



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 269 749**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/385 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **02758181 .8**

(86) Fecha de presentación : **20.08.2002**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1420815**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **26.05.2004**

(54) Título: **Vacuna a base de un análogo de β -amiloide y de un epítoto de célula T.**

(30) Prioridad: **20.08.2001 DK 2001 01231**
22.10.2001 US 337543 P
16.04.2002 DK 2002 00558
16.04.2002 US 373027 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2007

(73) Titular/es: **Pharmexa A/S**
Kogle Alle 6
2970 Horsholm, DK

(72) Inventor/es: **Rasmussen, Peter Birk;**
Jensen, Martin Roland;
Nielsen, Klaus Gregorius;
Koefoed, Peter y
Degan, Florence Dal

(74) Agente: **Carpintero López, Francisco**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vacuna a base de un análogo de β -amiloide y de un epítotope de célula T.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a mejoras en terapia y prevención de la enfermedad de Alzheimer (AD) y otras enfermedades caracterizadas por deposición de amiloides, por ejemplo caracterizadas por depósitos de amiloides en el sistema nervioso central (SNC). Más específicamente, la presente invención proporciona medios para permitir un procedimiento para regular hacia abajo (no deseado) depósitos de amiloide permitiendo la producción de anticuerpos contra una proteína relevante (APP o $A\beta$) o componentes de la misma en sujetos que sufren de o en peligro de sufrir enfermedades que tienen una patología que implica deposición de amiloides. La invención también proporciona los polipéptidos modificados como tal. También comprendida por la presente invención están fragmentos de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos modificados así como vectores que incorporan estos fragmentos de ácidos nucleicos y células hospedadoras y líneas celulares transformadas con ellos. Finalmente la presente invención también proporciona un nuevo tipo de inmunógeno de péptido conjugado.

Antecedentes de la invención

La amiloidosis es la deposición extracelular de fibrilas proteicas insolubles que conduce a daño y enfermedad del tejido (Pepys, 1996; Tan y col., 1995; Kelly, 1996). Las fibrilas se forman cuando las proteínas y péptidos normalmente solubles se autosocian de una manera anormal (Kelly, 1997).

El amiloide está asociado a enfermedades graves que incluyen amiloidosis sistémica, AD, diabetes de comienzo en la madurez, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, demencia frontotemporal y las encefalopatías espongiiformes transmisibles relacionadas con priones (enfermedad de kuru y Creutzfeldt - Jacob en seres humanos y cenurosis ovina y BSE en ovejas y ganado vacuno, respectivamente) y la formación de placa amiloide en por ejemplo enfermedad de Alzheimer parece estar estrechamente asociada a la progresión de enfermedad humana. En modelos animales la sobreexpresión, o la expresión de formas modificadas, de proteínas encontradas en depósitos, como la proteína β -amiloide, se ha mostrado que induce diversos síntomas de enfermedad, por ejemplo, síntomas de tipo Alzheimer. No existe ningún tratamiento específico para la deposición de amiloide y estas enfermedades son usualmente fatales.

Las subunidades de fibrilas amiloides pueden ser de tipo salvaje, proteínas variantes o truncadas, y fibrilas similares se pueden formar *in vitro* a partir de oligopéptidos y proteínas desnaturalizadas (Bradbury y col., 1960; Filshie y col., 1964; Burke y Rougvie, 1972). La naturaleza del componente polipeptídico de las fibrilas define el carácter de la amiloidosis. A pesar de las grandes diferencias en tamaño, la estructura y función nativa de las proteínas amiloides, todas las fibrilas amiloides son de longitud indeterminada, no ramificadas, de 70 a 120 Å de diámetro, y muestran tinción característica con Rojo Congo (Pepys, 1996). Son características de una estructura β transversal (Pauling y Corey, 1951) en al que la cadena polipeptídica está organizada en hojas β . Aunque las proteínas amiloides tienen estructuras precursoras muy diferentes, todas pueden experimentar una conversión estructural, quizás junto con una ruta similar, a una forma con plegamiento desigual que es el bloque de construcción del protofilamento de la hélice de las hojas β .

Este patrón de fibra distintivo condujo a las amiloidosis que se llaman las β -fibrilosis (Glennner, 1980a, b), y la proteína de fibrilas de la AD se denominó la proteína β antes de que se conociera su estructura secundaria (Glennner y Wong, 1984). El patrón de difracción transversal β característico, junto con la apariencia de las fibrilas y las propiedades de tinción son ahora los sellos diagnósticos aceptados de amiloide, y sugieren que las fibrilas, aunque formadas a partir de precursores proteicos completamente diferentes, comparten un grado de similitud estructural y comprenden una superfamilia estructural, independientemente de la naturaleza de sus proteínas precursoras (Sunde M, Serpell LC, Bartlam M, Fraser PE, Pepys MB, Blake CCFJ Mol Biol 31 de octubre de 1997; 273 (3): 729 - 739).

Una de las enfermedades más extendidas y bien conocidas en las que los depósitos de amiloides en el sistema nervioso central se sugieren que tienen un papel central en la progresión de la enfermedad es la AD.

55 **AD**

La enfermedad de Alzheimer (AD) es un trastorno cerebral irreversible, progresivo que se produce gradualmente y da como resultado pérdida de memoria, cambios conductuales y de personalidad, y deterioro de las capacidades mentales. Estas pérdidas están relacionadas con la muerte de las células del cerebro y la interrupción de las conexiones entre ellas. El curso de esta enfermedad varía entre personas, como hace la velocidad de deterioro. De promedio, los pacientes de AD viven 8 a 10 años después de que se diagnostican, aunque la enfermedad puede durar hasta 20 años.

La AD avanza por fases, desde falta de memoria temprana, suave hasta una pérdida grave de función mental. Esta pérdida se conoce como demencia. En la mayoría de las personas con AD, los primeros síntomas aparecen después de la edad de los 60, pero comienzos más tempranos no son infrecuentes. Los síntomas más tempranos a menudo incluyen pérdida de memoria reciente, juicio defectuoso, y cambios en personalidad. A menudo, las personas en las fases iniciales de AD piensan menos claramente y olvidan los nombres de personas familiares y objetos comunes.

Más tarde en la enfermedad, pueden olvidar cómo hacer incluso tareas sencillas. Eventualmente, las personas con AD pierden toda la capacidad de razonar y se hacen dependientes de otra persona para su cuidado cada día. Por último, la enfermedad se hace tan debilitante que los pacientes están postrados y probablemente desarrollan otra enfermedad e infecciones. Lo más común, las personas con AD mueren de neumonía.

Aunque el riesgo de desarrollar AD aumenta con la edad, los síntomas de AD y demencia no son una parte del envejecimiento normal. La AD y otros trastornos de demencia están provocados por enfermedades que afectan al cerebro. En el envejecimiento normal, las células nerviosas en el cerebro no se pierden en grandes números. Por el contrario, la AD, altera sus procesos claves: comunicación de células nerviosas, metabolismo, y reparación. Esta alteración por último provoca que muchas células nerviosas paren de funcionar, pierden conexiones con otras células nerviosas, y mueren.

Al principio, la AD destruye neuronas en partes del cerebro que controlan la memoria, especialmente en el hipocampo y estructuras relacionadas. Como las células nerviosas en el hipocampo dejan de funcionar correctamente, la memoria a corto plazo falla, y a menudo, una capacidad de la persona que hace tareas fáciles y familiares comienza a decaer. La AD también ataca al cortex cerebral, particularmente las áreas responsables de lenguaje y razonamiento. Eventualmente, están implicadas muchas otras áreas del cerebro, todas estas regiones del cerebro se atrofian (contracción), y el paciente de AD llega a estar postrado, abandonado, totalmente imposibilitado, e insensible al mundo exterior (fuente; National Institute on Aging Progress Report on Alzheimer's Disease, 1999).

El impacto de la AD

La AD es la causa más común de demencia entre personas de 65 años de edad y mayor. Presenta un problema de salud importante debido a su enorme impacto sobre individuos, familias, el sistema de cuidado de salud, y sociedad como un conjunto. Los científicos estiman que hasta 4 millones de personas actualmente padecen la enfermedad, y la frecuencia se dobla cada 5 años por encima de los 65 años de edad. También se estima que aproximadamente 360.000 nuevos casos (incidencia) se producirán cada año, aunque este número se incrementará a medida que la población envejece (Brookmeyer y col., 1998).

La AD supone un gravamen económico pesado en la sociedad. Un estudio reciente en Los Estados Unidos estimaba que el coste anual de cuidado para un paciente es 18.418 dólares para un paciente con la AD suave, 30.096 dólares para un paciente con AD moderada, y 36.132 dólares para un paciente con AD grave. El coste nacional anual de cuidado para los pacientes con la AD en los Estados Unidos se estima que es ligeramente superior a los 50.000 millones de dólares (Leon y col., 1998).

Aproximadamente 4 millones de americanos son mayores de 85 años, y en la mayoría de los países industrializados, este grupo de edad es uno de los segmentos de crecimiento más rápido de la población. Se estima que este grupo ascenderá a cerca de 8,5 millones el año 2030 en los Estados Unidos; algunos expertos que estudian las tendencias de población sugieren que el número podría ser incluso mayor. Cuanto más viven las personas, el número de personas afectadas por estas enfermedades de envejecimiento, incluyendo la AD, continuarán creciendo. Por ejemplo, algunos estudios muestran cerca de la mitad de todas las personas de 85 años y mayores tienen alguna forma de demencia. (National Institute on Aging Progress Report on Alzheimer's Disease, 1999).

Las características principales de la AD

Las estructuras anormales en el cerebro son los sellos de la AD: placas amiloides de ovillos neurofibrilares (NFT). Las placas son depósitos densos, insolubles en gran medida de material proteico y celular fuera y alrededor de las neuronas del cerebro. Los ovillos son fibras retorcidas insolubles que se acumulan en las neuronas interiores.

Existen dos tipos de AD: AD familiar (FAD), que sigue un cierto patrón de herencia, y AD esporádica, donde no se observa ningún patrón obvio de herencia. Debido a las diferencias en la edad de comienzo, la AD se describe adicionalmente como comienzo temprano (produciéndose en personas menores de 65 años) o de comienzo tardío (produciéndose en los de 65 años o mayores). La AD de comienzo temprano es raro (aproximadamente 10 por ciento de los casos) y generalmente afecta a personas con edades entre 30 y 60. Algunas formas de AD de comienzo temprano son hereditarias y se desarrollan en familias. La AD de comienzo temprano también a menudo progresa más rápido que la forma más común, de comienzo tardío.

Todas las FAD hasta ahora tienen un comienzo temprano, y como mucho el 50 por ciento de los casos de FAD se sabe ahora que están provocadas por defectos en tres genes localizados en tres cromosomas diferentes. Éstos son mutaciones en el gen APP sobre el cromosoma 21; mutaciones en un gen sobre el cromosoma 14, llamado presenilina 1; y mutaciones en un gen sobre el cromosoma 1, llamado presenilina 2. Sin embargo, todavía no existe evidencia de que cualquiera de estas mutaciones juegan un papel importante en la forma más común, esporádica o no familiar de la AD de comienzo tardío. (National Institute on Aging Progress Report on Alzheimer's Disease, 1999).

Placas amiloides

En la AD, las placas amiloides se desarrollan primero en áreas del cerebro usadas para memoria y otras funciones cognitivas. Constan de depósitos insolubles en gran medida de amiloide beta (de aquí en adelante denominado A β) - un fragmento de proteína precursora amiloide (APP, la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEC ID N° 2) - entremezclado con partes de neuronas y con células no nerviosas tales como microglía y astrositos. No se sabe si las propias placas amiloides constituyen la causa principal de la AD o si son un subproducto del proceso de la AD. Ciertamente, cambios en la proteína APP puede provocar la AD, como se muestra en la forma heredada de la AD provocada por mutaciones en el gen APP, y la formación de la placa A β parece que está estrechamente asociada a la progresión de la enfermedad humana (Lippa C. F. y col., 1998).

APP

La APP es una de las muchas proteínas que están asociadas con las membranas celulares. Después de que está hecha, la APP se llega a embeber en las membranas celulares nerviosas, parcialmente en el interior y parcialmente en el exterior de la célula. Recientes estudios que usan ratones transgénicos demuestran que la APP parece que juega un papel importante en el crecimiento y supervivencia de neuronas. Por ejemplo, ciertas formas y cantidades de la APP pueden proteger neuronas contra tanto daño a corto como largo plazo y pueden hacer que las neuronas dañadas sean capaces de repararse mejor ellas mismas y ayudar a partes de neuronas a crecer después de la lesión cerebral.

Mientras que la APP está embebida en la membrana celular, las proteasas actúan en sitios particulares en la APP, escindiéndose en fragmentos de proteínas. Otra proteasa ayuda a escindir la APP para formar A β , y otra proteasa escinde la APP en la mitad del fragmento amiloide de manera que no se pueda formar A β . La A β formada es de dos longitudes diferentes, una más corta de 40 (ó 41) aminoácidos A β que es relativamente soluble y se agrega lentamente, y una ligeramente más larga, de 42 aminoácidos A β “pegajosa” que rápidamente forma grumos insolubles. Mientras que la A β se está formando, no se sabe exactamente cómo se mueve a través o alrededor de células nerviosas. En las fases finales de este proceso, la A β “pegajosa” se agrega en largos filamentos en el exterior de la célula, junto con fragmentos de neuronas muertas y moribundas y la microglía y astrocitos, forma las placas que son características de la AD en el tejido cerebral.

Existe alguna evidencia de que las mutaciones en la APP se obtienen más probablemente que la A β se recortarán fuera del precursor de la APP, de este modo provocando o bien más A β total o relativamente más de la forma “pegajosa” a preparar. También parece que las mutaciones en la presenilina pueden contribuir a la degeneración de neuronas en al menos dos formas: modificando la producción de más o desencadenando la muerte de células más directamente. Otros investigadores sugieren que las presenilinas 1 y 2 pueden estar implicadas en la aceleración de la marcha de la apoptosis.

Se espera que a medida que la enfermedad progresa, se formarán más y más placas, llenando más y más el cerebro. Los estudios sugieren que puede ser que la A β se agregue y desagregue al mismo tiempo, de un modo de equilibrio dinámico. Esto eleva la esperanza de que pueda ser posible romper las placas incluso después de que se formen. (National Institute on Aging Progress Report on Alzheimer's Disease, 1999).

Se cree que la A β es tóxica para las neuronas. En estudios de cultivos de tejidos, los investigadores observaron un incremento en la muerte de células neuronales del hipocampo modificadas por ingeniería genética para sobreexpresan formas mutadas de APP humana comparadas con neuronas que sobreexpresan la APP humana normal (Luo y col., 1999).

Además, la sobreexpresión o la expresión de formas modificadas de la proteína A β se ha demostrado en modelos animales que induce síntomas de tipo Alzheimer, (Hsiao K. y col., 1998).

Dado que la generación de A β se incrementa, su agregación en placas, y la neurotoxicidad resultante puede conducir a la AD, es de interés terapéutico investigar condiciones bajo las que la agregación de A β en placas podría ralentizarse o incluso bloquearse.

Presenilinas

Las mutaciones en la presenilina 1 (S-180) son responsables de casi el 50% de todos los casos de AD familiar de comienzo temprano (FAD). Alrededor de 30 mutaciones se han identificado que dan lugar a la AD. El comienzo de la AD varía con las mutaciones. Las mutaciones en la presenilina 2 son responsables de una parte mucho más pequeña de los casos de FAD, pero es todavía un factor significativo. Se sabe ahora si las presenilinas están implicadas en AD no familiar esporádica. La función de las presenilinas no se conoce, pero parece que están implicadas en el procesamiento de APP para proporcionar A β -42 (la forma más pegajosa más larga del péptido, SEC ID N° 2, residuos 673 - 714), ya que los pacientes de AD con mutaciones de presenilina tienen niveles incrementados de este péptido. No está claro si la presenilinas también tienen un papel en la provocación de la generación de NFT. Algo sugiere que las presenilinas podrían tener un papel más directo en la degeneración de neuronas y muerte de neuronas. La presenilina 1 se localiza en el cromosoma 14 mientras que la presenilina 2 esta ligada al cromosoma 1. Si una persona alberga una versión mutada de solo uno de estos genes él o ella es casi cierto que desarrolla la AD de comienzo temprano.

Existe cierta incertidumbre de si la presenilina 1 es idéntica a la secretasa gama hipotética implicada en el procesamiento de APP (Naruse y col., 1998).

Apolipoproteína E

La apolipoproteína E está usualmente asociada a colesterol, pero también se encuentra en placas y ovillos de los cerebros de la AD. Mientras que los alelos 1 - 3 no parece que estén implicadas en la AD existe una correlación significativa entre la presencia del alelo APOE-e4 y desarrollo de la AD tardía (Strittmatter y col., 1993). Es, sin embargo, un factor de riesgo y no una causa directa como es el caso para la presenilina y las mutaciones de APP y no se limita a la AD familiar.

Las formas en las que la proteína de ApoE e4 de aumentar la probabilidad de desarrollar la AD no se conocen con certeza, pero una posible teoría es que facilita la acumulación de A β y esto contribuye a ralentizar la edad de aparición de la AD, o la presencia o ausencia de alelos de APOE particular puede afectar la forma en que las neuronas responden a la lesión. (Buttini y col., 1999).

También la Apo A1 se ha mostrado que es amiloigénica. La apo A1 intacta puede ella misma formar fibrilas de tipo amiloide *in vitro* que son rojo congo positivas (Am J. Pathol 147 (2): 238 - 244 (agosto de 1995), Wisniewski T, Golabek AA, Kida E, Wisniewski KE, Frangione B).

Parecen existir resultados contradictorios que indican que existe un efecto positivo del alelo APOE-34 en la disminución de síntomas de pérdida mental, comparado con otros alelos (Stern, Brandt, 1997, Annals of Neurology 41).

Ovillos neurofibrilares

Este segundo sello de la AD consta de colecciones anormales de hebras retorcidas encontradas en el interior de las células nerviosas. El componente principal de los ovillos es una forma de una proteína llamada tau (t). En el sistema nervioso central, las proteínas tau se conocen mejor por su capacidad de unirse y ayudar a estabilizar los microtúbulos, que son un constituyente de la estructura de soporte interno, o esqueleto de las células. Sin embargo, en la AD la tau se cambia químicamente, y esta tau alterada no puede estabilizar más los microtúbulos, provocando que se desintegren. Este colapso del sistema de transporte puede al principio dar como resultado malfunciones en la comunicación entre células nerviosas y puede más tarde conducir a la muerte de neuronas.

En la AD, la tau químicamente alterada se retuerce en dos hebras de filamentos helicoidales apareados de tau que se enrollan entre sí. Estos filamentos son la principal sustancia encontrada en los ovillos neurofibrilares. En un estudio reciente, los investigadores encontraron cambios neurofibrilares en menos de 6% de las neuronas en una parte particular del hipocampo en cerebros sanos, en más del 43 por ciento de estas neuronas de las personas que murieron con AD suave, y en 71 por ciento de estas neuronas de personas que murieron con AD grave. Cuando se estudió la pérdida de neuronas, se encontró una progresión similar. Evidencia de este tipo soporta la idea de que la formación de ovillos y al pérdida de neuronas progresa junto con el curso de la AD. (National Institute on Aging Progress Report on Alzheimer's Disease, 1999).

Tauopatías y ovillos

Varias enfermedades neurodegenerativas, distintas de la AD, se caracterizan por la agregación de tau en filamentos insolubles en neuronas y glia, conduciendo a disfunción y muerte. Muy recientemente, varios grupos de investigadores, que estuvieron estudiando familias con una variedad de demencias hereditarias distintas de AD, encontraron las primeras mutaciones en el gen tau sobre el cromosoma 17 (Clark y col., 1998; Hutton y col., 1998; Poorkaj y col., 1998; Spillantini y col., 1998). En estas familias, las mutaciones en el gen tau provocan muerte celular neuronal y demencia. Estos trastornos que comparten algunas características con la AD pero difieren en varios aspectos importantes, se llaman colectivamente "demencia frontotemporal y parkinsonismo ligado al cromosoma 17" (FTDP-17). Son enfermedades tales como enfermedad de Parkinson, algunas formas de esclerosis lateral amiotrófica (ALS), degeneración corticobasal, parálisis supranuclear progresiva, y enfermedad de Pick, y todas están caracterizadas por la agregación anormal de la proteína tau.

Otras enfermedades neurológicas de tipo AD

Existen importantes paralelismos entre la AD y otras enfermedades neurológicas, incluyendo enfermedades de priones (tales como kuru, enfermedad de Creutzfeld - Jacob y encefalitis espongiforme bovina), enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, y demencia frontotemporal. Todo implica depósitos de proteínas anormales en el cerebro. La AD y enfermedades de priones provocan demencia y muerte, y ambas están asociadas con la formación de fibrilas amiloides insolubles, pero de proteínas de membrana que son diferentes entre sí.

Los científicos que estudian la enfermedad de Parkinson, el segundo trastorno neurodegenerativo más común después de AD, descubrieron el primer gen ligado a la enfermedad. Este gen codifica una proteína llamada sinucleína, que, de manera desconcertante, también se encontró en las placas amiloides de los cerebros de pacientes de AD (Lavedan C, 1998, Genome Res. 8 (9): 871 - 80). Los investigadores también descubrieron que defectos genéticos en la enfermedad de Huntington, otro trastorno neurodegenerativo progresivo que provoca demencia, provocan que la

proteína de Huntington forme fibrilas insolubles muy similares a las fibrilas A β de la AD y las fibrilas proteicas de la enfermedad de priones, (Scherzinger E, y col., 1999, PNAS Estados Unidos 96 (8): 4604 - 9):

Los científicos también han descubierto un gen novedoso, que cuando muta, es responsable de la demencia familiar británica (FBD), una enfermedad heredada rara que provoca trastornos de movimiento graves y demencia progresiva similar a la observada en la AD. En un análisis bioquímico de las fibrilas amiloides encontradas en las placas de FBD, se encontró un único péptido llamado ABri (Vidal y col., 1999). Una mutación en un punto particular junto con este gen da como resultado la producción de una proteína Bri más larga que la normal. El péptido ABri, que es una forma recortada del extremo mutado de la proteína Bri se deposita como fibrilas amiloides. Estas placas se piensa que conducen a la disfunción neuronal y demencia que caracteriza FBD.

Inmunización con A β

El sistema inmune normalmente tomará parte en la eliminación de proteína extraña y partículas proteináceas en el organismo pero los depósitos asociados a las enfermedades anteriormente mencionadas constaban principalmente de auto - proteínas, por lo tanto haciendo que el papel del sistema inmune en el control de estas enfermedades sea menos obvio. Además, los depósitos se localizan en un compartimiento (el SNC) separado normalmente del sistema inmune, sugiriendo ambos hechos que cualquier vacuna o planteamiento inmunoterapéutico sea ineficaz.

Sin embargo, los científicos recientemente han intentado inmunizar ratones con una vacuna compuesta de A β humana heteróloga y una sustancia conocida que excita el sistema inmune (Schenk y col., 1999 y el documento WO 99/27944). La vacuna se ensayó en un modelo de ratón transgénico parcial de la AD con un gen mutado humano para la APP insertada en el ADN del ratón. El ratón produjo la proteína APP modificada y desarrolló placas amiloides a medida que envejecían. Este modelo de ratón se usó para ensayar si la vacunación contra la APP humana transgénica modificada tenía un efecto en la aparición de placas. En un primer experimento, a un grupo de ratones transgénicos se proporcionaron inyecciones mensuales de la vacuna comenzando a las 6 semanas de edad y terminando a los 11 meses. Un segundo grupo de ratones transgénicos no recibió ninguna inyección y sirvió como grupo control. A los 13 meses de edad, los ratones en el grupo control tenían placas que cubren el 2 a 6 por ciento de sus cerebros. Por el contrario, los ratones inmunizados no tenían virtualmente placas.

En un segundo experimento, los investigadores comenzaron las inyecciones a los 11 meses, cuando algunas placas ya se habían desarrollado. Durante un período de 7 meses, los ratones transgénicos control tenían un incremento de 17 veces en la cantidad de placa en sus cerebros, mientras que los que recibieron la vacuna tenían un 99 por ciento de disminución comparado con los ratones transgénicos control de 18 meses. En algunos ratones, alguno de los depósitos de placas preexistentes parecían haberse eliminado por el tratamiento. También se encontró otro daño asociado a placas, tal como inflamación y procesos de células nerviosas anormales, disminuyendo como resultado de la inmunización.

Lo mencionado anteriormente es de esta manera un estudio preliminar en ratones y por ejemplo, los científicos necesitan encontrar si los ratones vacunados permanecen sanos en otros aspectos y si la memoria de los vacunados permanece normal. Además, debido a que el modelo de ratón no es una representación completa de la AD (los animales no desarrollan ovillos neurofibrilares ni ninguna de sus neuronas muere), estudios adicionales serán necesarios para determinar si los seres humanos tienen una reacción similar o diferente de los ratones. Otra cuestión a considerar es que el procedimiento puede quizás "curar" la deposición amiloide pero no detiene el desarrollo de la demencia.

Cuestiones técnicas presentan también desafíos importantes. Por ejemplo, es improbable que sea incluso imposible, usando esta tecnología, crear una vacuna que permita que los seres humanos induzca anticuerpos contra sus propias proteínas. Así numerosas cuestiones de seguridad y eficacia necesitarán ser resueltos antes de que se pueda considerar cualquier ensayo en seres humanos.

El trabajo de Schenk y col., muestra de esta manera que si era posible generar una respuesta inmune fuerte hacia las auto - proteínas en los depósitos proteináceos en el sistema nervioso central tal como las placas formadas en la AD, es posible prevenir tanto la formación de los depósitos como posiblemente también eliminar las placas ya formadas.

Recientemente, ensayos clínicos que usan las vacunas de A β descritas anteriormente se han terminado debido a efectos adversos: un número de los sujetos vacunados desarrollaron encefalitis crónica que se puede deber a una autoinmunidad no controlada contra A β en el SNC.

Objeto de la invención

El objeto de la presente invención es proporcionar terapias novedosas contra afecciones caracterizadas por la deposición de amiloide, tal como la AD. Un objeto adicional de la presente invención es desarrollar una autovacuna contra amiloide, con el fin de obtener un tratamiento novedoso para la AD y para otros trastornos patológicos que implican deposición de amiloide.

Sumario de la invención

En esta memoria descriptiva se describe el uso de una tecnología de autovacunación para generar fuertes respuestas inmunes contra o bien la APP y A β . También se describe la preparación de tales vacunas para la prevención, posible cura o alivio de los síntomas de tales enfermedades asociados con depósitos de amiloide.

De este modo, en su alcance más amplio y más general, la presente invención se refiere al uso de un inmunógeno, que

- a) es un poliaminoácido que incorpora en la misma molécula una fracción sustancial de epítopes de células B de APP y/o A β de manera que el poliaminoácido reacciona hasta el mismo grado que lo hace la APP o A β con un suero policlonal inducido contra APP o A β , y al menos un epítipo T auxiliar extraño (epítipo T_H), y que contiene al menos un epítipo T_H extraño y una secuencia rota de APP o A β de manera que el poliaminoácido no incluye ninguna subsecuencia de la SEQ ID N°: 2 que se une de manera productiva a las moléculas de clase II de MHC que inicia una respuesta de célula T; o
- b) es un conjugado que comprende una estructura central de polihidroxipolímero al que está acoplado un poliaminoácido como se ha definido en a); o
- c) es un conjugado que comprende una estructura central de polihidroxipolímero al que está acoplado separadamente 1) el al menos un epítipo T_H extraño y 2) una secuencia rota de APP o A β como se ha definido en a); o
- d) es un ácido nucleico que codifica el poliaminoácido como se ha definido en a); o
- e) es un microorganismo no patógeno o virus que lleva un fragmento de ácido nucleico que codifica y expresa el poliaminoácido como se ha definido en a),

en la preparación de una preparación farmacéutica que contiene el inmunógeno para el tratamiento, prevención o mejora en un animal de la enfermedad de Alzheimer u otras enfermedades caracterizadas por la deposición de amiloide.

El presente cesionario ha presentado previamente una solicitud de patente internacional referida a estrategias de vacunación segura contra polipéptidos amiloidogénicos tales como APP y A β , véase el documento 01/62284. Esta solicitud no contiene detalles con relación a los análogos útiles mencionados anteriormente de APP y A β .

La invención también se refiere a APP y A β así como a fragmentos de ácidos nucleicos que codifican un subconjunto de éstos. También las composiciones inmunógenas que comprenden los análogos o fragmentos de ácidos nucleicos son parte de la invención.

Leyenda de la figura

Fig. 1: Muestra esquemática de variantes Autovac derivadas de la proteína precursora amiloide con el propósito de generar respuestas de anticuerpo contra la proteína A β A β -43 (o C-100). La APP se muestra esquemáticamente en la parte superior de las figuras y las construcciones esquemáticas restantes muestran que los epítipes P2 y P30 de modelo están sustituidos o insertados en diversos truncamientos de la APP. En la figura, el patrón negro indica la secuencia señal de APP, los rasgos verticales oscuros son el dominio transmembrana de la APP, los rasgos verticales claros son el dominio intracelular de la APP, los rasgos de trazo grueso cruzado indican el epítipo P30, y los rasgos de trazo cruzado fino indican el epítipo P2. La casilla de línea rellena indica A β -42/43 y la casilla de línea rellena y la casilla de línea de puntos juntas indican C-100. "Abeta" designa A β .

Fig. 2: Muestra esquemática de una realización de la síntesis de conjugados inmunógenos generalmente aplicables. El péptido A (cualquier secuencia antigénica, por ejemplo una secuencia de A β descrita en esta memoria descriptiva) y el péptido B (una secuencia de aminoácidos que incluye un epítipo auxiliar T extraño se sintetizan y se mezclan. Después de eso se ponen en contacto con un polihidroxipolímero activado adecuado, los péptidos A y B se unen mediante el grupo de activación en una relación que corresponde a la relación inicial entre estas dos sustancias en la mezcla de péptidos. Véase el ejemplo 4 para detalles.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

En lo que se describe a continuación un número de términos usados en la presente memoria descriptiva y reivindicaciones se definirán y explicarán en detalle con el fin de clarificar los límites y confines de la invención.

Los términos "amiloide" y "proteína amiloide" que se usan indistintamente en esta memoria descriptiva denotan una clase de fibrilas no ramificadas proteináceas de longitud indeterminada. Las fibrilas amiloides muestran tinción característica con rojo Congo y comparten una estructura transversal β en la que la cadena polipeptídica está organizada

en hojas β . El amiloide generalmente se deriva de proteínas amiloidogénicas que tienen estructuras precursoras muy diferentes pero que todas pueden experimentar una conversión estructural a una forma mal plegada que es el bloque de construcción del protofilamento de hélice de hoja β . Normalmente, el diámetro de las fibrilas amiloides varía entre aproximadamente 70 y aproximadamente 120 Å.

El término “proteína amiloidogénica” pretende indicar un polipéptido que está implicado en la formación de depósitos de amiloides, siendo o bien parte de los depósitos como tal o siendo parte de la ruta biosintética que conduce a la formación de los depósitos. Por lo tanto, los ejemplos de proteínas amiloidogénicas son APP y $A\beta$, pero también las proteínas implicadas en el metabolismo de éstas pueden ser proteínas amiloidogénicas. En esta memoria descriptiva se describen en detalle un número de polipéptidos amiloidogénicos.

Un “polipéptido amiloide” en esta memoria descriptiva pretende indicar polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos de las proteínas amiloidogénicas descritas en esta memoria descriptiva derivadas de mamíferos humanos u otros (o truncamientos de los mismos que comparten una cantidad sustancial de epítopes de células B con una proteína amiloidogénica intacta) - por lo tanto un polipéptido amiloidogénico puede por ejemplo, comprender partes sustanciales de un precursor para el polipéptido amiloidogénico (en el caso de $A\beta$, un posible polipéptido amiloide podría ser derivado de la APP). También las formas no glucosiladas de polipéptidos amiloidogénicos que se preparan en el sistema procariótico están incluidas dentro de los límites del término como son las formas que tienen patrones de glucosilación debido al uso de por ejemplo, levaduras u otros sistemas de expresión eucarióticos no mamíferos. Sin embargo, se debe observar que cuando se usa el término “un polipéptido amiloidogénico” se pretende que el polipéptido en cuestión sea normalmente no inmunógeno cuando se presenta al animal a tratar. En otras palabras, el polipéptido amiloidogénico es una auto - proteína o es un análogo de tal auto - proteína que normalmente no dará lugar a una respuesta inmune contra el amiloidogénico del animal en cuestión.

Un “análogo” es una molécula derivada de APP o de $A\beta$ que incorpora uno o varios cambios en su estructura molecular. Tal cambio puede, por ejemplo, estar en la forma de fusión de poliaminoácidos de APP o $A\beta$ a una pareja de fusión adecuada (es decir, un cambio en la estructura primaria que implica exclusivamente adiciones en terminal C- y/o N de residuos de aminoácidos) y/o pueden estar en forma de inserciones y/o supresiones y/o sustituciones en la secuencia del aminoácido del polipéptido. También abarcadas por el término están las moléculas derivadas de APP o de $A\beta$, véase la descripción más adelante de las modificaciones de APP o $A\beta$. En algunos casos el análogo se puede construir de manera que sea menos capaz o incluso incapaz de generar anticuerpos contra la proteína (s) precursora (s) del amiloide normal (es), por lo tanto evitando la interferencia no deseada con la forma no agregada (fisiológicamente normal) del polipéptido que es un precursor de la proteína amiloide.

Se debe observar que el uso como una vacuna en un ser humano de un xeno - análogo (por ejemplo, un análogo canino o porcino) de una APP o $A\beta$ se puede imaginar que produce la inmunidad deseada contra APP o $A\beta$. Tal uso de un xeno - análogo para inmunización también se considera parte de la invención.

El término “polipéptido” en el presente contexto pretende significar tanto péptidos cortos de entre 2 y 10 residuos de aminoácidos, oligopéptidos de entre 11 y 100 restos de aminoácidos, como polipéptidos de más de 100 restos de aminoácidos. Además el término también pretende incluir proteínas, es decir biomoléculas funcionales que comprenden al menos un polipéptido; cuando comprendiendo al menos dos polipéptidos, estos pueden formar complejos, estar unidos covalentemente, o pueden estar unidos no covalentemente. El (los) polipéptido (s) en una proteína se puede glucosilar y/o lipidar y/o comprender grupos prostéticos. También el término “poliaminoácido” es un equivalente al término “polipéptido”.

Los términos “linfocito T” y “célula T” se usarán indistintamente para linfocitos de origen tímico que son responsables de diversas respuestas inmunes mediadas por células así como para actividad auxiliar en la respuesta inmune humoral. Del mismo modo, los términos “linfocito B” y “célula B” se usarán indistintamente para linfocitos que producen anticuerpos.

El término “subsecuencia” significa cualquier tramo de al menos 3 aminoácidos o, cuando sea relevante, de al menos 3 nucleótidos, derivados directamente de una secuencia de aminoácidos amiloide de origen natural, respectivamente.

El término “animal” en el presente contexto en general propone denotar una especie animal (preferiblemente mamífero), tal como *Homo sapiens*, *Canis domesticus*, etc, y no un único animal. Sin embargo, el término también denota una población de tal especie animal, ya que es importante que los individuos inmunizados de acuerdo con el procedimiento de la invención alberguen todos sustancialmente el mismo polipéptido amiloidogénico que permite inmunización de los animales con el (los) mismo (s) inmunógeno (s). Si, por ejemplo, existen variantes del polipéptido amiloidogénico en diferente población humana puede ser necesaria usar inmunógenos diferentes en estas poblaciones diferentes con el fin de ser capaz de romper la autotolerancia hacia el polipéptido amiloidogénico en cada población de una manera óptima. Será evidente para la persona experta que un animal en el presente contexto es un ser vivo que tiene un sistema inmune. Se prefiere que el animal sea un vertebrado tal como un animal.

Por el término “regulación hacia abajo *in vivo* de APP o $A\beta$ ” se entiende en esta memoria descriptiva la reducción en el organismo vivo de la cantidad total de proteína amiloide depositada (o amiloide como tal) del tipo relevante. La regulación hacia abajo se puede obtener por medio de varios mecanismos: de éstos, la simple interferencia con

amiloide mediante la unión de anticuerpo para prevenir la falsa agregación es la más sencilla. Sin embargo, también está dentro del alcance de la presente invención que el la unión a anticuerpo de cómo resultado la eliminación del amiloide por células depuradoras (tal como macrófagos y otras células fagocíticas) y que los anticuerpos interfieren con otros polipéptidos amiloidogénicos que conducen a la formación de amiloide. Una posibilidad adicional es que los anticuerpos se unan a A β en el exterior del SNC, retirando por lo tanto de manera eficaz A β del SNC mediante un principio de acción de masas simple.

La expresión “efectuando la presentación. . . al sistema inmune” pretende denotar que el sistema inmune del animal se somete a una estimulación inmunógena de una manera controlada. Como será evidente a partir de la descripción a continuación, tal estimulación del sistema inmune se posee efectuar en un número de formas de las que la más importante son vacunación con “farmacinas” (es decir, una vacuna que se administra para tratar o mejorar una enfermedad en curso) o vacunación de “farmacina” de ácido nucleico. El resultado importante para lograrlo es que las células competentes inmunes en el animal se confronten con el antígeno de una manera inmunológicamente eficaz, mientras que el modo preciso de lograr este resultado es de menos importancia para la idea de invención que subyace la presente invención.

El término “cantidad inmunológicamente eficaz” tiene su significado usual en la técnica, es decir, una cantidad de un inmunógeno, que es capaz de inducir una respuesta inmune que engrana agentes patógenos que comparten características inmunológicas con el inmunógeno.

Cuando se usa la expresión de que el polipéptido amiloidogénico se ha “modificado” quiere significar en esta memoria descriptiva una modificación química del polipéptido, que constituye la estructura central del polipéptido amiloidogénico. Tal modificación puede, por ejemplo, ser la derivatización por ejemplo, alquilación) de ciertos restos de aminoácidos en la secuencia del polipéptido amiloidogénico, pero como se apreciará a partir de la descripción más adelante, las modificaciones preferidas comprenden cambios de la estructura primaria de la secuencia de aminoácidos.

Cuando se describe “autotolerancia hacia APP o A β ” se entiende que ya que el polipéptido es una auto - proteína en la población a vacunar, individuos normales en la población no montan una respuesta inmune contra el polipéptido amiloidogénico; sin embargo, no se puede excluir que los individuos ocasionales en una población animal podría ser capaz de producir anticuerpos contra polipéptido amiloidogénico nativo, por ejemplo, como parte de un trastorno autoinmune. De cualquier forma, un animal no solamente será autotolerante hacia su propia APP o A β , pero no se puede excluir que los análogos derivados de otra especie animal o de una población que tiene un fenotipo diferente también se toleraría por dicho animal.

Un “epítipo de células T extraño” (o: “epítipo de linfocitos T extraño”) es un péptido que es capaz de unirse a una molécula de MHC y que estimula las células T en una especie animal. Los epítipos de células T extraños en la invención son epítipos “promiscuos”, es decir que se unen a una fracción sustancial de una clase particular de moléculas de MHC en una especie o población animal. Solamente se conocen un número muy limitado de tales epítipos de células T promiscuos, y se describirán en detalle más adelante. Los epítipos de células T promiscuos también se denominan epítipos de células “universales”. Se debe observar que con el fin de que los inmunógenos que se usan de acuerdo con la presente invención sean eficaces en una fracción de de una población animal tanto como sea posible, puede ser necesario 1) insertar varios epítipos de las células T extraños en el mismo análogo o 2) preparar varios análogos en los que cada análogo tiene insertado un epítipo promiscuo diferente. Se debe observar que el concepto de epítipos de células T extraños también abarca el uso de epítipos de células T crípticos, es decir, epítipos que se derivan de una auto - proteína y que solamente ejerce un comportamiento inmunógeno cuando existe en forma aislada sin ser parte de la auto - proteína en cuestión.

Un “epítipo de linfocitos auxiliares T extraño” (un epítipo T_H extraño) es un epítipo de células T extraño, que une una molécula de clase II de MHC y se puede presentar sobre la superficie de una célula presentadora de antígeno (APC) unida a la molécula de clase II de MHC.

Una “parte funcional” de una (bio)molécula en el presente contexto pretende significar la parte de la molécula que es responsable de al menos uno de los efectos bioquímicos o fisiológicos ejercidos por la molécula. Se sabe bien en la técnica que muchas enzimas y otras moléculas efectoras tienen un sitio activo que es responsable de los efectos ejercidos por la molécula en cuestión. Otras partes de la molécula pueden servir como un propósito estabilizador o potenciador de solubilidad y por lo tanto puede excluirse si estos propósitos no son de relevancia en el contexto de una cierta realización de la presente invención. Por ejemplo es posible usar ciertas citoquinas como un resto modificador en una APP o A β (véase la descripción detallada más adelante), y en tal caso, la cuestión de estabilidad puede ser irrelevante ya que el acoplamiento a APP o A β puede proporcionar la estabilidad necesaria.

El término “adyuvante” tiene su significado usual en la técnica de la tecnología de vacuna, es decir, una sustancia o una composición de material que es 1) no en sí mismo capaz de montar una respuesta inmune específica contra el inmunógeno de la vacuna, pero que es 2) no obstante capaz de potenciar la respuesta inmune contra el inmunógeno. O en otras palabras, vacunación con el adyuvante solo no proporciona una respuesta inmune o puede no dar lugar a una respuesta inmune contra el inmunógeno, pero la vacunación combinada con inmunógeno y adyuvante induce una respuesta inmune contra el inmunógeno que es más fuerte que el inducido por el inmunógeno solo.

“Dirección” de una molécula pretende denotar en el presente contexto la situación en la que una molécula tras la introducción en el animal aparece preferentemente en cierto (s) tejido (s) o estará preferiblemente asociada a ciertas células o tipos de células. El efecto se puede lograr de un número de formas que incluye formulación de la molécula en composición que facilita la dirección o mediante la introducción en la molécula de grupos, que facilitan la dirección.

Estos asuntos se discutirán en detalle más adelante.

“Estimulación del sistema inmune” significa que una sustancia o composición de material muestra un efecto general, no específico inmunoestimulador. Un número de adyuvantes y adyuvantes supuestos (tal como ciertas citoquinas) comparten la capacidad de estimular el sistema inmune. El resultado de usar un agente inmunoestimulador es un aumento de “vigilancia” del sistema inmune que significa que la inmunización simultánea o posterior con un inmunógeno induce una respuesta inmune significativamente más eficaz comparada con el uso aislado del inmunógeno.

“Unión productiva” significa la unión de un péptido a la molécula de MHC (Clase I o II) de manera que sea capaz de estimular las células T que se acoplan a una célula que presentan el péptido unido a la molécula de MHC. Por ejemplo, un péptido unido a una molécula de Clase II de MHC en la superficie de un APC se dice que se une de manera productiva si esta APC estimulará una célula T_H que se une al complejo péptido - Clase II de MHC.

Realizaciones preferidas de regulación hacia debajo de amiloide

El análogo usado como inmunógeno en el uso de la invención es una molécula de APP o A β modificada en la que está presente al menos un cambio en la secuencia de aminoácidos de APP o A β , ya que las posibilidades de obtener la ruptura importante total de autotolerancia se facilita en gran medida de esa forma - es decir, por ejemplo, evidente a partir de los resultados presentados en el ejemplo 2 comparativo en esta memoria descriptiva, cuando la inmunización con la A β de tipo salvaje se compara con la inmunización con una molécula variante de A β . Se ha mostrado (en Dalum I y col., 1996, J. Immunol. 157: 4796 - 4804) que los linfocitos B potencialmente auto - reactivos que reconocen las auto - proteínas están fisiológicamente presentes en individuos normales. Sin embargo, con el fin de que estos linfocitos B se induzcan para que se produzcan realmente anticuerpos reactivos con las auto - proteínas relevantes, se necesita asistencia de los linfocitos auxiliares T que producen citoquinas (células T_H o linfocitos T_H). Normalmente esta ayuda no se proporciona debido a que los linfocitos T en general no reconocen los epítopes de las células T derivadas de auto proteínas cuando se presentan por las células presentadoras de antígeno (APCs). Sin embargo, proporcionando un elemento de “extrañeza” en una auto - proteína (es decir, introduciendo una modificación inmunológicamente significativa), las células T que reconocen el elemento extraño se activan tras reconocer el epítipo extraño sobre un APC (tal como, inicialmente, una célula mononuclear). Los linfocitos B policlonales (que también son APCs) capaces de reconocer auto - epítopes sobre la auto - proteína modificada también internaliza el antígeno y posteriormente presenta el (los) epítipo (s) de las células T extraño (s) de los mismos, y los linfocitos T activados posteriormente proporcionan ayuda de las citoquinas a estos linfocitos B policlonales auto - reactivos. Ya que los anticuerpos producidos por estos linfocitos B policlonales son reactivos con diferentes epítopes sobre el polipéptido modificado, incluyendo aquellos que también están presentes en el polipéptido nativo, se induce una reacción cruzada de anticuerpo con la auto - proteína no modificada. En conclusión, los linfocitos T pueden conducir a actuar como si la población de los linfocitos B policlonales hayan reconocido un antígeno extraño enteramente, mientras que de hecho solamente el (los) epítipo (s) insertado (s) es / son extraño (s) para el huésped. De esta forma, se inducen los anticuerpos capaces de reaccionar de manera cruzada con los auto - antígenos no modificados.

Se conocen en la técnica varias formas de modificar un auto - antígeno peptídico con el fin de obtener la rotura de autotolerancia. Por lo tanto, de acuerdo con la invención, la modificación puede incluir que

- al menos un primer resto se introduce que efectúa la dirección de la molécula modificada a una célula presentadora de antígenos (APC), y/o
- al menos un segundo resto se introduce que estimula el sistema inmune, y/o
- al menos un tercer resto se introduce que optimiza la presentación del polipéptido amiloidogénico modificado al sistema inmune

Sin embargo, todas estas modificaciones se deben llevar a cabo mientras se mantiene una fracción sustancial de los epítopes de los linfocitos B originales en la APP o A β , ya que por lo tanto se potencia el reconocimiento de los linfocitos B de la molécula nativa.

En una realización preferida, los grupos secundarios (en la forma de epítopes de las células T extraños o el primer, segundo y tercer resto mencionado anteriormente) están covalente o no covalentemente introducidos. Esto significa que los tramos de los residuos de aminoácidos derivados de la APP o A β se derivaticen sin alterar la secuencia primaria de aminoácidos, o al menos sin introducir cambios en los enlaces peptídicos entre los aminoácidos individuales en la cadena.

Una realización alternativa, y preferida utiliza la sustitución de aminoácidos y/o supresión y/o adición (que se puede efectuar por medios recombinantes o por medio de síntesis de péptidos. Una versión especialmente preferida se esta realización es la técnica descrita en el documento WO 95/05849, que describe un procedimiento para regular hacia abajo las auto - proteínas inmunizando con análogos de las auto - proteínas en las que un número de secuencias

de aminoácidos se ha sustituido con un número correspondiente de secuencia (s) de aminoácidos que comprende cada una un epítipo de células T inmunodominante extraño, mientras que al mismo tiempo mantiene la estructura terciaria global de la auto - proteína en el análogo. Para los propósitos de la presente invención, es sin embargo suficiente si la modificación (sea una inserción, adición, supersigno sustitución) da lugar a un epítipo de células T extraño y al mismo tiempo preserva un número sustancial de epítopes de células B en APP o A β . Sin embargo, con el fin de obtener máxima eficacia de la respuesta inmune inducida, se prefiere que la estructura terciaria global de APP o A β se mantenga en la molécula modificada.

En algunos casos se prefiere que la APP o A β o fragmentos de los mismos estén mutados. Especialmente preferidas son variantes de sustitución en las que la metionina en la posición 35 en A β - 43 está sustituida, preferiblemente con leucina o isoleucina, o simplemente suprimida. Los análogos especialmente preferidos contienen una única metionina que está localizada en el extremo C, o bien porque es de origen natural en el polipéptido amiloidogénico o epítipo T_H extraño, o porque se ha insertado o añadido. Por lo tanto, también se prefiere que la parte del análogo que incluye el epítipo T_H extraño esté sin metionina, excepto de la posible localización C - terminal de una metionina.

La principal razón para retirar todo excepto una metionina es que llega a ser posible preparar de manera recombinante análogos multiméricos que se pueden posteriormente escindir mediante cianogenbromuro para dejar los análogos individuales. La ventaja es, que la producción recombinante de llega a facilitar de esta manera.

De hecho, en general se prefiere que todos los análogos de APP o A β que se usan de acuerdo con la presente invención comparten la característica de incluir solamente una sola metionina que está posicionada en el aminoácido C - terminal en el análogo y que otra metionina en o bien el polipéptido amiloidogénico o el epítipo T_H extraño están suprimidos o sustituidos por otro aminoácido.

Una mutación interesante adicional es una supresión o sustitución de de la fenilalanina en la posición 19 en A β - 43, y se prefiere especialmente que la mutación sea una sustitución de de este residuo de fenilalanina con una prolina.

Otros poliaminoácidos interesantes a usar en los análogos son partes truncadas de la proteína A β - 43. Esto también se puede emplear en análogos inmunógenos de acuerdo con la presente invención. Se prefieren especialmente los truncados A β (1 - 42), γ (1 - 40), A β (1 - 39), A β (1 - 35), A β (1 - 34), A β (1 - 28), A β (1 - 12), A β (1 - 5), A β (13 - 28), A β (13 - 35), A β (17 - 28), A β (25 - 35), A β (35 - 40), A β (36 - 42) y A β (35 - 42) (donde los números entre paréntesis indican los tramos de aminoácidos de A β - 43 que constituye en fragmento relevante - A β (35 - 40) es por ejemplo idéntico a los aminoácidos 706 - 711 en la SEQ ID N°: 2). Todas estas variantes con las partes truncadas de A β - 43 se puede hacer con los fragmentos A β descritos en esta memoria descriptiva, en particular con las variantes 9, 10, 11, 12 y 13 mencionadas en el ejemplo 1.

La siguiente fórmula describe las construcciones moleculares generalmente cubiertas por la invención:

$$(\text{MOD}_1)_{s1}(\text{amiloide}_{e1})_{n1}(\text{MOD}_2)_{s2}(\text{amiloide}_{e2})_{n2}\dots(\text{MOD}_x)_{sx}(\text{amiloide}_{ex})_{nx} \quad (\text{I})$$

donde amiloide_{e1} - amiloide_{ex} son x epítipo de células B que contienen subsecuencias de APP o A β que son independientemente idénticos o no idénticos y que pueden contener o no contener grupos secundarios extraños, x es un número entero ≥ 3 , n1 - nx son x números enteros ≥ 0 (al menos uno es ≥ 1), MOD₁ - MOD_x don x modificaciones introducidos entre los epítopes de células B preservados, y s₁ - s_x son x números enteros ≥ 0 (al menos uno es ≥ 1 si no se introducen grupos secundarios en las secuencias de amiloide_{ex}). De este modo, dadas las restricciones funcionales generales sobre la inmunogenicidad de las construcciones, la invención permite toda clase de permutaciones de la secuencia original de la APP o A β , y todas las clases de modificaciones en ella. De este modo, se incluyen en la invención APP o A β obtenidas por omisión de partes de la secuencia que por ejemplo muestran efectos adversos *in vivo* u omisión de partes que son normalmente intracelulares y de este modo puede dar lugar a reacciones inmunológicas indeseadas.

Una versión preferida de las construcciones esquematizadas anteriormente son, cuando son aplicables, aquellas en las que el epítipo de las células B que contiene la subsecuencia de una proteína amiloide no se expone extracelularmente en el polipéptido precursor de la que se deriva el amiloide. Realizando tal elección de los epítopes amiloides, se asegura que los anticuerpos no se generan de manera que fueran reactivos con las células que producen el precursor amiloide y por lo tanto la respuesta inmune que se genera se limita a una respuesta inmune contra los depósitos amiloides no deseados. Una selección similar puede, cuando es aplicable, hacerse para otros polipéptidos amiloidogénicos aparte de amiloide. Por ejemplo, en estos casos, será factible inducir inmunidad contra epítopes del polipéptido amiloidogénico que solamente están expuestos a la fase extracelular cuando están libres de cualquier acoplamiento a las células a partir de las que se producen.

El mantenimiento de una fracción sustancial de los epítopes de las células B o incluso la estructura terciaria global de una proteína que se somete a modificación como se describe en esta memoria descriptiva se puede lograr de varias formas. Una es simplemente preparar un antisuero policlonal dirigido contra el polipéptido amiloidogénico (por ejemplo, un antisuero preparado en un conejo) y después de esto usar este antisuero como un reactivo de ensayo (por ejemplo, en un ELISA competitivo) contra las proteínas modificadas que se producen. Las versiones modificadas (análogos) que reaccionan en la misma medida con el antisuero como lo hacen la APP o A β se debe considerar que

tiene la misma estructura terciaria global que la APP o A β mientras que los análogos que muestran una reactividad limitada (pero todavía significativa y específica) con tal antisuero se consideran que tienen mantenida una fracción sustancial de los epítopes de células B.

- 5 Como alternativa, una selección de anticuerpos monoclonales reactivos con distintos epítopes sobre la APP o A β se puede preparar y usar como un panel de ensayo. Este planteamiento tiene la ventaja de permitir 1) un mapeo de los epítopes de la APP o A β y 2) un mapeo de los epítopes que se mantienen en los análogos preparados.

10 Por supuesto, un tercer planteamiento sería resolver la estructura tridimensional de la APP o A β o de un truncamiento biológicamente activo del mismo (véase anteriormente) y comparar ésta con la estructura tridimensional resuelta de los análogos preparados. La estructura tridimensional se puede resolver mediante la ayuda de estudios de difracción de rayos X y espectroscopía de RMN. Información adicional con relación a la estructura terciaria se puede en alguna medida obtener a partir de estudios de difracción de rayos X que tienen la ventaja de requerir solamente el polipéptido en forma pura (mientras que la difracción de rayos X requiere la provisión de polipéptido cristalizado y 15 RMN requiere la provisión de variantes isotópicas del polipéptido) con el fin de proporcionar información útil sobre la estructura terciaria de una molécula dada. Sin embargo, últimamente la difracción de rayos X y/o RMN son necesarias para obtener datos concluyentes ya que el difracción de rayos X solamente puede proporcionar evidencia indirecta de estructura tridimensional correcta mediante la información de elementos de estructura secundaria.

20 Una realización preferida de la invención utiliza presentaciones múltiples de epítopes de linfocitos B de APP o A β (es decir, la fórmula I en la que al menos un epítope de células B está presente en dos posiciones). Este efecto se puede lograr de formas diversas, por ejemplo, simplemente preparando la fusión de polipéptidos que comprende la estructura (polipéptido derivado de APP o A β)_m, en la que m es un número entero ≥ 2 y después introducir las modificaciones descritas en esta memoria descriptiva en al menos una de las secuencias de APP o A β . Se prefiere que 25 las modificaciones introducidas incluyan al menos una duplicación de un epítope de linfocitos B y/o la introducción de un hapteno. Estas realizaciones que incluyen presentaciones múltiples de epítopes seleccionados se prefieren especialmente en situaciones en las que solamente partes secundarias del polipéptido amiloidogénico son útiles como constituyentes en un agente de vacuna.

30 Como se ha mencionado anteriormente, la introducción de un epítope de células T extraño se puede lograr mediante la introducción de al menos una inserción, adición, supresión, o sustitución de aminoácidos. Por supuesto, la situación normal será la introducción de más de un cambio en la secuencia de aminoácidos (por ejemplo, inserción de o sustitución por un epítope de células T) pero el objetivo importante a alcanzar es que el análogo, cuando se procese por una célula presentadora de antígenos (APC), dará lugar a tal epítope de células T extraño inmunodominantes que se presenta en el contexto de una molécula de clase II de MCH sobre la superficie de la APC. De este modo, si la 35 secuencia de aminoácidos del polipéptido amiloidogénico en posiciones apropiadas comprende un número de residuos de aminoácidos que se pueden encontrar en un epítope T_H extraño se puede lograr proporcionando los restantes aminoácidos del epítope extraño por medio de inserción, adición, supresión y sustitución de aminoácidos. En otras palabras, no es necesario introducir un epítope T_H completo mediante inserción o sustitución con el fin de realizar el propósito de la presente invención. 40

Se prefiere que el número de inserciones, supresiones, sustituciones o adiciones de aminoácidos sea al menos 2, tal como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, y 25 inserciones, sustituciones, adiciones o supresiones. Se prefiere además que el número de inserciones, sustituciones, adiciones, o supresiones de aminoácidos no exceda 45 de 150, tal como mucho 100, como mucho 90, como mucho 80, y como mucho 70. Se prefiere especialmente que el número de sustituciones, inserciones, supresiones, o adiciones no exceda de 60, y en particular el número no exceda de 50 o incluso 40. Lo más preferido es un número de no más de 30. Con respecto a las adiciones de aminoácidos, se debe observar que ésta, cuando la construcción resultante está en la forma de un polipéptido de fusión, es a menudo considerablemente mayor que 150. 50

Las realizaciones preferidas de la invención incluyen modificación introduciendo al menos un epítope de células T inmunodominantes extraño. Se entenderá que la cuestión de dominancia inmune de un epítope de células T depende de la especie animal en cuestión. Como se usa en esta memoria descriptiva, el término "inmunodominancia" simplemente se refiere a epítopes que en el individuo/población vacunado o/a da lugar a una respuesta inmune significativa, pero 55 es un hecho bien conocido que un epítope de células T que es inmunodominante en un individuo/población no es necesariamente inmunodominante en otro individuo de la misma especie, incluso aunque pueda ser capaz de unir las moléculas MHC-II en el último individuo. Por lo tanto, para los propósitos de la presente invención, un epítope de células T dominante inmune es un epítope de células T que será eficaz proporcionando ayuda de células T cuando está presente en un antígeno. Típicamente, los epítopes de células T dominantes inmunes tienen como característica inherente que sustancialmente siempre se presentarán unidas a una molécula de clase II de MHC, independientemente del polipéptido en el que aparecen. 60

Otro punto importante es el asunto de restricción de MHC de epítopes de células T. En general, los epítopes de células T de origen natural son MCH restringidos, es decir, ciertos péptidos que constituyen un epítope de células T se unirán eficazmente a un subconjunto de moléculas de clase II de MHC. Esto a su vez tiene el efecto de que en la 65 mayoría de los casos el uso de un epítope de células T específico dará como resultado un componente de vacuna que solamente es eficaz en una fracción de la población, y dependiendo del tamaño de esa fracción, puede ser necesario incluir más epítopes de células T en la misma molécula, o como alternativa preparar una vacuna de componentes

múltiples en la que los componentes son variantes de APP o Aβ que se distinguen entre sí por la naturaleza del epítipo de células T introducido.

Si la restricción de MHC de las células T usadas es completamente desconocida (por ejemplo en una situación en la que el animal vacunado tiene una composición de MHC poco definida), la fracción de la población cubierta por una composición de vacuna específica se puede determinar mediante la siguiente fórmula

$$f_{\text{población}} = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - p_i) \quad (\text{II})$$

en la que p_i es la frecuencia en la población de contestadores al epítipo de células T extraño presentes en la composición de vacuna, y n es el número total de epítopos de células T extraños en la composición de vacuna. De este modo, una composición de vacuna que contiene 3 epítopos de células T extraños que tienen frecuencias de respuesta en la población de 0,8, 0,7, y 0,6 respectivamente, proporcionaría

$$1 - 0,2 \times 0,3 \times 0,4 = 0,976$$

es decir 97,6 por ciento de la población montará estadísticamente una respuesta mediada por MHC-II a la vacuna.

La fórmula anterior no se aplica en situaciones en las que se conoce un patrón de restricción de MHC más o menos preciso de los péptidos usados. Si, por ejemplo, un cierto péptido solamente se une a las moléculas de MHC - II humanas codificadas por alelos de HLA - DR DR1, DR3, DR5, y DR7, después el uso de este péptido junto con otro péptido que une las moléculas de MHC - II restantes codificadas por los alelos HLA - DR realizarán el 100% de cobertura en la población en cuestión. De manera similar, si el segundo péptido solamente une DR3 y DR5, la adición de este péptido no incrementará la cobertura en todos. Si se basa el cálculo de respuesta de población puramente sobre restricción de MHC de epítopos de células T en la vacuna, la fracción de la población cubierta por una composición de vacuna específica se puede determinar mediante la fórmula siguiente:

$$f_{\text{población}} = 1 - \prod_{j=1}^3 (1 - \varphi_j)^2 \quad (\text{III})$$

en la que φ_j es la suma de frecuencias en la población de haplotipos alélicos que codifican las moléculas de MHC que unen cualquiera de los epítopos de las células T en la vacuna y que pertenecen al j° de los 3 loci de HLA (DP, DR y DQ); en la práctica, primero se determina las moléculas que reconocerán cada epítipo de las células T en la vacuna y después de esto se enumeran por tipo (DR, DR y DQ) - después, las frecuencias individuales de los diferentes haplotipos alélicos enumerados se suman para cada tipo, produciendo por lo tanto φ_1 , φ_2 , y φ_3 .

Puede ocurrir que el valor de p_i en la fórmula (II) exceda el valor teórico correspondiente π_i :

$$\pi_i = 1 - \prod_{j=1}^3 (1 - v_j)^2 \quad (\text{IV})$$

en la que v_j es la suma de frecuencias en la población de haplotipo alélico que codifica las moléculas de MHC que unen el i° epítipo de células T en la vacuna y que pertenecen al j° de los 3 loci de HLA (DP, DR y DQ). Esto significa que en $1 - p_i$ de la población es una frecuencia de contestadores de $f_{\text{residual}_i} = (1 - p_i) / (1 - \pi_i)$. Por lo tanto, la fórmula III se puede ajustar de manera que produzca la fórmula V:

$$f_{\text{población}} = 1 - \prod_{j=1}^3 (1 - \varphi_j)^2 + \left(1 - \prod_{j=1}^3 (1 - f_{\text{residual}_j}) \right) \quad (\text{V})$$

en la que el término $1 - f_{\text{residual}_i}$ se fija en cero si es negativo. Se debe observar que la fórmula V requiere que todos los epítopos se hayan mapeado para haplotipos contra conjuntos idénticos de haplotipos.

Por lo tanto, cuando se seleccionan epítopos de células T a introducir en el análogo, es importante incluir todo el conocimiento de los epítopos que sea disponible: 1) la frecuencia de contestadores en la población de cada epítipo, 2) datos de restricción de MHC, y 3) frecuencia en la población de los haplotipos relevantes.

Existe un número de epítopos de células T "promiscuos" de origen natural que son activos en una gran proporción de individuos de una especie animal o una población animal y éstos se introducen preferiblemente en la vacuna reduciendo por lo tanto la necesidad de un número muy grande de análogos diferentes en la misma vacuna.

El epítipo promiscuo puede de acuerdo con la invención ser un epítipo de células T humano de origen natural tal como epítopos de toxoide de tétanos (por ejemplo, los epítopos P2 y P30), toxoide de difteria, hemaglutinina de virus de influenza (HA), y antígeno CS de *P. falciparum*.

Con los años, se han identificado un número de otros epítopos de células T promiscuos. Especialmente péptidos capaces de unir una gran proporción de moléculas de HLA - DR codificadas por los alelos diferentes HLA - DR se han identificado y éstos son todos los epítopos de células T posibles a introducir en los análogos usados de acuerdo con la presente invención. Véanse también los epítopos descritos en las siguientes referencias: documento WO 98/23635 (Frazer IH y col., de cesión común a la Universidad de Queensland); Southwood S y col., 1998, J. Immunol. 160: 3363 - 3373; Sinigaglia F y col., 1988, Nature 336: 778 - 780; Chicz RM y col., 1993, J. Exp. Med 178: 27 - 47; Hammer J y col., 1993, Cell 74: 197 - 203; y Falk K y col., 1994, Immunogenetics 39: 239 - 242. La última referencia también se refiere a ligandos de HLA - DQ y DP. Todos los epítopos enumerados en estas 5 referencias son relevantes como epítopos naturales candidatos a usar en la presente invención, como son epítopos que comparten motivos comunes con éstos.

Como alternativa, el epítipo puede ser un epítipo de células T que es capaz de unir una gran proporción de moléculas de clase II de MHC. En este contexto los péptidos de epítopos DR pan ("PADRE") descritos en el documento WO 95/07707 y en el artículo correspondiente de Alexander J y col., 1994, Immunity 1: 751 - 761 son candidatos interesantes para epítopos a usar de acuerdo con la presente invención. Se debe observar que los péptidos PADRE más eficaces descritos en estos artículos llevan aminoácidos D en los extremos C y N con el fin de mejorar la estabilidad cuando se administran. Sin embargo, la presente invención principalmente ayuda a la incorporación de los epítopos relevantes como parte del polipéptido amiloidogénico que después de deben descomponer enzimáticamente en el interior del compartimiento lisosomal de los APCs para permitir la presentación posterior en el contexto de una molécula de MHC - II y por lo tanto no es conveniente incorporar aminoácidos D en los epítopos usados en la presente invención.

Un péptido PADRE especialmente preferido es el que tiene la secuencia de aminoácidos AKFVAAWTLKAAA [SEQ ID NO: 17] o una subsecuencia inmunológicamente eficaz de la misma. Éste, y otros epítopos que tienen la misma falta de restricción de MHC son epítopos de células T preferidos que deberían estar presente en los análogos usados en el procedimiento de la invención. Tales epítopos super promiscuos permitirán las realizaciones más sencillas de la invención en las que solamente un único polipéptido amiloidogénico modificado se presenta al sistema inmune de animal vacunado.

Como se ha mencionado anteriormente, la modificación del polipéptido amiloidogénico también puede incluir la introducción de un primer resto que dirige el polipéptido amiloidogénico modificado a una APC o un linfocito B. Por ejemplo, el primer resto puede ser un agente de unión específica para un antígeno de superficie específico de APC. Muchos de tales antígenos de superficie específico se conocen en la técnica. Por ejemplo, el resto puede ser un carbohidrato para el que existe un receptor del linfocito B o la APC (por ejemplo, manan o manosa). Como alternativa, el segundo resto puede ser un hapteno. También se puede usar un fragmento de anticuerpo que reconoce específicamente una molécula de superficie sobre las APC o linfocitos como un primer resto (la molécula de superficie puede por ejemplo ser un receptor FC γ de macrófagos y monocitos, tales como FC γ RII, como alternativa cualquier otro marcador específico de superficie tal como CD40 o CTLA-4). Se debe observar que todas estas moléculas de dirección ejemplar se pueden usar como parte de un adyuvante también, véase más adelante.

Como alternativa o suplemento a la dirección del polipéptido amiloidogénico modificado a un cierto tipo de célula con el fin de lograr una respuesta inmune potenciada, es posible incrementar el nivel de sensibilidad del sistema inmune incluyendo el segundo resto anteriormente mencionado que estimula el sistema inmune. Los ejemplos típicos de tales segundos restos son citoquinas, y proteínas de choque térmico o chaperonas moleculares, así como partes eficaces de las mismas.

Las citoquinas adecuadas a usar de acuerdo con la invención son aquellas que normalmente también funcionan como adyuvantes en una composición de vacuna, es decir, por ejemplo, interferón γ (IFN- γ), interleuquina 1 (IL - 1), interleuquina 2 (IL - 2), interleuquina 4 (IL - 4), interleuquina 6 (IL - 6), interleuquina 12 (IL - 12), interleuquina 13 (IL - 13), interleuquina 15 (IL - 15), y factor estimulante de colonia de granulocitos - macrófagos (GM - CSF); como alternativa, la parte funcional de la molécula de citoquinas puede ser suficiente como el segundo resto. Con respecto al uso de tales citoquinas como sustancias adyuvantes, véase, la descripción más adelante.

De acuerdo con la invención, las proteínas de choque térmico adecuadas o chaperonas usadas como el segundo resto pueden ser HSP70, HSP90, HSC70, GRP94 (también conocida como gp96, véase Wearsch, PA y col., 1998, Biochemistry 37: 5709 - 19), y CRT (calreticuina).

Como alternativa, el segundo resto puede ser una toxina, tal como listeriolicina (LLO), lípido A y enterotoxina lábil al calor. También, un número de derivados micobacterianos tales como MDP (muramil dipéptido), CFA (adyuvante de Freund completo) y los diésteres de trehalosa TDM y TDE son posibilidades interesantes.

También la posibilidad de introducir un tercer resto que potencia la presentación del polipéptido amiloidogénico modificado al sistema inmune es una realización importante de la invención. La técnica ha mostrado varios ejemplos

de este principio. Por ejemplo, se sabe que el anclaje de lipidación de palmitoílo en la proteína de *Borrelia burgdorferi* OspA se puede utilizar para proporcionar polipéptidos auto - adyuvantes (véase, por ejemplo, el documento WO 96/40718) parece que las proteínas lipidadas forman estructuras de tipo micela con un núcleo que consta de las partes de anclaje de lipidación de los polipéptidos y las partes restantes de la molécula saliente de los mismos, dando como resultado múltiples presentaciones de los determinantes antigénicos. Por lo tanto, el uso de éste y planteamientos relacionados que usan anclajes de lipidación diferentes (por ejemplo, un grupo miristilo, un grupo miristilo, un grupo farnesilo, un grupo geranilo - geranilo, un anclaje de GPI, y un grupo N-acil diglicérido) son realizaciones preferidas de la invención, ya que especialmente la provisión de tal anclaje de lipidación en una proteína producida recombinantemente es justamente sencilla y solamente requiere el uso de por ejemplo, una secuencia de señal de origen natural como un agente de fusión para el polipéptido amiloidogénico modificado. Otra posibilidad es el uso del fragmento C3d de factor C3 complementario o el propio Ce (véase Dempsey y col., 1996, Science 271, 348 - 350 y Lou y Kohler, 1998, Nature Biotechnology 16, 458 - 462).

Una realización alternativa de la invención que también da como resultado la presentación preferida de copias múltiples (por ejemplo al menos 2) de las regiones epitópicas importantes del polipéptido amiloidogénico al sistema inmune es el acoplamiento covalente del v, subsecuencia o variantes del mismo a ciertas moléculas. Por ejemplo, se pueden usar polímeros, por ejemplo, carbohidratos tales como dextrano, véase, por ejemplo, Lees A y col., 1994, Vaccine 12: 1160 - 1166; Lees A y col., 1990, J. Immunol. 145: 3594 - 3600, pero también manosa y manan son alternativas útiles. Las proteínas de membrana integral de por ejemplo *E. coli*. y otras bacterias son también útiles agentes de conjugación. Las moléculas vehículo tradicionales tales como hemocianina de lapa de ojo de cerradura (KLH), toxoide de tétanos, toxoide de difteria, y albúmina sérica bovina (BSA) también se prefieren y son útiles agentes de conjugación.

Las realizaciones preferidas de acoplamiento de acoplamiento covalente del material derivado de APP o A β a polihidroxipolímeros tal como carbohidratos implican el uso de al menos un péptido derivado de APP o A β y al menos un epítipo auxiliar T extraño que se acoplan de manera separada al polihidroxipolímero (es decir, el epítipo auxiliar T extraño y la secuencia de aminoácidos derivada de APP o A β no está condensados entre sí sino mejor unido al polihidroxipolímero que después sirve como una estructura central del vehículo). De nuevo, tal realización es la más preferida cuando el epítipo de células C que lleva las regiones de los péptidos derivados de la APP o A β están constituidas por tramos cortos de péptidos - esto es porque este planteamiento es una forma muy conveniente de lograr presentaciones múltiples de epítopos seleccionados en el agente inmunógeno resultante. Sin embargo, también es posible simplificar los análogos acoplados ya descritos en esta memoria descriptiva a la estructura central del polihidroxipolímero, es decir, que el material derivado de la APP o A β no está unido a la estructura central de manera separada de los epítopos T_H.

Se prefiere especialmente que el acoplamiento del epítipo auxiliar T extraño y el (poli) péptido derivado de APP o A β es por medio de un enlace amida que se puede escindir mediante una peptidasa. Esta estrategia tiene el efecto que APC será capaz de recoger el conjugado y al mismo tiempo será capaz de procesar el conjugado y posteriormente presentar el epítipo de células T en un contexto de clase II de MHC.

Una forma de lograr el acoplamiento de péptidos (tanto el péptido derivado de APP o A β de interés como el epítipo extraño) es activar un polihidroxipolímero adecuado con grupos tresil (trifluoroetilsulfonilo) u otros grupos de activación adecuados tales como maleimido, cloroformiato de p-nitrofenilo (para activación de grupos OH y formación de un enlace de péptidos entre péptido y polihidroxipolímero), y tosil (p-toluensulfonilo). Por ejemplo, es posible preparar polisacáridos activados como se describe en el documento WO 00/05316 y US 5.874.469 y acoplar éstos a péptidos derivados de APP o A β o poliaminoácidos así como a epítopos de células T preparados mediante técnicas de síntesis de péptidos de fase sólida o líquida convencionales. El producto resultante consta de una estructura central de polihidroxipolímero (por ejemplo, una estructura central de dextrano) que tiene, unido a él mediante su extremo C o mediante otros restos de nitrógeno disponibles, poliaminoácidos derivados de APP o A β y de epítopos de células T extraños. Si se desea, es posible sintetizar los péptidos de APP o A β de manera que protejan todos los grupos amino excepto el que está en el extremo N, posteriormente se acoplan a los péptidos protegidos resultantes al resto de dextrano trefilado, y finalmente desproteger el conjugado resultante. Un ejemplo específico de este planteamiento se describe en los ejemplos más adelante.

En lugar de usar las moléculas de polisacáridos solubles en agua como se indica en los documentos WO 00/05316 y US 5.874.469, es posible igualmente utilizar moléculas de polisacáridos reticuladas, por lo tanto obteniendo un conjugado de partículas entre polipéptidos y polisacáridos - esto se cree que conduce a una presentación mejorada para el sistema inmune del polipéptido, ya que se alcanzan los objetivos, a saber obtener un efecto de depósito local cuando se inyecta el conjugado y para obtener partículas que son dianas atractivas para las APC. El planteamiento de uso de tales sistemas de partículas también se detalla en los ejemplos.

Las consideraciones que son la base de áreas elegidas de introducción de modificaciones en APP o A β son a) preservación de epítopos de células T conocidos y predichos, b) preservación reestructura terciaria, c) anulación de epítopos de células B presentes en las "células productoras" etc. De cualquier forma, como se ha descrito anteriormente, es medianamente fácil seleccionar un conjunto de moléculas amiloidogénicas modificadas que se han sometido todas a la introducción de un epítipo de células T en diferentes localizaciones.

Ya que las realizaciones más preferidas de la presente invención implican la regulación hacia debajo de A β humano, se prefiere por lo tanto que el polipéptido de APP o A β descrito anteriormente sea un polipéptido de A β humano. En esta realización, se prefiere especialmente que el polipéptido de APP o A β se haya modificado sustituyendo al menos una secuencia de aminoácidos en la SEQ ID N°: 2 con al menos una secuencia de aminoácidos de longitud igual o diferente y que contiene un epítipo T_H extraño. Los ejemplos de APP y A β amiloidogénicas modificadas se muestran esquemáticamente en la figura 1 que usa los epítopes P2 y P30 como ejemplos. La razón fundamental de tales construcciones se describe en detalle en el ejemplo.

Más específicamente, un T_H que contiene (o que completa) la secuencia de aminoácidos que se introduce en la SEQ ID N°: 2 se puede introducir en cualquier aminoácido en la SEQ ID N°: 2. Es decir, la introducción es posible después de cualesquiera aminoácidos 1 - 770, pero preferiblemente después de cualesquiera aminoácidos 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, y 714 en la SEQ ID N°: 2. Esto se puede combinar con la supresión de cualesquiera o todos los aminoácidos 1 - 671, o cualesquiera o todos los aminoácidos 715 - 770. Además, cuando se utiliza la técnica de sustitución, cualesquiera de los aminoácidos 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, y 714 en la SEQ ID N°: 2 se puede suprimir en combinación con la introducción.

De acuerdo con la invención, los análogos no incluyen ninguna subsecuencia de la SEQ ID N°: 2 que se une de manera productiva a las moléculas de clase II de MHC que comienzan una respuesta de células T.

La razón fundamental de tal estrategia para el diseño del inmonógeno que se acopla al sistema inmune para inducir por ejemplo una respuesta inmune anti - A β es la siguiente: se ha observado que cuando la inmunización con proteínas antológicas abundantes tales como A β formulada en un adyuvante que es suficientemente fuerte para romper la tolerancia del cuerpo hacia la proteína antológica, existe un peligro de que en algunos individuos vacunados la respuesta inmune inducida no se pueda discontinuar simplemente discontinuando la inmunización. Esto se debe a que la respuesta inmune en tales individuos está lo más probablemente dirigida por un epítipo T_H nativo de la proteína antológica, y esto tiene el efecto adverso de que la propia proteína de los individuos vacunados serán capaces de funcionar como un agente inmunizante en sí mismo: de este modo se ha establecido una condición autoinmune.

El uso de los epítopes T_H extraños tienen el mejor conocimiento de los inventores nunca se ha observado que produce este efecto, debido a que la respuesta autoinmune se dirige por un epítipo T_H extraño, y se ha demostrado repetidamente por los inventores que la respuesta inmune inducida invocada por la tecnología preferida de hecho disminuye después de la discontinuación de las inmunizaciones. Sin embargo, en teoría puede suceder en unos pocos individuos que la respuesta inmune estuviera también dirigida por un epítipo T_H autólogo de la autoproteína relevante que inmuniza contra) - esto es especialmente relevante cuando se considera que las auto - proteínas son relativamente abundantes, tal como A β , mientras que otras auto - proteínas terapéuticamente relevantes solamente están presentes localmente o en cantidades así de bajas en el cuerpo, ese "efecto de auto - inmunización" no es una posibilidad. Una forma muy sencilla de evitar esto es por lo tanto evitar la inclusión en el inmonógeno de secuencias de péptidos que podrían servir como epítopes T_H (y ya que los péptidos más cortos que aproximadamente 9 aminoácidos no pueden servir como epítopes T_H, el uso de fragmentos más cortos es un planteamiento simple y factible). Por lo tanto, esta realización de la invención también sirve para asegurar que el inmonógeno no incluye las secuencias de péptidos de APP o A β dianas que podrían servir como "epítopes T_H autoestimulantes" que incluyen secuencias que solamente contienen sustituciones conservadoras en una secuencia de la proteína diana que pudiera de otra manera funcionar como un epítipo T_H.

Las realizaciones preferidas de la presentación del sistema inmune de los análogos de la APP o A β implican el uso de un péptido quimérico que comprende al menos un péptido derivado de APP o A β , que no se une de manera productiva a las moléculas de clase II de MHC, y al menos un epítipo auxiliar T extraño. Es especialmente ventajoso si el análogo inmonógeno es uno, en el que la secuencia de aminoácidos que comprende uno o más epítopes de células B se representan o bien como una secuencia continua o como una secuencia que incluye inserciones, en los que las inserciones comprenden epítopes auxiliares T extraños.

De nuevo, tal realización es la más preferida cuando el epítipo de células B adecuado que lleva regiones de la APP o A β están constituidas por tramos cortos de péptidos que no serían capaces de unirse de manera productiva a una molécula de clase II de MHC. El epítipo o epítopes de células B seleccionados del polipéptido amiloidogénico debe comprender por lo tanto como mucho 9 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID N°: 2. Se prefieren péptidos más cortos, tales como los que tienen como mucho 8, 7, 6, 5, 4, ó 3 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos del polipéptido amiloidogénico.

Se prefiere que el análogo comprenda al menos una subsecuencia de la SEQ ID N°: 2 de manera que cada una de tal al menos una subsecuencia independientemente consta de tramos de aminoácidos de la APP o A β seleccionada entre el grupo constituido por 9 aminoácidos consecutivos, 8 aminoácidos consecutivos, 7 aminoácidos consecutivos, 6 aminoácidos consecutivos, 5 aminoácidos consecutivos, 4 aminoácidos consecutivos, y 3 aminoácidos consecutivos.

Se prefiere especialmente que los aminoácidos consecutivos comiencen en el residuo de un aminoácido seleccionado entre el grupo constituido por 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687,

688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, y 714 en la SEQ ID N°: 2.

Vacunación de proteína/péptido; formulación y administración de los análogos

5

Quando se efectúa la presentación del polipéptido amiloidogénico o el v modificado a un sistema inmune de animales por medio de la administración del mismo al animal, la formulación del polipéptido sigue los principios generalmente reconocidos en la técnica.

10

La preparación de vacunas que contienen secuencias de péptidos como ingredientes activos se entiende bien generalmente en la técnica, como se ejemplifica por las patentes de Estados Unidos 4.608.251; 4.601.903; 4.599.231; 4.599.230; 4.596.792; y 4.578.770, todas incorporadas en esta memoria descriptiva como referencia. Típicamente, tales vacunas se preparan como inyectables o bien como soluciones o suspensiones líquidas; también se pueden preparar formas adecuadas sólidas para solución en, o suspensión en, líquido antes de inyección. La preparación también puede estar emulsionada. El ingrediente inmunógeno activo a menudo se mezcla con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo. Tales excipientes son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol, o similares, y las combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la vacuna puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes de tamponación de pH, o adyuvantes que potencian la eficacia de las vacunas, véase la descripción detallada de adyuvantes más adelante.

15

20

Las vacunas se administran convencionalmente por vía parenteral, por inyección, por ejemplo, o bien por vía subcutánea, por vía intracutánea, por vía intradérmica, por vía subdérmica o por vía intramuscular. Las formulaciones adicionales que son adecuadas para otros modos de administración incluyen supositorios y, en algunos casos, formulaciones orales, bucales, sublinguales, intraperitoneales, intravaginales, anales, epidurales, espinales, e intracraneales. Para supositorios, los ligantes y vehículos tradicionales pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; tales supositorios se pueden formar a partir de mezclas que contienen el ingrediente activo en el intervalo de 0,5% a 10%, preferiblemente 1 - 2%. Las formulaciones orales incluyen tales excipientes normalmente empleados como, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, y similares. 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%. Para las formulaciones orales, la toxina de cólera es un agente de formulación interesante (y también un posible agente de conjugación).

25

30

35

Los polipéptidos se pueden formular en la vacuna como formas neutras o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres del péptido) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también se pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, o férrico, y tales bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, y similares.

40

45

Las vacunas se administran de una manera compatible con la formulación de dosificación, y de tal manera como será terapéuticamente eficaz e inmunogénica. La cantidad a administrar depende del sujeto a tratar, incluyendo, por ejemplo, la capacidad del sistema inmune del individuo para montar una respuesta inmune, y el grado de protección deseado. Los intervalos de dosificación adecuados son del orden varios cientos de microgramos de ingrediente activo por vacunación con un intervalo preferido de entre 0,1 μ g a 2.000 μ g (incluso no obstante se contemplan cantidades mayores en el intervalo 1 - 10 mg), tales como en el intervalo de entre aproximadamente 0,5 μ g y 1000 μ g, preferiblemente en el intervalo de entre 1 μ g y 500 y especialmente en el intervalo de entre aproximadamente 10 μ g y 100 μ g. Los regímenes adecuados para la administración adicional e inyecciones de dosis de recuerdo están también disponibles pero de tipifican mediante la administración inicial seguida de inoculaciones posteriores u otras administraciones.

50

55

La manera de aplicación puede variar ampliamente. Cualquiera de los procedimientos convencionales para la administración de una vacuna son aplicables. Éstos incluyen aplicación oral sobre una base sólida fisiológicamente aceptable o en una dispersión fisiológicamente aceptable, por vía parenteral, por inyección o similares. La dosificación de la vacuna dependerá de la vía de administración y variará de acuerdo con la edad de la persona a vacunar y la formulación del antígeno.

60

Algunos de los polipéptidos de la vacuna son suficientemente inmunógenos en una vacuna, pero para alguno de los otros la respuesta inmune se potenciará si la vacuna además comprende una sustancia adyuvante.

65

Se conocen diversos procedimientos de lograr efecto adyuvante para la vacuna. Los principios y procedimientos generales se detallan en "The Theory and Practical Application of Adjuvants", 1995, Duncan E. S. Stewart - Tull (ed.), John Wiley & sons Ltd, ISBN 0 - 471 - 95170 - 6, y también en "Vaccines: New Generation Immunological Adjuvants", 1995, Gregoriadis G y col., (eds), Plenum Press, Nueva York, ISBN 0 - 306 - 45283 - 9.

Se prefiere especialmente usar un adyuvante que se pueda demostrar que facilita la rotura de la autotolerancia a autoantígenos; de hecho, es esencial en los casos en los que se usa el polipéptido amiloidogénico no modificado

como el ingrediente activo en la autovacuna. Los ejemplos no limitantes de adyuvantes adecuados se seleccionan entre el grupo constituido por adyuvante de dirección inmune; un adyuvante modulador inmune tal como una toxina, y un derivado micobacteriano; una formulación oleosa; una matriz de complejo inmunoestimulante (matriz ISCOM); una partícula; DDA; adyuvantes de aluminio; adyuvantes de ADN; γ -inulina; y un adyuvante de encapsulación. En general se debe observar que las descripciones anteriores que se refieren a los compuestos y agentes útiles como primer, segundo y tercer restos en los análogos también se refieren *mutatis mutandi* a su uso en el adyuvante de una vacuna de la invención.

La aplicación de adyuvantes incluyen el uso de agentes tales como hidróxido o fosfato de aluminio (alum), usado comúnmente como solución al 0,05 a 0,1 por ciento en solución salina tamponada, mezcal con polímeros sintéticos de azúcares (por ejemplo Carbopol®) usado como solución al 0,25 por ciento, agregación de la proteína en la vacuna mediante tratamiento por calor con temperaturas que varían entre 70°C y 101°C durante períodos de 30 segundos a 2 minutos respectivamente y también son posibles agregación por medio de agentes de reticulación. La agregación mediante reactivación con anticuerpos tratados con pepsina (fragmentos Fab) a albúmina, mezcla con células bacterianas tales como *C. parvum* o endotoxinas o componentes de lipopolisacáridos de bacterias gram - negativas, también se pueden usar emulsión en vehículos oleosos fisiológicamente aceptables tal como monooleato de manida (Aracel A) o emulsión con solución al 20 por ciento de un perfluorocarbono (Fluosol - DA) usado como sustituto de bloque. También se prefiere la mezcla con aceites tales como escualeno e IFA.

De acuerdo con la invención el DDA (bromuro de dimetildiocetadecilamonio) es un candidato interesante para un adyuvante como es ADN y γ -inulina, pero también adyuvantes completo e incompleto de Freund así como saponinas de *quillaja* tal como QuilA y QS21 son interesantes como RIBI. Las posibilidades adicionales son monofosforil lípido A (MPL), los anteriormente mencionados C3 y C3d, muramil dipéptido (MDP).

Las formulaciones de liposomas también se sabe que confieren efectos adyuvantes, y por lo tanto se prefieren adyuvantes de liposomas de acuerdo con la invención.

También los adyuvantes de tipo de matriz de complejo inmunoestimulante (matriz ISCOM®) son elecciones preferidas de acuerdo con la invención, especialmente ya que se ha mostrado que este tipo de adyuvantes son capaces de regular hacia arriba la expresión de clase II de MHC por APCs. La matriz ISCOM® consta de (fraccionada opcionalmente) saponinas (triterpenoides) de *Quillaja saponaria*, colesterol, y fosfolípido. Cuando se mezcla con la proteína inmunogénica, la formulación particulada resultante es la que se conoce como una partícula de ISCOM donde la saponina construye 60 - 70% p/p, el colesterol y fosfolípido 10 - 15% p/p, y la proteína 10 - 15% p/p. Los detalles relativos a la composición y uso de complejos inmunoestimulantes se pueden, por ejemplo, encontrar en los libros de texto anteriormente mencionados que tratan de adyuvantes, pero también Morein B y col., 1995, Clin. Immunother. 3: 461 - 475 así como Barr IG y Mitchell GF, 1996, Immunol. and Cell Biol. 74: 8 - 25 proporcionan instrucciones útiles para la preparación de complejos inmunoestimulantes completos.

Otra posibilidad altamente interesante (y así, preferida) de lograr efecto adyuvante es emplear la técnica descrita en Gosselin y col., 1992. En resumen, la presentación de un antígeno relevante tal como un antígeno de la presente invención se puede potenciar conjugando el antígeno de anticuerpos (o fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno) contra los receptores de Fc γ sobre monocitos/macrófagos. Específicamente conjugados entre antígeno y anti-Fc γ RI se han demostrado que potencian la inmunogenicidad para los propósitos de vacunación.

Otras posibilidades implican el uso de las moléculas de dirección y modulación inmune /entre otros citoquinas) mencionadas anteriormente como candidatos para el primer y segundo restos en las versiones modificaciones de polipéptidos amiloidogénicos. A este respecto, también son posibilidades inductores sintéticos de citoquinas como poli I:C.

Los derivados micobacterianos adecuados se seleccionan entre el grupo constituido por muramil dipéptido, adyuvante completo de Freund, RIBI, y un diéster de trehalosa tal como TMD y TDE.

Los adyuvantes de dirección inmunes adecuados se seleccionan entre el grupo constituido por ligando CD40 y anticuerpos CD40 o específicamente fragmentos de unión de los mismos (véase la descripción anterior), manosa, un fragmento Fab, y CTLA-4.

Los adyuvantes poliméricos adecuados se seleccionan entre el grupo constituido por un carbohidrato tal como dextrano, PEG, almidón, manan, y manosa; un polímero plástico tal como; y látex tal como perlas de látex.

Todavía otra forma interesante de modulación de una respuesta inmune es incluir el inmunógeno (opcionalmente junto con adyuvantes y portadores y vehículos farmacéuticamente aceptables) en un "nódulo linfático virtual" (VLN) (un dispositivo patentado médico desarrollado por ImmunoTherapy, Inc., 360 Lexington Avenue, Nueva York, NY 10017 - 6501). El VLN (en un dispositivo tubular delgado) imita la estructura y función de un nódulo linfático. La inserción de un VLN bajo la piel crea un sitio de inflamación estéril con un gran aumento de citoquinas y quimioquinas. Las células T y B así como las APC responden rápidamente a las señales de peligro, se dirigen al sitio inflamado y se acumulan en el interior de la matriz porosa del VLN. Se sabe que la dosis de antígeno necesaria requiere montar una respuesta inmune a un antígeno se reduce cuando se usa el VLN y esa protección inmune conferida por la vacunación usando una inmunización convencional superior usando Ribi como un adyuvante. La tecnología, se describe

entre otros brevemente en Gelber C y col., 1998, "Elicitation of Robust Cellular and Humoral Immune Responses to Small Amounts of Immunogens Using a Novel Medical Device Designated the Virtual Lymph Node", en "From the laboratory to the Clinic, Book of Abstracts, 12 - 15 de octubre de 1998, Seascape Resort, Aptos, California".

La formulación en micropartículas de vacunas se ha mostrado en muchos casos que incrementa la inmunogenicidad de antígenos proteicos y por lo tanto es otra realización preferida de la invención. Las micropartículas están hechas o bien como co - formulaciones de antígeno con un polímero, un lípido, un carbohidrato u otras moléculas adecuadas para fabricar las partículas, o las micropartículas pueden ser partículas homogéneas constituidas solamente por el propio antígeno.

Los ejemplos de micropartículas a base de polímero son partículas a base de PLGA y PVP (Gupta, R. K. y col., 1998) donde el polímero y el antígeno se condensan en una partícula sólida. Las partículas a base de lípidos se pueden fabricar como micelas del lípido (también llamados liposomas) que atrapan el antígeno dentro de la micela (Pietrobon, P. J. 1995). Las partículas a base de carbohidratos se fabrican típicamente de un carbohidrato degradable adecuado tal como almidón o quitosan. El carbohidrato y el antígeno se mezclan y condensan en partículas en un proceso similar al usado para partículas de polímero (Kas, H. S. y col., 1997).

Las partículas constituidas solamente por el antígeno se pueden fabricar mediante diversas técnicas de pulverización y secado por congelación. Especialmente adecuadas para los propósitos de la presente invención es la tecnología de fluido super crítico que se usa para fabricar partículas muy uniformes de tamaño controlado (York, P. 1999 y Shekunov, B. y col., 1999).

Se espera que la vacuna se deba administrar 1 - 6 veces al año, al como 1, 2, 3, 4, 5, 6, ó 6 veces al año a un individuo en necesidad del mismo. Se ha mostrado previamente que la inmunidad de memoria inducida por el uso de las autovacunas preferidas de acuerdo con la invención no es permanente, y por lo tanto el sistema inmune necesita ser periódicamente estimulado con el polipéptido amiloidogénico o polipéptidos amiloidogénicos modificados.

Debido a la variación genética, individuos diferentes pueden reaccionar con respuestas inmunes de intensidad variable al mismo polipéptido. Por lo tanto, la vacuna de acuerdo con la invención puede comprender varios polipéptidos diferentes con el fin de incrementar la respuesta inmune, véase también la descripción anterior referente a la elección de introducciones de epítopes de células TR extraños. La vacuna puede comprender dos o más polipéptidos, donde todos los polipéptidos son como se han definido anteriormente.

La vacuna puede por lo tanto comprender 3 - 20 polipéptidos diferentes modificados o no modificados, tales como 3 - 10 polipéptidos diferentes.

Vacunación por ácidos nucleicos

Como una alternativa a la administración clásica de una vacuna a base de péptidos, la tecnología de vacunación de ácidos nucleicos (también conocida como "inmunización de ácidos nucleicos", "inmunización genética", e "inmunización génica") ofrece un número de características atractivas.

Primero, en contraste con el planteamiento de vacuna tradicional, la vacunación de ácido nucleico no requiere producción a gran escala consumidora de recursos del agente inmunógeno (por ejemplo, en la forma de fermentación a escala industrial de microorganismos que producen polipéptidos amiloidogénicos modificados). Además, no existe necesidad de purificación por dispositivo y esquemas de replegamiento para el inmunógeno. Y finalmente, ya que la vacunación de ácidos nucleicos se basa en el aparato bioquímica del individuo vacunado con el fin de producir el producto de expresión del ácido nucleico introducido, el procedimiento post - traduccional óptimo del producto de expresión se espera que se produzca, esto es especialmente importante en el caso de autovacunación, ya que, como se ha mencionado anteriormente, una fracción significativa de los epítopes de células B originales se debe preservar en la molécula modificada, y ya que los epítopes de células B en principio se pueden constituir por partes de cualquier (bio)molécula (por ejemplo, carbohidrato, lípido, proteína, etc.). Por lo tanto, los patrones de glucosilación y lipidación nativa del inmunógeno puede muy bien ser de importancia para la inmunización global y esto se asegura mejor teniendo el huésped que produce el inmunógeno.

Por lo tanto, un uso preferido de la invención permite la presentación del polipéptido amiloidogénico modificado al sistema inmune introduciendo ácido (s) nucleico (s) que codifica (n) el polipéptido amiloidogénico modificado e las células del animal y obteniendo por lo tanto la expresión *in vivo* por las células de (de los) ácido (s) nucleico (s) introducido (s).

En esta realización, el ácido nucleico introducido es preferiblemente ADN que puede estar en la forma de ADN desnudo, ADN formulado con lípidos cargados o no cargados, ADN formulados en liposomas, ADN incluido en un vector viral, ADN formulado con una proteína o polipéptido que facilita la transfección, ADN formulado con una proteína o polipéptido de dirección, ADN formulado con agentes que precipitan calcio, ADN acoplado a una molécula vehículo inerte, ADN encapsulado en un polímero, por ejemplo, en PLGA (véase, la tecnología de microencapsulación descrita en el documento 98/31398) o en quitina o quitosan, y ADN formulado con un adyuvante. En el contexto se observa que prácticamente todas las consideraciones que pertenecen al uso de adyuvante en la formulación de vacuna tradicional se aplican para la formulación de vacunas de ADN. Por lo tanto, todas las descripciones en esta memoria

descriptiva que se refieren al uso de adyuvantes en el contexto de las vacunas a base de polipéptidos se aplican *mutatis mutandi* a su uso en la tecnología de vacunación de ácidos nucleicos.

Como para las vías de administración y esquemas de administración de las vacunas a base de polipéptido que se han detallado anteriormente, éstas son también aplicables a las vacunas de de ácido nucleico de la invención y todas las descripciones anteriores pertenecen a vías de administración y esquemas de administración para aplicar *mutatis mutandis* a ácidos nucleicos. A esto se debe añadir que las vacunas de ácidos nucleicos se pueden administrar adecuadamente por vía intravenosa y por vía intraarterial. Además, se sabe bien en la técnica que las vacunas de ácido nucleico se pueden administrar mediante el uso de una llamada pistola de genes, y por lo tanto éste y modos equivalentes de administración se consideran como parte de la presente invención. Finalmente, también el uso de un VLN en la administración de ácidos nucleicos se ha reseñado que produce buenos resultados, y por lo tanto este modo particular de administración se prefiere de modo particular.

Además el (los) ácido (s) nucleico (s) usado (s) como agente de inmunización pueden contener regiones que codifican el 1º, 2º y/o 3º resto, por ejemplo, en la forma de sustancias inmunomoduladoras descritas anteriormente tales como las citoquinas descritas como adyuvantes útiles. Una versión preferida se esta realización comprende el tener al región codificadora para el análogo y al región codificadora para el inmunomodulador en diferentes marcos de lectura o al menos bajo el control de promotores diferentes. Por lo tanto se evita que el análogo o epítipo se produzca como un agente de fusión para el modulador. Como alternativa, se pueden usar dos fragmentos de nucleótidos distintos, pero éste se prefiere menos debido a la ventaja de asegurar la co - expresión cuando tienen ambas regiones codificadoras incluidas en la misma molécula.

De acuerdo con lo anterior, la invención se refiere a una composición para inducir la producción de anticuerpos contra APP o Aβ, comprendiendo al composición

- un fragmento de ácido nucleico o un vector de la invención (véase la descripción de vectores más adelante), y
- un vehículo farmacéutica e inmunológicamente aceptable y/o vehículo y/o adyuvante como se ha descrito anteriormente.

En circunstancias normales, el ácido nucleico que codifica variantes en la forma de un vector en el que la expresión está bajo el control de un promotor viral. Para descripciones más detalladas de vectores de acuerdo con la invención, véase, la descripción más adelante. También, descripciones detalladas con relación a la formulación y uso de vacunas de ácido nucleico están disponibles, véase Donnelly JJ y col., 1997, Annu. Rev. Immunol. 15: 617 - 648 y Donnelly JJ y col., 1997, Life Sciences 60: 163 - 172.

Vacunas vivas

Una tercera alternativa para efectuar la presentación del polipéptido amiloidogénico modificado al sistema inmune es el uso de tecnología de vacuna viva. En la vacunación viva, la presentación al sistema inmune se efectúa mediante la administración, al animal, de un microorganismo no patogénico que se ha transformado con un fragmento de ácido nucleico que codifica un polipéptido amiloidogénico modificado o con un vector que incorpora tal fragmento de ácido nucleico. El fragmento no patogénico puede ser cualquier cepa bacteriana atenuada adecuada (atenuada por medio de subcultivo o por medio de la eliminación de productos de expresión patogénica mediante tecnología de ADN recombinante), por ejemplo, *Mycobacterium bovis* BCG., *Streptococcus spp.* no patogénico., *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Vibrio cholerae*, *Shigella*, etc. Las revisiones con relación a la preparación de vacunas vivas establecidas en la técnica se pueden, por ejemplo, encontrar en Saliou P, 1995, Rev. Prat. 45: 1492 - 1496 y Walter PD, 1992, Vaccine 10: 977 - 990. Para detalles acerca de los fragmentos de ácidos nucleicos y vectores usados en tales vacunas vivas, véase la descripción más adelante.

Como una alternativa a las vacunas vivas bacterianas, el fragmento de ácido nucleico de la invención descrita más adelante se pueden un vector de vacuna viral no virulento tal como una cepa de vaccinia o cualquier otro pox virus adecuado.

Normalmente, el microorganismo o virus no patogénico, se administra solamente una vez al animal, pero en ciertos casos, puede ser necesario administrar el microorganismo más de una vez en toda la vida con el fin de mantener inmunidad protectora. Incluso se contempla que los esquemas de inmunización como los detallados anteriormente para la vacunación de polipéptidos será útil cuando se usan vacunas de virus o vivas.

Como alternativa, la vacunación viva o de virus se vacuna con la vacunación previa o posterior de polipéptidos y/o ácidos nucleicos. Por ejemplo, es posible efectuar inmunización primaria con una vacuna viva o de virus seguida de inmunizaciones de recuerdo posteriores usando el planteamiento de polipéptidos o de ácidos nucleicos.

El microorganismo o virus se puede transformar con ácido (s) nucleicos (s) que contienen regiones que codifican el 1º, 2º y/o 3º restos, por ejemplo, en la forma de las sustancias inmunomoduladoras descritas anteriormente tales como las citoquinas descritas como adyuvantes útiles. Una versión preferida de esta realización abarca el tener la región codificadora para el análogo y la región codificadora para el inmunomodulador en diferentes fases de lectura o

al menos bajo el control de diferentes promotores. Por lo tanto se evita que el análogo o epítopes se produzcan como agentes de fusión al inmunomodulador. Como alternativa, se pueden usar dos fragmentos de nucleótidos distintos como agentes de transformación. De hecho, el tener el 1° y/o 2° y/o 3° restos en la misma fase de lectura puede proporcionar como tal producto de expresión, un análogo de la invención, y tal realización se prefiere especialmente de acuerdo con la presente invención.

Uso de la invención en tratamiento de enfermedades

Como se apreciará a partir de la descripción anterior, la provisión de la invención permite el control de las enfermedades caracterizadas por depósitos amiloides. En este contexto, la AD es la diana clave para el procedimiento de la invención pero también otras enfermedades caracterizadas por depósitos amiloides son posibles dianas. Por lo tanto, una diana importante para la invención es tratar y/o prevenir y/o mejorar la AD u otras enfermedades caracterizadas por deposición de amiloides, que comprende la regulación hacia debajo de APP o A β a tal grado que la cantidad de amiloide disminuye significativamente.

Se prefiere especialmente que la reducción en amiloide de cómo resultado una inversión del equilibrio entre formación amiloide y degradación/eliminación amiloide, es decir, que la velocidad de degradación/eliminación de amiloide lleve a exceder la velocidad de formación de amiloide. Controlando cuidadosamente el número e impacto inmunológico de inmunizaciones del individuo en necesidad de las mismas y será posible obtener un equilibrio con el tiempo que da como resultado una reducción neta de depósitos de amiloide sin tener excesivos efectos adversos.

Como alternativa, si en un individuo no es posible eliminar o reducir la existencia de depósitos de amiloide la invención permite una reducción clínicamente significativa en la formación de nuevo amiloide, por lo tanto prolongando significativamente el tiempo donde la afección patológica no es debilitante. Debe ser posible controlar la velocidad de depósito de amiloide o bien midiendo la concentración en suero de amiloide (que se cree que está en equilibrio con el material depositado), o usando barrido por tomografía de emisión de positrones (PET), véase Small GW, y col., 1996, Ann N Y Acad Sci 802: 70 - 78.

Otras enfermedades y afecciones en las que los medios y usos actuales se pueden usar en el tratamiento o mejoría de una forma análoga se han mencionado anteriormente en los "antecedentes de la invención" (amiloidosis sistémica, diabetes de comienzo en la madurez, enfermedad de parkinson, enfermedad de Huntington, demencia frontotemporal y las encefalopatías espongiiformes transmisibles relacionadas con priones) o se enumeran más adelante en la sección de encabezamiento "otras enfermedades causadas por amiloides y proteínas asociadas a ellas".

Péptidos, polipéptidos, y composiciones de la invención

Como será evidente a partir de lo anterior, la presente invención se basa en el concepto de inmunizar individuos contra el antígeno amiloidogénico con el fin de obtener una cantidad reducida de depósitos de de amiloides relacionados con la patología. La forma preferida de obtener tal inmunización es usar versiones modificadas del polipéptido amiloidogénico, proporcionando por lo tanto moléculas que no se han descrito previamente en la técnica.

Se cree que los análogos descritos en esta memoria descriptiva son inventivas por derecho propio, y por lo tanto una parte importante de la invención pertenece a un análogo como se ha descrito anteriormente. Por lo tanto, cualquier descripción presentada en esta memoria descriptiva que pertenece a APP o A β modificadas son relevantes para los propósitos de descripción de análogos amiloidogénicos de la invención, y cualquiera de tales descripciones se aplica *mutatis mutandi* a la descripción de estos análogos.

Se debe observar que las moléculas amiloidogénicas modificadas comprenden modificaciones que dan como resultado un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos 70% con una proteína amiloidogénica o con una subsecuencia de la misma de al menos 10 aminoácidos de longitud. Se prefieren identidades de secuencia mayores, por ejemplo, al menos 75% o incluso al menos 80, 85, 90, o 95%. La identidad de secuencia para proteínas y ácidos nucleicos se pueden calcular como $N_{\text{ref}} - N_{\text{dif}} \cdot 100 / N_{\text{ref}}$, en la que N_{dif} es el número total de residuos no idénticos en las dos secuencias cuando están alineadas y en la que N_{ref} es el número de residuos en una de las secuencias. Por lo tanto, la secuencia de ADN AGTCAGTC tendrá una identidad de secuencia de 75% con la secuencia AATCAATC ($N_{\text{dif}} = 2$ y $N_{\text{ref}} = 8$).

La invención también pertenece a composiciones útiles en ejercitar el procedimiento de la invención. Por lo tanto la invención se refiere a una composición inmunogénica que comprende una cantidad inmunológicamente eficaz de un análogo como se ha descrito anteriormente, dicha composición comprende adicionalmente un diluyente y/o vehículo y/o excipiente farmacéutica e inmunológicamente aceptable y opcionalmente un adyuvante. En otras palabras, esta parte de la invención se refiere a formulaciones de polipéptido amiloidogénico modificado, esencialmente como se ha descrito anteriormente. La elección de adyuvantes, portadores y vehículos, está de acuerdo con la línea que se ha descrito anteriormente cuando se menciona la formulación de polipéptido amiloidogénico modificado y no modificado para uso en el procedimiento de la invención para la regulación hacia debajo de APP o A β .

Los polipéptidos se preparan de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica. Los polipéptidos más largos se preparan normalmente por medio de la tecnología génica recombinante que incluye la introducción de una secuencia de ácido nucleico que codifica el análogo en un vector adecuado, transformación de una célula hospedadora

adecuada con el vector, expresión por la célula hospedadora de la secuencia de ácido nucleico, recuperación del producto de expresión de las células hospedadoras o su sobrenadante en cultivo, y posterior purificación y modificación adicional opcional, por ejemplo, repliegamiento o derivatización.

- 5 Se preparan preferiblemente péptidos más cortos por medio de técnicas bien conocidas de síntesis de péptidos en fase líquida. Sin embargo, recientes avances en esta tecnología han hecho posible la producción de polipéptidos de longitud completa y proteínas por estos medios, y por lo tanto está también dentro del alcance de la presente invención para preparar las construcciones largas por medios sintéticos.

10 *Fragmentos de ácidos nucleicos y vectores de la invención*

- Se apreciará a partir de la descripción anterior que los polipéptidos amiloidogénicos modificados se pueden preparar mediante tecnología génica recombinante pero también por medio de síntesis o semisíntesis química; las últimas dos opciones son especialmente relevantes cuando la modificación consiste en acoplamiento a moléculas no proteí-
15 náceas tales como polímeros de carbohidrato y de hecho también cuando la modificación comprende la adición de cadenas laterales o grupos laterales a una cadena de péptidos derivada de APP o A β .

- Para el propósito de tecnología génica recombinante, y de hecho también para el propósito de inmunización de ácido nucleico, los fragmentos de ácido nucleico que codifican polipéptido amiloidogénico modificado son productos químicos importantes. Por lo tanto, una parte importante de la invención pertenece a un fragmento de ácido nucleico que codifica un análogo de polipéptido amiloidogénico, es decir un polipéptido derivado de APP o A β que o bien comprende la secuencia natural a la que se ha añadido o insertado una gente de fusión o, preferiblemente un polipéptido derivado de APP o A β en el que se ha introducido un epítipo de células T extraño mediante la inserción y/o adición, preferiblemente mediante sustitución y/o supresión. Los fragmentos de ácido nucleico de la invención son o bien
25 fragmentos de ADN o ARN.

- Los fragmentos de ácido nucleico de la invención normalmente se insertarán en vectores adecuados para formar vectores de clonación o expresión que llevan fragmentos de ácido nucleico de la invención; tales vectores novedosos son también parte de la invención. Detalles concernientes a la construcción de estos vectores de la invención se describirán en el contexto de células y microorganismos transformadas más adelante. Los vectores, pueden, dependiendo del propósito y tipo de aplicación, estar en la forma de plásmidos, fagos, cósmicos, minicromosomas, o virus, sino también ADN desnudo que solamente se expresa transitoriamente en ciertas células en un vector importante. Los vectores de clonación y expresión preferidos de la invención son capaces de replicación autónoma, permitiendo por lo tanto altos números de copias para el propósito de expresión de alto nivel o replicación de alto nivel para la clonación superior.
35

- El esquema general de un vector de la invención comprende las siguientes características en la dirección 5' $\rightarrow$ 3' y en enlace operable: un promotor para dirigir la expresión del fragmento de ácido nucleico de la invención, opcionalmente una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido guía que permite la secreción (a la fase extracelular o, cuando sea aplicable, en el periplasma) de o integración en la membrana del fragmento polipeptídico, el fragmento de ácido nucleico de la invención, y opcionalmente una secuencia de ácido nucleico que codifica un terminador. Cuando se opera con vectores de expresión en cepas productoras de líneas celulares es para el propósito de estabilidad genética de la célula transformada preferida que el vector cuando se introduce en una célula hospedadora se integre en el genoma de la célula hospedadora. En contraste, cuando se trabaja con vectores a usar para efectuar la expresión *in vivo* en un animal (es decir, cuando se usa el vector en vacunación de ADN) es por razones de seguridad preferidas que el vector es incapaz de integrarse en el genoma de la célula hospedadora; típicamente, se usan ADN desnudo o vectores virales no integrantes, cuyas elecciones se conocen por los expertos en la técnica.
45

- Los vectores de la invención se usan para transformar células hospedadoras para que produzcan el polipéptido amiloidogénico modificado de la invención. Tales células transformadas, que también son parte de la invención, pueden ser células o líneas celulares cultivadas usadas para la propagación de fragmentos y vectores de ácidos nucleicos de la invención, o se usan para producción recombinante de los polipéptidos amiloidogénicos de la invención. Como alternativa, las células transformadas pueden ser cepas de vacuna viva en las que el fragmento de ácido nucleico (una copia única o múltiple) se han insertado de manera que efectúa la secreción o integración en la membrana bacteriana o pared celular del polipéptido amiloidogénico modificado.
55

- Las células transformadas preferidas de la invención son microorganismos tales como bacterias (tales como las especies *Escherichia* [por ejemplo *E. coli*], *Bacillus*, por ejemplo, *Bacillus subtilis*], *Salmonella*, o *Mycobacterium* [preferiblemente no patógeno, por ejemplo, *M. bovis* BCG]), levaduras (tales como *Saccharomyces cerevisiae*), y protozoos. Como alternativa, las células transformadas se derivan de un organismo multicelular tal como hongo, una célula de insecto, un célula vegetal, o una célula de mamífero. Las más preferidas son células derivadas de un ser humano, véase, la descripción de líneas celulares y vectores más adelante. Recientes resultados han mostrado gran promesa en el uso de una línea celular de *Drosophila melanogaster* comercialmente disponible (la línea celular Schneider 2 (S₂) y sistema de vector disponible de Invitrogen) para la producción recombinante de polipéptidos en el laboratorios de los solicitantes, y por lo tanto este sistema de expresión se prefiere particularmente.
65

Para los propósitos de clonación y/o expresión optimizada se prefiere que la célula transformada sea capaz de replicar el fragmento de ácido nucleico de la invención. Las células que expresan el fragmento de ácido nucleico son

realizaciones útiles preferidas de la invención; se pueden usar para la preparación a pequeña escala o gran escala del polipéptido amiloidogénico modificado o, en el caso de bacterias no patogénicas, como constituyentes de vacuna en una vacuna viva.

- 5 Cuando se producen las moléculas de la invención por medio de células transformadas, es conveniente, aunque lejos de lo esencial, que el producto de expresión o bien se exporte en el medio de cultivo o se lleve sobre la superficie de la célula transformada.

- 10 Cuando una célula productora eficaz se ha identificado, se prefiere, en su propia base, establecer una línea celular estable que lleva el vector de la invención y que expresa el fragmento de ácido nucleico que codifica el polipéptido amiloidogénico modificado. Preferiblemente, esta línea celular estable secreta o lleva el análogo de la invención, facilitando por lo tanto la purificación del mismo.

- 15 En general, los vectores plásmidos que contienen replicón y secuencias de control que se derivan de especies compatibles con la célula hospedadora se usan junto con los hospedadores. El vector ordinariamente lleva un sitio de replicación, así como secuencias marcadoras que son capaces de proporcionar selección fenotípica en las células transformadas. Por ejemplo, *E. coli* se transforma típicamente usando pBR322, un derivado plásmido de la especie *E. coli* (véase, por ejemplo, Bolivar y col., 1977). El plásmido pBR322 contiene genes para resistencia a ampicilina y tetraciclina y se este modo proporciona medios fáciles para identificar células transformadas. El plásmido pBR, u
20 otros plásmido o fago microbiano también debe contener, o estar modificado para contener, promotores que se pueden usar por los microorganismos procarióticos para expresión.

- Los promotores más comúnmente usados en construcciones de ADN recombinante incluyen la B-lactamasa (penicilinas) y sistemas de promoción de lactosa (Chang y col., 1978; Itakura y col., 1977; Goeddel y col., 1979; EP-A-0 036 776). Mientras éstos son los más comúnmente usados, otros promotores microbianos se han descubierto y utilizado, y se han publicado los detalles relativos a sus secuencias de nucleótidos, permitiendo que un trabajador experto les ligue funcionalmente con vectores de plásmidos (Siebwenlist y col., 1980). Ciertos genes de procariotas se pueden expresar eficazmente en *E. coli* a partir de sus propias secuencias promotoras, evitando la necesidad de adición de otro promotor mediante medios artificiales.

- 30 Además de procariotas, también se pueden usar microbios eucarióticos, tales como cultivos de levaduras, y por lo tanto el promotor debe ser capaz de dirigir la expresión. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadero es el microorganismo más comúnmente usado entre los microorganismos eucarióticos, aunque numerosas otras cepa están comercialmente disponibles. Para la expresión en *Saccharomyces*, se usa, por ejemplo, comúnmente el plásmido YRp7 (Stinchcomb y col., 1979; Kingsman y col., 1979; Tschemper y col., 1980). Este plásmido ya contiene el gen trp1 que proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levaduras que carece de la capacidad de desarrollarse en triptófano por ejemplo ATCC N° 44076 o PEP4-1 (Jones, 1977). La presencia de la lesión de trp1 como una característica del genoma de la célula hospedadora de levadura entonces proporciona un ambiente eficaz para detectar la transformación mediante crecimiento en ausencia de triptófano.

- 40 Las secuencias promotoras adecuadas en vectores de levaduras incluyen los promotores para la 3-fosfoglicerato quinasa (Hitzman y col., 1980) u otras enzimas glucolíticas (Hess y col., 1968; Holland y col., 1978), tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructo quinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa, y glucoquinasa. En la construcción de plásmidos de expresión adecuados, las secuencias de terminación asociadas a estos genes también están ligados en el extremo 3' del vector de expresión de la secuencia deseada a expresar que proporciona poliadenilación del ARNm y terminación.

- Otros promotores, que tienen la ventaja adicional de transcripción controlada por condiciones de crecimiento son la 50 región promotora para la alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas de degradación asociadas al metabolismo de nitrógeno, y la gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa anteriormente mencionada, y las enzimas responsables para la utilización maltosa y galactosa. Es adecuado cualquier vector plásmido que contiene un promotor compatible de levadura, origen de secuencias de replicación y terminación.

- 55 Además de los microorganismos, también se pueden usar como huéspedes cultivos de células derivados de organismos multicelulares. En principio, cualquiera de tales cultivos celulares es operativo, si es de cultivo vertebrado o invertebrado. Sin embargo, ha sido de mayor interés en células de vertebrados, y la propagación de vertebrado en cultivo (cultivo de tejidos) ha llegado a ser un procedimiento rutinario en los años recientes (Tissue Culture, 1973). Los ejemplos de tales líneas de células hospedadoras útiles son las células VERO y HeLa, líneas de células de ovario de hámster chino, y células W138, BHK, COS-7 293, *Spodoptera frugiperda* (SF) (comercialmente disponibles como sistemas de expresión completa a partir de, entre otros, Protein Sciences, 1000 Research Parkway, Meriden, CT 06450, Estados Unidos y de Invitrogen), y líneas de células MDCK. En la presente invención, una línea celular especialmente preferida es S₂ disponible de Invitrogen, PO Box 2312, 9704 CH Groningen, The Netherlands.

- 65 Los vectores de expresión para tales células incluyen ordinariamente (si es necesario) un origen de replicación, un promotor localizado en frente del gen a expresar, junto con cualquier sitio de unión a ribosoma necesario, sitios de ajuste de ARN, sitio de poliadenilación, y secuencias terminadoras transcripcionales.

Para uso en células de mamíferos, las funciones de control sobre los vectores de expresión se proporcionan a menudo por material viral. Por ejemplo, los promotores comúnmente usados se derivan de poliovirus, Adenovirus 2, y los más frecuentemente Virus de simio 40 (SV40). Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 son particularmente útiles debido a que ambos se obtienen fácilmente del virus como un fragmento que también contiene el origen viral SV40 de replicación (Fiers y col., 1978). También se pueden usar fragmentos de SV40 menores o mayores, con tal que se incluya la secuencia de aproximadamente 250 pares de bases que se extiende entre el sitio *HindIII* hacia el sitio *BglII* localizado en el origen viral de replicación. Además, también es posible, y a menudo deseable, utilizar secuencias promotoras o de control, con tal que tales secuencias de control sean compatibles con los sistemas de células hospedadoras.

Un origen de replicación se puede proporcionar o bien mediante construcción del vector que incluye un Orión exógeno, tal como se puede derivar de SV40 u otro virus (por ejemplo, Poliovirus, Adeno, VSV, BPV) o se puede proporcionar por el mecanismo de replicación cromosómica de la célula hospedadora. Si el vector está integrado en el cromosoma de la célula hospedadora, lo último es a menudo suficiente.

Identificación de análogos útiles

Será evidente para los expertos en la técnica que no todas las variantes o modificaciones posibles de polipéptidos amiloidogénicos de origen natural tendrán la capacidad de generar anticuerpos en un animal que son de reacción cruzada con la forma natural. Sin embargo, no es difícil establecer un rastreo convencional eficaz para moléculas amiloidogénicas que cumplirán los requerimientos mínimos para la reactividad inmunológica descrita en esta memoria descriptiva. Por lo tanto, un procedimiento para la identificación de un polipéptido amiloidogénico modificado que es capaz de incluir anticuerpos contra polipéptido amiloidogénico no modificado en una especie animal en la que el polipéptido amiloidogénico no modificado es una autoproteína (no inmunogénica), comprendiendo el procedimiento

- preparar, mediante las técnicas de síntesis de péptidos o de ingeniería genética, un conjunto de polipéptidos amiloidogénicos modificados en los que los aminoácidos se han añadido a, insertados en, suprimidos de, o sustituidos en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido amiloidogénico de la especie animal dando lugar por lo tanto a secuencias de aminoácidos en el conjunto que comprende epítopos de células T que son extraños a la especie animal, o preparando un conjunto de fragmentos de ácidos nucleicos que codifican el conjunto de polipéptidos amiloidogénicos modificados mutuamente distintos,
- ensayar miembros del conjunto de polipéptidos amiloidogénicos modificados o fragmentos de ácidos nucleicos por su capacidad de inducir la producción de anticuerpos por la especie animal contra la APP o A β no modificada, e
- identificar y opcionalmente aislar el (los) miembro (s) del conjunto de polipéptidos amiloidogénicos modificados que significativamente induce la producción de anticuerpos contra polipéptido amiloidogénico no modificado en la especie o identificar y opcionalmente aislar los productos de expresión de polipéptidos codificados por miembros del conjunto de fragmentos de ácidos nucleicos que significativamente induce la producción de anticuerpos contra APP o A β no modificada en la especie animal.

En este contexto, el “conjunto de polipéptidos amiloidogénicos modificados mutuamente distintos” es una colección de polipéptidos amiloidogénicos modificados no idénticos que, por ejemplo, se han seleccionado en base de los criterios descritos anteriormente (por ejemplo, en combinación con estudios de patrones de diroísmo circular, espectro de RMN, y/o de difracción de rayos X). El conjunto puede consistir en solamente unos pocos miembros pero se contempla que el conjunto pueda contener varios cientos de miembros.

El ensayo de miembros del conjunto se puede por último realizar *in vivo*, pero se pueden aplicar numerosos ensayos *in vitro* que estrechan el número de moléculas modificadas que servirán el propósito de la invención.

Ya que el objetivo de introducción de los epítopos de células T extraños es soportar la respuesta de células B por el auxiliar de las células T, un prerequisite es que la proliferación de las células T esté inducida por el polipéptido amiloidogénico modificado. La proliferación de las células T se puede ensayar mediante ensayos de proliferación normalizados *in vitro*. En resumen, una muestra enriquecida por células T se obtiene a partir de un sujeto y posteriormente se mantiene en cultivo. El cultivo de las células T se pone en contacto con las APC del sujeto que han tomado previamente la molécula modificada y procesado para presentar sus epítopos de células T. La proliferación de células T se controla y se compara con un control adecuado (por ejemplo, células T en cultivo puestas en contacto con las APC que se han procesado intactas, polipéptido amiloidogénico nativo). Como alternativa, la proliferación se puede medir determinando la concentración de citoquinas relevantes liberadas por las células T en respuesta a su reconocimiento de células T extrañas.

Habiendo hecho altamente probable que al menos un polipéptido amiloidogénico modificado es cualquier tipo de conjunto capaz de inducir la producción de anticuerpo contra APP o A β , es posible preparar una composición inmunogénica que comprende al menos un polipéptido amiloidogénico modificado que es capaz de inducir anticuerpos contra APP o A β no modificada en una especie animal en la que APP o A β no modificada es una autoproteína, comprendiendo el procedimiento la mezcla del (de los) miembro (s) del conjunto que induce significativamente la producción de anticuerpos en la especie animal que son reactivos con la APP o A β con un vehículo y/o diluyente y/o

excipiente farmacéutica o inmunológicamente aceptable, opcionalmente en combinación con al menos un adyuvante farmacéutica e inmunológicamente aceptable.

Los ensayos descritos anteriormente de conjuntos de polipéptidos se llevan convenientemente a cabo inicialmente preparando un número de secuencias de vectores o de ácidos nucleicos mutuamente distintos de la invención, insertando éstos en vectores de expresión, transformando células hospedadoras adecuadas (o animales hospedadores) con los vectores, y efectuando la expresión de las secuencias de ácidos nucleicos de la invención. A estas etapas pueden seguir el aislamiento de los productos de expresión. Se prefiere que las secuencias de ácido nucleico y/o vectores se preparen mediante procedimientos que comprenden ejercitar una técnica de amplificación molecular tal como PCR o mediante la síntesis de ácidos nucleicos.

Dianas amiloidogénicas específicas

Además de las proteínas muy a menudo asociadas a APP, ApoE4 y Tau de Alzheimer, existe una larga lista de otras proteínas que de algunas maneras han estado unidas a AD, o bien mediante su presencia directa en placas u ovillos de cerebros de AD o mediante su asociación genética aparente con un incremento del riesgo de desarrollar AD. La mayoría, si no todos estos antígenos están juntos con la A β , APP, presenilina y ApoE4 anteriormente descritas, proteínas dianas putativas en cierta realización de la presente invención. Estas dianas putativas se describen ya completamente en el documento WO 01/62284. Por lo tanto, estas dianas putativas solamente se mencionarán brevemente en esta memoria descriptiva, mientras que una descripción minuciosa de antecedentes se puede encontrar en el documento WO 01/62282.

Alfa1-antiquimiotripsina (ACT); Alfa2-macroglobulina; ABAD (alcohol deshidrogenasa de unión a A β -péptido); APLP1 y -2 (precursor de amiloide de tipo proteína 1 y -2); AMY117; Bax; Bcl-2; Bleomicin hidrolasa; BRI/ABRI; Cromogranina A; Clusterin/apoJ; proteína de unión a CRF (factor de liberación de corticotropina); EDTF (factor tóxico derivado de endotelio); Heparan sulfato proteoglicanos; proteína - 2 mediadora de la respuesta de colapsina humana; Huntingtin (proteína de la enfermedad de Huntington); ICAM-1; IL-6; antígeno CD68 asociado a lisosomas; P21 ras; PLC-delta 1 (fosfolipasa C isoenzima delta 1); componente sérico P-amiloide (SAP); Sinaptofisina; Sinucleína (alfa-sinucleína o NACP); y TGF-b1 (factor b1 de factor de crecimiento transformador).

Los medios y procedimientos descritos actualmente para la regulación hacia debajo de APP o A β se pueden combinar con terapias, por ejemplo, inmunoterapia específica activa, contra cualquiera de estos polipéptidos amiloidogénicos diferentes.

Aparte de la enfermedad de Alzheimer, también la angiopatía amiloide cerebral es una enfermedad que sería una diana adecuada para la tecnología descrita actualmente.

Se contempla que la mayoría de los procedimientos para inmunizar contra APP o A β se debe restringir a la inmunización que da lugar a anticuerpos que reaccionan de manera cruzada con la APP o A β . No obstante, en algunos casos será de interés para inducir inmunidad celular en la forma de respuestas de CTL contra células que presentan epítopes de Clase I de MCH a partir de polipéptidos amiloidogénicos - esto puede ser un expediente en aquellos casos en los que la reducción en el número de células que producen APP o A β no constituyen un efecto adverso grave. En tales casos cuando se desean las respuestas de CTL se prefiere utilizar las enseñanzas del documento WO 00/20027 del solicitante.

Vehículos inmunógenos

Las moléculas que comprenden un epítipo auxiliar T y péptidos de APP o A β que representan o incluyen epítopes de células B unidos de manera covalente a la molécula de polímeros no inmunógenos que actúan como un vehículo, por ejemplo un poli-hidroxipolímero activado multivalente, funcionará, como se ha mencionado anteriormente como una molécula de vacuna que solamente contiene las partes inmunológicamente relevantes, se pueden obtener, y son realizaciones interesantes en las variantes d y e descritas anteriormente. Se pueden usar los epítopes promiscuos o también llamados auxiliares T si por ejemplo la diana para la vacuna es un autoantígeno tal como APP o A β . Además, los elementos que potencian la respuesta inmunológica se podría también acoplar al vehículo y por lo tanto actuar como un adyuvante. Tales elementos podrían ser manosa, tuftsin, muramil dipéptido, motivos de CpG etc. En ese caso, la formulación de adyuvantes posterior del producto de vacuna pudiera ser innecesaria y el producto se podría administrar en agua o solución salina pura.

Acoplando los epítopes de células T citotóxicas (CTL) junto con los epítopes auxiliares T también será posible generar específico de CTL para el antígeno a partir del que el epítipo de CTL se deriva. Los elementos que promueven la captación del producto al citosol, tal como manosa, del APC, por ejemplo un macrófago, también se podría acoplar al vehículo junto con la CTL- y epítipo auxiliar T y potencian la respuesta de CTL.

La relación de epítopes de células B y epítopes auxiliares T (P2 y P30) en el producto final se puede variar variando la concentración de estos péptidos en la etapa de síntesis. Como se ha mencionado anteriormente, la molécula inmunógena se puede etiquetar con, por ejemplo, manosa, tuftsin, motivos CpG u otras sustancias estimulantes inmunes (descritas en esta memoria descriptiva) mediante la adición de éstas, si es necesario usando por ejemplo derivados aminados de las sustancias, al tampón carbonato en la etapa de síntesis.

Si un polihidroxipolímero activado insoluble se usa para combinar los péptidos que contienen el epítipo de células B de APP o A β y epítopos auxiliares T puede, como se ha mencionado anteriormente realizarse como una síntesis de fase sólida y el producto final se puede recoger y purificarse mediante lavado y filtración. Los elementos a acoplar a un polihidroxipolímero activado de tresilo (péptidos, etiquetas, etc) se pueden añadir al polihidroxipolímero a bajo pH, por ejemplo, pH 4 - 5, y se permite que se distribuye de manera igual en el "gel" mediante difusión pasiva. Posteriormente, el pH se puede incrementar hasta pH 9 - 10 para comenzar la reacción de los grupos amino primarios en los péptidos y etiquetas a los grupos tresilo en el polihidroxipolímero. Después de acoplar los péptidos y por ejemplo los elementos de estimulación inmune el gel se muele para formar partículas de tamaño adecuado para inmunización.

Por lo tanto tal inmunógeno comprende

a) al menos una primera secuencia de aminoácidos derivada de APP o A β , como se ha descrito anteriormente, y

b) al menos una segunda secuencia de aminoácidos que incluye un epítipo de células T auxiliares T,

en el que cada uno de al menos la primera y al menos la segunda secuencias de aminoácidos están acopladas a un vehículo polihidroxipolimérico activado farmacéuticamente aceptable.

Con el fin de que las secuencias de aminoácidos se acoplen al polihidroxipolímero es normalmente necesario "activar" el polihidroxipolímero con un grupo reactivo adecuado que puede formar el enlace necesario a la secuencias de aminoácidos.

El término "polihidroxipolímero" pretende que tenga el mismo significado que en el documento WO 00/05316, es decir el polihidroxipolímero puede tener exactamente las mismas características que se enseñan específicamente en esa solicitud. Por lo tanto, el polihidroxipolímero puede ser soluble o insoluble en agua (requiriendo de esta manera diferentes etapas de síntesis durante la preparación del inmunógeno). El polihidroxipolímero se puede seleccionar entre compuestos polihidroxipoliméricos de origen natural y compuestos polihidroxi sintéticos.

Los polihidroxipolímeros específicos y sintéticos son polisacáridos seleccionados entre acetan, amilopectina, goma agar - agar, azarosa, alginatos, goma arábica, carregenano, celulosa, ciclodextrinas, dextrano, furcelaran, galactomanan, gelatina, gatti, glucano, glicógeno, guar, Baraya, konjac/A, goma de semilla de acacia falsa, manan, pectina, pisillo, pululan, almidón, tamarina, tragacanto, xantano, xilano, y xiloglucano. El dextrano se prefiere especialmente.

Sin embargo, el polihidroxipolímero también se puede seleccionar entre poli (etilenimina) (PEI) altamente ramificada, tetratienilen vinileno, Kevalr (largas cadenas de poli-parafenil tereftalamida), poli (uretanos), poli (siloxanos), polidimetilsiloxano, silicona, poli (metil metacrilato) (PMMA), polo (alcohol vinílico), poli (vinil pirrolidona), poli (2-hidroxi etil metacrilato), poli (N-vinil pirrolidona), poli (alcohol vinílico), poli (ácido crílico), politetrafluoroetileno (PTFE), poli archilamida, poli (etilen-co-vinil acetato), poli (etilen glicol) y derivados, poli (ácido metacrílico), polilactidas (PLA), poliglicolidas (PGA), poli (lactida-coglicolidas) (PLGA), polianhídridos, y poliortoésteres.

El peso molecular medio (peso) del polihidroxipolímero en cuestión (es decir antes de activación) es típicamente al menos 1.000, tal como al menos 2.000, preferiblemente en el intervalo de 2.500 - 2.000.000, más preferiblemente en el intervalo de 3.000 - 1.000.000, en particular en el intervalo de 5.000 - 500.000. En los ejemplos se ha mostrado que los polihidroxipolímeros que tienen un peso molecular medio en el intervalo de 10.000 - 200.000 son particularmente ventajosos.

El polihidroxipolímero es preferiblemente soluble en agua hasta un grado de al menos 10 mg/ml, preferiblemente al menos 25 mg/ml, tal como al menos 50 mg/ml, en particular al menos 100 mg/ml, tal como al menos 150 mg/ml a temperatura ambiente. Se sabe que el dextrano, incluso cuando se activa como se ha descrito anteriormente, cumple con los requerimientos con respecto a la solubilidad en agua.

Para alguno de los polihidroxipolímeros más interesantes, la relación entre grupos C (átomos de carbono) y OH (grupos hidroxilo) de los polihidroxipolímeros inactivados (es decir, el polihidroxipolímero nativo antes de la activación) está en el intervalo de 1,3 a 2,5, tal como 1,5 - 2,3, preferiblemente 1,6 - 2,1, en particular 1,85 - 2,05. Sin estar unido a ninguna teoría específica, se cree que tal como la relación C/OH del polihidroxipolímero inactivado representa un nivel altamente ventajoso de hidrofiliidad. El alcohol polivinílico y polisacáridos son ejemplos de polihidroxipolímeros que cumplen con este requerimiento. Se cree que la relación anteriormente mencionada debe ser aproximadamente la misma para el polihidroxipolímero activado como la relación de activación debe ser bastante baja.

El término "vehículo de polihidroxipolímero" pretende significar la parte del inmunógeno que lleva las secuencias de aminoácidos. Como regla general, el vehículo de polihidroxipolímero tiene sus límites exteriores cuando las secuencias de aminoácidos se pueden escindir mediante una peptidasa, por ejemplo, en una célula presentadora de antígeno que procesa el inmunógeno. Por lo tanto, el vehículo de polihidroxipolímero puede ser el polihidroxipolímero con un grupo de activación, donde el enlace entre el grupo de activación y la secuencia de aminoácidos se puede escindir por una peptidasa en una APC, o el vehículo de polihidroxipolímero puede ser un polihidroxipolímero con grupo de activación y por ejemplo, un engarce tal como un único aminoácido o un número de aminoácidos D, donde la última parte del engarce puede unirse a las secuencias de aminoácidos y escindirse por una peptidasa en la APC.

Como se mencionado anteriormente, los polihidroxipolímeros llevan grupos funcionales (grupos de activación), que facilitan el anclaje de péptidos al vehículo. Un amplio intervalo de grupo funcionales aplicables se conocen en la técnica, por ejemplo grupos tresilo (trifluoroetilsulfonilo), maleimido, cloroformiato de p-nitrofenilo, cianogenbromuro, tosil (p-toluensulfonilo), triflil (trifluorometanosulfonilo), pentafluorobencenosulfonilo, y vinil sulfona. Los ejemplo preferidos de grupos funcionales dentro de la presente invención son grupos tresilo, maleimido, tosilo, triflilo, pentafluorobencenosulfonilo, cloroformiato de p-nitrofenilo, y vinilsulfonilo, entre los que los grupos tresilo, maleimido, y tosilo son particularmente relevantes.

Los polihidroxipolímeros activados por tresilo se pueden preparar usando cloruro de tresilo como se describe para activación de dextrano en el ejemplo 1 en el documento WO 00/05316 o como se ha descrito en Gregorius y col., J. Immunol. Meth. 181 (1995) 65 - 73.

Los polihidroxipolímeros activados por maleimido se pueden preparar usando isocianato de p-maleimidofenilo como se describe para activación de dextrano en el ejemplo 3 del documento WO 00/05316. Como alternativa, los grupos maleimido se pueden introducir en un polihidroxipolímero, tal como dextrano, mediante derivatización de un polihidroxipolímero activado por tresilo (tal como dextrano activado por tresilo (TAD)) con un compuesto de diamina (generalmente $H_2N-C_nH_{2n}-NH_2$, donde n es 1 - 20, preferiblemente 1 - 8, por ejemplo 1,3-diaminopropano, en exceso y posteriormente se hace reaccionar los grupos amino introducidos en TAD con reactivos tales como 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de sulfasuccinimidilo (sulfo-SMCC), 4-(p-maleimidofenil)butirato de succinimidilo (SMP), 4-(p-maleimidofenil)butirato de sulfa-succinimidilo (sulfa-SMP), N- γ -maleimidobutiriloxi-succinimida éster (GMBS) o N- γ -maleimidobutiriloxi-sulfosuccinimida éster. Aunque los diferentes reactivos y vías para la activación da como resultado formalmente productos activados de maleimida ligeramente diferentes con respecto a la unión entre la funcionalidad de maleimida y el resto del grupo hidroxil precursor sobre el que se realiza la activación, todas y cada una se consideran como "polihidroxipolímeros activados por maleimida".

Los polihidroxipolímeros activados por tosilo se pueden preparar usando cloruro de tosilo como se describe para activación de dextrano en el ejemplo 2 en el documento WO 00/05316. Los polímeros activados por triflilo y pentafluorobencenosulfonilo se preparan como los análogos activados por tosilo o tresilo, por ejemplo usando los cloruros de ácido correspondientes.

El polihidroxipolímero activado por cianogenbromuro se puede preparar haciendo reaccionar el polihidroxipolímero con cianogenbromuro usando procedimientos convencionales. Los grupos funcionales son normalmente ésteres de cianatos con dos grupos hidroxil del polihidroxipolímero.

El grado de activación se puede expresar como la relación entre los grupos hidroxil libres y grupos de activación (es decir, grupos hidroxil funcionalizados). Se cree que una relación entre los grupos hidroxil libres del polihidroxipolímero y los grupos de activación deben estar entre 250:1 y 4:1 con el fin de obtener un equilibrio ventajoso entre al hidrofili- cidad y la reactividad del polihidroxipolímero. Preferiblemente la relación está entre 100:1 y 6:1, más preferiblemente entre 60:1 y 8:1, en particular entre 40:1 y 10:1.

Los polihidroxipolímeros especialmente interesantes para uso en el procedimiento para producir el inmunógeno generalmente aplicable de acuerdo con la invención son polisacáridos activados por tresilo, tosilo y maleimido, especialmente dextrano activado por tresilo (TAD), dextrano activado por tosilo (TosAD), y dextrano activado por maleimido (MAD).

Se prefiere que el enlace entre el vehículo de polihidroxipolímero y las secuencias de aminoácidos unidas a él se pueden escindir por una peptidasa, por ejemplo, como una peptidasa activa en el procesamiento de antígenos en una APC. Se prefiere por lo tanto que al menos la primera y al menos la segunda secuencias de aminoácidos cada una de ellas proporcione el resto de nitrógeno de sus enlace amida respectivo.

El vehículo de polihidroxipolímero puede estar sustancialmente libre de residuos de aminoácidos, que necesitan que el grupo de activación proporcione parte de un enlace que se puede escindir por peptidasa, pero como se ha mencionando anteriormente, el vehículo también puede incluir simplemente un espaciador que incluye al menos un aminoácido L. No obstante, al menos la primera y al menos la segunda secuencias de aminoácidos están normalmente unidas a la versión activada del polihidroxipolímero mediante el nitrógeno en el extremo N de la secuencia de aminoácidos.

El inmunógeno generalmente aplicable descrito anteriormente de la presente invención se puede usar en procedimientos de inmunización esencialmente como se describe en esta memoria descriptiva para las vacunas de polipéptidos. Esto es, todas las descripciones que se refieren a dosificaciones, modo de administración y formulación de vacunas de polipéptidos para regular hacia abajo los polipéptidos amiloidogénicos descritos en esta memoria descriptiva que aplican *mutatis mutandi* a los inmunógenos generalmente aplicables.

Tecnología de vacunación segura generalmente aplicable

Como se ha descrito anteriormente, una realización preferida de la presente invención supone el uso de variantes de polipéptidos amiloidogénicos que son incapaces de proporcionar epítopes T_H auto - derivados que pueden dirigir una respuesta inmune contra el polipéptido amiloidogénico.

Sin embargo, los presentes inventores creen que esta estrategia para diseñar vacunas anti propias, es una tecnología aplicable que es inventiva por derecho propio. Se debe probar especialmente en los casos en los que el auto autógeno que se busca regule hacia debajo de manera lo suficientemente abundante en el cuerpo de manera que sea posible que pueda producirse la autoestimulación de una respuesta inmune. Por lo tanto, todas las descripciones anteriores de esta realización en la medida en que se refiere a la provisión de una respuesta inmune anti propia contra APP o A β aplican *mutatis mutandi* para inmunización contra otros polipéptidos, especialmente aquellos que están presentes en cantidades suficientes para ellos para mantener la respuesta inmune en la forma de una afección autoinmune no controlada debido a que los epítopes T_H autólogos del auto - polipéptido relevante dirigen la respuesta inmune.

Ejemplo 1 Comparativo

El planteamiento de autovacunación para inmunizar contra la AD

El hecho de que los ratones con inactivación de la proteína A β no muestren ninguna anomalía o efectos secundarios adversos, sugieren que la eliminación o reducción de las cantidades de A β serán seguras, Zheng H. (1996).

Los experimentos publicados en los que se inmunizan animales transgénicos contra la proteína A β humana transgénica sugieren que era posible romper la autotolerancia, regulación hacia debajo de A β se podría obtener mediante anticuerpos auto - reactivos. Estos experimentos sugieren adicionalmente que tal regulación hacia debajo de A β potencialmente prevendría ambos la formación de placas, e incluso eliminar las placas de A β ya formadas del cerebro, véase Schenk y col., (1999). Pero, tradicionalmente no es posible generar anticuerpos contra las autoproteínas.

Los datos publicados no proporcionan los medios para romper la autotolerancia verdadera hacia las verdaderas autoproteínas. Ni los datos proporcionan los medios información sobre cómo asegurar que la reacción inmune se dirige solamente a predominantemente hacia los depósitos de A β , y no hacia la proteína precursora de A β unida a la membrana celular, si esto se considera necesario. Una respuesta inmune generada usando la tecnología existente presumiblemente generaría una respuesta inmune hacia las autoproteínas de una forma no regulada de manera que se puede generar auto - reactividad tan indeseada y excesiva hacia partes de la proteína A β . Por lo tanto, usando estrategias de inmunización existentes lo más probablemente será incapaz de generar fuertes respuestas inmunes hacia autoproteínas y además serán inseguras debido a la potencial fuerte reactividad cruzada hacia la APP unida a membranas que esté presente en un gran número de células en el SNC.

La presente invención proporciona los medios de generar de manera eficaz una fuerte respuesta inmune regulada hacia las autoproteínas verdaderas que potencialmente podrían formar placas y provocar enfermedad grave en el SNC o en otros compartimientos del cuerpo. Una vacuna terapéutica de proteína A β humana segura y eficaz se desarrollará usando esta tecnología para el tratamiento de la AD.

A la luz de esto, es posible anticipar que la AD, una enfermedad predicha que lesiona el sistema de atención sanitaria en el siglo siguiente, se podría curar, o las vacunas descritas podrían al menos constituir un planteamiento terapéutico eficaz para el tratamiento de los síntomas y progresión de esta enfermedad. Esta técnica representa un planteamiento inmunológico completamente nuevo para bloquear la deposición de amiloides en la AD y otras enfermedades neurológicas también.

En la siguiente tabla, se indican 35 construcciones contempladas. Todas las posiciones proporcionadas en la tabla son relativas a la metionina de partida de la APP(primer aminoácido en la SEC ID N° 2) e incluyen el aminoácido tanto de inicio como de final, por ejemplo, el fragmento de 672 - 714 incluye tanto el aminoácido 672 como el 714. Las posiciones de inicio como de final para P2 y P30 indican que el epítopo sustituye una parte del fragmento de la APP en las posiciones indicadas (ambas posiciones incluidas en la sustitución) - en la mayoría de las construcciones, los epítopes introducidos sustituyen un fragmento de la longitud del epítopo. Los asteriscos en la tabla tienen el siguiente significado:

*) Solamente una posición para P2 y P30 indica que el epítopo se ha insertado en el derivado de la APP en la posición indicada (el epítopo comienza en el aminoácido adyacente C - terminalmente a la posición proporcionada).

**) La construcción 34 contiene tres fragmentos de APP idénticos separados por P30 y P2, respectivamente.

***) La construcción 35 contiene nueve fragmentos de APP idénticos separados por epítopes P30 y P2 alternativos.

Construcciones AutoVac de APP

No de var.	Comienzo del segmento de APP con relación a aa 1 de APP	Fin del segmento de APP con relación a aa 1 de APP	Posición del epítopo P2 con relación a aa 1 de APP	Posición del epítopo P30 con relación a aa 1 de APP	Longitud de la molécula
1	630	770	656 - 670	635 - 655	141
2	630	714	656 - 670	635 - 655	85
3	672	770	735 - 749	714 - 728	99
4	672	770		714 - 728	99
5	672	770	714 - 728		99
6	672	770	723*	723*	135
7	672	770		723*	120
8	672	770	723*		114
9	672	714		672*	64
10	672	714		714*	64
11	672	714	672*		58
12	672	714	714*		58
13	672	714	714*	672*	79
14	672	714	680 - 694		43
14	672	714	685 - 799		43
16	672	714	690 - 704		43

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

17	672	714	695 - 790	43
18	672	714		43
19	672	714		43
20	672	714		43
21	672	714		43
22	672	714	680*	79
23	672	714	690*	79
24	672	714	700*	79
25	672	714	710*	79
26	672	714		64
27	672	714		64
28	672	714		64
29	672	714		64
30	672	714	680*	58
31	672	714	690*	58
32	672	714	700*	58
33	672	714	710*	58
34	672	714	Después de rep. 1**	165
35	672	714	34 x 3***	165

La parte de APP contra la que es más interesante generar una respuesta es el péptido del núcleo de la A β de 43 aminoácidos (A β - 43, correspondiente a la SEC ID N° 2, residuos 672 - 714) que es el principal constituyente de las placas amiloides en los cerebros de la AD. este fragmento de la APP es parte de todas las construcciones enumeradas anteriormente.

Las variantes 1 y 2 comprenden una porción de la corriente hacia arriba de la APP de la A β - 43 en la que se han situado los epítopes P2 y P30 modelos. Todas las variantes a y 3 - 8 comprenden el fragmento C-100 que se mostrado que es neurotóxico - el fragmento C-100 corresponde a los residuos de aminoácidos 714 - 770 de la SEC ID N° 2. En las variantes 3 - 5 los epítopes sustituyen una parte del fragmento C-100 mientras que las variantes 6 - 8 se han insertado en C-100.

Las variantes 9 - 35 contienen solamente la proteína del núcleo A β -43. En las variantes 9 - 13, P2 y P30 se condensan a cualquier extremo de A β -43; en 14 - 21 P2 y P30 sustituye parte de A β -43; en 22 - 33 P2 y P30 se insertan en A β -43; 34 contiene tres fragmentos idénticos A β -43 espaciados por P30 y P2, respectivamente; 35 contiene 9 repeticiones A β -43 espaciadas por los epítopes P2 y P30 alternativos.

Las partes truncadas de la proteína A β -43 descritas anteriormente también se pueden emplear en los análogos inmunógenos de acuerdo con la presente invención. Especialmente preferidos son los truncados A β (1-42), A β (1-40), A β (1-39), A β (1-35), A β (1-34), A β (1-34), A β (1-28), A β (1-12), A β (1- 5), A β (13-28), A β (13-28), A β (13-35), A β (17-28), A β (25-35), A β (35-40), A β (36-42) y A β (35-42) (donde los números entre paréntesis indican los tramos de aminoácidos de A β -43 que constituyen el fragmento relevante - A β (35-40) es por ejemplo idéntico a los aminoácidos 706 - 711 en la SEQ ID N° 2). Todas estas variantes con partes truncadas de A β -43 se pueden hacer con los fragmentos A β descritos en esta memoria descriptiva, en particular con las variantes 9, 10, 11, 12, y 13.

En algunos casos se prefiere que el A β -43 o fragmentos del mismo están mutados. Especialmente preferidas son las variantes de sustitución donde la metionina en la posición 35 en A β -43 se han sustituido, preferiblemente con leucina o isoleucina, o simplemente suprimida. Los análogos especialmente preferidos contienen una sola metionina que se localiza en el extremo C, o bien porque es de origen natural en el polipéptido amiloidogénico o epítipo T_H extraño, o debido a que se ha insertado o añadido. Por lo tanto, también se prefiere que la parte del análogo que incluye el epítipo T_H extraño esté libre de metionina, excepto de la posible localización C-terminal posible de una metionina.

De hecho, en general se prefiere que todos los análogos de APP o A β que se usan de acuerdo con la presente invención comparten las características de incluir solamente una sola metionina que se posiciona como el aminoácido C-terminal en el análogo y que otras metioninas en o bien el polipéptido amiloidogénico o el epítipo T_H extraño están suprimidos o sustituidos por otro aminoácido.

Una mutación interesante adicional es una supresión o sustitución de la fenilalanina en la posición 19 en A β -43, y se prefiere especialmente que la mutación sea una sustitución de este residuo de fenilalanina con una prolina.

La siguiente tabla expone un grupo de construcciones especialmente preferidas que operan con truncados o mutaciones de A β -43:

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 269 749 T3

Nº de variante	Segmento de Aβ usado en la molécula con relación a 1 de Aβ (1-42/43)	Posición del segmento Aβ con relación al aa 1 de la molécula	Posición del epítipo P2 con relación al aa 1 de la molécula	Posición del epítipo P30 con relación al aa 1 de la molécula	Longitud total de la molécula (aa)
36	1 - 28	22 - 49	50 - 64	1 - 21	64
37	1 - 12 (a) + 13 - 28 (b)	1 - 12 (a) + 49 - 64 (b)	34 - 48	13 - 33	64
38	1 - 12 (x 3)	1 - 12, 34 - 45, 61 - 72	46 - 60	13 - 33	72
39	13 - 28 (x 3)	1 - 16, 38 - 53, 69 - 84	54 - 68	17 - 37	84
40	1 - 12 (a) + 13 - 35 (b) + 36 - 42 (c)	1 - 12 (a) + 34 - 56 (b) + 72 - 78 (c)	57 - 71	13 - 33	78
41	1 - 28 (x 3)	1 - 28, 50 - 77, 93 - 120	78 - 92	29 - 49	120
42	1 - 43 (F19P/M35K)	1 - 43	65 - 79	44 - 64	79

En esta tabla, el segmento Aβ usado en la molécula se indica por números de aminoácidos con relación al aa 1 de la molécula (1 - 42/43), es decir, 1 - 28 significa que el fragmento 1 - 28 de (1 - 42/43), es decir 1 - 28 significa que el fragmento 1 - 28 de Aβ (1-42/43) se usa en la molécula. Si se usan dos o más segmentos diferentes, ambos se indican en la tabla, es decir, 1 - 12 (a) + 13 - 28 (b) significa que tanto el fragmento 1 - 12 como el fragmento 13 - 28 de Aβ (1 - 42/43) se usan en la molécula.

También, si está presente el mismo segmento en más de una copia en la construcción se indica en la tabla, es decir, 1 - 12 (x 3) muestra que el fragmento 1 - 12 de Aβ (1 - 42/43) está presente en tres copias de la construcción.

Además, la posición del segmento Aβ en la molécula se muestra mediante posiciones de aminoácidos con relación al primer aminoácido de la molécula, es decir, 29 - 42 muestra que el segmento de Aβ en cuestión se posiciona entre el aminoácido 22 y el aminoácido 49 en la molécula, ambas posiciones incluidas. Las posiciones de los epítopos P2 y P30 se indican de manera equivalente. Si dos o más fragmentos de Aβ diferentes se usan en la molécula, se muestran todas sus posiciones, es decir, 1 - 12 (a) + 49 - 64 (b) significa que el fragmento (a) está posicionado entre el aa 1 - 12 en la molécula y fragmento (b) de aa 49 - 64.

Además, si se presenta más de una copia del mismo fragmento en la molécula, las posiciones para todas las copias se muestran, es decir 1 - 12, 34 - 45, 61 - 72 muestra que las tres copias del fragmento de Aβ se coloquen entre la posición 1 - 12, 34 - 45 y 61 - 72, respectivamente, en la molécula.

Finalmente, la indicación de la longitud total de cada molécula incluye tanto el (los) fragmento (s) Aβ como los epítopos P2 y P30.

La variante 42 contiene dos sustituciones de aminoácidos en las posiciones 19 (phe a pro) y 35 (met a lys) como se indica en la columna que muestra los fragmentos Aβ.

Véase la figura 1 y la tabla anterior para detalles sobre puntos particulares para la introducción de los epítopos de células T extraños.

Un tipo adicional de construcción se prefiere especialmente. Ya que un objetivo de la presente invención es evitar la destrucción de las células que producen APP mientras que se desea la eliminación de la Aβ, parece factible preparar construcciones de autovacunas que comprenden solamente partes de la Aβ que no se exponen a la fase extracelular

cuando está presente en la APP. De este modo, tales construcciones necesitarían contener al menos un epítipo de células B derivados del fragmento de aminoácidos definidos por los aminoácidos 700 - 714 en la SEC ID N° 2. Ya que tal fragmento de polipéptido corto se predice que es solamente débilmente inmunógeno se prefiere que tal construcción de autovacuna conste de varias copias del epítipo de células B, por ejemplo en la forma de una construcción que tiene la estructura mostrada en la fórmula I en la descripción deseada de la presente invención, véase anteriormente. En esa versión de fórmula I, los términos amiloide_{el} - amiloide_{ex} son x epítipo de células B que contienen secuencias de aminoácidos derivadas de los aminoácidos 700 - 714 de la SEC ID N° 2. Una alternativa preferida es la posibilidad anteriormente detallada de acoplamiento del polipéptido amiloidogénico y el epítipo de auxiliares T extraño mediante un enlace amidaa una molécula vehículo de polisacárido - de esta forma presentaciones múltiples del epítipo "débil" constituido por los aminoácidos 700 - 714 de la SEC ID N° 2 se hace posible, y se hace también posible seleccionar una relación óptima entre los epítopos de las células B y de las células T.

Ejemplo Comparativo 2

15 *Inmunización de ratones transgénicos con proteínas Aβ y modificadas*

Construcción del ADN que codifica hAB43+-34. El gen hAB43+-34 se construyó en varias etapas. Primero se generó un fragmento de PCR con los cebadores ME n° 801 (SEC ID N° 10) y ME n° 802 (SEC ID N° 11) usando el cebador ME n° 800 (SEC ID N° 9) como molde. ME n° 800 codifica el fragmento abeta-43 humano con codones optimizados de *E. coli*. ME n° 801 y 802 añade sitios de restricción apropiados al fragmento.

El fragmento de PCR se purificó, se digirió con NcoI y HindIII, se purificó de nuevo y se clonó en un vector de expresión de *E. coli* pET28b+ digerido y purificado por NcoI - HindIII. El plásmido resultante que codifica Aβ humano de tipo salvaje se llama pAB1.

En la siguiente etapa el epítipo de auxiliares T, P2, se añade al extremo C de la molécula. El cebador ME n° 806 (SEC ID N° 12) contiene la secuencia que codificale epítipo P2, de este modo generando una fusión de P2 y Abeta-43 mediante la reacción de PCR.

La clonación se realizó preparando un fragmento de PCR con los cebadores ME n° 178 (SEC ID N° 8) y ME n° 806 usando pAB1 como molde. El fragmento se purificó, se digirió con NcoI e HindIII, se purificó otra vez y se clonó en un vector pET28b+ digerido y purificado por NcoI - HindIII. El plásmido resultante que codifica Aβ humano de tipo salvaje se llama pAB2.

De manera análoga, se preparó otro plásmido alojando la secuencia que codifica Aβ-43 con otro epítipo de auxiliares T, P30, añadido al extremo N. Esto se hizo preparando un fragmento de PCR con los cebadores ME n° 105 (SEC ID N° 7) y ME n° 807 (SEC ID N° 13) usando pAB1 como molde.

El fragmento se purificó, se digirió con NcoI e HindIII, se purificó otra vez y se clonó en un vector pET28b+ digerido y purificado por NcoI - HindIII. El plásmido resultante que codifica Aβ humano de tipo salvaje se llama pAB3.

En la tercera etapa, se añade una segunda repetición de Aβ-43 de manera C terminal al epítipo P2 del plásmido pAB2 mediante el cebador ME n° 809 (SEC ID N° 14). ME n° 809 al mismo tiempo crea un sitio BamHI inmediatamente después de la repetición Aβ-43. Un fragmento de PCR se preparó con los cebadores ME n° 178 y ME n° 809 usando pAB2 como molde. El fragmento se digirió con NcoI e HindIII, se purificó y se clonó en un vector pET28b+ digerido y purificado por NcoI - HindIII. El plásmido resultante que codifica Aβ humano de tipo salvaje se llama pAB4.

Finalmente, el epítipo P30 - secuencia de repetición Aβ-43 de pAB3 se clonó en el plásmido pAB4. Esto se realizó preparando un fragmento de PCR con los cebadores ME n° 811 (SEC ID N° 16) y ME n° 105 usando pAB3 como molde. El fragmento se purificó y se usó como cebador en una PCR posterior con ME n° 810 (SEC ID N° 15) usando pAB4 como molde. El fragmento resultante se purificó, se digirió con BamHI y HindIII y se clonó en el plásmido pAB4 purificado y digerido por BamHI y HindIII. El plásmido resultante pAB5, codifica la molécula hAB43+-34.

Todos los procedimientos de PCR y clonación se realizaron esencialmente como describen Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. 1989 "Molecular Cloning: a laboratory manual". 2ª edición. Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y.

Para todos los procedimientos de clonación, se usaron células K-12 de *E. coli*, cepa Top-10 F' (Stratagene, Estados Unidos). El vector pET28b+ se compró a Novagen, Estados Unidos. Todos los cebadores se sintetizaron en DNA Technology, Dinamarca.

Expresión y purificación de hAB43+-34. La proteína hAB43+-34 codificada por pAB5 se expresó en células BL21-Gold de *E. coli* (Novagen) como describen los proveedores del sistema de pET28b+ (Novagen).

La proteína hAB43+-34 expresada se purificó a más de 85% de pureza lavando de cuerpos de inclusión seguido de cromatografía de intercambio catiónico usando una estación de trabajo de purificación BioCad (PerSeptive Biosys-

ES 2 269 749 T3

tems, Estados Unidos) en presencia de urea 6 M. La urea se retiró después mediante diálisis por etapas contra una solución que contenía cantidades decrecientes de urea. El tampón final era Tris 10 mM, pH 8,5.

Estudio de inmunización. Ratones transgénicos para APP humana (proteían presursoar de Alzheimer) se usaron para este estudio. Estos ratones, llamados TgRND8, expresan una forma mutada de APP que da como resultado alta concentración de A β -40 y A β -42 en cerebros de ratones (Janus, C. y col.).

Los ratones (8 - 10 ratones por grupo) se inmunizaron con o bien Abeta- 42 (SEC ID N° 2, residuos 673 - 714, sintetizada por medio de una estrategia Fmoc convencional) o la variante hAB43+-34 (construcción 34 en la tabla del ejemplo 1, producido recombinantemente) cuatro veces a intervalos de dos semanas. Las dosis eran o bien 100 mg para A β o 50 mg para hAB43+-34. Se extrajo sangre de los ratones el día 43 (después de tres inyecciones) y después del día 52 (después de cuatro inyecciones) y se usaron los sueros para determinar el nivel de valoraciones específicas de anti-A β -42 usando un ELISA de A β -42 directo.

La siguiente tabla muestra las valoraciones medias relativas de anti- Abeta-42

Inmunógeno	Día 43 (después de 3 inmunizaciones)	Día 52 (después de 4 inmunizaciones)
A β -42	4000	3000
hAB43+-34	16000	23000

Como es evidente, las valoraciones de anticuerpos obtenidas cuando se inmunizan con la variante hAB43+-34 A β son aproximadamente 4 veces y 7,5 veces mayores después de e y 4 inmunizaciones, respectivamente, que las valoraciones obtenidas cuando se usa la A β -42 de tipo salvaje como inmunógeno. Este hecho se pone adicionalmente en perspectiva, cuando se considera el hecho de que la cantidad de variante usada para inmunización era solamente 50% de la cantidad de secuencia de tipo salvaje usada para inmunización.

Ejemplo Comparativo 3

Síntesis de una vacuna de copolímero de péptido A β usando poli-hidroxipolímero como agente de reticulación

Introducción. Una vacuna conjugada tradicional consta de un poli (péptido) acoplado a una proteína vehículo. El péptido contiene el (los) epítoto (s) de células B y la proteína vehículo proporciona epítoto (s) de células T. Sin embargo, la mayoría de la proteína vehículo será normalmente irrelevante como fuente para epítotos auxiliares T, ya que solamente una parte minorizaría de las secuencias totales contiene los epítotos auxiliares T relevantes. Tales epítotos se pueden definir y sintetizar como péptidos de por ejemplo 12 - 15 aminoácidos. Si estos péptidos están unidos covalentemente a los péptidos que contienen los epítotos de células B, por ejemplo, mediante un polihidroxipolímero activado, se puede obtener una molécula de vacuna que solamente contiene las partes relevantes. Además es posible proporcionar un conjugado de vacuna que contiene una relación optimizada entre epítotos de células B y células T.

Síntesis del poli-hidroxipolímero activado. Los poli-hidroxipolímeros tales como dextrano, almidón, azarosa, etc. se pueden activar con cloruro de 2,2,2- trifluoroetanosulfonilo (cloruro de tresilo), o bien por medio de una síntesis homogénea (dextrano) disuelto en N-metilpirrolidinona (NMP) o mediante una síntesis heterogénea (almidón, azarosa, dextrano reticulado) en por ejemplo, acetona.

Se añaden 225 ml de N-metil pirrolidinona seca (NMP) en condiciones secas a dextrano secado por congelación, soluble en agua (4,5 g, 83 mmoles), calidad clínica, PM (medio) 78.000) en un matraz de fondo redondo de 500 ml provisto de de un imán para agitar. El matraz se coloca en un baño de aceite de 60°C con agitación magnética. Cuando el dextrano se disuelve el matraz se retira inmediatamente del baño de aceite y la temperatura en el baño se reduce hasta 40°C. El matraz se coloca en el baño de aceite, todavía con agitación magnética, y se añade cloruro de tresilo (2,764 ml, 25 mmoles) gota a gota. Se retira el matraz del baño de aceite y se agita durante 1 hora a temperatura ambiente. El producto dextrano activado por tresilo, TAD) se precipita en 1200 ml de etanol frío (99,9%). Se decanta el sobrenadante y el precipitado se recoge en tubos de polipropileno de 50 ml en una centrífuga a 2000 rpm. El precipitado se disuelve en 50 ml de ácido acético al 0,5%, se dializa 2 veces contra 5000 ml de ácido acético al 0,5% y se seca por congelación. TAD se puede almacenar como un polvo secado por congelación a -20°C.

Un poli-hidroxipolímero insoluble, tal como azarosa o dextrano reticulado puede ser activado por tresilo preparando una suspensión del poli-hidroxipolímero en por ejemplo, acetona y realizar la síntesis como una síntesis de fase sólida. El poli-hidroxipolímero se puede recoger mediante filtración. Los procedimientos adecuados se reseñan en por ejemplo, Nilsson K y Mosbach K (1987), *Methods in Enzymology* 135, p. 67, y en Hermansson GT y col. (1992), en "Immobilized Affinity Ligand Techniques", Academic Press, Inc., p. 87.

Síntesis de las vacunas de copolímeros del péptido A beta. TAD (10 mg) se disuelve en 100 μ l de H₂O y se añaden 1000 ml de tampón carbonato, pH 9,6, que contiene 5 mg de A β -42 (SEQ ID N°: 2, residuos 673 - 714), 2,5 mg de P2 (SEQ ID N°: 4) y 2,5 mg de P30 (SEQ ID N°: 6). El A β -42 y los péptidos P2 y P30 todos contienen grupos de

lisina protegidos: éstos están en la forma de grupos de lisina protegidos por 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-iliden) etil (Dde). Los péptidos se preparan mediante una estrategia de Fmoc convencional, donde el Fmoc-Lys (Boc)-OH convencional se ha sustituido con Fmoc-Lys (Dde)-OH (obtenido de Novabiochem, n° de catálogo 04-12-1121), es decir, los grupos ϵ -amino en lisina se protege con Dde en lugar de Boc.

El valor de pH se mide y se ajusta hasta 9,6 usando HCl 1 M. Después de 2,5 horas a temperatura ambiente, se añade hidracina de una solución al 80% hasta una concentración de hidracina final de 8% y la solución se incuba durante otros 30 minutos a temperatura ambiente y después de esto se seca inmediatamente por congelación. El producto secado por congelación se disuelve en H₂O y se dializa de manera extensa contra H₂O antes del secado final por congelación.

La relación entre epítopes de células B (A β) y epítopes de auxiliares T (P2 y P30) en el producto final se puede variar usando diferentes concentraciones de estos péptidos en la etapa de síntesis. Además, el producto final se puede marcar con, por ejemplo, manosa (de manera que se dirija el conjugado a APC) añadiendo la manosa aminada al tampón carbonato en la etapa de síntesis.

Si se usa un poli-hidroxipolímero activado insoluble para combinar los péptidos que contienen el epítipo de células B y los epítopes de auxiliares T, el acoplamiento al polímero se puede realizar como una síntesis de fase sólida y el producto final se recoge y se purifica mediante lavado y filtración.

Como se ha mencionado en la descripción general, el planteamiento descrito actualmente para preparar una vacuna a base de péptidos se puede aplicar a cualquier otro antígeno de polipéptido donde sería conveniente preparar una vacuna peptídica puramente sintética y donde el antígeno polipeptídico en cuestión proporciona una inmunogenicidad suficiente en un solo péptido:

Ejemplo Comparativo 4

Vacunas de copolímeros de péptidos de síntesis

TAD (10 mg) se disuelve en 100 μ l de H₂O y se añaden 1000 ml de tampón carbonato, pH 9,6, que contiene 1 - 5 mg de péptido A (cualquier péptido inmunógeno de interés), 1 - 5 mg de P2 (epítipo P2 de toxoide de difteria) y 1 - 5 mg de P30 (epítipo P30 de toxoide de difteria). El valor de pH se mide y se ajusta hasta pH 9,6 usando HCl 0,1 M.

Después de 2,5 horas a temperatura ambiente la solución se seca inmediatamente después por congelación. El producto secado por congelación se disuelve en H₂O y se dializa de manera extensa contra H₂O o se desala sobre una columna de filtración por gel antes del secado final por congelación. En caso de que los péptidos tengan lisina en la secuencia la ϵ -amina en la cadena lateral de lisina se debe proteger mediante Dde usando el derivado Fmoc-Lys (Dde)-OH en la síntesis (Gregorius y Theisen 2001, presentado). Después del acoplamiento, se añade hidracina de una solución al 80% hasta una concentración final entre 1 - 20% y la solución se incuba durante otros 30 minutos a temperatura ambiente, se seca por congelación inmediatamente después y se dializa de manera extensa contra H₂O o se desala sobre una columna de filtración por gel antes del secado final por congelación. El principio de expone de forma esquemática en la Fig. 2.

Tales inmunógenos han sido utilizados por los inventores con un corto fragmento C-terminal de la proteína de *Borrelia burgdorferi* OspC como "péptido A" y un epítipo de toxoide de difteria (P2 o P30) como un péptido B. Los resultados de los estudios de inmunización con este antígeno revelaron que solamente el inmunógeno de la invención que incluye el fragmento OIPC y un epítipo de difteria extraño que se empareja con el haplotipo de MHC de los ratones vacunados eran capaces de inducir anticuerpos reactivos con OIPC en estos ratones. En contraste, una molécula que contiene solamente el péptido OIPC era incapaz de inducir la producción de anticuerpos y lo mismo era verdad para una mezcla de 2 inmunógenos en la que uno contenía la OspC y el otro el epítipo. Por lo tanto se concluye que la inclusión en el mismo vehículo polihidroxipolímero es superior, si no esencial, con el fin de inducir la producción de anticuerpos contra un hapteno peptídico corto como OspC.

Lista de referencias

Brookmeyer, R.; Gray, S.; Kawas, C. (1998). Projections of Alzheimer's Disease in the United States and the Public Health Impact of Delaying Disease Onset. *American Journal of Public Health*, 88(9), 1337-1342.

Buttini, M.; Orth, M.; Bellosta, S.; Akeefe, H.; Pitas, R.E.; Wyss-Coray, T.; Mucke, L.; Mahley, R.W. (1999). Expression of Human Apolipoprotein E3 or E4 in the Brains of Apoe^{-/-} Mice: Isoform-Specific Effects on Neurodegeneration. *Journal of Neuroscience*, 19, 4867-4880.

Clark, L.N.; Poorkaj, P.; Wszolek, Z.; Geschwind, D.H.; Nasreddine, Z.S.; Miller, B.; Li, D.; Payami, H.; Awert, F.; Markopoulou, K.; Andreadis, A.; D'Souza, I.; Lee, V.M.; Reed, L.; Trojanowski, J.Q.; Zhukareva, V.; Bird, T.; Schel-lenberg, G.; Wilhelmsen, K.C. (1998). Pathogenic Implications of Mutations in the Tau Gene in Pallido-Ponto-Nigral Degeneration and Related Neurodegenerative Disorders Linked to Chromosome 17. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 95(22), 13103-13107.

Gupta, R. K. et. al. (1998), *Dev Biol Stand.* 92: 63-78.

Hsiao K. et al. (1998) "Transgenic mice expressing Alzheimer amyloid precursor proteins", *Exp. Gerontol.* 33 (7-8), 883-889.

Hutton, M.; Lendon, C.L.; Rizzu, P.; Baker, M.; Froelich, S.; Houlden, H.; Pickering-Brown, S.; Chakraverty, S.; Isaacs, A.; Grover, A.; Hackett, J.; Adamson, J.; Lincoln, S.; Dickson, D.; Davies, P.; Petersen, R.C.; Stevens, M.; de Graaff, E.; Wauters, E.; van Baren, J.; Hillebrand, M.; Joosse, M.; Kwon, J.M.; Nowotny, P.; Che, L.K.; Norton, J.; Morris, J.C.; Reed, L.E.; Trojanowski, J.; Basun, H.; Lannfelt, L.; Neystat, M.; Fahn, S.; Dark, F.; Tannenberg, T.; Dodd, P.; Hayward, N.; Kwok, J.B.J.; Schofield, P.R.; Andreadis, A.; Snowden, J.; Craufurd, D.; Neary, D.; Owen, F.; Oostra, B.A.; Hardy, J.; Goate, A.; van Swieten, J.; Mann, D.; Lynch, T.; Heutink, P. (1998). Association of Missense and 5'-Splice-Site Mutations in Tau with the Inherited Dementia FTDP-17. *Nature*, 393, 702-705.

Janus, C. et. al. (2000), *Nature* **408**: 979 - 982.

Kas, H.S. (1997) *J Microencapsul* **14**: 689-711.

Leon, J.; Cheng, C.K.; Neumann, P.J. (1998). Alzheimer's Disease Care: Costs and Potential Savings. *Health Affairs*, 17(6), 206-216.

Lippa C. F. et al. (1998) Ab-42 deposition precedes other changes in PS-1 Alzheimer's disease. *Lancet* 352, 1117-1118.

Luo, J.-J.; Wallace, W.; Riccioni, T.; Ingram, D.K.; Roth, G.S.; Kusiak, J.W. (1999). Death of PC12 Cells and Hip- pocampal Neurons Induced by Adenoviral-Mediated FAD Human Amyloid Precursor Protein Gene Expression. *Journal of Neuroscience Research*, 55(5), 629-642.

Naruse, S.; Thinakaran, G.; Luo, J.-J.; Kusiak, J.W.; Tomita, T.; Iwatsubo, T.; Qian, X.; Ginty, D.D.; Price, D.L.; Borchelt, D.R.; Wong, P.C.; Sisodia, S.S. (1998). Effects of PSI Deficiency on Membrane Protein Trafficking in Neurons. *Neuron*, 21(5), 1213-1231.

National Institute on Aging Progress Report on Alzheimer's Disease, 1999, NIH Publication No. 99-4664.

Pietrobon, P.J. (1995), *Pharm Biotechnol.* 6: 347-61Poorkaj, P.; **Bird, T.D.; Wijsman, E.; Nemens, E.; Garruto, R.M.; Anderson, L.; Andreadis, A.; Wiederhold, W.C.; Raskind, M.; Schellenberg, G.D.** (1998). Tau Is a Candidate Gene for Chromosome 17 Frontotemporal Dementia. *Annals of Neurology*, 43, 815-825.

Schenk, D.; Barbour, R.; Dunn, W.; Gordon, G.; Grajeda, H.; Guido, T.; Hu, K.; Huang, J.; Johnson-Wood, K.; Khan, K.; Kholodenko, D.; Lee, M.; Liao, Z.; Lieberburg, I.; Motter, R.; Mutter, L.; Soriano, F.; Shopp, G.; Vasquez, N.; Vandever, C.; Walker, S.; Wogulis, M.; Yednock, T.; Games, D.; Seubert, P. (1999). Immunization with A-beta Attenuates Alzheimer's Disease-Like Pathology in the PDAPP Mouse. *Nature*, 400(6740), 173-177.

Shekunov, B. et. al. (1999), *J. Crystal Growth* 198/199: 1345 - 1351.

Spillantini, M.G.; Murrell, J.R.; Goedert, M.; Farlow, M.R.; Klug, A.; Ghetti, B. (1998). Mutation in the Tau Gene in Familial Multiple System Tauopathy with Presenile Dementia. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 95(13), 7737-7741.

Strittmatter, W.J.; Saunders, A.M.; Schmechel, D.; Pericak-Vance, M.; Enghild, J.; Salvesen, G.S.; Roses, A.D. (1993). Apolipoprotein E: High-Avidity Binding to A β and Increased Frequency of Type 4 Allele in Late-Onset Familial Alzheimer Disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 90, 1977-1981.

Vidal, R.; Frangione, B.; Rostagno, A.; Mead, S.; Revesz, T.; Plant, G.; Ghiso, J. (1999). A Stop-Codon Mutation in the BRI Gene Associated with Familial British Dementia. *Nature*, 399: 776-781.

Zheng H. (1996) "Mice deficient for the amyloid precursor protein gene". *Ann. N Y Acad. Sci.*, 777, 421-426.

York, P. (1999), *PSTT* 11: 430-440.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un inmunógeno que

- a) es un poliaminoácido que incorpora en la misma molécula una fracción sustancial de epítopes de células B de APP y/o A β de manera que el poliaminoácido reacciona hasta el mismo grado que lo hace la APP o A β con un suero policlonal inducido contra APP o A β , y al menos un epítipo T auxiliar extraño (epítipo T_H), y que contiene al menos un epítipo T_H extraño y una secuencia rota de APP o A β de manera que el poliaminoácido no incluye ninguna subsecuencia de la SEQ ID N°: 2 que se une de manera productiva a las moléculas de clase II de MHC que inicia una respuesta de célula T; o
- b) es un conjugado que comprende una estructura central de polihidroxipolímero al que está acoplado un poliamino ácido como se ha definido en a); o
- c) es un conjugado que comprende una estructura central de polihidroxipolímero al que está acoplado separadamente 1) el al menos un epítipo T_H extraño y 2) una secuencia rota de APP o A β como se ha definido en a); o
- d) es un ácido nucleico que codifica el poliaminoácido como se ha definido en a); o
- e) es un microorganismo no patógeno o virus que lleva un fragmento de ácido nucleico que codifica y expresa el poliaminoácido como se ha definido en a),

En la preparación de una preparación farmacéutica que contiene el inmunógeno para el tratamiento, prevención o mejora en un animal de la enfermedad de Alzheimer u otras enfermedades **caracterizadas** por la deposición de amiloide.

2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el poliaminoácido o conjugado incluye

- al menos un primer resto que efectúa la dirección del poliaminoácido a una célula presentadora de antígenos (APC), o un linfocito B, y/o
- al menos un segundo resto se introduce que estimula el sistema inmune, y/o
- al menos un tercer resto que optimiza la presentación del poliaminoácido al sistema inmune.

3. El uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el primero y/o el segundo y/o el tercer resto está/están unido (s) como grupos laterales, mediante unión covalente o no covalente a grupos químicos adecuados en la APP, o secuencia de A β .

4. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el poliaminoácido o conjugado comprende un polipéptido de fusión.

5. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el poliaminoácido o conjugado incluye una duplicación de al menos un epítipo de células B de APP o A β y/o una introducción de un hapteno.

6. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el epítipo de células T extraño es inmunodominante en el animal.

7. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el epítipo de células T es promiscuo, tal como un epítipo de células T que se selecciona entre un epítipo de células T promiscuo y una secuencia artificial de péptidos de unión de MHC-II.

8. El uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el epítipo de células T natural se selecciona entre un epítipo de toxoide de tétanos tal como P2 o P30, un epítipo de toxoide de difteria, un epítipo de hemaglutinina de virus de influenza, y un epítipo CS de *P. falciparum*.

9. El uso de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el poliaminoácido o conjugado comprende epítopes de células B que no están expuestos a la fase extracelular cuando está presente en una forma unida a células del polipéptido precursor de A β .

10. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el poliaminoácido o conjugado carece de al menos un epítipo de células B que se expone a la fase extracelular cuando está presente en una forma unida a células del polipéptido precursor de A β .

11. El uso de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el poliaminoácido o conjugado comprende como mucho 9 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID N°: 2, tal como como mucho 8, como mucho 7, como mucho 6, como mucho 5, como mucho 4, y como mucho 3 aminoácidos consecutivos.

12. El uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el poliaminoácido o conjugado comprende al menos una subsecuencia de la SEQ ID N°: 2 de manera que cada una de tal al menos una subsecuencia de la SEQ ID N°: 2 consta independientemente de tramos de aminoácidos seleccionados entre el grupo de aminoácidos de la SEQ ID N°: 2, 8 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID N° 2, 7 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID N° 2, 6 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID N° 2, 5 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID N° 2, 4 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID N° 2, y 3 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID N° 2,.

13. El uso de acuerdo con la reivindicación 11 ó 12, en el que los aminoácidos consecutivos comienzan en un residuo de aminoácidos seleccionado entre el grupo constituido por el residuo 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, y 714.

14. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que al menos dos copias del poliaminoácido o conjugado están unidos covalentemente o no covalentemente a una molécula vehículo capaz de efectuar la presentación de copias múltiples de determinantes antígenos.

15. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, variantes b) o c), en el que el poliamino ácido y el epítopo en el que el análogo comprende la secuencia de aminoácidos T_H están unidos al polihipóxi-polímero mediante un enlace amida.

16. El uso de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, variantes b) o c), en el que el polihipóxi-polímero es un polisacárido.

17. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el poliamino ácido o conjugado se ha formulado con un adyuvante que facilita la rotura de autotolerancia a autoantígenos.

18. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el tratamiento, prevención o mejora supone la administración de una cantidad eficaz del poliamino ácido o conjugado al animal mediante una vía seleccionada entre la vía parenteral tal como las vías intracutánea, la subcutánea, y la intramuscular; la vía peritoneal, la vía oral; la vía bucal; la vía sublingual; la vía epidural; la vía espinal; la vía anal; y la vía intracraneal.

19. El uso de acuerdo con la reivindicación 18, en el que la cantidad eficaz está entre 0,5 µg y 2000 µg del poliamino ácido o conjugado.

20. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 13, en el que el tratamiento, prevención o mejora supone la introducción de ácido (s) nucleico (s) que codifica (n) el poliamino ácido o conjugado en las células de animal y obteniendo por lo tanto la expresión *in vivo* mediante las células del (de los) ácido (s) nucleico (s) introducido (s).

21. El uso de acuerdo con la reivindicación 20, e el que el (los) ácido (s) nucleico (s) introducido (s) se selecciona (n) entre ADN desnudo, ADN formulado con lípidos cargados o no cargados, ADN formulado en liposomas, ADN incluido en un vector viral, ADN formulado con una proteína o polipéptido que facilita la transfección, ADN formulado con una proteína o polipéptido de dirección, ADN formulado con agentes precipitantes de calcio, ADN acoplado a una molécula vehículo inerte, ADN encapsulado en quitina o quitosan, y ADN formulado con un adyuvante.

22. El uso de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 18 - 21, en el que el tratamiento, prevención o mejora supone al menos una administración/introducción al año, tal como al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 6, y al menos 12 administraciones/introducciones.

23. El uso de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el tratamiento, prevención o mejora supone que APP o Aβ está regulada hacia abajo hasta tal grado que la cantidad total de amiloide disminuye o que la velocidad de formación de amiloide se reduce con significación crítica.

24. Un poliamino ácido o conjugado que se deriva de una APP o Aβ animal en el que se introduce una modificación que tiene como resultado la inmunización del animal con el poliamino ácido o conjugado induce la producción de anticuerpos contra la APP o Aβ autóloga del animal, y en el que el poliamino ácido o conjugado es como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 - 16.

25. Una composición inmunogénica que comprende una cantidad inmunogénicamente eficaz de un poliamino ácido o conjugado de acuerdo con la reivindicación 24, comprendiendo adicionalmente la composición un portador y/o vehículo y opcionalmente un adyuvante farmacéutica e inmunológicamente aceptable.

26. Un fragmento de ácido nucleico que codifica un poliamino ácido o conjugado de acuerdo con la reivindicación 24.

27. Un vector que lleva el fragmento de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 26, tal como un vector que es capaz de replicación autónoma.

28. El vector de acuerdo con la reivindicación 27 que se selecciona entre el grupo constituido por un plásmido, un fago, un cósmido, un minicromosoma, y un virus.

29. El vector de acuerdo con la reivindicación 27 ó 28, que comprende, en la dirección 5' → 3' y en enlace operable, un promotor para dirigir la expresión del fragmento de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 26, opcionalmente una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido guía que permite la secreción de o integración en la membrana del fragmento polipeptídico, el fragmento de ácido nucleico de la invención, de acuerdo con la reivindicación 26, y opcionalmente un terminador.

30. El vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 27 - 29 que, cuando se introducen una célula hospedadora, es capaz o incapaz de integrarse en el genoma de la célula hospedadora.

31. El vector de acuerdo con la reivindicación 29 ó 30, en el que el promotor dirige la expresión en una célula eucariótica y/o en una célula procariótica.

32. Una célula transformada que lleva el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 27 - 31, tal como una célula transformada que es capaz de replicar el fragmento de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 26.

33. La célula transformada de acuerdo con la reivindicación 32, que es un microorganismo seleccionado entre una bacteria, una levadura, un protozoo, o una célula derivada de un organismo multicelular seleccionado entre un hongo, una célula de insecto tal como una célula S₂ o SF, una célula vegetal, y una célula de mamífero.

34. La célula transformada de acuerdo con la reivindicación 32 ó 33, que expresa el fragmento de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 27, tal como una célula transformada, que secreta o lleva sobre su superficie, el análogo de acuerdo con la reivindicación 24.

35. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 13, variante e), en el que el tratamiento, prevención, o mejora supone la administración de un microorganismo o virus no patógeno que lleva un fragmento de ácido nucleico que codifica y expresa el poliamino ácido o conjugado.

36. Una composición para inducir la producción de anticuerpos contra amiloide, comprendiendo la composición

- un fragmento de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 26 o un vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 27 - 31, y
- un portador y/o vehículo y/o adyuvante farmacéutica e inmunológicamente aceptable.

37. Una línea celular estable que lleva el vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 27 - 31 y que expresa el fragmento de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 26, y que opcionalmente secreta o lleva el poliamino ácido o conjugado de acuerdo con la reivindicación 24 sobre su superficie.

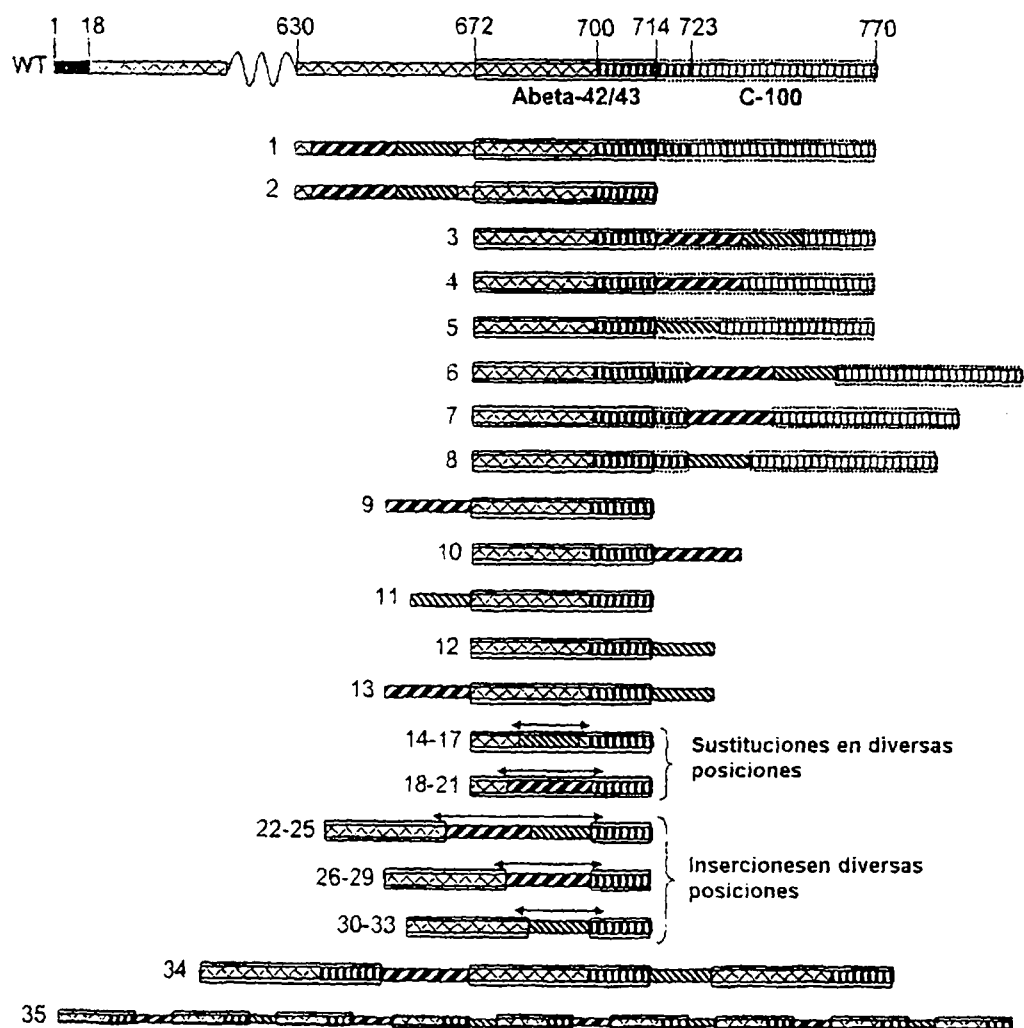


Fig. 1

SÍNTESIS DE PEPCoVAC

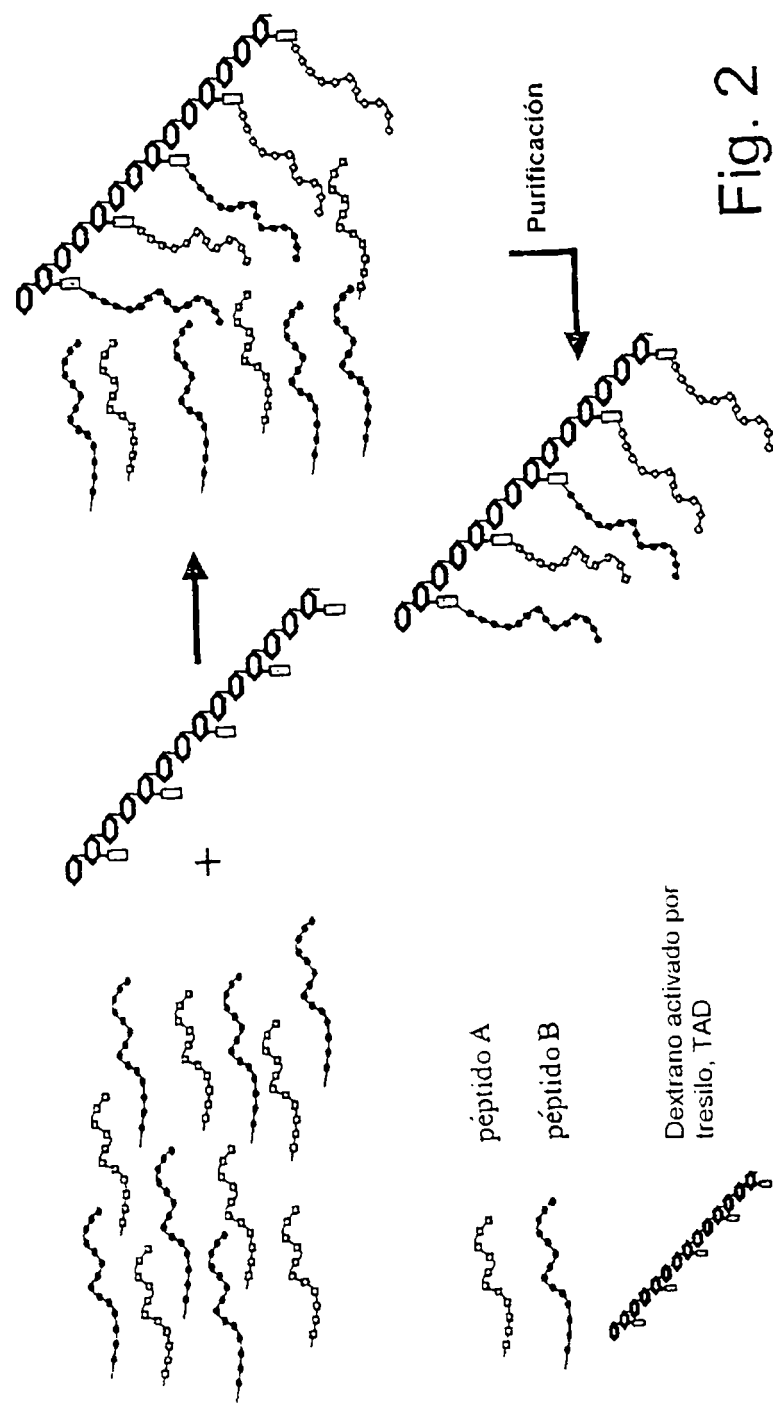


Fig. 2

ES 2 269 749 T3

LISTA DE SECUENCIAS

5 <100> Pharmexa A/S
<120> Procedimiento novedosos para la regulación hacia debajo de amiloide
<130> P1009PC1
10 <140>
<141>
15 <160> 16
<170> PatentIn versión 3.0
20 <210> 1
<211> 2313
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
25 <220>
<221> CDS
30 <222> (1) .. (2313)
<220>
<221> misc_característica
35 <222> (2098) .. (2169)
<223> nucleótidos que codifican región transmembrana
<220>
40 <221> misc_característica
<222> (2014) .. (2313)
<223> nucleótidos que codifican C-100
45 <220>
<221> misc_característica
<222> (2016) .. (2144)
<223> Abeta 42/43
50 <220>
<221> misc_característica
55 <222> (2014) .. (2142)
<223> Abeta 42/43
60
65

ES 2 269 749 T3

<400> 1

5	atg ctg ccc ggt ttg gca ctg ctc ctg ctg gcc gcc tgg acg gct cgg 48
	Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg
	1 5 10 15
10	gcg ctg gag gta ccc act gat ggt aat gct ggc ctg ctg gct gaa ccc 96
	Ala Leu Glu Val Pro Thr Asp Gly Asn Ala Gly Leu Leu Ala Glu Pro
	20 25 30
15	cag att gcc atg ttc tgt ggc aga ctg aac atg cac atg aat gtc cag 144
	Gln Ile Ala Met Phe Cys Gly Arg Leu Asn Met His Met Asn Val Gln
	35 40 45
20	aat ggg aag tgg gat tca gat cca tca ggg acc aaa acc tgc att gat 192
	Asn Gly Lys Trp Asp Ser Asp Pro Ser Gly Thr Lys Thr Cys Ile Asp
	50 55 60
25	acc aag gaa ggc atc ctg cag tat tgc caa gaa gtc tac cct gaa ctg 240
	Thr Lys Glu Gly Ile Leu Gln Tyr Cys Gln Glu Val Tyr Pro Glu Leu
	65 70 75 80
30	cag atc acc aat gtg gta gaa gcc aac caa cca gtg acc atc cag aac 288
	Gln Ile Thr Asn Val Val Glu Ala Asn Gln Pro Val Thr Ile Gln Asn
	85 90 95
35	tgg tgc aag cgg ggc cgc aag cag tgc aag acc cat ccc cac ttt gtg 336
	Trp Cys Lys Arg Gly Arg Lys Gln Cys Lys Thr His Pro His Phe Val
	100 105 110
40	att ccc tac cgc tgc tta gtt ggt gag ttt gta agt gat gcc ctt ctc 384
	Ile Pro Tyr Arg Cys Leu Val Gly Glu Phe Val Ser Asp Ala Leu Leu
	115 120 125
45	gtt cct gac aag tgc aaa ttc tta cac cag gag agg atg gat gtt tgc 432
	Val Pro Asp Lys Cys Lys Phe Leu His Gln Glu Arg Met Asp Val Cys
	130 135 140

ES 2 269 749 T3

	gaa act cat ctt cac tgg cac acc gtc gcc aaa gag aca tgc agt gag	480
	Glu Thr His Leu His Trp His Thr Val Ala Lys Glu Thr Cys Ser Glu	
5	145 150 155 160	
	aag agt acc aac ttg cat gac tac ggc atg ttg ctg ccc tgc gga att	528
10	Lys Ser Thr Asn Leu His Asp Tyr Gly Met Leu Leu Pro Cys Gly Ile	
	165 170 175	
	gac aag ttc cga ggg gta gag ttt gtg tgt tgc cca ctg gct gaa gaa	576
15	Asp Lys Phe Arg Gly Val Glu Phe Val Cys Cys Pro Leu Ala Glu Glu	
	180 185 190	
	agt gac aat gtg gat tct gct gat gcg gag gag gat gac tcg gat gtc	624
20	Ser Asp Asn Val Asp Ser Ala Asp Ala Glu Glu Asp Asp Ser Asp Val	
	195 200 205	
25		
	tgg tgg ggc gga gca gac aca gac tat gca gat ggg agt gaa gac aaa	672
30	Trp Trp Gly Gly Ala Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Asp Lys	
	210 215 220	
	gta gta gaa gta gca gag gag gaa gaa gtg gct gag gtg gaa gaa gaa	720
35	Val Val Glu Val Ala Glu Glu Glu Glu Val Ala Glu Val Glu Glu Glu	
	225 230 235 240	
	gaa gcc gat gat gac gag gac gat gag gat ggt gat gag gta gag gaa	768
40	Glu Ala Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu Asp Gly Asp Glu Val Glu Glu	
	245 250 255	
	gag gct gag gaa ccc tac gaa gaa gcc aca gag aga acc acc agc att	816
45	Glu Ala Glu Glu Pro Tyr Glu Glu Ala Thr Glu Arg Thr Thr Ser Ile	
	260 265 270	
50		
	gcc acc acc acc acc acc acc aca gag tct gtg gaa gag gtg gtt cga	864
55	Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Ser Val Glu Glu Val Val Arg	
	275 280 285	
	gag gtg tgc tct gaa caa gcc gag acg ggg ccg tgc cga gca atg atc	912
60	Glu Val Cys Ser Glu Gln Ala Glu Thr Gly Pro Cys Arg Ala Met Ile	
	290 295 300	

65

ES 2 269 749 T3

	tcc cgc tgg tac ttt gat gtg act gaa ggg aag tgt gcc ccatttc ttt	960
	Ser Arg Trp Tyr Phe Asp Val Thr Glu Gly Lys Cys Ala Pro Phe Phe	
5	305 310 315 320	
	tac ggc gga tgt ggc ggc aac cgg aac aac ttt gac aca gaa gag tac	1008
10	Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Arg Asn Asn Phe Asp Thr Glu Glu Tyr	
	325 330 335	
	tgc atg gcc gtg tgt ggc agc gcc atg tcc caa agt tta ctc aag act	1056
15	Cys Met Ala Val Cys Gly Ser Ala Met Ser Gln Ser Leu Leu Lys Thr	
	340 345 350	
20	acc cag gaa cct ctt gcc cga gat cct gtt aaa ctt cct aca aca gca	1104
	Thr Gln Glu Pro Leu Ala Arg Asp Pro Val Lys Leu Pro Thr Thr Ala	
25	355 360 365	
	gcc agt acc cct gat gcc gtt gac aag tat ctc gag aca cct ggg gat	1152
30	Ala Ser Thr Pro Asp Ala Val Asp Lys Tyr Leu Glu Thr Pro Gly Asp	
	370 375 380	
	gag aat gaa cat gcc cat ttc cag aaa gcc aaa gag agg ctt gag gcc	1200
35	Glu Asn Glu His Ala His Phe Gln Lys Ala Lys Glu Arg Leu Glu Ala	
	385 390 395 400	
40	aag cac cga gag aga atg tcc cag gtc atg aga gaa tgg gaa gag gca	1248
	Lys His Arg Glu Arg Met Ser Gln Val Met Arg Glu Trp Glu Glu Ala	
	405 410 415	
45	gaa cgt caa gca aag aac ttg cct aaa gct gat aag aag gca gtt atc	1296
	Glu Arg Gln Ala Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp Lys Lys Ala Val Ile	
50	420 425 430	
	cag cat ttc cag gag aaa gtg gaa tct ttg gaa cag gaa gca gcc aac	1344
55	Gln His Phe Gln Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu Gln Glu Ala Ala Asn	
	435 440 445	
60	gag aga cag cag ctg gtg gag aca cac atg gcc aga gtg gaa gcc atg	1392
	Glu Arg Gln Gln Leu Val Glu Thr His Met Ala Arg Val Glu Ala Met	
	450 455 460	

ES 2 269 749 T3

5	ctc aat gac cgc cgc cgc ctg gcc ctg gag aac tac atc acc gct ctg	1440
	Leu Asn Asp Arg Arg Arg Leu Ala Leu Glu Asn Tyr Ile Thr Ala Leu	
	465 470 475 480	
10	cag gct gtt cct cct cgg cct cgt cac gtg ttc aat atg cta aag aag	1488
	Gln Ala Val Pro Pro Arg Pro Arg His Val Phe Asn Met Leu Lys Lys	
	485 490 495	
15	tat gtc cgc gca gaa cag aag gac aga cag cac acc cta aag cat ttc	1536
	Tyr Val Arg Ala Glu Gln Lys Asp Arg Gln His Thr Leu Lys His Phe	
	500 505 510	
20		
	gag cat gtg cgc atg gtg gat ccc aag aaa gcc gct cag atc cgg tcc	1584
	Glu His Val Arg Met Val Asp Pro Lys Lys Ala Ala Gln Ile Arg Ser	
25	515 520 525	
	cag gtt atg aca cac ctc cgt gtg att tat gag cgc atg aat cag tct	1632
30	Gln Val Met Thr His Leu Arg Val Ile Tyr Glu Arg Met Asn Gln Ser	
	530 535 540	
	ctc tcc ctg ctc tac aac gtg cct gca gtg gcc gag gag att cag gat	1680
35	Leu Ser Leu Leu Tyr Asn Val Pro Ala Val Ala Glu Glu Ile Gln Asp	
	545 550 555 560	
40		
	gaa gtt gat gag ctg ctt cag aaa gag caa aac tat tca gat gac gtc	1728
	Glu Val Asp Glu Leu Leu Gln Lys Glu Gln Asn Tyr Ser Asp Asp Val	
	565 570 575	
45		
	ttg gcc aac atg att agt gaa cca agg atc agt tac gga aac gat gct	1776
	Leu Ala Asn Met Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser Tyr Gly Asn Asp Ala	
50	580 585 590	
	ctc atg cca tct ttg acc gaa acg aaa acc acc gtg gag ctc ctt ccc	1824
55	Leu Met Pro Ser Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr Val Glu Leu Leu Pro	
	595 600 605	
	gtg aat gga gag ttc agc ctg gac gat ctc cag ccg tgg cat tct ttt	1872
60	Val Asn Gly Glu Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gln Pro Trp His Ser Phe	
	610 615 620	
65		

ES 2 269 749 T3

5	ggg gct gac tct gtg cca gcc aac aca gaa aac gaa gtt gag cct gtt	1920
	Gly Ala Asp Ser Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn Glu Val Glu Pro Val	
	625 630 635 640	
10	gat gcc cgc cct gct gcc gac cga gga ctg acc act cga cca ggt tct	1968
	Asp Ala Arg Pro Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr Thr Arg Pro Gly Ser	
	645 650 655	
15	ggg ttg aca aat atc aag acg gag gag atc tct gaa gtg aag atg gat	2016
	Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Lys Met Asp	
	660 665 670	
20		
	gca gaa ttc cga cat gac tca gga tat gaa gtt cat cat caa aaa ttg	2064
	Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu	
25	675 680 685	
30	gtg ttc ttt gca gaa gat gtg ggt tca aac aaa ggt gca atc att gga	2112
	Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly	
	690 695 700	
35	ctc atg gtg ggc ggt gtt gtc ata gcg aca gtg atc gtc atc acc ttg	2160
	Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile Thr Leu	
	705 710 715 720	
40	gtg atg ctg aag aag aaa cag tac aca tcc att cat cat ggt gtg gtg	2208
	Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Val Val	
	725 730 735	
45		
	gag gtt gac gcc gct gtc acc cca gag gag cgc cac ctg tcc aag atg	2256
	Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys Met	
50	740 745 750	
55	cag cag aac ggc tac gaa aat cca acc tac aag ttc ttt gag cag atg	2304
	Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu Gln Met	
	755 760 765	
60	cag aac tag	2313
	Gln Asn	
	770	
65		
	<210> 2	
	<211> 770	

ES 2 269 749 T3

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5 <400> 2

10	Met	Leu	Pro	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Trp	Thr	Ala	Arg
	1				5					10					15	
15	Ala	Leu	Glu	Val	Pro	Thr	Asp	Gly	Asn	Ala	Gly	Leu	Leu	Ala	Glu	Pro
				20				25					30			
20	Gln	Ile	Ala	Met	Phe	Cys	Gly	Arg	Leu	Asn	Met	His	Met	Asn	Val	Gln
			35					40					45			
25	Asn	Gly	Lys	Trp	Asp	Ser	Asp	Pro	Ser	Gly	Thr	Lys	Thr	Cys	Ile	Asp
		50					55					60				
30	Thr	Lys	Glu	Gly	Ile	Leu	Gln	Tyr	Cys	Gln	Glu	Val	Tyr	Pro	Glu	Leu
	65					70					75				80	
35	Gln	Ile	Thr	Asn	Val	Val	Glu	Ala	Asn	Gln	Pro	Val	Thr	Ile	Gln	Asn
				85						90					95	
40	Trp	Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Gln	Cys	Lys	Thr	His	Pro	His	Phe	Val
				100					105					110		
45	Ile	Pro	Tyr	Arg	Cys	Leu	Val	Gly	Glu	Phe	Val	Ser	Asp	Ala	Leu	Leu
			115					120					125			
50	Val	Pro	Asp	Lys	Cys	Lys	Phe	Leu	His	Gln	Glu	Arg	Met	Asp	Val	Cys
		130					135					140				
55	Glu	Thr	His	Leu	His	Trp	His	Thr	Val	Ala	Lys	Glu	Thr	Cys	Ser	Glu
	145					150					155				160	
60	Lys	Ser	Thr	Asn	Leu	His	Asp	Tyr	Gly	Met	Leu	Leu	Pro	Cys	Gly	Ile
				165						170					175	
65																

ES 2 269 749 T3

5	Asp Lys Phe Arg Gly Val Glu Phe Val Cys Cys Pro Leu Ala Glu Glu	180	185	190
10	Ser Asp Asn Val Asp Ser Ala Asp Ala Glu Glu Asp Asp Ser Asp Val	195	200	205
15	Trp Trp Gly Gly Ala Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Asp Lys	210	215	220
20	Val Val Glu Val Ala Glu Glu Glu Glu Val Ala Glu Val Glu Glu Glu	225	230	235
25	Glu Ala Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu Asp Gly Asp Glu Val Glu Glu	245	250	255
30	Glu Ala Glu Glu Pro Tyr Glu Glu Ala Thr Glu Arg Thr Thr Ser Ile	260	265	270
35	Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Ser Val Glu Glu Val Val Arg	275	280	285
40	Glu Val Cys Ser Glu Gln Ala Glu Thr Gly Pro Cys Arg Ala Met Ile	290	295	300
45	Ser Arg Trp Tyr Phe Asp Val Thr Glu Gly Lys Cys Ala Pro Phe Phe	305	310	315
50	Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Arg Asn Asn Phe Asp Thr Glu Glu Tyr	325	330	335
55	Cys Met Ala Val Cys Gly Ser Ala Met Ser Gln Ser Leu Leu Lys Thr	340	345	350
60	Thr Gln Glu Pro Leu Ala Arg Asp Pro Val Lys Leu Pro Thr Thr Ala	355	360	365
65	Ala Ser Thr Pro Asp Ala Val Asp Lys Tyr Leu Glu Thr Pro Gly Asp	370	375	380

ES 2 269 749 T3

5	Glu Asn Glu His Ala His Phe Gln Lys Ala Lys Glu Arg Leu Glu Ala	385	390	395	400
10	Lys His Arg Glu Arg Met Ser Gln Val Met Arg Glu Trp Glu Glu Ala	405	410	415	
15	Glu Arg Gln Ala Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp Lys Lys Ala Val Ile	420	425	430	
20	Gln His Phe Gln Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu Gln Glu Ala Ala Asn	435	440	445	
25	Glu Arg Gln Gln Leu Val Glu Thr His Met Ala Arg Val Glu Ala Met	450	455	460	
30	Leu Asn Asp Arg Arg Arg Leu Ala Leu Glu Asn Tyr Ile Thr Ala Leu	465	470	475	480
35	Gln Ala Val Pro Pro Arg Pro Arg His Val Phe Asn Met Leu Lys Lys	485	490	495	
40	Tyr Val Arg Ala Glu Gln Lys Asp Arg Gln His Thr Leu Lys His Phe	500	505	510	
45	Glu His Val Arg Met Val Asp Pro Lys Lys Ala Ala Gln Ile Arg Ser	515	520	525	
50	Gln Val Met Thr His Leu Arg Val Ile Tyr Glu Arg Met Asn Gln Ser	530	535	540	
55	Leu Ser Leu Leu Tyr Asn Val Pro Ala Val Ala Glu Glu Ile Gln Asp	545	550	555	560
60	Glu Val Asp Glu Leu Leu Gln Lys Glu Gln Asn Tyr Ser Asp Asp Val	565	570	575	
65	Leu Ala Asn Met Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser Tyr Gly Asn Asp Ala	580	585	590	

ES 2 269 749 T3

5 Leu Met Pro Ser Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr Val Glu Leu Leu Pro
 595 600 605
 10 Val Asn Gly Glu Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gln Pro Trp His Ser Phe
 610 615 620
 15 Gly Ala Asp Ser Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn Glu Val Glu Pro Val
 625 630 635 640
 20 Asp Ala Arg Pro Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr Thr Arg Pro Gly Ser
 645 650 655
 25 Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Lys Met Asp
 660 665 670
 30 Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu
 675 680 685
 35 Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly
 690 695 700
 40 Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile Thr Leu
 705 710 715 720
 45 Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Val Val
 725 730 735
 50 Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys Met
 740 745 750
 55 Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu Gln Met
 755 760 765
 60 Gln Asn
 770

<210> 3

<211> 45

<212> ADN

<213> *Clostridium tetani*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(45)

ES 2 269 749 T3

<223> ADN que codifica el epítoto P2

<400> 3

```

5      cag tac atc aaa gct aac tcc aaa ttc atc ggt atc acc gag ctg      45
      Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu
          1             5             10             15

```

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

15 <213> *Clostridium tetani*

<400> 4

```

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

```

<210> 5

25 <211> 63

<212> ADN

<213> *Clostridium tetani*

30 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(63)

35 <223> ADN que codifica el epítoto P30

<400> 5

```

40      ttc aac aac ttc acc gta agc ttc tgg ctg cgt gtt ccg aaa gtt agc      48
      Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
          1             5             10             15
45      gct agc cac ctg gaa      63
      Ala Ser His Leu Glu
                20

```

50 <210> 6

<211> 21

<212> PRT

<213> *Clostridium tetani*

55 <400> 6

```

60      Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
          1             5             10             15
      Ala Ser His Leu Glu
                20

```

65 <210> 7

<211> 21

ES 2 269 749 T3

	<212> ADN	
	<213> Sintético	
	<223> Cebador de PCR sintético	
5	<400> 7	
	caactcagct tccttcggg c	21
10	<210> 8	
	<211> 21	
	<212> ADN	
15	<213> Sintético	
	<223> Cebador de PCR sintético	
	<400> 8	
20	agatctcgat cccgcgaaat t	21
	<400> 9	
25	atggatgcag aattccgtca cgactccggg taagaagttc accaccagaa actgggttttc	60
	ttcgcagaag atgttggttc caacaaagg gcaatcatcg gtctgatggg tggcgggtgtt	120
	gttatcgcga cctag	135
30	<210> 10	
	<211> 31	
	<212> ADN	
35	<213> Sintético	
	<223> Cebador de PCR sintético	
	<400> 10	
40	gccggccatg gatgcagaat tccgtcacga c	31
	<210> 11	
45	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Sintético	
50	<223> Cebador de PCR sintético	
	<400> 11	
55	gccggaagct tctaggtcgc gataacaaca ccgccaacc	39
	<210> 12	
	<211> 84	
60	<212> ADN	
	<213> Sintético	
	<223> Cebador de PCR sintético	
65		

ES 2 269 749 T3

<400> 12
 ccggcaagct tctacagctc ggtgataccg atgaatttgg agttagcttt gatgtactgg 60
 gtgcgcgataa caacaccgcc aacc 84

5
 <210> 13
 <211> 101
 <212> ADN
 10 <213> Sintético
 <223> Cebador de PCR sintético

<400> 13
 15 gccggccatg ggtttcaaca acttcaccgt tagcttctgg ctgcgtgttc cgaaagttag 60
 cggagagccac ctggaagatg cagaattccg tcacgactcc g 101

<210> 14
 20 <211> 172
 <212> ADN
 <223> Cebador de PCR sintético

25 <400> 14
 ggcaccaagct tggatccggc cgcgataaca acaccgccaa ccatcagacc gatgattgca 60
 cctttgttgg aaccaacatc ttctgcgaag aaaaccagtt tctggtggtg aacttcgtaa 120
 30 cctgcagtctgt gacggaaactc tgcattccagc tcggtgatac cgatgaattt gg 172

<210> 15
 <211> 30
 35 <212> ADN
 <213> Sintético
 <223> Cebador de PCR sintético

40 <400> 15
 ctggaagatg cagagttccg tcacgactcc 30

<210> 16
 45 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Sintético
 <223> Cebador de PCR sintético

50 <400> 16
 gcgccggatc ctcaacaac ttcaccgtta gcttc 35

55 <210> 17
 <211> 13
 <212> PRT
 60 <213> Sintético
 <223> Secuencia de unión de HLA DR sintético

<400> 17
 65 Ala Lys Phe Val Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala
 1 5 10