓN SEM. 0	GMT SEM. 3	GMT SEM. 6
AG344	5 µg de Aβ1-7/CRM	Al(OH) <sub>3</sub>	<100	21.404	54.157
AG345	5 µg de Aβ1-7/rC5ap	Al(OH) <sub>3</sub>	<100	61.967	402.972
AG346	5 µg de Aβ1-7/ORF1224	Al(OH) <sub>3</sub>	<100	10.711	30.084
AG347	5 µg de Aβ1-7/ORF1664	Al(OH) <sub>3</sub>	<100	7.188	43.226
AG348	5 µg de Aβ1-7/ORF2452	Al(OH) <sub>3</sub>	<100	11.437	109.091
AG349	5 µg de Aβ1-7/T367	Al(OH) <sub>3</sub>	<100	321	5.139
AG350	5 µg de Aβ1-7/T858	Al(OH) <sub>3</sub>	<100	16.656	33.328
AG351	5 µg de Aβ1-7/CRM	Ninguno	<100	2.615	119.488
AG352	5 µg de Aβ1-7/rC5ap	Ninguno	<100	11.858	279.113
AG353	5 µg de Aβ1-7/ORF1224	Ninguno	<100	1.674	18.719
AG354	5 µg de Aβ1-7/ORF1664	Ninguno	<100	119	9.832
AG355	5 µg de Aβ1-7/ORF2452	Ninguno	<100	2.493	76.038
AG356	5 µg de Aβ1-7/T367	Ninguno	<100	50	620
AG357	5 µg de Aβ1-7/T858	Ninguno	<100	28.820	275.202

Se inmunizó a los animales las semanas 0 y 3, y se les extrajo sangre las semanas 0, 3 y 6.

La dosis se basa en la cantidad total de conjugado. Adyuvante: 100 µg de Al(OH)<sub>3</sub> o ninguno.

EJEMPLO 10Preparación de conjugados péptido Aβ-proteína adicionales5 I. Activación

Se disolvió CRM<sub>197</sub> descongelado (8 ml, 59,84 mg, a 7,48 mg/ml) en tampón borato 0,1 M (pH 9, 3,968 ml) para llevar la concentración a 5 mg/ml. La solución se enfrió en un baño de hielo a 0°C-5°C. Se disolvió en DMF (100 µl) (Aldrich-Sigma) N-hidroxisuccinimida del ácido bromoacético (59,9 mg) (Aldrich-Sigma) y se añadió, gota a gota, a la solución de CRM<sub>197</sub>. Tras la adición de la N-hidroxisuccinimida del ácido bromoacético, se observó un precipitado. Cuando se comprobó el pH, se redujo a pH 6. El pH de la mezcla de reacción se llevó de nuevo a pH 9 añadiendo más tampón borato 0,1 M. A continuación, se agitó la mezcla de reacción a 4°C durante 1 hora, removiendo suavemente. La mezcla se purificó y se concentró utilizando concentración para centrifuga Centriprep YM-10 y se volvió a purificar en una columna Sephadex G-25 utilizando como eluyente borato 10 mM. Las fracciones positivas para reactivo de Bradford se combinaron y se concentraron utilizando Centriprep YM-10. El grado de bromoacetilación se determinó mediante el ensayo de Bradford (lineal). La concentración resultó ser de 5,36 mg/ml (produjo 30 mg). Se ajustó la concentración final para que fuera 5 mg/ml y se almacenó en el congelador en sacarosa al 5% hasta su uso posterior.

20 II. Conjugación

Para cada conjugación, se utilizó CRM<sub>197</sub> bromoacetilado descongelado. Los péptidos se disolvieron en tampón borato (2,5 mg en 125 ml de tampón borato 0,1 M). Se observó una ligera insolubilidad con los péptidos Aβ KLVFFAEDC (SEQ ID NO: 45), CLVFFAEDV (SEQ ID NO: 47), CKLVFFAED (SEQ ID NO: 48) y LVFFAEDC (SEQ ID NO: 50). Se trató CRM<sub>197</sub> bromoacetilado (5 mg/ml) con las soluciones/suspensiones de péptidos. La relación entre péptido y proteína en la mezcla fue de 1:2. Se observó turbidez en las mezclas de conjugado con los péptidos KLVFFAEDC (SEQ ID NO: 45), CLVFFAEDV (SEQ ID NO: 47), CKLVFFAED (SEQ ID NO: 48) y KLVFFAEDC (SEQ ID NO: 45). A continuación, se comprobaron las mezclas para el pH (pH 9) y se incubaron a 4°C durante la noche removiendo lentamente. Se hicieron concentraciones finales de las mezclas a 3 mg/ml antes de la incubación. La turbidez de las mezclas de conjugado con los péptidos CLVFFAEDV (SEQ ID NO: 47) y LVFFAEDC (SEQ ID NO: 50) desapareció después de la incubación. Sin embargo, KLVFFAEDC (SEQ ID NO: 45) y CKLVFFAED (SEQ ID NO: 48) eran todavía ligeramente turbios. También se preparó conjugado proteico simulado soluble con cisteamina en una relación 1:1 (p/p). Se obtuvieron péptidos sintetizados de BIOSOURCE con una pureza de aproximadamente un 95%.

35 Octámeros:

40 LVFFAEDVC (SEQ ID NO: 44)  
KLVFFAEDC (SEQ ID NO: 45)  
VFFAEDVGC (SEQ ID NO: 43)  
CLVFFAEDV (SEQ ID NO: 47)  
CKLVFFAED (SEQ ID NO: 48)  
45 CVFFAEDVG (SEQ ID NO: 46)

45 Heptámeros:

50 VFFAEDVC (SEQ ID NO: 49)  
LVFFAEDC (SEQ ID NO: 50)

III. Protección de los grupos lisina sin reaccionar en la proteína:

55 Las lisinas sin reaccionar se protegieron con N-acetilcisteamina (CMCA; Aldrich-Sigma) en una relación 1/1 (p/p) durante 4 horas a 4°C mientras se removía en oscuridad. Los péptidos sin reaccionar y los reactivos de protección se eliminaron de los conjugados por diálisis utilizando un casete Slide-A-Lyzer (Pm límite 10.000) (Pierce) contra tampón PBS (2 l) durante la noche (13 horas). El intercambio de tampón y la diálisis se realizaron dos veces (2 x 14 horas). Se observó una ligera insolubilidad en los conjugados con los péptidos KLVFFAEDC (SEQ ID NO: 45) y CKLVFFAED (SEQ ID NO: 48). A continuación, se almacenaron todos los conjugados en el frigorífico a 4°C en un conservante.

IV. Caracterización del transportador proteico:

65 Se utilizó espectrometría de masas MALDI-TOF para determinar la masa del CRM<sub>197</sub> bromoacetilado y la masa del conjugado simulado N-acetilcisteamina-CRM<sub>197</sub>. En base a las masas de CRM<sub>197</sub> y CRM<sub>197</sub> bromoacetilado, se modificaron 11 restos lisina.



(59941,46-58590,29)/122 = 11

Donde; el Pm de CRM<sub>197</sub> es 58.624,29

El Pm de CRM<sub>197</sub> bromoacetilado es 59.941,46

El Pm de bromoacetato es 122

5 El grado de bromoacetilación fue superior al 28%. (El número total de lisinas en CRM<sub>197</sub> fue 39). De estos 11 restos lisina modificados, 10 se acoplaron con la cisteamina. La eficacia de acoplamiento fue del 90%.

(61143- 59941)/119 = 10

Donde; el Pm de CRM<sub>197</sub> bromoacetilado es 59.941,46

El Pm de conjugado simulado es 61.143

10 El Pm de la N-acetilcisteamina es 119

$$(10/11) \times 100 = 90$$

15

20 V. Caracterización de los conjugados péptido-proteína mediante análisis SDS-PAGE/transferencia de western con gel prefabricado de tris-tricina:

20

Los conjugados proteína-péptido se analizaron mediante transferencia de western. Las calles son: marcador (calle 1); L-28375 24/01 (calle 2); L-28375 24/02 (calle 3); L-28375 24/03 (calle 4); L-28375 24/04 (calle 5); L-28375 24/05 (calle 6); L-28375 24/06 (calle 7) L-28375 24/07 (calle 8); L-28375 24/08 (calle 9); L-28375 24/09 (Simulado) (calle 10); y, BrAcCRM<sub>197</sub> (calle 11). Se utilizó un anticuerpo monoclonal específico de péptido procedente de ratones (248 - 6H9 - 806 Aß 17-28) como anticuerpo primario (antisuero) (la dilución 1:3.000 resultó ser la mejor). El anticuerpo secundario fue IgG de cabra anti-ratón (H+L)-HPR (dilución 1:1.000). Se observó que todos los conjugados eran reconocidos por el anticuerpo primario, a excepción del conjugado simulado y el CRM<sub>197</sub> activado. (Véase la Figura 10).

25

30 Concentración de proteína

Las concentraciones de proteína de las muestras de conjugado se determinaron mediante el ensayo BCA de Pierce. (Véase la Tabla 15).

35 Análisis de aminoácidos

Se llevó a cabo el análisis de aminoácidos para determinar el grado de conjugación. Se calculó el grado de conjugación en base a los restos de CMCA (carboximetilcisteamina) encontrados en los conjugados. La CMCA se utilizó para proteger los sitios activados sin reaccionar después de la conjugación con los péptidos. (Véase la Tabla 15).

40

**Tabla 15**

Grado de conjugación de los péptidos con BrAcCRM <sub>197</sub>			
Código del conjugado	Secuencia peptídica (SEQ ID NO:)	Concentración final (mg/ml)	Grado de conjugación (en base a CMCA)
L-28375 24/01	LVFFAEDV-C (SEQ ID NO:44)	1,67	8/10
L-28375 24/02	KLVFFAED-C (SEQ ID NO:45)	0,82	5/10
L-28375 24/03	VFFAEDVG-C (SEQ ID NO:43)	1,43	8/10
L-28375 24/04	C-LVFFAEDV (SEQ ID NO:47)	1,04	9/10
50 L-28375 24/05	C-KLVFFAED (SEQ ID NO:48)	0,78	1/10
L-28375 24/06	C-VFFAEDVG (SEQ ID NO:46)	0,97	9/10
L-28375 24/07	VFFAEDV-C (SEQ ID NO:49)	1,00	7/10
L-28375 24/08	LVFFAED-C (SEQ ID NO:50)	0,99	8/10
55 L-28375 24/09 (Simulado)		1,89	10/11

Todos los ensayos colorimétricos se realizaron con un espectrofotómetro de microplacas y SOFTmax Pro.

60 EJEMPLO 11

Estudios inmunogénicos de conjugados de péptido Aß en ratones Swiss Webster

65 Se inmunizó a ratones Swiss Webster exogámicos con VFFAEDVG-C (SEQ ID NO: 43), LVFFAEDV-C (SEQ ID NO: 44), KLVFFAED-C (SEQ ID NO: 45), C-VFFAEDVG (SEQ ID NO: 46), C-LVFFAEDV (SEQ ID NO: 47), C-KLVFFAED (SEQ ID NO: 48), VFFAEDV-C (SEQ ID NO: 49), LVFFAED-C (SEQ ID NO: 50) cada uno conjugado

con CRM<sub>197</sub>, o con Aβ1-7CRM<sub>197</sub>, todos formulados con el adyuvante RC 529 SE. Se inmunizó, por vía subcutánea, a nueve grupos de 10 animales por grupo, con uno de los conjugados de péptido Aβ al comienzo del estudio (semana 0) y posteriormente la semana 4. El suero se recogió antes de, pero los mismos días que, la inmunización.

## 5 Estudios inmunogénicos de conjugados de péptido Aβ en ratones Balb/c endogámicos

Se inmunizó a ratones Balb/c endogámicos como en el párrafo anterior, pero también se les reforzó con conjugado y adyuvante la semana 12.

## 10 Resultados

Se recogen sueros de ambos estudios para el análisis del título de anticuerpos IgG específicos de péptido Aβ<sub>13-28</sub>. También se recogen sueros de ratones Balb/c para el análisis un día antes del refuerzo de la semana 12, y una semana después del mismo. Se evalúan las células esplénicas de los animales utilizados en el Ejemplo 11 para su potencial para responder *in vitro* a la estimulación con una combinación solapada de péptidos que abarcan Aβ<sub>1-42</sub>, Aβ<sub>1-42</sub> de longitud completa, CRM<sub>197</sub>, o activadores policlonales. El análisis comprende lectura Elispot para las interleucinas 4 y 5, y el interferón-gamma. Una vez finalizado, pueden evaluarse los conjugados de péptido Aβ como se ha descrito anteriormente y como se describe en el Ejemplo 6.

## 20 EJEMPLO 12

### Estudios inmunogénicos de conjugados de péptido Aβ en ratones PSAPP

Se inmuniza a ratones PSAPP con VFFAEDVG-C (SEQ ID NO: 43), LVFFAEDV-C (SEQ ID NO: 44), KLVFFAED-C (SEQ ID NO: 45), C-VFFAEDVG (SEQ ID NO: 46), C-LVFFAEDV (SEQ ID NO: 47), C-KLVFFAED (SEQ ID NO: 48), VFFAEDV-C (SEQ ID NO: 49), LVFFAED-C (SEQ ID NO: 50). El ratón PSAPP, un ratón doblemente transgénico (PSAPP) que sobreexpresa los transgenes mutantes de APP y PS1, se describe en Holcomb, *et al.* (1998) *Nature Medicine* 4:97-11.

### 30 Estudios inmunogénicos de conjugados de péptido Aβ en ratones PDAPP

Se inmuniza a ratones PDAPP con VFFAEDVG-C (SEQ ID NO: 43), LVFFAEDV-C (SEQ ID NO: 44), KLVFFAED-C (SEQ ID NO: 45), C-VFFAEDVG (SEQ ID NO: 46), C-LVFFAEDV (SEQ ID NO: 47), C-KLVFFAED (SEQ ID NO: 48), VFFAEDV-C (SEQ ID NO: 49), LVFFAED-C (SEQ ID NO: 50). El ratón PDAPP expresa una forma mutante de APP humana (APP<sup>V71F</sup>) y desarrolla la enfermedad de Alzheimer a una edad temprana (Bard *et al.* (2000) *Nature Medicine* 6:916-919; Masliah E, *et al.* (1996) *J Neurosci* 15;16(18):5795-811).

## 35 Resultados

Se recogen sueros de ambos estudios para el análisis del título de anticuerpos IgG específicos de péptido Aβ<sub>13-28</sub>. Una vez finalizado, los conjugados de péptido Aβ se evaluarán como se ha descrito anteriormente y como se describe en los Ejemplos 6 y 11, así como en el ensayo de condicionamiento de miedo contextual (CFC).

El condicionamiento de miedo contextual es una forma común de aprendizaje que es excepcionalmente fiable y se adquiere rápidamente en la mayoría de los animales, por ejemplo, mamíferos. Los animales de ensayo aprenden a temer un estímulo y/o entorno anteriormente neutro debido a su asociación con una experiencia aversiva (véase, por ejemplo, Fanselow, *Anim. Learn. Behav.* 18:264-270 (1990); Wehner *et al.*, *Nature Genet.* 17:331-334 (1997); Caldarone *et al.*, *Nature Genet.* 17:335-337 (1997)).

El condicionamiento de miedo contextual es especialmente útil para determinar función o disfunción cognitiva, por ejemplo, como resultado de una enfermedad o un trastorno, tal como una enfermedad o trastorno neurodegenerativo, una enfermedad o trastorno relacionado con Aβ, una enfermedad o trastorno amiloidogénico, la presencia de una alteración genética desfavorable que afecta a la función cognitiva (por ejemplo, una mutación genética, una interrupción génica o un genotipo no deseado), y/o la eficacia de un agente, por ejemplo, un agente conjugado de Aβ, sobre la capacidad cognitiva. Por consiguiente, el ensayo de CFC proporciona un método para ensayar independientemente y/o validar el efecto terapéutico de agentes para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno cognitivo, y, en particular, una enfermedad o trastorno que afecta a una o más regiones cerebrales, por ejemplo, el hipocampo, el subículo, la corteza cingulada, la corteza prefrontal, la corteza perirrinal, la corteza sensorial y el lóbulo temporal medio.

Por lo general, el ensayo de CFC se realiza utilizando cámaras convencionales para animales y el empleo de entrenamiento de condicionamiento que comprende un choque suave (por ejemplo, descarga en la pata de 0,35 mA) emparejado con una señal auditiva (por ejemplo, un período de ruido uniforme de 85 db), olfativa (por ejemplo, extracto de almendras o de limón), táctil (por ejemplo, la textura del suelo de la jaula) y/o visual (destello luminoso). La respuesta a la experiencia aversiva (choque) es por lo general una de inmovilidad (ausencia de movimiento, salvo de respiración), pero también puede incluir parpadeo, o cambio en el reflejo de la membrana

nictitante, dependiendo del animal de ensayo seleccionado. La respuesta aversiva se caracteriza generalmente el primer día de entrenamiento para determinar una línea basal para el miedo no condicionado, con resultados de respuesta aversiva en días de ensayo posteriores, por ejemplo, inmovilidad en presencia del contexto y/o la señal pero en ausencia de la experiencia aversiva, caracterizándose como miedo condicionado por el contexto y/o la señal, respectivamente. Para mejorar la fiabilidad, los animales de ensayo son por lo general sometidos a ensayo por separado por técnicos independientes y se puntúan a lo largo del tiempo. Pueden encontrarse detalles adicionales del diseño experimental en la técnica, por ejemplo, en Crawley, JN, What's Wrong with my Mouse; Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice, Wiley-Liss, NY (2000).

Los animales de ensayo ejemplares (por ejemplo, animales modelo) incluyen mamíferos (por ejemplo, roedores o primates no humanos) que presentan síntomas destacados o una patología que es característica de un trastorno amiloidogénico tal como la enfermedad de Alzheimer. Pueden crearse modelos animales mediante endogamia selectiva para un síntoma deseado, o pueden modificarse por ingeniería genética utilizando técnicas transgénicas que son bien conocidas en la técnica, como el de una alteración genética específica (por ejemplo, una mutación genética, una interrupción génica) en un gen que está asociado con el trastorno de demencia, que conduce a la expresión o función aberrante del gen diana. Por ejemplo, se dispone de varias cepas de ratón transgénico que sobreexpresa APP y desarrolla patología de placas de amiloide y/o desarrolla déficits cognitivos que son característicos de la enfermedad de Alzheimer (véase, por ejemplo, Games *et al.*, *supra*, Johnson-Wood *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 94:1550 (1997); Masliah E y Rockenstein E. (2000) J Neural Transm Suppl; 59: 175-83).

Como alternativa, el modelo animal puede crearse utilizando compuestos químicos (por ejemplo, neurotoxinas, anestésicos) o técnicas quirúrgicas (por ejemplo ablación estereotáctica, axotomización, transección, aspiración) que eliminan o interfieren de otra forma con la función normal de una región cerebral anatómica (por ejemplo, el hipocampo, la amígdala, la corteza peririnal, el núcleo septal medio, el locus coeruleus, los cuerpos amilares) o neuronas específicas (por ejemplo, las neuronas serotoninérgicas, colinérgicas o dopaminérgicas) que están asociadas con síntomas característicos o patología del trastorno amiloidogénico. En determinadas formas de realización preferentes, el modelo animal presenta un déficit cognitivo destacado asociado con el aprendizaje o la memoria, además de la patología neurodegenerativa que se asocia con un trastorno amiloidogénico. Más preferentemente, el déficit cognitivo empeora progresivamente con la edad, de manera que la evolución de la enfermedad en el modelo animal es paralela a la evolución de la enfermedad en un sujeto que padece el trastorno amiloidogénico.

El condicionamiento de miedo contextual y otros ensayos *in vivo* para ensayar la funcionalidad de los conjugados descritos en el presente documento pueden realizarse utilizando ratones de tipo silvestre o ratones con determinada alteración genética que conduce déficit mnésico o modelos de ratón de enfermedad neurodegenerativa, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, incluidos modelos de ratón que presentan niveles elevados de A $\beta$  soluble en el líquido cefalorraquídeo (CSF) o plasma. Por ejemplo, los modelos animales para la enfermedad de Alzheimer incluyen ratones transgénicos que sobreexpresan la mutación "Swedish" de la proteína precursora de amiloide humana (*hAPP<sub>swe</sub>*; Tg2576), que presentan placas y déficits de memoria dependientes de la edad (Hsiao *et al.* (1996) Science 274:99-102). La funcionalidad *in vivo* de los conjugados descritos en el presente documento también puede ensayarse utilizando el ratón mutante PS-1, descrito en Duff, *et al.* (1996) Nature 383, 710-713. Se describen otros modelos transgénicos genéticamente modificados de la enfermedad de Alzheimer en Masliah E y Rockenstein E. (2000) J Neural Transm Suppl. 59: 175-83.

En diversos aspectos, los métodos de la invención comprenden la administración de un conjugado de A $\beta$  que es capaz de mejorar la cognición en un sujeto, en el que el conjugado de A $\beta$  se ha identificado en el uso de un ensayo que es adecuadamente predictivo de eficacia inmunoterapéutica en el sujeto. En formas de realización ejemplares, el ensayo es un ensayo en animales modelo que se basa, al menos en parte, en la comparación de la cognición, según se determina a partir de un estudio de condicionamiento de miedo contextual, de un animal después de administrar al animal un reactivo inmunológico de ensayo, en comparación con un control adecuado. El ensayo de CFC evalúa los cambios en la cognición de un animal (por lo general un ratón o una rata) tras el tratamiento con un potencial compuesto terapéutico. En determinadas formas de realización, el cambio en la cognición evaluado es una mejora del estado de la alteración de la memoria o una reversión del déficit de memoria. Por consiguiente, el ensayo de CFC proporciona un método directo para determinar el efecto terapéutico de los agentes para prevenir o tratar la enfermedad cognitiva, y, en particular, una enfermedad o trastorno que afecta a una o más regiones cerebrales, por ejemplo, el hipocampo, el subiculum, la corteza cingulada, la corteza prefrontal, la corteza peririnal, la corteza sensorial y el lóbulo temporal medio. Tales ensayos de CFC se analizan en la solicitud de patente de EE.UU. con N° de serie 60/XXX.XXX titulada "Contextual Fear Conditioning for Predicting Immunotherapeutic Efficacy" (con número de expediente del mandatario ELN-058-1), presentada el 15 de diciembre de 2004, y la solicitud de patente de EE.UU. con N° de serie 60/XXX.XXX titulada "Contextual Fear Conditioning for Predicting Immunotherapeutic Efficacy" (con número de expediente del mandatario ELN-058-2).

## BIBLIOGRAFÍA

Bernatowicz, M.S., y Matsueda, G.R. (1986) Analytical Biochemistry 155: 95-102.

Kniskern, P.J., y Marburg, S. (1994) Development and Clinical Uses of Haemophilus b Conjugate Vaccines: Conjugation: Design, Chemistry, and Analysis Ellis, R.W., y Granoff, D.M., Eds; Marcel Dekker, Inc: Nueva York, NY, 37-70

Arrizon, V., Biechler, R., Cummings, J., y Harbaugh, J. (1991) High-Performance Liquid Chromatography of Peptide and Protein: Separation, Analysis, and Conformation Mant, C.T. y Hodges, R.S., Eds; CRC Press: Boca Raton, FL, 859-863.

Carlsson, J. *et al.* (1978) *Biochem J*, 173: 723.

Means, G.E., Cangdon, W.I., y Bender, M.I. (1972) *Biochemistry* 11: 3564-3574.

Glennner & Wong (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120: 1131

Hardy (1984) *Trends in Neurosciences* 20: 1131.

Hardy(1977) *Trends in Neurosciences* 20: 154.

Stoute *et al.* (1997) *N. Engl. J. Med.* 336: 86-91.

Goebel *et al.*, (1939) *J. Exp. Med.* 69: 5 3.

Schneerson *et al.* (1980) *J. Exp. Med.* 152: 361-376.

Chu *et al.* (1983) *Infect. Immun.* 40: 245.

Schneerson *et al.* (1984) *Infect. Immun.* 45: 582-591.

Anderson *et al.* (1985) *J. Pediatr.* 107: 346.

Insel *et al.* (1986) *J. Exp. Med.* 158: 294.

Patente de EE.UU. Nº 4.,673.574 Jun., 1987 Anderson

Patente de EE.UU. Nº 4.902.506 Feb., 1990 Anderson *et al.*

Patente de EE.UU. Nº 5.192.540 Mar., 1993 Kuo *et al.*

Patente de EE.UU. Nº 5.306.492 Abr., 1994 Porro

Patente de EE.UU. Nº 5.360.897 Nov., 1994 Anderson *et al.*

Patente de EE.UU. Nº 5.785.973 Jul., 1998 Bixler *et al.*

Patente de EE.UU. Nº 6.361.777 Mar., 2002 Hoogerhout

Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (C.S.H. P. Pres, NY 2ª ed., 1989)

Bernatowicz, M. S., y Matsueda, G. R. (1986) *Analytical Biochemistry* 155, 95-102.

Kniskern, P.J., y Marburg, S. (1994) Development and Clinical Uses of Haemophilus b Conjugate Vaccines: Conjugation: Design, Chemistry, and Analysis Ellis, R.W., y Granoff, D.M., Eds; Marcel Dekker, Inc: Nueva York, NY, 37-70

Arrizon, V., Biechler, R., Cummings, J., y Harbaugh, J. (1991) High-Performance Liquid Chromatography of Peptide and Proteins: Separation, Analysis, and Conformation Mant, C.T. y Hodges, R.S., Eds; CRC Press: Boca Raton, FL, 859-863.

# LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Arumugham, Rasappa Prasad, A. Krishna

<120> Métodos para producir conjugados transportadores de péptidos inmunogénicos

<130> 025721-000110US

<140>

<141>

<150> US 60/530.480

<151> 17-12-2003

<160> 54

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Asp Ala Glu Phe Arg Cys

1

5

<210> 2

<211> 8  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 5 <400> 2  
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Cys  
 10 1 5  
 <210> 3  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 15 <400> 3  
 20 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Cys  
 1 5 10  
 25 <210> 4  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 30 <400> 4  
 35 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val Cys  
 1 5 10  
 40 <210> 5  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 45 <400> 5  
 Asp Ala Glu Phe Arg Gly Ala Gly Ala Cys  
 50 1 5 10  
 <210> 6  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 55 <400> 6  
 60 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Gly Ala Gly Ala Cys  
 65 1 5 10

5 <210> 7  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 7

10

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Gly Ala Gly Ala Cys

15 1 5 10

20 <210> 8  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 8

25

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val Gly Ala Gly Ala

30 1 5 10 15

Cys

35

40 <210> 9  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 9

45

Val Glu Tyr Gly Ser Asp His Arg Phe Glu Ala Asp Cys

50 1 5 10

55 <210> 10  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 10

60

Gly Ala Gly Ala

65 1

5 <210> 11  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 11

10 Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr  
 1 5 10

15 <210> 12  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

20 <220>  
 <221> característica\_diversa  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

25 <400> 12

30 Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala  
 1 5 10

35 <210> 13  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

40 <400> 13

45

50 Glu Lys Lys Ile Ala Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser Val Phe Asn Val  
 1 5 10 15

55 <210> 14  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 14

60 Phe Glu Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile  
 1 5 10

65

<210> 15  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 15

Asp Gln Ser Ile Gly Asp Leu Ile Ala Glu Ala Met Asp Lys Val Gly  
1                5                10                15

Asn Glu Gly

<210> 16  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 16

Gln Val His Phe Gln Pro Leu Pro Pro Ala Val Val Lys Leu  
1                    5                    10

<210> 17  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 17

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu  
1                5                      10                          15

<210> 18  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 18

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser  
1                5                      10                      15

Ala Ser His Leu Glu  
20

<210> 19  
<211> 15



<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 19

5

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr  
1 5 10 15

10

<210> 20  
<211> 51  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

15

<400> 20

20

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe  
1 5 10 15

25

Ile Gly Ile Thr Glu Leu Cys Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp  
20 25 30

30

Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Asp Ala Glu Phe  
35 40 45

35

40

Arg His Asp  
50

45

<210> 21  
<211> 42  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

50

<400> 21

55

60

65

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

10 Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile  
20 25 30

15 Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala  
35 40

20 <210> 22  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

25 <400> 22

30 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe  
1 5 10 15

35 Ile Gly Ile Thr Glu Leu  
20

40 <210> 23  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

45 <400> 23

50 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp  
1 5 10 15

55 Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu  
20 25

60 <210> 24  
<211> 43  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

65 <400> 24

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

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe  
1 5 10 15

Ile Gly Ile Thr Glu Leu Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu  
20 25 30

Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu  
35 40

<210> 25  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 25

Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe  
1 5 10 15

Ile Gly Ile Thr Glu Leu  
20

<210> 26  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<220>  
<221> característica\_diversa  
<222> (3)..(3)  
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 26

Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Asp Ala Glu  
1 5 10 15

Phe Arg His Asp  
20

<210> 27  
<211> 34  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<220>  
<221> característica\_diversa

<222> (24)..(24)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 27

5

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala

1 5 10 15

10

Glu Phe Arg His Asp Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala

20 25 30

15

20

Ala Ala

<210> 28

<211> 34

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25

<220>

<221> característica\_diversa

<222> (3)..(3)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

30

<400> 28

35

Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Asp Ala Glu

1 5 10 15

40

Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg

20 25 30

45

50

His Asp

<210> 29

<211> 20

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

55

<220>

<221> característica\_diversa

<222> (10)..(10)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

60

<400> 29

65

5 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu  
1 5 10 15

10 Lys Ala Ala Ala  
20

15 <210> 30  
<211> 24  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 30

25 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His  
1 5 10 15

30 Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg  
20

35 <210> 31  
<211> 24  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

40 <400> 31

45 Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His  
1 5 10 15

50 Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg  
20

55 <210> 32  
<211> 24  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

60 <400> 32

65

5           Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His  
          1                           5                           10                           15

10           Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg  
                                  20

15           <210> 33  
              <211> 34  
              <212> PRT  
              <213> *Homo sapiens*  
  
              <400> 33

20           Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Asp Ala Glu  
          1                           5                           10                           15

25

30           Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg  
                          20                           25                           30

35           His Asp

40           <210> 34  
              <211> 27  
              <212> PRT  
              <213> *Homo sapiens*  
  
              <400> 34

45           Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu  
          1                           5                           10                           15

50

55           Lys Leu Ala Thr Asp Ala Glu Phe Arg His Asp  
                          20                           25

60           <210> 35  
              <211> 34  
              <212> PRT  
              <213> *Homo sapiens*  
  
              <400> 35

65

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala  
1                5                10                15

Glu Phe Arg His Asp Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu  
20 25 30

Ala Thr

<210> 36  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 36

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Pro Lys  
1                5                10                15

Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr  
20 25

<210> 37  
<211> 79  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 37

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu  
 1 5 10 15

Lys Leu Ala Thr Glu Lys Lys Ile Ala Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser  
 20 25 30

Val Phe Asn Val Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile  
 35 40 45

Thr Glu Leu Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro  
 50 55 60

Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Asp Ala Glu Phe Arg His Asp  
 65 70 75

<210> 38  
 <211> 58  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 38

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala  
 1 5 10 15

Glu Phe Arg His Asp Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly  
 20 25 30

Ile Thr Glu Leu Cys Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg  
 35 40 45

Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu  
 50 55

<210> 39  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*



<400> 39

5 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe

10 1 5 10 15

15 Ile Gly Ile Thr Glu Leu Cys Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp

20 20 25 30

25 Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu

30 35 40

35

40

45

50

55

60

65

<210> 40  
<211> 535  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 40

5	Gly	Ala	Asp	Asp	Val	Val	Asp	Ser	Ser	Lys	Ser	Phe	Val	Met	Glu	Asn
	1				5					10					15	
10	Phe	Ser	Ser	Tyr	His	Gly	Thr	Lys	Pro	Gly	Tyr	Val	Asp	Ser	Ile	Gln
				20					25					30		
15	Lys	Gly	Ile	Gln	Lys	Pro	Lys	Ser	Gly	Thr	Gln	Gly	Asn	Tyr	Asp	Asp
		35						40					45			
20	Asp	Trp	Lys	Glu	Phe	Tyr	Ser	Thr	Asp	Asn	Lys	Tyr	Asp	Ala	Ala	Gly
	50						55					60				
25	Tyr	Ser	Val	Asp	Asn	Glu	Asn	Pro	Leu	Ser	Gly	Lys	Ala	Gly	Gly	Val
30	65					70					75					80
35	Val	Lys	Val	Thr	Tyr	Pro	Gly	Leu	Thr	Lys	Val	Leu	Ala	Leu	Lys	Val
				85						90					95	
40																
45																
50																
55																
60																
65																

5            Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu  
                          100                            105                            110

10           Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly  
                          115                            120                            125

15           Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser  
                          130                            135                            140

20           Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser  
                          145                            150                            155                            160

25           Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp  
    165                            170                            175

30           Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val Arg  
    180                            185                            190

35           Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp Val  
    195                            200                            205

40           Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His Gly  
    210                            215                            220

45           Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser Glu  
    225                            230                            235                            240

50           Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu Glu  
    245                            250                            255

55           Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu Glu  
    245                            250                            255

60           Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu Glu  
    245                            250                            255

65           Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu Glu  
    245                            250                            255

5 His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro Val  
 260 265 270  
 10 Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln Val  
 275 280 285  
 15 Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala Leu  
 290 295 300  
 20 Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly Ala  
 305 310 315 320  
 25 Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser  
 325 330 335  
 30 Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp  
 340 345 350  
 35 Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu Phe  
 355 360 365  
 40 Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly His  
 370 375 380  
 45 Lys Thr Gln Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val Ser Trp Asn Thr  
 385 390 395 400  
 50 Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg Thr Gly Phe Gln Gly Glu Ser Gly His  
 405 410 415  
 55 Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu Asn Thr Pro Leu Pro Ile Ala Gly Val  
 60  
 65

420                      425                      430  
 5                      Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr  
                     435                      440                      445  
 10  
                     His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile  
                     450                      455                      460  
 15  
                     Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro Lys Ser Pro Val Tyr Val Gly  
                     465                      470                      475                      480  
 20  
                     Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val Ala Phe His Arg Ser Ser Ser  
                     485                      490                      495  
 25  
                     Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu  
                     500                      505                      510  
 30  
                     Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His Thr Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser  
                     515                      520                      525  
 35  
                     Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser  
                     530                      535  
 40  
 45

<210> 41  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 41

55                      Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly  
                     1                      5                      10                      15  
 60

Arg

<210> 42

<211> 42  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

5 <400> 42

10 Asp Ala Glu Phe Gly His Asp Ser Gly Phe Glu Val Arg His Gln Lys  
1 5 10 15

15 Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile  
20 25 30

20 Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala  
35 40

25 <210> 43  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial  
30 <220>  
<223> A-beta 18-25 + C  
35 <400> 43

Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Cys  
1 5

40 <210> 44  
<211> 9  
<212> PRT  
45 <213> Artificial  
<220>  
<223> A-beta 17-24 + C

50 <400> 44

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Cys  
1 5

55 <210> 45  
<211> 9  
<212> PRT  
60 <213> Artificial  
<220>  
<223> A-beta 16-23 + C  
65 <400> 45

		Lys	Leu	Val	Phe	Phe	Ala	Glu	Asp	Cys	
		1								5	
5											
10											
15											
20											
25											
30											
35											
40											
45											
50											
55											
60											
65											

		Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Cys
5		1 5
10	<210> 50 <211> 8 <212> PRT <213> Artificial	
15	<220> <223> A-beta 17-23 + C  <400> 50	
20		Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Cys
25	<210> 51 <211> 8 <212> PRT <213> Artificial	1 5
30	<220> <223> A-beta 16-22 + C	
35	<220> <221> característica_diversa <222> (8)..(8) <223> CRM 197 añadido mediante la cisteína terminal  <400> 51	
40		Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Cys
45	<210> 52 <211> 8 <212> PRT <213> Artificial	1 5
50	<220> <223> C + A-beta 18-24	
55	<220> <221> característica_diversa <222> (1)..(1) <223> CRM 197 añadido mediante la cisteína N-terminal  <400> 52	
60		Cys Val Phe Phe Ala Glu Asp Val
65	<210> 53 <211> 8	1 5



<212> PRT  
<213> Artificial

5      <220>  
     <223> C + A-beta 17-23  
     <400> 53

10 Cys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp  
1 5

15

<210> 54  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> C + A-beta 16-22 + C

25

<220>  
<221> característica\_diversa  
<222> (1)..(1)  
<223> CRM 197 añadido mediante la cisteína N-terminal  
  
<400> 54

Cys Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu  
1 5

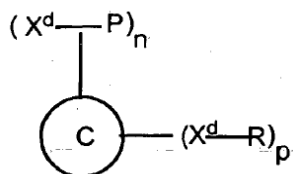
## Reivindicaciones

1. Método para conjugar un inmunógeno peptídico mediante un grupo reactivo de un resto aminoacídico del inmunógeno peptídico con un transportador proteico/polipeptídico que tiene uno o más grupos funcionales, comprendiendo el método las etapas de:

(a) derivatizar uno o más de los grupos funcionales del transportador proteico/polipeptídico para generar un transportador derivatizado con sitios reactivos, en el que el transportador está seleccionado del grupo que consiste en CRM<sub>197</sub>, ORF1224 de *Streptococcus pyogenes*, ORF1664 de *Streptococcus pyogenes*, ORF2452 de *Streptococcus pyogenes* y ORF T858 de *Chlamydia pneumoniae*;

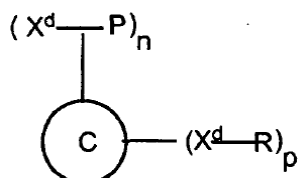
(b) hacer reaccionar el transportador proteico/polipeptídico derivatizado de la etapa (a) con un grupo reactivo de un aminoácido del inmunógeno peptídico en condiciones de reacción tales que el inmunógeno peptídico se conjuga con el transportador proteico/polipeptídico derivatizado mediante los grupos funcionales; y

(c) hacer reaccionar adicionalmente el conjugado con N-acetilcisteamina para inactivar los grupos funcionales libres reactivos sin reaccionar en el transportador proteico/polipeptídico derivatizado, preservando así la funcionalidad del transportador, de manera que conserve su capacidad para inducir las respuestas inmunitarias deseadas contra el inmunógeno peptídico que de otra manera no se producirían sin un transportador, en el que el conjugado tiene la fórmula:



en la que C es el transportador proteico/polipeptídico,  $X^d$  es un grupo funcional derivatizado del transportador proteico/polipeptídico, P es el inmunógeno peptídico, R es una molécula de protección, n es un número entero superior a 0, pero inferior o igual a 85, y p es un número entero superior a 0, pero inferior o igual a 85.

2. Conjugado inmunógeno peptídico-transportador proteico/polipeptídico que tiene la fórmula:



en la que,

C es el transportador proteico/polipeptídico seleccionado del grupo que consiste en CRM<sub>197</sub>, ORF 1224 de *Streptococcus pyogenes*, ORF1664 de *Streptococcus pyogenes*, ORF2452 de *Streptococcus pyogenes* y ORF T858 de *Chlamydia pneumoniae*,

$X^d$  es un grupo funcional derivatizado de un resto aminoacídico del transportador proteico/polipeptídico,

P es una molécula de inmunógeno peptídico fijada covalentemente al grupo funcional derivatizado del resto aminoacídico del transportador proteico/polipeptídico,

R es una molécula de protección formada por la reacción del conjugado con N-acetilcisteamina fijada covalentemente al grupo funcional derivatizado de un resto aminoacídico del transportador proteico/polipeptídico, preservando así la funcionalidad del transportador de manera que conserve su capacidad para inducir las respuestas inmunitarias deseadas contra el inmunógeno peptídico que de otra manera no se producirían sin un transportador,

n es un número entero superior a 0, pero inferior o igual a 85, y

p es un número entero superior a 0, pero inferior o igual a 85.

3. Método según la reivindicación 1, o conjugado inmunógeno peptídico-transportador proteico/polipeptídico según la reivindicación 2, en el que el transportador proteico/polipeptídico es CRM<sub>197</sub>.

4. Método según la reivindicación 1, o conjugado inmunógeno peptídico-transportador proteico/polipeptídico según la reivindicación 2, en el que el inmunógeno peptídico está seleccionado del grupo que consiste en una proteína bacteriana, una proteína viral, una proteína fúngica, una proteína parasitaria y una proteína eucariota.

5. Método según la reivindicación 1, que comprende adicionalmente introducir un resto cisteína en el extremo C-terminal o N-terminal del inmunógeno peptídico.
- 5 6. Método según la reivindicación 5, en el que el resto cisteína se introduce en el extremo C-terminal del inmunógeno peptídico.
7. Método según la reivindicación 5, en el que el resto cisteína se introduce en el extremo N-terminal del inmunógeno peptídico.
- 10 8. Conjugado inmunógeno peptídico-transportador proteico/polipeptídico según la reivindicación 2, en el que el inmunógeno peptídico comprende un resto cisteína situado en el extremo amino terminal del inmunógeno peptídico o en el extremo carboxilo terminal del inmunógeno peptídico.
- 15 9. Conjugado inmunógeno peptídico-transportador proteico/polipeptídico según la reivindicación 8, en el que el resto cisteína está situado en el extremo carboxilo terminal del inmunógeno peptídico.
10. Conjugado inmunógeno peptídico-transportador proteico/polipeptídico según la reivindicación 8, en el que el resto cisteína está situado en el extremo amino terminal del inmunógeno peptídico.
- 20 11. Método según la reivindicación 1, o conjugado inmunógeno peptídico-transportador proteico/polipeptídico según la reivindicación 2, en el que el grupo funcional de una o más moléculas de aminoácido del transportador proteico/polipeptídico se derivatizan utilizando un reactivo de entrecruzamiento.
- 25 12. Método o conjugado inmunógeno peptídico-transportador proteico/polipeptídico según la reivindicación 11, en el que el transportador proteico/polipeptídico se hace reaccionar con un agente de haloacetilación.
13. Composición inmunogénica que comprende un conjugado de un inmunógeno peptídico con un transportador proteico/polipeptídico según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, u 8 a 12, junto con uno o más excipientes, diluyentes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables.
- 30 14. Composición inmunogénica según la reivindicación 13, en la que uno o más adyuvantes están seleccionados del grupo que consiste en GM-CSF, 529 SE, IL-12, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, *Mycobacterium tuberculosis*, *Bordetella pertussis*, lipopolisacáridos bacterianos, compuestos de fosfato de aminoalquil-glucosamina, MPL™ (monofosforil lípido A 3-O-desacilado), un polipéptido, Quil A, STIMULON™ QS-21, una toxina de pertussis (PT), una toxina termolábil de *E. coli* (LT), IL-1  $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, interferón  $\alpha$ , interferón  $\beta$ , interferón  $\gamma$ , G-CSF, TNF- $\alpha$  y TNF- $\beta$ .
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

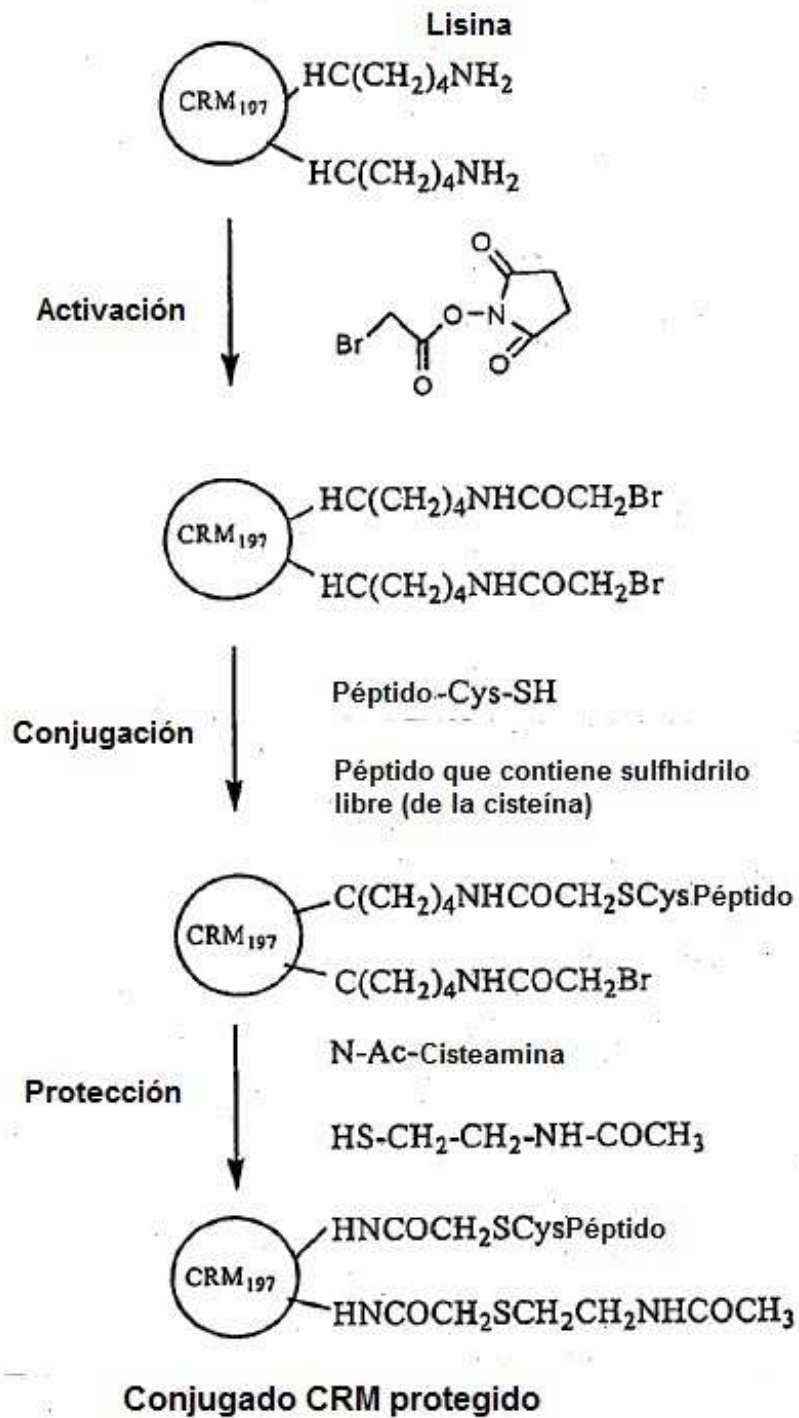


Figura 1

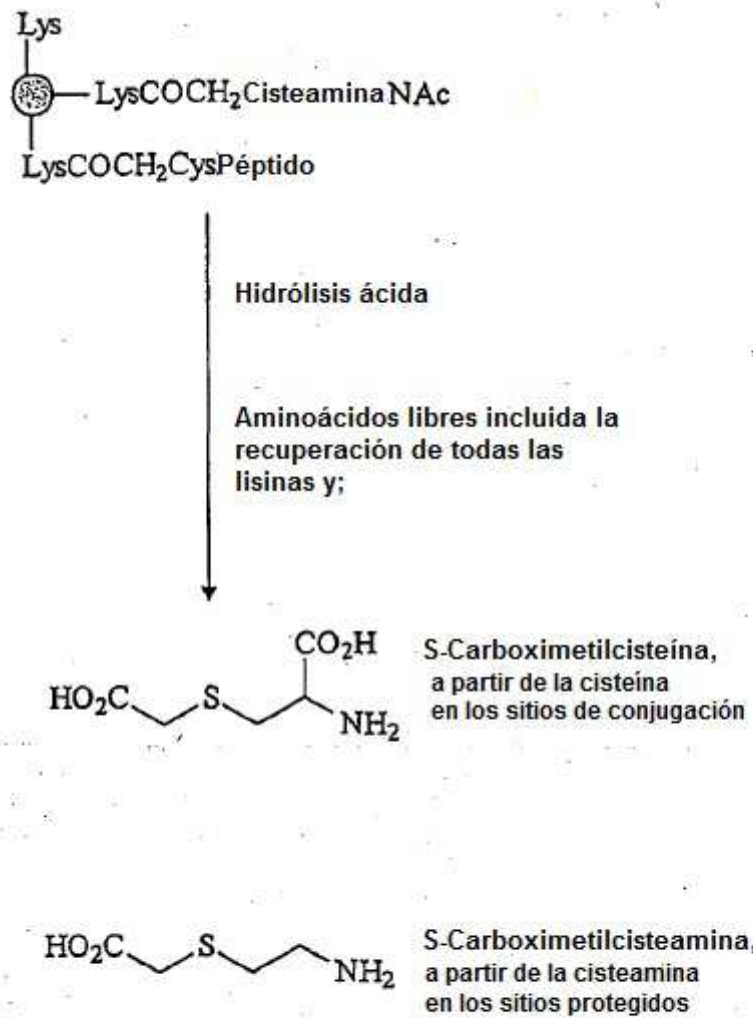


Figura 2

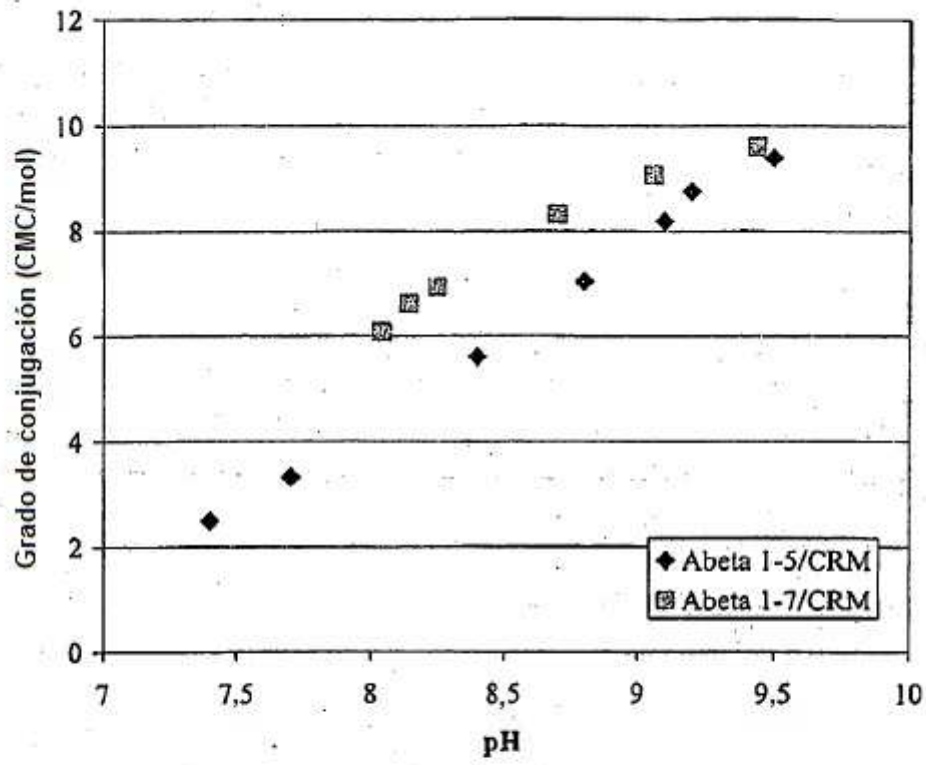


Figura 3

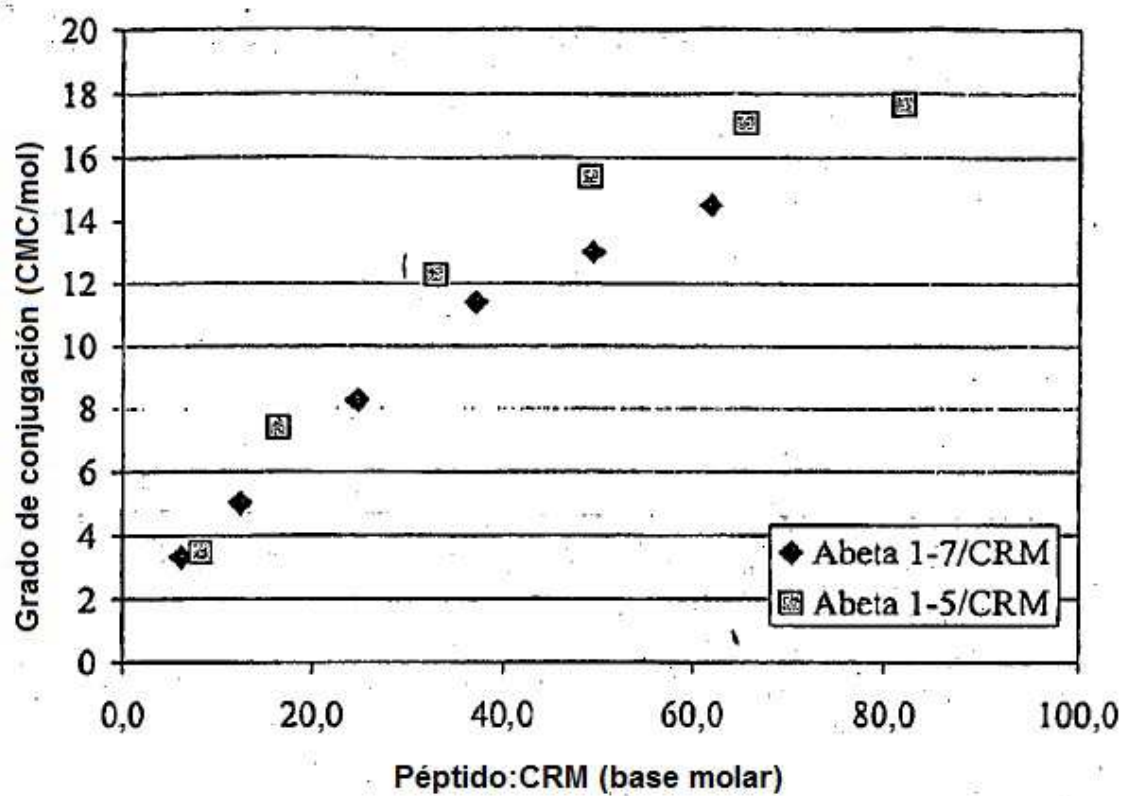


Figura 4

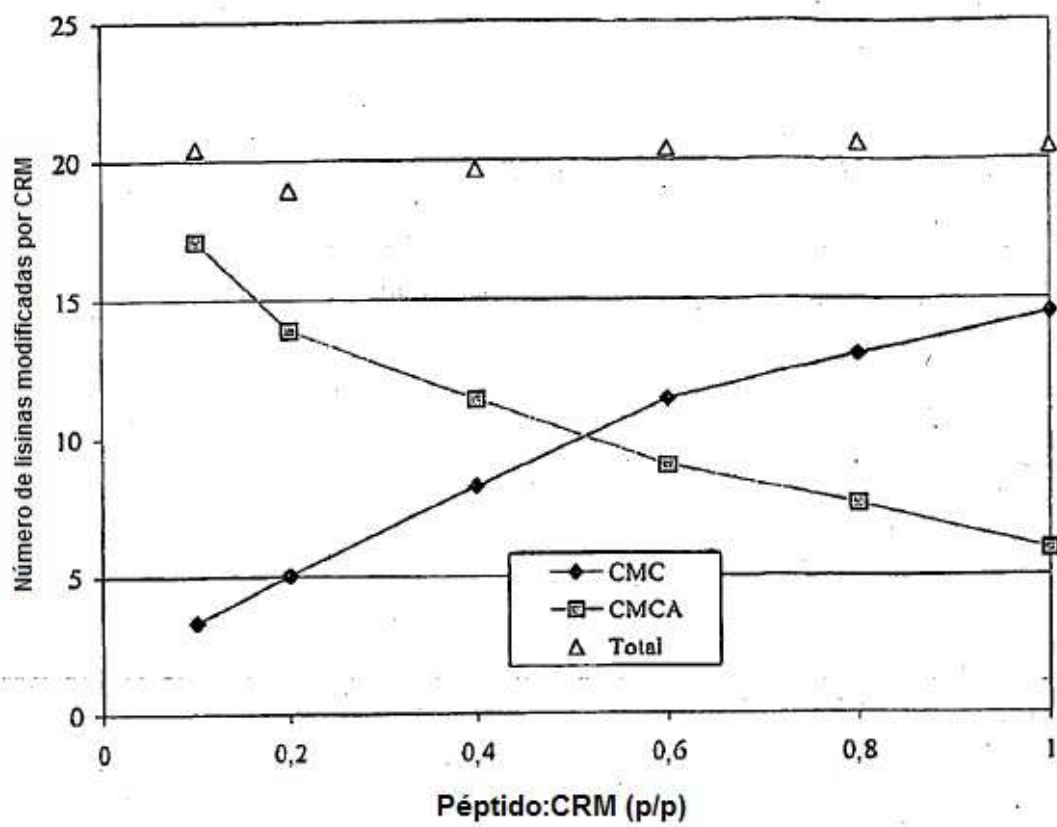


Figura 5



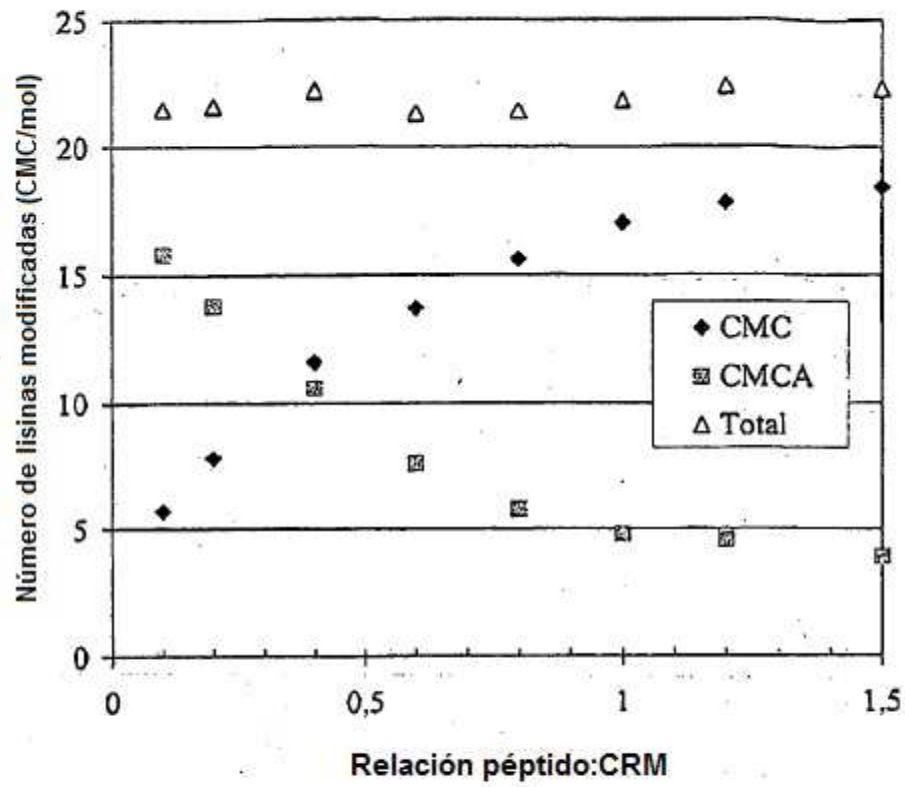


Figura 6

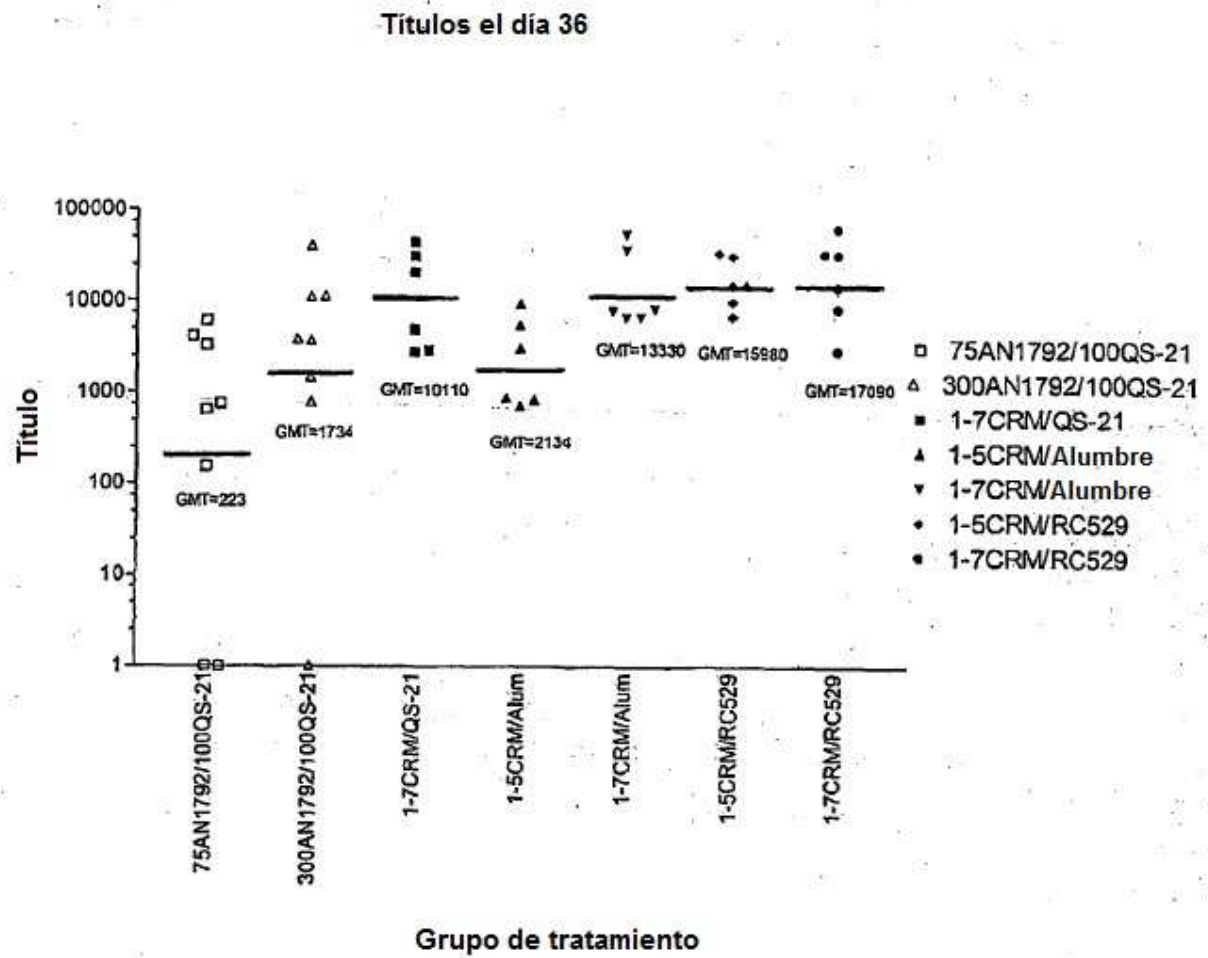
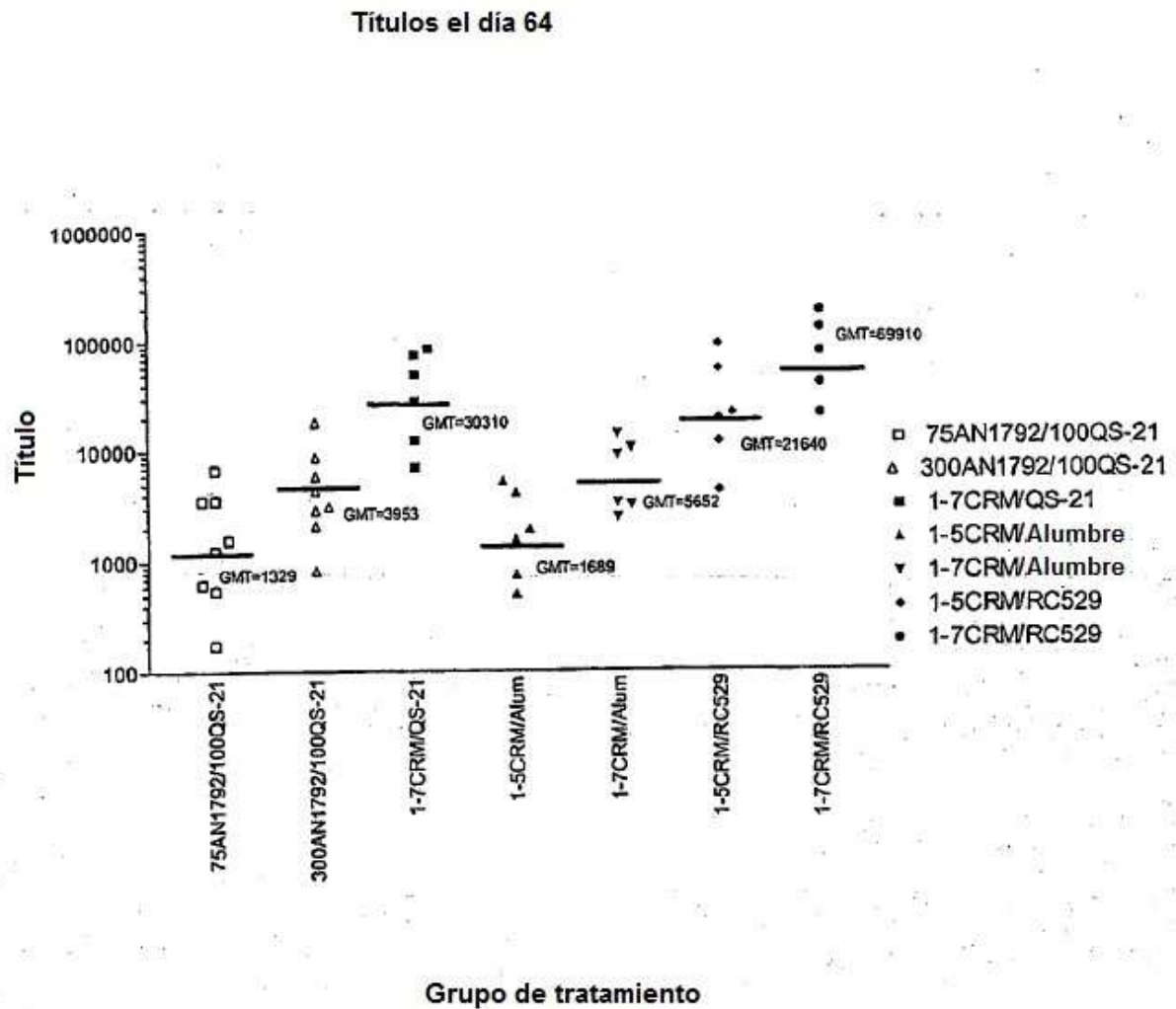
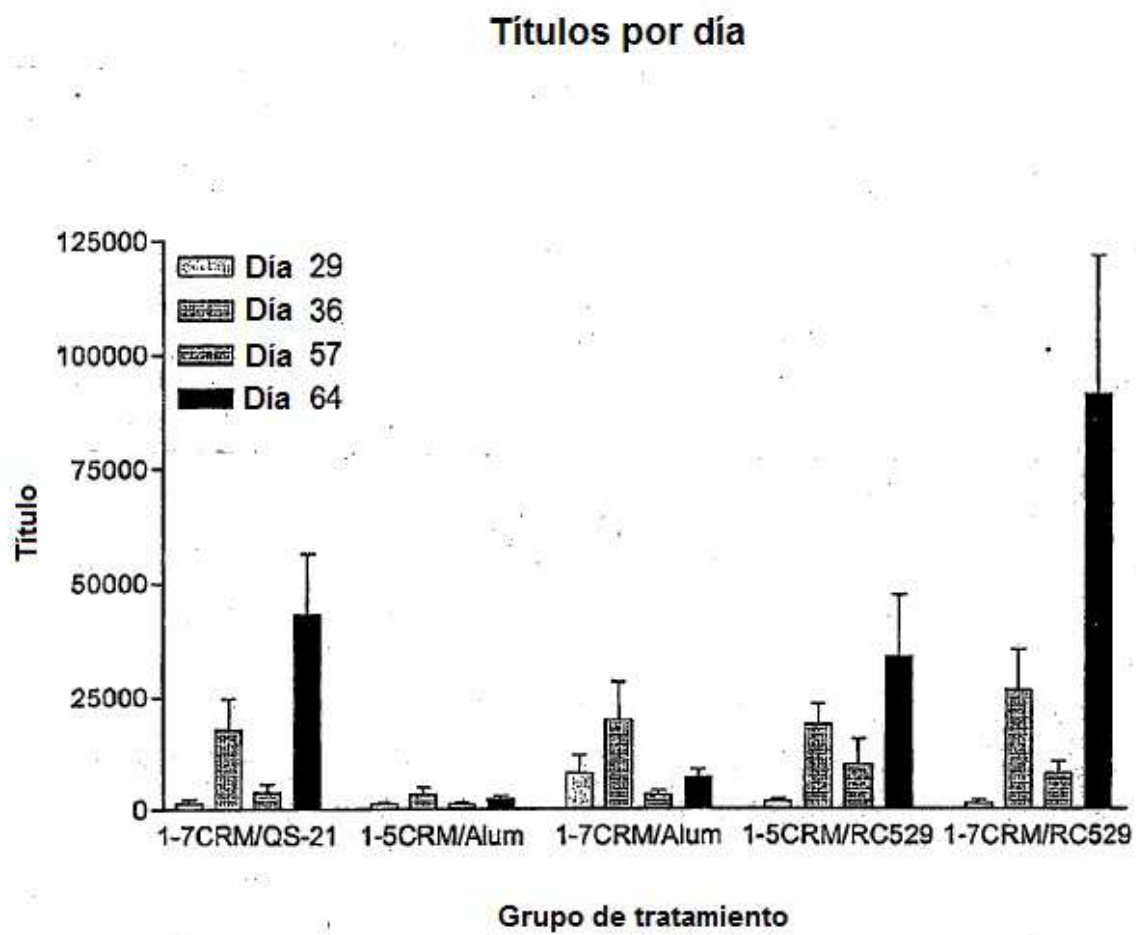


Figura 7



**Figura 8**

**Figura 9**

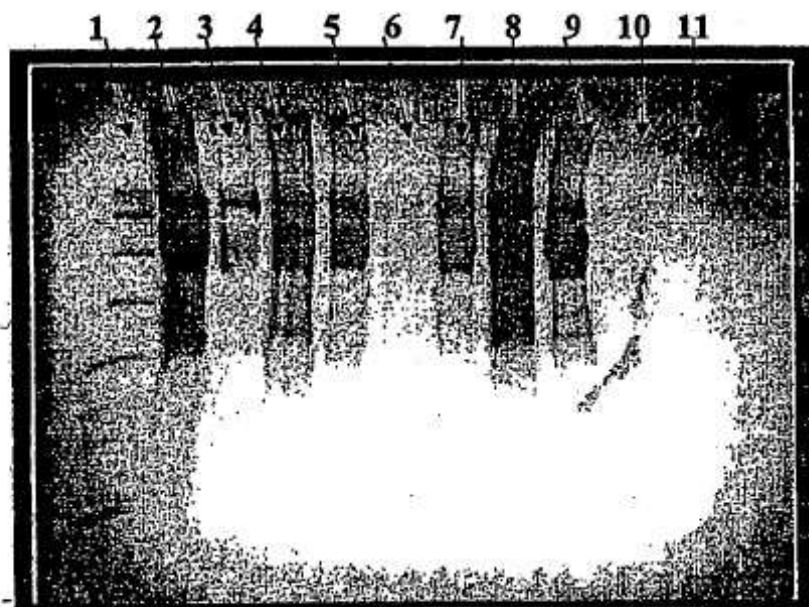


Figura 10