

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 624 908**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2000 E 09075267 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017 EP 2108376**

(54) Título: **Prevención y tratamiento de la enfermedad amiloide**

(30) Prioridad:

28.05.1999 US 322289

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.07.2017

(73) Titular/es:

JANSSEN ALZHEIMER IMMUNOTHERAPY (100.0%)
Monksland Athlone
Westmeath, IE

(72) Inventor/es:

SCHENK, DALE B.;
BARD, FREDERIQUE;
VASQUEZ, NICKI J. y
YEDNOCK, TED

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 624 908 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).

Prevención y tratamiento de la enfermedad amiloide**Descripción****5 CAMPO TÉCNICO**

La invención reside en los campos de la técnica de la inmunología y la medicina.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad progresiva que resulta en demencia senil. Véase, en general, Selkoe, *TINS* 16, 403-409 (1993); Hardy *et al.*, WO 92/13069; Selkoe, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 53, 438-447 (1994); Duff *et al.*, *Nature* 373, 476-477 (1995); Games y col., *Nature* 373, 523 (1995). En términos generales, 15 la enfermedad se clasifica en dos categorías: inicio tardío, que se produce en la vejez (65 + años) y de aparición temprana, que se desarrolla mucho antes del periodo senil, es decir, entre 35 y 60 años. En ambos tipos de enfermedad, la patología es la misma, pero las anomalías tienden a ser más graves y generalizadas en los casos que comienzan a una edad temprana. La enfermedad se caracteriza por al menos dos tipos de lesiones en el cerebro, placas seniles y ovillos neurofibrilares. Las placas seniles son áreas de neuropilo desorganizado de hasta 20 150 µM con depósitos amiloideos extracelular en el centro visibles por análisis microscópico de secciones de tejido cerebral. Los ovillos neurofibrilares son depósitos intracelulares de proteína tau asociada a microtúbulos que consisten en dos filamentos retorcidos el uno del otro en pares.

25 El constituyente principal de las placas es un péptido denominado A β o péptido β -amiloide. El péptido A β es un fragmento interno de 39-43 aminoácidos de una proteína precursora denominada proteína precursora amiloide (APP). Varias mutaciones dentro de la proteína de APP se han correlacionado con la presencia de la enfermedad de Alzheimer. Véase, por ejemplo, Goate *et al.*, *Nature* 349, 704 (1991) (valina⁷¹⁷ a isoleucina); Chartier Harlan *et al.*, *Nature* 353, 844 (1991) (valine⁷¹⁷ a glicina); Murrell *et al.*, *Science* 254, 97 (1991) (valina⁷¹⁷ a fenilalanina); Mullan *et al.*, *Nature Genet.* 1, 345 (1992) (una doble mutación cambia lisina⁵⁹⁵-metionina⁵⁹⁶ a asparagina⁵⁹⁵-leucina⁵⁹⁶). Se cree que estas mutaciones causan la enfermedad de Alzheimer por procesamiento incrementado o alterado de APP para A β , en particular procesamiento de APP para cantidades aumentadas de la forma larga de A β (es decir, A β 1-42 y A β 1-43). Se cree que las mutaciones en otros genes, tales como los genes de presenilina, PS1 y PS2, afectan indirectamente el procesamiento de APP para generar mayores cantidades de forma larga A β (véase Hardy, *TINS* 20, 154 (1997)). Estas observaciones indican que la A β , y particularmente su forma larga, es un elemento causante de la enfermedad de Alzheimer.

35 McMichael, EP 526.511, propone la administración de dosificaciones homeopáticas (menos de o igual a 10-² mg/día) de A β a pacientes con A β preestablecida. En un humano típico con aproximadamente 5 litros de plasma, sería de esperar que incluso el límite superior de esta dosificación generaría una concentración de no más de 2 µg/ml. La concentración normal de A β en plasma humano está típicamente en el rango de 50-200 µg/ml (Seubert *et al.*, *Nature* 359, 325-327 (1992)). Debido a la dosis propuesta de EP 526.511 apenas alteraría el nivel de A β endógeno circulante y porque EP 526.511 no recomienda el uso de un adyuvante, como un inmunoestimulante, parece inverosímil que cualquier beneficio terapéutico resultaría.

40 FRENKEL D ET AL.; JOURNAL OF NEUROIMMUNOLOGY, 88, 85-90 (1998) describe anticuerpos murinos que se unen a A β 1-7 o 1-5; WO 98/44955 da a conocer la administración de ADN que codifica los anticuerpos murinos se unen a A β 1-7 o 1-5 a las células del sistema nervioso central.

45 Por el contrario, la presente descripción se dirige *inter alia* a tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades amiloidogénicas mediante la administración de fragmentos de A β , o anticuerpo a determinados epítopos dentro de A β a un paciente en condiciones que generen una respuesta inmunitaria beneficiosa en el paciente. La invención cumple así una necesidad desde hace mucho tiempo para los regímenes terapéuticos para prevenir o mejorar la neuropatología y, en algunos pacientes, el deterioro cognitivo asociado con la enfermedad de Alzheimer.

55 RESUMEN DE LA INVENCIÓN REIVINDICADA

50 La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo que se une específicamente a un epítopo dentro de los residuos 1-10 de A β , donde el isotipo del anticuerpo es IgG1 humano, y un portador farmacéuticamente aceptable.

55 La invención también proporciona una composición farmacéutica de este tipo para su uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad asociada con depósitos amiloideos de A β en el cerebro de un paciente.

60 La invención también proporciona un anticuerpo que se une específicamente a un epítopo dentro de los residuos 1-10 de A β , en el que el isotipo del anticuerpo es IgG1 humano, para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad asociada con depósitos amiloideos de A β en el cerebro de un paciente.

En un aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas o anticuerpos tal como se definen en las reivindicaciones para uso en métodos de prevención o tratamiento de una enfermedad asociada con depósitos amiloideos de A β en el cerebro de un paciente. Tales enfermedades incluyen enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down y deterioro cognitivo de Down. Este último puede ocurrir con o sin otras características de una enfermedad amiloidogénica. Algunos métodos implican la administración de una dosificación eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a un componente de un depósito amiloide al paciente. Tales métodos son particularmente útiles para prevenir o tratar la enfermedad de Alzheimer en pacientes humanos. Algunos métodos implican la administración de una dosificación eficaz de un anticuerpo que se une a A β . Algunos métodos implican la administración de una dosificación eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a un epítopo dentro de los residuos 1-10 de A β . En algunos procedimientos, el anticuerpo se une específicamente a un epítopo dentro de los residuos 1-6 de A β . En algunos procedimientos, el anticuerpo se une específicamente a un epítopo dentro de los residuos 1-5 de A β . En algunos procedimientos, el anticuerpo se une específicamente a un epítopo dentro de los residuos 1-7 de A β . En algunos procedimientos, el anticuerpo se une específicamente a un epítopo dentro de los residuos 3-7 de A β . En algunos procedimientos, el anticuerpo se une específicamente a un epítopo dentro de los residuos 1-3 de A β . En algunos procedimientos, el anticuerpo se une específicamente a un epítopo dentro de los residuos 1-4 de A β . En algunos procedimientos, el anticuerpo se une a un epítopo que comprende un residuo N-terminal libre de A β . En algunos procedimientos, el anticuerpo se une a un epítopo dentro de los residuos de 1-10 de A β donde el residuo 1 y/o residuo 7 de A β es ácido aspártico. En algunos procedimientos, el anticuerpo se une específicamente a un péptido sin unirse a la proteína precursora de amiloide de longitud completa (APP). En algunos métodos, el isotipo del anticuerpo es IgG1 humano.

En algunos procedimientos, el anticuerpo se une a un depósito amiloide en el paciente e induce una respuesta de eliminación contra el depósito amiloide. Por ejemplo, tal respuesta de eliminación puede realizarse por fagocitosis mediada por receptor de Fc.

Los métodos se pueden utilizar tanto en pacientes asintomáticos y aquellos que actualmente muestran síntomas de la enfermedad. El anticuerpo utilizado en tales métodos puede ser un anticuerpo humano, humanizado, químérico o no humano y puede ser monoclonal o policlonal. En algunos métodos, el anticuerpo se prepara a partir de un humano inmunizado con péptido A β , siendo este humano el paciente a tratar con anticuerpo. En algunos procedimientos, el anticuerpo se administra con un portador farmacéutico como una composición farmacéutica. En algunos métodos, el anticuerpo se administra a una dosis de 0,0001 a 100 mg/kg, preferiblemente, al menos un anticuerpo de peso corporal de 1 mg/kg. En algunos procedimientos, el anticuerpo se administra en múltiples dosis durante un período prolongado, por ejemplo, de al menos seis meses. En algunos procedimientos, el anticuerpo se administra como una composición de liberación sostenida. El anticuerpo se puede administrar, por ejemplo, por vía intraperitoneal, oral, subcutánea, intracraeal, intramuscular, tópica, intranasal o intravenosa.

En algunos procedimientos, el anticuerpo se administra por administración de un polinucleótido que codifica al menos una cadena de anticuerpo al paciente. El polinucleótido se expresa para producir la cadena de anticuerpo en el paciente. Opcionalmente, el polinucleótido codifica cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo. El polinucleótido se expresa para producir las cadenas pesadas y ligeras en el paciente. En algunos métodos, el paciente se controla para el nivel de anticuerpo administrado en la sangre del paciente.

En otro aspecto, la descripción proporciona métodos para prevenir o tratar una enfermedad asociada con depósitos amiloideos de A β en el cerebro del paciente. Por ejemplo, los métodos se pueden utilizar para tratar la enfermedad de Alzheimer o el síndrome de Down o deterioro cognitivo. Tales métodos implican la administración de fragmentos de A β o análogos de los mismos que provocan una respuesta inmunogénica contra ciertos epítopos dentro de A β . Algunos métodos implicarían la administración a un paciente de una dosificación eficaz de un polipéptido que comprende un segmento N-terminal de al menos los residuos 1-5 de A β , el primer residuo de A β siendo el residuo N-terminal del polipéptido, donde el polipéptido está libre de un segmento C-terminal 1-5 de A β . Algunos métodos implican la administración a un paciente de una dosificación eficaz de un polipéptido que comprende un segmento N-terminal de A β , el segmento comienza en el residuo 1-3 de A β y terminando en los residuos 7-11 de A β . Algunos métodos implican la administración a un paciente de una dosificación eficaz de un agente que induce una respuesta inmunogénica contra un segmento N-terminal de A β , el segmento comienza en el residuo 1-3 de A β y terminando en residuos 7-11 de A β sin inducir una respuesta inmunogénica contra un epítopo dentro de los residuos 12-43 de A β 43.

En algunos de los métodos anteriores, el segmento N-terminal de A β está vinculado a su C-término a un polipéptido heterólogo. En algunos de los métodos anteriores, el segmento N-terminal de A β está vinculado en su N-término a un polipéptido heterólogo. En algunos de los métodos anteriores, el segmento N-terminal de A β está unido en sus terminales N y C a un primer y segundo polipéptido heterólogo. En algunos de los métodos anteriores, el segmento N-terminal de A β está unido en su extremo N-terminal con un polipéptido heterólogo, y en su C-término al menos una copia adicional del segmento N-terminal. En algunos de los métodos anteriores, el polipéptido heterólogo y de este modo una respuesta de células B contra el segmento N-terminal. En algunos de los métodos anteriores, el polipéptido comprende además al menos una copia adicional del segmento N-terminal. En algunos de los métodos anteriores, el polipéptido comprende N-término a C-término, el segmento N-terminal de A β , una pluralidad de copias adicionales del segmento N-terminal, y el segmento de aminoácido heterólogo. En algunos de los métodos

anteriores, el segmento N-terminal consiste en A β 1-7. En algunos de los métodos anteriores, el segmento N-terminal consiste en A β 3-7.

5 En algunos procedimientos, el fragmento está libre de al menos el 5 aminoácidos C-terminales en A β 43. En algunos procedimientos, el fragmento comprende hasta 10 aminoácidos contiguos de A β . Los fragmentos se administran típicamente en más de 10 microgramos por dosis por paciente.

10 En algunos procedimientos, el fragmento se administra con un adyuvante que potencia la respuesta inmunitaria al péptido A β . El adyuvante y el fragmento pueden ser administrados en cualquier orden o juntos como una composición. El adyuvante puede ser, por ejemplo, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, MPLTM, QS-21 (StimulonTM) o adyuvante incompleto de Freund.

15 La descripción proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden fragmentos de A β u otros agentes que desencadenan la respuesta inmunogénica a los mismos epítopos de A β , tal como se describe anteriormente, y un adyuvante. La invención proporciona también composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos como se definen en las reivindicaciones y un portador farmacéuticamente aceptable.

20 En otro aspecto, la descripción proporciona métodos de cribado de un anticuerpo para la actividad en el tratamiento de una enfermedad asociada con depósitos de A β en el cerebro de un paciente (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer). Tales métodos implican poner en contacto el anticuerpo con un polipéptido que comprende al menos cinco aminoácidos contiguos de un segmento N-terminal de A β que comienza en el residuo entre 1 y 3 de la A β , siendo el polipéptido libre de un segmento C-terminal de A β . Uno determina entonces si el anticuerpo se une específicamente al polipéptido, proporcionando la unión específica una indicación de que el anticuerpo tiene actividad en el tratamiento de la enfermedad.

25 En otro aspecto, la descripción proporciona métodos de cribado de un anticuerpo para la actividad en la limpieza de una entidad biológica asociada a antígeno. Tales métodos implican la combinación de la entidad biológica asociada a antígeno y el anticuerpo y células fagocíticas que llevan receptores de Fc en un medio. Se supervisa entonces la cantidad de la entidad biológica asociada a antígeno que queda en el medio. Una reducción en la cantidad de la entidad biológica asociada a antígeno indica el anticuerpo tiene actividad de eliminación contra la entidad biológica asociada a antígeno. El antígeno puede proporcionarse como una muestra de tejido o en forma aislada. Por ejemplo, el antígeno se puede proporcionar como una muestra de tejido del cerebro de un paciente con enfermedad de Alzheimer o un animal mamífero que tiene la patología de Alzheimer. Otras muestras de tejido contra el que los anticuerpos pueden ensayarse para la actividad de eliminación incluyen muestras cancerosas de tejidos, muestras de tejidos infectadas por virus, comprendiendo las muestras de tejido células inflamatorias, tumores anormales en las células no malignas, o muestras de tejidos que comprenden una matriz extracelular anormal.

30 En otro aspecto, la descripción proporciona métodos para detectar un depósito amiloide en un paciente. Tales métodos implican la administración al paciente de un anticuerpo que se une específicamente a un epítope dentro de los aminoácidos 1-10 de A β , y detectan la presencia del anticuerpo en el cerebro del paciente. En algunos procedimientos, el anticuerpo se une a un epítopo dentro de los residuos 4-10 de A β . En algunos procedimientos, el anticuerpo está marcado con una etiqueta paramagnética y se detecta por tomografía de resonancia magnética nuclear.

35 45 La descripción proporciona además kits de diagnóstico adecuados para su uso en los métodos anteriores. Dicho kit comprende un anticuerpo que se une específicamente a un epítope con los restos 1-10 de A β . Algunos kits llevan una etiqueta que describe el uso del anticuerpo para el diagnóstico *in vivo* o un control de la enfermedad de Alzheimer.

50 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIG. 1: El título de anticuerpos tras la inyección de ratones transgénicos con A β -142.

55 FIG. 2: La carga de amiloide en el hipocampo. El porcentaje de la zona de la región del hipocampo ocupada por placas amiloides, definidas por reactividad con el anticuerpo monoclonal 3D6 de A β específico, se determinó por análisis de imagen cuantitativa asistida por ordenador de secciones de cerebro inmunoreaccionadas. Los valores para los ratones individuales se muestran clasificados por grupo de tratamiento. La línea horizontal para cada agrupación indica el valor mediano de la distribución.

60 FIG. 3: Distrofia neurítica en el hipocampo. El porcentaje del área de la región del hipocampo ocupada por neuritas distróficas, definida por su reactividad con el 8E5 monoclonal APP-específico humano, se determinó por análisis de imagen asistida por ordenador cuantitativa de secciones de cerebro inmunoreaccionadas. Los valores para los ratones individuales se muestran para el grupo tratado por AN1792 y el grupo de control tratado por PBS. La línea horizontal para cada agrupación indica el valor de la mediana de la distribución.

65 FIG. 4: Astrocitosis en la corteza retroesplenial. El porcentaje del área de la región cortical ocupada por

astrocitos (GFAP)-positivos de proteína ácida fibrilar glial se determinó por análisis de imagen cuantitativa asistida por ordenador de secciones del cerebro inmunoreaccionadas. Los valores para los ratones individuales se muestran clasificados por el grupo de tratamiento y los valores de grupo mediano se indican mediante líneas horizontales.

5 FIG. 5: Títulos de anticuerpos de media geométrica a A β 1-42 después de la inmunización con una gama de ocho dosis de AN1792 que contiene 0,14, 0,4, 1,2, 3,7, 11, 33, 100, o 300 μ g.

10 FIG. 6: Cinética de la respuesta de anticuerpos a inmunización de AN1792. Los títulos son expresados como medias geométricas de los valores para los 6 animales en cada grupo.

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

20 FIG. 8: Análisis cuantitativo de imágenes de la carga de placa neurítica en ratones tratados con PBS y AN1792.

25 FIG. 9: Análisis cuantitativo de imágenes del porcentaje de la corteza retroesplénial ocupada por astrocitosis en ratones tratados por PBS y AN1792.

30 FIG. 10: Ensayo de proliferación de linfocitos en células de bazo de (panel superior) tratado por AN1792 o (panel inferior) tratado por PBS.

35 FIG. 11: Niveles totales de A β en la corteza. Un diagrama de dispersión de perfiles individuos de A β en ratones inmunizados con derivados A β o APP combinados con adyuvante de Freund.

40 FIG. 12: Carga de amiloide en la corteza se determinó por análisis cuantitativo de imágenes de secciones de cerebro inmunoreaccionadas para los ratones inmunizados con los conjugados de péptido A β A β 1-5, A β 1-12 EA, y A β 13-28; los agregados de A β de longitud completa AN1792 (A β 1-42) y AN1528 (A β 1-40) y el grupo de control tratado por PBS.

45 FIG. 13: Títulos medios geométricos de anticuerpos A β -específicos para grupos de ratones inmunizados con derivados de A β o APP combinadas con adyuvante de Freund.

50 FIG. 14: Títulos medios geométricos de anticuerpos A β -específicos para grupos de cobayas inmunizadas con AN1792, o un derivado palmitoilado del mismo, combinado con diferentes adyuvantes.

55 FIG. 15 (AE): Los niveles de A β en la corteza de ratones PDAPP de 12 meses de edad tratados con AN1792 o AN1528 con diferentes adyuvantes.

60 FIG. 16: Título medio de los ratones tratados con el anticuerpo políclonal a A β .

65 FIG. 17: Título de ratones tratados con anticuerpo monoclonal 10D5 a A β .

70 FIG. 18: Título de ratones tratados con anticuerpo monoclonal 2F12 a A β .

75 FIG. 19: Mapa de epítopos: Respuesta de N-terminal restringida. Suero de día 175 de monos cynomolgus se ensayó por ELISA contra una serie de péptidos de solapamiento 10-mer que cubren la secuencia completa de AN1792. Número animal F10920M muestra una respuesta restringida N-terminal representativa al péptido DAEFRHDSGY que abarca los aminoácidos 1-10 del péptido AN1792 que se utilizó como antígeno inmunizante.

80 FIG. 20: Mapa de epítopos: Respuesta N-terminal no restringida. Suero de día 175 de monos cynomolgus se ensayó mediante ELISA frente a una serie de péptidos superpuestos 10-mer que cubren la secuencia completa AN1792. El número animal F1097SF muestra una respuesta N-terminal no restringida representativa. La reactividad se ve contra los dos péptidos N-terminales y un péptido C-terminal al péptido DAEFRHDSGY que cubre los aminoácidos 1-10 del péptido AN1792.

DEFINICIONES

85 El término "identidad sustancial" significa que dos secuencias peptídicas, cuando se alinean de manera óptima, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando pesos de hueco por defecto, comparten al menos 65 por ciento de identidad de secuencia, preferiblemente al menos identidad de secuencia de 80 o 90 por ciento, más preferiblemente al menos identidad de secuencia 95 por ciento o más (por ejemplo, identidad de secuencia de 99 por ciento o más). Preferiblemente, las posiciones de residuos que no son idénticas difieren por sustituciones de aminoácidos conservativos.

90 Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como secuencia de referencia, a la

que las secuencias de prueba se comparan. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un ordenador, las coordenadas de subsecuencia se designan, si es necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencia. El algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de secuencia de identidad de la secuencia de prueba con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa designados.

La alineación óptima de secuencias para la comparación puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970), por el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. EE.UU.* 85: 2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFTT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección visual (véase generalmente Ausubel *et al.*, *supra*). Un ejemplo de algoritmo que es adecuado para la determinación de por ciento de identidad de secuencia y similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990). El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Típicamente, los parámetros del programa por defecto se pueden utilizar para realizar la comparación de secuencias, aunque también pueden usarse parámetros personalizados. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 89, 10915 (1989)).

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

Los agentes terapéuticos de la invención son típicamente sustancialmente puros a partir de contaminante no deseado. Esto significa que un agente es típicamente al menos aproximadamente 50% de pureza p/p (peso/peso), así como proteínas interferentes sustancialmente libres y contaminantes. A veces los agentes tienen al menos aproximadamente 80% p/p y, más preferiblemente al menos pureza de 90% o aproximadamente 95% p/p. Sin embargo, usando técnicas de purificación de proteínas convencionales, los péptidos homogéneos de al menos el 99% p/p puede obtenerse.

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

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

APP⁶⁹⁵, APP⁷⁵¹, y APP⁷⁷⁰ se refieren, respectivamente, a polipéptidos largos de residuo de aminoácidos 695, 751, y 770 codificados por el gen APP humano. Véase Kang *et al.*, *Nature* 325, 773 (1987); Ponte *et al.*, *Nature* 331, 525 (1988); y Kitaguchi *et al.*, *Nature* 331, 530 (1988). A los aminoácidos dentro de la proteína precursora de amiloide humano (APP) se les asignan números según la secuencia de la isoforma APP770. Términos tales como A β 39, A β 40, A β 41, A β 42 y A β 43 se refieren a un péptido A β que contiene residuos de aminoácido 1-39, 1-40, 1-41, 1-42 y 1-43.

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

El término "epítopo" o "determinante antigenético" se refiere a un sitio en un antígeno al que responden células B y/o T. Epítopos de células B se pueden formar tanto a partir de aminoácidos contiguos o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por el plegamiento terciario de una proteína. Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos típicamente se retienen en la exposición a disolventes desnaturalizantes mientras que los epítopos formados por el plegamiento terciario típicamente se pierden en el tratamiento con disolventes desnaturalizantes. Un epítopo incluye normalmente al menos 3, y más habitualmente, al menos 5 o 8-10 aminoácidos en una conformación

espacial única. Los métodos para determinar la conformación espacial de los epítopos incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos X y la resonancia magnética nuclear 2-dimensional. Véase, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996). Los anticuerpos que reconocen el mismo epítopo pueden identificarse en un inmunoensayo simple que muestra la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana. Células T reconocen epítopos continuos de aproximadamente nueve aminoácidos para las células CD8 o aproximadamente 13-15 aminoácidos para las células CD4. Las células T que reconocen el epítopo pueden identificarse mediante ensayos *in vitro* que miden la proliferación dependiente de antígenos, como se determina por incorporación de ³H-timidina por las células T cebadas en respuesta a un epítopo (Burke *et al.*, *J. Inf. Dis.* 170, 1110-19 (1994)), mediante matanza dependiente de antígeno (Cytotoxic T Lymphocyte Assay, Tigges *et al.*, *J. Immunol.* 156, 3901-3910), o por la secreción de citoquinas.

El término respuesta "inmunológica" o "inmunológica" es el desarrollo de una respuesta humoral beneficiosa (anticuerpo mediado) y/o una respuesta celular (mediada por células T de antígeno específico o sus productos de secreción) dirigida contra un péptido amiloide en un paciente receptor. Tal respuesta puede ser una respuesta activa inducida por la administración de inmunógeno o una respuesta pasiva inducida por la administración de anticuerpo o células T cebadas. Una respuesta inmune celular se provoca por la presentación de epítopos polipeptídicos en asociación con moléculas de MHC de clase I o clase II para activar las células T auxiliares CD4⁺ de antígeno específico y/o células T citotóxicas CD8⁺. La respuesta también puede implicar la activación de monocitos, macrófagos, células NK, basófilos, células dendríticas, astrocitos, células de microglia, eosinófilos u otros componentes de la inmunidad innata. La presencia de una respuesta inmunológica mediada por células puede determinarse mediante ensayos de proliferación (células T CD4⁺) o ensayos CTL (linfocitos T citotóxicos) (véase Burke, *supra*; Tigges, *supra*). Las contribuciones relativas de las respuestas humoral y celular al efecto protector o terapéutico de un inmunógeno puede distinguirse aislando separadamente anticuerpos y células T de un animal singénico inmunizado y midiendo el efecto protector o terapéutico en un segundo sujeto.

Un "agente inmunogénico" o "inmunógeno" es capaz de inducir una respuesta inmunológica contra sí misma en la administración a un mamífero, opcionalmente en conjunto con un adyuvante.

El término "polinucleótido desnudo" se refiere a un polinucleótido no complejado con materiales coloidales. Los polinucleótidos desnudos a veces se cloran en un vector plásmido.

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

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

$\text{A}\beta$ desagregado o monomérico significa unidades peptídicas monoméricas solubles de $\text{A}\beta$. Un método para preparar $\text{A}\beta$ monomérico consiste en disolver péptido liofilizado en DMSO puro con sonicación. La solución resultante se centrifuga para eliminar cualquier partícula insoluble. $\text{A}\beta$ agregada es una mezcla de oligómeros en los que las unidades monoméricas son mantenidas juntas mediante enlaces no covalentes.

La competencia entre anticuerpos se determina mediante un ensayo en el que la inmunoglobulina bajo ensayo inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común, tal como $\text{A}\beta$. Se conocen numerosos tipos de ensayos de unión competitiva, por ejemplo: radioinmunoensayo en fase sólida directo o indirecto (RTA), en fase sólida de inmunoensayo enzimático directo o indirecto (ETA), ensayo de competición de sandwich (véase Stahli *et al.*, *Methods in Enzymology* 9: 242-253 (1983)); biotinavidina directa en fase sólida EIA (véase Kirkland *et al.*, *J. Immunol.* 137: 3614-3619 (1986)); ensayo de marcado directo en fase sólida, ensayo sandwich marcado directo en fase sólida (véase Harlow y Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press (1988)); marcador directo RIA en fase sólida usando etiqueta I-125 (véase Morel *et al.*, *Molec Immunol* 25 (1): 7-15 (1988)); biotinavidin de fase sólida directa EIA (Cheung *et al.*, *Virology* 176: 546-552 (1990)); y RIA etiquetado directo (Moldenhauer *et al.*, *Scand J. Immunol* 32: 77-82 (1990)). Típicamente, tal ensayo implica el uso de antígeno purificado unido a una superficie sólida o células que llevan cualquiera de estos, una inmunoglobulina de ensayo no marcada y una inmunoglobulina de referencia marcada. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de marcador unido a la superficie sólida o las células en presencia de la inmunoglobulina de ensayo. Por lo general, la inmunoglobulina de ensayo está presente en exceso. Los anticuerpos identificados por el ensayo de competición (anticuerpos que compiten) incluyen anticuerpos que se unen al mismo epítopo como el anticuerpo de referencia y anticuerpos que se unen a un epítopo adyacente suficientemente próximo al epítopo unido por el anticuerpo de referencia para el impedimento estérico que se produzca. Por lo general, cuando un anticuerpo competitivo está presente en exceso, inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común en al menos 50 o 75%.

Las composiciones o métodos "que comprenden" uno o más elementos recitados pueden incluir otros

elementos no enumerados específicamente. Por ejemplo, una composición que comprende péptido A β que abarca tanto un péptido aislado A β y péptido A β como un componente de una secuencia polipeptídica más grande.

5 DESCRIPCIÓN DETALLADA

I. General

10 Varias enfermedades y condiciones amiloidogénicas se caracterizan por la presencia de depósitos de un péptido agregado a una masa insoluble en el cerebro de un paciente. Tales enfermedades incluyen la enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down y deterioro cognitivo. Este último es un síntoma de la enfermedad de Alzheimer y el síndrome de Down, pero también puede suceder sin otras características de cualquiera de estas enfermedades. Por ejemplo, deterioro cognitivo leve o pérdida de memoria asociada a edad se produce en algunos pacientes que no han desarrollado todavía, o puede que nunca desarrollen la enfermedad de Alzheimer completa. El deterioro cognitivo leve puede ser definido por puntuación en el Examen de Estado Mini-Mental de conformidad con la convención. Tales enfermedades se caracterizan por agregados de A β que tienen una estructura de lámina β -plegado y tinción con el colorante Congo Rojo. El enfoque básico de la prevención o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer u otras enfermedades amiloidogénicas mediante la generación de una respuesta inmunogénica a un componente del depósito de amiloide en un paciente se describe en el documento WO 99/27944. La presente solicitud se reitera y confirma la eficacia del enfoque básico. La presente solicitud está, sin embargo, dirigida principalmente a la mejora de reactivos y métodos. Estas mejoras se basan, en parte, en que los presentes inventores han localizado los epítopos preferidos dentro de A β contra los cuales una respuesta inmunogénica debe dirigirse. La identificación de epítopos preferidos dentro de A β resulta en agentes y métodos que han aumentado la eficacia, potencial reducido de efectos secundarios, y/o una mayor facilidad de fabricación, formulación y administración.

25 II. Agentes terapéuticos

30 Una respuesta inmunogénica puede ser activa, como cuando un inmunógeno es administrado para inducir anticuerpos reactivos con A β en un paciente, o pasiva, como cuando se administra un anticuerpo que se une a A β en un paciente.

1. Agentes inductores de respuesta inmune activa

35 Los agentes terapéuticos inducen una respuesta inmunogénica dirigida específicamente a determinados epítopos dentro de péptidos A β . Los agentes preferidos son el péptido A β en sí y los segmentos de los mismos. Las variantes de tales segmentos, análogos y miméticos de péptido A β natural que inducen y/o reaccionan de forma cruzada con anticuerpos frente a los epítopos preferidos de A β péptido también pueden utilizarse.

40 A β , 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 aminoácidos, que es el componente principal de placas características de la enfermedad de Alzheimer. A β se genera por el procesamiento de una proteína más grande APP por dos enzimas, denominadas secretasas β y γ (véase Hardy, TINS 20, 154 (1997)). Mutaciones conocidas en APP asociadas con la enfermedad de Alzheimer se producen próxima al lugar de secretasa β o γ , o dentro de A β . Por ejemplo, la posición 717 está próxima al sitio de escisión de γ -secretasa de APP en su procesamiento a A β , y posiciones 670/671 están próximas al sitio de escisión de β -secretasa. Se cree que las mutaciones que causan EA mediante la interacción con las reacciones de escisión por las cuales se forma A β con el fin de aumentar la cantidad de la forma de aminoácido 42/43 de A β generado.

50 A β tiene la propiedad inusual de que se pueda fijar y activar tanto cascadas de complemento alternativo como clásico. 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 las células B. Además, C3bi se deshace adicionalmente y entonces se une a CR2 en las células B de una manera dependiente de células T que conduce a un aumento de 10.000 en la activación de estas células. Este mecanismo hace que A β genere una respuesta inmunitaria en exceso de la de los otros antígenos.

55 A β tiene varias formas de origen natural. Las formas humanas de A β se denominan A β 39, A β 40, A β 41, A β 42 y A β 43. Las secuencias de estos péptidos y su relación con el precursor APP se ilustran mediante la FIG. 1 de Hardy *et al.*, TINS 20, 155-158 (1997). Por ejemplo, A β 42 tiene la secuencia:

60 H2N-Asp-Ala-Glu-Phc-Arg-His-Asp-Scr-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala-OH.

65 A β 41, A β 40 y A β 39 difieren de A β 42 por la omisión de Ala, Ala-Ile, y Ala-Ile-Val respectivamente desde el extremo C-terminal. A β 43 difiere de A β 42 por la presencia de un residuo de treonina en el C-término. Los fragmentos inmunogénicos de A β son ventajosos con respecto a la molécula intacta en los presentes métodos para varias razones. En primer lugar, debido a que sólo ciertos epítopos dentro de A β inducen una respuesta

inmunogénica útil para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, una dosificación igual de masa de un fragmento que contiene tales epítopos proporciona una mayor concentración molar de los epítopos inmunogénicos útiles que una dosis de A β intacta. En segundo lugar, ciertos fragmentos inmunogénicos de A β generan una respuesta inmunogénica contra los depósitos amiloideos sin generar una respuesta inmunogénica significativa contra la proteína APP de la cual se deriva A β . En tercer lugar, los fragmentos de A β son más fáciles de fabricar que A β intacta debido a su tamaño más corto. En cuarto lugar, los fragmentos de A β no se agregan de la misma manera como A β intacta, lo que simplifica la preparación de composiciones farmacéuticas y administración de los mismos. Algunos fragmentos inmunogénicos de A β tienen una secuencia de al menos 2, 3, 5, 6, 10 o 20 aminoácidos contiguos de un péptido natural. Algunos fragmentos inmunogénicos no tienen más de 10, 9, 8, 7, 5 ó 3 residuos contiguos de A β . Se prefieren fragmentos de la mitad N-terminal de A β . Fragmentos inmunogénicos preferidos incluyen A β 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 3-7, 1-3, y 1-4. La designación de A β 15 por ejemplo, indica un fragmento que incluye los residuos 1-5 de A β y que carecen de otros residuos de A β . Se prefieren particularmente los fragmentos que comienzan en los residuos 1-3 de A β y que terminan en los residuos 7-11 de A β . El fragmento A β 1-12 también se puede utilizar, pero es menos preferido. En algunos procedimientos, el fragmento es un fragmento N-terminal distinto de A β 1-10. Otros fragmentos menos preferidos incluyen A β 13-28, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40 y 35-42. Estos fragmentos requieren la detección de actividad en la limpieza o la prevención de depósitos amiloideos como se describe en los Ejemplos antes del uso. Los fragmentos que carecen de al menos uno, y algunas veces al menos 5 o 10 aminoácidos C-terminales presentes en formas naturales de A β se utilizan en algunos de los métodos. Por ejemplo, un fragmento que carece de 5 aminoácidos del extremo C-terminal de A β 43 incluye los primeros 38 aminoácidos del extremo N-terminal de A β . Otros componentes de las placas de amiloide, por ejemplo, fragmentos de sinucleína, y epítópicas de los mismos también se pueden usar para inducir una respuesta inmunogénica.

A menos que se indique lo contrario, la referencia a A β incluye las secuencias de aminoácidos humanas naturales indicadas anteriormente, así como análogos incluyendo alélico, especies y variantes inducidas. Los análogos típicamente difieren de los péptidos de origen natural en uno, dos o unas pocas posiciones, a menudo en virtud de sustituciones conservadoras. Los análogos presentan típicamente al menos 80 o 90% de identidad de secuencia con los péptidos naturales. Algunos análogos también incluyen aminoácidos no naturales o modificaciones de aminoácidos N o C-terminales de en una, dos o unas pocas posiciones. Por ejemplo, el residuo de ácido aspártico en la posición natural de 1 y/o 7 de A β puede reemplazarse con ácido isoaspártico. Ejemplos de aminoácidos no naturales son D-aminoácidos, α , α -aminoácidos disustituidos, aminoácidos N-alquilo, ácido láctico, 4-hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetillisina, ϵ -N-acetillisina, O-fososerina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, ω -N-metilarginina, y ácido isoaspártico. Los fragmentos y análogos se pueden cribar para la eficacia profiláctica o terapéutica en modelos de animales transgénicos en comparación con los controles no tratados o placebo como se describe a continuación.

A β , sus fragmentos, y análogos pueden ser sintetizados por síntesis de péptidos en fase sólida o expresión recombinante, o pueden obtenerse de fuentes naturales. sintetizadores de péptidos automáticos están disponibles comercialmente de numerosos proveedores, tales como Applied Biosystems, Foster City, California. La expresión recombinante puede ser en bacterias, tales como *E. coli*, levadura, células de insecto o células de mamífero. Procedimientos para expresión recombinante son descritos por Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (C.S.H.P. Press, NY 2^a ed., 1989). Algunas formas de péptido A β también están disponibles comercialmente (por ejemplo, American Peptides Company, Inc., Sunnyvale, CA y California Peptide Research, Inc. Napa, CA).

Los agentes terapéuticos también incluyen polipéptidos más largos que incluyen, por ejemplo, un fragmento activo de un péptido, junto con otros aminoácidos. Por ejemplo, los agentes preferidos incluyen proteínas de fusión que comprenden un segmento de A β fusionado a una secuencia heteróloga de aminoácidos que induce una respuesta de células T auxiliares en contra de la secuencia de aminoácidos heterólogos y de este modo una respuesta de células B contra el segmento A β . Tales polipéptidos pueden ser examinados para la eficacia profiláctica o terapéutica en modelos animales en comparación con los controles no tratados o placebo como se describe a continuación. El péptido A β , análogo, fragmento activo u otro polipéptido que se pueden administrar en forma asociada o multimérica o en forma disociada. Agentes terapéuticos también incluyen multimeros de agentes inmunogénicos monoméricos.

En una variación adicional, un péptido inmunogénico, tal como un fragmento de A β , se puede presentar por un virus o una bacteria como parte de una composición inmunogénica. Un ácido nucleico que codifica el péptido inmunogénico se incorpora en un genoma o episoma del virus o bacterias. Opcionalmente, el ácido nucleico se incorpora de una manera tal que el péptido inmunogénico se expresa como una proteína secretada o como una proteína de fusión con una proteína de la superficie externa de un virus o una proteína transmembrana de una bacteria para que se muestre el péptido. Los virus o bacterias usadas en tales métodos deben ser no patógenos o atenuados. Virus adecuados incluyen adenovirus, HSV, virus de la encefalitis equina venezolana y otros virus alfa, virus de la estomatitis vesicular, y otros virus rabdo, vaccinia y viruela aviar. Las bacterias adecuadas incluyen salmonella y shigella. La fusión de un péptido inmunogénico a HBsAg de VHB es particularmente adecuada. Los agentes terapéuticos también incluyen péptidos y otros compuestos que no tienen necesariamente una similitud de secuencia de aminoácidos significativa con A β pero no obstante sirven como miméticos de A β e inducen una respuesta inmune similar. Por ejemplo, cualesquiera péptidos y proteínas que forman hojas β -plegadas pueden examinarse para determinar su idoneidad. Anticuerpos antiidiotípicos contra anticuerpos monoclonales para A β u

otros péptidos amiloidogénicos también se pueden utilizar. Tales anticuerpos anti-Id imitan el antígeno y generan una respuesta inmune (véase *Essential Immunology* (Roit ed., Blackwell Scientific Publications, Palo Alto, 6^a ed.), p. 181). Los agentes distintos de péptidos A β deben inducir una respuesta inmunogénica contra uno o más de los segmentos preferidos de A β enumerados anteriormente (por ejemplo, 1-10, 1-7, 1-3, y 3-7). Preferiblemente, tales agentes inducen una respuesta inmunogénica que se dirige específicamente a uno de estos segmentos sin ser dirigidos a otros segmentos de A β .

5 Bibliotecas aleatorias de péptidos u otros compuestos también pueden examinarse para determinar su idoneidad. Las bibliotecas combinatorias se pueden producir para muchos tipos de compuestos que se pueden sintetizar de una manera paso por paso. Tales compuestos incluyen polipéptidos, miméticos beta, polisacáridos, 10 fosfolípidos, hormonas, prostaglandinas, esteroides, compuestos aromáticos, compuestos heterocíclicos, benzodiazepinas, glicinas oligoméricas N-sustituidas y oligocarbamatos. Las grandes bibliotecas combinatorias de los compuestos pueden ser construidas por el método de bibliotecas codificadas sintéticas (ESL) descrito en 15 Affymax, WO 95/12608, Affymax, documento WO 93/06121, Universidad de Columbia, documento WO 94/08051, Pharmacopeia, documento WO 95/35503 y Scripps, WO 95/30642. Las bibliotecas de péptidos también pueden generarse mediante métodos de presentación de fagos. Véase, por ejemplo, Devlin, documento WO 91/18980.

20 Las bibliotecas combinatorias y otros compuestos se examinan inicialmente para idoneidad mediante la determinación de su capacidad para unirse a anticuerpos o linfocitos (B o T) conocidos por ser específicos para A β u otros péptidos amiloidogénicos. Por ejemplo, revisiones iniciales se pueden realizar con cualquier suero polyclonal o anticuerpo monoclonal a A β o un fragmento del mismo. Los compuestos pueden entonces ser examinados para la unión a un epítopo específico dentro de A β (por ejemplo, 1-10, 1-7, 1-3, 1-4, 1-5 y 3-7). Los compuestos pueden ser probados por los mismos procedimientos descritos para las especificidades de epítopo de anticuerpo de mapeo. Los 25 compuestos identificados por tales revisiones se analizan entonces adicionalmente por la capacidad para inducir anticuerpos o linfocitos reactivos a A β o fragmentos de los mismos por ejemplo, múltiples diluciones de los sueros se pueden ensayar en placas de microtitulación que han sido recubiertas previamente con A β o un fragmento del mismo y un ELISA estándar puede ser realizada para la prueba de anticuerpos reactivos a A β o el fragmento. Los 30 compuestos pueden ser examinados para la eficacia profiláctica y terapéutica en animales transgénicos predispuestos a una enfermedad amiloidogénica, tal como se describe en los Ejemplos. Tales animales incluyen, por ejemplo, ratones que portan una mutación 717 de APP descrita por Games *et al.*, Supra, y los ratones que llevan una mutación sueca 670/671 de APP tal como se describe por McConlogue *et al.*, US 5.612.486 y Hsiao *et al.*, 35 *Science* 274, 99 (1996); Staufenbiel *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 94, 13287-13292 (1997); Sturchler-Pierrat *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 94, 13287-13292 (1997); Borchelt *et al.*, *Neuron* 19, 939 945 (1997). El mismo enfoque de detección se puede utilizar en otros agentes potenciales análogos de A β y péptidos más largos que incluyen fragmentos de la A β , descritos anteriormente.

2. Agentes inductores de respuesta inmune pasiva

40 Agentes terapéuticos de la invención también incluyen anticuerpos que se unen específicamente a A β , como se define en las reivindicaciones. Los agentes terapéuticos de la divulgación también incluyen anticuerpos que se unen específicamente a otros componentes de placas amiloides. Tales anticuerpos pueden ser monoclonales o polyclonales. Algunos de tales anticuerpos se unen específicamente a la forma agregada de A β sin unirse a la forma 45 disociada. Algunos se unen específicamente a la forma disociada sin unirse a la forma agregada. Algunos se unen a ambas formas agregadas y disociadas. Algunos de tales anticuerpos se unen a una forma corta natural de A β (es decir, A β 39, 40 o 41) sin unirse a una forma larga natural de A β (es decir, A β 42 y A β 43). Algunos anticuerpos se unen a una forma larga sin unirse a una forma corta. Algunos anticuerpos se unen a A β sin unirse a la proteína precursora amiloide de longitud completa. Los anticuerpos utilizados en los métodos terapéuticos por lo general 50 tienen una región constante intacta o al menos suficiente de la región constante para interaccionar con un receptor de Fc. IgG1 de isotipo humano es preferido debido a que tiene mayor afinidad de los isotipos humanos por el receptor FcRI en células fagocíticas. Fragmentos biespecíficos Fab también se pueden utilizar, en el que un brazo del anticuerpo tiene especificidad para A β , y el otro para un receptor de Fc. Algunos anticuerpos se unen a A β con una afinidad de unión mayor que o igual a aproximadamente 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹, o 10¹⁰ M⁻¹.

55 Los sueros polyclonales típicamente contienen poblaciones mixtas de anticuerpos que se unen a varios epítopos a lo largo de la longitud de A β . Sin embargo, los sueros polyclonales pueden ser específicos para un segmento particular de A β , tal como A β 1-10. Los anticuerpos monoclonales se unen a un epítopo específico dentro de A β que puede ser un epítopo conformacional o no conformacional. La eficacia profiláctica y terapéutica de anticuerpos puede ensayarse usando los procedimientos de modelo animal transgénico descritos en los Ejemplos. 60 Anticuerpos monoclonales preferidos se unen a un epítopo dentro de los residuos 1-10 de A β (con el primer residuo N-terminal de A β física designada 1). Algunos anticuerpos monoclonales preferidos se unen a un epítopo dentro de los aminoácidos 1-5, y algunos para un epítopo dentro de 5-10. Algunos anticuerpos preferidos se unen a epítopos dentro de los aminoácidos 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7 o 3-7. Algunos anticuerpos preferidos se unen a un epítopo a partir de los residuos 1-3 y terminando en los residuos 7-11 de A β . Anticuerpos menos preferidos incluyen los que se unen a epítopos con los residuos 10-15, 15-20, 25-30, 10-20, 20, 30, o 10-25 de A β . Se recomienda que tales anticuerpos 65 sean examinados para la actividad en el modelo de ratón descrito en los Ejemplos antes del uso. Por ejemplo, se ha encontrado que ciertos anticuerpos contra epítopos dentro de los residuos 10-18, 16-24, 18-21 y 33-42 carecen de

actividad. En algunos métodos, se utilizan múltiples anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión a epítopos diferentes. Tales anticuerpos se pueden administrar secuencialmente o simultáneamente. Los anticuerpos para los componentes amiloïdes distintos de A β también se pueden utilizar. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser dirigidos a la sinucleína de proteína asociada a amiloide.

Cuando se dice que un anticuerpo se une a un epítopo dentro de residuos especificados, tales como A β 1-5 por ejemplo, lo que se entiende es que el anticuerpo se une específicamente a un polipéptido que contiene los residuos especificados (es decir, A β 1-5 en este ejemplo). Tal anticuerpo no contacta necesariamente con cada residuo dentro de A β 1-5. Tampoco afecta necesariamente de modo significativo la afinidad de unión de cada sustitución o eliminación de aminoácido dentro de A β 1-5. La especificidad de epítopo de un anticuerpo puede determinarse, por ejemplo, formando una biblioteca de presentación en fagos en la que diferentes miembros presentan diferentes subsecuencias de A β . La biblioteca de presentación de fagos se selecciona a continuación para los miembros de unión específica a un anticuerpo bajo ensayo. Se aísla una familia de secuencias. Típicamente, una tal familia contiene una secuencia central común, y diversas longitudes de secuencias flanqueantes en los diferentes miembros. La secuencia central más corta que muestra unión específica al anticuerpo define el epítopo unido por el anticuerpo. Los anticuerpos también pueden ensayarse para determinar la especificidad de epítopo en un ensayo de competición con un anticuerpo cuya especificidad de epítopo ya se ha determinado. Por ejemplo, anticuerpos que compiten con el anticuerpo 3D6 para la unión a A β se unen al mismo o similar epítopo que 3D6, es decir, dentro de los residuos A β 1-5. Del mismo modo anticuerpos que compiten con el anticuerpo 10D5 se unen al mismo o similar epítopo, es decir, dentro de residuos de A β 3-6. La detección de anticuerpos de la especificidad de epítopo es un predictor útil de la eficacia terapéutica. Por ejemplo, un anticuerpo determinado que se une a un epítopo dentro de los residuos 1-7 de la A β es probable que sea eficaz en la prevención y tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Los anticuerpos monoclonales o policlonales que se unen específicamente a un segmento preferido de A β sin unirse a otras regiones de A β tienen un número de ventajas con respecto a anticuerpos monoclonales que se unen a otras regiones o sueros policlonales a A β intacta. En primer lugar, para dosificaciones de masa iguales, las dosificaciones de anticuerpos que se unen específicamente a segmentos preferidos contienen una dosis más alta molar de anticuerpos eficaces en la limpieza de placas de amiloide. En segundo lugar, los anticuerpos se unen específicamente a segmentos preferidos pueden inducir una respuesta de eliminación contra depósitos amiloïdes sin inducir una respuesta de eliminación contra polipéptido APP intacto, reduciendo de este modo el potencial de efectos secundarios.

i. Características generales de las inmunoglobulinas

La unidad estructural básica del anticuerpo es conocida por comprender un tetrámero de subunidades. Cada tetrámero está compuesto de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). La porción aminoterminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsables principalmente del reconocimiento del antígeno. La porción carboxiterminal de cada cadena define una región constante responsable principalmente de la función efectora. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta, o epsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas ligera y pesada, las regiones variable y constante se unen por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo la cadena pesada también una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más. (Véase en general, *Fundamental Immunology* (Paul, W., ed., 2^a ed., Raven Press, Nueva York, 1989), cap. 7.

Las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada forman el sitio de unión de anticuerpo. Por lo tanto, un anticuerpo intacto tiene dos sitios de unión. Salvo en anticuerpos bifuncionales o biespecíficos, los dos sitios de unión son los mismos. Todas las cadenas muestran la misma estructura general de regiones marco relativamente conservadas (FR) unidas por tres regiones hipervariables, también llamadas regiones determinantes de complementariedad o CDR. Las CDR de las dos cadenas de cada par están alineadas por las regiones marco, lo que permite la unión a un epítopo específico. De N-terminal a C-terminal, tanto cadenas ligeras como pesadas comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio está de acuerdo con las definiciones de Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 y 1991), o Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987); Chothia y colaboradores, *Nature* 342: 878-883 (1989).

ii. La producción de anticuerpos no humanos

La producción de anticuerpos no humanos monoclonales, por ejemplo, murino, cobaya, primate, conejo o rata, se puede lograr mediante, por ejemplo, inmunizando del animal con A β . Un polipéptido más largo que comprende A β o un fragmento inmunogénico de anticuerpos A β o antiidiotípicos a un anticuerpo a A β también se pueden utilizar. Véase Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (CSHP NY, 1988). Tal inmunógeno puede ser obtenido a partir de una fuente natural, mediante síntesis peptídica o mediante expresión recombinante. Opcionalmente, el inmunógeno puede administrarse fusionado o no complejado con una proteína portadora, tal como se describe a continuación. Opcionalmente, el inmunógeno puede administrarse con un adyuvante. Existen

varios tipos de adyuvante que pueden usarse como se describe a continuación. Adyuvante Completo de Freund seguido de adyuvante incompleto se prefiere para la inmunización de animales de laboratorio. Conejos o cobayas se utilizan típicamente para preparar anticuerpos policlonales. Los ratones se usan típicamente para preparar anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos se seleccionaron para la unión a A β . Opcionalmente, los anticuerpos se criban adicionalmente para la unión a una región específica de A β . Este último cribado puede llevarse a cabo mediante la determinación de la unión de un anticuerpo a una colección de mutantes de delección de un péptido A β y determinar qué mutantes de delección se unen al anticuerpo. La unión puede evaluarse, por ejemplo, mediante transferencia Western o ELISA. El fragmento más pequeño que muestra unión específica al anticuerpo define el epítopo del anticuerpo. Alternativamente, la especificidad de epítopo se puede determinar por un ensayo de competición en el que un anticuerpo de ensayo y de referencia compiten para la unión a A β . Si los anticuerpos de ensayo y de referencia compiten, a continuación, se unen al mismo epítopo o epítopos suficientemente proximales que la unión de un anticuerpo interfiere con la unión del otro. El isotipo preferido para tales anticuerpos es IgG2a de isotipo de ratón o isotipo equivalente en otras especies. IgG2a de isotipo de ratón es el equivalente de IgG1 de isotipo humano.

iii. Los anticuerpos químéricos y humanizados

Los anticuerpos químéricos y humanizados tienen la misma o similar especificidad de unión y afinidad como un ratón u otro anticuerpo no humano que proporciona el material de partida para la construcción de un anticuerpo químérico o humanizado. Los anticuerpos químéricos son anticuerpos cuya luz y genes de cadena pesada se han construido, típicamente por ingeniería genética, a partir de segmentos de genes de inmunoglobulina que pertenecen a diferentes especies. Por ejemplo, los segmentos variables (V) de los genes de un anticuerpo monoclonal de ratón pueden unirse a segmentos constantes humanos (C), tales como IgG1 e IgG4. Se prefiere IgG1 de isótipo humano. Un anticuerpo químérico típico es por lo tanto una proteína híbrida que consiste en el dominio de unión a V o al antígeno de un anticuerpo de ratón y el dominio C o efector de un anticuerpo humano.

Los anticuerpos humanizados tienen residuos de marco de región variable sustancialmente de un anticuerpo humano (denominado un anticuerpo aceptor) y regiones determinantes de complementariedad sustancialmente de una anticuerpo de ratón, (denominado inmunoglobulina donante). Véase, Queen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 86: 10029-10033 (1989) y WO 90/07861, US 5.693.762, US 5.693.761, US 5.585.089, US 5.530.101 y Winter, US 5.225.539. La región constante, si está presente, también es sustancial o completamente de una inmunoglobulina humana. Los dominios variables humanos suelen ser elegidos a partir de anticuerpos humanos cuyas secuencias de marco presentan un alto grado de identidad de secuencia con los dominios de región variable murina a partir de los cuales se derivaron las CDR. Los residuos de marco de región variable de cadena pesada y ligera pueden derivar de las mismas o diferentes secuencias de anticuerpo humano. Las secuencias de anticuerpos humanos pueden ser secuencias de anticuerpos humanos naturales o pueden ser secuencias de consenso de varios anticuerpos humanos. Véase Carter *et al.*, WO 92/22653. Ciertos aminoácidos de los residuos de marco de región variable humana se seleccionan para la sustitución basándose en su posible influencia sobre la conformación de CDR y/o la unión a antígeno. La investigación de tales influencias posibles se realiza por modelado, examen de las características de los aminoácidos en localizaciones particulares, o la observación empírica de los efectos de la sustitución o la mutagénesis de aminoácidos particulares.

Por ejemplo, cuando un aminoácido difiere entre un residuo de marco de región variable murina y un residuo de marco de región variable humana seleccionada, el aminoácido del marco humano generalmente debería sustituirse por el aminoácido de marco equivalente del anticuerpo de ratón cuando se espera razonablemente que el aminoácido:

- (1) se une de forma no covalente directamente al antígeno,
 - (2) es adyacente a una región CDR,
 - (3) interacciona de otra manera con una región CDR (por ejemplo, dentro de aproximadamente 6 Å de una región CDR), o
 - (4) participa en la interfaz VL-VH.

Otros candidatos para la sustitución son aminoácidos de marco de estructura humana aceptor que son inusuales para una inmunoglobulina humana en esa posición. Estos aminoácidos pueden sustituirse con aminoácidos de la posición equivalente del anticuerpo donante de ratón o de las posiciones equivalentes de inmunoglobulinas humanas más típicas. Otros candidatos para la sustitución son aceptores de aminoácidos del marco humano que son inusuales para una inmunoglobulina humana en esa posición. Los marcos de región variable de inmunoglobulinas humanizadas normalmente muestran al menos 85% de identidad de secuencia a una secuencia de marco de zona variable humana o consenso de dichas secuencias.

iv. Anticuerpos humanos

Los anticuerpos humanos contra A β son proporcionados por una variedad de técnicas descritas a continuación. Algunos anticuerpos humanos son seleccionados por experimentos de unión competitiva, o de otra manera, para tener la misma especificidad de epítopo que un anticuerpo de ratón particular, tal como uno de los

anticuerpos monoclonales de ratón descritos en el Ejemplo XI. Los anticuerpos humanos también se pueden cribar para una especificidad de epítopo particular mediante el uso de sólo un fragmento de A β como el inmunógeno, y/o mediante el cribado de anticuerpos contra una colección de mutantes de delección de A β . Los anticuerpos humanos tienen preferiblemente IgG1 humana de especificidad de isotipo.

5 (I) Metodología del trioma

El enfoque básico y una pareja de fusión celular ejemplar, SPAZ-4, para su uso en este enfoque han sido descritos por Oestberg *et al.*, *Hybridoma* 2: 361-367 (1983); Oestberg, Patente de EE.UU. Nº 4.634.664; y Engleman *et al.*, Patente de Estados Unidos 4.634.666. Las líneas celulares productoras de anticuerpos obtenidas por este procedimiento se denominan triomas, debido a que descienden de tres células—dos humanas y una de ratón. Inicialmente, una línea de mieloma de ratón se fusiona con un B-limfocito humano para obtener una célula híbrida xenogénica no productora de anticuerpo, tales como la línea celular SPAZ-4 descrita por Oestberg, supra. La célula xenogénica es fusionada con un B-limfocito humano inmunizado para obtener una línea celular de trioma productor de anticuerpo. Triomas han demostrado producir anticuerpos de forma más estable que los hibridomas ordinarios hechos de células humanas.

20 Los linfocitos B inmunizados se obtienen de la sangre, el bazo, los ganglios linfáticos o médula ósea de un donante humano. Si se desean anticuerpos frente a un antígeno o epítopo específico, es preferible usar ese antígeno o epítopo para la inmunización. La inmunización puede ser o bien *in vivo* o *in vitro*. Para la inmunización *in vivo*, las células B se aíslan típicamente a partir de un humano inmunizado con A β , un fragmento del mismo, polipéptido más grande que contiene A β o fragmento, o un anticuerpo antiidiotípico a un anticuerpo a A β . En algunos procedimientos, las células B se aíslan del mismo paciente que es la terapia de anticuerpos en última instancia, a ser administrado. Para la inmunización *in vitro*, los linfocitos B están típicamente expuestos a antígeno durante un periodo de 7-14 días en un medio tal como RPMI-1640 (véase Engleman, supra) suplementado con plasma humano al 10%.

30 Los linfocitos B inmunizados se fusionan a una célula híbrida xenogénica tal como SPAZ-4 por métodos bien conocidos. Por ejemplo, las células se tratan con 40-50% polietilenglicol de MW 1000-4000, a aproximadamente 37 grados C, durante aproximadamente 5-10 min. Las células se separan de la mezcla de fusión y se propagan en medio selectivo para los híbridos deseados (por ejemplo, HAT o AH). Los clones que secretan anticuerpos que tienen la especificidad de unión requerida son identificados ensayando el medio de cultivo del trioma para la capacidad de unirse a A β o un fragmento del mismo. Los triomas que producen anticuerpos humanos que tienen la especificidad deseada se subclonian por la técnica de dilución limitante y se cultivan *in vitro* en medio de cultivo. Las líneas de células de trioma obtenidas se ensayaron luego para determinar la capacidad de unir A β o un fragmento del mismo.

40 Aunque triomas son genéticamente estables no producen anticuerpos en niveles muy altos. Los niveles de expresión pueden aumentarse clonando genes de anticuerpos del trioma en uno o más vectores de expresión, y transformando el vector en líneas celulares estándar de mamífero, bacterianas o de levadura.

(2) Mamíferos transgénicos no humanos

45 Anticuerpos humanos contra A β también se pueden producir a partir de mamíferos transgénicos no humanos que tienen transgenes que codifican al menos un segmento del locus de inmunoglobulina humana. Por lo general, el locus de inmunoglobulina endógena de dichos mamíferos transgénicos está funcionalmente inactivado. Preferiblemente, el segmento del locus de inmunoglobulina humana incluye secuencias no reorganizadas de componentes de la cadena pesada y ligera. Tanto la inactivación de genes de inmunoglobulina endógena y la introducción de genes de inmunoglobulina exógena se puede lograr mediante recombinación homóloga diana, o por introducción de cromosomas YAC. Los mamíferos transgénicos resultantes de este proceso son capaces de reorganizar funcionalmente las secuencias componentes de inmunoglobulina, y expresar un repertorio de anticuerpos de diversos isotipos codificados por genes de inmunoglobulina humana, sin expresar los genes de inmunoglobulina endógenos. La producción y propiedades de los mamíferos que tienen estas propiedades se describen en detalle por, por ejemplo, Lonberg *et al.*, WO93/12227 (1993); US 5.877.397, US 5.874.299, US 5.814.318, US 5.789.650, US 5.770.429, US 5.661.016, US 5.633.425, US 5.625.126, US 5.569.825, US 5.545.806, *Nature* 148, 1547-1553 (1994), *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996), Kucherlapati, WO 91/10741-(1991). Los ratones transgénicos son particularmente adecuados. Anticuerpos Anti-A β se obtienen mediante la inmunización de un mamífero no humano transgénico, tal como se describe por Lonberg o Kucherlapati, supra, con A β o un fragmento del mismo. Anticuerpos monoclonales se preparan mediante, por ejemplo, la fusión de células B de dichos mamíferos a líneas celulares de mieloma adecuadas utilizando tecnología Kohler-Milstein convencional. anticuerpos policlonales humanos también se pueden proporcionar en la forma de suero de seres humanos inmunizados con un agente inmunógeno. Opcionalmente, tales anticuerpos policlonales se pueden concentrar mediante purificación por afinidad usando A β u otro péptido amiloide como un reactivo de afinidad.

65 (3) Métodos de exposición de fagos

Un enfoque adicional para obtener anticuerpos anti-A β humanos es para cribar una biblioteca de ADN de células B humanas según el protocolo general esbozado por Huse *et al.*, *Science* 246: 1275-1281 (1989). Como se ha descrito para la metodología de trioma, tales células B pueden obtenerse a partir de un humano inmunizado con A β , fragmentos, polipéptidos más largos que contienen A β o fragmentos o anticuerpos antiidiotípicos. Opcionalmente, dichas células B se obtienen a partir de un paciente quien en última instancia ha de recibir el tratamiento con anticuerpos. Se seleccionan anticuerpos que se unen a A β o un fragmento del mismo. Las secuencias que codifican tales anticuerpos (o fragmentos de unión) se cloran a continuación y se amplifican. El protocolo descrito por Huse se hace más eficiente en combinación con tecnología de presentación de fagos. Véase, por ejemplo, Dower *et al.*, WO 91/17271 y McCafferty *et al.*, WO 92/01047, US 5.877.218, US 5.871.907, US 5.858.657, US 5.837.242, US 5.733.743 y US 5.565.332. En estos métodos, bibliotecas de fago se producen en la que los miembros presentan diferentes anticuerpos en sus superficies exteriores. Los anticuerpos generalmente se muestran como fragmentos Fv o Fab. Fagos que presentan anticuerpos con una especificidad deseada se seleccionan mediante enriquecimiento por afinidad a un péptido A β o fragmento del mismo.

En una variación del método de presentación de fagos, los anticuerpos humanos que tienen la especificidad de unión de un anticuerpo murino seleccionado pueden ser producidos. Véase Winter, el documento WO 92/20791. En este método, ya sea la región variable de cadena pesada o ligera del anticuerpo murino seleccionado se usa como un material de partida. Si, por ejemplo, una región variable de cadena ligera se selecciona como el material de partida, una biblioteca de fagos se construye en la que elementos representan la misma región de cadena ligera variable (es decir, el material de partida murino) y una cadena pesada de la región variable diferente. Las regiones variables de cadena pesada se obtienen a partir de una biblioteca de regiones variables de cadena pesada humana reordenada. Un fago que muestra una fuerte unión para A β específico (por ejemplo, al menos 10⁸ y preferiblemente al menos 10⁹ M⁻¹) se selecciona. La cadena pesada de la región variable humana de este fago sirve a continuación como material de partida para la construcción de una biblioteca de fagos adicional. En esta biblioteca, cada fago muestra la misma región variable de cadena pesada (es decir, la región identificada a partir de la primera biblioteca de presentación) y una región variable de cadena ligera diferente. Las regiones variables de cadena ligera se obtienen a partir de una biblioteca de regiones de cadena ligera variable humana reordenada. Una vez más, el fago que muestra una fuerte unión específica para A β se seleccionan. Estos fagos muestran las regiones variables de los anticuerpos anti-A β completamente humanos. Estos anticuerpos por lo general tienen la misma o similar especificidad de epítopo que el material de partida murino.

v. Selección de la región constante

Las regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpos químéricos, humanizados, o humanos pueden ser vinculados a al menos una porción de una región constante humana. La elección de la región constante depende, en parte, de si el complemento dependiente de anticuerpo y/o toxicidad mediada por células se desea. Por ejemplo, los isótopos IgG1 y IgG3 tienen actividad del complemento e isótipos IgG2 e IgG4 no la tienen. La elección de isótipo también puede afectar paso del anticuerpo en el cerebro. Se prefiere IgG1 de isótipo humano. Regiones constantes de cadena ligera pueden ser lambda o kappa. Los anticuerpos pueden expresarse como tetrámeros que contienen dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, como cadenas pesadas separadas, cadenas ligeras, como Fab, Fab'F(ab')2, y Fv, o como anticuerpos de cadena sencilla en los que los dominios variables de cadena pesada y ligera están unidos a través de un espaciador.

VI. Expresión de anticuerpos recombinantes

Anticuerpos químéricos, humanizados y humanos se producen típicamente por expresión recombinante. Constructos de polinucleótido recombinante típicamente incluyen una secuencia de control de la expresión unida operativamente a las secuencias codificantes de cadenas de anticuerpo, incluyendo regiones promotoras naturalmente asociadas o heterólogas. Preferiblemente, las secuencias de control de expresión son sistemas promotores eucariotas en vectores capaces de transformar o transfectar células huésped eucarióticas. Una vez que el vector se ha incorporado en el huésped apropiado, el huésped se mantiene en condiciones adecuadas para la expresión de alto nivel de las secuencias de nucleótidos, y la recolección y purificación de los anticuerpos de reacción cruzada.

Estos vectores de expresión son típicamente replicables en los organismos huésped ya sea como episomas o como una parte integral del ADN cromosómico del huésped. Comúnmente, vectores de expresión contienen marcadores de selección, por ejemplo, resistencia de amicilina o resistencia de higromicina, para permitir la detección de aquellas células transformadas con las secuencias de ADN deseadas.

E. coli es un huésped procariota particularmente útil para clonar las secuencias de ADN de la presente descripción. Los microbios, tales como levaduras también son útiles para la expresión. *Saccharomyces* es un huésped de levadura preferido, con vectores adecuados que tienen secuencias de control de la expresión, un origen de replicación, secuencias de terminación y similares, como se deseé. Los promotores típicos incluyen 3-quinasa fosfoglicerato y otras enzimas glicolíticas. promotores de levadura inducibles incluyen, entre otros, promotores de deshidrogenasa de alcohol, isocitocromo C, y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa.

Las células de mamífero son un huésped preferido para expresar segmentos de nucleótidos que codifican inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas. Véase Winnacker, *From Genes to Clones*, (VCH Publishers, NY, 1987). Un número de líneas de células huésped adecuadas capaces de secretar proteínas heterólogas intactas se han desarrollado en la técnica, e incluyen líneas de células CHO, diversas líneas celulares COS, células HeLa, células L y líneas celulares de mieloma. Preferiblemente, las células son no humanas. Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de la expresión, tales como un origen de replicación, un promotor, un potenciador (Queen *et al.*, *Immunol. Rev.* 89:49 (1986)), y sitios de información necesarios de procesamiento, tales como sitios de unión a ribosomas, sitios de empalme de ARN, sitios de poliadenilación, y secuencias terminadoras de la transcripción. secuencias de control de la expresión preferidas son promotores derivados de genes endógenos, citomegalovirus, SV40, adenovirus, virus del papiloma bovino, y similares. Véase Co *et al.*, *J. Immunol.* 148: 1149 (1992).

Alternativamente, las secuencias codificantes de anticuerpos pueden incorporarse en transgenes para la introducción en el genoma de un animal transgénico y la expresión posterior en la leche del animal transgénico (véase, por ejemplo, US 5.741.957, US 5.304.489, US 5.849.992). transgenes adecuados incluyen secuencias codificantes para las cadenas ligeras y/o pesadas en unión operativa con un promotor y potenciador de un gen específico de la glándula mamaria, tal como caseína o lactoglobulina beta.

Los vectores que contienen los segmentos de ADN de interés se pueden transferir a la célula huésped por procedimientos bien conocidos, dependiendo del tipo de huésped celular. Por ejemplo, la transfección con cloruro de calcio se utiliza comúnmente para las células procarióticas, mientras que el tratamiento con fosfato de calcio, electroporación, lipofecció, biolítica o transfección a base viral puede utilizarse para otros huéspedes celulares. Otros métodos utilizados para transformar células de mamífero incluyen el uso de polibreno, fusión de protoplastos, liposomas, electroporación, y microinyección (véase en general, Sambrook *et al.*, *Supra*). Para la producción de animales transgénicos, los transgenes pueden microinyectarse en oocitos fertilizados, o pueden incorporarse en el genoma de células madre embrionarias, y los núcleos de dichas células transferidas a oocitos enucleados.

Una vez expresados, los anticuerpos pueden purificarse de acuerdo con procedimientos estándar de la técnica, incluyendo la purificación por HPLC, cromatografía en columna, electroforesis de gel y similares (véase, en general, Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, NY, 1982)).

3. Las proteínas transportadoras

Algunos agentes para inducir una respuesta inmune contienen el epítopo apropiado para inducir una respuesta inmune contra los depósitos amiloideos pero son demasiado pequeños para ser inmunogénicos. En esta situación, un inmunógeno de péptido puede estar unido a un portador adecuado para ayudar a provocar una respuesta inmunitaria. Los portadores adecuados incluyen albúminas séricas, hemocyanina de lapa californiana, moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovoalbúmina, toxoide tetánico, o un toxoide de otras bacterias patógenas, tales como difteria, *E. coli*, cólera, o *H. pylori*, o un derivado de toxina atenuada. Otros portadores incluyen epítopos de células T que se unen a múltiples alelos de MHC, por ejemplo, al menos el 75% de todos los alelos de MHC humanos. Tales portadores se conocen a veces en la técnica como "epítopos universales de células T". Los ejemplos de epítopos de células T universales incluyen:

Influenza hemaglutinina: HA₃₀₇₋₃₁₉ PKYVKQNTLKLAT
 45 PADRE (residuos comunes en negrita) AKXVAATWLKAAA
 Malaria CS: T3 epítopo EKKIAKMEKASSVFNV
 Antígeno de superficie hepatitis B: HBsAG₁₉₋₂₈ FFLLTRILTI
 Proteína de choque térmico 65: hsp65₁₅₃₋₁₇₁ DQSIGDLIAEAMDKGNEG
 bacilo Calmette-Guerin QVHFQPLPPAVVKL
 50 Toxoide tetánico: TT₃₃₀₋₈₄₄ QYIKANSKFIGITEL
 Toxoide tetánico: TT₉₄₇₋₉₆₇ FNNFTVSFWLVPKVSASHLE
 HIV gp120 T1: KQI INMWQEVGKAMYA.

Otros portadores para estimular o potenciar una respuesta inmune incluyen citoquinas tales como péptidos IL-1, IL-1 α y β, IL-2, γINF, IL-10, GM-CSF, y quimiocinas, tal como MIP1α y β y RANTES. Los agentes inmunogénicos también se pueden vincular a péptidos que potencian el transporte a través de tejidos, como se describe en O'Mahony, WO 97/17613 y WO 97/17614.

Los agentes inmunogénicos pueden estar vinculados a los portadores mediante reticulación química. Las técnicas para la vinculación de un inmunógeno a un portador incluyen la formación de enlaces de disulfuro usando N-succinimidilo-3-(2-piridilo-tio) propionato (SPDP) y succinimidilo 4-(N-maleimidometilo)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC) (si el péptido carece de un grupo de sulfhidrilo, esto puede ser proporcionado mediante la adición de un residuo de cisteína). Estos reactivos crean un enlace de disulfuro entre ellos mismos y péptido de cisteína reside en una proteína y un enlace de amida a través del un amino en una lisina, u otro grupo de amino libre en otros aminoácidos. Una variedad de tales agentes formadores de disulfuro/amida se describen por *Immun. Rev.* 62, 185 (1982). Otros agentes de acoplamiento bifuncionales forman un tioéster en lugar de un enlace de disulfuro. Muchos

de estos agentes formadores de tioeter están disponibles comercialmente e incluyen ésteres reactivos de 6-ácido maleimidocaproico, 2-ácido bromoacético, y 2-ácido yodoacético, 4-(N-maleimido-metilo)ciclohexano-1-ácido carboxílico. Los grupos de carboxilo se pueden activar combinándolos con succinimida o 1-hidroxilo-2-nitro-4-ácido sulfónico, sal de sodio.

5 Los péptidos inmunogénicos también pueden expresarse como proteínas de fusión con portadores (es decir, péptidos heterólogos). El péptido inmunogénico puede estar ligado en su extremo amino terminal, su extremo carboxilo terminal, o ambos a un portador. Opcionalmente, múltiples repeticiones del péptido inmunogénico pueden estar presentes en la proteína de fusión. Opcionalmente, un péptido inmunogénico puede estar ligado a múltiples 10 copias de un péptido heterólogo, por ejemplo, tanto en los extremos N y C del péptido. Algunos péptidos portadores sirven para inducir una respuesta de células T auxiliares contra el péptido portador. Las células T auxiliares inducen a su vez una respuesta de células B contra el péptido inmunogénico ligado al péptido portador.

15 Algunos agentes de la divulgación comprenden una proteína de fusión en la que un fragmento N-terminal de A β está vinculado en su C-término a un péptido portador. En tales agentes, el residuo N-terminal del fragmento de A β constituye el residuo N-terminal de la proteína de fusión. Por consiguiente, tales proteínas de fusión son 20 eficaces en la inducción de anticuerpos que se unen a un epítopo que requiere el residuo N-terminal de A β a estar en forma libre. Algunos agentes de la descripción comprenden una pluralidad de repeticiones de un segmento N-terminal de A β vinculado en el C-término a una o más copias de un péptido portador. El fragmento N-terminal de A β incorporado en tales proteínas de fusión a veces comienza en A β 1-3 y termina en A β 7-11. A β 1-7, A β 1-3, 1-4, 1-5, y 3-7 es fragmento N-terminal preferido de A β . Algunas proteínas de fusión comprenden diferentes segmentos N-terminales de A β en tandem. Por ejemplo, una proteína de fusión puede comprender A β 1-7 seguido de un A β 1-3 seguido de un péptido heterólogo.

25 En algunas proteínas de fusión, un segmento N-terminal de A β se fusiona en su extremo N-terminal a un péptido portador heterólogo. La misma variedad de segmentos N-terminales de A β puede utilizarse como con fusiones C-terminales. Algunas proteínas de fusión comprenden un péptido heterólogo ligado al N-término de un segmento N-terminal de A β , que es a su vez se vincula a uno o más segmentos N-terminales de A β en tandem.

30 Algunos ejemplos de proteínas de fusión adecuadas para uso en la divulgación se muestran a continuación. Algunas de estas proteínas de fusión comprenden segmentos de A β vinculado al epítopos de toxoides tétnanos tal como se describe en el documento US 5.196.512, EP 378.881 y EP 427.347. Algunas proteínas de fusión comprenden segmentos de A β vinculados a péptidos portadores descritos en la US 5.736.142. Algunos péptidos heterólogos son epítopos de células T universales. En algunos procedimientos, el agente para la administración es 35 simplemente una única proteína de fusión con un segmento A β ligado a un segmento heterólogo en configuración lineal. En algunos métodos, el agente es multímero de proteínas de fusión representadas por la fórmula 2 x , en la que x es un número entero de 1-5. Preferiblemente x es 1, 2 o 3, siendo 2 el más preferido. Cuando x es dos, tal multímero tiene cuatro proteínas de fusión con enlaces en una configuración preferida denominada MAP4 (véase el documento US 5.229.490). Epítopos de A β están subrayados.

40 La configuración MAP4 se muestra a continuación, donde las estructuras ramificadas son producidas mediante el inicio de la síntesis de péptidos tanto en las aminas N terminales y de cadena lateral de la lisina. Dependiendo del número de veces que la lisina se incorpora en la secuencia y se dejó en rama, la estructura resultante presentará múltiples N-terminales. En este ejemplo, cuatro N-terminales idénticos se han producido en el 45 núcleo que contiene lisina ramificada. Tal multiplicidad mejora en gran medida la capacidad de respuesta de las células B afines.



60 AN90549 (A β 1-7/Toxoide tetánico 830-844 en una configuración MAP4):

DAEFRHDQYIKANSKFIGITEL

65 AN90550 (A β 1-7/Toxoide tetánico 947-967 en una configuración MAP4):

DAEFRHDFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE

AN90542 (A β 1-7/Toxoid tetánico 830-844 + 947-967 en una configuración lineal):

5 DAEFRHHDQYIKANSKFIGITELFNNFIVSFWLRLVPKVSASHLE

AN90576: (A β 3-9)/Toxoid tetánico 830-844 en una configuración MAP4):

10 EFRHDSGQYIKANSKFIGITEL

Péptido descrito en el documento US 5.736.142 (todos en configuraciones lineales):

15 AN90562 (A β 1-7/péptido) AKXVAAWTLKAAADAEFRHD

AN90543 (A β 1-7 x 3/péptido): DAEFRHDDAEFRHDDAEFRHDAKXVAAWTLKAAA

20 Otros ejemplos de proteínas de fusión (epítopo inmunogénico de A β en negrita) incluyen

AKXVAATLKAAC-DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD

DAEFRHD-AKXVAAWTLKAAA

DAEFRHD-ISQAVHAAHAEINEAGR

30 EFRHDSG-ISOAVHAAHAEINEAGR

PKYYKONTI KI AT-DAFFRHD-DAFFRHD-DAFFRHD

DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT-DAEFRHD

DAEFRHD- DAEFRHD-DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT

40 DAEFRHD-DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT

DAEFRHD-PKYVKONTIKIAT-FKKIAKMEKASSVFNV-

QYIKANSKFIGITEL-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-**DAEFRHDSLFKQW**

DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL-

FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE

50 DAEFRHD-QYIKANSKFIGITELCFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE

DAEFRHD-QYIKANSKFIGITELCFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-

DAEFRHD

55 DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL en una resina de 2 ramas

Péptido

65 EQVTNVGGAIISQAVHAAHAEVNNEAGR (proteína de fusión sinucleína en configuración MAP4)

Las mismas o similares proteínas de portador y métodos de vinculación se pueden utilizar para la generación de inmunógenos para utilizarse en la generación de anticuerpos contra A β para su uso en inmunización pasiva. Por ejemplo, A β o un fragmento ligado a un portador puede administrarse a un animal de laboratorio en la producción de anticuerpos monoclonales frente a A β .

5 4. Ácidos nucleicos que codifican agentes terapéuticos

10 Las respuestas inmunes contra depósitos amiloideos también pueden ser inducidos por la administración de ácidos nucleicos que codifican segmentos de péptido A β , y fragmentos de los mismos, otros inmunógenos peptídicos, o anticuerpos y sus cadenas de componentes usadas para inmunización pasiva. Tales ácidos nucleicos pueden ser ADN o ARN. Un segmento de ácido nucleico que codifica un inmunógeno típicamente se vincula a elementos reguladores, tales como un promotor y potenciador, que permiten la expresión del segmento de ADN en las células diana previstas de un paciente. Para la expresión en células sanguíneas, como es deseable para la inducción de una respuesta inmune, elementos promotores y potenciadores de genes de inmunoglobulina de cadena ligera o pesada o el promotor temprano intermedio de CMV y el potenciador son adecuados para la expresión directa. Los elementos reguladores unidos y las secuencias codificantes a menudo se clonian en un vector. Para la administración de anticuerpos de cadena doble, las dos cadenas pueden clonarse en iguales o distintos vectores.

20 Un número de sistemas de vectores virales están disponibles, incluyendo sistemas retrovirales (véase, por ejemplo, Lawrie y Tumin, *Cur Opin Genet Develop.* 3, 102-109 (1993)); vectores adenovirales (véase, por ejemplo, Bett *et al.*, *J. Virol.* 67, 5911 (1993)); vectores de virus asociados a adeno (véase, por ejemplo, Zhou *et al.*, *J. Exp. Med.* 179, 1867 (1994)), vectores virales de la familia de la viruela, incluyendo virus vaccinia y los virus de la viruela aviar, vectores virales del género de virus alfa tales como los derivados de Virus de Bosque Sindbis y Semliki (véase, por ejemplo, Dubensky *et al.*, *J. Virol.* 70, 508-519 (1996)), virus de la encefalitis equina venezolana (véase el documento US 5.643.576) y rabdovirus, tales como el virus de la estomatitis vesicular (véase el documento WO 96/34625) y virus del papiloma (Ohe *et al.*, *Human gene Therapy* 6, 325-333 (1995)) y, Woo *et al.*, WO 94/12629 y Xiao y Brandsma, *Nucleic Acids Res* 24, 2630-2622 (1996)).

30 ADN que codifica un inmunógeno, o un vector que contiene el mismo, puede empaquetarse en liposomas. Los lípidos adecuados y análogos relacionados se describen en US 10 5.208.036, 5.264.618, 5.279.833 y 5.283.185. Los vectores y el ADN que codifican un inmunógeno también pueden adsorberse a o asociarse con portadores particulados, ejemplos de los cuales incluyen polímeros y polilactidas de metacrilato de metilo y polí(lactidacoglicolidas), véase, por ejemplo, McGee *et al.*, *J. Micro Encap.* (1996).

35 Vectores de terapia génica o ADN desnudo se pueden administrar *in vivo* por administración a un paciente individual, típicamente por administración sistémica (por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, nasal, gástrica, intradérmica, intramuscular, subdérmica, o infusión intracraneal) o aplicación tópica (véase, por ejemplo, US 5.399.346). Tales vectores pueden incluir además agentes auxiliares tales como bupivacaína (US 5.593.970). El ADN también puede administrarse usando una pistola génica. Véase Xiao y Brandsma, *supra*. El ADN que codifica un inmunógeno se precipita sobre la superficie de perlas metálicas microscópicas. Los microproyectiles se aceleran con una onda de choque o expandiendo gas de helio, y penetran los tejidos a una profundidad de varias capas celulares. Por ejemplo, el Accel™ Gene Delivery Device fabricado por Agacetus, Inc. Middleton WI es adecuado. Alternativamente, el ADN desnudo puede pasar a través de la piel en el torrente sanguíneo simplemente mediante la detección de la ADN sobre la piel con irritación química o mecánica (véase el documento WO 95/05853).

45 En una variación adicional, los vectores que codifican inmunógenos pueden suministrarse a células *ex vivo*, tales como células explantadas de un paciente individual (por ejemplo, linfocitos, aspirados de médula ósea, biopsia tisular) o células madre hematopoyéticas donantes universales, seguido por reimplantación de las células en un paciente, usualmente después de selección para células que han incorporado el vector.

50 III. Examen de los anticuerpos para la actividad de eliminación

55 La descripción proporciona procedimientos de cribado de un anticuerpo para la actividad en la limpieza de un depósito de amiloide o cualquier otro antígeno, o entidad biológica asociada, para la que la actividad de compensación se desea. Para explorar la actividad contra un depósito amiloide, una muestra de tejido de un cerebro de un paciente con la enfermedad de Alzheimer o un modelo animal que tiene la patología de Alzheimer característica se pone en contacto con células fagocíticas que llevan un receptor Fc, tales como células microgliales, y el anticuerpo bajo ensayo en un medio *in vitro*. Las células pagocíticas pueden ser un cultivo primario o una línea celular, tal como BV-2, C8-B4, o THP-1. En algunos procedimientos, los componentes se combinan en un portaobjetos de microscopio para facilitar el control microscópico. En algunos métodos, múltiples reacciones se realizan en paralelo en los pocillos de una placa de microtitulación. En un formato de este tipo, se puede emplear un portaobjetos de microscopio en miniatura separado se puede montar en los pocillos separados, o un formato de detección no microscópico, tal como detección de ELISA de A β . Preferiblemente, se hace una serie de mediciones de la cantidad de depósito de amiloide en la mezcla de reacción *in vitro*, partiendo de un valor basal antes de que la reacción ha procedido, y uno o más valores de ensayo durante la reacción. El antígeno puede detectarse por tinción, por ejemplo, con un anticuerpo marcado con fluorescencia a A β u otro componente de placas amiloides. El

anticuerpo usado para la tinción puede o no ser el mismo que el anticuerpo que se está examinando para la limpieza de actividad. Una reducción relativa a la línea basal durante la reacción de los depósitos amiloideos indica que el anticuerpo bajo ensayo tiene actividad de eliminación. Tales anticuerpos son probablemente útiles en la prevención o el tratamiento y la enfermedad de Alzheimer de otras enfermedades amiloidogénicas.

5 Métodos análogos se pueden utilizar para examinar anticuerpos para la actividad en limpieza de otros tipos de entidades biológicas. El ensayo se puede usar para detectar la actividad de eliminación contra prácticamente cualquier tipo de entidad biológica. Típicamente, la entidad biológica tiene alguna función en la enfermedad humana o animal. La entidad biológica puede proporcionarse como una muestra de tejido o en forma aislada. Si se proporciona como una muestra de tejido, la muestra de tejido es preferiblemente no fijada para permitir el fácil acceso a los componentes de la muestra de tejido y para evitar la perturbación de la conformación de los componentes relacionados con la fijación. Los ejemplos de muestras de tejido que pueden ser examinados en este ensayo incluyen tejido canceroso, tejido precanceroso, tejido que contiene tumores benignos tales como verrugas o lunares, tejido infectado con microorganismos patógenos, tejido infiltrado con células inflamatorias, tejido que lleva matrices patológicas entre células (por ejemplo, periearditis fibrinosa), tejido que lleva antígenos aberrantes, y tejido cicatricial. Los ejemplos de entidades biológicas aisladas que pueden usarse incluyen A β , antígenos virales o virus, proteoglicanos, antígenos de otros microorganismos patógenos, antígenos tumorales, y moléculas de adhesión. Dichos antígenos pueden obtenerse de fuentes naturales, expresión recombinante o síntesis química, entre otros medios. La muestra de tejido o entidad biológica aislada se pone en contacto con células fagocíticas que llevan receptores Fc, tales como monocitos o células microgliales, y un anticuerpo a ensayar en un medio. El anticuerpo puede estar dirigido a la entidad biológica bajo ensayo o a un antígeno asociado con la entidad. En la última situación, el objeto es examinar si la entidad biológica es fagocitada indirectamente con el antígeno. Por lo general, aunque no necesariamente, el anticuerpo y la entidad biológica (a veces con un antígeno asociado) se ponen en contacto entre sí antes de añadir las células fagocíticas. La concentración de la entidad biológica y/o el antígeno asociado, si está presente, que quedan en el medio se controlan a continuación. Una reducción en la cantidad o concentración de antígeno o la entidad biológica asociada en el medio indica que el anticuerpo tiene una respuesta de eliminación contra el antígeno y/o entidad biológica asociada junto con las células fagocíticas (véase, por ejemplo, Ejemplo 14).

30 IV. PACIENTES SUSCEPTIBLES DE TRATAMIENTO

Los pacientes susceptibles de tratamiento incluyen individuos en riesgo de enfermedad pero que no muestran síntomas, así como pacientes que muestran síntomas actualmente. En el caso de la enfermedad de Alzheimer, prácticamente cualquier persona está en riesgo de padecer la enfermedad de Alzheimer si vive lo suficiente. Por lo tanto, los presentes métodos se pueden administrar profilácticamente a la población general sin necesidad de ninguna evaluación del riesgo del sujeto paciente. Los presentes métodos son especialmente útiles para las personas que tienen un riesgo genético conocido de la enfermedad de Alzheimer. Tales individuos incluyen los que tienen parientes que han experimentado esta enfermedad, y aquellos cuyo riesgo se determina por análisis de marcadores genéticos o bioquímicos. Los marcadores genéticos de riesgo hacia la enfermedad de Alzheimer incluyen mutaciones en el gen APP, particularmente mutaciones en la posición 717 y las posiciones 670 y 671 denominadas mutaciones Hardy y Suecas respectivamente (véase Hardy, TINS, *supra*). Otros marcadores de riesgo son mutaciones en los genes de la presenilina, PSEN1 y PSEN2, y ApoE4, historial familiar de EA, hipercolesterolemia o aterosclerosis. Las personas que actualmente sufren de la enfermedad de Alzheimer pueden reconocerse desde la demencia característica, así como la presencia de factores de riesgo descritos anteriormente. Además, una serie de pruebas de diagnóstico están disponibles para identificar individuos que tienen A β . Éstos incluyen la medición de CSF tau y niveles A β 42. Niveles elevados de tau y niveles reducidos de A β 42 indican la presencia de A β . Las personas que sufren de la enfermedad de Alzheimer también puede ser diagnosticadas por criterios ADRDA tal como se ha discutido en la sección de ejemplos.

50 En los pacientes asintomáticos, el tratamiento puede comenzar a cualquier edad (por ejemplo, 10, 20, 30). Por lo general, sin embargo, no es necesario comenzar el tratamiento hasta que un paciente alcance 40, 50, 60 o 70. El tratamiento típicamente implica múltiples dosificaciones durante un período de tiempo. El tratamiento puede monitorizarse mediante el ensayo de anticuerpo, o respuestas activadas de células T o de células B al agente terapéutico (por ejemplo, péptido A β) a lo largo del tiempo. Si la respuesta se cae, se recomienda una dosis de refuerzo. En el caso de los pacientes con síndrome de Down potenciales, el tratamiento puede comenzar antes del nacimiento mediante la administración del agente terapéutico a la madre o poco después del nacimiento.

V. REGÍMENES DE TRATAMIENTO

60 En aplicaciones profilácticas, las composiciones farmacéuticas o medicamentos se administran a un paciente susceptible a, o de otra manera en riesgo de, enfermedad de Alzheimer en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo, disminuir la gravedad, o retardar el inicio de la enfermedad, incluyendo síntomas bioquímicos, histológicos y/o conductuales de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones o medicamentos se administran a un paciente que se sospecha de, o que ya sufre de una enfermedad en una cantidad suficiente para curar, o al menos detener parcialmente, los síntomas de la enfermedad

(bioquímicos, histológicos y/o conductuales), incluyendo sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios en el desarrollo de la enfermedad. En algunos métodos, la administración de agente reduce o elimina el deterioro miocognitivo en pacientes que aún no han desarrollado la patología característica de Alzheimer. Una cantidad adecuada para conseguir el tratamiento terapéutico o profiláctico se define como una dosis terapéutica o profilácticamente efectiva. En ambos regímenes profilácticos y terapéuticos, los agentes normalmente se administran en varias dosificaciones hasta que se ha conseguido una respuesta inmune suficiente. Típicamente, la respuesta inmune se controla y dosis repetidas se dan si la respuesta inmune empieza a disminuir.

Las dosis eficaces de las composiciones de la presente invención, por el tratamiento de las afecciones descritas anteriormente varían dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo medios de administración, sitio diana, estado fisiológico del paciente, si el paciente es humano o un animal, otras medicaciones administradas, y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Por lo general, el paciente es un humano, pero mamífero no humano tales como mamíferos transgénicos también pueden ser tratados. Las dosificaciones de tratamiento necesitan titularse para optimizar la seguridad y la eficacia. La cantidad de inmunógeno depende de si el adyuvante también se administra, con dosis más altas que se requieren en la ausencia de adyuvante. La cantidad de un inmunógeno para su administración en ocasiones varía de 1-500 µg por paciente y más habitualmente de 5-500 µg por inyección para la administración humana. En ocasiones, se utiliza una dosis mayor de 12 mg por inyección. Típicamente aproximadamente 10, 20, 50 o 100 µg se utiliza para cada inyección humana. La masa de inmunógeno también depende de la relación de masa del epítopo inmunogénico en el inmunógeno para la masa de inmunógeno como un todo. Típicamente, 10^{-3} a 10^{-5} micromoles de epítopo inmunogénico se utilizan para microgramo de inmunógeno. El momento de las inyecciones puede variar significativamente desde una vez al día, a una vez al año, a una vez cada década. En cualquier día dado que se administre una dosis de inmunógeno, la dosificación es mayor que 1 µg/paciente y habitualmente mayor que 10 µg/paciente si el adyuvante también se administra, y mayor que 10 µg/paciente y habitualmente mayor que 100 µg/paciente en ausencia de adyuvante. Un régimen típico consiste en una inmunización seguida de inyecciones de refuerzo a intervalos de tiempo, tales como intervalos de 6 semanas. Otro régimen consta de una inmunización seguida por inyecciones de refuerzo 1, 2 y 12 meses más tarde. Otro régimen supone una inyección cada dos meses para el resto de la vida. Alternativamente, las inyecciones de refuerzo pueden ser de forma irregular tal como se indica mediante la monitorización de la respuesta inmune.

Para la inmunización pasiva con un anticuerpo, la dosificación varía de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más habitualmente de 0,01 a 5 mg/kg, de peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser de 1 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del rango de 110 mg/kg. Un régimen de tratamiento ejemplar implica la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. En algunos procedimientos, dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes specificidades de unión se administran simultáneamente, en cuyo caso la dosificación de cada anticuerpo administrado está dentro de los rangos indicados. El anticuerpo se administra habitualmente en múltiples ocasiones. Los intervalos entre las dosis individuales pueden ser semanales, mensuales o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares como se indica midiendo los niveles sanguíneos de anticuerpo a A β en el paciente. En algunos procedimientos, la dosificación se ajusta para lograr una concentración de anticuerpo en plasma de 1-1.000 µg/ml y en algunos métodos 25 - 300 µg/ml. Alternativamente, el anticuerpo puede administrarse como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere menos administración frecuente. La dosificación y frecuencia varían dependiendo de la vida media del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la vida media más larga, seguida por anticuerpos humanizados, anticuerpos químicos, y anticuerpos no humanos. La dosificación y frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, una dosificación relativamente baja se administra a intervalos relativamente infrecuentes durante un largo período de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento para el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, una dosis relativamente alta a intervalos relativamente cortos a veces se requieren hasta que la progresión de la enfermedad se reduzca o termine, y preferiblemente hasta que el paciente muestra mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Despues, se puede administrar un régimen profiláctico a la paciente.

Dosis para inmunógenos de codificación de ácidos nucleicos varían de aproximadamente 10 ng a 1 g, 100 ng a 100 mg, 1 µg a 10 mg, o 30-300 µg de ADN por paciente. Las dosis para vectores virales infecciosos varían de 10-100, o más, viriones por dosis.

Los agentes para inducir una respuesta inmunitaria pueden administrarse por vía parenteral, tópica, intravenosa, oral, subcutánea, intraarterial, intracraneal, intraperitoneal, intranasal o medios intramusculares para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico. La ruta más típica de administración de un agente inmunogénico es subcutánea aunque otras vías pueden ser igualmente eficaces. La siguiente vía más común es la inyección intramuscular. Este tipo de inyección se realiza más típicamente en los músculos de la pierna o el brazo. En algunos procedimientos, los agentes se inyectan directamente en un tejido particular donde se han acumulado depósitos, por ejemplo inyección intracraneal. La inyección intramuscular en infusión intravenosa se prefieren para la administración de anticuerpo. En algunos procedimientos, en particular anticuerpos terapéuticos se inyectan directamente en el cráneo. En algunos procedimientos, los anticuerpos se administran como una composición de liberación sostenida o dispositivo, tal como un dispositivo Medipad™.

5 Los agentes de la invención opcionalmente pueden administrarse en combinación con otros agentes que
 son al menos parcialmente eficaces en el tratamiento de la enfermedad amiloidogénica. En el caso del síndrome de
 Alzheimer y de Down, en el que los depósitos amiloídes se producen en el cerebro, los agentes de la invención
 también se pueden administrar en combinación con otros agentes que aumentan el paso de los agentes de la
 invención a través de la barrera hematoencefálica. Los agentes inmunogénicos de la descripción, tales como
 péptidos, se administran a veces en combinación con un adyuvante. Una variedad de adyuvantes se puede utilizar
 en combinación con un péptido, tales como A β , para provocar una respuesta inmune. Los adyuvantes preferidos
 aumentan la respuesta intrínseca a un inmunógeno sin provocar cambios conformacionales en el inmunógeno que
 afecten a la forma cualitativa de la respuesta. Los adyuvantes preferidos incluyen hidróxido de aluminio y fosfato de
 10 aluminio, 3 De-O-acilado lípido de monofosforilo A (MPLTM) (véase el documento GB 2220211 (RIBI ImmunoChem
 Research Inc., Hamilton, Montana, ahora parte de Corixa). StimulonTM QS-21 es un glucósido de triterpeno o
 15 saponina aislada de la corteza del árbol Quillaja Saponaria Molina que se encuentra en América del Sur (véase
 Kensil *et al.*, en *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell y Newman, Plenum Press, Nueva
 York, 1995); Patente de Estados Unidos Nº 5.057.540), (Aquila BioPharmaceuticals, Framingham, MA). Otros
 20 adyuvantes son emulsiones de aceite en agua (tales como escualeno o aceite de cacahuete), opcionalmente en
 combinación con estimulantes inmunes, tales como lípido de monofosforilo A (véase Stoute *et al.*, *N. Engl. J. Med.*
 25 336, 86-91 (1997)). Otro adyuvante es CpG (WO 98/40100). Alternativamente, A β puede acoplarse a un adyuvante.
 Sin embargo, dicho acoplamiento no debería cambiar sustancialmente la conformación de A β de modo que pueda
 30 afectar a la naturaleza de la respuesta inmune. Los adyuvantes pueden administrarse como un componente de una
 composición terapéutica con un agente activo o pueden administrarse por separado, antes de, simultáneamente con,
 35 o después de la administración del agente terapéutico.

Una clase preferida de adyuvantes son sales de aluminio (alumbre), tales como hidróxido de aluminio,
 40 fosfato de aluminio, sulfato de aluminio. Tales adyuvantes pueden usarse con o sin otros agentes
 inmunoestimulantes específicos tales como MPL o 3-DMP, QS-21, aminoácidos poliméricos o monoméricos tales
 45 como ácido poliglutámico o polilisina. Otra clase de adyuvantes son formulaciones de emulsión aceite-en-agua.
 Tales adyuvantes pueden usarse con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como péptidos de
 50 muramilo (por ejemplo, N acetilmuramilo-L-treonilo-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetilo-normuramilo-L-alanilo-D-
 55 isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramilo-L-alanilo-D-isoglutaminilo-L-alanina-2-(1'-2'dipalmitoilo-sn-glicero-3-
 hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), N-acetilglucosaminilo-N-acetilmuramilo-L-Al-D-isoglu-L-Ala-dipalmitoxi
 60 propilamida (DTP-DPP) theramideTM), u otros componentes de la pared celular bacteriana. emulsiones aceite-en-
 agua incluyen (a) MF59 (documento WO 90/14837), que contiene 5% de escualeno, 0,5% de Tween 80, y 0,5% de
 65 Span 85 (que contiene opcionalmente diversas cantidades de MTP-PE) formulado en partículas submicrométricas
 usando un microfluidizador tal como el Modelo 110Y microfluidizador (Microfluidics, Newton MA), (b) SAF, que
 70 contiene 10% de escualeno, 0,4% de Tween 80, 5% de polímero plurónico-bloqueado L121, y thr-MDP, ya sea
 microfluidizado en una emulsión de submicron o vórtex para generar una emulsión de tamaño de partícula más
 75 grande, y (c) sistema adyuvante RibiTM (RAS), (RIBI ImmunoChem, Hamilton, MT) que contiene 2% de escualeno,
 80 0,2% de Tween 80, y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste en
 monofosfotillipido A (MPL), dimicolado de trehalosa (TDM), y esqueleto de la pared celular (CWS), preferiblemente
 85 MPL + CWS (DetoxTM). Otra clase de adyuvantes preferidos es adyuvantes de saponina, tales como StimulonTM
 (QS-21, Aquila, Framingham, MA) o partículas generadas de los mismos tales como ISCOM (complejos
 90 inmunoestimulantes) y ISCOMATRIX. Otros adyuvantes incluyen el Adyuvante Completo de Freund (CFA) y
 Adyuvante Incompleto de Freund (IFA). Otros adyuvantes incluyen citocinas, tales como interleucinas (IL 1, IL2, IL1-
 95 2 y), de colonias de macrófagos factor estimulante (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF).

Un adyuvante puede administrarse con un inmunógeno como una única composición, o se puede
 administrar antes de, simultáneamente con o después de la administración del inmunógeno. El inmunógeno y el
 100 adyuvante pueden envasarse y suministrarse en el mismo vial o pueden envasarse en viales separados y mezclarse
 antes de su uso. Inmunógeno y adyuvante se envasan típicamente con una etiqueta que indica la aplicación
 terapéutica prevista. Si inmunógeno y adyuvante se envasan por separado, el embalaje incluye típicamente
 105 instrucciones para la mezcla antes de su uso. La elección de un adyuvante y/o portador depende de la estabilidad de
 la formulación inmunogénica que contiene el adyuvante, la vía de administración, el programa de dosificación, la
 110 eficacia del adyuvante para la especie a la que se vacuna y, en seres humanos, un adyuvante farmacéuticamente
 aceptable es uno que se ha aprobado o puede aprobarse para la administración humana por los organismos
 115 reguladores pertinentes. Por ejemplo, el Adyuvante Completo de Freund no es adecuado para la administración
 humana. Se prefieren Alum, MPL y QS-21. Opcionalmente, dos o más adyuvantes diferentes se pueden utilizar
 120 simultáneamente. Las combinaciones preferidas incluyen alumbre con MPL, alumbre con QS-21, MPL con QS-21 y
 alumbre, QS-21 y MPL juntos. Además, el Adyuvante Incompleto de Freund se puede utilizar (Chang *et al.*,
 125 *Advanced Drug Delivery Reviews* 32, 173-186 (1998)), opcionalmente en combinación con cualquiera de alumbre,
 QS-21 y MPL y todas las combinaciones de los mismos.

Los agentes de la invención se administran a menudo como composiciones farmacéuticas que comprenden
 130 un agente terapéutico activo, es decir, y una variedad de otros componentes farmacéuticamente aceptables. Véase
 Remington's Pharmaceutical Science (15^a ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1980). La forma
 135 preferida depende del modo pretendido de administración y aplicación terapéutica. Las composiciones también
 pueden incluir, dependiendo de la formulación deseada, portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables no

tóxicos, que se definen como portadores comúnmente utilizados para formular composiciones farmacéuticas para la administración animal o humana. El diluyente se selecciona de manera que no afecte a la actividad biológica de la combinación. Ejemplos de tales diluyentes son agua destilada, solución salina con fosfato fisiológico, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. Además, la composición farmacéutica o formulación también 5 puede incluir otros portadores, adyuvantes, o estabilizadores no terapéuticos, no inmunogénicos, no tóxicos y similares. Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente tales como proteínas, polisacáridos tales como quitosano, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos y 10 copolímeros (tales como sefarosa funcionalizada por látex (TM), agarosa, celulosa, y similares), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácido, y agregados de lípidos (tales como gotitas de aceite o liposomas). Adicionalmente, estos portadores pueden funcionar como agentes inmunoestimulantes (*es decir*, adyuvantes).

Para la administración parenteral, los agentes de la invención se pueden administrar como dosificaciones inyectables de una solución o suspensión de la sustancia en un diluyente fisiológicamente aceptable con un portador farmacéutico que puede ser un líquido estéril tal como aceites en agua, solución salina, glicerol, o etanol. 15 Adicionalmente, sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, tensioactivos, sustancias tamponantes del pH y similares pueden estar presentes en las composiciones. Otros componentes de composiciones farmacéuticas son los de origen en petróleo, animal, vegetal, o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja, y aceite mineral. En general, los glicoles tales como propilenglicol o polietilenglicol son 20 portadores líquidos preferidos, particularmente para soluciones inyectables. Los anticuerpos se pueden administrar en la forma de una inyección de depósito o preparación de implante que puede formularse de una manera tal que permite una liberación sostenida del ingrediente activo. Una composición exemplar comprende anticuerpo monoclonal a 5 mg/mL, formulado en tampón acuoso que consiste en 50 mM L-histidina, 150 mM de NaCl, ajustado a pH 6,0 con HCl.

25 Típicamente, las composiciones se preparan como inyectables, bien como soluciones o suspensiones líquidas; formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, portadores líquidos antes de la inyección también se pueden preparar. La preparación también se puede emulsionar o encapsular en liposomas o micropartículas tales como polilactida, poliglicolida, o copolímero para un efecto adyuvante potenciado, como se discutió anteriormente (véase Langer, *Science* 249, 1527 (1990) y Hanes, *Advanced Drug Delivery Reviews* 28, 97-30 119 (1997). Los agentes de esta invención se pueden administrar en forma de una inyección de depósito o preparación de implante que pueden formularse de una manera tal que permita una liberación sostenida o pulsátil del ingrediente activo.

35 Las formulaciones adicionales adecuadas para otros modos de administración incluyen la vía oral, intranasal, y formulaciones pulmonares, supositorios, y aplicaciones transdérmicas.

Para supositorios, los aglutinantes y portadores incluyen, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; tales supositorios pueden formarse a partir de mezclas que contienen el ingrediente activo en el intervalo de 0,5% a 40 10%, preferiblemente 1%-2%. Las formulaciones orales incluyen excipientes, tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa y carbonato de magnesio. Estas composiciones toman la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y contienen 10%-95% de ingrediente activo, preferiblemente 25%-70%.

45 La aplicación tópica puede resultar en la liberación transdérmica o intradérmica. La administración tópica puede facilitarse mediante la coadministración del agente con toxina del cólera o derivados o subunidades desintoxicadas de los mismos u otras toxinas bacterianas similares (véase Glenn *et al.*, *Nature* 391, 851 (1998)). La coadministración puede lograrse mediante el uso de los componentes como una mezcla o como moléculas unidas obtenidas por reticulación química o expresión como una proteína de fusión.

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

55 VI. Métodos de Diagnóstico

La descripción proporciona métodos para detectar una respuesta inmune contra un péptido en un paciente que sufre de o es susceptible a la enfermedad de Alzheimer. Los métodos son particularmente útiles para el seguimiento de un curso de tratamiento que se administra a un paciente. Los métodos se pueden utilizar para controlar tanto el tratamiento terapéutico en pacientes sintomáticos como el tratamiento profiláctico en pacientes 60 asintomáticos. Los métodos son útiles para controlar tanto la inmunización activa (por ejemplo, anticuerpo producido en respuesta a la administración de inmunógeno,) como la inmunización pasiva (por ejemplo, el nivel de medición de anticuerpo administrado).

65 1. Inmunización activa

Algunos métodos implican determinar un valor de línea de base de una respuesta inmune en un paciente

antes de administrar una dosificación de agente, y comparar este con un valor para la respuesta inmune después del tratamiento. Un aumento significativo (*es decir*, mayor que el margen típico de error experimental en mediciones repetidas de la misma muestra, expresado como una desviación estándar de la media de tales mediciones) en el valor de la respuesta inmunitaria señala un resultado de tratamiento positivo (*es decir*, que la administración del agente ha logrado o aumentado una respuesta inmune). Si el valor para la respuesta inmune no se cambia significativamente, o se disminuye, un resultado de tratamiento negativo se indica. En general, se espera que pacientes sometidos a un ciclo inicial de tratamiento con un agente inmunogénico para mostrar un aumento de la respuesta inmunitaria con las dosificaciones sucesivas, que finalmente alcanza un nivel. La administración de agente se continúa generalmente mientras que la respuesta inmune se aumenta. El logro del nivel es un indicador de que la administración del tratamiento puede ser suspendido o reducido en la dosificación o frecuencia.

En otros procedimientos, un valor de control (*es decir*, una desviación media y estándar) de respuesta inmune se determina para una población control. Típicamente los individuos en la población control no han recibido tratamiento previo. Los valores medidos de respuesta inmune en un paciente después de la administración de un agente terapéutico se comparan entonces con el valor control. Un aumento significativo con respecto al valor de control (por ejemplo, mayor que una desviación estándar de la media) indica un resultado de tratamiento positivo. La falta de aumento significativo o una disminución indica un resultado de tratamiento negativo. La administración de agente se continúa generalmente mientras que la respuesta inmunitaria se aumenta con respecto al valor control. Como anteriormente, el logro de un nivel relativo a los valores de control es un indicador de que la administración de tratamiento puede interrumpirse o reducirse la frecuencia de la dosis.

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

En otros métodos, un paciente que no está recibiendo actualmente tratamiento pero se ha sometido a un curso previo de tratamiento se controla para la respuesta inmune para determinar si se requiere una reanudación del tratamiento. El valor medido de respuesta inmune en el paciente puede ser comparado con un valor de respuesta inmune previamente conseguido en el paciente después de un curso previo de tratamiento. Una disminución significativa relativa a la medición anterior (*es decir*, mayor que un margen típico de error en mediciones repetidas de la misma muestra) es una indicación de que el tratamiento puede reanudarse. Alternativamente, el valor medido en un paciente puede compararse con un valor de control (desviación media más estándar) determinado en una población de pacientes después de someterse a un curso de tratamiento. Alternativamente, el valor medido en un paciente puede compararse con un valor de control en poblaciones de pacientes tratados profilácticamente que permanecen libres de síntomas de la enfermedad, o poblaciones de pacientes tratados terapéuticamente que muestran mejora de características de la enfermedad. En todos estos casos, una disminución significativa relativa al nivel de control (*es decir*, más de una desviación estándar) es un indicador de que el tratamiento debe reanudarse en un paciente.

La muestra de tejido para el análisis es típicamente sangre, plasma, suero, fluido mucoso o cefalorraquídeo del paciente. La muestra se analiza para la indicación de una respuesta inmune a cualquier forma de péptido A β , típicamente A β 42. La respuesta inmunitaria puede determinarse a partir de la presencia de, por ejemplo, anticuerpos o células T que se unen específicamente al péptido A β . Métodos ELISA de detección de anticuerpos específicos para A β se describen en la sección de Ejemplos. Los métodos para detectar células T reactivas se han descrito anteriormente (véase Definiciones). En algunos procedimientos, la respuesta inmune se determina usando un ensayo de compensación, tal como se describe en la Sección III anterior. En tales métodos, una muestra de tejido de un paciente al que se examina se pone en contacto con depósitos amiloideos (por ejemplo, de un ratón PDAPP) y células fagocíticas que llevan receptores Fc. A continuación, se monitorea la eliminación posterior del depósito amiloide. La existencia y el grado de limpieza de respuesta proporciona una indicación de la existencia y nivel de anticuerpos eficaces para eliminar A β en la muestra de tejido del paciente al que se examina.

2. Inmunización pasiva

En general, los procedimientos para controlar la inmunización pasiva son similares a aquellos para controlar la inmunización activa descrita anteriormente. Sin embargo, el perfil de anticuerpos después de la inmunización pasiva típicamente muestra un pico inmediato en concentración de anticuerpos seguido por un decaimiento exponencial. Sin una dosificación adicional, el deterioro se aproxima a los niveles de pretratamiento dentro de un período de días a meses dependiendo de la semivida del anticuerpo administrado. Por ejemplo, la vida media de algunos anticuerpos humanos es del orden de 20 días.

En algunos métodos, una medición de línea de base de anticuerpo a A β en el paciente se realiza antes de la administración, una segunda medición se realiza poco después para determinar el nivel pico de anticuerpos, y una o más mediciones se realizan a intervalos para controlar la descomposición de los niveles de anticuerpos. Cuando el nivel de anticuerpo se ha reducido al valor basal o un porcentaje predeterminado del pico menos la línea de base (por ejemplo, 50%, 25% o 10%), se administra la administración de una dosificación adicional de anticuerpo. En algunos procedimientos, niveles medidos pico o posteriores menos el fondo se comparan con niveles de referencia determinados previamente para constituir un régimen de tratamiento profiláctico o terapéutico beneficioso en otros pacientes. Si el nivel de anticuerpo medido es significativamente menor que una administración de nivel de referencia (por ejemplo, menor que la media menos una desviación estándar del valor de referencia en la población de pacientes que se benefician del tratamiento) de una dosis adicional de anticuerpo se indica.

3. Kits de diagnóstico

La descripción proporciona además kits de diagnóstico para realizar los métodos de diagnóstico descritos anteriormente. Típicamente, dichos kits contienen un agente que se une específicamente a los anticuerpos a A β . El kit también puede incluir una etiqueta. Para la detección de anticuerpos frente a A β , la etiqueta está típicamente en forma de anticuerpos antiidiotípicos marcados. Para la detección de anticuerpos, el agente puede suministrarse preunido a una fase sólida, tal como a los pocillos de una placa de microtitulación. Los kits también contienen típicamente etiquetado que proporciona instrucciones de uso del kit. El etiquetado puede incluir también un gráfico u otros niveles de correlación de régimen de correspondencia de marcador medido con niveles de anticuerpos a A β . El término etiquetado se refiere a cualquier material escrito o registrado que está unido a, o de otra manera acompaña a un kit en cualquier momento durante su fabricación, transporte, venta o uso. Por ejemplo, el término etiquetado abarca panfletos y folletos publicitarios, materiales de embalaje, instrucciones, cintas de audio o de vídeo, discos informáticos, así como letra impresa directamente en los kits.

La descripción también proporciona kits de diagnóstico para llevar a cabo visualización *in vivo*. Dichos kits típicamente contienen un anticuerpo de unión a un epítopo de A β , preferentemente dentro de los residuos 1-10. Preferiblemente, el anticuerpo está marcado o un reactivo de marcaje secundario está incluido en el kit. Preferiblemente, el kit está etiquetado con instrucciones para realizar un ensayo de visualización *in vivo*.

VII. Visualización *in vivo*

La descripción proporciona métodos de visualización de depósitos amiloideos *in vivo* en un paciente. Tales métodos son útiles para diagnosticar o confirmar el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, o la susceptibilidad a la misma. Por ejemplo, los métodos se pueden utilizar en un paciente que presenta síntomas de demencia. Si el paciente tiene depósitos amiloideos anormales, entonces el paciente es probable que sufren de la enfermedad de Alzheimer. Los métodos también pueden ser utilizados en pacientes asintomáticos. La presencia de depósitos anormales de amiloide indica susceptibilidad a la enfermedad sintomática futura. Los métodos también son útiles para la monitorización de la progresión de la enfermedad y/o la respuesta al tratamiento en pacientes que han sido previamente diagnosticados con la enfermedad de Alzheimer.

Los métodos funcionan mediante la administración de un reactivo, tal como un anticuerpo, que se une a A β para el paciente y, a continuación, la detección del agente después de que se ha unido. Los anticuerpos preferidos se unen a depósitos de A β en un paciente sin unirse a polipéptido APP de longitud completa. Se prefieren particularmente los anticuerpos que se unen a un epítopo de A β dentro de aminoácidos 1-10. En algunos procedimientos, el anticuerpo se une a un epítopo dentro de los aminoácidos 7-10 de A β . Tales anticuerpos se unen típicamente sin inducir una respuesta sustancial de compensación. En otros métodos, el anticuerpo se une a un epítopo dentro de los aminoácidos 1-7 de A β . Tales anticuerpos se unen típicamente e inducen una respuesta de eliminación a A β . Sin embargo, la respuesta de eliminación puede evitarse usando fragmentos de anticuerpo que carecen de una región constante de longitud completa, tales como Fab. En algunos procedimientos, el mismo anticuerpo puede servir como un tratamiento y reactivo de diagnóstico. En general, los anticuerpos se unen a epítópos C-terminales de residuo 10 de A β no muestran una señal tan fuerte como anticuerpos que se unen a epítópos dentro de los residuos 1-10, presumiblemente debido a que los epítópos C-terminales son inaccesibles en depósitos amiloideos. Por consiguiente, dichos anticuerpos son menos preferidos.

Reactivos de diagnóstico pueden administrarse por inyección intravenosa en el cuerpo del paciente, o directamente en el cerebro por inyección intracraneal o taladro de un agujero a través del cráneo. La dosificación de reactivo debe estar dentro de los mismos intervalos que para los métodos de tratamiento. Típicamente, el reactivo está marcado, aunque en algunos métodos, el reactivo primario con afinidad por A β es no marcado y un agente de marcaje secundario se usa para unirse al reactivo primario. La elección del marcador depende de los medios de detección. Por ejemplo, un marcador fluorescente es adecuado para la detección óptica. El uso de marcadores paramagnéticos es adecuado para la detección tomográfica sin intervención quirúrgica. Los marcadores radiactivos también pueden detectarse usando PET o SPECT.

El diagnóstico se lleva a cabo comparando el número, tamaño y/o la intensidad de los marcadores a los valores de la línea base correspondiente. Los valores de la línea base pueden representar los niveles medios en una población de individuos no enfermos. Los valores de la línea base también pueden representar niveles previos determinados en el mismo paciente. Por ejemplo, los valores de la línea base pueden determinarse en un paciente 5 antes de comenzar el tratamiento, y los valores medidos a partir de entonces en comparación con los valores de la línea de base. Una disminución en los valores relativos a la línea de base de las señales de una respuesta positiva al tratamiento.

EJEMPLOS

10

I. EFICACIA PROFILÁCTICA DE A_β CONTRA EA

15

Estos ejemplos describen la administración de péptido A_β42 a ratones transgénicos que sobreexpresan APP con una mutación en la posición 717 (APP_{717V>F}) que los predispone a desarrollar neuropatología de tipo 20 Alzheimer. La producción y las características de estos ratones (ratones PDAPP) se describen en Games *et al.*, *Nature, supra*. Estos animales, en su forma heterocigota, comienzan a depositar A_β a los seis meses de edad hacia adelante. A los quince meses de edad presentan niveles de deposición A_β equivalente a la observada en la enfermedad de Alzheimer. Ratones PDAPP se inyectaron con A_β42 agregada (A_β42 agregada) o solución salina tamponada con fosfato. A_β42 agregada fue elegida debido a su capacidad para inducir anticuerpos frente a múltiples epítopos de A_β.

A. MÉTODOS

25

1. Fuente de ratones

30

Treinta ratones hembra heterogéneos PDAPP se dividieron aleatoriamente en los siguientes grupos: 10 ratones para ser inyectados con A_β42 agregada (uno murió en el tránsito), 5 ratones para ser inyectados con PBS/adyuvante o PBS y 10 controles no inyectados. Cinco ratones fueron inyectados con péptidos derivados de la secuencia de la proteína amiloide sérica (SAP).

2. Preparación de los inmunógenos

35

Preparación de A_β42 agregada: dos miligramos de A_β42 (US Peptides Inc, lote K-42-12) se disolvieron en 0,9 ml de agua y se completó hasta 1 ml mediante la adición de 0,1 ml de 10 x PBS. Esto se agitó con vórtex y se dejó incubar durante la noche 37°C, en cuyas condiciones el péptido se agregó. Cualquier A_β no usado se almacenó como un polvo liofilizado seco a 20°C hasta la siguiente inyección.

40

3. Preparación de las inyecciones

45

Para cada inyección, 100 µg de A_β42 agregada en PBS por ratón se emulsionó 1: 1 con Adyuvante Completo de Freund (CFA) en un volumen final de 400 µl de emulsión para la primera inmunización, seguido de un refuerzo de la misma cantidad de inmunógeno en Adyuvante Incompleto de Freund (IFA) a las 2 semanas. Dos dosis adicionales en IFA se administraron a intervalos mensuales. Las inmunizaciones posteriores se realizaron a intervalos mensuales en 500 µl de PBS. Las inyecciones se administraron por vía intraperitoneal (i.p.).

50

Las inyecciones de PBS siguieron el mismo horario y los ratones fueron inyectados con una mezcla 1: 1 de PBS/adyuvante a 400 µl por ratón, o 500 µl de PBS por ratón. Las inyecciones SAP igualmente siguieron el mismo programa usando una dosis de 100 µg por inyección.

4. Titulación de sangrado de ratón, preparación del tejido e inmunohistoquímica

55

Los métodos anteriores se describen infra en materiales y procedimientos generales.

B. RESULTADOS

60

Los ratones PDAPP se inyectaron bien con A_β42 agregada (A_β42 agregada), péptidos SAP o salina tamponada con fosfato. A un grupo de ratones PDAPP también se le dejó como control positivo no inyectado. Los títulos de los ratones a A_β42 agregada se monitorearon cada dos meses a partir del cuarto impulso hasta que los ratones tenían un año de edad. Los ratones se sacrificaron a los 13 meses. En todos los puntos de tiempo examinados, ocho de los nueve ratones A_β42 agregados desarrollaron un título alto de anticuerpos, que se mantuvo alto durante toda la serie de inyecciones (títulos mayores que 1/10000). El noveno ratón tenía un título bajo, pero medible de aproximadamente 1/1000 (figura 1, tabla 1). Ratones inyectados por SAP tenían títulos de 1: 1.000 a 1: 30.000 para este inmunógeno con sólo un único ratón superior a 1: 10.000.

5 Los ratones tratados con PBS se titularon contra A β 42 agregada a los seis, diez y doce meses. En una dilución 1/100 de los ratones PBS, cuando se titulan contra A β 42 agregada, sólo superada 4 veces el fondo en un punto de datos, de lo contrario, eran menos de 4 veces el fondo en todos los puntos del tiempo (Tabla 1). La respuesta SAP específica era insignificante en estos puntos de tiempo con todos los títulos de menos de 300.

10 Siete de los nueve ratones en el grupo tratado A β 1-42 agregada no tenían amiloide detectable en sus cerebros. En contraste, el tejido cerebral de los ratones en grupos SAP y PBS contenía numerosos depósitos amiloideos en el hipocampo, así como en las cortezas frontal y cingulada. El patrón de la deposición era similar al de los controles no tratados, con implicación característica de subregiones vulnerables, tales como la capa molecular externa del giro dentado del hipocampo. Un ratón del grupo inyectado A β 1-42 tenía una carga de amiloide enormemente reducida, confinada en el hipocampo. Una placa aislada se identificó en otro ratón tratado por A β 1-42.

15 15 El análisis de imagen cuantitativo de la carga amiloide en el hipocampo verificó la dramática reducción lograda en los animales tratados con A β 42(AN1792) (Fig. 2). Los valores de la mediana de la carga de amiloide para el grupo PBS (2,22%), y para el grupo de control no tratado (2,65%) fueron significativamente mayores que para los inmunizados con AN1792 (0,00%, p = 0,0005). En contraste, el valor mediano para el grupo inmunizado con péptidos SAP (SAPP) era del 5,74%. El tejido cerebral de los ratones de control no tratados contenía numerosos depósitos amiloideos A β visualizados con el anticuerpo monoclonal A β específico (mAb) 3D6 en el hipocampo, así como en la corteza retroesplenial. Un patrón similar de deposición de amiloide se observó también en ratones inmunizados con SAPP o PBS (Fig. 2). Además, en estos últimos tres grupos hubo una implicación característica de subregiones vulnerables del cerebro visto clásicamente en EA, tales como la capa molecular externa del giro dentado del hipocampo, en los tres de estos grupos.

20 25 Los cerebros que no contenían depósitos A β también estaban desprovistos de placas neuríticas que normalmente se visualizan en ratones PDAPP con el anticuerpo humano APP 8E5. Todos los cerebros de los grupos restantes (inyectados con SAP, PBS y ratones no inyectados) tenían numerosas placas neuríticas típicas de los ratones PDAPP no tratados. Un pequeño número de placas neuríticas estaba presente en un ratón tratado con AN1792, y un único grupo de neuritas distróficas se encontró en un segundo ratón tratado con AN1792. Análisis de imagen del hipocampo, y se muestran en la FIG. 3, demostraron la práctica eliminación de las neuritas distróficas en los ratones tratados con AN1792 (mediana 0,00%) en comparación con los receptores de PBS (mediana 0,28%, p = 0,0005). Astrocitosis característica de la inflamación asociada a placa también estaba ausente en los cerebros del grupo inyectado A β 1-42. Los cerebros de los ratones en los otros grupos contenían astrocitos GFAP positivos abundantes y agrupados típicos de gliosis A β asociada a placas. Un subconjunto de las diapositivas reaccionadas por GFAP se contratiñeron con tioflavina S para localizar los depósitos A β . Los astrocitos GFAP positivos se asociaron con placas A β en el SAP, PBS y controles no tratados. Ninguna asociación de este tipo se encontró en los ratones tratados con A β 142 de placa negativa, mientras gliosis asociada a placas mínima se identificó en un ratón tratado con AN1792.

30 40 Los análisis de imágenes, mostrados en la FIG. 4 para la corteza retroesplenial, verificaron que la reducción en la astrocitosis fue significativa con un valor medio de 1,56% para los tratados con AN1792 frente a valores medianos mayores del 6% para los grupos inmunizados con péptidos SAP, PBS o (p = 0,0017) no tratado.

45 45 Evidencia de un subconjunto de los ratones A β 42 y PBS indicó que inmunorreactividad de MHC II asociada a placas estaba ausente en los ratones inyectados por A β 1-42, en consonancia con la falta de una respuesta inflamatoria relacionada con A β .

50 55 Las secciones de los cerebros de ratón también se hicieron reaccionar con un mAb específico con un anticuerpo monoclonal específico para MAC-1, una proteína de superficie celular. MAC-1-(CD11b) es un miembro de la familia de integrinas y existe como un heterodímero con CD18. El complejo CD11b/CD18 está presente en monocitos, macrófagos, neutrófilos y células asesinas naturales (Mak y Simard). Es probable que el tipo de células MAC-1-reactivo residente en el cerebro es microglia basada en la morfología fenotípica similar en secciones inmunoreaccionadas por MAG-1. El etiquetado de MAC-1 asociada a placas era inferior en los cerebros de los ratones tratados con AN1792 en comparación con el grupo de control PBS, un hallazgo consistente con la falta de una respuesta inflamatoria inducida por A β .

C. CONCLUSIÓN

60 65 La falta de placas de A β y cambios neuronales y glióticos reactivos en los cerebros de los ratones inyectados con A β 1-42 indican que ninguno o extremadamente poco amiloide se depositaron en sus cerebros, y consecuencias patológicas, tales como gliosis y patología neurítica, estaban ausentes. Los ratones PDAPP tratados con A β 1-42 muestran esencialmente la misma falta de patología que los ratones de control no transgénicos. Por lo tanto, las inyecciones A β 1-42 son altamente efectivas en la prevención de la deposición o el aclaramiento de A β humana a partir de tejido cerebral, y la eliminación de cambios degenerativos neuronales e inflamatorios posteriores. Así, la administración de péptido A β puede tener beneficio tanto preventivo como terapéutico en la prevención de la

EA.

II. ESTUDIO DE LA RESPUESTA DE DOSIS

5 Grupos de ratones Swiss Webster de cinco semanas de edad, (N = 6 por grupo) se inmunizaron con 300, 100, 33, 11, 3,7, 1,2, 0,4 o 0,13 ug de A β formulada en CFA/IFA administrado por vía intraperitoneal. Tres dosis se administraron a intervalos bisemanales seguido por una cuarta dosis un mes más tarde. La primera dosis se emulsionó con CFA y las dosis restantes se emulsionaron con IFA. Los animales se sangraron 47 días después de cada inmunización de partida después de la segunda dosis para la medición de los títulos de anticuerpos. Los animales en un subconjunto de tres grupos, los inmunizados con 11, 33, o 300 μ g de antígeno, se sangraron adicionalmente a intervalos aproximadamente mensuales durante cuatro meses tras la cuarta inmunización para controlar la descomposición de la respuesta de anticuerpos a través de una gama de dosis de formulaciones inmunogénicas. Estos animales recibieron una quinta inmunización final a los siete meses después del inicio del estudio. Se sacrificaron una semana más tarde para medir respuestas de anticuerpos a AN1792 y para realizar análisis toxicológicos.

20 Se observó una respuesta a la dosis decreciente 300 a 3,7 μ g sin respuesta en las dos dosis más bajas. La media de los títulos de anticuerpos son de aproximadamente 1: 1000 después de 3 dosis y de aproximadamente 1: 10,000 tras 4 dosis de 11-300 μ g de antígeno (véase FIG. 5).

25 Los títulos de anticuerpos se aumentaron espectacularmente para todos excepto para el grupo de dosis más bajo después de la tercera inmunización con aumentos en GMT que van de 5 a 25 veces. Las respuestas de anticuerpos bajas fueron entonces detectables, incluso para los receptores de 0,4 μ g. Los grupos de 1,2 y 3,7 μ g tenían títulos comparables con GMT de aproximadamente 1000 y los cuatro dosis más altas agrupados junto con GMT de aproximadamente 25.000, con la excepción del grupo de dosis 33 μ g con un GMT inferior de 3000. Tras la cuarta inmunización, el incremento de título era más modesto para la mayoría de los grupos. Hubo una respuesta a la dosis clara en todos los grupos de dosis de antígeno inferior desde 0,14 μ g a 11 μ g que van desde ningún anticuerpo detectable para los receptores de 0,14 μ g a un GMT de 36.000 para los receptores de 11 μ g. Una vez más, los títulos para los cuatro grupos de dosis más altas de 11 a 300 μ g se agruparon juntos. Por lo tanto, tras dos inmunizaciones, el título de anticuerpos era dependiente de la dosis de antígeno a través del amplio intervalo desde 0,4 hasta 300 μ g. Llegado a la tercera inmunización, los títulos de las cuatro dosis más altas eran comparables y se mantuvieron en un nivel tras una inmunización adicional. Un mes después de la cuarta inmunización, los títulos fueron de 2 a 3 posiciones mayores en el grupo 300 μ g que los medidos a partir de la sangre extraída cinco días después de la inmunización (Fig. 6). Esta observación sugiere que la respuesta de anticuerpos anamnésica pico se produjo más tarde de 5 días después de la inmunización. Un aumento más modesto (50%) se observó en este momento en el grupo de 33 μ g. En el grupo de dosis de 300 μ g a los dos meses después de la última dosis, los GMT declinaron abruptamente en un 70%. Después de otro mes, la disminución era menos pronunciada al 45% (100 μ g) y aproximadamente 14% para las dosis 33 y 11 μ g. Por lo tanto, la tasa de disminución en los títulos de anticuerpos circulantes tras el cese de la inmunización parece ser bifásica con una disminución pronunciada el primer mes tras la respuesta de pico seguida por una tasa más modesta de disminución a partir de entonces.

30 Los títulos de anticuerpos y la cinética de la respuesta de éstos ratones Swiss Webster son similares a los de ratones transgénicos PDAPP heterocigotos jóvenes inmunizados de una manera paralela. Las dosificaciones eficaces para inducir una respuesta inmune en los seres humanos son típicamente similares a las dosificaciones eficaces en ratones.

III. EXAMEN PARA EFICACIA TERAPÉUTICA CONTRA EA ESTABLECIDA

35 Este ensayo está diseñado para examinar agentes inmunogénicos para la actividad en la detención o reversión características neuropatológicas de la EA en animales de edad avanzada. Las inmunizaciones con 42 aminoácidos de A β larga (1792) se iniciaron en un punto de tiempo cuando las placas amiloides ya están presentes en los cerebros de los ratones PDAPP.

40 En el transcurso de tiempo utilizado en este estudio, los ratones PDAPP no tratados desarrollan un número de cambios neurodegenerativos que se asemejan a los encontrados en la EA (Games *et al.*, *supra* y Johnson-Wood *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 94, 1550-1555 (1997)). La deposición de A β en placas amiloides se asocia con una respuesta neuronal degenerativa que consiste en elementos axonales aberrantes y dendríticos, denominados neuritas distróficas. Los depósitos amiloides que están rodeados de y contienen neuritas distróficas llamadas placas neuríticas. Tanto en ratón EA como ratón PDAPP, las neuritas distróficas tienen una estructura globular distintiva, son inmunorreactivas con un panel de anticuerpos que reconocen APP y componentes del citoesqueleto y muestran cambios degenerativos subcelulares complejos en el nivel ultraestructural. Estas características permiten mediciones relevantes a la enfermedad, selectivas y reproducibles de la formación de placas neuríticas en el cerebro PDAPP. El componente neuronal distrófico de las placas neuríticas de PDAPP se visualiza fácilmente con un anticuerpo específico para APP humana (anticuerpo monoclonal 8E5), y es fácilmente medible por análisis de imagen asistida por ordenador. Por lo tanto, además de medir los efectos de AN1792 sobre la formación de la placa amiloide, se monitorearon los efectos de este tratamiento en el desarrollo de la distrofia neurítica.

5 Los astrocitos y la microglía son células no neuronales que responden y reflejan el grado de lesión neuronal. Los astrocitos de GFAP positivo y microglia de MHC II positivo se observan comúnmente en la EA, y sus aumentos de la activación con la gravedad de la enfermedad. Por lo tanto, también monitoreamos el desarrollo de astrocitosis reactiva y microgliosis en los ratones tratados con AN1792.

A. Materiales y Métodos

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

20 La metodología era como en el Ejemplo 1 salvo que se indique lo contrario. Los péptidos de EE.UU. de lote 12 y péptidos de California lote ME0339 de AN1792 se utilizó para preparar el antígeno para las seis inmunizaciones administradas antes del punto de tiempo de 15 meses. Los péptidos de California lotes ME0339 y ME0439 se utilizaron para las tres inmunizaciones adicionales administradas entre los 15 y 18 meses.

25 Para las inmunizaciones, 100 µg de AN1792 en 200 µl PBS o PBS solo se emulsionó 1: 1 (vol: vol) con Adyuvante Completo de Freund (CFA) o Adyuvante Incompleto de Freund (IFA) o PBS en un volumen final de 400 µl. La primera inmunización se administró con CFA como adyuvante, las siguientes cuatro dosis se administraron con TFA y las últimas cuatro dosis con PBS solo sin adyuvante añadido. Un total de nueve inmunizaciones se administraron durante el período de siete meses en un programa de dos semanas para las tres primeras dosis seguido por un intervalo de cuatro semanas para las inyecciones restantes. El grupo de tratamiento de cuatro meses, eutanasiado a los 15 meses de edad, recibió sólo las 6 primeras inmunizaciones.

35 B. Resultados

1. Efectos de tratamiento AN1792 en carga de amiloide

40 Los resultados de un tratamiento AN1792 sobre la carga amiloide cortical determinada por análisis de imagen cuantitativo se muestran en la FIG. 7. El valor mediano de la carga de amiloide cortical era del 0,28% en un grupo de ratones PDAPP de 12 meses no tratado, un valor representativo de la carga de placa en ratones al inicio del estudio. A los 18 meses, la carga de amiloide se aumentó más de 17 veces a 4,87% en los ratones tratados por PBS, mientras que ratones tratados por AN1792 tenían una gran reducción de la carga de amiloide de sólo el 0,01%, en particular menos de los grupos de 12 meses no tratados y grupos tratados con PBS tanto de 15 como de 18 meses. La carga amiloide se redujo significativamente en los receptores AN1792 tanto a 15 (reducción del 96%; p = 0,003) como a 18 (> 99% de reducción; p = 0,0002) meses.

45 Normalmente, la deposición amiloide cortical en ratones PDAPP se inicia en las cortezas frontal y retroesplenial (RSC) y progresó en una dirección ventral-lateral para implicar las cortezas temporal y entorinal (CE). Poco o ningún amiloide se encontró en la CE de ratones de 12 meses, la edad aproximada en la que se administró primero AN1792. Después de 4 meses de un tratamiento de AN1792, la deposición de amiloide se redujo en gran medida en la RSC, y la implicación progresiva de la CE se eliminó completamente mediante un tratamiento AN1792. Esta última observación demostró que AN1792 detuvo completamente la progresión de amiloide que normalmente invadiría las cortezas temporal y ventral, así como deposición detenida o posiblemente invertida en la RSC.

55 Los profundos efectos de tratamiento de AN1792 en el desarrollo de la carga de amiloide cortical en los ratones PDAPP se demuestran adicionalmente por el grupo de 18 meses, que se había tratado durante siete meses. Una ausencia casi completa de amiloide cortical se encontró en el ratón tratado con AN1792, con una falta total de placas difusas, así como una reducción en los depósitos compactados.

60 2. Cambios celulares y morfológicos asociados a tratamiento AN1792

65 Una población de células A_β-positivas se encontró en regiones del cerebro que normalmente contienen depósitos amiloideos. Notablemente, en varios cerebros de receptores AN1792, se encontraron muy pocas placas o ninguna de amiloide cortical extracelular. La mayoría de la inmunorreactividad A_β parecía estar contenida dentro de

las células con gran soma lobular o agrupada. Fenotípicamente, estas células se parecían a microglia o monocitos activados. Eran inmunorreactivas con anticuerpos que reconocen ligandos expresados por monocitos activados y microglia (MHC II y CD11b) y se asociaron ocasionalmente con la pared o lumen de los vasos sanguíneos. La comparación de secciones casi adyacentes marcadas con anticuerpos de A β y MHC II específicos reveló que 5 patrones similares de estas células fueron reconocidos por ambas clases de anticuerpos. El examen detallado de los cerebros de la AN1792 reveló que las células MHC II positivas estaban restringidas a las proximidades del amiloide limitado que queda en estos animales. En las condiciones de fijación empleadas, las células no eran 10 inmunorreactivas con anticuerpos que reconocen los ligandos de células T (CD3, CD3e) o células B (CD45RA, CD45RB) o antígeno común de leucocitos (CD45), pero eran reactivas con un anticuerpo que reconoce leucosialina (CD43), que reacciona cruzadamente con monocitos. No se encontraron tales células en cualquiera de los ratones tratados por PBS.

15 Los ratones PDAPP invariablemente desarrollan la deposición de amiloide pesado en la capa molecular exterior del giro dentado del hipocampo. La deposición forma una racha distinta dentro de la vía perforante, una subregión que contiene clásicamente placas amiloides en la EA. La aparición característica de estos depósitos en los ratones tratado por PBS se parecía a la caracterizada anteriormente en los ratones no tratados por PDAPP. La deposición de amiloide consistía en ambas placas difusas y compactadas en una banda continua. En contraste, en 20 un número de cerebros de ratones tratados por AN1792 este patrón estaba drásticamente alterado. El depósito de amiloide del hipocampo ya no contenía amiloide difuso, y el patrón de bandas se interrumpió completamente. En cambio, un número de estructuras punteadas inusuales estaban presentes que son reactivas con anticuerpos anti-A β , varias de las cuales parecían ser células que contienen amiloide.

25 Células MHC II-positivas se observaron frecuentemente en la proximidad de amiloide extracelular en animales tratados con AN1792. El patrón de asociación de células A β positivas con amiloide era muy similar en varios cerebros de ratones AN1792. La distribución de estas células monocíticas estaba restringida a la proximidad del amiloide depositado y estaba completamente ausente de otras regiones cerebrales desprovistas de placas A β . La microscopía confocal de secciones etiquetadas por MHCII y A β reveló que el material de la placa estaba contenida dentro de muchas de las células monocíticas.

30 Análisis cuantitativo de imágenes de secciones etiquetadas por MHC II y MAC I puso de manifiesto una tendencia hacia una mayor inmunoreactividad en la RSC y en el hipocampo de ratones tratados con AN1792 en comparación con el grupo PBS que alcanzó significación con la medición de reactividad MAC 1 en el hipocampo.

35 Estos resultados son indicativos del aclaramiento activo, mediado por células de amiloide en regiones del cerebro que soportan placa.

3. Efectos AN1792 sobre los niveles de A β : Determinaciones ELISA

40 (a) Niveles corticales

45 En ratones PDAPP no tratados, el nivel mediano de A β total en la corteza a los 12 meses era de 1.600 ng/g, el cual se incrementó a 8.700 ng/g a los 15 meses (Tabla 2). A los 18 meses el valor era de 22.000 ng/g, un aumento de más de 10 veces durante el curso del tiempo del experimento. Animales tratados con PBS tuvieron A β total de 8.600 ng/g a los 15 meses, aumentándose a 19.000 ng/g a los 18 meses. En contraste, animales tratados con 1792 tenían 81% menos A β total a los 15 meses (1.600 ng/g) que el grupo inmunizado por PBS. Significativamente, menos ($p = 0,0001$) A β total (5.200 ng/g) se encontró a los 18 meses cuando se compararon los grupos AN1792 y PBS (Tabla 2), lo que representa una reducción del 72% del A β que de otra manera estaría presente. Se obtuvieron resultados similares cuando se compararon los niveles corticales de A β 42, es decir, que el 50 grupo tratado con AN1792 contenía mucho menos AB42, pero en este caso las diferencias entre los grupos AN1792 y PBS fueron significativas tanto a los 15 meses ($p = 0,04$) como a los 18 meses ($p = 0,0001$, Tabla 2).

Tabla 2: Niveles medianos de A β (ng/g) en la corteza

		NO TRATADO			PBS			AN1792		
Edad	Total	A β 42	(n)	Total	A β 42	(n)	Total	A β 42	(n)	
12	1600	1300	(10)							
15	8700	8300	(10)	8600	7200	(9)	1600	1300 *	(10)	
18	22.200	18.500	(10)	19.000	15.900	(12)	5,200**	4,000 **	(9)	

* $p = 0,0412$
** $p = 0,0001$

(b) Niveles de hipocampo

En ratones PDAPP no tratados, los niveles de hipocampo medianos de A β total a los doce meses de edad fueron de 15.000 ng/g, aumentándose a 51.000 ng/g a los 15 meses y adicionalmente a 81.000 ng/g a los 18 meses (tabla 3). Del mismo modo, ratones inmunizados por PBS mostraron valores de 40.000 ng/g y 65.000 ng/g a los 15 meses y 18 meses, respectivamente. Animales inmunizados por AN1792 mostraron menos A β total, específicamente 25.000 ng/g y 51.000 ng/g en los respectivos puntos de tiempo de 15 meses y 18 meses. El valor de grupo tratado AN1792 a los 18 meses era significativamente inferior que el del grupo tratado con PBS ($p = 0,0105$; Tabla 3). La medición de A β 42 dio el mismo patrón de resultados, a saber, que los niveles en el grupo tratado con AN1792 fueron significativamente más bajos que en el grupo PBS (39.000 ng/g vs. 57.000 ng/g, respectivamente; $p = 0,002$) en la evaluación de 18 meses (Tabla 3).

Tabla 3: Niveles medianos de A β (ng/g) en el hipocampo

	NO TRATADO			PBS			AN1792		
Edad	Total	A β 42	(n)	Total	A β 42	(n)	Total	A β 42	(n)
12	15.500	11.100	(10)						
15	51.500	44.400	(10)	40.100	35.70	(9)	24.50	22.100	(10)
18	80.800	64.200	(10)	65.400	57.10	(12)	50.90	38.900 **	(9)

* $p = 0,0105$
** $p = 0,0022$

(c) Niveles cerebelares

En ratones PDAPP no tratados a los 12 meses, el nivel cerebeloso mediano del A β total era de 15 ng/g (Tabla 4). A los 15 meses, esta mediana se aumentó hasta 28 ng/g y a los 18 meses había aumentado a 35 ng/g. Animales tratados por PBS muestran valores medianos de A β total de 21 ng/g a los 15 meses y 43 ng/g a los 18 meses. Se encontró que animales tratados con AN1792 tenían 22 ng/g de A β total a los 15 meses y significativamente menos ($p = 0,002$) A β total a los 18 meses (25 ng/g) que el grupo de PBS correspondiente (Tabla 4).

Tabla 4: Niveles de A β mediana (ng/g) en el cerebro

	NO TRATADO		PBS		AN1792	
Edad	A β Total	(n)	A β Total	(n)	A β Total	(n)
12	15,6	(10)				
15	27,7	(10)	20,8	(9)	21,7	(10)
18	35,0	(10)	43,1	(12)	24,8 *	(9)

* $p = 0,0018$

4. Efectos de tratamiento AN1792 sobre los niveles de APP

APP- α y la molécula de APP de longitud completa contienen toda o parte de la secuencia de A β y por lo tanto podrían estar potencialmente afectados por la generación de una respuesta inmune dirigida por AN1792. En los estudios realizados hasta la fecha, un ligero aumento en los niveles de APP ha sido notado a medida que aumenta la neuropatología en el ratón PDAPP. En la corteza, los niveles de cualquiera de APP- α /FL (longitud completa) o APP- α eran esencialmente sin cambios por el tratamiento con la excepción de que APP- α se redujo en un 19% en el punto de tiempo de 18 meses en el AN1792 vs. el grupo tratado por PBS. Los valores APP de 18 meses tratados con AN1792 no fueron significativamente diferentes de los valores de los grupos PBS no tratados de 12 meses y 15 meses y de 15 meses. En todos los casos los valores APP permanecieron dentro de los intervalos

que se encuentran normalmente en ratones PDAPP.

5. Efectos de tratamiento AN1792 en patología neurodegenerativa y gliótica

5 La carga de placa neurítica se redujo significativamente en la corteza frontal de ratones tratados por AN1792 en comparación con el grupo PBS tanto a 15 (84%; $p=0,03$) como 18 (55%; $p = 0,01$) meses de edad (Fig. 8). El valor mediano de la carga de placa neurítica se aumentó de 0,32% a 0,49% en el grupo de PBS entre los 15 y 18 meses de edad. Esto contrastaba con la gran reducción de desarrollo de placas neuríticas en el grupo AN1792, con valores medianos de carga de placas neuríticas de 0,05% y 0,22%, en los grupos de 15 y 18 meses, respectivamente.

10 15 Inmunizaciones con AN1792 parecían estar bien toleradas y astrocitosis reactiva también se redujo significativamente en la RSC de ratones AN1792 cuando se compara con el grupo PBS tanto a 15 (56%; $p = 0,011$) como 18 (39%; $p = 0,028$) meses de edad (Fig. 9). Valores medianos de los valores del porcentaje de astrocitosis en el grupo de PBS aumentaron entre los 15 y 18 meses de 4,26% a 5,21%. El tratamiento de AN1792 suprimió el desarrollo de astrocitosis en ambos puntos temporales de 1,89% y 3,2%, respectivamente. Esto sugiere que la neurópila no estaba siendo dañado por el proceso de despacho.

20 6. Respuestas de anticuerpos

25 Tal como se describió anteriormente, ratones PDAPP heterocigotos de 11 meses de edad ($N = 24$) recibió una serie de 5 inmunizaciones de 100 μ g de AN1792 emulsionado con adyuvante de Freund y se administró por vía intraperitoneal en las semanas 0, 2, 4, 8 y 12, y una sexta inmunización con PBS solo (adyuvante no de Freund) en la semana 16. Como control negativo, un conjunto paralelo de 24 ratones transgénicos ajustado por edad recibió inmunizaciones de PBS emulsionado con los mismos adyuvantes y la administración de produjo en el mismo horario. Los animales se sangraron dentro del plazo de tres a siete días después de cada inmunización comenzando tras la segunda dosis. Las respuestas de anticuerpos a AN1792 se midieron por ELISA. Los títulos medios geométricos (GMT) para los animales que fueron inmunizados con AN1792 eran de aproximadamente 1.900, 7.600 y 45.000 tras la segunda, tercera y última (sexta) dosis, respectivamente. Ningún anticuerpo A β específico se midió en los animales de control tras la sexta inmunización.

30 35 Aproximadamente una mitad de los animales fueron tratados durante un período adicional de tres meses, recibiendo inmunizaciones aproximadamente a 20, 24 y 27 semanas. Cada una de estas dosis se administró en portador de PBS solo sin adyuvante de Freund. Los títulos medios de anticuerpos permanecieron sin cambios durante este período de tiempo. De hecho, los títulos de anticuerpos parecieron permanecer estables desde el cuarto al octavo sangrado de purga correspondiente a un período que cubre la quinta a la novena inyección.

40 45 Para determinar si los anticuerpos de A β específicos provocados por la inmunización que se detectaron en el suero de un ratón tratado por A β 1792 también se asociaron con amiloide cerebral depositado, un subconjunto de las secciones de los ratones tratados por AN1792 y PBS se hicieron reaccionar con un anticuerpo específico para IgG de ratón. En contraste con el grupo PBS, placas A β en los cerebros tratados con AN1792 se recubrieron con IgG endógena. Esta diferencia entre los dos grupos se observó en ambos grupos de 15 de 18 meses. Particularmente sorprendente era la falta de etiquetado en el grupo de PBS, a pesar de la presencia de una carga de amiloide pesada en estos ratones. Estos resultados muestran que la inmunización con una proteína A β sintética genera anticuerpos que reconocen y se unen *in vivo* a la A β en las placas amiloides.

50 7. Las respuestas inmunes mediadas por células

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

60 C. Conclusión

65 Los resultados de este estudio muestran que inmunización AN1792 de ratones PDAPP que poseen depósitos amiloides existentes ralentizan y evitan la deposición amiloide progresiva y retardan los cambios neuropatológicos consecuentes en el cerebro envejecido de ratón PDAPP. Inmunizaciones con AN1792 detuvieron esencialmente amiloide en desarrollo en estructuras que normalmente sucumbirían a la amiloidosis. Así, la administración de un péptido A β tiene beneficio terapéutico en el tratamiento de la EA.

IV. EXAMEN DE FRAGMENTOS A_β

5 Ratones 100 PDAPP de 9-11 meses de edad se inmunizaron con 9 regiones diferentes de APP y A_β para determinar qué epítotos transmiten la respuesta eficaz. Los 9 inmunógenos diferentes y un control se inyectaron i.p. como se describe anteriormente. Los inmunógenos incluyen cuatro conjugados de péptido A_β humanos 1-12, 13-28, 32-42, 1-5, acoplados a IgG anti-ratón de oveja mediante un enlace de cistina; aminoácidos de polipéptidos APP 592695, A_β agregada humana 1-40, y A_β agregada humana 25-35, y A_β42 agregada de roedor. A_β42 y PBS 10 agregadas se utilizaron como controles positivos y negativos, respectivamente. Se usaron diez ratones por grupo de tratamiento. Los títulos se controlaron como anteriormente y los ratones se sacrificaron al final de los 4 meses de inyecciones. Histoquímica, niveles de A_β, y análisis de toxicología se determinó post mortem.

A. Materiales y métodos

15 1. Preparación de inmunógenos

Preparación de péptidos A_β acoplados: cuatro conjugados de péptidos humanos A_β (residuos de aminoácidos 1-5, 1-12, 13-28, y 32-42, cada uno conjugado con IgG anti-ratón de oveja) se prepararon por acoplamiento a través de una cisteína artificial añadida al péptido A_β usando la sulfo-EMCS reactiva de reticulación. 20 Los derivados de péptidos A_β se sintetizaron con las siguientes secuencias de aminoácidos final. En cada caso, la ubicación del residuo de cisteína insertado está indicada mediante subrayado. El derivado de péptido A_β13-28 también tenía dos residuos de glicina añadidos antes de la cisteína terminal de carboxilo como se indica.

25 Péptido A_β1-12 NH2-DAEFRHDSGYEVC-COOH
 Péptido A_β1-5 NH2-DAEFRCC-COOH
 Péptido A_β33-42 NH2-C-amino-ácido heptanoico GLMVGGVVIA-COOH
 Péptido A_β13-28 Ac-NH-HHQICLVFFAEDVGSNKGGC-COOH

30 Para prepararse para la reacción de acoplamiento, diez mg de anti-ratón de oveja (Jackson ImmunoResearch Laboratories) se dializó durante la noche frente a tampón de borato de sodio de 10 mM, pH 8,5. El anticuerpo dializado se concentró hasta un volumen de 2 ml utilizando un tubo Amicon Centriprep. Diez mg sulfo-EMCS

35 [N (ε-maleimidocuproiloxi) succinimida] (Molecular Sciences Co.) se disolvió en un agua desionizada mL. Se añadió un exceso molar de 40 veces de sulfo-EMCS gota a gota con agitación a IgG anti-ratón de oveja y y después la solución se agitó durante un período adicional de diez mm. La IgG anti-ratón de oveja activada se purificó y se intercambió el tampón mediante el paso sobre una columna de filtración de gel de 10 mL (Columna Pierce Presto, obtenida de Pierce Chemicals) equilibrada con 0,1 M NaPO₄, 5 mM EDTA, pH 6,5. Fracciones que contienen anticuerpo, identificadas mediante absorbancia a 280 nm, se agruparon y se diluyeron a una concentración de aproximadamente 1 mg/mL, usando 1,4 mg por DO como coeficiente de extinción. Un exceso molar de 40 veces de péptido A_β se disolvió en 20 mL de 10 mM NaPO₄, pH 8,0, con la excepción del péptido A_β33-42 para lo cual 10 mg 40 primero se disolvió en 0,5 mL de DMSO y después se diluyó a 20 mL con el tampón 10mM NaPO₄. Las soluciones de péptidos se agregaron cada uno a 10 mL de IgG anti-ratón de oveja activada y se sacudieron a temperatura ambiente durante 4 h. Los conjugados resultantes se concentraron hasta un volumen final de menos de 10 mL 45 usando un tubo Amicon Centriprep y luego se dializaron frente a PBS para intercambiar el tampón y eliminar el péptido libre. Los conjugados se pasaron a través de filtros de tamaño de poro 0,22 μm para la esterilización y a continuación en alícuotas en fracciones de 1 mg y se almacenaron congelados a -20°C. Las concentraciones de los conjugados se determinaron utilizando el ensayo de proteína BCA (Pierce Chemicals) con IgG de caballo para la curva estándar. La conjugación se documentó por el aumento del peso molecular de los péptidos conjugados con respecto al de la IgG anti-ratón de oveja activada. El conjugado anti-ratón de oveja A_β 1-5 era un depósito de dos 50 conjugaciones, el resto eran de una sola preparación.

2. Preparación de péptidos A_β agregados

55 Péptidos 1-40 humanos (AN1528; California Peptides Inc., Lote ME0541), 1-42 humanos (AN1792; California Peptides Inc., Lotes ME0339 y ME0439), 25-35 humanos, y 1-42 roedores (California Peptides Inc., Lote ME0218) estaban recién solubilizaeow para la preparación de cada conjunto de inyecciones de polvos liofilizados que se habían almacenado desecados a 20°C. Para este fin, se añadieron dos mg de péptido a 0,9 ml de agua desionizada y la mezcla se agitó con vórtex para generar una solución relativamente uniforme o suspensión. De los cuatro, AN1528 era el único péptido soluble en esta etapa. A alícuota de 100 μl de 10X PBS (1X PBS: 0,15 M NaCl, 0,01 M fosfato de sodio, pH 7,5) se añadió entonces en cuyo momento AN1528 comenzó a precipitarse. La suspensión se agitó con vórtex de nuevo y se incubó durante la noche a 37°C para su uso el día siguiente.

60 65 Preparación de la proteína pBx6: Se construyó un plásmido de expresión que codifica pBx6, una proteína de fusión que consta de la secuencia líder N-terminal de polimerasa MS-2 de bacteriófago 100-aminoácido seguido por los aminoácidos 592-695 de APP (βAPP) se construyó como se describe por Oltersdorf *et al.*, J. Biol. Chem. 265, 4492-4497 (1990). El plásmido se transfeció en *E. coli* y se expresó la proteína tras la inducción del promotor. Las

bacterias se lisaron en 8M urea y pBx6 se purificó parcialmente mediante SDS PAGE preparativa. Las fracciones que contenían pBx6 se identificaron mediante transferencia de Western usando un anticuerpo políclonal anti-pBx6 de conejo, reunido, concentrado usando un tubo Amicon Centriprep y se dializaron contra PBS. La pureza de la preparación, estimada por SDS PAGE manchado por azul de Coomassie, era de aproximadamente 5 a 10%.

5

B. Resultados y discusión

1. Diseño del estudio

Un centenar de ratones transgénicos PDAPP heterocigóticos de 9 a 11 meses de edad macho y hembra, se obtuvieron de Charles River Laboratory y Taconic Laboratory. Los ratones se clasificaron en diez grupos para inmunizarse con diferentes regiones de A β o APP combinadas con adyuvante de Freund. Los animales se distribuyeron para coincidir con el sexo, edad, parentesco y el origen de los animales dentro de los grupos lo más cerca posible. Los inmunógenos incluyeron cuatro péptidos A β derivados de la secuencia humana, 1-5, 1-12, 13-28, y 33-42, cada uno conjugado con IgG anti-ratón de oveja; cuatro péptidos A β agregados, polipéptidos humanos 1-40 (AN1528), humanos 1-42 (AN1792), humanos 25-35, y roedores 1-42; y un polipéptido de fusión, designado como pBx6, contenido los residuos de aminoácidos de APP 592-695. Un décimo grupo se inmunizó con PBS combinado con adyuvante como control.

Para cada inmunización, 100 μ g de cada péptido A β en 200 μ l PBS o 200 μ g del derivado de APP pBx6 en el mismo volumen de PBS o PBS solo se emulsionó 1:1 (vol: vol) con Adyuvante Completo de Freund (CFA) en un volumen final de 400 μ l para la primera inmunización, seguido de un refuerzo de la misma cantidad de inmunógeno en Adyuvante Incompleto de Freund (IFA) para las siguientes cuatro dosis y con PBS para la dosis final. Las inmunizaciones se administran por vía intraperitoneal en un programa bisemanal para las primeras tres dosis, después en un programa mensual a partir de entonces. Los animales se sangraron cuatro a siete días después de cada inmunización comenzando tras la segunda dosis para la medición de los títulos de anticuerpos. Los animales se sacrificaron aproximadamente una semana después de la última dosis.

2. Niveles A β y APP en el cerebro

Después de unos cuatro meses de inmunización con los diversos péptidos A β o el derivado de APP, se extrajeron los cerebros de los animales perfundidos por salina. Un hemisferio se preparó para el análisis inmunohistoquímico y el segundo se usó para la cuantificación de los niveles de A β y APP. Para medir las concentraciones de diversas formas de péptido beta amiloide y proteína precursora de amiloide, el hemisferio se disecó y se homogeneizó de las regiones de hipocampo, cortical, y del cerebelo se prepararon en 5 M de guanidina. Estos se diluyeron y el nivel de amiloide o APP se cuantificó por comparación con una serie de diluciones de patrones de péptido A β o APP de concentraciones conocidas en un formato ELISA.

La concentración mediana de A β total para el grupo de control inmunizado con PBS era 5,8 veces mayor en el hipocampo que en la corteza (mediana de 24.318 ng/g de tejido del hipocampo en comparación con 4.221 ng/g para la corteza). La mediana del nivel en el cerebelo del grupo de control (23,4 ng/g de tejido) era de alrededor de 1,000 veces menor que en el hipocampo. Estos niveles son similares a los que hemos informado anteriormente para ratones PDAPP transgénicos heterocigotos de esta edad (Johnson-Woods *et al.*, 1997, *supra*).

Para la corteza, un subconjunto de grupos de tratamiento tuvo A β mediano total y A β 1-42 niveles que diferían significativamente del grupo de control ($p < 0,05$), recibiendo aquellos animales el conjugado péptido AN1792, roedor A β 1-42 o A β 1-5 como se muestra en la FIG. 11. Los niveles medianos de A β total se redujeron en un 75%, 79% y 61%, respectivamente, en comparación con el control para estos grupos de tratamiento. No había correlaciones discernibles entre los títulos de anticuerpos A β específicos y niveles de A β en la región cortical del cerebro para cualquiera de los grupos.

En el hipocampo, la reducción mediana de A β total asociado con el tratamiento AN1792 (46%, $p = 0,0543$) no era tan grande como la observada en la corteza (75%, $p = 0,0021$). Sin embargo, la magnitud de la reducción era mucho mayor en el hipocampo que en la corteza, una reducción neta de 11.186 ng/g de tejido en el hipocampo frente a 3.171 ng/g de tejido en la corteza. Para los grupos de animales que recibieron roedor A β 1-42 o A β 1-5, los niveles medianos totales de A β se redujeron en 36% y 26%, respectivamente. Sin embargo, dado el pequeño tamaño de los grupos y la alta variabilidad de los niveles de amiloide péptido de animal a animal dentro de ambos grupos, estas reducciones no fueron significativas. Cuando los niveles de A β 1-42 se midieron en el hipocampo, ninguna de las reducciones inducidas por tratamiento alcanzó significación. Por lo tanto, debido a la carga A β menor en la corteza, los cambios en esta región son un indicador más sensible de los efectos del tratamiento. Los cambios en niveles A β medidos por ELISA en la corteza son similares, pero no idénticos, a los resultados de los análisis de inmunohistoquímica (véase abajo).

A β total también se midió en el cerebelo, una región normalmente mínimamente afectada con patología de la EA. Ninguna de las concentraciones medianas A β de cualquiera de los grupos inmunizados con los diversos péptidos A β o el derivado de APP difirieron del grupo de control en esta región del cerebro. Este resultado

sugiere que los niveles no patológicos de A β no se ven afectados por el tratamiento.

La concentración APP también se determinó mediante ELISA en la corteza y cerebelo de ratones tratados y de control. Se utilizaron dos ensayos de APP diferentes. El primero, designado APP- α /FL, reconoció tanto formas APP-alfa (α , la forma secretada de APP que se ha escindido dentro de la secuencia A β), y de longitud completa (FL) de APP, mientras que el segundo reconoce sólo APP- α . En contraste con la disminución asociada al tratamiento de A β en un subconjunto de grupos de tratamiento, los niveles de APP eran no cambiados en todos los animales tratados en comparación con los de control. Estos resultados indican que las inmunizaciones con péptidos A β no agotan APP; más bien el efecto del tratamiento es específico para A β .

En resumen, niveles totales de A β y de A β 1-42 se redujeron significativamente en la corteza mediante el tratamiento con conjugado AN1792, roedor A β 1-42 o A β 1-5. En el hipocampo, A β total se redujo significativamente sólo mediante un tratamiento AN1792. Ningún otro cambio asociado a tratamiento en los niveles A β o APP en las regiones del hipocampo, cortical o cerebelar, era significativo.

2. Análisis histoquímico

Cerebros de un subconjunto de seis grupos se prepararon para el análisis inmunohistoquímico, tres grupos inmunizados con los péptidos conjugados A β 1-5, A β 1-12, y A β 13-28; dos grupos inmunizados con los agregados A β de longitud completa AN1792 y AN1528 y el grupo de control tratado por PBS. Los resultados de los análisis de imagen de la carga de amiloide en secciones de cerebro de estos grupos se muestran en la FIG. 12. Hubo reducciones significativas de la carga de amiloide en las regiones corticales de tres de los grupos de tratamiento en comparación con los animales de control. Se observó la mayor reducción de la carga amiloide en el grupo que recibió AN1792 donde el valor medio se redujo en un 97% ($p = 0,001$). Reducciones significativas también se observaron para los animales tratados con AN1528 (95%, $p = 0,005$) y el conjugado de péptido A β 1-5 (67%, $p = 0,02$).

Los resultados obtenidos por la cuantificación del A β total o A β 1-42 por ELISA y la carga de amiloide por análisis de imágenes difieren en cierta medida. El tratamiento con AN1528 tuvo un impacto significativo sobre el nivel de carga de amiloide cortical cuando se midió por análisis de imágenes cuantitativo pero no en la concentración de A β total en la misma región cuando se mide por ELISA. La diferencia entre estos dos resultados es probable que sea debida a las especificidades de los ensayos. El análisis de imagen mide únicamente A β insoluble agregada en placas. En contraste, el ELISA mide todas las formas de EA, tanto solubles como insolubles, monoméricas y agregadas. Dado que se cree que la patología de la enfermedad está asociada con la forma asociada a placas insolubles de A β , la técnica de análisis de imágenes puede tener más sensibilidad para revelar los efectos del tratamiento. Sin embargo ya que el ELISA es un ensayo más rápido y más fácil, es muy útil para fines de selección. Por otra parte se puede revelar que la reducción asociada a tratamiento de A β es mayor para A β asociada a placas que A β total.

Para determinar si los anticuerpos de A β específicos provocados por la inmunización en los animales tratados reaccionaron con el amiloide del cerebro depositado, un subconjunto de las secciones de los animales tratados y los ratones de control se hicieron reaccionar con un anticuerpo específico para la IgG de ratón. En contraste con el grupo PBS, las placas que contienen A β se recubrieron con IgG endógena para los animales inmunizados con los conjugados de péptido A β A β 1-5, A β 1-12, y A β 13-28; y los agregados A β de longitud completa AN1792 y AN1528. Los cerebros de los animales inmunizados con los demás péptidos A β o el péptido APP pBx6 no fueron analizados por este ensayo.

3. Medición de títulos de anticuerpo

Los ratones se sangraron cuatro a siete días después de cada inmunización comenzando tras la segunda inmunización, para un total de cinco extracciones de sangre. Los títulos de anticuerpos se midieron como anticuerpo de enlace de A β 1-42 usando un ELISA tipo sándwich con placas plásticas de multipicillo revestidas con A142. Como se muestra en la FIG. 13, los títulos de anticuerpos de pico se indujeron después de la cuarta dosis para las cuatro formulaciones inmunogénicas que provocaban los títulos más altos de anticuerpos AN1792 específicos: AN1792 (GMT máximo: 94.647), AN1528 (GMT máximo: 88.231), A β 1-12 conjugado (GMT máximo: 47.216) y roedores A β 1-42 (GMT máximo: 10.766). Los títulos de estos grupos se redujeron ligeramente después de las dosis quinta y sexta. Para los cinco inmunógenos restantes, se alcanzaron títulos máximos tras la quinta o la sexta dosis y éstas eran de magnitud muy inferior a los de los cuatro grupos de título más alto: conjugado A β 1-5 (GMT máximo: 2.356), pBx6 (GMT máximo: 1.986), conjugado A β 13-28 (GMT máximo: 1.183), A β 33-42 conjugado (GMT máximo: 658), A β 25-35 (GMT máximo: 125). Los títulos de anticuerpos se midieron también contra los péptidos homólogos usando el mismo formato de ELISA de tipo sándwich para un subconjunto de los inmunógenos, los grupos inmunizados con A β 1-5, A β 13-28, A β 25-35, A β 33-42 o roedor A β 1-42. Estos títulos fueron aproximadamente los mismos como los medidos contra A β 1-42 excepto por el inmunógeno de roedor A β 1-42 en el que los títulos de anticuerpos de caso contra el inmunógeno homólogo fueron aproximadamente dos veces más altos. La magnitud de la concentración de anticuerpo AN1792 específico de los animales individuales o los valores medios de los grupos

de tratamiento no se correlacionaron con la eficacia medida como la reducción de la A β en la corteza.

4. Respuestas linfoproliferativas

5 La linfoproliferación dependiente de A β se midió usando células de bazo recogidas aproximadamente una semana después de la inmunización final, sexta. Las células recién cosechadas, 105 por pocillo, se cultivaron durante 5 días en la presencia de A β 1-40 a una concentración de 5 μ M para la estimulación. Las células procedentes de un subconjunto de siete de los diez grupos también fueron cultivadas en presencia del péptido inverso, A β 40-1. Como control positivo, se cultivaron células adicionales con el mitógeno de células T, PHA, y, como 10 un control negativo, las células fueron cultivadas sin péptido añadido.

15 Los linfocitos de una mayoría de los animales proliferaron en respuesta a PHA. No hubo respuestas significativas al péptido inverso A β 40-1. Las células de animales inmunizados con los péptidos grandes agregados A β , AN1792, roedor A β 1-42 y AN1528 proliferaron robustamente cuando se estimularon con A β 1-40 con la cpm más alta en los receptores de AN1792. Un animal en cada uno de los grupos inmunizados con conjugado A β 1-12, 20 conjugado A β 1328 y A132535 proliferaron en respuesta a A β 1-40. Los grupos restantes que recibieron conjugado A β 1-5, conjugado A β 33-42 pBx6 o PBS no tuvieron animales con una respuesta estimulada por A β . Estos resultados 25 se resumen en la Tabla 5 a continuación.

20

Tabla 5				
	Inmunógeno	Conjugado	Aminoácidos A β	Respondedores
25	A β 1-5	Sí	5-mer	0/7
30	A β 1-12	Sí	12-mer	1/8
35	A β 13-28	Sí	16-mer	1/9
40	A β 25-35		11-mer	1/9
	A β 33-42	Sí	10-mer	0/10
	A β 1-40		40-mer	5/8
	A β 1-42		42-mer	9/9
	r A β 1-42		42-mer	8/8
	pBx6			0/8
	PBS		0-mer	0/8

45 Estos resultados muestran que AN1792 y AN1528 estimulan fuertes respuestas de células T, muy probablemente del fenotipo CD4+. La ausencia de una respuesta de célula T A β específica en los animales inmunizados con A β 1-5 no es sorprendente ya que epítopos peptídicos reconocidos por las células T CD4+ son por lo general aproximadamente 15 aminoácidos de longitud, aunque péptidos más cortos a veces pueden funcionar con menos eficiencia. Así, es probable que la mayoría de los epítopos de células T auxiliares para los cuatro péptidos del conjugado residen en la pareja de conjugado IgG, no en la región A β . Esta hipótesis está apoyada por la muy baja 50 incidencia de respuestas proliferativas para los animales en cada uno de estos grupos de tratamiento. Dado que el conjugado A β 1-5 era eficaz para la reducción significativa del nivel de A β en el cerebro, en la aparente ausencia de células T A β específicas, la respuesta inmunitaria efectora clave inducida por la inmunización con este péptido parece ser anticuerpo.

55 La falta de células T y la respuesta de anticuerpos baja de péptido de fusión pBx6, que abarca los aminoácidos de APP 592-695 incluyendo todos los residuos de A β pueden deberse a la escasa inmunogenicidad de esta preparación particular. La escasa inmunogenicidad del agregado A β 25-35 es probablemente debido a que el péptido es demasiado pequeño para que probablemente contenga un buen epítopo de células T para ayudar a la inducción de una respuesta de anticuerpos. Si este péptido se conjugara con una proteína portadora, probablemente sería más inmunogénico.

60 V. Preparación de anticuerpos policlonales para la protección pasiva

125 ratones no transgénicos fueron inmunizados con 100 μ g de A β 1-42, además del adyuvante CFAIIFA, y se sacrificaron a los 4-5 meses. Se recogió sangre de ratones inmunizados. IgG se separó de otros componentes de

la sangre. Anticuerpo específico para el inmunógeno puede purificarse parcialmente por cromatografía de afinidad. Un promedio de alrededor de 0,5-1 mg de anticuerpo inmunógeno específico se obtiene por ratón, dando un total de 60-120 mg.

5 VI. La inmunización pasiva con anticuerpos para A β

10 Grupos de ratones PDAPP de 7-9 meses de edad se inyectaron con 0,5 mg en PBS de anti-A β polyclonal o anti-A β específico monoclonal como se muestra a continuación. Todas las preparaciones de anticuerpo se purificaron para tener bajos niveles de endotoxina. Los monoclonales pueden ser preparados contra un fragmento inyectando el fragmento o forma más larga de A β en un ratón, preparando hibridomas y examinando los hibridomas para un anticuerpo que se une específicamente a un fragmento deseado de A β sin unirse a otros fragmentos no solapantes de A β .

15 Tabla 6

Anticuerpo	Epítopo
2H3	A β 1-12
10D5	A β 1-12
266	A β 13-28
21F12	A β 33-42
A β 42 anti-humano polyclonal de ratón	A β 42 anti-agregada

30 Los ratones fueron inyectados ip según sea necesario durante un período de 4 meses para mantener una concentración circulante de anticuerpo medida por título ELISA de mayor que 1/1000 definida por ELISA para A β 42 u otro inmunógeno. Los títulos se controlaron como anteriormente y los ratones se sacrificaron al final de los 6 meses de inyecciones. Histoquímica, niveles de A β y toxicología se realizaron post mortem. Se usaron diez ratones por grupo. Estudios adicionales de inmunización pasiva se describen en los Ejemplos XI y XII abajo.

35 VII. Comparación de diferentes adyuvantes

40 Este ejemplo compara CFA, alumbre, una emulsión de agua en aceite y MPL para la capacidad de estimular una respuesta inmune.

45 A. Materiales y Métodos

1. Diseño del estudio

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

55 2. Preparación de los inmunógenos

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

Un derivado palmitoilado de AN1792 se preparó por acoplamiento de anhídrido palmítico, disuelto en dimetilformamida, al residuo amino terminal de AN1792 antes de la eliminación del péptido naciente de la resina mediante tratamiento con ácido fluorhídrico.

5 Para preparar las dosis de formulación con Adyuvante Completo de Freund (CFA) (grupo 2), 33 µg de AN1792 en 200 µl PBS, se emulsionó 1:1 (vol: vol) con CFA en un volumen final de 400 µl para la primera inmunización. Para las inmunizaciones posteriores, el antígeno se emulsionó de manera similar con Adyuvante Incompleto de Freund (IFA).

10 Para preparar las dosis de formulación con MPL para los grupos 5 y 8, polvo liofilizado se añadió (Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MT) a trietilamina acuosa al 0,2% a una concentración final de 1 mg/mL y se agitó en vórtex. La mezcla se calentó a 65 a 70°C durante 30 s para crear una suspensión uniforme ligeramente opaca de micelas. La solución estaba recién preparada para cada conjunto de inyecciones. Para cada inyección en el grupo 5, 33 µg de AN1792 en 16,5 µL PBS, 50 µg de MPL (50 µl) y 162 µL de PBS se mezclaron en un tubo de borosilicato inmediatamente antes de su uso.

15 Para preparar la dosis de formulación con la emulsión bajo aceite-en-agua, AN1792 en PBS se añadió a 5% de escualeno, 0,5% de Tween 80, 0,5% de Span 85 en PBS para alcanzar una concentración de dosis única final del AN1792 33 µg en 250 µL (grupo 6). La mezcla se emulsionó pasando a través de un dispositivo de mano de dos cámaras 15 a 20 veces hasta que las gotitas de la emulsión parecieron ser aproximadamente iguales en diámetro a una perla de látex de diámetro estándar de 1,0 µm cuando se observa bajo un microscopio. La suspensión resultante era opalescente, de color blanco lechoso. Las emulsiones se preparan para cada serie de inyecciones. Para el grupo 8, se añadió MPL en 0,2% de trietilamina a una concentración de 50 µg por dosis a la mezcla de escualeno y un detergente para la emulsión como se señaló anteriormente. Para el derivado de palmitoílo (grupo 7), se añadió 33 µg por dosis de palmitoil-NH-Aβ1-42 al escualeno y se agitó. Tween 80 y Span 85 se añadieron a continuación con agitación en vórtex. Esta mezcla se añadió a PBS para alcanzar concentraciones finales de 5% de escualeno, 0,5% de Tween 80, 0,5% de Span 85 y la mezcla se emulsionó como se señaló anteriormente.

20 30 Para preparar la dosis de formulación con alumbre (grupos 9 y 10), AN1792 en PBS se añadió a Alhidrogel (gel de hidróxido de aluminio, Accurate, Westbury, NY) para alcanzar concentraciones de 33 µg (dosis baja, grupo 9) o 300 µg (dosis alta, grupo 10) AN1792 por 5 mg de alumbre en un volumen de dosis final de 250 µL. La suspensión se mezcló suavemente durante 4 horas a TA.

35 3. Medición de los títulos de anticuerpos

40 Las cobayas se sangraron seis a siete días después de la inmunización a partir de la segunda inmunización para un total de cuatro extracciones de sangre. Títulos de anticuerpos contra Aβ42 se midieron mediante ELISA como se describe en Materiales y Procedimientos Generales.

45 4. Preparación del tejido

50 Tras aproximadamente 14 semanas, todos los cobayas se sacrificaron mediante la administración CO₂. Se recogió el líquido cefalorraquídeo y se trajeron los cerebros y tres de cerebro (hipocampo, corteza y cerebelo) se disecaron y se utilizaron para medir la concentración de proteína total Aβ usando ELISA.

B. Resultados

55 1. Respuestas de anticuerpos

60 Hubo una amplia gama en la potencia de los diversos adyuvantes cuando se midió como la respuesta de anticuerpos a AN1792 después de la inmunización. Como se muestra en la FIG. 14, cuando AN1792 se administró en PBS, no se detectaron anticuerpos tras dos o tres inmunizaciones y las respuestas insignificantes se detectaron después de la cuarta y quinta dosis con títulos de media geométrica (GMTs) de sólo aproximadamente 45. La emulsión o/w indujo títulos modestos después de la tercera dosis (GMT 255) que se mantuvieron tras la cuarta dosis (GMT 301) y cayó con la dosis final (GMT 54). Hubo una clara respuesta a la dosis de antígeno para AN1792 unido a alumbre con 300 µg siendo más inmunogénico en todos los puntos de tiempo que 33 µg. En el pico de la respuesta de anticuerpos, tras la cuarta inmunización, la diferencia entre las dos dosis era del 43% con GMT de aproximadamente 1940 (33 µg) y 3400 (300 µg). La respuesta de anticuerpos a 33 µg AN1792 más MPL era muy similar a la generada con casi una dosis diez veces mayor de antígeno (300 µg) unido a alumbre. La adición de MPL a una emulsión o/w redujo la potencia de las formulaciones relativas a la con MPL como el único adyuvante hasta un 75%. Un derivado palmitoilado de AN1792 era completamente no inmunogénico cuando se administra en PBS y dio títulos modestos cuando se presentó en una emulsión o/w con GMT de 340 y 105 para la tercera y la cuarta hemorragia. Los títulos de anticuerpos más altos se generaron con adyuvante de Freund con un GMT máximo de aproximadamente 87.000, un valor casi 30 veces mayores que la GMT de las siguientes dos formulaciones más potentes, MPL y altas dosis de AN1792/alumbre.

5 Los adyuvantes más prometedores identificados en este estudio son MPL y alumbre. De estos dos, parece preferible MPL porque una dosis de antígeno inferior de 10 veces se requiere para generar la misma respuesta de anticuerpos como la obtenida con alumbre. La respuesta puede incrementarse aumentando la dosis de antígeno y/o adyuvante y mediante la optimización del programa de inmunización. La emulsión o/w era un adyuvante muy débil para AN1792 y la adición de una emulsión o/w para adyuvante MPL disminuyó la actividad adyuvante intrínseca de MPL solo.

10 2. Niveles A β en el cerebro

15 A aproximadamente 14 semanas, los cobayas se anestesiaron profundamente, se extrajo el líquido cefalorraquídeo (CSF) y los cerebros fueron extirpados de los animales en un subconjunto de los grupos, los inmunizados con adyuvante de Freund (grupo 2), MPL (grupo 5), alumbre con una dosis alta, 300 μ g, de AN1792 (grupo 10) y el grupo de control de PBS inmunizado (grupo 3). Para medir el nivel de péptido AP, un hemisferio se disecaron y homogeneizados de las regiones de hipocampo, cortical, y del cerebelo se prepararon en 5 M de guanidina. Estos se diluyeron y se cuantificaron mediante comparación con una serie de diluciones de proteína estándar de A β de concentraciones conocidas en un formato ELISA. Los niveles de proteína A β en el hipocampo, la corteza y el cerebelo fueron muy similares para los cuatro grupos a pesar de la amplia gama de respuestas de anticuerpos a A β provocados por estas formulaciones. Los niveles medios de A β de aproximadamente 25 ng/g de tejido se midieron en el hipocampo, 21 ng/g en la corteza y 12 ng/g en el cerebelo. Por lo tanto, la presencia de un título de anticuerpos de alta circulación a A β durante casi tres meses en algunos de estos animales no alteró los niveles de A β total en sus cerebros. Los niveles de A β en el CSF también fueron bastante similares entre los grupos. La falta de efecto grande de inmunización AN1792 en la A β endógena indica que la respuesta inmune se centra en las formaciones patológicas de A β .

20 25 VIII. Respuesta inmune a diferentes adyuvantes en ratones

30 Ratones Swiss Webster hembra de seis semanas de edad se utilizaron para este estudio con 10-13 animales por grupo. Las inmunizaciones se dieron en los días 0, 14, 28, 60, 90 y 20 administradas por vía subcutánea en un volumen de dosis de 200 μ l. PBS se utilizó como el tampón para todas las formulaciones. Los animales se sangran siete días después de cada inmunización a partir de la segunda dosis para el análisis de los títulos de anticuerpos por ELISA. El régimen de tratamiento de cada grupo se resume en la Tabla 7.

Tabla 7

Diseño experimental					
Grupo	N ^a	Adjuvante ^b	Dosis	Antígeno	Dosis (μg)
1	10	MPL	12,5 μg	AN1792	33
2	10	MPL	25 μg	AN1792	33
3	10	MPL	50 μg	AN1792	33
4	13	MPL	125 μg	AN1792	33
5	13	MPL	50 μg	AN1792	150
6	13	MPL	50 μg	AN1528	33
7	10	PBS		AN1792	33
8	10	PBS		Ninguno	
9	10	Escualeno emulsionado	5%	AN1792	33
10	10	Escualeno mezclado	5%	AN1792	33
11	10	Alumbre	2 mg	AN1792	33
12	13	MPL Alumbre	+ 50 μg/2 mg	AN1792	33
13	10	QS-21	5 μg	AN1792	33
14	10	QS-21	10 μg	AN1792	33
15	10	QS-21	25 AN1792	AN1792	33
16	13	QS-21	25 AN1792	AN1792	150
17	13	QS-21	25 AN1792	AN1528	33
18	13	QS-21 + MPL	25 μg/50 μg	AN1792	33
19	13	QS-21 + Alumbre	25 μg/2 mg	AN1792	33

Notas al pie:

a número de ratones en cada grupo al inicio del experimento.

b Se anotan los adyuvantes. El tampón para todas estas formulaciones era PBS. Para el grupo 8, no hubo adyuvante y no hubo antígeno.

Los títulos de ELISA de anticuerpos contra A_β42 en cada grupo se muestran en la Tabla 8 a continuación.

Tabla 8.

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

La tabla muestra que se obtuvieron los títulos más altos para los grupos 4, 5 y 18, en los que los adyuvantes fueron 125 µg MPL, 50 µg MPL y QS-21 más MPL.

5 IX. La eficacia terapéutica de diferentes adyuvantes

Un estudio de la eficacia terapéutica se llevó a cabo en ratones transgénicos PDAPP con un conjunto de adyuvantes adecuados para el uso en seres humanos para determinar su capacidad para potenciar la respuesta inmune a A β y para inducir el aclaramiento inmunomedido de depósitos amiloideos en el cerebro.

10 Ciento ochenta ratones transgénicos PDAPP heterocigóticos macho y hembra, de 7,5 a 8,5 meses de edad se obtuvieron de Charles River Laboratories. Los ratones se ordenaron en nueve grupos que contienen 15 a 23 animales por grupo a inmunizarse con AN1792 o AN1528 combinados con diversos adyuvantes. Los animales se distribuyeron para coincidir con el género, la edad y el parentesco de los animales dentro de los grupos lo más cerca posible. Los adyuvantes incluyen alumbre, MPL y QS-21, cada uno en combinación tanto con antígenos como adyuvantes de Freund (AF) combinados sólo con AN1792. Un grupo adicional se inmunizó con AN1792 formulado en tampón PBS más el timerosal conservante sin adyuvante. Un noveno grupo se inmunizó con PBS solo como control negativo.

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

5 10 Para preparar la dosis de formulación con alumbre (grupos 1 y 5), se añadió péptido A β en PBS a alhidrogel (dos por ciento de gel de hidróxido de aluminio acuoso, Sargeant, Inc., Clifton, NJ) hasta alcanzar concentraciones de 100 μ g de péptido A β por 1 mg de alumbre. 10X PBS se añadió a un volumen de dosis final de 200 μ l en 1X PBS. La suspensión se mezcló suavemente durante aproximadamente 4 h a TA antes de la inyección.

15 20 Para preparar la dosis de formulación con MPL (Grupos 2 y 6), polvo liofilizado (Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MT; Lote 67039-E0896B) se añadió a trietilamina acuosa al 0,2% a una concentración final de 1 mg/mL y se agitó en vórtex. La mezcla se calentó a 65 a 70°C durante 30 s para crear una suspensión uniforme ligeramente opaca de micelas. La solución se almacenó a 4°C. Para cada conjunto de inyecciones, 100 μ g de péptido por dosis en 50 μ l PBS, 50 μ g de MPL por dosis (50 μ l) y 100 μ l de PBS por dosis se mezclaron en un tubo de borosilicato inmediatamente antes de su uso.

25 Para preparar la dosis de formulación con QS-21 (Grupos 3 y 7), polvo liofilizado (Aquila, Framingham, MA; Lote A7018R) a PBS, pH 6,6-6,7 a una concentración final de 1 mg/ml y se agitó en vórtex. La solución se almacenó a -20°C. Para cada conjunto de inyecciones, 100 μ g de péptido por dosis en 50 μ l de PBS, 25 μ g de QS-21 por dosis en 25 μ l de PBS y 125 μ l de PBS por dosis se mezclaron en un tubo de borosilicato inmediatamente antes de su uso.

30 35 40 45 Para preparar la dosis de formulación con adyuvante de Freund (Grupo 4), 100 μ g de AN1792 en 200 μ l PBS se emulsionó 1:1 (vol: vol) con Adyuvante Completo de Freund (CFA) en un volumen final de 400 μ l para la primera inmunización. Para las inmunizaciones posteriores, el antígeno se emulsionó de manera similar con Adyuvante Incompleto de Freund (IFA). Para las formulaciones que contienen los adyuvantes alumbre, MPL o QS-21, 100 μ g por dosis de AN1792 o AN1528 se combinó con alumbre (1 mg por dosis) o MPL (50 μ g por dosis) o QS-21 (25 μ g por dosis) en un volumen final de 200 μ l PBS y se administró por inoculación subcutánea en la espalda entre los omóplatos. Para el grupo que recibe AF, 100 μ g de AN1792 se emulsionó 1:1 (vol: vol) con Adyuvante Completo de Freund (CFA) en un volumen final de 400 μ l y se administró por vía intraperitoneal para la primera inmunización, seguido de un refuerzo de la misma cantidad de inmunógeno en Adyuvante Incompleto de Freund (IFA) para las cinco dosis posteriores. Para el grupo que recibió AN1792 sin adyuvante, 10 μ g de AN1792 se combinó con 5 μ g de timerosal en un volumen final de 50 μ l de PBS y se administró por vía subcutánea. El noveno grupo de control recibió sólo 200 μ l de PBS administrado por vía subcutánea. Las inmunizaciones se realizaron según una programa básemanal para las primeras tres dosis, después en un programa mensual a partir de entonces en los días 0, 16, 28, 56, 85 y 112. Los animales se sangraron de seis a siete días después de cada inmunización comenzando tras la segunda dosis para la medición de los títulos de anticuerpos. Los animales fueron sacrificados aproximadamente una semana después de la última dosis. Los resultados se midieron mediante ensayo de ELISA de niveles A β y APP en el cerebro y mediante la evaluación inmunohistoquímica de la presencia de placas amiloides en secciones de cerebro. Además, se determinaron los títulos de anticuerpos A β específico, y respuestas proliferativas y de citoquinas dependientes de A β .

50 55 60 La Tabla 9 muestra que los títulos de anticuerpos más altos a A β 1-42 se indujeron con AF y AN1792, los títulos que alcanzaron un máximo tras la cuarta inmunización (GMT máximo: 75.386) y después se disminuyeron en un 59% después de la sexta inmunización final. El título medio máximo provocado por MPL con AN1792 era 62% menor que el generado con AF (GMT máximo: 28.867) y también se alcanzó pronto en el esquema de inmunización, tras 3 dosis, seguido de una disminución a 28% del valor pico después de la sexta inmunización. El título medio máximo generado con QS-21 combinado con AN1792 (GMT: 1.511) era de aproximadamente 5 veces inferior que el obtenido con MPL. Además, la cinética de la respuesta era más lenta, ya que se requirió una inmunización adicional para alcanzar la respuesta del pico. Los títulos generados por AN1792 enlazado a alumbre eran marginalmente mayores que los obtenidos con QS-21 y la cinética de respuesta fueron más rápidos. Para AN1792 administrado en PBS con timerosal la frecuencia y el tamaño de los títulos fueron apenas mayores que la de PBS solo. Los títulos máximos generados con MPL y AN1528 (GMT 3099 máximo) fueron aproximadamente 9 veces menores que aquellos con AN1792. AN1528 enlazado a alumbre era muy escasamente inmunogénico con títulos bajos generados sólo en algunos de los animales. Ninguna respuesta de anticuerpos se observó en los animales de control inmunizados con PBS solo.

Tabla 9

Títulos de anticuerpos de media geométrica					
Semana de sangrado					
Tratamiento	3,3	5,0	9,0	13,0	17,0
Alumbre/ AN1792	102 (12/21) b	1081 (17/20)	2366 (21/21)	1083 (19/21)	572 (18/21)
MPL/ AN1792	6241 (21/21)	28867 (21/21)	1,1242 (21/21)	5665 (20/20)	8204 (20/20)
QS-21/ AN1792	30 (1/20)	227 (10/19)	327 (10/19)	1511 (17/18)	1188 (14/18)
CFA/ AN1792	10076 (15/15)	61279 (15/15)	75386 (15/15)	41628 (15/15)	30,574 (15/15)
Alumbre/ AN1528	25 (0/21)	33 (1/21)	39 (3/20)	37 (1/20)	31 (2/20)
MPL/ AN1528	184 (15/21)	2591 (20/21)	1653 (21/21)	1156 (20/20)	3099 (20/20)
QS-21/ AN1528	29 (1/22)	221 (13/22)	51 (4/22)	820 (20/22)	2994 (21/22)
PBS más timerosal	25 (0/16)	33 (2/16)	39 (4/16)	37 (3/16)	47 (4/16)
PBS	25 (0/16)	25 (0/16)	25 (0/15)	25 (0/12)	25 (0/16)
Notas al pie:					
a Títulos de anticuerpos de media geométrica medidos contra Aβ1-42					
b Número de respondedores por grupo					

Los resultados de tratamiento AN1792 o AN1528 con diversos adyuvantes, o timerosal en la carga de amiloide cortical en ratones de 12 meses de edad determinados por ELISA se muestran en la FIG. 15. En los ratones de PDAPP de control PBS, el nivel mediano de Aβ total en la corteza a los 12 meses era 1.817 ng/g. Se observaron niveles notablemente reducidos de Aβ en ratones tratados con AN1792 más CFA/TFA, AN1792 más alumbre, AN1792 más MPL y QS-21 más AN1792. La reducción alcanzó significación estadística ($p < 0,05$) solamente para AN1792 más CFA/IFA. Sin embargo, como se muestra en los Ejemplos I y III, los efectos de la inmunización en reducción de los niveles Aβ se convierten sustancialmente mayores en ratones de 15 meses y 18 meses de edad. Por lo tanto, se espera que al menos las composiciones AN1792 más alumbre, AN1792 más MPL y AN1792 más QS-21 lograrán significación estadística en el tratamiento de ratones de más edad. Por el contrario, la AN1792 más el conservante timerosal mostró un nivel mediano de Aβ aproximadamente igual que en los ratones tratados con PBS. Se obtuvieron resultados similares cuando se compararon niveles corticales de Aβ42. El nivel mediano del de Aβ42 en los controles de PBS era 1.624 ng/g. Se observaron Notablemente reducidos niveles medios de 403, 1.149, 620 y 714 se observaron en los ratones tratados con AN1792 más CFA/IFA, AN1792 más alumbre, AN1792 más MPL y AN1792 más QS-21, respectivamente, con la reducción que logra la significación estadística ($p = 0,05$) para el grupo de tratamiento con AN1792 CFA/IFA. El nivel mediano en los ratones tratados con AN1792 timerosal era 1.619 ng/g Aβ42.

Se realizó un estudio de eficacia adyuvante/inmunógeno terapéutico adicional en ratones transgénicos PDAPP heterocigotos machos y hembras de 9 - 10,5 meses de edad. La duración del estudio era de 25 semanas con 29-40 animales por grupo de tratamiento; por lo tanto, los animales eran 15 - 16,5 meses de edad en la terminación. Los grupos de tratamiento se identifican en la Tabla 10 a continuación.

		Adyuvante	Inmunógeno	Tampón de dilución	Administración
5	Grupo 1:	MPL-SE	AN1792-GCS (75 µg)	PBS	SC (250 µL)
10	Grupo 2:	ISA 51	AN1792-GCS (75 µg)	PBS	IP (400 µL)
15	Grupo 3:	QS21	AN1792-GCS (75 µg)	PBS	SC (250 µL)
20	Grupo 4:	QS21 abrev.	AN1792-GCS (75 µg)	PBS	SC (250 µL)
25	Grupo 5:	PBS	-----	-----	SC (250 µL)

20 **Abreviaturas de Tabla 10:** MAP - péptido multiantigénico; TT - epítopo de células T de toxoide tetánico (830.844); SQ - subcutánea; IP - vía intraperitoneal; PBS - fosfato, solución salina tamponada; ISA-51 es un adyuvante comercialmente disponible similar a IFA; GCS es una formulación de glicina/citrato/sacarosa, MPL-SE es MPL en una emulsión estabilizada de agua y aceite.

25 El calendario de inmunización era idéntico para todos los grupos de tratamiento excepto para el Grupo 3, el grupo horario abreviado QS-21/AN1792. Los ratones se inyectaron en las semanas 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, con sangrados en las semanas 3, 5, 9, 13, 17, 21 y 25. Los grupos 1, 2, recibieron ocho inyecciones y el Grupo 3 recibió cuatro inyecciones durante el período de 25 semanas del estudio. El Grupo 4, el horario abreviado QS-21/AN1792, recibió inyecciones en las semanas 0, 2, 4, y 8 sólo. Este grupo no se inyectó para el resto del estudio, a pesar de que se extrajo sangre en el mismo horario de purga como el resto del estudio para seguir deterioro del título. Los grupos 3 y 5, QS-21/AN1792 y PBS, respectivamente, sirvió como controles positivos y negativos para este estudio.

30 Los títulos se determinaron mediante el ensayo de título de anticuerpos anti-A β .

35 **Grupo 1**, el grupo MPL-SE /AN1792, levantó un título de media geométrica máxima (GMT) de 17.100 a las 9 semanas cayendo a un GMT de 10.000 a las 25 semanas. Inicialmente, los títulos MPL-SE subieron a una velocidad algo mayor que el grupo de control QS21/AN1792 (Grupo 4).

40 **Grupo 2**, el grupo ISA 51/AN1792, produjo títulos altos en todo el estudio alcanzando un GMT de más de 100.000 durante las últimas 9 semanas del estudio.

45 **Grupo 3**, el grupo de control QS21/AN1792, alcanzó su título máximo en 17 semanas con un GMT de 16.000. El título luego cayó en las próximas 8 semanas para terminar con GMT de 8.700. Un animal en este grupo no planteó un título largo de todo el curso del experimento.

50 **Grupo 4**, el grupo de horario de inyecciones abreviado QS21/AN1792, alcanzó un título máximo de 7.300 a las 13 semanas, cinco semanas después de su inyección final. El título luego cayó a un GMT de 2.100 en el sangrado final (25 semanas). Al igual que en el grupo de control, un animal no logró levantar un título detectable, mientras que otro animal perdió todo el título al final del período de deterioro.

55 **Grupo 5**, el grupo de PBS sólo, no tenía títulos.

60 Para evaluar los niveles A β corticales, A β total y A β 1-42 se midieron por ELISA. Brevemente, un hemisferio cerebral se disecó para tejido cortical, hipocampo y cerebro seguido de homogeneización en tampón de guanidina 5M y se ensayó para A β cerebral. Los resultados corticales totales de A β y A β 42 son similares. Un análisis estadístico de Mann-Whitney se realizó para determinar la significación entre los grupos con un valor p de $\leq 0,05$ indicando un cambio significativo en A β .

65 Todos los grupos de tratamiento redujeron significativamente niveles de A β total en comparación con el grupo de control PBS (véase la Tabla 11). El grupo MPL-SE/AN1792, mostró el cambio mayor en A β , y es significativamente mejor que los otros grupos de tratamiento. El grupo abreviado QS21/AN1792 era similar en su cambio global de A β al grupo de control QS21 que recibió las ocho inyecciones. Los niveles de A β en el grupo ISA 51/AN1792, se redujeron de manera similar en comparación con el grupo CFA/TFA:MAP (A β 1-7).

Tabla 11 Niveles A_β corticales

	PBS	MPL-SE	ES UN	QS-21	QS-21-(4)
MEDIANA (tejido ng/g)	7.335	1.236	3.026	2.389	2.996
RANGO (tejido ng/g)	550-18.358	70-3.977	23-9.777	210- 11.167	24-16.834
valor p	----	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
N	38	29	36	34	40

En conclusión, adyuvantes MPL-SE, ISA-51 y QS21 combinados con AN1792 son eficaces en la inducción de una respuesta inmune suficiente para retardar significativamente deposición A_β en la corteza.

X. Análisis de Toxicidad

5 Los tejidos se recogieron para su examen histopatológico a la terminación de los estudios descritos en los Ejemplos 2, 3 y 7. Además, hematología y química clínica se realizaron en muestras de sangre terminales de los ejemplos 3 y 7. Se evaluó la mayoría de los órganos principales, incluyendo el cerebro, pulmonar, linfoide, gastrointestinal, hígado, riñón, adrenal y gónadas. Aunque se observaron lesiones esporádicas en los animales del estudio, no hubo diferencias obvias, ya sea en los tejidos afectados o la gravedad de la lesión, entre animales 10 AN1792 tratados y no tratados. No hubo lesiones histopatológicas únicas observadas en animales inmunizados por AN1528 en comparación con animales tratados por PBS o no tratados. Tampoco hubo diferencias en el perfil de bioquímica clínica entre grupos adyuvantes y animales tratados con PBS en el ejemplo 7. Aunque hubo aumentos significativos en varios de los parámetros de hematología entre los animales tratados con AN1792 y adyuvante de Freund en el Ejemplo 7 con respecto a animales tratados por PBS, este tipo de efectos se espera de un tratamiento 15 de adyuvante de Freund y la peritonitis que acompaña y no indican ningún efecto adverso a partir de un tratamiento AN1792. Aunque no forma parte de la evaluación toxicológica, la patología del cerebro de ratón PDAPP fue examinado extensamente como parte de los criterios de valoración de eficacia. Ningún indicio de tratamiento relacionado con efectos adversos sobre la morfología del cerebro se observó en los estudios. Estos resultados 20 indican que un tratamiento AN1792 se tolera y es al menos sustancialmente libre de efectos secundarios.

XI. El tratamiento terapéutico con anticuerpos anti-A_β

Este ejemplo examina la capacidad de diversos anticuerpos monoclonales y policlonales a A_β para inhibir la 25 acumulación de A_β en el cerebro de ratones transgénicos heterocigotos.

1. Diseño del estudio

30 Sesenta ratones transgénicos PDAPP heterocigotos macho y hembra, de 8,5 a 10,5 meses de edad se obtuvieron de Charles River Laboratory. Los ratones se clasificaron en seis grupos a tratar con diversos anticuerpos dirigidos a A_β. Los animales se distribuyeron para coincidir con el sexo, edad, parentesco y el origen de los animales dentro de los grupos lo más cerca posible. Como se muestra en la Tabla 10, los anticuerpos incluían cuatro 35 anticuerpos monoclonales murinos A_β específicos, 2H3 (dirigido a residuos A_β 1-12), 10D5 (dirigido a residuos A_β 1-16), 266 (dirigido a residuos A_β 13-28 y se une a monomérico pero no a AN1792 agregada), 21F12 (dirigida a residuos A_β 33-42). Un quinto grupo se trató con una fracción de anticuerpo policlonal A_β específico (levantada por inmunización con AN1792 agregada). El grupo de control negativo recibió el diluyente, PBS, solo sin anticuerpo.

40 Los anticuerpos monoclonales se inyectaron a una dosis de aproximadamente 10 mg/kg (suponiendo que los ratones pesaron 50 g). Las inyecciones se administraron por vía intraperitoneal cada siete días en promedio para mantener los títulos de anti-A_β por encima de 1000. Aunque títulos más bajos se midieron para mAb 266 ya que no se une bien a la AN1792 agregada usada como antígeno de captura en el ensayo, se mantuvo el mismo programa de dosificación para este grupo. El grupo que recibe anticuerpo monoclonal 2H3 se interrumpió en las primeras tres 45 semanas desde el anticuerpo se despejó demasiado rápidamente *in vivo*. Los animales se sangraron antes de cada dosificación para la medición de los títulos de anticuerpos. El tratamiento se continuó durante un período de seis meses para un total de 196 días. Los animales se sacrificaron una semana después de la última dosis.

Tabla 12

<u>DISEÑO EXPERIMENTAL</u>				
Grupo de tratamiento	N ^a	Anticuerpo de tratamiento	Especificidad de anticuerpo	Isotipo de anticuerpo
1	9	ninguno (PBS solo)	N/A ^b	N/A
2	10	Policlonal	A β 1-42	mezclado
3	0	mAb ^c 2H3	A β 1-12	IgG1
4	8	mAb 10D5	A β 1-16	IgG1
5	6	mAb 266	A β 13-28	IgG1
6	8	mAb 21F12	A β 33-42	IgG2a
Notas al pie de página				
a. Número de ratones en el grupo a la terminación del experimento. Todos los grupos empezaron con 10 animales por grupo.				
b. NA: no aplicable				
c. mAb: anticuerpo monoclonal				

2. Materiales y Métodos

a. Preparación del anticuerpo

5 Anticuerpos policlonales de anti-A β se prepararon a partir de sangre recogida de dos grupos de animales. El primer grupo consistía en 100 ratones Swiss Webster hembra, de 6 a 8 semanas de edad. Se inmunizaron en los días 0, 15, y 29 con 100 μ g de AN1792 combinado con CFA/IFA. Una cuarta inyección se administró en el día 36 con una mitad de la dosis de AN1792. Los animales se desangraron después del sacrificio el día 42, se preparó suero y los sueros se reunieron para crear un total de 64 ml. El segundo grupo constaba de 24 ratones hembra isogénicos con los ratones PDAPP pero no transgénicos para el gen APP humano, de 6 a 9 semanas de edad. Se inmunizaron en los días 0, 14, 28 y 56 con 100 μ g de AN1792 combinado con CFA/IFA. Estos animales también se desangraron después del sacrificio el día 63, se preparó el suero y se combinaron para un total de 14 ml. Se combinaron los dos lotes de suero. La fracción de anticuerpo se purificó usando dos rondas secuenciales de precipitación con sulfato de amonio saturado al 50%. El precipitado final se dializó frente a PBS y se ensayó para endotoxinas. El nivel de endotoxina era menor de 1 EU/mg.

20 Los anticuerpos monoclonales anti-A β se prepararon a partir de fluido de ascitis. El fluido se deslipidó primero mediante la adición de sulfato de dextrano sódico concentrado a fluido helado de ascitis por agitación en hielo para alcanzar una concentración final de 0,238%. Despues CaC12 concentrada se añadió con agitación para alcanzar una concentración final de 64mM. Esta solución se centrifugó a 10.000 x g y se descartó el gránulo. El sobrenadante se agitó en hielo añadiéndole gota a gota un volumen igual de sulfato de amonio saturado. La solución se centrifugó de nuevo a 10.000 x g y se descartó el sobrenadante. El gránulo se resuspendió y se dializó contra 20 mM Tris-HCl, 0,4 M NaCl, pH 7,5. Esta fracción se aplicó a una columna Q de Sefarosa Pharmacia FPLC y se eluyó con un gradiente inverso de 0,4 M a 0,275 M NaCl en 20 mM Tris-HCl, pH 7,5.

25 El pico de anticuerpos se identificó por absorbancia a 280 nm y se agruparon las fracciones apropiadas. La preparación de anticuerpo purificado se caracterizó midiendo la concentración de proteína usando el método BCA y la pureza usando SDS-PAGE. El depósito también se examinó para endotoxina. El nivel de endotoxina era menor de 1 UE/mg. Los títulos, se les asignó a los títulos de menos de 100 arbitrariamente un valor de título de 25.

3. Niveles de A β y APP en el cerebro:

30 Despues de aproximadamente seis meses de tratamiento con las diversas preparaciones de anticuerpos anti-A β , los cerebros se retiraron de los animales después de perfusión salina. Un hemisferio se preparó para el análisis inmunohistoquímico y el segundo se usó para la cuantificación de niveles A β y APP. Para medir las concentraciones de diversas formas de péptido de amiloide beta y la proteína precursora de amiloide (APP), el

hemisferio se diseccionó y homogeneizados del hipocampo, cortical, y las regiones del cerebelo se prepararon de 5M guanidina. Estos se diluyeron en serie y el nivel de péptido amiloide o APP se cuantificaron por comparación con una serie de diluciones de patrones de péptido A β o APP de concentraciones conocidas en un formato ELISA.

5 Los niveles de A β total y de A β 1-42 medidos por ELISA en homogeneizados de la corteza, y el hipocampo y el nivel de A β total en el cerebelo se muestran en las Tablas 11, 12 y 13, respectivamente. La concentración mediana del A β total para el grupo de control, inoculado con PBS, era 3,6 veces mayor en el hipocampo que en la corteza (mediana de tejido del hipocampo de 63.389 ng/g en comparación con 17.818 ng/g para la corteza). La mediana del nivel en el cerebelo del grupo de control (30,6 ng/g de tejido) era más de 2,000 veces menor que en el hipocampo. Estos niveles son similares a los que hemos informado anteriormente para ratones transgénicos PDAPP heterocigotos de esta edad (Johnson-Wood *et al.*, 1997).

10
15 Para la corteza, un grupo de tratamiento tenía un nivel de A β mediano, medido como A β 1-42, el cual difería significativamente del del grupo de control ($p < 0,05$), aquellos animales que recibieron el anticuerpo polyclonal anti-A β como se muestra en la Tabla 13. El nivel mediano de A β 1-42 se redujo en un 65%, en comparación con el control para este grupo de tratamiento. Los niveles medios de A β 1-42 también se redujeron significativamente en un 55% en comparación con el control en un grupo de tratamiento adicional, los animales dosificados con el mAb 10D5 ($p = 0,0433$).

Tabla 13

		CORTEZA					
Grupo de tratamiento	N ^a	Medianas			Medias		
		Aβ total		Aβ42		Aβ total	Aβ42
		Valor ELISA ^b	Valor P ^c	% de cambio	Valor ELISA	% de cambio	Valor ELISA
PBS	9	17818	NA ^d	NA	13802	NA	16150+/-7456 ^e
Anti-Aβ42 políclonal	10	6160	0.0055	-65	4892	0.0071	5912+/-5738
mAb 10D5	8	7915	0.1019	-56	6214	0.0433	4454+/-3347
mAb 266	6	9144	0.1255	-49	8481	0.1255	6943+/-3351
mAb 21F12	8	15158	0.2898	-15	13578	0.7003	7489+/-6921
							11005+/-6324

Notas a pie de página:

- a. Número de animales por grupo al final del experimento
- b. Tejido ng/g
- c. Análisis Mann Whitney
- d. NA: no aplicable
- e. Desviación estándar

En el hipocampo, el porcentaje de reducción media de A β total asociado con el tratamiento con anticuerpo anti-A β políclonal (50%, p = 0,0055) no era tan grande como el observado en la corteza (65%) (Tabla 14). Sin embargo, la magnitud absoluta de la reducción era casi 3 veces mayor en el hipocampo que en la corteza, una reducción neta de 31.683 ng/g de tejido en el hipocampo frente a 11.658 ng/g de tejido en la corteza. Cuando se 5 midió como el nivel de la forma más amiloidogénica de A β 1-42 EA, más que como A β total, la reducción conseguida con el anticuerpo políclonal era significativa (p = 0,0025). Los niveles medianos en los grupos tratados con mAb 10D5 y 266 se redujeron en 33% y 21%, respectivamente.

Tabla 14

HIPOCAMPO								
Grupo de tratamiento	N ^a	Medias				Medias		
		A β total	A β 42	Valor ELISA ^b	Valor P ^c	% de cambio	Valor ELISA	A β total
PBS	9	63389	NA ^d	NA	54429	NA	NA	58351+/-13308 ^e
Anti-A β 42 políclonal	10	31706	0.0055	-50	27127	0.0025	-50	30058+/-22454
mAb 10D5	8	46779	0.0675	-26	36290	0.0543	-33	44581+/-18632
mAb 266	6	48689	0.0990	-23	43034	0.0990	-21	36419+/-27304
mAb 21F12	8	51563	0.7728	-19	47961	0.8099	-12	57327+/-28927

Notas de pie de página:

- a. Número de animales por grupo al final del experimento
- b. Tejido ng/g
- c. Análisis Mann Whitney
- d. NA: no aplicable
- e. Desviación estándar

$\text{A}\beta$ total también se midió en el cerebelo (Tabla 15). Esos grupos dosificados con anti- $\text{A}\beta$ polyclonal y el anticuerpo 266 mostraron reducciones significativas de los niveles de $\text{A}\beta$ total (43% y 46%, $p = 0,0033$ y $p = 0,0184$, respectivamente) y de ese grupo tratado con 10D5 tuvo una reducción casi significativa (29%, $p = 0,0675$).

Tabla 15

<u>CEREBELO</u>					
Grupo de tratamiento	N ^a	Medianas		Medias	
		A β total	A β total	Valor ELISA ^b	Valor P ^c
PBS	9	30,64	NA ^d	N/A	40,001+/-31,89 ^e
Anti-A β 42 políclonal	10	17,61	0,0033	-43	18,15+/-4,36
mAb 10D5	8	21,68	0,0675	-29	27,29+/-19,43
mAb 266	6	16,59	0,0184	-46	19,59+/-6,59
mAb 21F12	8	29,80	> 0,9999	-3	32,88+/-9,90

Notas al pie de página:

- a. Número de animales por grupo al final del experimento
- b. Tejido ng/g
- c. Análisis Mann Whitney
- d. NA: no aplicable
- e. Desviación estándar

La concentración de APP también se determinó mediante ELISA en la corteza y cerebelo de ratones tratados por PBS tratados por anticuerpo y de control. Dos ensayos de APP diferentes se utilizaron. El primero, denominado APP- α /FL, reconoce tanto APP-alfa (α , la forma secretada de APP que se ha escindido dentro de la secuencia A β), y formas de longitud completa (FL) de APP, mientras que el segundo reconoce sólo APP- α . En contraste con la disminución asociada a tratamiento de A β en un subconjunto de grupos de tratamiento, los niveles de APP estaban prácticamente sin cambios en todos los animales tratados en comparación con los de control. Estos resultados indican que las inmunizaciones con anticuerpos A β agotan A β sin agotar APP.

En resumen, los niveles de A β se redujeron significativamente en la corteza, el hipocampo y el cerebelo en animales tratados con el anticuerpo políclonal producido contra AN1792. En menor medida, los anticuerpos monoclonales para la región amino terminal de A β 1-42, específicamente aminoácidos 1-16 y 13-28 también mostraron efectos significativos del tratamiento.

4. Análisis histoquímicos:

La morfología de las placas A β -inmunoreactivas en subconjuntos de cerebros de ratones en los grupos de tratamiento PBS, AB42 políclonal, 21F12, 266 y 10D5 se comparó cualitativamente con los estudios previos en los que los procedimientos de inmunización estándar con AB42 fueron seguidos.

La alteración más grande tanto en la extensión como la aparición de placas amiloideas ocurrieron en los animales inmunizados con el anticuerpo políclonal A β 42. La reducción de la carga amiloide, morfología erosionada de placa e inmunorreactividad A β asociada a células se parecía estrechamente a los efectos producidos por el procedimiento de inmunización estándar. Estas observaciones apoyan los resultados de ELISA en loz que reducciones significativas tanto en A β total como A β 42 se lograron por la administración del anticuerpo políclonal A β 42.

En evaluaciones cualitativas similares, placas de amiloide en el grupo de 10D5 también se redujeron en número y aspecto, con alguna evidencia de inmunorreactividad A β asociada a células. En relación con los animales tratados por control, la fracción Ig políclonal contra A β y uno de los anticuerpos monoclonales (10D5) redujo la carga de placas en un 93% y 81%, respectivamente (p<0,005). 21F12 parecía tener un efecto relativamente modesto sobre la carga de la placa. Las micrografías de cerebro después del tratamiento con pabA β 1-42 muestran depósitos

difusos y ausencia de muchas de las placas compactadas más grandes en el grupo tratado pabA β ₁₋₄₂ en relación con los animales tratados por control.

5 5. Medición de títulos de anticuerpos:

Un subconjunto de tres ratones elegidos aleatoriamente de cada grupo se sangraron justo antes de cada inoculación intraperitoneal, para un total de 30 extracciones de sangre. Los títulos de anticuerpos se midieron como anticuerpo de unión a A β ₁₋₄₂ usando un ELISA de tipo sándwich con placas de multipocillo de plástico revestidas con A β ₁₋₄₂ como se describe en detalle en los Materiales y Procedimientos Generales. Los títulos medios para cada extracción de sangre se muestran en las Figuras 16-18 para el anticuerpo políclonal y los 10D5 y 21F12 monoclonales, respectivamente. Los títulos tenían un promedio de aproximadamente 1000 durante este período de tiempo para la preparación de anticuerpos políclonal y eran ligeramente por encima de este nivel para animales tratados con 10D5 y 21F12.

15

6. Respuestas linfoproliferativas:

Linfoproliferación dependiente de A β se midió usando células de bazo recogidas ocho días después de la infusión final de anticuerpo. Las células recién cosechadas, 10⁵ por pocillo, se cultivaron durante 5 días en presencia de A β ₁₋₄₀ a una concentración de 5 μ M para la estimulación. Como control positivo, se cultivaron células adicionales con el mitógeno de células T, PHA, y, como control negativo, células se cultivaron sin péptido añadido.

Los esplenocitos de ratones PDAPP inmunizados pasivamente con diversos anticuerpos anti-A β se estimularon *in vitro* con AN1792 y se midieron las respuestas proliferativas y de citoquinas. El propósito de estos ensayos era el de determinar si la inmunización pasiva facilitaba la presentación del antígeno, y por lo tanto el cebado de respuestas de células T específicas para AN1792. No se observó respuestas proliferativas o citoquinas AN1792 específicas en ratones pasivamente inmunizados con los anticuerpos anti-A β .

30 XII: ESTUDIO ADICIONAL DE LA INMUNIZACIÓN PASIVA

En un segundo estudio, el tratamiento con 10D5 se repitió y se ensayaron dos anticuerpos anti-A β adicionales, los monoclonales 3D6 (A β ₁₋₅) y 16C11-(A β ₃₃₋₄₂). Los grupos de control recibieron PBS o un anticuerpo irrelevante ajustado a isotipo (TM2a). Los ratones eran más viejos (heterocigotos de 11,5-12 meses de edad) que en el estudio anterior, de lo contrario el diseño experimental era el mismo. Una vez más, después de seis meses de tratamiento, 10D5 redujo la carga de placas en más de un 80% con respecto a PBS o controles de anticuerpos ajustado a isotipo ($p = 0,003$). Uno de los otros anticuerpos contra A β , 3D6, era igualmente eficaz, produciendo una reducción del 86% ($p = 0,003$). En contraste, el tercer anticuerpo contra el péptido, 16C11, no tuvo ningún efecto sobre la carga de placas. Se obtuvieron resultados similares con las mediciones A β ₄₂ ELISA. Estos resultados demuestran que una respuesta de anticuerpos contra el péptido A β , en ausencia de inmunidad de células T, es suficiente para disminuir la deposición amiloide en ratones PDAPP, pero que no todos los anticuerpos anti-A β son eficaces. Los anticuerpos dirigidos a epítopos que comprenden 30 aminoácidos 15 o 37 de A β son particularmente eficaces.

45 En resumen, hemos demostrado que los anticuerpos administrados pasivamente contra A β redujeron la extensión de la deposición de la placa en un modelo de ratón de la enfermedad de Alzheimer. Cuando se mantiene en concentraciones séricas modestas (25-70 μ g/ml), los anticuerpos tuvieron acceso al SNC a niveles suficientes para decorar las placas β -amiloide. La entrada de anticuerpos en el SNC no se debía a una fuga anormal de la barrera hematoencefálica ya que no había aumento en la permeabilidad vascular medida por Azul de Evans en ratones PDAPP. Además, la concentración de anticuerpo en el parénquima cerebral de ratones PDAPP era igual que en ratones no transgénicos, representando el 0,1% de la concentración de anticuerpos en suero (independientemente del isotipo).

55 XIII: CONTROL DE LA UNIÓN DE ANTICUERPOS

50 Para determinar si los anticuerpos contra A β podrían estar actuando directamente dentro del SNC, los cerebros tomados de ratones perfusionados con salina al final del Ejemplo XII, se examinaron para la presencia de los anticuerpos administrados periféricamente. Secciones de cerebro de criostato no fijadas fueron expuestas a un reactivo fluorescente contra inmunoglobulina de ratón (IgG-Cy3 anti-ratón de cabra). Las placas dentro de cerebros de los grupos de 10D5 y 3D6 fueron fuertemente decoradas con el anticuerpo, mientras que no hubo tinción en el grupo de 16C11. Para revelar el grado completo de deposición de la placa, las secciones seriadas de cada cerebro se inmunorreaccionaron primero con un anticuerpo anti-A β , y después con el reactivo secundario. 10D5 y 3D6, después de la administración periférica, tuvieron acceso a la mayoría de las placas dentro del SNC. La carga de placas se redujo enormemente en estos grupos de tratamiento en comparación con el grupo 16C11. Estos datos indican que anticuerpos administrados periféricamente pueden entrar en el SNC donde pueden desencadenar directamente aclaramiento de amiloide. Es probable que 16C11 también tenía acceso a las placas pero era incapaz

de unirse.

XIV: ENSAYO DE EXAMEN EX VIVO PARA ACTIVIDAD DE UN ANTICUERPO CONTRA DEPÓSITOS AMILOIDES

5 Para examinar el efecto de los anticuerpos sobre la eliminación de placas, establecimos un ensayo *ex vivo* en el que las células microgliales primarios se cultivaron con secciones de criostato no fijadas de cualquiera de ratón PDAPP o cerebros A β humanos. Las células microgliales se obtuvieron de las cortezas cerebrales de ratones DBA12N neonatos (13 días). Las cortezas se disociaron mecánicamente en HBSS (Solución salina equilibrada de Hanks, Sigma) con 50 μ g/ml de DNase I (Sigma). Las células disociadas se filtraron con un filtro de células gm 100 (Falcon), y se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos. El sedimento se resuspendió en medio de crecimiento (DMEM de alta glucosa, 10% de FBS, 25 ng/ml rmGM-CSF), y las células se sembraron a una densidad de 2 10 cerebros por matraz de cultivo de plástico T75. Después de 79 días, los matraces se rotaron en un agitador orbital a 200 rpm durante 2 horas a 37°C. La suspensión celular se centrifugó a 1000 rpm y se resuspendió en el medio de 15 ensayo.

15 Las secciones de criostato 10- μ m de cerebros EA humanos o de ratón PDAPP (intervalo postmortem de <3 h) fueron montados en deshielo en cubreobjetos de vidrio redondos recubiertos de polilisina y se colocaron en 20 pocillos de placas de 24 pocillos de cultivo tisular. Los cubreobjetos se lavaron dos veces con el medio de ensayo consistente en HSFM (medio libre de suero hibridoma, Gibco BRL) con 1% de FBS, glutamina, 25 penicilina/estreptomicina, y 5ng/ml rmGM-CSF (R&D). Control o anticuerpos anti-A β se añadieron a una concentración 2x (5 μ g/ml final) durante 1 hora. Las células microgliales fueron entonces sembradas a una densidad de 0,8 x 10 6 células/ml de medio de ensayo. Los cultivos se mantuvieron en un incubador humidificado (37°C, 5%CO $_2$) para las 24 horas o más. Al final de la incubación, los cultivos se fijaron con paraformaldehído al 4% y se 30 permeabilizaron con 0,1% Triton-X100. Las secciones se tiñeron con 3D6 biotinilado seguido de un conjugado estreptavidina/Cy3 (Jackson ImmunoResearch). Se visualizaron las células microgliales exógenas por una tinción nuclear (DAPI). Los cultivos se observaron con un microscopio fluorescente invertida (Nikon, TE300) y microfotografías fueron tomadas con una cámara digital SPOT usando el software SPOT (instrumentos de diagnóstico). Para el análisis Western blot, se extrajeron los cultivos en urea 8 M, se diluyeron 1: 1 en tampón de muestra reductor de tricina y se cargaron en un gel de tricina 16% (Novex). Después de la transferencia sobre immobilon, las transferencias se expusieron a 5 μ g/ml de pabA β 42 seguidos por un anticuerpo anti-ratón conjugado por HRP, y se desarollaron con ECL (Amersham).

35 Cuando el ensayo se realizó con secciones de cerebro PDAPP en presencia de 16C11 (uno de los anticuerpos contra A β que no era eficaz *in vivo*), las placas β -amiloide permanecieron intactas y no se observó fagocitosis. En contraste, cuando las secciones adyacentes se cultivaron en presencia de 10D5, los depósitos amiloideos desaparecieron en gran medida y las células microgliales mostraban numerosas vesículas fagocíticas que 40 contienen A β . Se obtuvieron resultados idénticos con secciones cerebrales EA; fagocitosis inducida por 10D5 de placas EA, mientras que 16C11 era ineficaz. Además, el ensayo proporcionó resultados comparables cuando se realizó con el ratón o las células microgliales humanas, y con el ratón, conejo, o anticuerpos de primates contra A β .

45 La Tabla 16 muestra si la unión y/o fagocitosis se obtuvo para varias especificidades de unión diferentes de anticuerpos. Se puede observar que los anticuerpos que se unen a epítopos dentro de aa 1-7 tanto unen como aclaran depósitos amiloideos, mientras que los anticuerpos que se unen a epítopos dentro de los aminoácidos 4-10 se unen sin eliminar los depósitos amiloideos. Los anticuerpos que se unen a epítopos C-terminales al residuo 10 ni unen ni aclaran depósitos amiloideos.

Tabla 16: Análisis de Especificidad Epítopo

N-Term	Anticuerpo		Tinción	Fagocitosis
	epítopo	isotipo		
MAB				
3D6	1-5	IgG2b	+	+
10D5	3-6	IgG1	+	+
22C8	3-7	IgG2a	+	+
6E10	5-10	IgG1	+	-
14A8	4-10	IgG1 de rata	+	-
13-28				
18G11	10-18	IgG1 de rata	-	-
266	16-24	IgG1	-	-
22D12	18-21	IgG2b	-	-
C-Término				
2G3	-40	IgG1	-	-
16C11	-40/-42	IgG1	-	-
21F12	-42	IgG2a	-	-
Suero inmune				
conejo (CFA)	1-6		+	+
ratón (CFA)	3-7		+	+
ratón (QS-21)	3-7		+	+
mono (QS-21)	1-5		+	+
ratón (MAPI-7)			+	+

La Tabla 17 muestra los resultados obtenidos con varios anticuerpos contra A β , comparando sus capacidades para inducir la fagocitosis en el ensayo *ex vivo* y para reducir carga de placa *in vivo* en estudios de transferencia pasiva. Aunque 16C11 y 21F12 unidos a péptido A β sintético agregado con alta avidez, estos anticuerpos eran incapaces de reaccionar con placas β -amiloides en secciones del cerebro no fijadas, no podían desencadenar fagocitosis en el ensayo *ex vivo*, y no eran eficaces *in vivo*. 10D5, 3D6, y el anticuerpo políclonal contra A β fueron activos por las tres medidas. El anticuerpo 22C8 se une más fuertemente a una forma analógica de origen natural A β en la que el ácido aspártico en las posiciones 1 y 7 se sustituye con ácido isoaspártico. Estos resultados muestran que la eficacia *in vivo* se debe a la liquidación del anticuerpo directa mediada de las placas dentro del SNC, y que el ensayo *ex* es predictivo de la eficacia *in vivo*.

5

10

15

El mismo ensayo se ha utilizado para examinar la liquidación de un anticuerpo contra un fragmento de sinucleína denominado como NAC. Sinucleína ha demostrado ser una proteína asociada a placas amiloides. Un anticuerpo a NAC se puso en contacto con una muestra de tejido cerebral que contenía placas amiloides, células microgliales, como antes. Suero de conejo se usó como un control. control posterior mostró una marcada reducción en el número y tamaño de placas indicativas de la actividad de eliminación del anticuerpo.

Tabla 17 El ensayo *ex vivo* como predictor de la eficacia *in vivo*.

	Anticuerpo	Isotipo	Avidez para A β agregada (pM)	Unión a placas β -amiloides	Eficacia <i>ex vivo</i>	Eficacia <i>in vivo</i>
5						
10						
15						
20						
25						
30						
35						
40						
45						
50						
55						
60						
65						

La microscopía confocal se usó para confirmar que A β se internaliza durante el transcurso del ensayo *ex vivo*. En presencia de anticuerpos de control, las células microgliales exógenas permanecían en un plano confocal encima del tejido, no había vesículas fagocíticas que contenían A β , y las placas permanecieron intactas dentro de la sección. En presencia de 10D5, casi todo el material de placa estaba contenido en vesículas dentro de las células microgliales exógenas. Para determinar el destino del péptido internalizado, cultivos tratados con 10D5 se extrajeron con urea 8M en varios puntos de tiempo, y se examinaron por análisis de transferencia Western. Al punto de tiempo de una hora, cuando aún no se había producido fagocitosis, la reacción con un anticuerpo policlonal contra A β reveló una fuerte banda 4 kD (correspondiente al péptido A β). La inmunorreactividad A β se disminuyó en el día 1 y estaba ausente el día 3. De esta manera, la fagocitosis mediada por anticuerpos de A β conduce a su degradación.

Para determinar si la fagocitosis en el ensayo *ex vivo* era Fc-mediado, fragmentos F(ab')2 del anticuerpo anti-A β 3D6 se prepararon. Aunque los fragmentos F(ab')2 retenían su capacidad completa de reaccionar con las placas, eran incapaces de desencadenar la fagocitosis por células microgliales. Además, la fagocitosis con el anticuerpo completo podía bloquearse por un reactivo contra receptores Fc murinos (anti-CD16/32). Estos datos indican que la liquidación *in vivo* de A β ocurre a través de la fagocitosis mediada por Fc-receptor.

40 XV: PASO DE ANTICUERPOS A TRAVÉS DE LA BARRERA SANGUÍNEA DEL CEREBRO

Este ejemplo determina la concentración de anticuerpo suministrado al cerebro después de la inyección intravenosa en un tejido periférico de cualquiera de ratones normales o PDAPP. Ratones normales PDAPP o de control fueron perfundidos con 0,9% de NaCl. Las regiones cerebrales (hipocampo o corteza) se diseccionaron y se congelaron rápidamente. Cerebro se homogeneizó en inhibidores 0,1% triton + proteasa. La inmunoglobulina se detectó en los extractos por ELISA. IgG anti-ratón de cabra Fab'2 se revistieron sobre una placa de RIA como reactivo de captura. Extractos de suero o de cerebro se incubaron durante 1 h. Los isotipos se detectaron con anti-ratón de IgG1-HRP o IgG2a-HRP o IgG2b-HRP (Caltag). Los anticuerpos, independientemente del isotipo, estaban presentes en el SNC a una concentración que es 1: 1000 la encontrada en la sangre. Por ejemplo, cuando la concentración de IgG1 era tres veces la de IgG2a en la sangre, era tres veces IgG2a en el cerebro, estando ambos presentes en 0,1% de sus niveles respectivos en la sangre. Este resultado se observó tanto en ratones transgénicos como no transgénicos por lo que el PDAPP no tiene una barrera hematoencefálica de fuga única.

55 XVI: EFICACIA TERAPÉUTICA DE UN PÉPTIDO AB EN LA CONFIGURACIÓN MAP

Un estudio de eficacia terapéutico adyuvante/inmunógeno se realizó en ratones transgénicos PDAPP heterocigotos machos y hembras de 9 a 10,5 meses de edad para examinar la eficacia de una proteína de fusión que comprende A β 1-7 en la configuración de MAP tetramérica como se describe anteriormente. La duración del estudio era de 25 semanas con 29-40 animales por grupo de tratamiento; por lo tanto, los animales era de 15 a 16,5 meses de edad en la terminación. La metodología utilizada en este estudio es la misma que en el estudio terapéutico de diferentes adyuvantes en el Ejemplo VIII anteriormente. Los grupos de tratamiento se identifican en la Tabla 18 a continuación.

Tabla 18

	Adyuvante	Inmunógeno	Tampón de dilución	Administración
5	Grupo 1: CFA/IFA	MAP (A β 1-7: TT) (100 μ g)	PBS	IP (400 μ l)
10	Grupo 2: QS21	AN1792-GCS (75 μ g)	PBS	SC (250 μ l)
15	Grupo 3: PBS			SC (250 μ l)

10 Abreviaturas de la tabla: MAP - péptido multiantigénica; TT - epítopo de células T toxoide tetánico (830,844); subcutánea SC; IP vía intraperitoneal; fosfato PBS solución salina tamponada; GCS es una formulación de glicina/citrato/sacarosa.

15 El calendario de inmunización era idéntico para todos los grupos de tratamiento. Los ratones se inyectaron en las semanas 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, con extracciones de sangre en la semana 3, 5, 9, 13, 17, 21 y 25. Los grupos 1, 2, 3, 4, y 6 recibieron ocho inyecciones de Grupos 2 y 3, QS21/AN1792 y PBS, respectivamente, que se sirvieron como controles positivos y negativos para este estudio.

20 Los títulos se determinaron mediante el ensayo de título de anticuerpos anti-A β .

25 **Grupo 1**, grupo CFA/IFA: MAP (A β 1-7: TT), tenían niveles bajos de título. GMT máximo alcanzado sólo era de 1.200 a las 13 semanas, cayendo a un GMT de 600 a la semana 25. Hubo 3 de los 30 ratones que no alzaron ningún título y otros 7 ratones que no superaron un título de 400 al final del estudio.

30 **Grupo 2**, el grupo de control QS21/AN1792, alcanzó su título máximo a las 17 semanas con un GMT de 16.000. El título después cayó en las próximas 8 semanas para terminar con un GMT de 8700. Un animal en este grupo no alzó un título a lo largo del experimento.

35 **Grupo 3**, el grupo de PBS sólo, no tenía títulos.

40 Ambos grupos de tratamiento mostraron un descenso significativo en los niveles corticales A β en comparación con el grupo de control PBS (véase la Tabla 19). El grupo CFA/IFA:MAP (A β 1-7), rebajó significativamente la A β en comparación con el grupo de control PBS a pesar de los relativamente bajos títulos de anticuerpos anti-A β .

Tabla 19 Niveles corticales A β

	PBS	MAPA	QS-21
40	MEDIANA (tejido ng/g)	7.335	3.692
45	RANGO (tejido ng/g)	550-18.358	240-10.782
	Valor de p	----	0,0003
	N	38	30
			34

50 En conclusión, el inmunógeno A β 1-7MAP es eficaz en la inducción de una respuesta inmune suficiente para retardar significativamente la deposición de A β en la corteza.

XVII. MAPEO DE EPÍTOPOS DE RESPUESTA INMUNOGÉNICA A A β EN MONOS

55 Este ejemplo analiza la respuesta de un primate a la inmunización con AN1792 (es decir, A β 1-42). Once grupos de monos (4/sexo/grupo) se inmunizaron con AN1792 (75 o 300 μ g/dosis) en combinación con el adyuvante QS-21-(50 o 100 μ g/dosis) o 5% dextrosa estéril en agua (D5W, grupo de control). Todos los animales recibieron inyecciones IM en uno de tres horarios de inyección como se muestra en la Tabla 20 para un total de 4, 5 o 8 dosis. Las muestras de suero (de 4 monos/sexo/grupo) recogidas en el Día 175 de las muestras de estudio y CSF (de 3 monos/sexo/grupo) recogidas en el Día 176 del estudio (en la necropsia a 6 meses) se evaluaron por su capacidad de unirse al péptido A β 1-40 y APP.

Tabla 20: Asignaciones de grupo y los niveles de dosis

Nº de Grupo	Horario ^a	# Monos (M/F)	AN1792 Dosis (µg/dose)	QS-21 Dosis (µg/dosis)	Ruta de dosis
	1	4/4	0	0	IM
2	1	4/4	Vehículo ^c	50	IM
3	1	4/4	Vehículo	100	IM
4	1	4/4	75	50	IM
5	1	4/4	300	50	IM
6	1	4/4	75	100	IM
7	1	4/4	300	100	IM
8	2	4/4	75	100	IM
9	2	4/4	300	100	IM
10	3	4/4	75	100	IM
11	3	4/4	300	100	IM

a. Horario 1, días de dosis 1, 15, 29, 57, 85, 113, 141, 169; Horario 2, días de dosis 1, 29, 57, 113, 169; Horario 3, días de dosis 1, 43, 85, 169
 b. Grupo de control de inyección D5W
 c. Portador consiste en el tampón de glicina/citrato/sacarosa que es el excipiente para AN1792.

La matriz exacta de péptidos lineales reconocidos por los anticuerpos en las muestras de suero de animales inmunizados con AN1792 se determinó mediante un ELISA que midió la unión de estos anticuerpos a péptidos solapantes que cubrían toda la secuencia A β 1-42. Péptidos biotinilados con secuencias parciales de AN1792 se obtuvieron de Chiron Technologies como 10 péptidos de aminoácidos con un solapamiento de 9 residuos y una etapa de un residuo por péptido (síntesis Nº 5366, Nº 5331 y Nº 5814). Los primeros 32 péptidos (desde la posición de ocho aminoácidos aguas arriba de N-terminal de AN1792 al vigesimocuarta aminoácido de AN1792) están biotinilados en el C-terminal con un enlazador de GGK. Los últimos 10 péptidos (repitiendo el péptido de treinta segundos a partir de la serie anterior) se biotinilan en el N-terminal con un enlazador que consiste en EGEG. Los péptidos biotinilados liofilizados se disolvieron a una concentración de 5 mM en DMSO. Estas reservas de péptidos se diluyeron a 5 µM en TTBS (0,05% de Tween 20, 25 mM Tris HCl, 137 mM NaCl, 5,1 mM KCl, pH = 7,5). Se añadieron alícuotas de 100 µl de esta solución 5 µM por duplicado a placas de 96 pocillos con estreptavidina recubierta previamente (Pierce). Las placas se incubaron durante una hora a la temperatura ambiente, después se lavó cuatro veces con TTBS. Las muestras de suero se diluyeron en muestra de diluyente sin azida para normalizar títulos, y se añadió 100 µl por pocillo. Estas placas se incubaron una hora a temperatura ambiente y después se lavó cuatro veces con TTBS. Anticuerpo antihumano de cabra de HRP conjugado (Jackson ImmunoResearch) se diluyó 1:10.000 en diluyente de muestra sin azida y se añadió 100 µl por pocillo. Las placas se incubaron de nuevo y se lavaron. Para desarrollar la reacción de color, TMB (Pierce), se añadió a 100 µl por pocillo y se incubó durante 15 min antes de la adición de 30 µl de 2 N H₂SO₄ para detener la reacción. La densidad óptica se midió a 450 nm en un lector de placas colorimétrico Vmax o Spectramax. La inmunización con AN1792 dio como resultado la producción de anticuerpos en el 100% de los animales en todos los grupos de dosis por Día 175. Los títulos medios en los grupos oscilaron entre 14596 - 56084. Hubo una tendencia para los títulos a ser más altos dentro de un programa de inmunización en la presencia de antígeno más alto y/o mayor concentración de adyuvante, pero no se pudo demostrar diferencias estadísticamente significativas debido a la alta variabilidad en las respuestas individuales de los animales a las inmunizaciones.

Sueros que fueron positivos para anticuerpos a AN1792 también fueron positivos para anticuerpos para A β 1-40. Los títulos medios en los grupos oscilaron entre 36867-165991, y en cuanto a títulos anti-AN1792, no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en el Día 175. La unión a AN1792 mostraron una correlación altamente positiva (Spearman r = 0,8671) con la unión a A β 1-40.

5 De los 48 monos inmunizados en diferentes horarios con AN1792, 33 muestras de CSF producidas de volumen adecuado y la calidad para el análisis. Treinta y dos (97%) de estos monos tenían títulos positivos a AN1792. Los títulos variaron de 2-246, con una media de $49,44 \pm 21,34$. Niveles CSF anti-AN1792 fueron $0,18 \pm 0,11\%$ de lo que se midió en el suero y demostraron una correlación altamente positiva (Spearman $r = 0,7840$) con títulos séricos. Ninguna diferencia observó entre los grupos o entre sexos en el porcentaje de anticuerpo en el CSF. El nivel de anticuerpo en el CSF es consistente con la transferencia pasiva de anticuerpo generado periféricamente a través de la barrera hematoencefálica en el sistema nervioso central.

10 El examen de un subconjunto de muestras de CSF positivas anti-AN1792 demostró que, como el anticuerpo en muestras de suero, el anticuerpo en el CSF reacciona cruzadamente con A β 1-40. Los títulos a A β 1-40 mostró una alta correlación (Spearman $r = 0,9634$) a sus respectivos títulos de AN1792. El examen de un subconjunto de muestras de CSF con los títulos más altos a AN1792 no mostraron ninguna unión a APP, como para los anticuerpos séricos.

15 15 Cuando los sueros del Día 175 se ensayaron frente a una serie de péptidos solapantes 10-mer, anticuerpos de todos los monos unidos al péptido cuya secuencia cubrió aminoácidos 1-10 del péptido AN1792 (aminoácidos 653-672 de APP). En algunos animales, este fue el único péptido al que la unión podría ser medida (véase FIG. 19).

20 20 En otros animales, otras reactividades podrían medirse, pero en todos los casos la reactividad a la secuencia peptídica N-terminal era la predominante. Las reactividades adicionales se dividían en dos grupos. Primero y más común, era la unión a péptidos de centrado alrededor de un péptido AN1792 de N-terminal 1-10 (Figura 20). La unión de este tipo fue dirigida a los péptidos que abarcan los aminoácidos 1-8, 1-9, y 2-11 del péptido AN1792. Estas reactividades, combinadas con el péptido 1-10, representan la inmensa mayoría de la reactividad en todos los animales. El mapeo de epítopos de los animales individuales en el tiempo indica que la reactividad de los 25 anticuerpos para el péptido 1-10 procede la propagación a los péptidos adyacentes. Esto demuestra una fuerte desviación de la respuesta inmune al péptido AN1792 N-terminal con su residuo de ácido aspártico de terminal libre. La segunda actividad detectable menor en algunos animales era vinculante a los péptidos localizados en C-terminal a la zona mayor y centrados alrededor de péptidos que cubren los aminoácidos 7-16, 11-20 y 16-25 del péptido AN1792. Estas reactividades se observaron sólo en 10-30% de los monos.

30 30 La variabilidad en la respuesta entre diferentes animales (por ejemplo, si los aminoácidos 1-10 fueron el epítopo reactivo exclusivo o predominante) no se correlacionó con la dosis de antígeno/adyuvante, horario de dosificación, o el título de anticuerpos, y es probablemente un reflejo de la composición genética de cada animal individual.

35 XVIII. PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DE SUJETOS HUMANOS

40 40 Un ensayo de fase I de dosis única se realiza para determinar la seguridad en los seres humanos. Un agente terapéutico se administra en dosificaciones crecientes a diferentes pacientes a partir de aproximadamente 0,01 el nivel de eficacia supuesta, y aumentando en un factor de tres hasta un nivel de aproximadamente 10 veces se alcanza la dosificación eficaz del ratón.

45 45 Un ensayo de fase II se lleva a cabo para determinar la eficacia terapéutica. Los pacientes con enfermedad de Alzheimer de etapa temprana a mediana definida utilizando los criterios de Alzheimer's disease and Related Disorders Association (ADRDA) para EA probable. La puntuación de pacientes adecuados en el rango de 12-26 en el Mini-Mental State Exam (MMSE). Otros criterios de selección son que los pacientes son propensos a sobrevivir a la duración del estudio y carecen de problemas que complican tales como el uso de medicaciones concomitantes que puedan interferir. Las evaluaciones iniciales de la función del paciente se realizan usando medidas psicométricas clásicas, como el MMSE y la ADAS, que es una escala exhaustiva para evaluar pacientes con estado y función de la enfermedad de Alzheimer. Estas escalas psicométricas proporcionan una medida de la progresión de la enfermedad de Alzheimer. Escalas de vida cualitativas adecuadas también se pueden utilizar para controlar el tratamiento. La progresión de la enfermedad también se puede controlar mediante resonancia magnética. Los perfiles sanguíneos de los pacientes también se pueden monitorizar incluyendo ensayos de anticuerpos y las respuestas de 50 50 células T inmunógeno específicas.

55 55 Tras medidas basales, los pacientes empiezan a recibir tratamiento. Se aleatorizaron y se trataron con agente terapéutico o placebo de forma ciega. Los pacientes se controlan al menos cada seis meses. La eficacia se determina por una reducción significativa en la progresión de un grupo de tratamiento con respecto a un grupo placebo.

60 60 Un segundo ensayo de fase II se realiza para evaluar la conversión de pacientes de pérdida de memoria temprana de la enfermedad de tipo no Alzheimer, a veces denominada deterioro de memoria asociado a la edad (AAMI) o deterioro cognitivo leve (DCL), a la enfermedad de Alzheimer probable como se define por criterios ADRDA. Los pacientes con alto riesgo de conversión a la enfermedad de Alzheimer se seleccionan de una población no clínica mediante el cribado de poblaciones de referencia para signos tempranos de pérdida de memoria u otras

dificultades asociadas con la sintomatología de pre-Alzheimer, un historial familiar de enfermedad de Alzheimer, factores de riesgo genéticos, edad, sexo y otras características encontradas para predecir alto riesgo para la enfermedad de Alzheimer. Se recogen puntuaciones basales en las métricas adecuadas incluyendo MMSE y ADAS junto con otras métricas diseñadas para evaluar una población más normal. Estas poblaciones de pacientes se dividen en grupos adecuados con comparación de placebo frente a alternativas de dosificación con el agente. Estas poblaciones de pacientes se siguieron a intervalos de aproximadamente seis meses, y el criterio de valoración para cada paciente es si o no se convierte en la enfermedad de Alzheimer probable según los criterios ADRDA al final de la observación.

10 XIX. Materiales y métodos generales

1. La medición de títulos de anticuerpos

15 Se sangraron los ratones haciendo un pequeño corte en la vena de la cola y recogiendo aproximadamente 200 μ l de sangre en un tubo de microcentrifuga. Los cobayas se sangraron primero mediante el afeitado de la zona de la espalda del corvejón y después usando una aguja de calibre 18 para cortar la vena metatarsiana y recogiendo la sangre en tubos de microcentrifuga. La sangre se dejó coagular durante una hora a temperatura ambiente (TA), se sometió a vórtex, después se centrifugó a 14.000 x g durante 10 min para separar el coágulo del suero. Entonces el suero se transfirió a un tubo de microcentrifuga limpio y se almacenó a 4°C hasta que se titularon.

20 Los títulos de anticuerpos se midieron por ELISA. Placas de microtitulación de 96 pocillos (placas Costar EIA) se recubrieron con 100 μ l de una solución que contiene o bien 10 μ g/ml ya sea A β 42 o SAPP u otros antígenos como se indica en cada uno de los informes individuales en Tampón de Recubrimiento de Pocillo (fosfato de sodio 0,1 M, pH 8,5, 0,1% de azida de sodio) y se mantiene durante la noche a TA. Los pocillos se aspiraron y los sueros se añadieron a los pocillos comenzando a una dilución 1/100 en Diluyente de Muestra (fosfato sódico 0,014 M, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 0,6% de albúmina de suero bovino, 0,05% de timerosal). Siete diluciones seriadas de las muestras se hicieron directamente en las placas en etapas de tres clases para alcanzar una dilución final de 1/218.700. Las diluciones se incubaron en los pocillos de placas recubiertos durante una hora a TA. A continuación, las placas se lavaron cuatro veces con PBS que contenía 0,05% de Tween 20. El segundo anticuerpo, una Ig anti-ratón de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (obtenida de Boehringer Mannheim), se añadió a los pocillos como 100 μ l de una dilución 1/3000 de Diluyente de Muestra y se incubó durante una hora a TA. Las placas se lavaron nuevamente cuatro veces en PBS, Tween 20. Para desarrollar el cromógeno, 100 μ l de TMB lenta (3,3',5,5'-bencidina de tetrametilo se obtuvo de Pierce Chemicals) se añadió a cada pocillo y se incubó durante 15 min a TA. La reacción se detuvo mediante la adición de 25 μ l de 2 M H₂SO₄. A continuación, la intensidad del color se leyó en un Vmax de Dispositivos Moleculares a (450 nm - 650 nm).

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

40 2. Ensayo de proliferación de linfocitos

45 Los ratones fueron anestesiados con isoflurano. Se retiraron los bazo y se enjuagaron dos veces con 5 ml de PBS que contenía suero bovino fetal inactivado térmicamente al 10% (PBS-FBS) y a continuación se homogeneizó en una unidad Centricon de 50° (Dako A/S, Dinamarca) en 1,5 ml PBS-FBS durante 10 segundos a 100 rpm en un Medimachine (Dako) seguido por filtración a través de una malla de nylon de tamaño de poro de 100 micrómetros. Los esplenocitos se lavaron una vez con 15 ml de PBS-FBS, y a continuación granulizados por centrifugación a 200 x g durante 5 min. Los glóbulos rojos se lisaron mediante resuspensión de los gránulos en 5 mL de tampón que contenía 0,15 M NH4CL, 1 M KHCO₃, 0,1 M NaEDTA, pH 7,4 durante cinco min a TA. Entonces los leucocitos se lavaron como anteriormente. Células recién aisladas de bazo (10^5 células por pocillo) se cultivaron en conjuntos por triplicado en placas de microtitulación tratadas por cultivo de tejido de fondo U de 96 pocillos (Corning, Cambridge, MA) en medio RPMI 1640 (JRH Biosciences, Lenexa, KS) suplementado con 2,05 mM de L glutamina, 1% de penicilina/estreptomicina, y 10% de EBS activada térmicamente, durante 96 h a 37°C. También se añadieron varios péptidos A β , A β 1-16, A β 1-40, A β 1-42 o A β 40-1 proteína de secuencia inversa a dosis que oscilan desde 5 hasta 0,18 micromolares en cuatro pasos. Las células en los pocillos de control se cultivaron con Concanavalina A (Con A) (Sigma, cat. n° C5275, a 1 microgramo/ml) sin proteína añadida. Las células se pulsaron durante las últimas 24 h con 3H-timidina (1 μ Ci/pocillo obtenido de Amersham Corp., Arlington Heights IL). Las células se recogieron a continuación en placas UniFilter y se contaron en un contador de centelleo de microplacas de conteo superior (Packard Instruments, Downers Grove, IL). Los resultados se expresan como cómputo por minuto (cpm) de radiactividad incorporada en las macromoléculas insolubles.

60 4. Preparación de tejidos de cerebro

65 Despues de la eutanasia, los cerebros se retiraron y un hemisferio se preparó para el análisis

inmunohistoquímico, mientras que tres regiones del cerebro (hipocampo, corteza y cerebelo) se diseccionaron a partir del otro hemisferio y se usaron para medir la concentración de diversas proteínas A β y formas de APP usando ELISA específicos (JohnsonWood *et al.*, *Supra*).

5 Los tejidos destinados para los ELISA se homogeneizaron en 10 volúmenes de tampón enfriado con tampón de guanidina helado (5,0 M guanidina-HCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0). Los homogeneizados se mezclaron por agitación suave usando un Nutator Adams (Fisher) durante tres a cuatro h a TA, después se almacenaron a -20°C antes de la cuantificación de A β y APP. Experimentos previos habían demostrado que los analitos eran estables en estas condiciones de almacenamiento, y que la proteína A β sintética (Bachem) se podrían recuperar 10 cuantitativamente cuando se alzaron en homogeneizados de tejido cerebral de control de los compañeros de camada de ratón (JohnsonWood *et al.*, *Supra*).

5. Medición de los niveles de A β

15 Los homogeneizados cerebrales se diluyeron 1:10 con Diluyente de Caseína helado (0,25% de caseína, PBS, 0,05% de azida de sodio, 20 μ g/ml de aprotinina, 5 mM EDTA pH 8,0, 10 μ g/ml de leupeptina) y después se centrifugaron a 16.000 x g durante 20 mm a 4°C. Las A β estándares sintéticas de proteína (142 aminoácidos) y los 20 patrones de APP se prepararon para incluir 0,5 M de guanidina y 0,1% de albúmina de suero bovino (BSA) en la composición final. La ELISA sándwich A β "total" utiliza anticuerpo monoclonal 266, específico para los aminoácidos 13-28 de A β (Seubert, *et al.*), como anticuerpo de captura, y anticuerpo monoclonal biotinilado 3D6, específico para los aminoácidos 1-5 de A β (JohnsonWood, *et al.*), como el anticuerpo reportero. El anticuerpo monoclonal 3D6 no reconoce APP secretada o APP de longitud completa, pero sólo detecta especies de A β con un ácido aspártico amino terminal. Este ensayo tiene un límite inferior de sensibilidad de 50 ng/ml (11 nM) y no muestra reactividad 25 cruzada con la proteína A β -murina endógena a concentraciones de hasta 1 ng/ml (JohnsonWood *et al.*, *Supra*).

25 El ELISA de sándwich A β 1-42 específico emplea mA β 21F12, específico para aminoácidos 33-42 de A β (Johnson-Wood, *et al.*), como el anticuerpo de captura. mA β Biotinilado 3D6 es también el anticuerpo indicador en este ensayo que tiene un límite inferior de sensibilidad de aproximadamente 125 μ g/ml (28 μ M, Johnson-Wood *et al.*). Para los ELISAs A β , 100 μ l de cualquiera de mA β 266 (al 10 μ g/ml) o mA β 21F12 a (5 μ g/ml) se recubrió en los 30 pocillos de 96 pocillos de placas de inmunoensayo (Costar) por incubación durante la noche a TA. La solución se retiró por aspiración y los pocillos se bloquearon por la adición de 200 μ l de albúmina de suero humano al 0,25% en tampón PBS durante al menos 1 hora a TA. La solución de bloqueo se retiró y las placas se almacenaron desecadas a 4°C hasta su uso. Las placas se rehidrataron con tampón de lavado [solución salina tamponada por Tris (0,15 M NaCl, 0,01 M Tris-HCl, pH 7,5), más 0,05% de Tween 20] antes de su uso. Se añadieron las muestras y los patrones 35 en alícuotas por triplicado de 100 μ l por pocillo y después se incubaron durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron al menos tres veces con tampón de lavado entre cada etapa del ensayo. El mA β 3D6 biotinilado, diluido a 0,5 μ g/ml en Tampón de Ensayo de Caseína (0,25% de caseína, PBS, 0,05% Tween 20, pH 7,4), se añadió y se incubó en los pocillos durante 1 h a TA. Un conjugado de peroxidasa de avidina-rábano picante, (Avidina-HRP obtenida de Vector, Burlingame, CA), diluido 1: 4000 en Tampón de Ensayo de Caseína, se añadió a los pocillos 40 durante 1 h a TA. El sustrato colorimétrico, Slow TMB-ELISA (Pierce), se añadió y se dejó reaccionar durante 15 minutos a TA, después de lo cual la reacción enzimática se detuvo por la adición de 25 μ l 2 N H₂SO₄. El producto de reacción se cuantificó usando un Vmax de Dispositivos Moleculares que mide la diferencia en la absorbancia a 450 nm y 650 nm.

45 6. Medición de los niveles de APP

50 Se utilizaron dos ensayos de APP diferentes. El primero, designado APP- α /FL, reconoce formas tanto de APP-alfa (α) y de longitud completa (FL) de APP. El segundo ensayo es específico para APP- α . El ensayo APPA/FL reconoce APP secretada incluyendo los primeros 12 aminoácidos de A β . Dado que el anticuerpo reportero (2H3) no es específico para el sitio de clip α , que se produce entre los aminoácidos 612-613 de APP695 (Esch *et al.*, *Science* 248, 1122-1124 (1990).); este ensayo también reconoce APP de longitud completa (APP-FL). Los experimentos preliminares utilizando anticuerpos inmovilizados de APP a la cola citoplásica de APP-FL para agotar homogeneizados de cerebro de APP-FL sugieren que aproximadamente el 30-40% de la APP- α /FL APP es FL (datos no mostrados). El anticuerpo de captura tanto para los ensayos de APP- α /FL y APP- α es mAb 8E5, inducido 55 contra los aminoácidos 444 a 592 de la forma APP695 (Games *et al.*, *supra*). El mAb reportero para el ensayo APP- α /FL es mAb 2H3, específico para los aminoácidos 597-608 de APP695 (JohnsonWood *et al.*, *Supra*) y el anticuerpo reportero para el ensayo de APPA es un derivado biotinilado de mAb 16H9, planteado a los aminoácidos 605 a 611 de APP. El límite inferior de sensibilidad del ensayo APP- α /FL es de aproximadamente 11 ng/ml (150 pM) (JohnsonWood *et al.*) y la del ensayo específico de APP- α es de 22 ng/ml (0,3 nM). Para ambos ensayos de APP, 60 mAb 8E5 se recubrió en los pocillos de placas de 96 pocillos de EIA, como se describe anteriormente para mAb 266. APP- α purificada, secretada por recombinante se utilizó como patrón de referencia para el ensayo de APP- α y el ensayo APP- α /FL (Esch *et al.*, *supra*). Las muestras de homogeneizado cerebral en guanidina 5 M se diluyeron 1:10 en ELISA diluyente de muestras (tampón de fosfato 0,014 M, pH 7,4, 0,6% de albúmina de suero bovino, 0,05% de timerosal, 0,5 MNaCl, 0,1% NP40). A continuación, se diluyeron 1: 4 en Diluyente de muestra que contiene 0,5 M de guanidina. Homogeneizados diluidos se centrifugaron a 16.000 x g durante 15 segundos a TA. Se añadieron los 65 patrones de APP y las muestras a la placa en alícuotas duplicadas y se incubaron durante 1,5 horas a TA. El

anticuerpo reportero biotinilado 2H3 o 16H9 se incubó con las muestras durante 1 hora a TA. La fosfatasa estreptavidina-alcalina (Boehringer Mannheim), diluido 1: 1000 en diluyente de muestra, se incubó en los pocillos durante 1 h a TA. Se añadió el 4-metilo-umbelíferilo-fosfato de sustrato fluorescente para la incubación a TA durante 30 min y se leyeron las placas en un fluorímetro Cytofluor tm 2350 (Millipore) a 365 nm de excitación y 450 nm de emisión.

7. Química inmunohistoquímica

Cerebros se fijaron durante tres días a 40°C en 4% de paraformaldehído en PBS y después se almacenaron de uno a siete días a 4°C en 1% de paraformaldehído, PBS hasta seccionarse. Secciones coronales de espesor de cuarenta micras se redujeron en un vibratoma a TA y se almacenaron en crioprotector (30% de glicerol, 30% de etilenglicol en tampón de fosfato) a -20°C antes del procesamiento inmunohistoquímico. Para cada cerebro, seis secciones al nivel del hipocampo de dorsal, cada una separada por intervalos consecutivos de 240 µm, se incubaron durante la noche con uno de los siguientes anticuerpos: (1) un anti-A β biotinilado (mAb, 3D6, específico para A β humana) diluido a una concentración de 2 µg/ml en PBS y 1% de suero de caballo; o (2) un mAb biotinilado específico para APP humana, 8E5, diluido a una concentración de 3 µg/ml en PBS y 1,0% de suero de caballo; o (3) un mAb específico para proteína ácida fibrilar glial (GFAP; Sigma Chemical Co.) diluido 1: 500 con 0,25% de Triton X-100 y 1% de suero de caballo, en solución salina tamponada de Tris, pH 7,4 (TBS); o (4) un mAb específico para CD11b, antígeno MAC-1, (Chemicon International) diluido 1: 100 con 0,25% de Triton X-100 y 1% de suero de conejo en TBS; o (5) un mAb específico para el antígeno MHC II, (Pharmingen) diluido 1: 100 con 0,25% de Triton X-100 y 1% de suero de conejo en TBS; o (6) un mAb de rata específico para CD 43 (Pharmingen) diluido 1: 100 con suero de conejo al 1% en PBS o (7) un mAb de rata específico para CD 45RA (Pharmingen) diluido 1: 100 con suero de conejo al 1% en PBS ; o (8) un monoclonal de rata A β específico para CD 45RB (Pharmingen) diluido 1: 100 con suero de conejo al 1% en PBS; o (9) un monoclonal de rata A β 10 específico para CD 45 (Pharmingen) diluido 1: 100 con suero de conejo al 1% en PBS; o (10) un biotinilado hámster polyclonal A β específico para CD3e (Pharmingen) diluido 1: 100 con suero de conejo al 1% en PBS o (11) un mAb de rata específico para CD3 (Serotec) diluido 1: 200 con suero de conejo al 1% en PBS ; o con (12) una solución de PBS que carece de un anticuerpo primario que contiene 1% de suero de caballo normal.

Las secciones que reaccionaron con soluciones de anticuerpo enumeradas en los 1,2 y 6-12 anteriormente se trataron previamente con 1,0% de Triton X-100, peróxido de hidrógeno 0,4% en PBS durante 20 min a TA para bloquear la peroxidasa endógena. Se incubaron durante la noche a 4°C con el anticuerpo primario. Las secciones que reaccionaron con 3D6 o 8E5 o mAbs CD3e a continuación se hicieron reaccionar durante una h a TA con un peroxidasa-avidina-biotina-complejo de rábano picante con componentes del kit "A" y "B" diluidos 1:75 en PBS (Vector Elite Standard Kit, Vector Labs, Burlingame, CA.). Las secciones que reaccionaron con anticuerpos específicos para CD 45RA, CD 45RB, CD 45, CD3 y la solución de PBS desprovista de anticuerpo primario se incubaron durante 1 hora a TA con IgG anti-rata biotinilada (Vector) diluida 1:75 en PBS o IgG de anti-ratón biotinilada de (Vector) diluido 1:75 en PBS, respectivamente. Las secciones después se hicieron reaccionar durante una hora a TA con un peroxidasa-avidina-biotina-complejo de rábano picante con componentes del kit "A" y "B" diluidos 1:75 en PBS (Vector Elite Standard Kit, Vector Labs, Burlingame, CA.).

Las secciones se desarrollaron en 0,01%, de peróxido de hidrógeno, 0,05% de 3,3'-diaminobencidina (DAB) a TA. Secciones destinadas a la incubación con anticuerpos específicos de GFAP, MAC-1 y MHC II se pretrataron con peróxido de hidrógeno al 0,6% a TA para bloquear peroxidasa endógena incubada durante la noche con el anticuerpo primario a 4°C. Las secciones que reaccionaron con el anticuerpo GFAP se incubaron durante 1 hora a TA con IgG de anti-ratón biotinilada hecha en caballo (Vector Laboratories; Vectastain Elite ABC Kit) diluido 1: 200 con TBS. Las secciones se hicieron reaccionar a continuación durante una h con peroxidasa-avidina-biotina-complejo (Vector Laboratories; Vectastain Elite ABC Kit) diluido 1: 1000 con TBS. Secciones incubadas con el anticuerpo monoclonal específico MAC-1 o MHC II como anticuerpo primario se hicieron reaccionar posteriormente durante 1 hora a TA con IgG de anti-rata biotinilada hecha en conejo diluido 1: 200 con TBS, seguido de incubación durante una h con complejo de avidina-biotina-peroxidasa diluido 1: 1000 con TBS. Secciones incubadas con anticuerpos específicos GFAP, MAC-1 y MHC II a continuación se visualizaron por tratamiento a TA con 0,05% DAB, 0,01% de peróxido de hidrógeno, 0,04% de cloruro de níquel, TBS durante 4 y 11 min, respectivamente.

Secciones inmunoetiquetadas se montaron en portaobjetos de vidrio (VWR, portaobjetos Superfrost), se secaron al aire durante la noche, sumergido en Propar (Anatech) y se recubrieron con cubreobjetos usando Permount (Fisher) como medio de montaje.

Para contrateñir placas de A β , un subconjunto de las secciones de GFAP positiva se montaron en portaobjetos Superfrost y se incubaron en tioflavina S acuosa al 1% (Sigma) durante 7 min después del procesamiento inmunohistoquímico. Las secciones después se deshidrataron y se liquidó en Propar, después recubierto con cubreobjetos montados con Permount.

8. Análisis de imagen

Un Sistema de Análisis de Imagen 150 Videométrico (Oncor, Inc., Gaithersburg, MD) unido a un

microscopio Nikon Microphot-FX a través de una cámara de vídeo CCD y un monitor Sony Trinitron se utilizó para la cuantificación de los portaobjetos inmunorreactivos. La imagen de la sección se almacenó en una memoria intermedia de vídeo y un umbral a base de color y saturación se determinó para seleccionar y calcular el área total de píxeles ocupada por las estructuras inmunoetiquetadas. Para cada sección, el hipocampo se perfiló manualmente y se calculó el área total de píxeles ocupada por el hipocampo. El porcentaje de carga de amiloide de por ciento se midió como: (la fracción del área del hipocampo que contiene depósitos inmunorreactivos de A β con mAb 3D6) x 100. De manera similar, el porcentaje de carga neurítica se midió como: (la fracción del área del hipocampo que contiene neuritas distróficas reactivas con anticuerpo monoclonal 8E5) x100. El Sistema de C-Imagen (Compix, Inc., Cranberry Township, PA) que opera el programa aplicación de software 32 simple se relacionó con un microscopio 5 Nikon Microphot-FX a través de una cámara Optronics y se utilizaron para cuantificar el porcentaje de la corteza retrosplenial ocupada por astrocitos GFAP positivos y microglías MAC-1 y MHC-II positivas. La imagen de la sección inmunoreaccionada se almacenó en una memoria intermedia de vídeo y se determinó un umbral a base de monocromo para seleccionar y calcular el área total de píxeles ocupada por células inmunoetiquetadas. Para cada sección, la corteza retroesplénial (RSC) se esbozó manualmente y el área total de píxeles ocupada por la RSC se 10 calculó. El porcentaje de astrocitosis se definió como: (la fracción de RSC ocupada por astrocitos GFAP-reactivos) X 100. De manera similar, el porcentaje de microgliosis se definió como: (la fracción de la RSC ocupada por microglia reactive MAC-I o MHC II) X 100. Para todos los análisis de imágenes, seis secciones a nivel del hipocampo dorsal, cada una separada por intervalos consecutivos de 240 μ m, se cuantificaron para cada animal. En todos los casos, el 15 estado de tratamiento de los animales era desconocido para el observador.

20 Aunque la invención anterior ha sido descrita en detalle para fines de claridad de comprensión, será obvio que ciertas modificaciones se pueden practicar dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. De lo anterior será evidente que la invención permite un número de usos. Por ejemplo, la invención proporciona cualquiera de los 25 anticuerpos a A β definido en las reivindicaciones para uso en el tratamiento, profilaxis o diagnóstico de enfermedad amiloidogénica. La descripción prevé el uso de cualquiera de los anticuerpos a A β se ha descrito anteriormente en la fabricación de un medicamento o composición de diagnóstico para su uso en el mismo. Del mismo modo, la descripción prevé el uso de cualquiera de los fragmentos epitópicos de A β descritos anteriormente para el tratamiento o la profilaxis de enfermedad amiloidogénica, o en la fabricación de un medicamento para uso en la misma.

30

Reivindicaciones

- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo que se une específicamente a un epítopo dentro de los residuos 1-10 de A β , en el que el isotipo del anticuerpo es IgG1 humana, y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 10 2. Una composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el anticuerpo se une específicamente a un epítopo dentro de:
- 10 los residuos 1-6 de A β ;
- 10 los residuos 1-7 de A β ;
- 10 los residuos 1-4 de A β ;
- 15 los residuos 1-3 de A β ;
- 15 los residuos 3-6 de A β ;
- 15 o los residuos 3-7 de A β .
- 20 3. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el anticuerpo se une específicamente a un epítopo que comprende un residuo N-terminal libre de A β .
- 20 4. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el anticuerpo es un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal.
- 25 5. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el anticuerpo comprende dos copias del mismo par de cadenas ligera y pesada.
- 30 6. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende una primera luz y un par de cadena pesada que se une específicamente al epítopo de A y una segunda luz y un par de cadena pesada que se une específicamente a un receptor de Fc en las células microgliales.
- 35 7. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde una cadena del anticuerpo se fusiona a un polipéptido heterólogo.
- 40 8. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el anticuerpo se une específicamente al péptido A β sin unirse a proteína precursora de amiloide (APP) de longitud completa.
- 40 9. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la composición farmacéutica comprende adicionalmente al menos un otro anticuerpo que se une a un epítopo diferente de A β .
- 45 10. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende un diluyente fisiológicamente aceptable para la administración parenteral.
- 45 11. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde la composición farmacéutica es para uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad asociada con los depósitos amiloideos de A en el cerebro de un paciente.
- 50 12. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 11, en la que la composición farmacéutica se administra por vía subcutánea o por vía intravenosa.
- 55 13. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en donde la composición farmacéutica se administra en múltiples dosis durante un período de al menos seis meses.
- 55 14. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, donde la composición farmacéutica se administra como una composición de liberación sostenida.
- 60 15. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en donde la dosis de anticuerpo es de 0,01 a 5 mg/kg de peso corporal del paciente.
- 65 16. Un anticuerpo que se une específicamente a un epítopo dentro de los residuos 1-10 de A β donde el isotipo del anticuerpo es IgG1 humana, para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad asociada con depósitos amiloideos de la A β en el cerebro de un paciente.

17. Un anticuerpo para el uso según la reivindicación 16, donde el anticuerpo es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8.

5 18. Un anticuerpo para el uso según la reivindicación 16 o la reivindicación 17, donde el anticuerpo se administra al paciente:

10 por vía subcutánea o intravenosa;
en múltiples dosificaciones durante un período de al menos seis meses;
como una composición de liberación sostenida; y/o
a una dosis de 0,01 a 5 mg/kg de peso corporal del paciente.

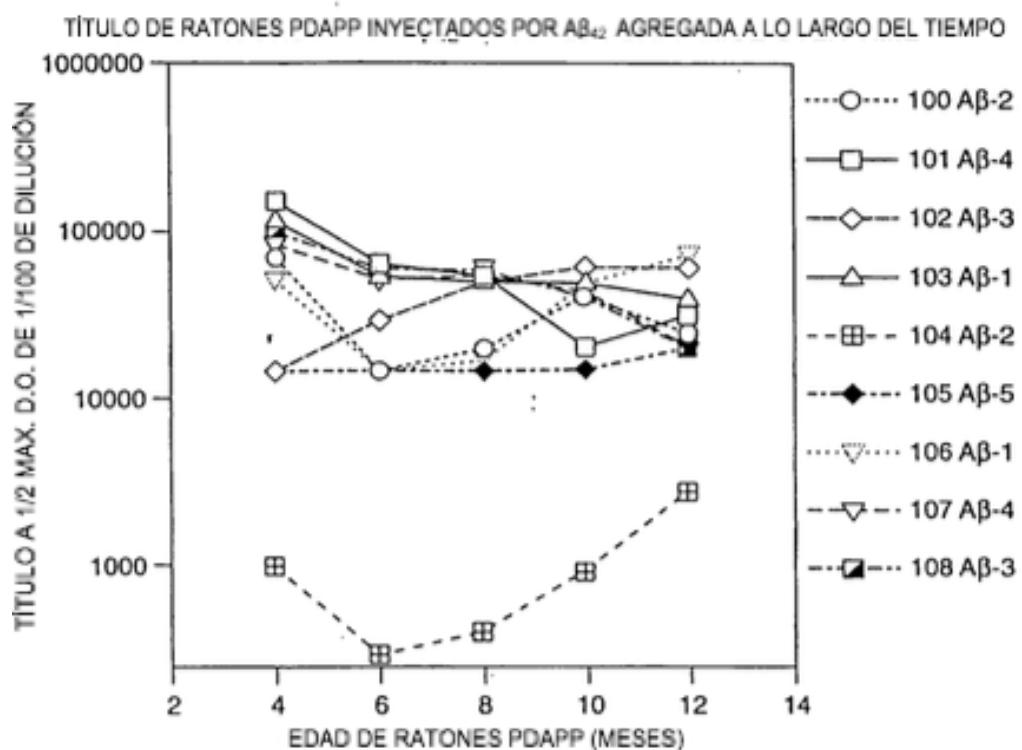


FIG. 1

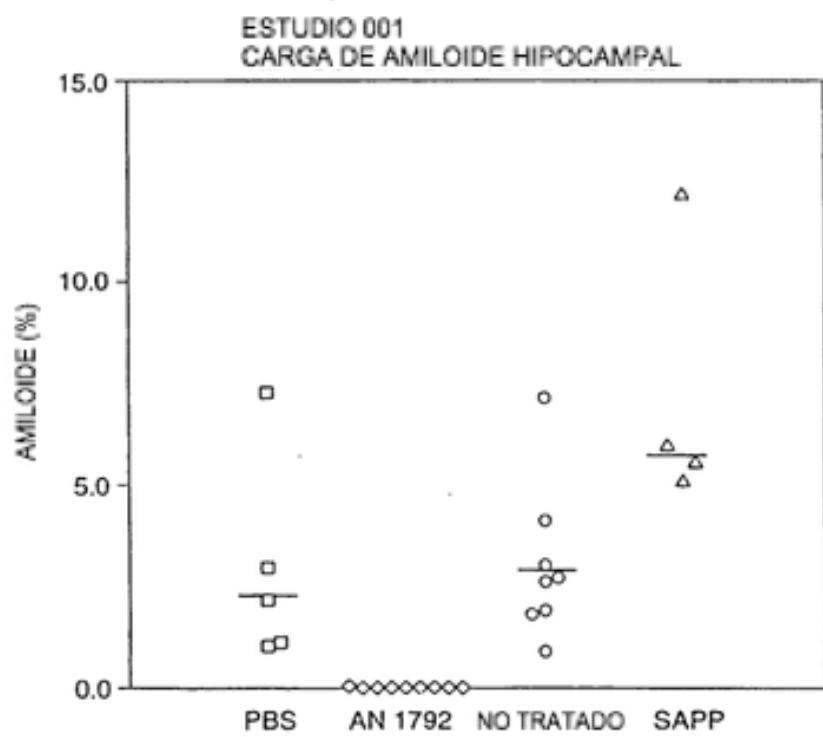


FIG. 2

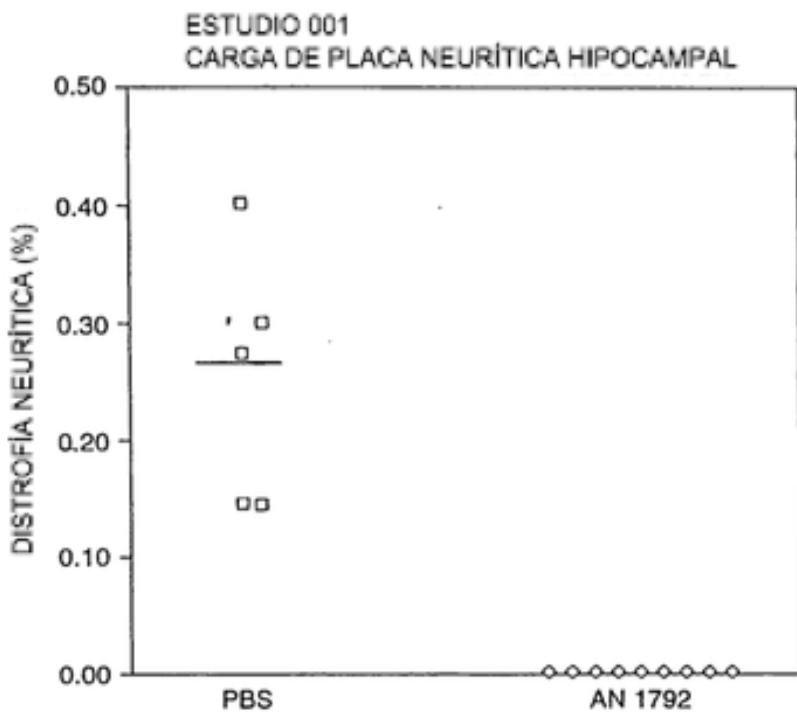


FIG. 3

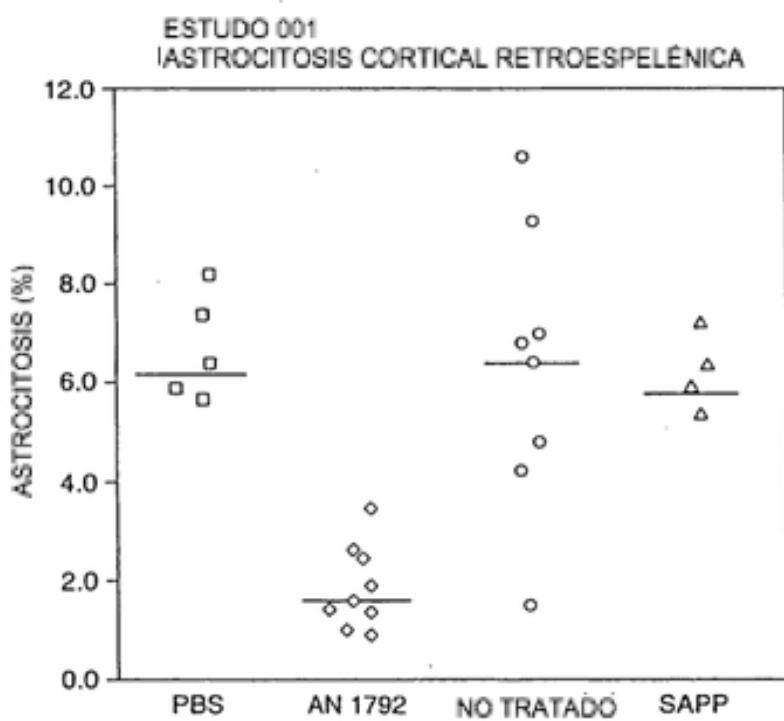


FIG. 4

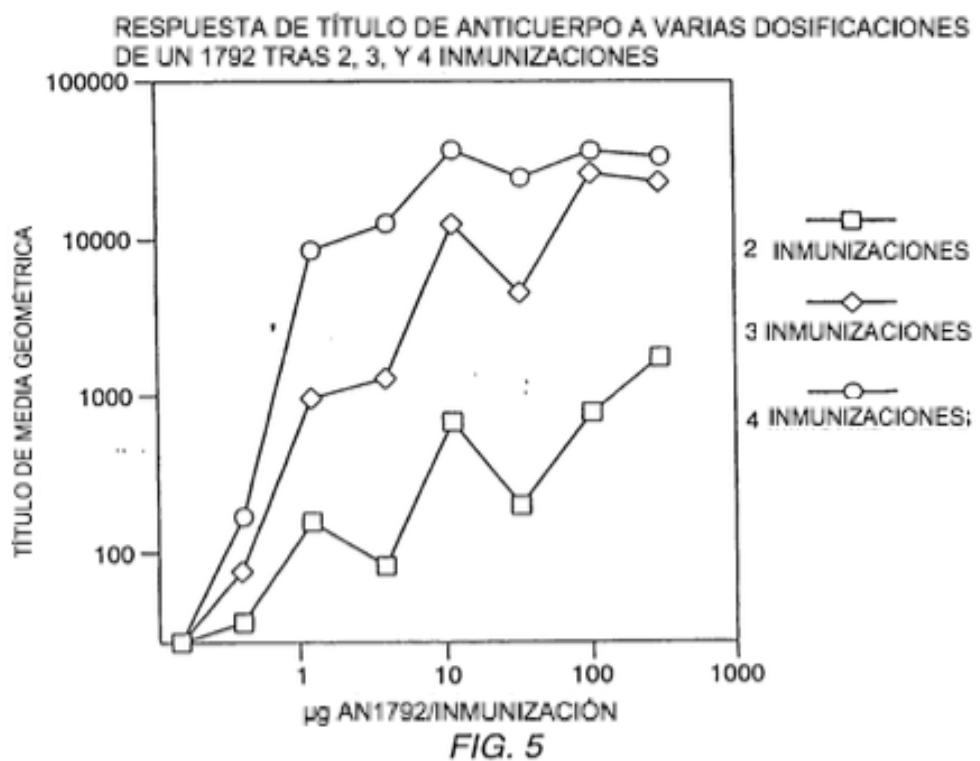


FIG. 5

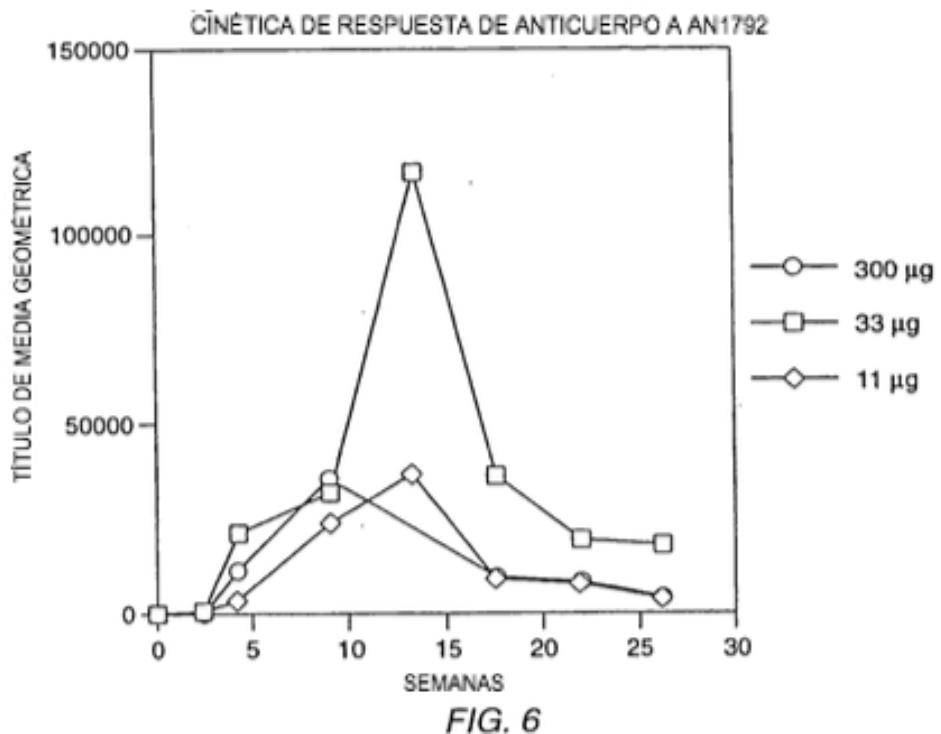


FIG. 6

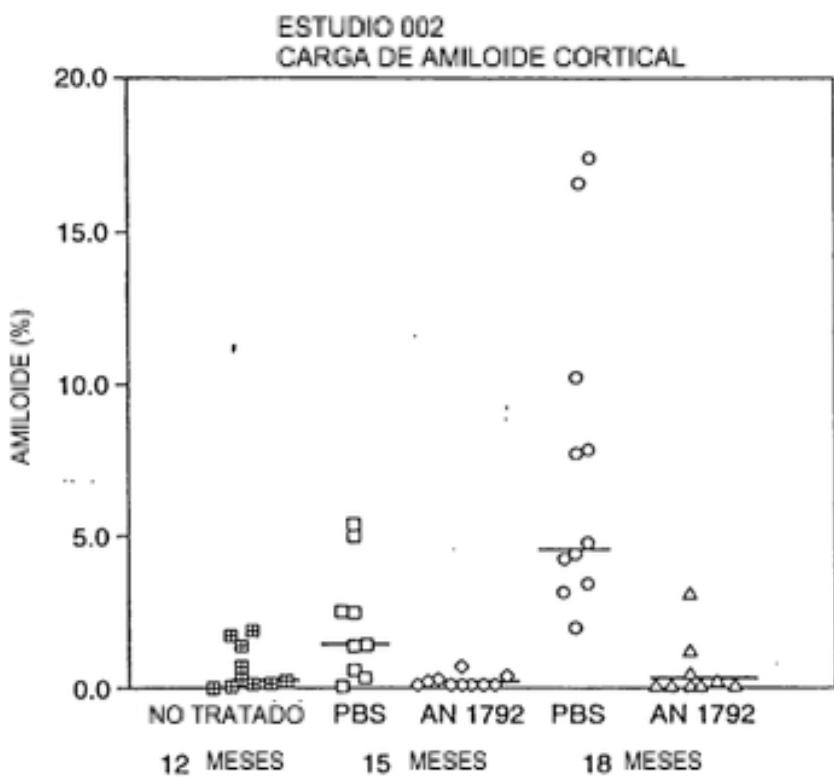


FIG. 7

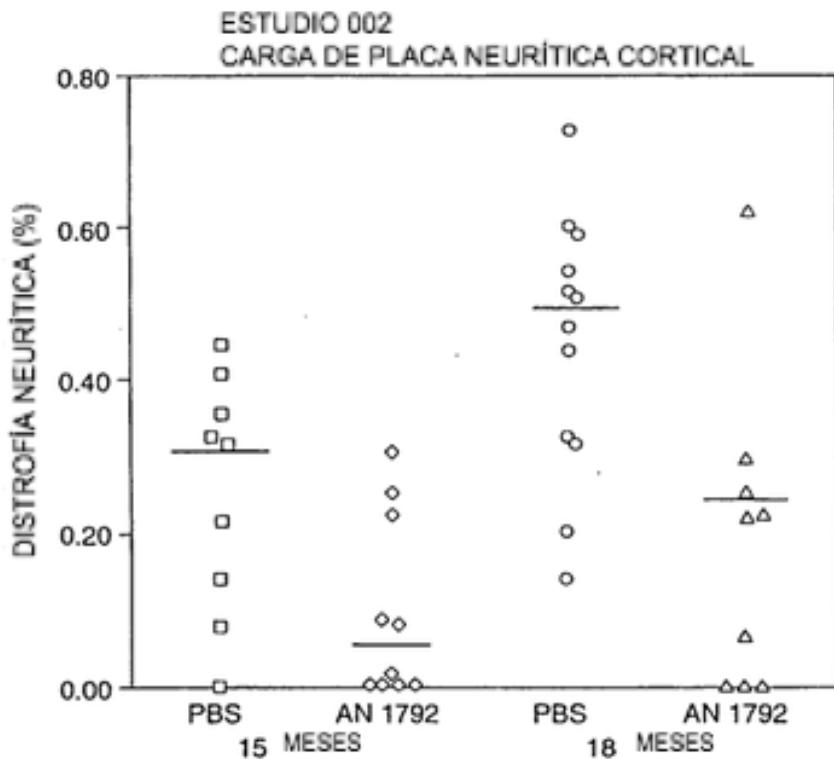


FIG. 8

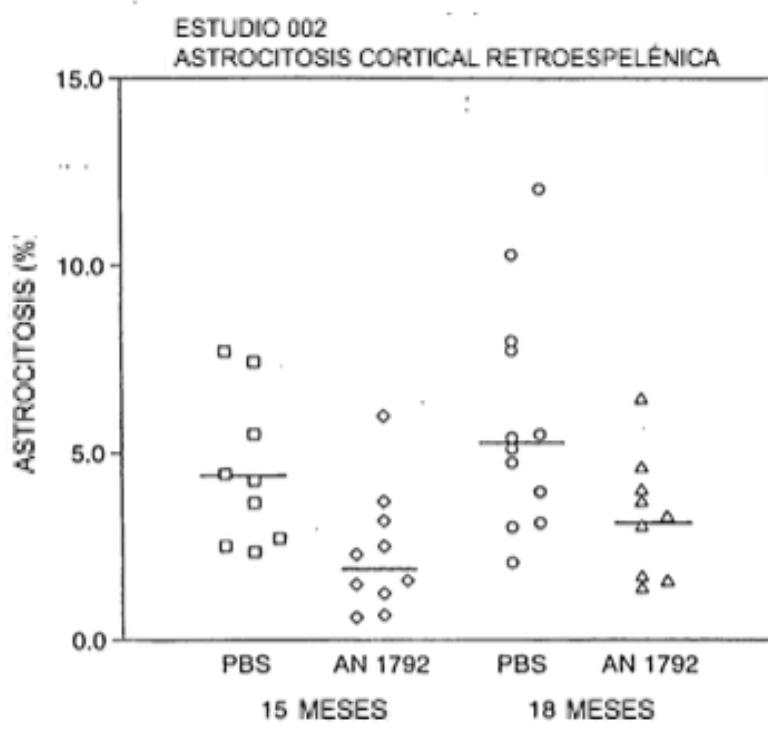


FIG. 9

ESTUDIO 002
ASTROCITOSIS CORTICAL RETROESPELÉNICA

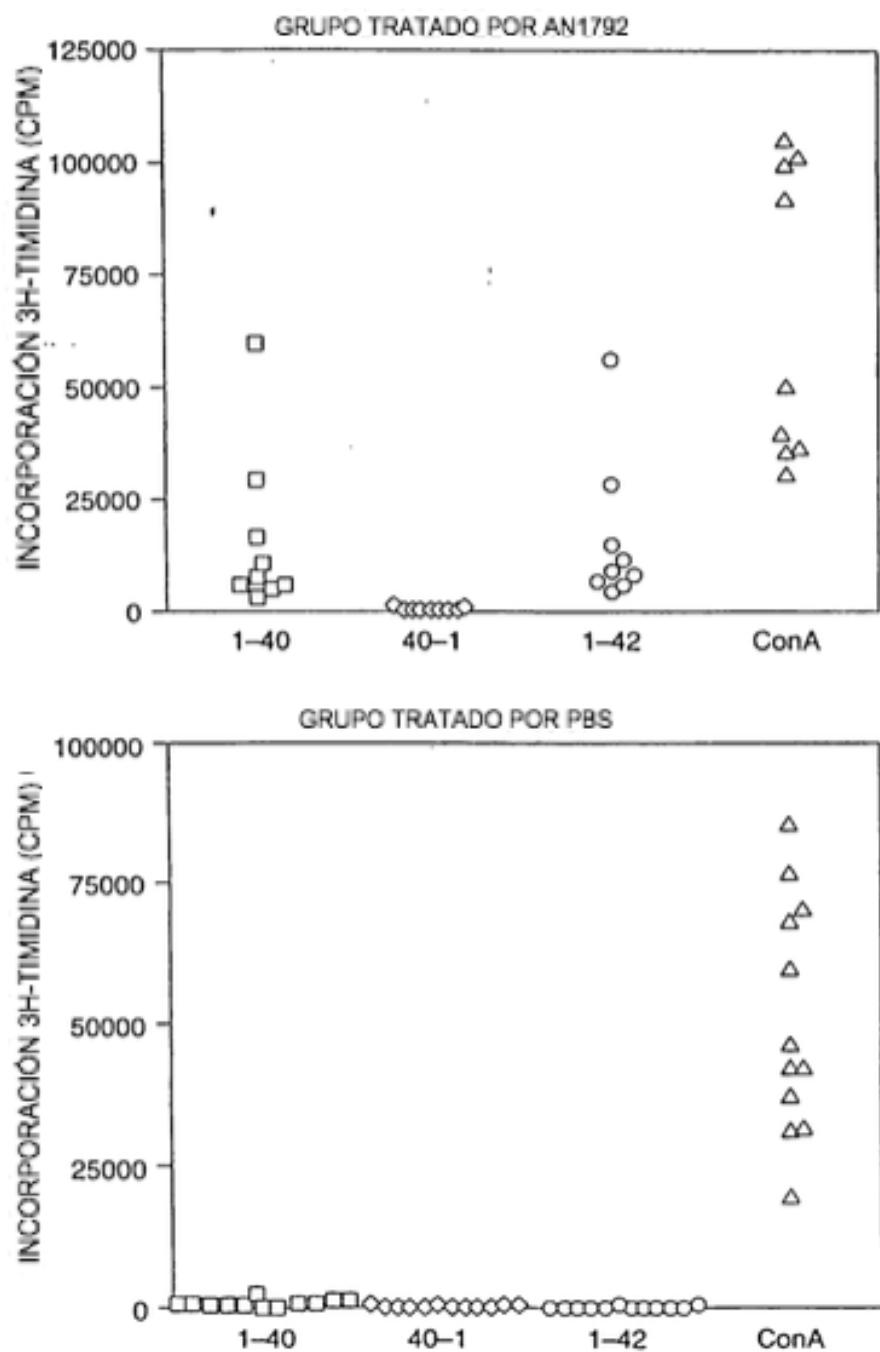


FIG. 10

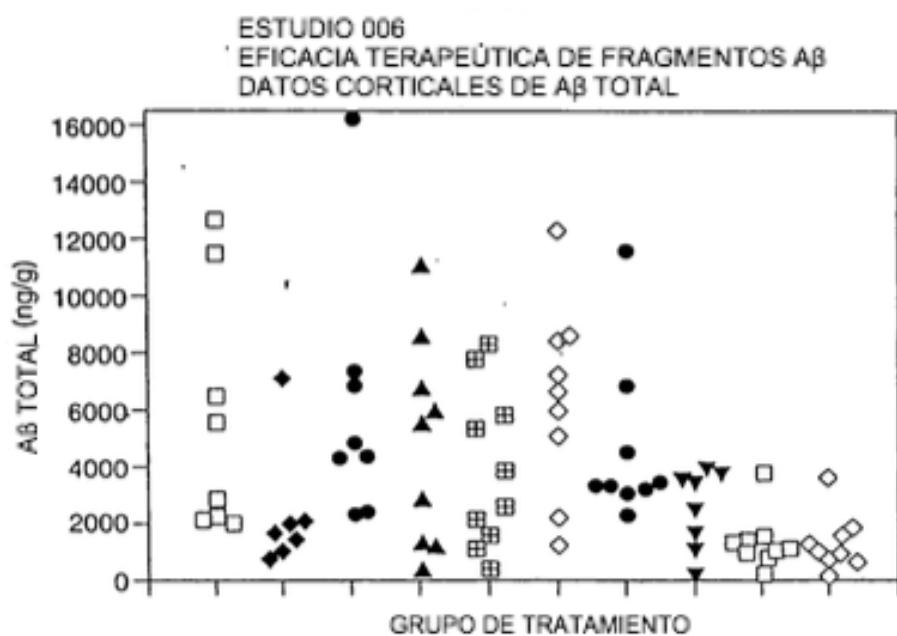


FIG. 11

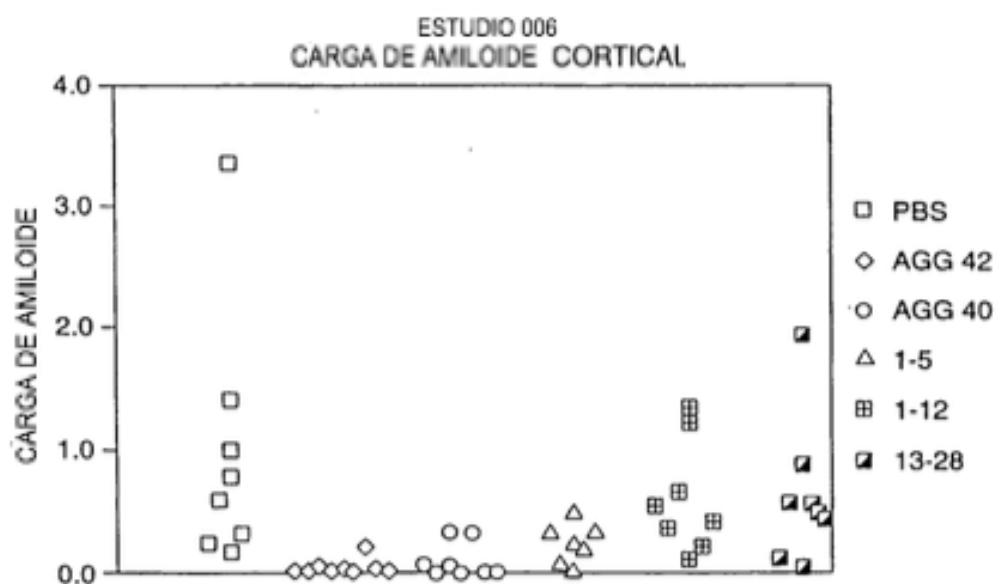


FIG. 12

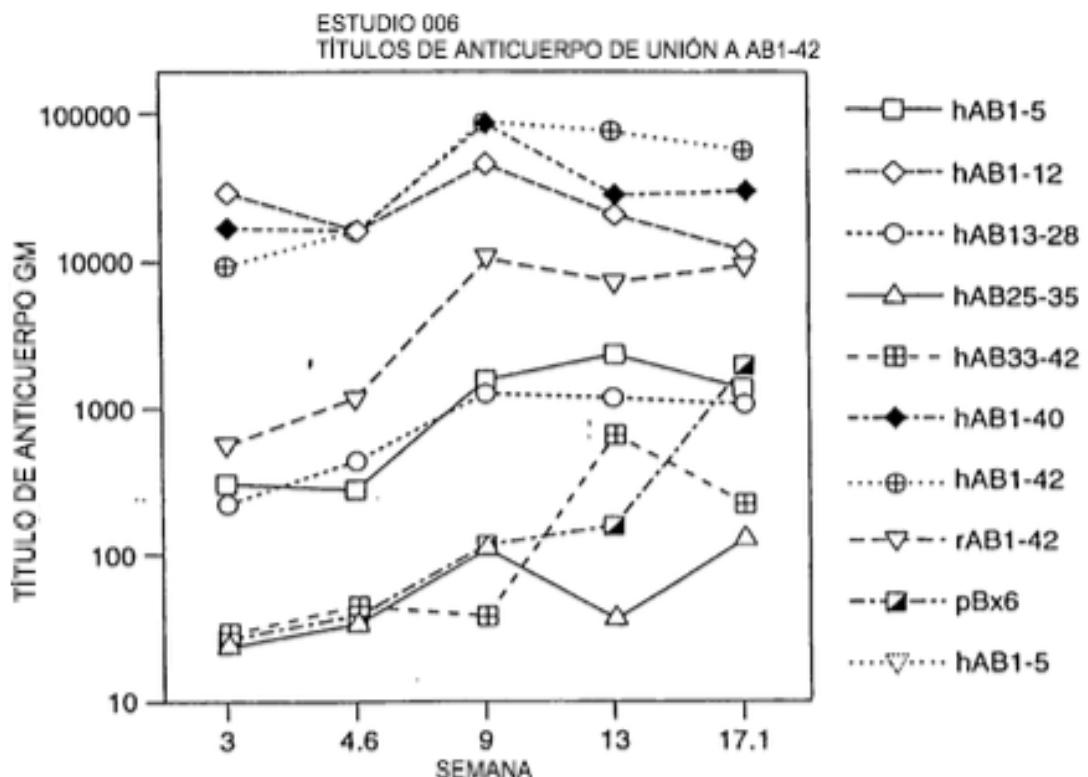


FIG. 13

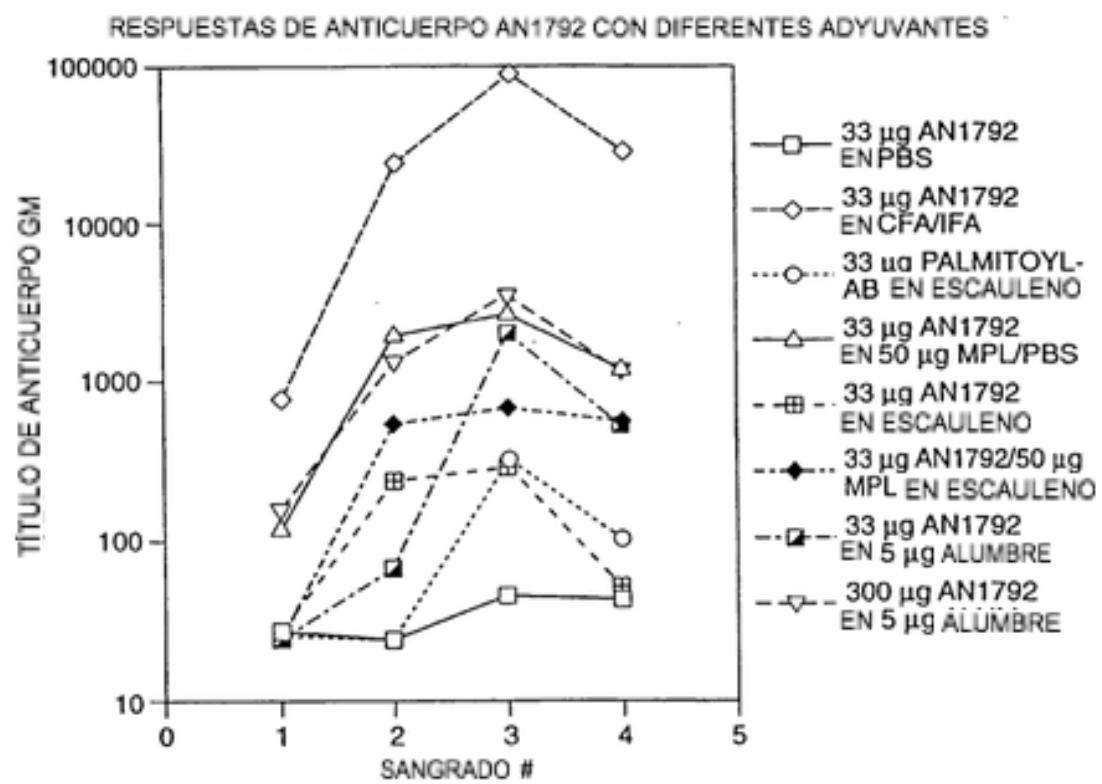


FIG. 14

CORTEZA

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

FIG. 15A

CORTEZA

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

FIG. 15B

CORTEZA

25 µg QS21 100 µg AN1528		CEA/IFA 100 µg AN1792	
615-128	1257	539-068	693
616-129	361	640-069	508
617-130	1008	641-070	440
536-131	3290	642-071	467
637-132	2520	690-072	42
638-133	3880	691-073	2491
744-134	627	692-074	121
745-135	58	795-075	137
746-136	2610	796-076	822
747-137	1509	797-077	475
769-138	1788	748-087	600
770-139	988	749-079	78
773-140	1199	750-080	1267
774-141	339	751-081	1351
775-142	402	761-082	69
776-143	537		
840-144	1119		
841-145	194		
821-146	1259		
822-147	5413		
823-148	2233		
VALOR p MEDIANO (M-W)	1199	VALOR p MEDIANO (M-W)	475 0.0481
DEV. EST. MEDIO	1552 1364	DEV. EST. MEDIO	637 655
% CV	88	% CV	103
VALOR p (PRUEBA t) n=21		VALOR p (PRUEBA t) n=15	0.0106

FIG. 15C

CORTEZA

5 µg TIMEROSAL/PBS 10 µg AN1792		2 µg ALUMBRE 100 µg AN1792	
635-149	1337	610-001	432
669-150	4644	611-002	1012
670-151	6335	612-003	3607
673-152	3700	613-004	508
674-153	2750	620-005	465
676-154	1687	621-006	16
681-156	185	622-007	28
682-157	8031	623-008	217
683-158	3450	708-009	2738
754-159	157	709-010	927
755-160	6857	710-011	1609
756-161	482	716-012	1608
805-162	524	784-014	3890
806-163	397	785-015	1614
807-164	234	786-018	285
		787-017	3102
		788-018	1617
		789-019	1474
		815-020	424
		816-021	1375
		817-022	2323
VALOR p MEDIANO (M-W)	1687	VALOR p MEDIANO (M-W)	1375 0.5000
DEV. EST. MEDIO	2718	DEV. EST. MEDIO	1394
% CV	2685	% CV	1166
VALOR p (PRUEBA t) n=15	99	VALOR p (PRUEBA t)	84
			0.2650
			n=21

FIG. 15D

CORTEZA

50 µg MPL 100 µg AN1792		25 µg QS21 100 µg AN1792	
646-023	2002	627-045	91
647-024	147	628-046	3397
648-025	1304	631-049	3702
649-026	34	632-050	1776
650-027	980	667-052	1832
724-028	1282	668-053	3023
726-030	1966	686-054	189
727-031	733	687-055	891
720-032	2563	688-056	240
721-033	5563	689-057	110
802-034	113	712-059	3311
803-035	671	825-061	1009
804-036	51	826-082	18165
811-037	613	827-063	73
812-038	332	828-064	78
813-039	1454	837-065	1051
814-040	2441	838-066	270
833-014	742	839-067	371
834-042	40		
836-044	807		
VALOR p MEDIANO (M-W)	774 0. 1710	VALOR p MEDIANO (M-W)	950 0.4076
DEV. EST. MEDIO % CV VALOR p (PRUEBA t) n=21	1192 1299 109 0.1506 n=21	DEV. EST. MEDIO % CV VALOR p (PRUEBA t) n=18	2199 4187 190 0.8131 n=18

FIG. 15E

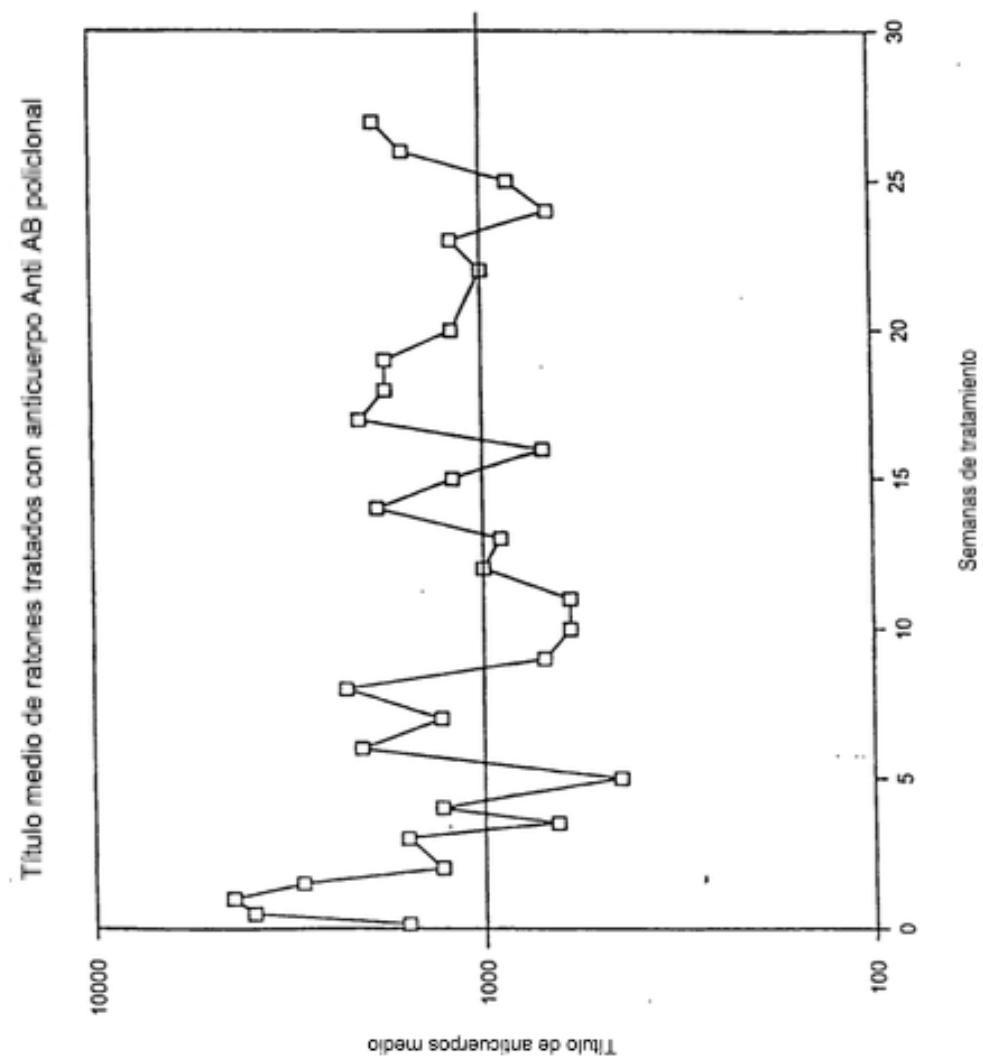
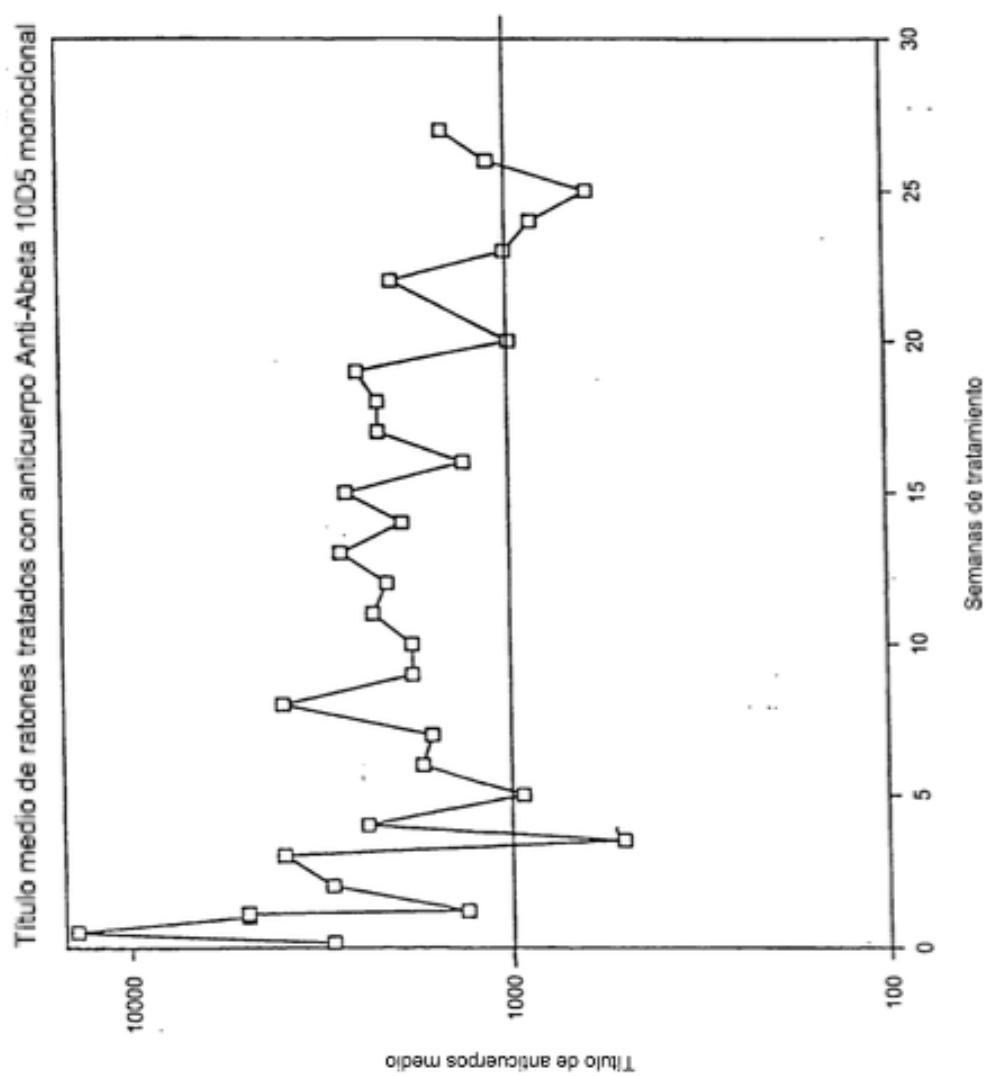


Figura 16



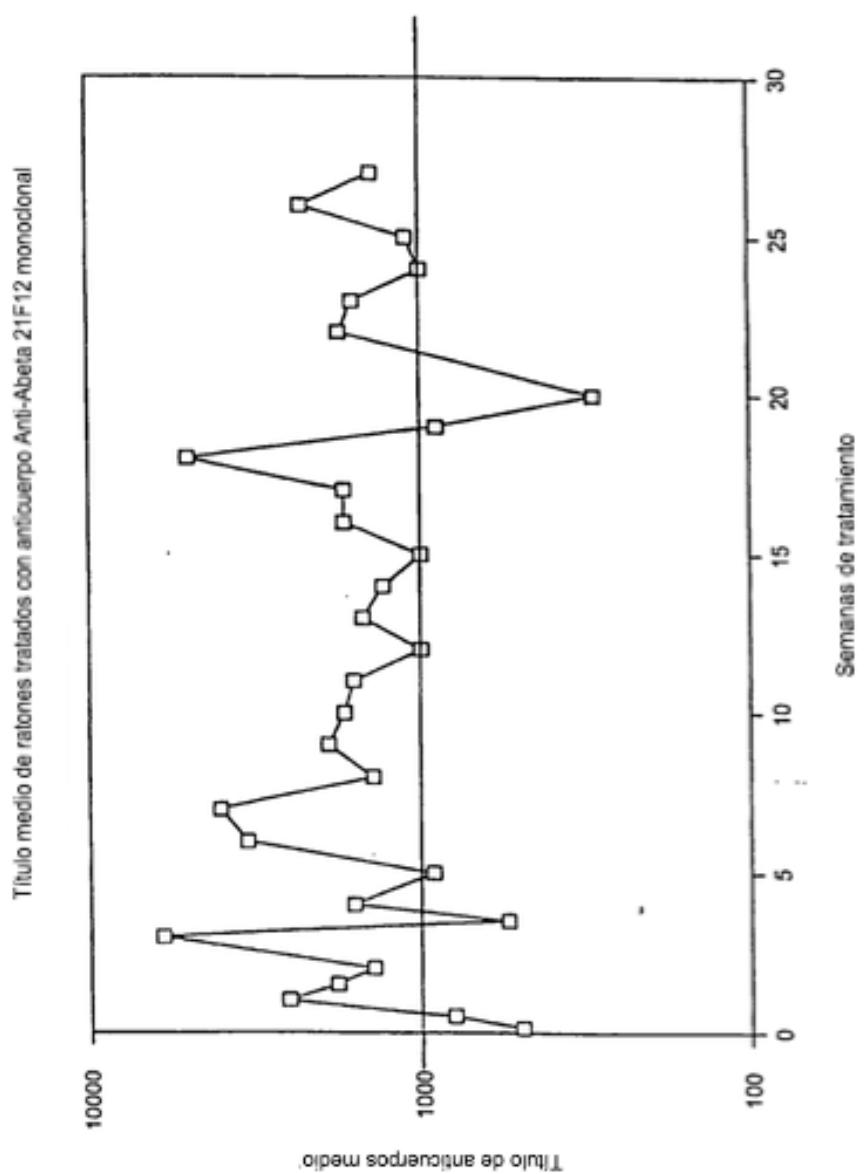


Figura 18

Figura 19:

Grupo 9: F10920M, 300 μ g AN1792 + 100 μ g QS21
Horario de dosificación 2, título=84.484 (normalizado a 8)

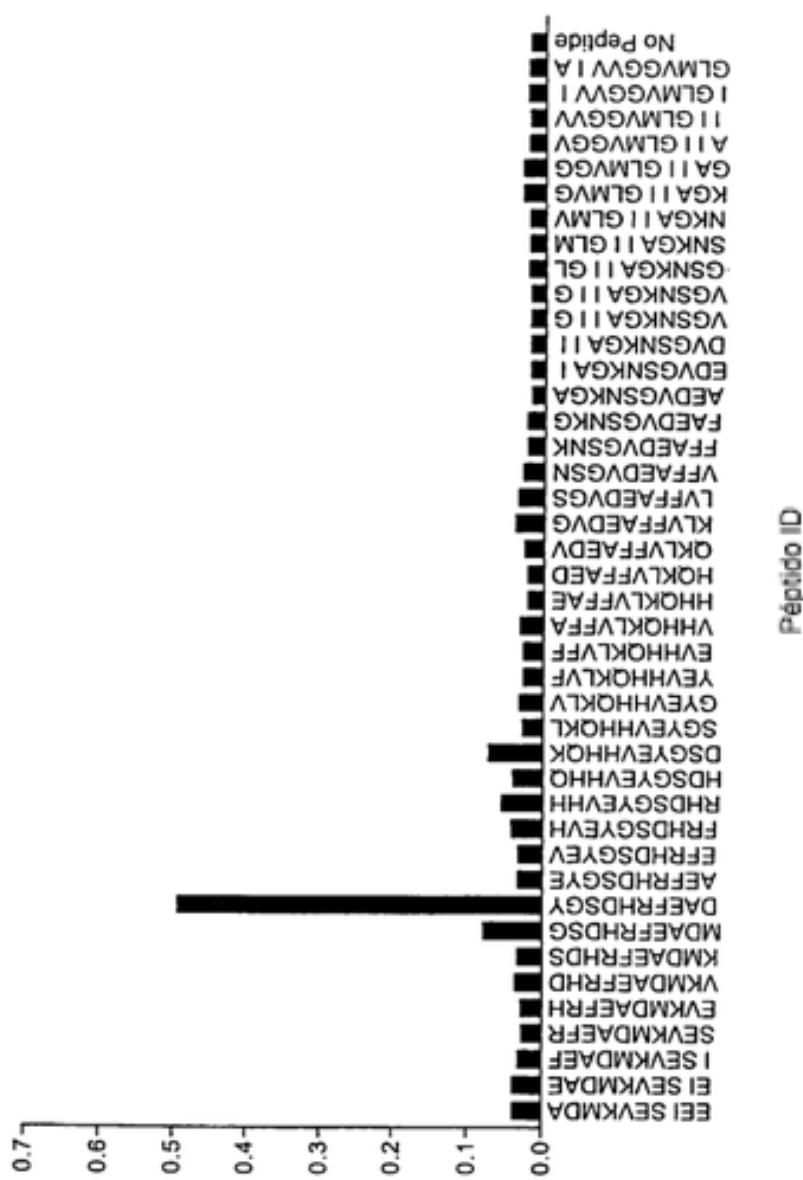


Figura 20:

Grupo 11: F10975F, 300 μ g AN1792 + 100 μ g QS21
Horario de dosificación 3, título=38.632 (normalizado a 8)

