



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 279 869**

(51) Int. Cl.:
C07K 14/47 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **02737552 .6**

(86) Fecha de presentación : **20.06.2002**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1397380**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **17.03.2004**

(54) Título: **Péptido antigénico comprendido por múltiples copias de un epítipo de un polipéptido implicado en enfermedades de formación de placas y los procedimientos de uso correspondientes.**

(30) Prioridad: **20.06.2001 US 299201 P**
12.04.2002 US 371717 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.09.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.09.2007

(73) Titular/es: **Ramot at Tel Aviv University Ltd.**
P.O. Box 39296
Tel Aviv 61392, IL

(72) Inventor/es: **Solomon, Beka**

(74) Agente: **Trigo Peces, José Ramón**

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

Péptido antigénico comprendido por múltiples copias de un epítipo de un polipéptido implicado en enfermedades de formación de placas y los procedimientos de uso correspondientes.

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

La presente invención hace referencia a un producto antigénico que presenta péptidos antigénicos para inducir una respuesta inmune efectiva para la prevención o reabsorción de depósitos de una enfermedad con formación de placas, como contra el A β en la enfermedad de Alzheimer.

Descripción del tipo relacionado

La patología de la Enfermedad de Alzheimer (AD), la enfermedad conformacional más estudiada, se caracteriza principalmente por unas placas extracelulares amiloides y unos ovillos o haces neurofibrilares (Price *et al.*, 1993). La relación entre estas lesiones y el proceso de la enfermedad ha sido debatida durante mucho tiempo. La teoría dominante actual de etiología y patogénesis de la AD está relacionada con la hipótesis de cascada amiloide (Hardy y Allsop, 1991; Selkoe, 1996; Hardy 1997) que determina que la sobreproducción de péptido β amiloide (A β P o A β), o la imposibilidad de eliminar dicho péptido, conducen a AD principalmente a través de una deposición amiloide que está implicada en la formación de ovillos neurofibrilares. Estas lesiones están pues asociadas con la muerte celular, que se refleja en la degradación mental, que es la marca de esta demencia (Goate, 1991; Hardy *et al.*, 1998). Durante algunos años la hipótesis de la cascada amiloide ha ganado fuerza a través de la observación de que las mutaciones causantes de la AD han sido identificadas en la proteína precursora de la beta-amiloide (APP) y en los genes de la presenilina (Sherrington, *et al.*, 1995; Levy-Lahad, *et al.*, 1995).

Un gran número de investigadores ha estudiado la propensión de la A β P o sus fragmentos a reunirse y formar agregados insolubles (para su revisión, véase Maggio y Mantyh, 1996). Mientras que el segmento hidrofóbico del dominio terminal C del péptido β amiloide desarrolla una estructura de cadena β en soluciones acuosas, independientemente del pH o de las condiciones de temperatura, la región terminal N puede mostrar conformaciones y propiedades de solubilidad diferentes dependiendo de las condiciones del entorno (Hollosi *et al.*, 1989, Soto *et al.*, 1995; Barrow y Zargorsky, 1991).

La región de terminación N parece proporcionar los medios para los contactos interfibrilares, así como las interacciones entre un filamento y otras proteínas o estructuras celulares que a menudo se asocian con las deposiciones β -amiloides (Fraser *et al.*, 1993). El dominio de terminal N contiene secuencias que permiten la existencia de un equilibrio dinámico entre las conformaciones de la hélice α y la cadena β . Las perturbaciones del equilibrio entre diferentes estados de conformación del péptido beta-amiloide pueden estar ocasionadas por los cambios locales de pH, las alteraciones de la hidrofobia medioambiental o el enlace de otras proteínas (Soto *et al.*; Kirschenbaum y Daggett, 1995).

Disgregación in vitro y prevención de beta-amiloide fibrilar

Los filamentos amiloides, similares a los encontrados en las placas amiloides y el amiloide cerebrovascular, pueden ser unidos a partir del péptido β sintetizado químicamente en unas condiciones experimentales bien definidas *in vitro*, y el efecto en las células neurales puede ser neurotóxico o neurotrófico, dependiendo del estado fibrilar β -amiloide (Lorenzo y Yanker, 1990; Howlett *et al.*, 1995). La formación amiloide *in vitro* es un complejo proceso cinético y termodinámico y la reversibilidad del crecimiento de placas amiloides *in vitro* sugiere la existencia de un equilibrio de estado uniforme entre A β P en placas y en solución (Maggio y Mantyh, 1996). La dependencia de la polimerización A β P en interacciones péptido-péptido para formar una fibrilla de lámina beta-plegada y la influencia estimuladora de otras proteínas en la reacción sugieren que la formación amiloide puede estar sujeta a modulación.

La pregunta esencial es cómo prevenir, o, mejor dicho, cómo invertir los cambios conformacionales que tienen que llevar a la formación del rico conformador de proteínas patológicas rico en lámina β . Basándonos en el paradigma del mimetismo conformacional, se mantuvo la hipótesis de que los péptidos sintéticos cortos, "mini chaperonas", podrían ser diseñados para interactuar específicamente con el fragmento proteínico que estuviera experimentando los cambios conformacionales, y resultarían útiles para la estabilización de una conformación deseada añadiendo residuos específicos que favorecieran o desfavorecieran la adopción de un motivo estructural concreto (Soto, 1999).

Recientemente, el enfoque inmunológico en el tratamiento de enfermedades conformacionales recibió una mayor atención. Las interacciones anticuerpo-antígeno implican cambios conformacionales tanto en el anticuerpo como en el antígeno, que podrían alternar entre insignificantes y considerables. La unión o enlace de anticuerpos monoclonales de alta afinidad (mAbs) a regiones de alta flexibilidad y antigenicidad, podría modificar la dinámica molecular de todo el antígeno (Frauenfelder *et al.*, 1979; Karplus y Petsko, 1990).

Los mAbs interactúan con puntos estratégicos en los que se inicia el despliegue de la proteína, estabilizando de esta forma la proteína, evitando así una posterior precipitación (Solomon y Balas, 1991; Katzav-Gozansky *et al.*, 1996). Se descubrió que los anticuerpos monoclonales estabilizaban la conformación de un antígeno frente al desplie-

que incorrecto, además de reconocer un epítipo incorrectamente plegado, induciendo la conformación nativa en una proteína parcialmente desplegada (Blond & Goldberg, 1987; Carlson y Yamush, 1992; Solomon y Schwartz, 1995).

El laboratorio de los inventores actuales llevó a cabo una investigación de un amplio panel de mAbs frente a diferentes regiones de A β P y descubrió que sólo los mAbs dirigidos a una localización hacia las regiones N-terminales del péptido β presentan propiedades anti-agregantes, siendo capaces de prevenir la formación amiloidea y disolver los agregados ya formados. Los Mabs 6C6 y 10D5 surgidos contra la región N-terminal del A β P (residuos 1-28) pueden disociarse en fibrillas A β y restaurar la solubilidad del péptido. La unión de dichos anticuerpos interfirió con interacciones no covalentes entre las fibrillas amiloides y condujo al deterioro del conjunto fibrilar amiloide, dando una forma amorfa, incluso con índices molares Ab/péptido 1:10-100. La prevención de la agregación de péptido, y la solubilización de agregados ya formados, exigían una relación equimolar de Ab/péptido, indicando el nivel molecular de estas interacciones (Solomon *et al.*, 1996; Hanan et Solomon, 1996; Solomon *et al.*, 1997). El efecto de neurotoxicidad se vio que estaba correlacionado con la formación de agregados A β y con el alcance de la estructura de lámina β (Pike *et al.*, 1995). Se sabe perfectamente que los efectos de AB en la reducción MTT en células PC 12 ocurren con concentraciones inferiores a las que tienen como resultado la muerte celular (Sladowsky *et al.*, 1993) y representan unos marcadores tempranos del compromiso metabólico que conduce en última instancia a la degeneración celular. El enlace de mAb 6C6 con el beta-amiloide fibrilar evita la neurotoxicidad de A β , como se mide con el análisis químico MTT, como consecuencia de la disgregación de la fibrillas beta-amiloides.

Se aplicaron métodos de ingeniería de anticuerpos para minimizar el tamaño de mAbs (135-900 KdA) mientras que se mantenía su actividad biológica (Winter *et al.*, 1994). Estas tecnologías y la aplicación de la tecnología PCR para crear grandes repertorios genéticos de anticuerpos hacen que el fago de anticuerpos presente una herramienta versátil para el aislamiento y caracterización de anticuerpos Fv (scFv) de cadena única (Hoogenboom *et al.*, 1998). Los scFvs pueden ser desplegados en la superficie del fago para una posterior manipulación o pueden ser liberados como fragmento soluble de scFv (~25 Kd).

El laboratorio de los inventores presentes ha creado por ingeniería un scFv que muestra unas propiedades anti-agregación similares a la molécula IgM parental (Frenkel *et al.*, 2000a). En la estructura scFv, los genes de anticuerpo del hibridoma 508 IgM anti-A β P han sido clonados. El anticuerpo segregado muestra una actividad específica hacia la molécula ABP a la hora de evitar sus efectos tóxicos en células PC 12 cultivadas.

Los anticuerpos Fv de cadena única dirigidos a una localización son el primer paso para dirigir los anticuerpos terapéuticos al cerebro mediante enfoques intracelulares o extracelulares. La capacidad del anticuerpo de cadena única 508F (Fv) de disolver las fibrillas β A ya formadas sugiere que sólo el punto de unión antígeno de los anticuerpos está implicado en la modulación de la conformación beta-amiloide.

La secuencia EFRH N-terminal de péptido β -amiloide es el epítipo de anticuerpos antiagregantes

La existencia de secuencias que estén cinéticamente implicadas en el proceso de plegado ha sido sugerida previamente en otros sistemas y ha sido demostrada mediante experimentos de desnaturalización y renaturalización *in vitro* (Silent y Agart, 1989). Este tipo de secuencias, que pueden desempeñar una función en la vía de plegado, sugiere la posibilidad de que no sólo sirvan para el proceso de plegado, sino que también contribuyan a una estabilidad conformacional.

La identificación de los "epítipos de agregación" como secuencias que están relacionadas con los puntos en los que se inicia la agregación proteínica, y la preparación de los anticuerpos monoclonales contra dichas regiones, facilita la comprensión y prevención de los procesos de agregación proteínica.

La disgregación y la prevención de amiloide se descubrió que dependían de la ubicación de los epítipos en el β -amiloide y las características de unión de los mAbs (Solomon *et al.*, 1997; Hanan y Solomon, 1996). La región N-terminal del beta-péptido se sugirió que era el punto inmunodominante en A β P, Mabs se manifestó en contra de que los fragmentos A β P que comprendían los aminoácidos 1-16 en el laboratorio de los actuales inventores, demostraran que esta región presenta características antigénicas en comparación con el resto del péptido β -amiloide.

Utilizando la biblioteca de fago-péptido, compuesta por fago filamentoso manifestando péptidos combinatorios al azar, los residuos EFRH (SEQ ID N° 5) situados en las posiciones 3-6 del terminal N A β P fueron definidos como el epítipo de anticuerpos anti-agregación dentro de β AP (Frenkel *et al.*, 1998). El epítipo EFRH (SEQ ID N° 5) está disponible para la unión de anticuerpos cuando el péptido β -amiloide se encuentre en solución o sea un agregado, y el bloqueo de este epítipo por anticuerpos afecta a la dinámica de todas las moléculas, evitando la auto-agregación y permitiendo la resolubilización de agregados ya formados. La identificación del epítipo de mAb 2H3, que no pueda afectar a la formación del β -amiloide a pesar del hecho de que se une al terminal N del péptido beta-amiloide, arrojó una luz sobre la importancia de esta región secuencial específica, definida como un epítipo anti-agregante, sobre el comportamiento de toda la molécula A β P (Frenkel *et al.*, 1999).

Inmunización contra el beta-amiloide con fago EFRH como antígeno

El bloqueo del epítipo EFRH (SEQ ID N° 5) por los anticuerpos dirigidos al punto, se vio que modulaba la dinámica de agregación y la resolubilización de agregados ya formados. No obstante, estos péptidos sintéticos de pequeñas di-

5 mensiones, compuestos por epítomos de anticuerpos, suelen ser normalmente antígenos pobres que necesitan de la síntesis química de un péptido y han de ser acoplados a un portador de grandes dimensiones, pero, incluso entonces pueden inducir una respuesta inmune de baja afinidad. En el laboratorio de los actuales inventores se desarrolló un procedimiento nuevo de inmunización para aumentar los anticuerpos anti-AβP, utilizando como antígeno los fagos filamentosos que despliegan sólo el péptido EFRH (SEQ ID N° 5). Se un utilizado bacteriófagos filamentosos de forma extensiva en los últimos años para su “despliegue” en su superficie de grandes repertorios de péptidos generados mediante la clonación de oligonucleótidos al azar en el extremo 5' de los genes que se codifican para formar la proteína de recubrimiento del fago (Scott y Smith, 1990; Scott, 1992). Como se ha informado recientemente, los bacteriófagos filamentosos son excelentes vehículos para la expresión y presentación de péptidos extraños en una gran variedad de preparados biológicos (Greenwood *et al.*, 1993; Medynski, 1994). La administración de fagos filamentosos induce una fuerte respuesta inmunológica a los sistemas de efectos fágicos (Willis *et al.*; 1993; Meola *et al.*, 1995). Las proteínas de revestimiento fágico pIII y pVIII son proteínas que han sido frecuentemente utilizadas para el despliegue fágico. El enfoque fágico filamentoso recombinante para obtener antígenos para péptidos específicos tiene una ventaja principal en la síntesis química, ya que los productos obtenidos son el resultado de la fidelidad biológica de mecánica transnacional y no están sujetos a los niveles de pureza del 70-94% comunes en la síntesis de fase sólida de péptidos. El fago presenta una fuente de antígenos fácilmente renovable, ya que puede obtenerse material adicional mediante cultivos bacterianos.

La inmunización con el fago de despliegue EFRH (SEQ ID N° 5) podría aumentar, en un breve período de tiempo, la elevada concentración de anticuerpos de gran afinidad (IgG) capaces de evitar la formación de beta-amiloide y de minimizar en mayor medida los efectos tóxicos. El nivel de anticuerpos en los sueros se vio que estaba relacionado con el número de copias de péptidos por fago (Frenkel *et al.* 2000b).

Los anticuerpos resultantes de la inmunización por fago EFRH (SEQ ID N° 5) son similares en lo que se refiere a sus propiedades inmunológicas con respecto a los anticuerpos introducidos mediante inyección directa con beta-amiloide íntegro (Tabla 1). Estos anticuerpos reconocen el beta-péptido de longitud completa (1-40) y presentan propiedades anti-agregantes como los anticuerpos introducidos contra el péptido Aβ y/o el beta-amiloide (Frenkel *et al.* 2000b, 2001). La elevada inmunogenicidad de los fagos filamentosos permite el incremento de anticuerpos contra los auto-antígenos. La inmunización de los cerdos de Guinea con fago EFRH (SEQ ID N° 5) como antígeno, en la que la secuencia de AβP es idéntica a la secuencia en humanos, tiene como resultado la producción de auto-anticuerpos (Frenkel *et al.*, 2001).

TABLA 1

Inhibición competitiva por diversos péptidos dentro del BAP del anticuerpo serológico incrementado frente a f88-EFRH en comparación con anticuerpo antiagregante de amiloides

	PÉPTIDO	RESIDUOS	SUERO RATONES	anticuerpo antiagregante*
40	FRH	(residuos 4-6 de AβP)	$\sim 10^{-3}$ M	3×10^{-3} M
	EFRH	(residuos 3-4 de AβP)y (SEQ. ID N° 5)	6×10^{-6} M	
45				3×10^{-6} M
	DAEFRH	(residuos 1-6 de AβP) y (residuos 1-6 de SEQ ID N° 2)	$3,0 \times 10^{-6}$ M	8×10^{-7} M
50	DAEFRHD	(residuos 1-7 de AβP) y (residuos 1-7 de SEQ ID N° 2)	$5,0 \times 10^{-6}$ M	9×10^{-7} M
55	DAEFRHDSG	(residuos 1-9 de AβP) y (SEQ ID N° 2)	$5,0 \times 10^{-6}$ M	1×10^{-6} M
	BAP (1-40)		$3,0 \times 10^{-6}$ M	8×10^{-7} M
60	WVLD	(SEQ ID N° 3)	Nd**	Nd**

* Frenkel et al. 1998

65 ** Valor IC₅₀ menor de 10^{-2} M, que no puede ser detectado mediante un análisis químico ELISA.

Los datos anteriores demuestran que un bacteriófago recombinante que despliegue un autoepítipo puede ser utilizado como vacuna para inducir autoanticuerpos para el tratamiento de enfermedades. Los fagos filamentosos normalmente se cultivan utilizando una cadena de laboratorio de *E. coli*, y, aunque la cadena de ocurrencia natural pueda ser diferente, es razonable asumir que la dosificación del fago en los intestinos tendrá como resultado la infección de la flora intestinal natural. El laboratorio de los actuales inventores ha descubierto que los fagos que no son activados por UV son tan inmunogénicos como sus contrapuntos infecciosos. Hay evidencia de la existencia de fagos filamentosos de larga duración en los intestinos de los animales inmunizados que podrían explicar la duradera respuesta inmune encontrada en ratones inmunizados con píldoras (Zuercher *et al.*, 2000).

Debido a la elevada antigenicidad del fago, éste puede ser administrado por vía intranasal, que es la forma más sencilla para la inmunización sin el empleo del adyuvante. Puesto que los cambios olfatorios se supone que juegan un papel en la enfermedad de Alzheimer (Murphy, 1999), la inmunización mucosal es una inducción efectiva de anticuerpos específicos A β P IgA para evitar el efecto patológico local de la enfermedad.

La eficacia del antígeno fago-EFRH para incrementar los anticuerpos beta-amiloide antiagregantes (Solomon y Frenkel, 2000) versus el beta-amiloide íntegro indica que:

- a. la elevada inmunogenicidad del fago permite la producción de una elevada volumetría (titrimetría) de anticuerpos IgG en un breve período de semanas sin necesidad de administración adyuvante;
- b. autoexpresión del antígeno orientado a una inmunización de larga duración;
- c. el papel clave del epítipo EFRH en la formación de beta-amiloide y su elevada inmunogenicidad han llevado a anticuerpos antiagregantes que reconocen el péptido beta-amiloide íntegro, sustituyendo el uso de beta-amiloide fibrilado.

Rendimiento de anticuerpos anti-beta-amiloides en el modelo de ratones transgénicos de AD

Varios laboratorios han alimentado a ratones transgénicos que producen A β y desarrollan placas y daño neuronal en sus cerebros (revisión en Van Leuven, 2000). Aunque no desencadenan la extendida muerte neuronal y la demencia severa observada en la enfermedad humana, son utilizados como modelos para el estudio de la enfermedad de Alzheimer.

La producción de anticuerpos anti-beta-amiloides mediante inmunización con el A β fibrilar del modelo de ratón de AD lleva a la inhibición de la formación de placas amiloides y de neuritas distróficas asociadas en el cerebro del ratón (Schenk *et al.*, 1999), y aumenta la factibilidad de la vacunación contra el AD. No obstante, debido a la baja inmunogenicidad de las fibrillas A β , es necesario repetir la administración de antígenos en presencia del adyuvante para obtener los anticuerpos anti-A β P necesarios para afectar a la formación de placa. Incluso, la inmunización con fibrillas tóxicas puede inducir a una mayor acumulación del amiloide tóxico en sí. Otra serie de experimentos ha demostrado que la administración periférica de anticuerpos contra el beta-péptido amiloide era suficiente para reducir la carga de amiloide en los cerebros de ratones afectados (Bard *et al.*, 2000). A pesar de los relativamente modestos niveles de suero, los anticuerpos administrados pasivamente fueron capaces de penetrar en el sistema nervioso central, decorar placas e inducir la eliminación del amiloide preexistente. Las cantidades pequeñas de estos anticuerpos que cruzan la barrera sangre-cerebro (0,1% de niveles de suero) podrían ser suficientes para atenuar la agregación posterior de estas especies a placas fibrilares de núcleo denso A β . Puesto que esta masa común de A β es pequeña, y puesto que los anticuerpos para esta forma de A β podrían necesitar únicamente inhibir el conjunto de fibrillas A β para poder tener dicho efecto funcional, estos anticuerpos no tienen que producir necesariamente grandes cambios en el A β cerebral total. Estos anticuerpos convierten el A β , las placas de núcleo denso, en depósitos difusos A β .

Por comparación, de los anticuerpos testados sólo los mAbs 10D5, 3D6 y PabA β ₁₋₄₂ dirigidos a las regiones N-terminales del A β P demostraron una eficacia *in vivo*. En contraste, mAbs16C11, 21F12 y el anticuerpo de control TM2a, dirigidos a otras regiones de A β P, estaban inactivos. Este resultado no es coherente con la incapacidad de estos anticuerpos de decorar las placas después de la administración *in vivo*, y explica su incapacidad para activar la eliminación de placas (Bard *et al.*, 2000). Estos datos *in vivo* confirman los anteriores datos *in vitro* (Solomon *et al.*, 1996; 1997) que determinan que sólo los anticuerpos dirigidos a epítipos estratégicos, como el EFRH (SEQ ID N° 5), muestran las denominadas propiedades “tipo chaperona” en la disolución de las placas y en evitar su formación. Estos datos asimismo confirman que sólo es necesaria una pequeña cantidad de anticuerpos para interferir con interacciones no-covalentes entre fibrillas A β P para disgregarlas en una configuración no-tóxica amorfa.

Se utilizaron modelos animales adecuados para evaluar los efectos de los anticuerpos anti-beta-amiloides en el daño cerebral y en las pérdidas cognitivas ocasionadas por la enfermedad de Alzheimer. Efectivamente, la inmunización con el péptido beta-amiloide mejora el aprendizaje y la memoria, además de disminuir los daños cerebrales en los modelos de ratones (Janus *et al.*, 2000; Morgan *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2000). Los resultados apoyan una reducción previamente observada en la formación de depósitos amiloides, pero van más allá para demostrar que la inmunización también ha ofrecido a los ratones una cierta protección de los déficits de aprendizaje “espacial” que normalmente acompañan a la formación de placas. Ambos grupos sugieren que una reducción pequeña o selectiva en la deposición beta-amiloide puede ser suficiente como protección contra la demencia. Cada grupo ha utilizado pruebas diferentes de memoria espacial, en las cuales los ratones tuvieron que nadar hasta una plataforma situada visiblemente bajo

la superficie de un estanque de agua, y subirse a ella. Merece la pena señalar que ambos grupos comprueban que la inmunización con péptido beta-amiloide ofrece una protección significativa de los déficits de rendimiento dependientes de la edad y los amiloides que se ven en los controles no-inmunizados. En uno de los modelos de ratón principales de la enfermedad de Alzheimer se han visto pruebas de los defectos de aprendizaje que dependen de la edad (y están asociados a la acumulación cada vez mayor de péptido beta-amiloide) (Chen *et al.*, 2000). Los autores muestran que estos defectos pueden distinguirse de los déficits dependientes de la edad, pero sólo mediante meticolosos diseño y análisis experimentales.

Estos hallazgos indican que la sobreexpresión A β y/o placas A β están asociadas a una perturbación en la función cognitiva, y, lo que es importante, sugieren que algunas formas de aprendizaje y memoria, aunque no todas, son ensayos de comportamiento adecuados de los déficits cognitivos progresivos asociados a las patologías del tipo de la enfermedad de Alzheimer.

No se entiende el mecanismo por el cual los anticuerpos anti-beta-amiloides bloquean los déficits de aprendizaje y memoria. Una posibilidad es que los anticuerpos neutralicen A β en algún compartimento restringido o desplieguen una forma sin deposición de A β (por ejemplo, una forma soluble) que sea responsable de la pérdida de memoria observada (Morgan *et al.*, 2000). Recientemente, el A β soluble ha sido propuesto como la causa de la pérdida en sinapsis en ratones transgénicos APP, puesto que algunas líneas transgénicas desarrollan una reducción en la inmunoreactividad para la sinaptofisina en la circunvolución dentada sin desarrollo de depósitos de A β . Una segunda posibilidad es que la microglía activada por los anticuerpos pueda eliminar el A β depositado, permitiendo así una función cognitiva normal. Una explicación alternativa sería que la inmunización afecta al A β en una conformación particular, al igual que las formas de lámina β en las protofibrillas. La primera de las explicaciones es más probable debido a los conjuntos oligoméricos de A β en láminas beta ("protofibrillas") como inmunógeno, y los antisueros resultantes reconocidos preferentemente como formas de lámina beta de A β . Este aspecto resulta significativo ya que los anticuerpos monoclonales aplicados a epítomos A β que dan inicio a la agregación fibrilar, inhiben el conjunto de protofibrillas oligoméricas A β sintéticas *in vitro* (Solomon *et al.*, 1996). Por lo tanto, es posible que los anticuerpos inducidos en los ratones transgénicos puedan unirse a agregados oligoméricos de lámina beta e inhibir una posterior reunión. Esta especie A β resulta especialmente neurotóxica, un intermediario crítico en la fibrillogénesis y un predecesor preciso de neurodegeneración.

Resulta concebible, no obstante, que la inmunización pudiera modular el metabolismo A β por medio de varios mecanismos distintivos, incluida la destrucción de A β mediante fagocitosis de microglia (Schenk *et al.*, 1999) o mediante la función de efecto del anticuerpo para activar los receptores Fc capaces de eliminar todo el inmunocomplejo del A β fibrilar con los anticuerpos dirigidos a la localización.

La Patente estadounidense N° 5.229.490 describe un producto antigénico que comprende un homopolímero dendrítico que contiene residuos monoméricos, en donde se une una gama plural de secuencias de proteínas antigénicas mediante enlaces covalentes (MAPS). Este producto antigénico, adecuado para vacunas contra diversas enfermedades infecciosas, constituye un portador alternativo a los portadores naturales, como las proteínas, carbohidratos, lípidos o liposomas.

No obstante, este documento no hace referencia al uso de dichos productos para el tratamiento de enfermedades formadoras de placas, como la enfermedad de Alzheimer.

45 Resumen de la invención

La presente invención facilita un producto antigénico que incluye un péptido antigénico múltiple (MAP) que contiene una pluralidad de un epítipo de polipéptido formador de depósitos implicada en una enfermedad o desorden de formación de placas, como es la enfermedad de Alzheimer. Este MAP se basa en un polímero dendrítico constituido sobre una molécula central que, al menos, es bifuncional/difuncional y contiene grupos funcionales de hasta 16 terminales a los cuales va unido mediante enlaces covalentes un péptido antigénico que comprende un epítipo de amiloide β que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5.

La presente invención también proporciona un método para inducir una respuesta inmune contra un polipéptido formador de depósitos implicado en una enfermedad de formación de placas mediante la administración del producto antigénico de la presente invención. La respuesta inmune inducida es efectiva para la prevención, inhibición de formación y/o reabsorción de depósitos de una enfermedad formadora de placas, como frente al A β en la enfermedad de Alzheimer.

60 Breve descripción de los gráficos

La Figura 1 muestra una representación esquemática de una incorporación de un péptido antígeno múltiple (MAP) en una resina de Wang homo octovalente. La flecha representa el punto de predisposición al desventado y el YYEFRHDS (SEQ ID N°:1) sombreado es la secuencia de péptido antigénico.

La Figura 2 muestra una línea cronológica en semanas de las inyecciones y las hemorragias en la inmunización y el control de ratones inmunizados con el producto antigénico MAP-YYEFRHDS (SEQ ID N°:1).

La Figura 3 muestra un gráfico de las volumetrías (titrimetrías) de inmunoglobulinas en el día 22 a partir de una primera hemorragia después de una segunda inyección de YYEFRHDS (SEQ ID N°:1).

La Figura 4 muestra un gráfico de las volumetrías (titrimetrías) de IgG e IgM en los sueros de ratones inmunizados por ELISA contra el epítipo EFRH (SEQ ID N°:5) el día 26 después de una segunda hemorragia tras de una segunda inyección de MAP- YYEFRHDS (SEQ ID N°:1).

La Figura 5 presenta el gráfico de las volumetrías IgG en los sueros de ratones inmunizados el día 70 después de una segunda hemorragia tras de una tercera inyección de MAP-YYEFRHDS (SEQ ID N°:1).

La Figura 6 presenta el gráfico de las volumetrías IgG en los sueros de ratones inmunizados el día 105 después de una tercera hemorragia tras de una tercera inyección de MAP-YYEFRHDS (SEQ ID N°:1).

La Figura 7 presenta una comparativa de las volumetrías IgG en los sueros de ratones 17 semanas después de la tercera inyección de MAP-YYEFRHDS (SEQ ID N°:1).

La Figura 8 muestra una representación esquemática de otra incorporación de un péptido antígeno múltiple en una resina de Wang homo octovalente. La flecha representa el punto de predisposición al desventado y la secuencia de péptido antigénico YEFRHYEFRH (SEQ ID N°:4) tiene una repetición de la secuencia de epítipo A β EFRH (SEQ ID N°:5). Este MAP también es conocido como MAP-(EFRH)₂.

La Figura 9 presenta una línea cronológica en semanas por inyecciones y hemorragias en la inmunización y control de ratones inmunizados con el producto antigénico MAP-YEFRHYEFRH (SEQ ID N°:4) que se muestra en la Fig. 8 o el complejo entre estreptavidina y MAP biotinilado que se muestra en la Fig. 11.

La Figura 10 muestra un gráfico de volumetrías de IgG en el suero de ratones tras la inmunización con MAP-YEFRHYEFRH (SEQ ID N°:4).

La Figura 11 muestra una representación esquemática de un complejo entre estreptavidina y MAP biotinilado.

La Figura 12 muestra un gráfico de volumetrías de IgG en el suero de ratones tras la inmunización con el complejo entre estreptavidina y MAP-YYEFRHDS (SEQ ID N°:1) biotinilado a modo de incorporación del complejo que se muestra en la Fig. 11.

La Figura 13 muestra una representación esquemática de otra incorporación de un péptido antígeno múltiple en una resina de Wang homo tetravalente. En PAO hay presentes ocho copias de la secuencia péptida antigénica PrP (144-152) y se puede ver como DYEDRYRE (SEQ ID N° 6).

La Figura 14 muestra un gráfico de las volumetrías de IgG contra la secuencia péptida antigénica PrP (144-152) de la SEQ ID N° 6. Dos ratones fueron inmunizados cinco veces con un antígeno MAP de ocho copias de SEQ ID N° 6 como la secuencia péptida antigénica, que forma parte de la hélice 1 de PrP. La primera inmunización incluía un adyuvante completo de Freund mientras que las siguientes inmunizaciones incluían un adyuvante de Freund incompleto. El nivel de anticuerpos fue medida utilizando en análisis químico ELISA. Las Figuras 13 y 14 son sólo para fines ilustrativos.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de que un péptido antígeno múltiple portador de una multiplicidad del epítipo EFRH (SEQ ID NO:5) de A β P había suscitado una respuesta inmunológica sorprendentemente superior si se comparaba con la obtenida por inmunización con el A β P de longitud completa o el epítipo EFRH (SEQ ID NO:5) desplegado en la superficie de un bacteriófago filamentoso en un rango de cientos de miles de copias por fago. En vista de esta respuesta inmunológica inesperadamente superior al epítipo EFRH (SEQ ID NO:5) en un sistema péptido antígeno múltiple, la presente invención pretende en términos generales obtener productos antigénicos que transporten múltiples copias de un epítipo de un polipéptido formador de depósitos implicado en una enfermedad de formación de placas en un sistema péptido antígeno múltiple.

Tal como se utiliza aquí en la especificación y en la sección de reivindicaciones que aparecerá a continuación, el término "enfermedad de formación de placas" hace referencia a enfermedades que se caracterizan por la formación de placas mediante una proteína agregante (péptido de formación de placas), como son, por ejemplo, la beta-amiloide, la amiloide A serosa, la cistatina C, la cadena ligera IgG kappa o la proteína priónica (PrP), en enfermedades como, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer en su brote inicial, la enfermedad de Alzheimer en su brote posterior, la enfermedad de Alzheimer presintomática, la SAA amiloidosis, el síndrome islándico hereditario, senilidad, mieloma múltiple y para una encefalopatía espongiforme transmisible (TSE), conocidas también por enfermedades priónicas que se conoce que afectan a los humanos, como, por ejemplo, el kuru, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), la enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) y el insomnio familiar fatal (FFI) o a los animales como, por ejemplo, la cenurosis ovina o prurito lumbar y la encefalitis espongiforme bovina (BSE).

El producto antigénico, según la presente invención, se basa estructuralmente en un polímero dendrítico en el cual los antígenos/epítomos están unidos mediante enlace covalente a los ramales que irradian de una molécula central. Dichos polímeros dendríticos se caracterizan por concentraciones de grupos funcionales por unidad de volumen molecular, superiores a las de los polímeros ordinarios. Por regla general se basan en dos o más ramales idénticos que se originen a partir de una molécula central que tenga al menos dos grupos funcionales. Dichos polímeros han sido descritos por Denkelwater *et al.* en la Patente estadounidense N° 4,289,872 y por Tomalia *et al.* en varias patentes estadounidenses, incluidas las patentes estadounidenses N° 4,599,400 Y 4,507,466. Otros polímeros de su clase han sido descritos por Erickson en la Patente estadounidense N° 4,515,920. Se suele denominar a los polímeros, polímeros dendríticos porque su estructura puede estar simbolizada en forma de árbol con un tronco central y varias ramas. A diferencia de un árbol, no obstante, las ramas en los polímeros dendríticos son todas sustancialmente idénticas. Este sistema de dendritas ha sido designado con el nombre de sistema péptido antígeno múltiple (MAPS), que es el nombre comúnmente utilizado para una combinación de antígeno/portador de antígeno que se compone de dos o más, normalmente idénticas, moléculas antigénicas, unidas mediante enlace covalente a un núcleo dendrítico que está compuesto por unidades principales, que son como mínimo bifuncionales/difuncionales. Cada unidad bifuncional constituye una base de crecimiento añadido. El núcleo dendrítico de un sistema péptido antígeno múltiple puede estar compuesto por moléculas de lisina. Por ejemplo, una lisina va unida mediante enlaces péptidos a través de cada uno de sus grupos amino a dos lisinas adicionales. Esa molécula de segunda generación tiene cuatro grupos amino libres, cada uno de los cuales puede ir unido mediante enlace covalente a una lisina adicional para formar un péptido antígeno múltiple (MAP) octavalente. El proceso puede ser repetido para formar una cuarta generación, o superior, de moléculas. Con cada generación, el número de grupos de amino libres aumenta geométricamente y puede ser representado por 2^n , donde n es el número de la generación. Alternativamente, la molécula de segunda generación que tiene cuatro grupos amino libres puede ser utilizada para formar un MAP tetravalente, es decir, un MAP con cuatro péptidos unidos mediante enlace covalente al núcleo. Muchas otras moléculas, como, por ejemplo, el ácido aspártico y el ácido glutámico, los dos con dos grupos carboxílicos y un grupo amino para producir ácidos poliaspártico o poliglutámico con 2^n grupos carboxílicos libres, pueden ser utilizadas para formar el núcleo dendrítico de un sistema péptido antígeno múltiple.

Como quedará claro y aparente a partir del debate que se presenta a continuación, alguno de los portadores o moléculas centrales utilizadas para formar el producto de la presente invención, son de un peso molecular tal que normalmente no podrían ser consideradas polímeros. No obstante, puesto que su estructura básica es similar a los polímeros dendríticos, es conveniente describirlos como tales. Por lo tanto, el término "polímero dendrítico" será en algunas ocasiones utilizado aquí para definir el producto de la invención. El término incluye moléculas portadoras que son lo suficientemente grandes como para ser consideradas polímeros, así como aquellas que contienen una cantidad de tres monómeros.

La química necesaria para ejecutar la síntesis de polímeros dendríticos es conocida y está disponible. Con los ácidos amínicos, la química para bloquear grupos funcionales que no deberían reaccionar y después retirar los grupos bloqueantes cuando se desee que los grupos funcionales reaccionen, ha sido descrita en detalle en numerosas patentes y artículos en la literatura técnica. Los polímeros dendríticos y el MAP completo pueden ser producidos en una resina como en síntesis Merrifield y, entonces, retirados del polímero. Tomalia ha utilizado amoníaco o etilenediamina como molécula central. En este procedimiento, la molécula central reacciona con un éster acrilato mediante adición Michael y los grupos éster son retirados mediante hidrólisis. Las moléculas resultantes de la primera generación contienen tres grupos carboxílicos libres en el caso de amoníaco y cuatro grupos carboxílicos libres cuando se emplea etilenediamina. Tomalia amplía el polímero dendrítico con etilenediamina seguida de otro monómero de éster acrílico, y repite la secuencia hasta que se consigue el peso molecular deseado. No obstante, será aparente para una persona experimentada en la materia, que cada uno de los ramales del polímero dendrítico pueda ser prolongado mediante cualquiera de una serie de procedimientos seleccionados. Por ejemplo, cada ramal podrá ser ampliado mediante reacciones múltiples con moléculas de lisina.

Erickson utilizó la técnica Merrifield clásica, en la que un polipéptido de sustancialmente cualquier peso molecular deseado es cultivado a partir de un soporte resínico sólido. Cuando se utiliza la técnica para la preparación de polímeros dendríticos, la molécula de unión que une el polímero al soporte resínico es trifuncional. Uno de los grupos funcionales está implicado en la unión a la resina, los otros dos grupos funcionales sirven como punto de partida para el crecimiento del polímero. El polímero es retirado de la resina cuando se ha conseguido el peso molecular deseado. Un procedimiento estándar de desventado o separación es el tratamiento con fluoruro de hidrógeno líquido y sulfuro de dimetilo a 0°C durante una hora. Otro procedimiento, más satisfactorio, es la utilización de un complejo de fluoruro de hidrógeno y de sulfuro de dimetilo (HF:DMF), tal y como describe Tam *et al.* (1983). Este procedimiento minimiza en gran medida las reacciones secundarias y la pérdida del péptido.

Denkelwater, en un ejemplo de su proceso, utiliza lisina como molécula central. Los grupos amino de la molécula central son bloqueados por la conversión en grupos de uretano. El grupo carboxilo es bloqueado por la reacción con benzilhidrilamida de lisina con dos grupos amino libres que sirven como puntos de partida para el crecimiento del polímero dendrítico.

Este breve esbozo de los tres procedimientos disponibles para la producción de polímeros dendríticos debería ser el adecuado para la enseñar los principios básicos de la tecnología actual a aquellos instruidos en la materia. También deberían enseñar a éstos las características más reseñables de los polímeros, una de las más importantes es que los polímeros proporcionan un gran número de grupos funcionales disponibles en un pequeño volumen molecular. El resultado es que se puede conseguir una gran concentración de antígenos en un pequeño volumen uniendo el antígeno

a los grupos funcionales disponibles. Es más, el producto molecular resultante contiene una elevada proporción de antígeno en un portador relativamente menor, es decir, la relación del antígeno con el portador es bastante alta. En contraste con los productos convencionales, se utiliza como base para las vacunas. Estos productos convencionales suelen estar a menudo compuestos por una pequeña cantidad de antígeno en una gran cantidad de portador.

Otras características importantes del polímero dendrítico como portador antígeno son que se conoce la estructura exacta; no hay contaminantes que puedan, en sí, ser antigénicos, producir irritación de tejidos u otras reacciones no-deseables; es conocida la concentración exacta del antígeno; el antígeno se distribuye simétricamente en el portador; y el portador puede ser utilizado como base para más de un antígeno, con lo que pueden producirse vacunas polivalentes. La ventaja principal de los MAPS de esta invención como base para vacunas es que, a diferencia de sistemas previos, que utilizan portadores materiales, como la hemocianina de *Megathura crenulata* (lapa californiana), el toxoide del tétano y la albúmina serosa bovina, siendo los portadores de esta invención entidades químicas totalmente definidas en las que los antígenos se dispersan en concentraciones conocidas. Además, el antígeno comprende una gran parte de la molécula, y no una proporción relativamente pequeña y sin definir de la molécula, como en el caso de los portadores naturales.

Además del polímero dendrítico a modo de portador, puede utilizarse una molécula de estreptavidina o de avidina para ampliar más las dimensiones del producto antigénico y, por lo tanto, evitar el uso de adyuvantes conjuntamente para la inmunización, y, también, ofrecer la capacidad de proporcionar una pluralidad de MAP en una sola molécula. La estreptavidina y la avidina son proteínas tetraméricas que comportan un punto de enlace de biotina por monómero, y, por lo tanto, son capaces de enlazar hasta cuatro moléculas de biotina. El carácter multivalente de la estreptavidina o de la avidina puede ser utilizado para formar un complejo con uno a cuatro MAPs biotinilados a modo de gran producto antigénico. El número de localizaciones de biotina ligadas al MAP biotinilado puede ser ajustado variando la fracción molar estreptavidina (o avidina): MAP biotinilado, como 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 o MAP biotinilado excedente. De esta forma se permitiría el enlace de uno, dos, tres o cuatro MAP biotinilado en el complejo con estreptavidina o avidina. Después de unir mediante enlaces el MAP biotinilado a estreptavidina o avidina, podrán bloquearse los enlaces o puntos libres de la estreptavidina o de la avidina con biotina. La Fig. 11 muestra un complejo de estreptavidina con cuatro MAP octovalentes biotinilados.

Puede ser que el número de epítomos de un polipéptido formador de depósitos implicados en una enfermedad o desorden de formación de placas en el producto antigénico de la presente invención, afecte a la fuerza con que se genere una respuesta inmune mediante inmunización con el producto antigénico. De esta forma se podrá explicar por qué la presencia de dos epítomos por péptido antigénico en un MAP octovalente (por un total de 16 epítomos) en el ejemplo 2, ha provocado una reacción inmune más fuerte que el MAP octovalente del ejemplo 1 (por un total de 8 epítomos). Puesto que la respuesta inmune suscitada por el complejo estreptavidina:MAP del ejemplo 3, que porta un total de unos 32 epítomos por producto antigénico de la presente invención, aparece como menor que la respuesta inmune suscitada por el MAP octovalente del ejemplo 2 con un total de 16 epítomos, el número óptimo de epítomos por producto antigénico podría encontrarse en el rango de mayor de ocho pero menor de 32. Aunque este hecho no ha sido aún testado, el inventor actual espera que un complejo de estreptavidina con cuatro MAP tetravalente con un total de 16 epítomos sería equivalente a un complejo de estreptavidina con dos MAP octovalentes con un total de 16 epítomos siempre que los epítomos en el MAP de cuatro u ocho enlaces sean los mismos.

Tal y como se utiliza en el presente artículo, el término “biotina” o “biotinilado” pretende abarcar la biotina, la biocitina y otros análogos de la biotina, como la biotina amino caproato N-hidroxisuccinimida éster, la biotina ácido 4-aminobenzoico, la biotinamida caproil hidracida y otros derivados y conjugados de la biotina. Dentro de estos otros derivados cabe señalar la biotina-dextrano, la biotina-disulfuro-N-hidroxisuccinimida éster, la biotina-6-amido quinolina, la biotina hidrácido, la d-biotina-N-hidroxisuccinimida éster, la biotina maleimida, la d-biotina p-nitrofenil éster, los nucleótidos biotinilados y los aminoácidos biotinilados, como el N-épsilon-biotinil-l-lisina.

Los términos “estreptavidina” y “avidina” según se emplean en el presente se pretende que abarquen la avidina la glicoproteína de clara del huevo nativa y las formas deglicosiladas de la avidina o la estreptavidina, estreptavidinas producidas por cadenas selectas de *Streptomyces*, como, por ejemplo, *Streptomyces avidinii*, bien en su forma nativa 72 kDa, bien en su forma estable trunca 52-60 kDa, la avidina o la estreptavidina recombinante o químicamente sintetizada, las variantes de la misma con sustituciones de aminoácidos, derivados de las mismas con modificaciones químicas, y fragmentos de las mismas siempre que dicha “estreptavidina” y “avidina” se sigan acomodando al enlace de biotina. Algunos de estos materiales están comercialmente disponibles, por ejemplo, la avidina nativa, las avidinas deglicosiladas y la estreptavidina, o pueden ser preparadas por métodos conocidos (véase Green 1975, donde se explica la preparación de la avidina y de la estreptavidina; Bayer *et al.*, 1995, donde se explica la preparación de la avidina deglicosilada). La avidina recombinante y la estreptavidina recombinante pueden ser preparadas mediante técnicas de ADN recombinante, por ejemplo, como se describe en Chandra y Gray, 1990, y en Argarana *et al.*, 1986 en lo que se refiere a la avidina recombinante y a la estreptavidina recombinante respectivamente. Un derivado de la avidina, la EXTRAVIDINA, puede ser obtenido en varias formas funcionalmente derivadas o conjugadas de Sigma Chemical Company (St Louis, MO). Otro ejemplo de derivado de la avidina es la NEUTRALITE AVIDINA (Belovo Chemicals, Bastogne, Bélgica), una forma deglicosilada de la avidina que ha sido obtenida enzimáticamente, muestra un pH neutro, y acepta grupos de lisina libres para posteriores derivaciones.

Cuando haya que emplear MAPS para producir una vacuna, a la que nos referiremos aquí también como composición inmunizante, es preferible que la molécula central sea un aminoácido de ocurrencia natural, como la lisina, para que pueda ser gestionado por el cuerpo siguiendo las vías metabólicas habituales. No obstante, como se explicará en mayor profundidad después, podrán utilizarse aminoácidos que no sean de ocurrencia natural, incluso aquellos que no sean α -aminoácidos. Los ácidos, u otras moléculas simétricas empleadas en la formación de la molécula central podrán ser de la forma D o L.

Aunque los polímeros dendríticos han sido principalmente descritos anteriormente como polímeros de poliamida, resultará visible inmediatamente que los portadores de esta invención no son exclusivamente las poliamidas dendríticas. Cualquiera de una amplia gama de moléculas que tenga, al menos, dos grupos funcionales disponibles, podrá servir como molécula central. El polipropileno glicol, por ejemplo, podrá servir como base para el polímero dendrítico de poliéster. El ácido succínico con glicoles o aminos selectos podrá servir como molécula central para generar poliésteres o poliamidas. Pueden utilizarse diisocianatos para generar poliuretanos. El punto importante es que la molécula central tiene al menos dos grupos funcionales disponibles, de los cuales pueden generarse ramales diferentes mediante reacciones secuenciales tipo andamiaje, con moléculas adicionales, contando también con al menos dos grupos funcionales o de anclaje disponibles en cada ramal. En el caso más simple en el que la molécula central tenga dos grupos funcionales disponibles y cada generación posterior tenga dos grupos funcionales disponibles, el número de puntos de anclaje a los que podrán unirse las moléculas de antígenos se expresa mediante 2^n , siendo n el número de orden de generación.

Para crear un debate más completo de la química de polímeros dendríticos, se dirige la atención a Tomalia *et al.* (1985), Aharoni *et al.* (1982), y los siguientes números de patente estadounidense 4,289,872; 4,558,120; 4,376,861; 4,568,737; 4,507,466; 4,587,329; 4,515,920; 4,599,400; 4,517,122 y 4,600,535.

La presente invención, en sus incorporaciones preferibles en la actualidad, ofrece un sistema de péptidos de múltiples antígenos que comprende una base polimérica dendrítica con una pluralidad de puntos o localizaciones de anclaje unidos mediante enlace covalente a moléculas antigénicas que pueden ser las mismas o diferentes. Los polímeros comprenden una molécula nuclear central que cuenta al menos con dos grupos funcionales a los cuales van unidos mediante enlace covalente ramales moleculares con grupos funcionales terminales. Los grupos funcionales terminales de los ramales van unidos mediante enlace covalente a moléculas antigénicas, que se describen aquí principalmente como antígenos péptidos.

El antígeno seleccionado puede ser sintetizado por separado u obtenido de otra forma, y luego unido al portador. Alternativamente, el antígeno puede ser sintetizado en el portador. Por ejemplo, si el antígeno es un oligopéptido o polipéptido de un peso molecular relativamente bajo, y los grupos funcionales disponibles en el polímero son los grupos amino o los grupos carboxilo, el antígeno podría ser sintetizado ampliando cada ramal del polímero utilizando técnicas de síntesis de péptidos conocidas.

La Fig. 1 muestra la estructura de un polímero dendrítico MAP en una resina que puede ser empleada en la práctica en esta invención. Como se podrá ver, se trata de un producto de polilisina dendrítico de tres generaciones. Puede ser obtenido comercialmente de una serie de proveedores, por ejemplo como resina de Wang tetravalente u octovalente, con un núcleo MAP, es decir, Advanced ChemTech, Inc. Louisville, KY, o puede ser producido mediante técnicas de fase sólida convencional generando el polímero en una resina Pam o Pop. Consultar Mitchell *et al.*, (1978) y Tam *et al.*, (1980). El polímero es entonces separado de la resina utilizando, preferiblemente, HF:DMS. La polilisina dendrítica fue constituida a partir de un elemento de enlace de glicina, unido originalmente mediante un elemento de enlace de bencilo a la resina. Pueden utilizarse otros elementos de enlace, como la alanina. Por supuesto, el elemento de enlace puede ser omitido, de tal forma como se muestra en la Fig. 1, o bien se puede utilizar una pluralidad de moléculas de elementos de enlace.

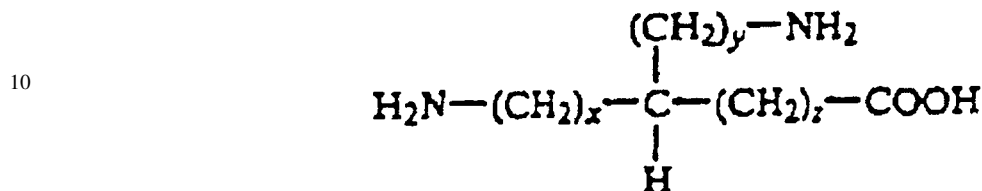
La Fig.1 muestra un antígeno péptido unido directamente a cada uno de los grupos funcionales disponibles de cada fracción de lisina terminal. En el caso en el que el antígeno sea un péptido relativamente corto, por ejemplo, de 6 a 14 residuos, podría ser útil para ampliar la polilisina por medio de un elemento de enlace como un tripéptido o tetrapéptido simple de glicina, alanina o beta-alanina. No obstante, en el caso de los péptidos antigénicos con más de 14 residuos, el elemento de enlace suele ser normalmente innecesario.

En la Fig. 8 se puede ver una incorporación preferible de un producto antigénico, en el que un antígeno péptido se une a cada uno de los grupos funcionales disponibles en cada fracción de lisina de un MAP octovalente. El MAP-YEFRHYEFRH (SEQ ID N° 4) que se muestra en la Fig. 8 también nos dirigimos a él en el presente como MAP-(EFRH)₂ porque tiene el epítipo EFRH (SEQ ID N° 5) repetido dos veces en el antígeno péptido. Como se puede demostrar en el ejemplo 2, este producto antigénico arrojaba una fuerte respuesta inmune, y es, por lo tanto, una incorporación preferible de la presente invención.

Posteriormente también se muestra un producto antigénico en el que un antígeno péptido PrP (144-152) (SEQ ID N°:6) va unido a cada uno de los grupos funcionales disponibles de cada fracción de lisina en un MAP octovalente, como se muestra en la Fig. 13. Como se demuestra en el ejemplo 4, este producto antigénico, también se produce como respuesta inmune y ha sido mencionado sólo para fines ilustrativos.

La presente invención ha sido descrita por conveniencia, principalmente, como se aplica a productos conformados sobre la lisina como molécula central. De hecho, la lisina y las moléculas parecidas a la lisina, como la omitina, nor-lisina y amino alanina son moléculas prioritarias para la constitución del producto de esta invención, ya que son relativamente fáciles de obtener, es sencillo trabajar con ellas y arrojan buenos resultados. Dichas moléculas centrales

5 pueden ser representadas por medio de la fórmula general:



15 donde x, y y z son enteros de 0 a 10, preferiblemente de 0 a 4, siempre que al menos una de ellas sea 1 y los grupos amino no puedan ir unidos al mismo átomo de carbono. En las moléculas más prioritarias, el total de x, y y z varía de 2 a 6, y los grupos amino van separados por, al menos, dos grupos metileno.

20 Otras moléculas centrales prioritarias son el etileno diamina y moléculas similares con cadenas más largas como las del propileno diamina y el butileno diamina. Dichas moléculas pueden estar representadas en la fórmula general:



25 donde n es un entero de 0 a 10, preferiblemente entre 0 y 3. Por supuesto, el amoníaco también puede ser empleado como molécula central.

El desarrollo de vacunas sintéticas contra un gran número de enfermedades se ha visto ampliamente acelerado por el reconocimiento de que una vacuna no tiene que estar basada en una proteína nativa, pero puede estar basada un segmento de bajo peso molecular de la proteína nativa. Estos segmentos, normalmente denominados determinantes inmunogénicos o epítomos, son capaces de estimular la producción de anticuerpos que protegerán, por eje., contra la infección producida por un vector infeccioso de un antígeno de proteína nativa. Los determinantes inmunogénicos son, a menudo, péptidos de bajo peso molecular, que pueden ser sintetizados convenientemente. Si no pueden ser sintetizados, pueden ser separados en forma pura de la proteína nativa en sí. de aquí en adelante, a estos inmunoestimulantes antigénicos los denominaremos péptidos antigénicos.

Las incorporaciones principales de esta invención pueden ser definidas a grosso modo como productos antigénicos que comprenden una molécula central dendrítica o polímero, a la cual van unidos mediante enlace covalente una pluralidad de antígenos tales como los péptidos antigénicos con un contenido de epítomos de un polipéptido formante de depósitos implicado en una enfermedad o desorden de formación de depósitos de placa, a los grupos funcionales disponibles. Los antígenos o epítomos pueden ser diferentes, aunque, preferiblemente, los antígenos o epítomos sean los mismos.

De una forma más específica, las principales incorporaciones de la invención pueden ser definidas como productos antigénicos o sistemas portadores que comprenden una base polimérica dendrítica que sea una molécula nuclear central y que tenga, al menos, dos grupos funcionales disponibles a los cuales se unan ramales de longitudes seleccionadas. Cada ramal de la molécula termina con un mínimo de un grupo funcional de anclaje disponible, muchos de los cuales van unidos mediante enlace covalente a moléculas antigénicas.

El péptido antigénico que va unido mediante enlaces covalentes a los grupos funcionales terminales del polímero dendrítico contiene, al menos, una copia de un epítomo de un polipéptido de formación de depósitos, es decir, amiloide β , que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°:5, implicado en la formación de depósitos en enfermedades o desórdenes que provoquen la formación de placas. Entre los ejemplos de enfermedades o desórdenes de formación de placas cabe señalar el brote o manifestación temprana de la enfermedad de Alzheimer, el brote o manifestación tardío de la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Alzheimer presintomática, la amiloidosis SAA, el síndrome islandés hereditario, senilidad, mieloma múltiple, kuru, enfermedad de Kreutzfeld-Jakob (CJD), enfermedad de Gwerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) e insomnio familiar fatal (FFI). Cuando en el péptido antigénico hay presentes más de una copia de un epítomo, como que haya, por ejemplo, dos o tres copias presentes en el péptido antigénico, un espaciador de residuos de ácido 1-8 amino, preferiblemente residuos 1-4, separa las copias múltiples del epítomo.

En la incorporación preferible de la presente invención, el epítome es EFRH (SEQ ID N°:5). En la Tabla 1 y en Frenkel *et al.* (1998) se muestran ejemplos no-limitadores de un péptido antigénico que contenga este epítomo preferible, siendo el prioritario el péptido antigénico de SEQ ID N°:1 sobre todos. En el caso de péptidos antigénicos pequeños, como los que tengan residuos 6-12, es preferible un polímero dendrítico octovalente (ocho grupos funcionales terminales) como la resina de Wang de MAP octovalente. No obstante, en péptidos más grandes, en el rango de unos 20 residuos de aminoácidos o más, es preferible un polímero dendrítico tetravalente, como la resina de Wang

MAP tetravalente. Un ejemplo preferible de péptido de mayores dimensiones es un péptido antigénico que contenga los residuos epítopos 106-126 de una proteína priónica.

WO 00/72876 y WO 00/72880 presentan, entre una lista de ejemplos posibles, el uso de MAP4 como portador de un péptido que contenga un epítipo A β . No existen datos en las publicaciones que indiquen que se hubieran hecho o ensayado muchas de estas construcciones. La inmunogenicidad inesperadamente superior de la estructura MAP de la presente invención no ha sido presentada ni sugerida en las dos publicaciones anteriores. En la medida en la que cualquier muestra o representación específica en estas publicaciones pudiera ser considerada como una anticipación de algún aspecto genérico de la presente invención, la representación genérica de la presente invención deberá ser entendida incluyendo una cláusula o condición de exclusión de las especies tales como las previamente mostradas en dichas publicaciones. Los aspectos de la presente invención, que no han sido anticipados por la divulgación de dichas publicaciones, no son claros a partir de la divulgación de dichas publicaciones por los resultados inesperadamente superiores que se presentan o alegan en la misma.

Una de las ventajas de la presente invención es que el polímero dendrítico puede servir como portador de dos o más antígenos diferentes, si así se desea. Una incorporación de la presente invención que utiliza este procedimiento se basa en el uso de una polilisina dendrítica o de otra molécula estructuralmente similar que emplea diferentes grupos amino bloqueantes, uno de los cuales es estable a la hidrólisis ácida, y el otro, es estable a la hidrólisis alcalina. De esta forma se hace posible la protección de cualquier de los grupos amino de la lisina por el método de protección ortogonal.

El fluorenil metil oxycarbonil (Fmoc) es un grupo protector de base inestable y es completamente estable a la desprotección ácida. El grupo bloqueante t-butoxicarbonil (Boc) es estable en condiciones clásicas, pero no es estable en condiciones levemente ácidas, como es el caso del ácido trifluoroacético al 50%. Eligiendo Boc-lis (Boc)-OH, Boc-lis (Fmoc)-OH, Fmoc-lis (Boc)-OH o Fmoc-lis (Fmoc)-OH, es posible situar un conjunto de antígenos en el grupo alfa amino de la lisina y otro en el grupo omega amino. Todos aquellos que tengan una experiencia o conocimiento de la técnica de la síntesis de péptidos, podrán diseñar rápidamente métodos para lograr los mismos tipos de productos utilizando diferentes grupos bloqueantes y otros polímeros dendríticos.

Algunas observaciones generales aplicables a la síntesis de MAPS serán de ayuda a aquellos que tengan un conocimiento de la técnica. Estas son:

1. Las síntesis normalmente requieren un tiempo prolongado de acoplamiento (de 2 a 4 horas).
2. El dimetil formamida es normalmente un disolvente más adecuado que el bicloruro de metileno.
3. Las resinas péptidas no deberán secarse en ninguna fase de la síntesis puesto que su resolución es extremadamente difícil.
4. El acoplamiento deberá ser cuidadosamente supervisado para poder realizarlo mediante el método cuantitativo de ninhidrina.
5. La mejor forma de dividir o separar el MAPS de la resina es el método desprotección de ácido mejorado, bien con HF o con TFMSA (Tam *et al.*, 1983 y 1986) en sulfuro de dimetilo para evitar las fuertes reacciones secundarias catalizadas ácidas.
6. Los MAPS tienden a agregarse con fuerza tras su separación del soporte resínico. La purificación se realiza mejor por medio de una diálisis extensiva en condiciones básicas y de fuerte desnaturalización, en un medio de diálisis que sea de 8M en urea y mercaptoetanol para eliminar los aditivos aromáticos no deseados de las reacciones de división, como el p-cresol y el tiocresol. Se puede realizar una purificación más exhaustiva posterior, si así se desea, utilizando una cromatografía de permeación en gel de alto rendimiento o una cromatografía de intercambio de iones. En la mayoría de los casos, los MAPS podrían ser utilizados directamente sin mayor necesidad de purificación.

Para aquellos con conocimientos profundos de la técnica, será evidente la posibilidad de muchas variaciones de las estructuras que se muestran y tratan en la presente patente. Todas estas variaciones se incluyen específicamente dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, véase la patente estadounidense n° 5,229,490, cuyo contenido íntegro se incorpora aquí por referencia.

El producto antigénico de la presente invención podría incluir una fracción de anclaje de membrana lipofílica que confiere unas propiedades adyuvantes entre otras ventajas. Una fracción de anclaje de membrana lipofílica en el término carboxilo del MP permite la amplificación posterior no-covalente mediante un liposoma o forma micelar. En correspondencia, el producto antigénico, según la presente invención, podría ser preparado en mayor profundidad con una gran variedad de vehículos, incluido el encapsulado dentro de los liposomas, para conseguir una mayor eficiencia de entrega y una dosificación reducida de forma concomitante. La preparación de liposomas es bien conocida dentro de la técnica.

Tripalmitoil-S-gliceril cisteína (P3C) y palmitoil cistina (PL) no son ejemplos limitadores de fracciones lipofílicas adecuadas para el producto antigénico de la presente invención. El P3C, que es un lipoaminoácido de *Esterichia coli* es un mitógeno de célula B que ha demostrado ser un adyuvante de particular éxito y no-tóxico. Véase la patente estadounidense n° 5,580,563 y DeFoort *et al.*, (1992), cuyos contenidos íntegros son incorporados en la presente por referencia.

Puesto que los productos de la presente invención proporcionan una elevada concentración de antígenos en un pequeño volumen molecular, en numerosos ejemplos, la composición inmunizadora de las vacunas de la invención podría ser empleada sin adyuvantes. Así, a modo de muestra, el ejemplo 3 demuestra que un complejo formado entre estreptavidina y MAP-YEFRHYEFRH (SEQ ID N°:4) tenía una fuerte respuesta inmune sin un adyuvante. Por regla general, cuanto mayor es el producto antigénico de la presente invención, menor necesidad habrá de adyuvante. No obstante, si se emplea un adyuvante, puede ser seleccionado de cualquier de los que normalmente se emplean para estimular los sistemas inmunogénicos de los mamíferos.

Las vacunas/composición inmunizadora de la invención podría ser definida como que comprende un portador farmacéuticamente aceptable, junto con una cantidad de producto antigénico de la invención, que es suficiente para producir una respuesta inmunológica. Una cantidad efectiva podría ser muy pequeña. Como se sabe, variará con el antígeno. Con el producto de la presente invención, debido a la elevada concentración de antígeno en un escaso volumen molecular, será inferior a las vacunas ordinarias que utilicen los mismos antígenos. la cantidad que constituye una cantidad efectiva puede variar dependiendo de si se pretende utilizar la vacuna como primer tratamiento o como tratamiento reforzante.

Podría ser conveniente suministrar los productos de la presente invención en forma de polvos liofilizados o secados por congelación listos para su reconstitución con un portador farmacéuticamente aceptable justamente antes de ser utilizados.

Los productos antigénicos de la presente invención pueden ser también empleados en varios ensayos diagnósticos, incluidos el radioinmunoensayo, la precipitación, la fijación complementaria, la inmunofluorescencia directa e indirecta, la aglutinación y el inmunoensayo vinculado a los enzimas. Para este tipo de ensayos, la fracción diagnóstica unida al polímero dendrítico puede llevar una etiqueta detectable, o puede hacerse que reaccione con un producto marcado o etiquetado, como un anticuerpo etiquetado o marcado para producir un producto de reacción detectable. Entre las marcas o etiquetas útiles cabe señalar etiquetas o marcas fluorescentes tales como la fluoresceína, la rodamina o la auramina. Se pueden emplear radioisótopos tales como el ^{14}C , ^{131}I , ^{125}I y ^{35}S . Entre las etiquetas o marcas de enzimas que pueden ser utilizadas se encuentra, por ejemplo, la peroxidasa de rábano silvestre, la glucosidasa β -D, la galactosidasa β -D, la ureasa, la glucosa oxidasa más peroxidasa y la fosfatasa ácida. Los Métodos para marcar o etiquetar son ya conocidos, y no necesitan ser descritos.

En aplicaciones profilácticas, el producto antigénico de la presente invención es administrado a un paciente susceptible o con el riesgo de una enfermedad formadora de placas, como es la enfermedad de Alzheimer, en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo, disminuir su severidad o retrasar el brote o comienzo de la enfermedad, incluidos los síntomas bioquímicos, histológicos y/o de comportamiento de la enfermedad, sus complicaciones y los fenotipos patológicos intermedios presentados durante el desarrollo de la enfermedad. En las aplicaciones terapéuticas, el producto antigénico de la invención es administrado a un paciente con sospechas de padecer, o que ya esté padeciendo, una enfermedad de estas características, en una cantidad suficiente para curar, o, al menos, detener parcialmente los síntomas de la enfermedad (bioquímica, histológica o de comportamiento), incluidas sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios, en el desarrollo de la enfermedad. En algunos métodos, la administración del producto antigénico reduce o elimina la deficiencia miocognitiva en pacientes que no hayan desarrollado aún las características de la patología de Alzheimer. Una cantidad adecuada para conseguir un tratamiento terapéutico o profiláctico se define como una dosificación terapéuticamente o profilácticamente efectiva. Tanto en los regímenes profilácticos como terapéuticos, el producto antigénico de la presente invención suele ser normalmente administrado en varias dosis hasta que se haya conseguido una respuesta inmune suficiente. Lo típico es controlar la respuesta inmune y repetir las dosis si la repuesta inmune comenzara a decrecer gradualmente.

La dosis efectivas del producto antigénico de la presente invención para el tratamiento de una enfermedad o desorden con formación de placas, como la enfermedad de Alzheimer, varían dependiendo de un gran número de factores diferentes, incluidos los medios de administración, el punto destino, el estado psicológico del paciente, si el paciente es humano o un animal, de otras medicaciones administradas, y de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Normalmente, el paciente es humano, pero los mamíferos no-humanos, incluidos los mamíferos transgénicos, también pueden ser tratados. Las dosis de tratamiento han de ser valoradas con una solución ácida para optimizar su seguridad y su eficacia. La cantidad de inmunógeno depende de si también se administra el adyuvante, con la posibilidad de necesitar mayores dosis si no existiera el adyuvante. Los 1-500 μg por paciente y, más comúnmente, a partir de los 5-500 μg por inyección para la administración humana. Ocasionalmente se suele utilizar una mayor dosis de 1-2 mg por inyección. Típicamente se suelen utilizar en torno a 10, 20, 50 ó 100 μg por inyección humana. La masa de inmunógeno también depende de la relación másica de epítipo inmunogénico dentro del inmunógeno con respecto a la masa de inmunógeno en conjunto. La periodicidad de las inyecciones puede variar de manera significativa desde una vez al día, a una vez al año, o una vez cada diez años. En un día determinado que se dosifica el inmunógeno, la dosis es mayor que 1-100 μg /paciente en la ausencia de adyuvante. Un régimen típico consiste en una inmunización seguida de inyecciones de refuerzo 1, 2 y 12 meses después. Otro régimen considera una inyección cada dos meses

de por vida. Como alternativa, las inyecciones de refuerzo pueden darse con carácter regular, según se vaya indicando por el control de la respuesta inmune.

El producto antigénico de la presente invención para inducir una respuesta inmune, puede ser administrado por vía parenteral, topical, intravenosa, oral, subcutánea, intraarterial, intracraneal, intraperitoneal, intranasal o intramuscular para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico. La vía más normal de administración de un agente inmunogénico es la subcutánea, aunque otras vías podrían resultar igualmente efectivas. La vía más típica de administración de un agente inmunogénico es la subcutánea, aunque otros recursos podrían resultar igualmente efectivos. La siguiente vía más común es la inyección intramuscular. Este tipo de inyección se aplica de forma típica en los músculos del brazo o de la pierna.

El producto antigénico de la invención podría, en algunos casos, ser administrado en combinación con un adyuvante. Puede utilizarse toda una variedad de adyuvantes en combinación con el producto antigénico de la invención para obtener una respuesta inmune. Los adyuvantes preferentes aumentan la respuesta intrínseca a un inmunógeno sin provocar cambios conformacionales en el inmunógeno que pudieran afectar a la forma cualitativa de la respuesta. Entre los adyuvantes preferidos cabe citar el hidróxido de aluminio y el fosfato de aluminio, 3 De-O-acilado monofosforil lípido A (MPLTM) (véase GB 2220211, RIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton, Montana, ahora forma parte de Corixa). StimulonTM QS-21 es un glicósido triterpeno o saponina aislados de la corteza interna del árbol Quillaja Saponaria Molina hallado en Sudamérica (véase Kensil *et al.*, 1995); la patente estadounidense n° 5,057,540 (Aquila BioPharmaceuticals, Framingham, MA). Otros adyuvantes son las emulsiones de aceite en agua (como el escualeno o el aceite de cacahuete), opcionalmente en combinación con estimulantes inmunes, como el monofosforil lípido A (véase Soute *et al.*, 1997). Otro adyuvante es el CpG (WO 98/40100). Alternativamente, el producto antigénico puede ir acoplado a un adyuvante. No obstante, dicho acoplamiento no debería cambiar sustancialmente la conformación del epítipo como para afectar a la naturaleza de la repuesta inmune a ello. Los adyuvantes pueden ser administrados como un componente de una composición con un producto antigénico de la invención administrada por separado, antes, simultáneamente, o después de la administración del producto antigénico.

Una clase preferible de adyuvantes son las sales de aluminio (alud), como el hidróxido de aluminio, el fosfato de aluminio, el sulfato de aluminio. Dichos adyuvantes pueden ser utilizados con o sin otros agentes específicos inmunoestimulantes, como el MPL o el 3-DMP, QS-21, los aminoácidos poliméricos o monoméricos, como el ácido poliglutámico o la polilisina. Otra clase de adyuvantes son las formulaciones de una emulsión de aceite en agua. Dichos adyuvantes pueden ser utilizados con o sin otros agentes específicos inmunoestimulantes, como los péptidos de muramil (por ejemplo, N-acetil muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (ni MDP), N-acetilmuramil-L-alanila-D-isoglutaminil-L-alanin-2-(1'-2'dipalmitoil-sn-glicero -3-hidroxifosfori)-etilamina (MTP-PE), n-acetilglucasaminil-N-acetilmuramil-L-Al-D-isoglu-L-Ala-dipalmitoxi propilamida (DTP-DPP) theramidaTM), u otros componentes de la pared celular bacteriana. Entre las emulsiones de aceite en agua cabe señalar (a) MF59 (WO 90/14837), con un contenido del 5% de escualeno, un 0,5% Tween 80 y un 0,5% Span 85 (con un contenido opcional de varias cantidades de MTP-PE) formuladas en partículas submicrónicas, utilizando un microfluidificador como el Modelo 110Y microfluidificador (Microfluidics, Newton MA), (b) SAF, con un contenido del 10% de escualeno, un 0,4% Tween 80, un 0,5% de polímero plurónico-bloqueado L121 y thr-MDP, bien microfluidificado en una emulsión submicrónica o revuelta para generar una emulsión con partículas de mayor tamaño, y (c) el sistema adyuvante RibiTM (RAS) (Ribi ImmunoChem, Hamilton, MT) con un contenido del 2% de escualeno, 0,2% Tween 80 y uno o varios componentes de pared celular bacteriana del grupo que consta de 5 monofosforil lípico A (MPL), tiehalosa dimicolato (TDM), y esqueleto de pared celular (CWS), preferiblemente MPL + CWS (DetoxTM). Otra clase de adyuvantes preferibles en adyuvantes saponi, como el StimulonTM (QS-21, Aquila, Framingham, MA) o partículas generadas del mismo como ISCOMs (complejos inmunoestimulantes) e ISCOMATRIX. Entre otros adyuvantes se incluyen el adyuvante completo de Freund (CFA) y el adyuvante incompleto de Freund (IFA). Otros adyuvantes que se incluyen son las citoquinas, como las interleuquinas 8IL-1, IL-2 e IL-12), el factor estimulante de colonias macrófagas (M-CSF), factor de necrosis de tumor (TNF).

Un adyuvante puede ser administrado con un inmunógeno como composición única, o puede ser administrado antes, simultáneamente o después de la administración del inmunógeno. El inmunógeno y el adyuvante pueden ser envasados y suministrados en el mismo vial o pueden ser envasados en viales separados y ser mezclados antes de su uso. El inmunógeno y el adyuvante suelen ser típicamente envasados con una etiqueta en la que se indique la aplicación terapéutica en cuestión. Si el inmunógeno y el adyuvante se envasan por separado, entonces el envase deberá incluir las instrucciones de mezclado antes de su uso. La opción de un adyuvante y/o portador depende de la estabilidad de la formulación inmunogénica que contiene el adyuvante, la vía de administración, el esquema de dosificación, la eficacia del adyuvante para la especie que se va a vacunar, y, en los humanos, un adyuvante farmacéuticamente aceptable es aquel que ha sido aprobado o puede ser aprobado para la administración humana por los organismos reglamentarios pertinentes. Por ejemplo, el adyuvante completo de Freund no es adecuado para la administración humana. Alum, MPL y QS-21 son preferibles. Opcionalmente, se pueden utilizar simultáneamente dos o más adyuvantes diferentes. Entre las combinaciones preferibles cabe citar el alum con MPL, el alum con QS-21, el MPL con QS-21 y el alum, el QS-21 y el MPL juntos los tres. Asimismo, el adyuvante incompleto de Freund puede ser utilizado (Chang *et al.*, 1998), opcionalmente en combinación con QS-2 y WPL, y todas las combinaciones de éstos.

El producto antigénico de la presente invención suele administrarse a menudo como composiciones farmacéuticas que comprenden un agente activo, es decir, el producto antigénico, y una variedad de otros componentes farmacéuticamente aceptables. Véase la Remington's Pharmaceutical Science (Ciencia Farmacéutica de Remington) (15ª edic.,

Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1980). La forma preferida depende del modo de administración y de aplicación terapéutica pretendidos. Las composiciones también contemplan, dependiendo de la formulación deseada, portadores no tóxicos, farmacéuticamente aceptables, que son definidos como vehículos normalmente utilizados para formular composiciones farmacéuticas para su administración animal o humana. El diluyente es seleccionado para no afectar a la actividad biológica de la combinación. Algunos ejemplos de estos diluyentes son el agua destilada, una solución salina tampón de fosfatos, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. Además, la composición farmacéutica o la formulación podrían incluir también otros portadores, adyuvantes o agentes auxiliares, o estabilizantes no-tóxicos, no-terapéuticos, no-inmunogénicos y similares.

Las composiciones farmacéuticas también pueden ser macromoléculas grandes, de lenta metabolización como las proteínas, polisacáridos como el quitosano, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos y copolímeros (como la sefarosaTM funcionalizada de látex, la agarosa, la celulosa, y similares), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, y agregados lípidos (como gotas de aceite o liposomas). Adicionalmente, estos portadores pueden funcionar como agentes inmunoestimulantes (es decir, adyuvantes).

Para una administración parenteral, el producto antigénico de la presente invención puede ser administrado en forma de dosis inyectables de una solución o suspensión de la sustancia en un diluyente psicológicamente aceptable, con un portador farmacéutico que pueda ser un líquido estéril, como las soluciones de agua y aceite, soluciones salinas, el glicerol o el etanol. Adicionalmente, pueden estar presentes en las composiciones sustancias auxiliares como agentes humectantes o emulsionantes, surfactantes, sustancias amortiguadoras del pH y similares. Otros componentes o composiciones farmacéuticas son aquellas de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, por ejemplo, el aceite de cacahuete, el aceite de soja y el aceite mineral. Por regla general, los glicoles, tales como el propileno glicol o el polietileno glicol, son portadores líquidos preferibles, concretamente para soluciones inyectables.

Lo que es más típico es que las composiciones sean preparadas como soluciones y suspensiones inyectables, más que líquidas; también se pueden preparar formas sólidas, adecuadas para una solución o suspensión de ellas en vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación también puede ser emulsionada o encapsulada en liposomas o micro-partículas, como el poliláctido, el poliglicólido o el copolímero para mejorar el efecto adyuvante, como se ha comentado previamente (véase Langer, 1990 y Hanes, 1997).

Entre los pacientes susceptibles al tratamiento se encuentran individuos con el riesgo de una enfermedad de formación de placas, pero que no presenten síntomas, así como aquellos pacientes que ya los presenten en la actualidad. En el caso de la enfermedad de Alzheimer, nadie virtualmente se encuentra bajo riesgo de sufrir la enfermedad de Alzheimer si vive lo suficiente. Así pues, el producto antigénico actual puede ser administrado con carácter profiláctico a la población general sin necesidad de evaluar de ninguna manera el riesgo del paciente sometido. Los presentes métodos son especialmente útiles para individuos que tengan un riesgo genético conocido de enfermedad de Alzheimer. Dichos individuos incluyen a aquellos que tengan parientes que hayan sufrido esta enfermedad, y aquellos cuyo riesgo se determina por el análisis de los marcadores genéticos o bioquímicos. Los marcadores genéticos de riesgo con respecto a la enfermedad de Alzheimer son las mutaciones del gen APP, especialmente las mutaciones de la posición 717 y de las posiciones 670 y 671, a las que se denomina mutaciones Hardy y Swedish, respectivamente. Otros marcadores de riesgo son las mutaciones en los genes de la presenilina, PS1 y PS2, y ApoE4, la historia familiar de AD, la hipercolesterolemia o la arteriosclerosis. Los individuos que en la actualidad sufren de la enfermedad de Alzheimer pueden ser reconocidos por una demencia característica, así como por la presencia de los factores de riesgo anteriormente descritos. Además, hay disponible una serie de pruebas diagnósticas disponibles para la identificación de individuos que tengan AD. Dentro de estas podemos citar la medición de los niveles tau CSF y A β 42. Unos niveles tau elevados y niveles A β 42 reducidos, significan la presencia de AD. Aquellos individuos que padezcan la enfermedad de Alzheimer pueden ser diagnosticados por los criterios ADRDA.

En pacientes asintomáticos, el tratamiento puede comenzar a cualquier edad (por ejemplo, 10, 20, 30). Sin embargo, lo normal es que no sea necesario comenzar el tratamiento hasta que un paciente llega a la edad de 40, 50, 60 ó 70. El tratamiento, normalmente, implica múltiples dosis durante un período de tiempo. El tratamiento puede ser controlado ensayando el anticuerpo, o las respuestas de la célula B al agente terapéutico (por ejemplo, producto antigénico de la presente invención) con el paso del tiempo. Si fracasa la respuesta, está indicada la administración de una dosis de refuerzo. En el caso de potenciales pacientes con síndrome de Down, el tratamiento podría comenzar antes del nacimiento mediante la administración del agente terapéutico a la madre, o, al de poco tiempo después del parto.

La presente invención también facilita métodos para detectar una respuesta inmune contra un polipéptido que implique una formación de depósitos vinculada a una enfermedad de formación de placas en un paciente que padezca, o tenga susceptibilidad a padecer, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer. Los métodos son especialmente útiles para supervisar el transcurso de un tratamiento que esté siendo administrado a un paciente. Los métodos pueden ser utilizados para controlar tanto el tratamiento terapéutico en pacientes sintomáticos y en tratamiento profiláctico en pacientes asintomáticos supervisando el anticuerpo producido en respuesta a la administración de un inmunógeno.

Algunos métodos conllevan la determinación de un valor de base para una respuesta inmune en un paciente antes de administrar una dosis del producto antigénico, y la comparación de dicho valor con un valor de respuesta inmune posterior al tratamiento. Un incremento significativo (es decir, mayor que el margen típico de error experimental en mediciones repetitivas de la misma muestra, expresadas como desviación estándar de la media de dichas mediciones) en el valor de la respuesta inmune es señal de unos resultados de tratamiento positivos (es decir, esta administración

del agente ha conseguido o aumentado una respuesta inmune). Si el valor de la respuesta inmune no cambia de forma significativa, o disminuye, esto es indicio de unos resultados de tratamiento negativos. En términos generales, los pacientes que pasen por un curso inicial de tratamiento con un agente inmunogénico, se espera que presenten un incremento en la respuesta inmune con dosis sucesivas, la cual, eventualmente, puede alcanzar un nivel relativamente estable. Suele continuarse, normalmente con la administración de un agente, mientras que la respuesta inmune aumenta con respecto al valor de control. Al igual que antes, el llegar a un nivel relativamente estable con respecto a los valores de control es un indicador de que puede discontinuarse la administración del tratamiento, o bien, puede reducirse la dosis o la frecuencia de administración.

En otros métodos, se determina un valor de control de respuesta inmune (por ejemplo, una desviación media y estándar) a partir de una población de control de individuos que hayan pasado por el tratamiento con un agente terapéutico y cuyas respuestas inmunes hayan alcanzado un nivel relativamente estable en respuesta al tratamiento. Los valores medidos de respuesta inmune en un paciente son comparados con el valor de control. Si el nivel medido en un paciente no fuera significativamente diferente (por ejemplo, más de una desviación estándar) del valor de control, podrá discontinuarse el tratamiento. Si el nivel en un paciente es significativamente inferior al valor de control, está garantizada la administración continuada del agente. Si el nivel en el paciente persiste en un valor inferior al de control, entonces podría indicarse el cambio en el régimen del tratamiento, por ejemplo, o el empleo de un diferente adyuvante.

En otros métodos, un paciente que no esté en la actualidad recibiendo tratamiento, pero que haya pasado por un proceso de tratamiento previo, es supervisado para ver su respuesta inmune y determinar si es necesario retomar el tratamiento. El valor medido de respuesta inmune en el paciente puede ser comparado con un valor de respuesta inmune previamente conseguido en el paciente después de un proceso de tratamiento previo. Una reducción significativa con respecto a la medición previa (es decir, mayor que un margen de error típico en mediciones repetidas de la misma muestra) es indicativa de que se puede proseguir con el tratamiento.

Alternativamente, el valor medido en un paciente puede ser comparado con un valor de control (desviación media más estándar) determinado en una población de pacientes después de haber pasado por un proceso de tratamiento. Alternativamente, el valor medido en un paciente puede ser comparado con un valor de control en poblaciones de pacientes tratados profilácticamente quienes quedan sin síntoma alguno de la enfermedad, o poblaciones de pacientes tratados terapéuticamente que presentan una mejoría de las características de la enfermedad. En todos estos casos, una reducción significativa con respecto al nivel de control (es decir, más de una desviación estándar) es un indicador de que debería ser retomado el tratamiento en el paciente.

La muestra de tejido que se va a analizar, lo típico es que sea de sangre, plasma, suero, fluido mucoso o cerebroespinal del paciente. La muestra es analizada para comprobar los indicios de respuesta inmune al producto antigénico. La respuesta inmune puede ser determinada a partir de la presencia de, por ejemplo, anticuerpos que se unan específicamente al péptido A β . Los métodos ELISA de detección de anticuerpos específicos de un péptido A β son descritos en los siguientes ejemplos.

Habiendo descrito ahora la invención, ésta se podrá ahora comprender con mayor rapidez y claridad haciendo referencia al siguiente ejemplo, que se facilita por medio de una ilustración, sin pretender que sea limitadora de la presente invención.

Ejemplo 1

Preparación de MAP con el epítipo EFRH (SEQ ID N°:5)

La cadena de péptidos TyrTyrGluPheArgHisAspSer (SEQ ID N°:1) fue sintetizada (a partir de los términos C y N) y una resina Wang con ocho enlaces, beta-resina Ala-Lis-2Lis-4Lis-4Hmoc, que es una resina central MAP. La resina de Wang con ocho enlaces fue obtenida del proveedor, Advanced ChemTech, Inc., Louisville, KY (www.peptide.com) y tiene una parte divisible que consiste en una beta-alanina, a la cual van unidas siete lisinas, en las ramas de una estructura arbórea. Las ramas terminan en cuatro lisinas con dos grupos Fmoc, cada uno de ellos, para un total de ocho grupos Fmoc. La síntesis de MAP puede ser ejecutada de acuerdo con las instrucciones del proveedor o según cualquier número de protocolos de síntesis de péptidos, como los mostrados en la patente estadounidense 5,229,490, y Tam *et al.* (1989).

Preparación del antígeno

El stock de MAP-YYEFRHDS (SEQ ID N°:1; 2 mg/ml) fue preparado en 12,5% DMF, 2 mg de MAP-YYEFRHDS (SEQ ID N°:1), fue disuelto en 125 μ l de agua doblemente destilada, fue añadido después para aumentar el volumen hasta 1 ml. El preparado fue guardado en un congelador.

Inmunización de los ratones Balb/C

Cuatro ratones (de nombres A, B, C, D) fueron inmunizados en intervalos de dos semanas con 100 μ g de MAP-YYEFRHDS (SEQ ID N°:1) + adyuvante (adyuvante completo de Freund o adyuvante incompleto de Freund) mediante inyección intraperitoneal, y dos ratones fueron inmunizados con H₂O + adyuvante como control negativo. Todos los ratones eran ratones de hembras de ocho semanas de edad.

Protocolo de inmunización

Día 0 - la primera inyección

5 Día 15 - la segunda inyección

Día 28 - la tercera inyección

10 La línea cronológica (en semanas) de las inyecciones y hemorragias se muestra en la Fig. 2.

Unión de anticuerpos policlonales a un péptido β -amiloide

15 En experimentos de unión de anticuerpos a un péptido β -amiloide, 100 mg de péptidos β -amiloides bien biotinilados 1-16 fueron unidos a placas de microtitrado revestidas con estreptavidina durante media hora a temperatura ambiente. Las placas ELISA fueron previamente revestidas con estreptavidina durante 16 h a 4°C, después de lavarlos, se detectaron anticuerpos vinculados a β -péptido mediante incubación con anticuerpos conjugados con peroxidasa de rábano silvestre, tal y como se ha descrito previamente en Frenkel *et al.* (1999). El tipo Ig fue medido con IgG anti-ratón de conejo e IgM anti-ratón marcado con peroxidasa de rábano silvestre.

20 Análisis de la respuesta inmunológica

Como puede verse en los resultados después de ELISA contra el epítipo EFRH con varias disoluciones (Fig. 3), la repuesta inmune es similar para cada ratón.

25 Determinación del tipo Ig en sueros de ratones inmunizados con ELISA frente al epítipo EFRH (SEQ ID N°:5)

30 La Fig. 4 muestra que la inmensa mayoría de anticuerpos es IgG, con lo que se facilitan pruebas de una segunda respuesta inmune. Como se puede comprobar de los resultados de la Fig. 5, cada ratón consigue una respuesta inmune adecuada, pero el ratón B presenta una mayor volumetría. En el día 105, la volumetría IgG en los sueros de ratones inmunizados sigue siendo bastante elevada (Fig. 6).

La presencia de larga duración de IgG contra epítipo EFRH (residuos 3-6 de SEQ ID N° 1)

35 Como puede verse en la Fig. 7, la respuesta inmune sigue siendo bastante fuerte después de 17 semanas a partir de la tercera inyección de MAP-YYEFRHDS (SEQ ID N°:1), que es 21 semanas después de la primera inyección MAP-YYEFRHDS (SEQ ID N°:1).

Ejemplo 2

40 La cadena de péptidos TriGluPheArgHisTirGluPheArgHis (SEQ ID N°:4), que tiene dos epítipos EFRH (SEQ ID N°:5) y es conocida igualmente como MAP-(EFRH)₂, fue sintetizada de la misma manera que la cadena de péptidos del ejemplo 1. El MAP-(EFRH)₂ resultante se muestra en la Fig. 8. El stock del antígeno MAP-(EFRH)₂ (10 mg/ml) fue preparado en 10% DMF y fue guardado en un congelador.

45 Inmunización de los ratones Blb/C

Dos ratones hembra de 8 semanas de edad (de nombres A y B) fueron inmunizados en intervalos aproximados de dos semanas con 100 μ g de MAP-(EFRH)₂ + fago filamentoso como adyuvante, mediante inyección intraperitoneal.

50 Protocolo de inmunización

Día 0 - la primera inyección de fago 3×10^2 + MAP-(EFRH)₂ 100 μ g por ratón.

55 Día 15 - la segunda inyección de fago 3×10^2 + MAP-(EFRH)₂ 100 μ g por ratón.

Día 34 - la tercera inyección de fago 3×10^2 + MAP-(EFRH)₂ 100 μ g por ratón.

Día 48 - la cuarta inyección de MAP-(EFRH)₂ (100 μ g) sin fago.

60 Día 62 - la quinta inyección MAP-(EFRH)₂ (100 μ g).

La línea cronológica aproximada (en semanas) de las inyecciones y las hemorragias se muestra en la Fig. 9.

Respuesta inmunológica

65 Como puede verse por los resultados después de ELISA contra el epítipo EFRH en varias disoluciones (Fig. 10), la inmunización con MAP-(EFRH)₂ produce una fuerte respuesta inmune según se demuestra por las elevadas volumetrías IgG de suero.

Ejemplo 3

(0129) El antígeno MAP-YYEFRHDS (SEQ ID N°:1), preparado en el ejemplo 1 fue biotinilado, y el antígeno biotinilado fue añadido a la estreptavidina en cuatro porciones en tubos cada 30 minutos. Los tubos fueron incubados a temperatura ambiente agitándolos suavemente. La relación molar estreptavidina:MAP-YYEFRHDS (SEQ ID N°:1) fue 1:4. Tras la incubación, la mezcla fue dializada contra PBS o H₂O. El complejo resultante de estreptavidina y MAP-YYEFRHDS (SEQ ID N°:1) biotinilado se puede ver en la Fig. 11.

Inmunización de los ratones Blb/C

Dos ratones hembra de 8 semanas de edad (de nombres G y H) fueron inmunizados en intervalos aproximados de dos semanas con la estreptavidina y el complejo de MAP-YYEFRHDS (SEQ ID N°:1) biotinilado (100 µg de MAP-YYEFRHDS (SEQ ID N° 1) por ratón) mediante inyección intraperitoneal sin adyuvante.

Protocolo de inmunización

Día 0 - la primera inyección

Día 15 - la segunda inyección

Día 34 - la tercera inyección

Día 48 - la cuarta inyección

Día 62 - la quinta inyección

La línea cronológica aproximada (en semanas) para las inyecciones y hemorragias se muestra en la Fig. 9.

Respuesta inmunológica

Como puede verse en los resultados después de ELISA contra el epítipo EFRH en varias diluciones (Fig. 12), la inmunización con el complejo de estreptavidina y MAP-YYEFRHDS (SEQ ID N°:1) biotinilado, produjo una buena respuesta inmune, aunque no tan fuerte como la respuesta inmune observada en el Ejemplo 2 cuando se comparan las volumetrías IgG serosas.

Ejemplo 4

(Sólo para fines ilustrativos)

El péptido antigénico es PrP 144-152, DYEDRYRE (SEQ ID N°:6) humano, la secuencia reconocida por el anticuerpo monoclonal 6H4 (Prionics AG), con el MAP diseñado presentando ocho copias de este péptido antigénico (Fig. 13).

Los animales utilizados como modelo de estudio para la inmunización activa fueron ratones BALB/C hembra viejos, en los cuales, la secuencia respectiva en ratones es diferente de la de los humanos, es decir, la secuencia de ratón es 143-151 DWEDRYRE (SEQ ID N° 7), que tienen una carencia y una un elemento no coincidente, Tyr a Trp, si se compara con la secuencia PrP 144-152 humana.

Los ratones fueron inmunizados una vez cada dos semanas, con 100 µg de MAP PrP (144-152), asociados con adyuvante de Freund y fueron sangrados una semana sí una no para examinar la volumetría de anticuerpos. La primera inmunización fue realizada con CFA (adyuvante completo de Freund) mientras que las otras cuatro fueron realizadas con IFA (adyuvante incompleto de Freund).

Los ratones fueron sangrados en la vena ocular y la volumetría de anticuerpos contra el péptido fue medida utilizando el ensayo ELISA. Los anticuerpos IgG formados contra el péptido fueron observados después de la segunda inmunización, y alcanzaron su pico tras la quinta inmunización, con una volumetría de 1:1,000,000 (Fig. 14). Como se esperaba durante dicho período de tiempo, el nivel de anticuerpos IgM cayó a un valor de 1:50. La inmunización fue finalizada después de la quinta inmunización, y ocho semanas después, los ratones fueron sangrados de nuevo, encontrando que el nivel de anticuerpos llegaba a un valor de 1.100,000. Incluso, los sueros reconocieron toda la proteína PrP mediante la inmunotinción de células CHO.

Bibliografía

Argarana et al., *Nucleic Acid Res.* (Res. de ácido nucleico) 14:1871-1882 (1986)

Bard, F., Cannon, C., Barbour, R., Burke, R-L, Games, D., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Lieberburg, I., Motter, R., Nguyen, M., Soriano, F., Vasquez, N., Weiss, K., Welch, B., Seubert, P., Schenk, D. and Yednock, T. Peripherally administered antibodies against amy-

loid beta peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. (Los anticuerpos administrados contra el péptido beta amiloide penetran en el sistema nervioso central y reducen la patología en un modelo de ratón de la enfermedad de Alzheimer), *Nature Medicine*, 6:916-920 (2000).

- 5 **Barrow, C.J. and Zagorski, M.G.** Solution structures of β -peptide and its constituent fragments: Relation to amyloid deposition (Estructuras en solución de β -péptido y sus fragmentos constituyentes: Relación con la deposición amiloide), *Science* 253,179-182 (1991):
- 10 **Bayer et al.,** *App. Biochem. Biotech.*, 53:1-9 (1995)
- 10 **Blond, S. and Goldberg, M.** Partly native epitopes are already present on early intermediates in the folding of tryptophan synthase (Los epítosos parcialmente nativos se encuentran presentes en los intermediarios tempranos en el plegado de la triptófano sintasa) *Proc Nati Acad Sci USA* 84, 1147-1151 (1987).
- 15 **Carlson, J.D. and Yarmush, M.L.** Antibody assisted protein refolding (Repliegue de proteínas con la ayuda de anticuerpos) *Biotechnol.* 10, 86-91 (1992).
- Carrell, R.W., Lomas, D.A.** Conformational disease (Enfermedad conformacional) *Lancet* 350, 134-138 (1997).
- 20 **Chandra et al.,** *Meth. Enzymol.*, 184:70-79 (1990)
- Chang et al.,** *Advanced Drug Delivery Reviews*, 32:173-186 (1998)
- 25 **Chen, G., Chen, K.S., Knox, J., Inglis, J., Bernard, A., Martin, S.J., Justice, A., McConlogue, L., Games, D., Freedman, S.T. and Monis, R.G.M.** A learning deficit related to age and β -amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. (Un déficit de aprendizaje relacionado con la edad y con las placas de β -amiloide en un modelo de ratón de enfermedad de Alzheimer) *Nature* 408:975-979 (2000).
- 30 **DeFoortetal.,** *Int. J. Peptide Protein Res.*, 40:214-221 (1992)
- 30 **Fraser, P. E., Levesque, L. and McLachlan, D.A.** Biochemistry of Alzheimer's disease, amyloid plaques (Bioquímica de la enfermedad de Alzheimer, placas amiloides) *Clin Bio-chem.* 26, 339-349(1993).
- 35 **Frenkel, D., Balass, M. and Solomon, B.** N-Terminal EFRH sequence of Alzheimer's β -amyloid peptide represents the epitope of its anti-aggregating antibodies (La secuencia EFRH de n terminales del péptido β -amiloide de Alzheimer representa el epítipo de sus anticuerpos antiagregantes) *J Neuroimmunology*, 88, 85-90 (1998)
- 40 **Frenkel, D., Balass, M., Kachalsky-Katzir, E. and Solomon, B.** High affinity binding of monoclonal antibodies to the sequential epitope EFRH of β -amyloid peptide is essential for modulation of fibrillar aggregation (El enlace de alta afinidad de anticuerpos monoclonales con el EFRH epítipo secuencial del péptido β -amiloide es esencial para la modulación de la agregación fibrilar) *J. Neuroimmunology* 95, 136-142(1999).
- 45 **Frenkel, D., Solomon, B. and Benhar, I.** Modulation of Alzheimer's beta-amyloid neurotoxicity by site-directed single-chain antibody (Modulación de la neurotoxicidad beta-amiloide del Alzheimer mediante anticuerpo de cadena única dirigido a la localización) *J Neuroimmunol*, 106:23-31 (2000a).
- 50 **Frenkel, D., Katz, O. and Solomon, B.** Immunization against Alzheimer's β -amyloid plaques via EFRH phage administration. (Inmunización contra las placas β -amiloides de Alzheimer vía administración del fago EFRH) *PNAS* 97, 21, 11455-11459 (2000b).
- 50 **Frenkel, D., Kariv, N. and Solomon, B.** Generation of autoantibodies towards Alzheimer's disease vaccination. Vaccine 19 (Generación de auto-anticuerpos hacia la vacunación de la enfermedad de Alzheimer, Vacuna 19), 2615-2619(2001).
- 55 **Frauenfelder, H., Petsko, G.A. and Tsernoglou, D.** Temperature dependent X-ray diffraction as a probe of protein structural dynamics, (Difracción de rayos X dependiente de la temperatura como prueba de dinámica estructural de proteínas). *Nature*, 280, 558-563 (1979).
- 60 **Goate, A., Chartier-Harlin, M-C., Mullan, M. et al. (1991).** Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease (Segregación de una mutación invertida en el gen de proteína precursora amiloide con la enfermedad de Alzheimer familiar) *Nature* 349, 704-706 (1991).
- Gray, Arch.,** *Biochem. Biophys.*, 163:426-428 (1974)
- 65 **Green,** *Advances in Protein Chemistry*, (Avances en Química proteínica) 29:85-133 (1975)
- Greenwood, J., Willis, E.A. and Perham, N.R.** Multiple display of foreign peptides on a filamentous bacteriophage. (Despliegue múltiple de péptidos extraños en un bacteriófago filamentoso) *J Mol Biol*, 220, 821-827 (1993).

- Hanan, E. and Solomon, B.** Inhibitory effect of monoclonal antibodies on Alzheimer's B-amyloid peptide aggregation. (Efecto inhibitorio de anticuerpos monoclonales en la agregación de péptidos β -amiloides de Alzheimer) *Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest.* 3, 130-133 (1996).
- 5 **Hanes, Advanced Drug Delivery Reviews,** (Estudios avanzados sobre el suministro de drogas) 28:97-119 (1997)
- Hardy, J.** Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease (Amiloide, las presenilinas y la enfermedad de Alzheimer) *Trends Neurosci.* 20, 154-159 (1997).
- 10 **Hardy, J. and Allsop, D.** Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease (Deposición amiloide como evento central en la etiología de la enfermedad de Alzheimer) *Trends Pharmacol Sci.* 12, 18295-18298(1991).
- 15 **Hardy, J., Duff, K., Hardy, K.G., Perez-Tur, J. and Hufton, M.** Genetic dissection of Alzheimer's disease and related dementias: amyloid and its relationship to tau. (Dirección genética de la enfermedad de Alzheimer y demencias relacionadas), *Nature Neurosci.* 355-358 (1998).
- 20 **Hollosi, M., Otvos, L., Kaijtar, J., Percell, A. and Lee, V.M.Y.** Is amyloid deposition in Alzheimer's disease preceded by an environment induced double conformational transition? (¿Está precedida la deposición amiloide en la enfermedad de Alzheimer por una doble transición conformacional inducida por el entorno?) *Pept Res* 2, 109-113 (1989).
- 25 **Hoogenboom, H.R., de Bruine, A.P., Hufton, S.E., Hoet, R.M. Arends, J.W. and Roovers, R.C.** Antibody phage display technology and its applications (Tecnología de despliegue de fagos de anticuerpos y sus aplicaciones) *Immunotechnology* 4:1-20 (1998).
- Howlett, D.R., Jennings, K.H., Lee, D.C., Clark, M.S.G., Brown, F., Wetzel, R., Wood, S.J., Camilleri, P. and Roberts, G.W.** Aggregation state and neurotoxic properties of Alzheimer beta-amyloid peptide. (Estado de agregación y propiedades neurotóxicas del péptido beta-amiloide del Alzheimer) *Neurodegeneration*, 4,23-32 (1995).
- 30 **Janus, C., Pearson, J., McLaurin, J., Mathews, P.M. Jiang, Y., Schmidt, S.D., Azhar Chisti, M., Horne, P., Heslin, D., French, J., Mount, H.T.J., Nixon, R.A., Mercken, M., Bergeron, C., Fraser, P.E., St. George-Hyslop, P. and Westaway, D.** A β peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease (La inmunización con péptido A β reduce el deterioro de comportamiento y las placas en un modelo de la enfermedad de Alzheimer) *Nature* 408:979-982 (2000).
- 35 **Karplus, M. and Petsko, G.A.** Molecular dynamics simulations in biology (Simulaciones de dinámica molecular en Biología). *Nature*, 347, 631-639 (1990).
- 40 **Katzav-Gozansky, T., Hanan, E. and Solomon, B.** Effect of monoclonal antibodies in preventing carboxypeptidase A aggregation (Efecto de los anticuerpos monoclonales en la prevención de la agregación de la carboxipeptidasa A). *Biotechnol Appl Biochem* 23,227-230 (1996).
- 45 **Kelly, J.W.** Alternative conformations of amyloidogenic proteins govern their behavior (Las conformaciones alternativas de proteínas amiloidogénicas controlan su comportamiento) *Curr. Opin. Struct Biol.* 6, 11-17(1996).
- Kensil et al.,** Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (Diseño de vacunas: el enfoque de la subunidad y el adyuvante) (1995)
- 50 **Kirshenbaum, K. and Daggett, V.** PH-Dependent conformations of the amyloid β (1-28) peptide fragment explored using molecular dynamics (Conformaciones dependientes del pH del fragmento de β (1-28) péptido amiloide exploradas utilizando la dinámica molecular) *Biochemistry* 34, 7629-7639 (1995).
- Langer, Science,** 249:1527 (1990)
- 55 **Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P. et al.** Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. (Gen candidato para el locus de la enfermedad de Alzheimer familiar en el cromosoma 1) *Science* 269, 973-977 (1995).
- 60 **Lorenzo, A. and Yankner, B.A.** β -Amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by Congo red. (La neurotoxicidad β -amiloide requiere la formación de fibrillas y es inhibida por el rojo Congo) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91,12243-12247 (1994).
- 65 **Maggio, J.E. and Mantyh, P.W.** Brain amyloid - a physicochemical perspective. (Amiloide cerebral - una perspectiva psicoquímica) *Brain Pathol* 6,147-162 (1996).
- Medynski, D.** Phage display: all dressed up and ready to role. (Despliegue de fagos: todos preparados y listos para desempeñar el papel) *Biol Technol* 12,1134-1136 (1994).

Meola, A., Delmastro, P., Monaci, P. et al. Derivation of vaccines from mimotopes: Immunological properties of human B virus surface antigen mimotopes displayed on filamentous phage. (Derivación de vacunas a partir de mimótopos: Propiedades inmunológicas de los mimótopos de antígenos de la superficie del virus B humano desplegados en un fago filamentoso) *J Immuno* 154, 3162-3172 (1995).

Morgan, D., Diamond, D.M., Gottschall, P.E., Ugen, K.E., Dickey, C., Hardy, J., Duff, K., Jantzen, P., Dicarlo, G., Wilcock, D., Connor, K., Hatcher, J., Hope, C., Gordon, M. and Arendash, G.W. A β peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease (La vacunación del péptido A β evita la pérdida de memoria en un modelo animal de la enfermedad de Alzheimer). *Nature* 408:982-985 (2000).

Murphy, C. Loss of olfactory function in dementing disease (Pérdida de la función olfativa en enfermedades de demencia) *Physiol. Behav.* 66,177-182 (1999).

Pike, C.J., Overman, M.J. and Colman, C.W. Amino-terminal deletions enhance aggregation of β -amyloid peptides *in vitro* (Las supresiones amino-terminales mejoran la agregación de péptidos β -amiloides *in vitro*). *J Biol Chem* 270, 23895-23898 (1995).

Price, D.L., Borchelt, D.R. and Sisodia, S.S. Alzheimer disease and prion disorders amyloid β -protein and prion protein amyloidosis (β -proteína amiloide y amiloidosis de proteínas priónicas de desórdenes priónicos y de la enfermedad de Alzheimer). *Proc Nati Acad Sci USA*, 90, 6381-6384 (1993)

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., Zhenmei, L., Lieberburg, I., Motter, R., Mutter, L., Soriano, F., Shopp, G., Vasquez, N., Vandever, C., Walker, S., Wogulis, M., Yednock, T., Games, D. and Seubert, P. Immunization with amyloid- β attenuates Alzheimer's disease-like pathology in the PDAPP mouse (La inmunización con β -amiloide atenúa la patología similar a la enfermedad de Alzheimer en el ratón PDAPP). *Nature*, 400,173-177 (1999).

Scott, J.K. and Smith, G.P. Searching for peptide ligands with an epitope library (Búsqueda de ligandos de péptido con una biblioteca de epítomos). *Science*, 249, 386-390 (1990).

Selkoe, D.J. Amyloid β protein and the genetics of Alzheimer's disease (Proteína β -amiloide y la genética de la enfermedad de Alzheimer). *J Biol Chem.* 271,18295-18298 (1996).

Sherrington, R., Rogaev, E.I., Liang, Y. et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease (Clonación de un gen portador de mutaciones de sentido inverso en un brote temprano de una enfermedad de Alzheimer familiar) *Nature* 375, 754-760 (1995).

Silen, J.L. and Agard, D.A. The x-ylytic protease pro-region does not require a physical linkage to activate the protease domain *in vivo*, (La región de la proteasa x-y no requiere una unión física para activar el dominio de la proteasa *in vivo*). *Nature* 341, 462-464 (1989).

Sladowski, D., Steer, S.J., Clothier, R.H. and Balls, M. An improved MTT assay (Un ensayo MTT mejorado). *J Immunol Methods.* 157,203-207 (1993).

Solomon, B. and Balas, N. Thermostabilization of Carboxypeptidase A by interaction with its monoclonal antibodies (Termoestabilización de la carboxipeptidasa A mediante la interacción con sus anticuerpos monoclonales). *Biotechnol and App Biochem* 14, 202-211 (1991).

Solomon, B. and Schwartz, F. Chaperone-like effect of monoclonal antibodies on refolding of heat-denatured carboxypeptidase A (Efecto tipo chaperona de anticuerpos monoclonales en el repliegue de la carboxipeptidasa A desnaturalizada por el calor). *J of Motee Recognition.* 8, 72-76 (1995).

Solomon, B., Koppel, R., Hannan, E. and Katzav, T. Monoclonal antibodies inhibit *in vitro* fibrillar aggregation of the Alzheimer's pamyloid peptide (Los anticuerpos monoclonales inhiben la agregación fibrilar *in vitro* del péptido pamilioide de Alzheimer). *Proc Nati Acad Sci USA*, 93, 452455 (1996).

Solomon, B., Koppel, R., Frankel, D. and Hanan-Aharon, E. Disaggregation of Alzheimer beta-amyloid by site-directed mAb (Disgregación del beta-amiloide de Alzheimer por mAb dirigido a la localización) *Proc Nati Acad Sci USA* 94, 4109-4112 (1997).

Solomon, B. and Frenkel, D. Vaccination for the prevention and treatment of Alzheimer's disease (Vacunación para la prevención y tratamiento de la enfermedad de Alzheimer) *Drugs of Today*, 36(9), 655-663 (2000).

Soto, C. Alzheimer's and prion disease as disorders of protein conformation: implications for the design of novel therapeutic approaches (Enfermedad priónica y de Alzheimer como desórdenes de conformación proteínica: implicaciones para el diseño de nuevos enfoques terapéuticos). *J. Mol. Med.* 77, 412-418 (1999).

- 5 **Soto, C., Castaño, E.M., Frangione, B. and Inestrosa, N.C.** The α -helical to β -strand transition in the amino-terminal fragment of the amyloid β -peptide modulates amyloid formation (la transición de hélice al a cadena β en el fragmento amino-terminal del β -péptido amiloide modula la formación amiloide). *J Biol Chem* 270, 3063 (1995).

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

10

Tam et al, *J. Am. Chem. Sic.*, 105:6442 (1983)

Tam et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 108:5242 (1986)

- 15 Van **Leuven, F.** Single and multiple transgenic mice as models for Alzheimer's disease (Ratones individuales y múltiples como modelos de la enfermedad de Alzheimer). *Prog Neurobiol.* 200061 (3):305-12. Review (2000).

- 20 **Willis, E.A., Perham, N.R. and Wraaith, D.** (1993). Immunological properties of foreign peptides in multiple display on a filamentous bacteriophage (Propiedades inmunológicas de péptidos extraños con despliegue múltiple en un bacteriófago filamentoso). *Gene*, 128, 79-83.

Winter, G., Griffiths, A.D., Hawkins, R.E. and Hoogenboom, H.R. Making antibody by phage display technology (Fabricación de anticuerpos mediante tecnología de despliegue de fagos) *Annu Rev Immunol* 12:433-455 (1994).

- 25 **Zuercher, A.W., Miescher, S.M., Voge, M., Rudolf, M.P., Stadler, M.B. and Stadler, B.M.** Oral anti-IgE immunization with epitope-displaying phage (Inmunización oral anti-IgE con fago de despliegue de epítomos) *Eur. J. Immunol.* 30,128-135 (2000).

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un producto antigénico que contiene una pluralidad de epítomos de amiloide- β , que comprende un polímero dendrítico, conformado sobre una molécula central que, al menos, es disfuncional como para hacer posible una unión de ramales y para albergar grupos funcionales de hasta 16 terminales a cada uno de los cuales, se une mediante enlaces covalentes un péptido antigénico que comprende un epítomo de amiloide β con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 5.

2. El producto antigénico de la reivindicación 1, en el cual dicho polímero dendrítico contiene ocho grupos funcionales de ocho terminales a los cuales se la une un péptido antigénico.

3. El producto antigénico de la reivindicación 1, en el que dicho polímero dendrítico contiene grupos funcionales de cuatro terminales a los cuales se une el péptido antigénico.

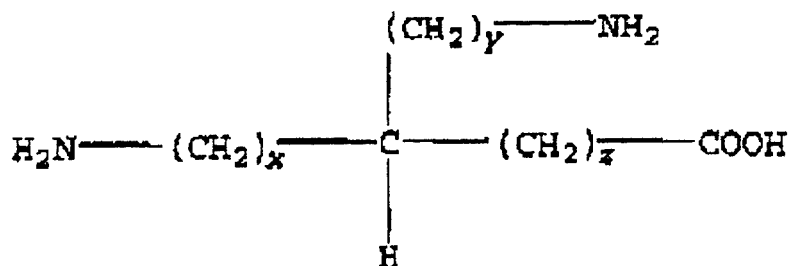
4. El producto antigénico de la reivindicación 1, en el que dicho polímero dendrítico contiene grupos funcionales de 16 terminales a los cuales va unido un péptido antigénico.

5. El producto antigénico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho péptido antigénico comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 1.

6. El producto antigénico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la molécula central es la lisina.

7. El producto antigénico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha molécula central es seleccionada del grupo que consiste en ácido aspártico y ácido glutámico.

8. El producto antigénico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha molécula central tiene la fórmula:



en la que x, y y z son enteros de 0 a 10, y, al menos una de la x, y o z tiene el valor 1.

9. El producto antigénico de la reivindicación 8, en el que los enteros x, y y z suman un total que se encuentra dentro de un rango de 2 a 6, y los grupos amino están separados por, al menos, dos grupos metileno.

10. El producto antigénico de la reivindicación 8, en el que dicha molécula central es seleccionada del grupo que está compuesto por ornitina, norlisina y amino alanina.

11. El producto antigénico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha molécula central tiene la fórmula:



en la que n es un entero de 0 a 10.

12. El producto antigénico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el péptido antigénico comprende dos epítomos de dicho polipéptido conformador de depósitos.

13. El producto antigénico de la reivindicación 12, en el que estos dos epítomos son idénticos.

14. El producto antigénico de la reivindicación 13, en el que el péptido antigénico comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 4.

ES 2 279 869 T3

15. El producto antigénico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que comprende además una molécula de avidina o de estreptavidina, donde uno a cuatro de dichos polímeros dendríticos está unido, cada uno, a dicha molécula de avidina o estreptavidina a través de una molécula de biotina conjugada a dicho polímero dendrítico para formar un complejo con dicha molécula de avidina o estreptavidina.

16. El producto antigénico de la reivindicación 15, donde dos o tres de dichos polímeros dendríticos están unidos a dicha molécula de avidina o estreptavidina.

17. El producto antigénico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, que además comprende una molécula con propiedades adyuvantes unida a dicho polímero dendrítico.

18. El producto antigénico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, que está encapsulado en un liposoma.

19. Una composición inmunizante, que comprende el producto antigénico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 y un portador farmacéuticamente aceptable, excipiente, adyuvante o agente auxiliar.

20. El uso de un producto antigénico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 para la producción de una terapia para el tratamiento de una enfermedad o desorden formador de placas que implique al amiloide β como polipéptido de formación de depósitos.

21. El uso de la reivindicación 20, en el cual la enfermedad o desorden de formación de placas es la enfermedad de Alzheimer.

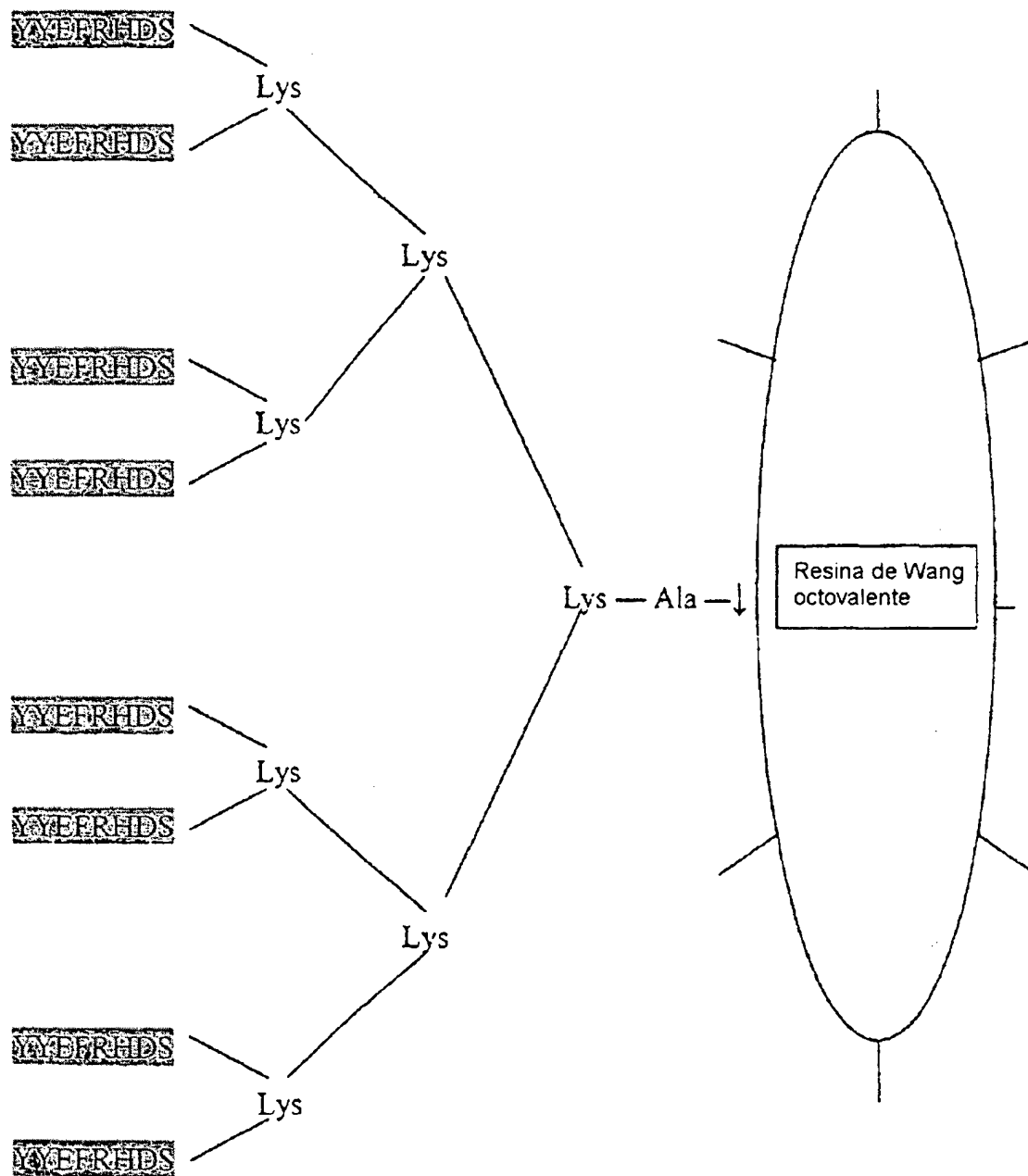


FIG. 1

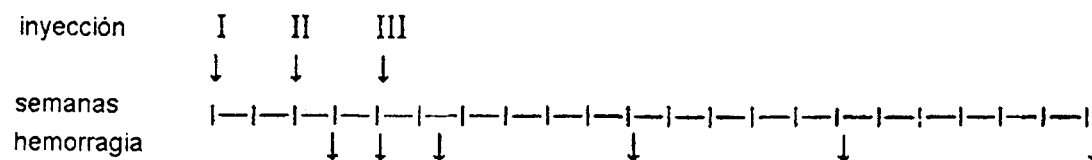


FIG. 2

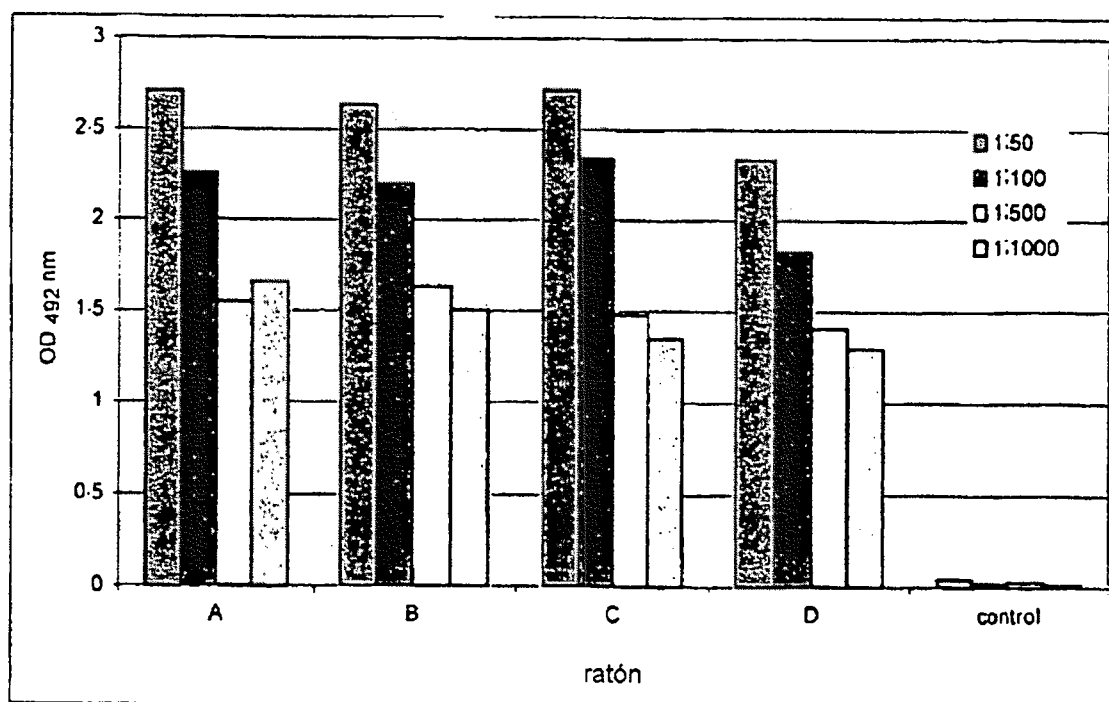


FIG. 3

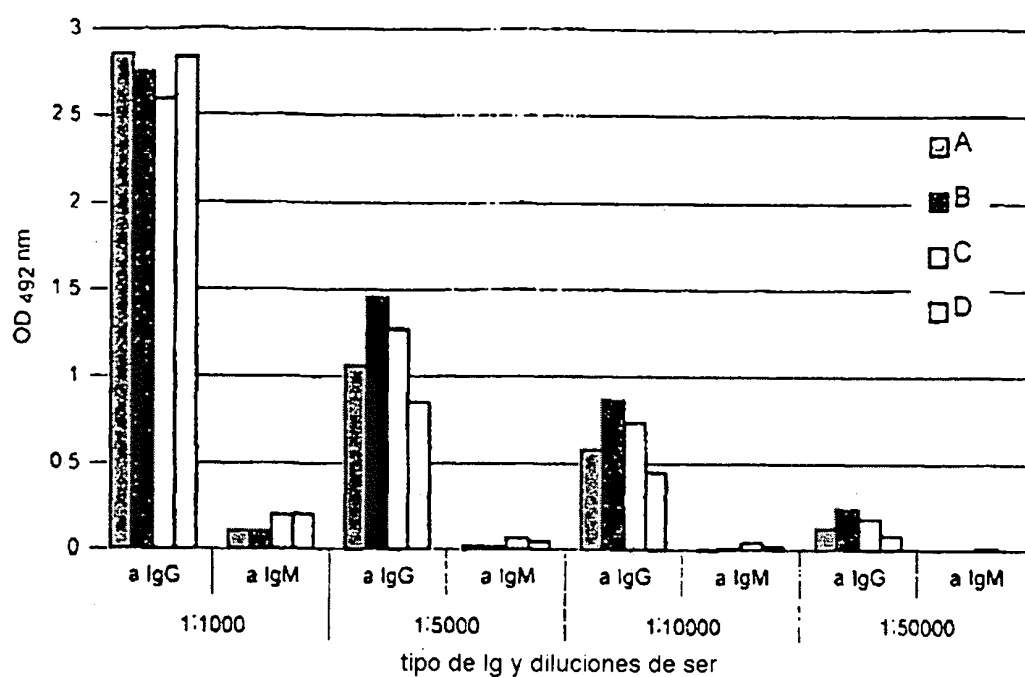


FIG. 4

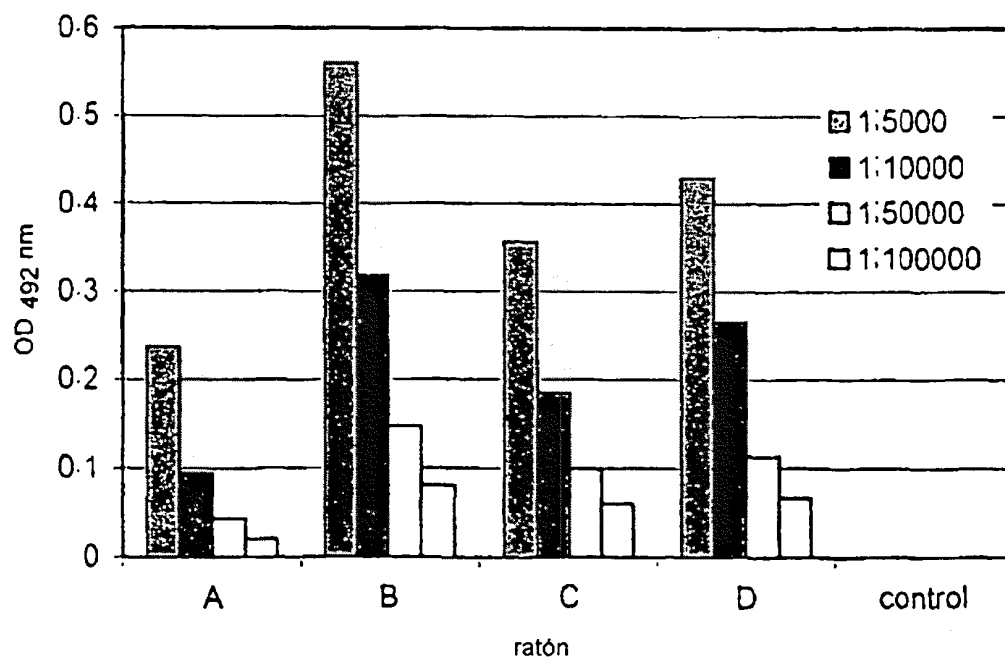


FIG. 5

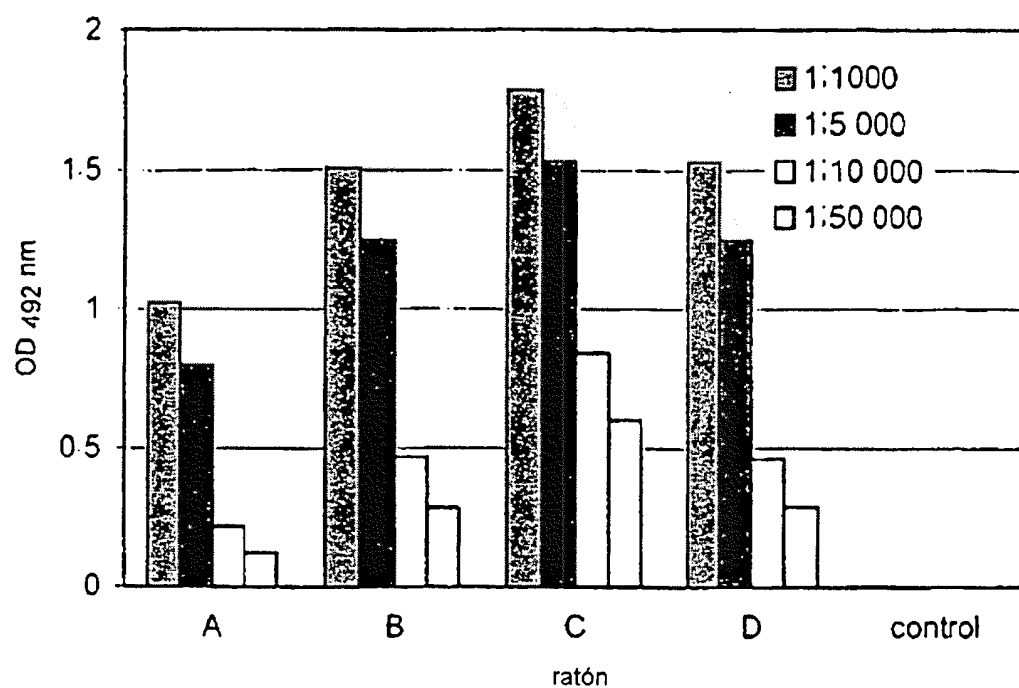


FIG. 6

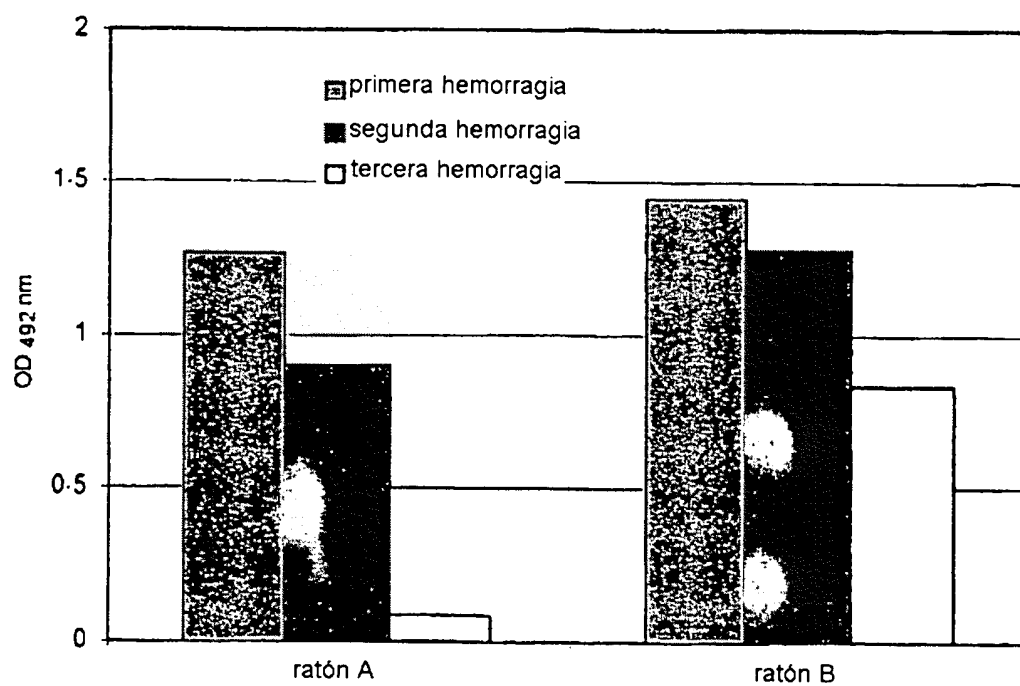


FIG. 7

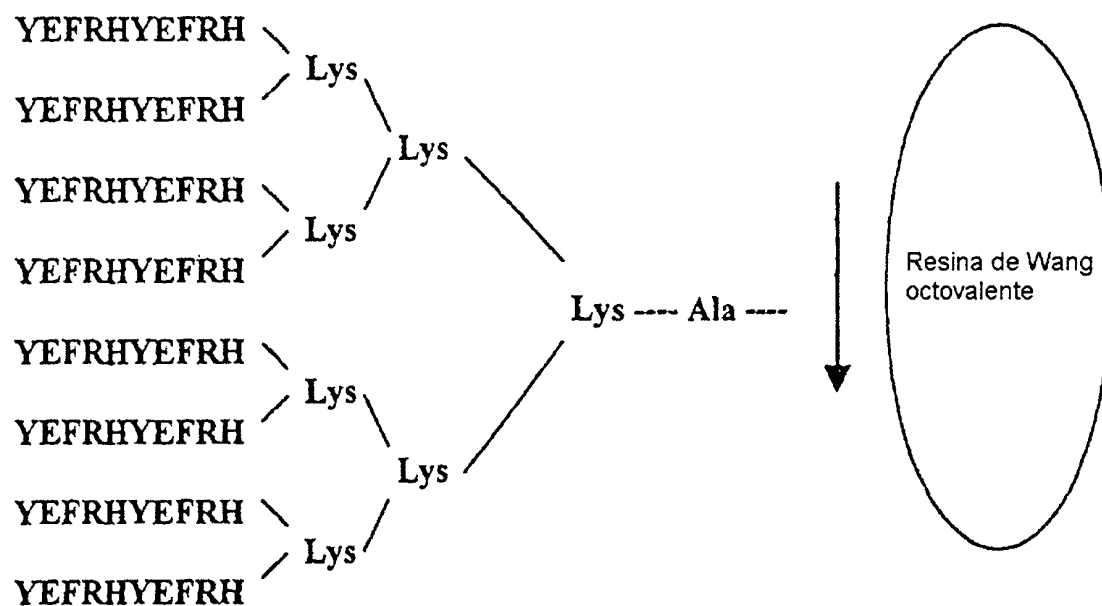


FIG. 8

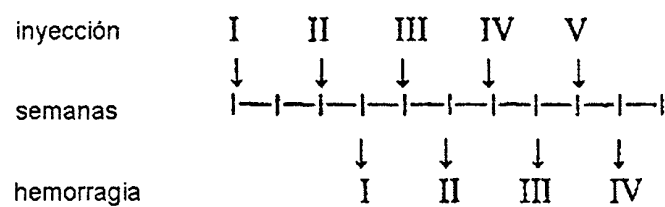


FIG. 9

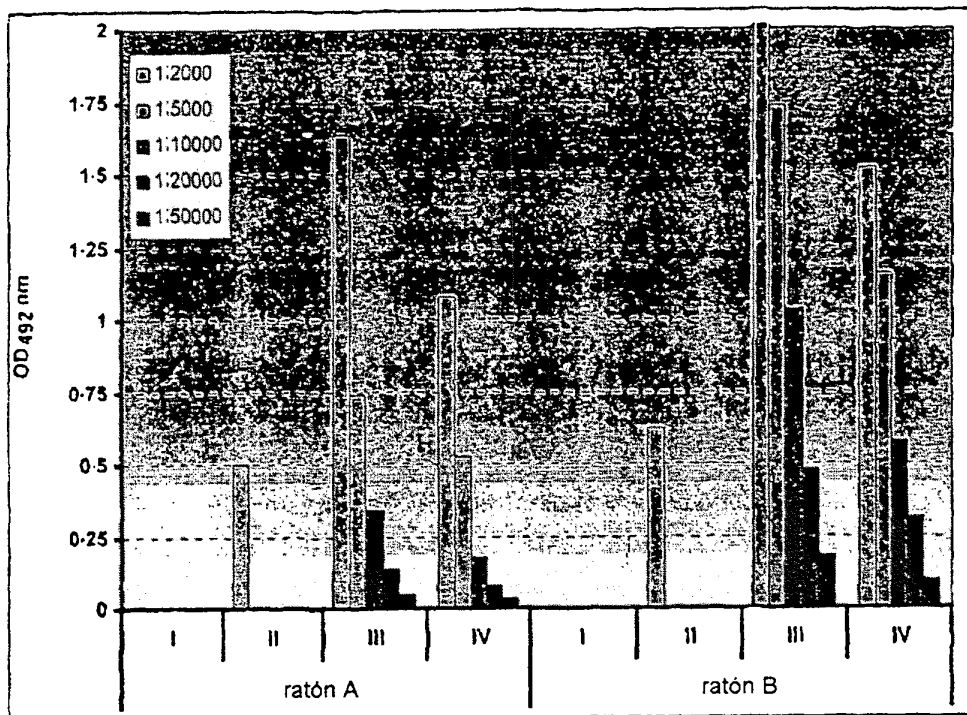


FIG. 10

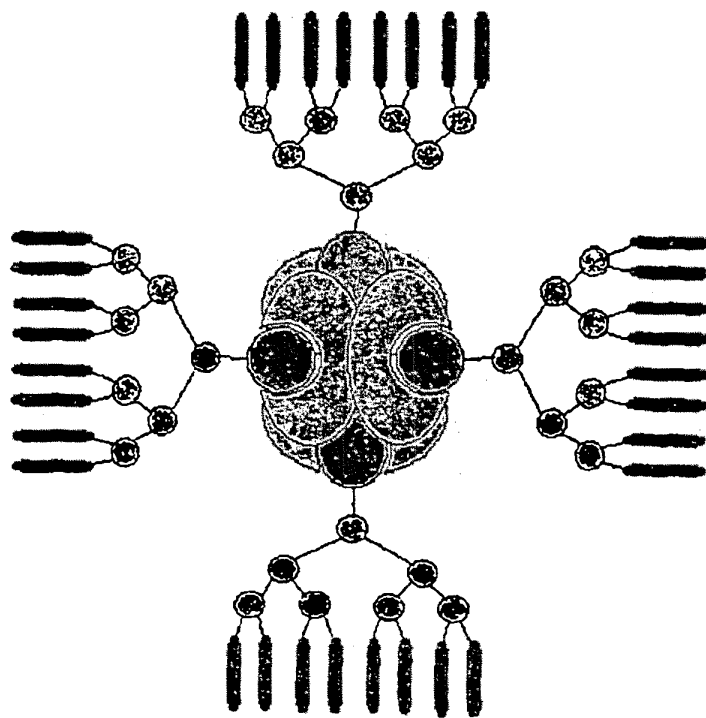


FIG. 11

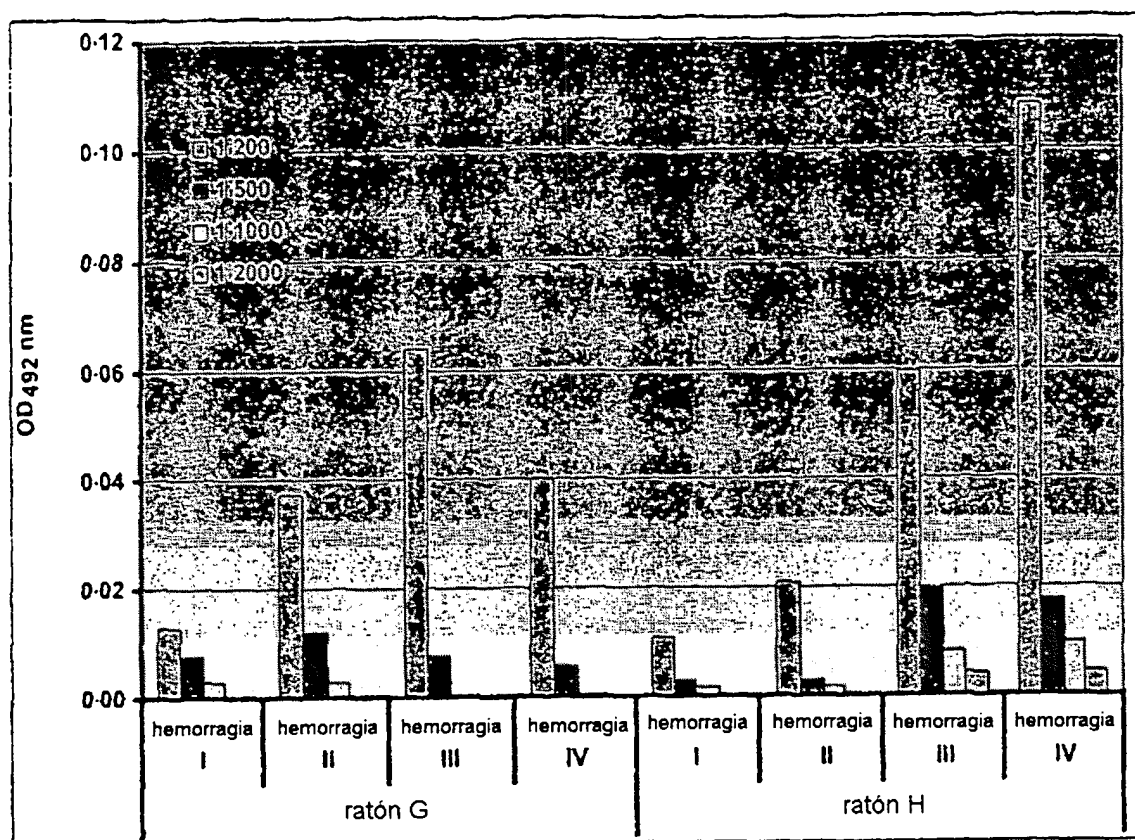


FIG. 12



ES 2 279 869 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> SOLOMON, Beka

5 <120> PRODUCTO ANTIGÉNICO CON DESPLIEGUE DE MÚLTIPLES COPIAS DE UN EPÍTOPO DE UN
POLIPÉPTIDO FORMADOR DE DEPÓSITOS IMPLICADO EN ENFERMEDADES DE FORMACIÓN
DE PLACAS Y MÉTODOS DE EMPLEO DEL MISMO

10 <130> SOLOMON=4.1A PCT

<140> AÚN SIN ASIGNAR

15 <141> 2002-06-20

<160> 7

20 <170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 8

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Sintética

<400> 1

35 Tyr Tyr Glu Phe Arg His Asp Ser
1 5

<210> 2

40 <211> 9

<212>PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Sintética

<400> 2

50 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly
1 5

<210>3

55 <211> 4

<212>PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

60 <223> Sintética

<400> 3

65 Trp Val Leu Asp
1

ES 2 279 869 T3

<210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sintética
 10
 <400> 4

 Tyr Glu Phe Arg His Tyr Glu Phe Arg His
 1 5 10
 15

 <210> 5
 <211> 4
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 25 <223> Sintética

 <400> 5

 Glu Phe Arg His
 1
 30

 <210> 6
 <211> 9
 35 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 40 <223> Sintética

 <400> 6

 45 Asp Tyr Glu Asp Arg Tyr Tyr Arg Glu
 1 5

 <210> 7
 <211> 9
 50 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 55 <223> Sintética

 <400> 7
 60
 Asp Trp Glu Asp Arg Tyr Tyr Arg Glu
 1 5

 65