

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 474 173**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2004** **E 11151428 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.04.2014** **EP 2336147**

54 Título: **Conjugados de portador peptídico inmunogénico beta y métodos de producir los mismos**

30 Prioridad:

17.12.2003 US 530481 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.07.2014

73 Titular/es:

**JANSSEN ALZHEIMER IMMUNOTHERAPY
(50.0%)
Little Island Industrial Estate
Little Island, County Cork, IE y
WYETH LLC (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ARUMUGHAM, RASAPPA G.;
PRASAD, A. KRISHNA y
HAGEN, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 474 173 T3

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

CONJUGADOS DE PORTADOR PEPTIDICO INMUNOGÉNICO BETA Y MÉTODOS DE PRODUCIR LOS MISMOS**5 Descripción****Antecedentes de la invención**

10 La esencia de la inmunidad adaptable es la habilidad de un organismo para reaccionar ante la presencia de sustancias extrañas y producir componentes (anticuerpos o células) capaces de interactuar específicamente y proteger al huésped de su invasión. Un "antígeno" o "inmunógeno" es una sustancia que es capaz de obtener este tipo de respuesta inmune y también capaz de interactuar con las células y anticuerpos sensibilizados que se fabrican contra él.

15 Los antígenos o inmunógenos son normalmente macromoléculas que contienen distintos sitios antigénicos o "epítopes" que se reconocen e interactúan con los varios componentes del sistema inmune. Pueden existir como moléculas individuales compuestas por sustancias químicas orgánicas sintéticas, proteínas, lipoproteínas, glicoproteínas, ARN, ADN o polisacáridos, o pueden ser parte de estructuras celulares (bacterias u hongos) o virus (Harlow y Lane 1988a, b y c; Male et al., 1987).

20 Moléculas pequeñas como péptidos cortos, aunque normalmente son capaces de interactuar con los productos de una respuesta inmune, a menudo no pueden provocar una respuesta por sí mismas. Estos inmunógenos de péptido o "haptenos" como también se llaman, son realmente antígenos incompletos, y, aunque no son capaces por sí mismos de provocar inmunogenicidad o de obtener producción de anticuerpos, pueden hacerse inmunogénicos acoplándolos a un transportador adecuado. Los transportadores típicamente son antígenos de proteínas de mayor peso molecular que son capaces de provocar una respuesta inmunogénica cuando se administran *in vivo*.

25 En una respuesta inmune, los anticuerpos se producen y secretan por los linfocitos B en conjunto con células T ayudantes (TA). En la mayoría de los sistemas transportadores de haptenos, las células B producen anticuerpos que son específicos para el hapteno y el transportador. En estos casos, los linfocitos T tendrán dominios específicos de enlace en el transportador pero no reconocerán al hapteno solo. En un tipo de sinergismo, las células B y T cooperan para inducir una respuesta de anticuerpo específica de hapteno. Después de que haya tenido lugar tal respuesta inmune, si el huésped es posteriormente desafiado con el hapteno solamente, normalmente responderá produciendo anticuerpos específicos de hapteno de células con memoria formadas después de la inmunización inicial.

30 Los haptenos sintéticos que imitan algunas estructuras epitópicas fundamentales en macromoléculas más grandes a menudo se conjugan con transportadores para crear una respuesta inmune para la molécula "original" más grande. Por ejemplo, los segmentos de péptido corto pueden sintetizarse de la secuencia conocida de una proteína y acoplarse a un transportador para inducir inmunogenicidad hacia la proteína nativa. Este tipo de planteamiento sintético para la producción inmunogénica se ha convertido en la base de muchas de las investigaciones actuales en la creación de vacunas. Sin embargo, en muchos casos, la mera creación de una respuesta de célula B usando conjugados sintéticos de péptido-transportador, aunque bien diseñados, no siempre garantizará una inmunidad protectora hacia un antígeno intacto. La respuesta inmune generada por un epítipo de péptido corto de una partícula viral más grande o células bacteriana puede ser solamente suficiente para generar memoria en el nivel de célula B. En estos casos, ahora generalmente se acepta que una respuesta citotóxica de célula BT sea un indicador más importante de inmunidad protectora. El diseño de inmunógenos peptídicos con los sitios apropiados de enlace epitópico para reconocimiento de célula B y célula T es hoy una de las áreas de investigación más desafiantes en inmunología.

35 El planteamiento para aumentar la inmunogenicidad de moléculas pequeñas y pobremente inmunogénicas al conjugar estas moléculas con moléculas "transportadoras" grandes se ha utilizado con éxito durante décadas (véase, por ejemplo, Goebel et al. (1939) J. exp. Med. 69: 53). Por ejemplo, se han descrito muchas composiciones inmunogénicas en las que polímeros capsulares purificados se han conjugado con proteínas transportadoras para crear composiciones inmunogénicas más efectivas al explotar este "efecto transportador". Schneerson et al. (1984) Infect. Immun. 45: 582-591). La conjugación también ha demostrado evitar la actividad pobre del anticuerpo normalmente observada en niños cuando se inmunizan con un polisacárido libre (Anderson et al. (1985) J. Pediatr. 107: 346; Insel et al. (1986) J. Exp. Med 158: 294). WO-A-00/050077 describe inmunógenos peptídicos unidos a un transportador derivado de Proteína D de *Haemophilus influenzae*.

40 Los conjugados hapteno-transportador se han generado con éxito usando varios reactivos de enlace cruzado/acoplamiento tal como enlazadores cruzados homobifuncionales, heterobifuncionales o de longitud cero. Muchos de tales métodos están actualmente disponibles para acoplar sacáridos, proteínas y péptidos a transportadores de péptido. Un inconveniente de usar reactivos de acoplamiento, que introducen sitios reactivos en las cadenas laterales de moléculas de aminoácido reactivo en el transportador y/o moléculas de hapteno, es que los

sitios reactivos si no se neutralizan son libres de reaccionar con cualquier molécula no deseada *in vitro* (afectando así negativamente a la funcionalidad o estabilidad del conjugado (o conjugados) o *in vivo* (planteando así un riesgo potencial de hechos adversos en personas o animales inmunizados con las preparaciones). Tal exceso de sitios reactivos puede reaccionar o “restringirse”, para inactivar estos sitios, utilizando varias reacciones químicas conocidas, pero estas reacciones pueden ser de otra manera perjudiciales para la funcionalidad de los conjugados. Estos puede ser particularmente problemático cuando se intenta crear un conjugado introduciendo los sitios reactivos en la molécula transportadora, ya que su mayor tamaño y su estructura más compleja (en relación con el hapteno) puede hacerla más vulnerable a los efectos perjudiciales del tratamiento químico. De hecho, no se conocen ejemplos de métodos por los cuales se haga un conjugado activando primero el transportador, después haciéndolo reaccionar con el hapteno en una reacción de conjugación y finalmente “restringiendo” el resto de sitios reactivos, mientras se conserva la habilidad del conjugado resultante para funcionar como una composición inmunogénica que tiene las propiedades deseadas del “efectos transportador”.

Breve resumen de la invención

La presente invención se dirige a un conjugado de inmunógeno peptídico-transportador de proteína/polipéptido como se define en la reivindicación 1. Este es un conjugado inmunogénico de un inmunógeno de péptido que comprende un fragmento de A β con un transportador CRM₁₉₇ proteínas/polipéptido, donde el fragmento de A β se conjuga con el transportador por medio de grupos funcionales derivatizados de residuos de aminoácido del transportador tales como residuos de lisina, y donde cualquier grupo funcional derivatizado de los residuos de aminoácido se inactiva por medio de restricción para bloquearlos de la reacción con otras moléculas, incluyendo proteínas/polipéptidos conservando de este modo la funcionalidad del transportador, de tal modo que retiene su habilidad para obtener las respuestas inmunes deseadas contra el inmunógeno peptídico que de otra manera no se darían sin un transportador. Además, la invención también se relaciona con composiciones inmunogénicas que contienen tales conjugados.

La divulgación describe un primer método de conjugación de un inmunógeno peptídico que comprende péptido A β o fragmentos de A β o análogos del mismo por medio de un grupo reactivo de un residuo de aminoácido del inmunógeno peptídico con un transportador de proteína/polipéptido que tiene uno o más grupos funcionales, comprendiendo el método las etapas de: (a) derivatizar uno o más de los grupos funcionales del transportador de proteína/polipéptido para generar una molécula derivatizadas con sitios reactivos; (b) hacer reaccionar el transportador derivatizado de proteína/polipéptido del a etapa (a) con un grupo reactivo de un residuo de aminoácido del inmunógeno peptídico bajo condiciones de reacción de tal manea que el inmunógeno peptídico se conjugue con el transportador derivatizado de la proteína/polipéptido por medio de los grupos funcionales; y (c) hacer reaccionar además el conjugado con un reactivo de restricción para inactivar los grupos funcionales reactivos libres en el transportador activado de proteína/polipéptido, conservando de este modo la funcionalidad del transportador de tal manera que retiene su habilidad para obtener las respuesta inmunes deseadas contra el inmunógeno peptídico que de otra manera no se daría sin un transportador.

El transportador de proteína/polipéptido es CRM₁₉₇.

La invención proporciona un inmunógeno peptídico que comprende fragmentos de A β que obtienen una respuesta inmunogénica contra ciertos epítopes en A β . Los péptidos inmunogénicos de la invención incluyen péptidos heterólogos inmunogénicos. En algunos péptidos inmunogénicos, una fragmento de A β s une a un transportador para formar un péptido heterólogo inmunogénico, y después este péptido heterólogo se une a un transportador que usa un método de la presente invención para formar un conjugado.

En otro aspecto de la invención, el inmunógeno peptídico es un polipéptido que comprende un segmento de terminal N de al menos 1-5 residuos de A β , siendo el primer residuo de A β el residuo de terminal N del polipéptido, donde el polipéptido está libre de un segmento de terminal C de A β . En otro aspecto más de la invención, el inmunógeno peptídico es un polipéptido que comprende un segmento de terminal N de A β , empezando el segmento en el residuo 1-3 de A β y acabando en los residuos 7-11 de A β . En algunos aspectos de la invención, el inmunógeno peptídico es una gente que induce una respuesta inmunogénica contra un segmento de terminal N de A β , empezando el segmento en el residuo 1-3 de A β y acabando en los residuos 7-11 de A β sin inducir una respuesta inmunogénica contra un epítope en los residuos de A β 43. En otro aspecto de la invención, el inmunógeno peptídico es un polipéptido heterólogo que comprende un segmento de A β unido a una secuencia heteróloga de aminoácido que induce una respuesta de célula T ayudante contra la secuencia heteróloga de aminoácido y de este modo una respuesta de célula B contra el segmento de terminal N.

En algunos inmunógenos peptídicos, el segmento de terminal N de A β está unido en su terminal C a un polipéptido heterólogo. En algunos inmunógenos peptídicos, el segmento de terminal N de A β está unido en su terminal N a un polipéptido heterólogo. En algunos inmunógenos peptídicos, el segmento de terminal N está unido en sus terminales N y C al primer y segundo polipéptido heterólogo. En algunos inmunógenos peptídicos, el segmento de terminal N de A β está unido en su terminal N a un polipéptido heterólogo, y en su terminal C a al menos una copia adicional del segmento de terminal N. En algunos inmunógenos peptídicos, el polipéptido

comprende de terminal N a terminal C, el segmento de terminal N de A β , una pluralidad de copias adicionales del segmento de terminal N y el segmento de aminoácido heterólogo.

5 En algunos de los inmunógenos peptídicos anteriores, el polipéptido comprende además al menos una copia adicional del segmento de terminal N. En algunos de los inmunógenos peptídicos anteriores, el fragmento está libre de al menos los 5 aminoácidos de terminal C en A β 43.

10 En algunos aspectos de los inmunógenos peptídicos anteriores, el fragmento comprende hasta 10 aminoácidos contiguos de A β .

En otro aspecto, la invención proporciona un inmunógeno peptídico que comprende péptido A β de fragmentos de A β o análogos de los mismos que obtienen una respuesta inmunogénica contra ciertos epítopes en A β pueden estar en una configuración referida como configuración de péptidos de antígenos múltiples (PAM).

15 En algunos de los aspectos anteriores de la invención, el inmunógeno peptídico de la terminal N es la mitad de A β . En algunos aspectos de la invención, el inmunógeno peptídico es un fragmento A β seleccionado del grupo consistente en A β 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-11, 1-12, 1-16, 3-6 y 3-7. En algunos de los aspectos anteriores de la invención, el inmunógeno peptídico es de la región interna de A β . En algunos de los aspectos de la invención, el inmunógeno peptídico es un fragmento A β seleccionado del grupo consistente en A β 13-28, 15-24, 17-28 y 25-35. En algunos de los aspectos anteriores de la invención, el inmunógeno peptídico es del final de la terminal C de A β . En algunos de los aspectos de la invención, el inmunógeno peptídico es un fragmento A β seleccionado del grupo consistente en A β 33-42, 35-40 y 35-42. En algunos aspectos de la invención, el inmunógeno peptídico es un fragmento A β seleccionado del grupo consistente en A β 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-11, 1-12, 1-16, 1-28, 3-6, 2-7, 13-28, 15-24, 17-28, 25-35, 33-42, 35-40 y 35-42. En algunos aspectos de la invención, el inmunógeno peptídico es un fragmento A β seleccionado del grupo consistente en A β 1-5, A β 1-7, A β 1-9 y A β 1-12. En algunos aspectos de la invención, el inmunógeno peptídico es un fragmento A β seleccionado del grupo consistente en A β 1-5-L, A β 1-7-L, A β 1-9-L y A β 1-12-L, donde L es un enlazador. En algunos aspectos de la invención, el inmunógeno peptídico es un fragmento A β seleccionado del grupo consistente en A β 1-5-L-C, A β 1-7-L-C, A β 1-9-L-C y A β 1-12-L-C, donde C es un residuo de aminoácido cisteína.

30 En algunos aspectos de la invención, el inmunógeno peptídico es un fragmento A β seleccionado del grupo consistente en A β 16-22, A β 16-23, A β 17-23, A β 17-24, A β 18-24 y A β 18-25. En algunos aspectos de la invención, el inmunógeno peptídico es un fragmento A β seleccionado del grupo consistente en A β 16-22-C, A β 16-23-C, A β 17-23-C, A β 17-24-C, A β 18-24-C y A β 18-25-C, donde C es un residuo de aminoácido cisteína. En otros aspectos de la invención, el inmunógeno peptídico es un fragmento A β seleccionado del grupo consistente en C-A β 16-22, C-A β 16-23, C-A β 17-23, C-A β 17-24, C-A β 18-24 y C-A β 18-25, donde C es un residuo de aminoácido cisteína.

35 En algunos de los inmunógenos peptídicos anteriores, el polipéptido heterólogo se selecciona del grupo consistente en péptido que tienen un epítipo de célula T, un epítipo de célula B y combinaciones de los mismos.

40 En una realización, el grupo funcional de una o más moléculas de aminoácido del transportador de proteína/polipéptido o del enlazador de polipéptido opcionalmente unido se derivatiza usando un reactivo de enlace cruzado. En otra realización, el reactivo de derivatización es un reactivo de enlace cruzado de longitud cero. En otra realización, el reactivo de derivatización es un reactivo de enlace cruzado homobifuncional. En otra realización más, el reactivo de derivatización es un reactivo de enlace cruzado heterobifuncional.

45 En una realización preferente, el reactivo heterobifuncional es un reactivo que reacciona con un grupo funcional primario o ϵ -amina de una o más moléculas de aminoácido del transportador de proteína/polipéptido y un grupo colgante tiol de una o más moléculas de aminoácido del inmunógeno peptídico. En una realización, el reactivo heterobifuncional es N-succinimidil bromoacetato.

50 En otra realización, el grupo funcional primario o ϵ -amina es lisina. En otra realización más, la derivatización del grupo funcional primario o ϵ -amina de la lisina del transportador de proteína/polipéptido con N-succinimidil bromoacetato da como resultado la bromoacetilación de los residuos primarios o ϵ -amina en molécula de lisina en el transportador de proteína/polipéptido. En una realización más preferente, el grupo colgante tiol es un residuo de cisteína del inmunógeno peptídico, que puede localizarse en la terminal amino del inmunógeno peptídico, en la terminal carboxi del inmunógeno peptídico o internamente en el inmunógeno peptídico.

55 En otra realización, el grupo colgante tiol se genera por un reactivo de tiolización tal como N-acetil homocisteína tio lactona, reactivo de Traut (2-iminotilano) SATA (N-Succinimidil S-acetiltioacetato), SMPT (4-Succinimidiloxycarbonil-metil2-piridilditio tolueno), Sulfo LC SPDP (Sulfo Succinimidil piridil ditio propionamido hexanoato), SPDP (Succinimidil piridil ditio propionato). En una realización preferente, el reactivo de restricción que se usa para inactivar reactivos libres, grupos funcionales en el transportador activado de proteína/polipéptido se selecciona del grupo de reactivos consistente en cisteamina, N-acetilcisteamina y etanolamina.

60

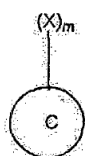
65

En una realización particularmente preferente, el reactivo de restricción que se usa para inactivar grupos funcionales de reactivo libres en el transportador activado de proteína/polipéptido se selecciona del grupo de reactivo consistente en hidróxido de sodio, carbonato de sodio, bicarbonato de sodio y amoniaco.

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

10 En otra realización, uno o más de los grupos funcionales son un enlazador, que esta opcionalmente unido al transportador de proteína/polipéptido. En una realización preferente, el enlazador es un enlazador de péptido. En una realización más preferente, el enlazador de péptido es polilisina.

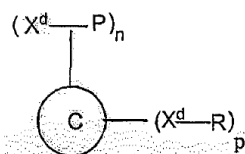
15 La divulgación describe un segundo método para conjugar un inmunógeno peptídico que comprende péptido de A β o fragmentos de A β o análogos de los mismos A β o análogos de los mismos con un transportador de proteína/polipéptido que tienen la siguiente estructura:



donde:

25 C es un transportador de proteína/polipéptido y X es un grupo funcional derivatizado de un residuo de aminoácido en el transportador de proteína/polipéptido u opcionalmente un residuo de aminoácido de un enlazador de péptido covalentemente unido al transportador de proteína/polipéptido, y donde m es un número entero superior a 0, pero inferior o igual a 85, comprendiendo el método las etapas de:

- 30 (a) derivatizar uno más de los grupos funcionales del transportador de proteína/polipéptido o de la molécula enlazadora opcionalmente unida para generar una molécula derivatizada con los sitios reactivos;
- (b) hacer reaccionar el transportador de proteína/péptido derivatizado de la etapa (a) con un grupo reactivo de un residuo de aminoácido del inmunógeno peptídico para formar un conjugado covalentemente unido de péptido de transportador inmunógeno-proteína/polipéptido; y
- 35 (c) hacer reaccionar además dicho conjugado con un reactivo de restricción para inactivar los grupos funcionales reactivos libres en el transportador activado de proteína/polipéptido, de tal manera que los grupos restringidos no sean libres para reaccionar con otras moléculas, incluyendo proteínas/polipéptidos conservando de este modo la funcionalidad del transportador, de tal manera que retenga su habilidad para obtener las respuestas inmunes deseadas contra el inmunógeno peptídico que de otra manera se darían sin un transportador para generar un conjugado de transportador de péptido restringido inmunógeno-proteína/polipéptido que tiene la siguiente fórmula:
- 40



donde

50 C es el transportador de proteína/polipéptido y X^d es un grupo funcional derivatizado de un residuo de aminoácido del transportador de proteína/polipéptido u opcionalmente de un residuo de aminoácido de un enlazador de péptido covalentemente unido al transportador de proteína/polipéptido, y donde,

55 P es la molécula de inmunógeno peptídico covalentemente unida al grupo funcional derivatizado en el residuo de aminoácido en el transportador de proteína u opcionalmente un residuo de aminoácido en un enlazador de péptido covalentemente unido al transportador de proteína/polipéptido, R es una molécula de restricción covalentemente unida al grupo funcional derivatizado o un residuo de aminoácido en el transportador de proteína/polipéptido u opcionalmente un residuo de aminoácido en un enlazador de péptido covalentemente unido a un transportador de proteína/polipéptido, n es un número entero superior a 0, pero inferior o igual a 85, y p es un número entero superior a 0, pero inferior a 85.

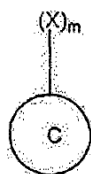
60

Las realizaciones detalladas para el primer método descrito anteriormente también son aplicables a los conjugados que se acaban de describir preparados mediante el segundo método.

65

La divulgación proporciona inmunógeno peptídico que comprende péptido de Aβ o fragmentos de Aβ o análogos de los mismos Aβ o análogos de los mismos/conjugados de transportador de polipéptido donde el transportador de proteína/polipéptido tiene la fórmula:

5

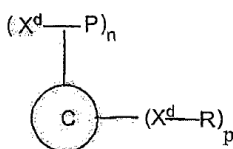


10

donde, C es un transportador de proteína/polipéptido y X es un grupo funcional derivatizado de un residuo de aminoácido en el transportador de proteína/polipéptido u opcionalmente un residuo de aminoácido de un enlazador de péptido covalentemente unido al transportador de proteína/polipéptido, y donde m es un número entero superior a 0, pero inferior o igual a 85, y donde el conjugado de inmunógeno peptídico-proteína/transportador de polipéptido que tiene la fórmula:

15

20



25

donde

C es el transportador de proteína/polipéptido y X^d es un grupo funcional derivatizado de un residuo de aminoácido del transportador de proteína/polipéptido u opcionalmente de un residuo de aminoácido de un enlazador de péptido covalentemente unido al transportador de proteína/polipéptido, y donde, P es la molécula de inmunógeno peptídico covalentemente unida al grupo funcional derivatizado del residuo de aminoácido del transportador de proteína u opcionalmente de un residuo de aminoácido de un enlazador de péptido covalentemente unido a un transportador de proteína/polipéptido, R es una molécula de restricción covalentemente unida al grupo funcional derivatizado de un residuo de aminoácido del transportador de proteína/polipéptido u opcionalmente de un residuo de aminoácido de un enlazador de péptido covalentemente unido a un transportador de proteína/polipéptido, conservando de este modo la funcionalidad del transportador, de tal manera que retiene su habilidad para obtener las respuestas inmunes deseadas contra el inmunógeno peptídico que de otra manera no se darían sin un transportador, n es un número entero superior a 0, pero inferior o igual a 85, y p es un número entero superior a 0, pero inferior a 85.

30

35

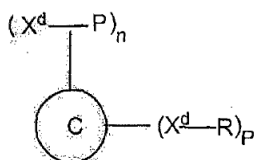
40

Las realizaciones detalladas para el primer y segundo método descritos anteriormente también son aplicables a los conjugados que se acaban de describir.

45

También se describen inmunógenos peptídicos que comprenden péptido de Aβ o fragmentos de Aβ o análogos de los mismos Aβ o análogos de los mismos/conjugados de transportador de polipéptido generados de acuerdo con el segundo método de la invención y que tienen la fórmula:

50



donde,

55

C es el transportador de proteína/polipéptido y X^d es un grupo funcional derivatizado de un residuo de aminoácido del transportador de proteína/polipéptido u opcionalmente de un residuo de aminoácido de un enlazador de péptido covalentemente unido al transportador de proteína/polipéptido, y donde, P es la molécula de inmunógeno peptídico covalentemente unida al grupo funcional derivatizado del residuo de aminoácido del transportador de proteína u opcionalmente de un residuo de aminoácido de un enlazador de péptido unido covalentemente unido a un transportador de proteína/polipéptido, R es una molécula de restricción covalentemente unida al grupo funcional derivatizado de un residuo de aminoácido del transportador de proteína/polipéptido u opcionalmente de un residuo de aminoácido de un enlazador de péptido covalentemente unido a un transportador de proteína/polipéptido, conservando de este modo la funcionalidad del transportador, de tal manera que retiene su habilidad para obtener las respuestas inmunes deseadas contra el inmunógeno peptídico que de otra manera no se darían sin un transportador, n es un número entero superior a 0, pero inferior o igual a 85, y p es un número entero superior a 0, pero inferior a 85.

60

65

Las realizaciones detalladas el segundo método descrito anteriormente también son aplicables a los conjugados generados mediante el segundo método, como se acaba de describir.

5 En otra realización, la invención se dirige a composiciones inmunogénicas que comprenden un conjugado de un inmunógeno peptídico con un transportador de proteína/polipéptido generado mediante el segundo método, junto con uno o más excipientes, diluyentes o adyuvantes farmacéuticamente aceptables.

10 Las realizaciones detalladas para el segundo método y los conjugados generados de este modo descritos anteriormente son también aplicables a composiciones inmunogénicas que contienen esos conjugados como se acaban de describir.

Breve descripción de los dibujos

15 Figura 1: Diagrama de flujo que representa la química de proceso usada para la conjugación de fragmentos de péptido de Aβ para transportador de proteína/polipéptido CRM₁₉₇ para formar el conjugado Aβ/CRM₁₉₇.

Figura 2: Diagrama de flujo que representa química de hidrólisis ácida usada para determinación cuantitativa de S-carboximetilcisteína y S-carboximetilcisteamina como evaluación del grado de conjugación de conjugados 20 inmunógeno peptídico-proteína/polipéptido tal como el conjugado Aβ/CRM₁₉₇.

Figura 3: Esta figura representa la dependencia de pH de la reacción de conjugación péptido Aβ/CRM.

Figura 4: esta figura representa la dependencia de la conjugación péptido Aβ/CRM en la proporción péptido:CRM.

25 Figura 5: Verificación del proceso de restricción para conjugación Aβ1-7/CRM. El pH de la reacción fue 9,15. El tiempo de reacción con péptido fue 16 horas, la restricción con N-acetilcisteamina fuer 8 horas.

Figura 6: Conjugación y restricción con varias proporciones péptido:CRM con péptido. El pH de la reacción fue 9,0. El tiempo de reacción fue 16 horas, la restricción con N-acetilcisteamina fue 8 horas.

30 Figura 7: Títulos de día 36 de sueros de primates después de inmunización de primates con conjugados de péptido Aβ con varios adyuvantes.

35 Figura 8: Títulos de día 64 de sueros de primates después de inmunización de primates con conjugados de péptido Aβ con varios adyuvantes.

Figura 9: Títulos de primates por día y grupo de tratamiento. Los primates se inmunizaron con conjugados CRM₁₉₇ Aβ 1-7 y Aβ 1-5 con alumbre o RC529 como adyuvantes y los títulos de anticuerpos anti- Aβ se midieron el día 29, 36, 57 y 54.

40 Figura 10: Los conjugados péptido-proteína se caracterizaron usando análisis de transferencia Western con un gel prefabricado de tris-tricina. Las calles son: marcador (calle 1); L-28375 24/01 (calle 2); L-28375 24/02 (calle 3); L-28375 24/03 (calle 4); L-28375 24/04 (calle 5); L-28375 24/05 (calle 6); L-28375 24/06 (calle 7) L-28375 24/07 (calle 8); L-28375 24/08 (calle 9); L-28375 24/09 (Simulación) (calle 10); y BrAcCRM₁₉₇ (calle 11).

45 **BREVE DESCRIPCIÓN DE SECUENCIAS**

SEQ ID NO:	Secuencia	Descripción
50 1	DAEFR-C	Aβ1-5-C
2	DAEFRHD-C	Aβ1-7-C
55 3	DAEFRHDSG-C	Aβ1-9-C
4	DAEFRHDSGYEV-C	Aβ1-12-C
5	DAEFR-GAGA-C	Aβ1-5-L-C
60 6	DAEFRHD-GAGA-C	Aβ1-7-L-C
7	DAEFRHDSG-GAGA-C	Aβ1-9-L-C
8	DAEFRHDSGYEV-GAGA-C	Aβ1-12-L-C
65 9	VEYGS DHRFEAD-C	Aβ12-1-C

ES 2 474 173 T3

SEQ ID NO:	Secuencia	Descripción
5 10	10 GAGA	Péptido enlazador
	11 PKYVKQNTLKLAT	Hemaglutinina de influenza:HA ₃₀₇₋₃₁₉
	12 AKXVAAWTLKAAA	Péptido PAN-PDR (péptido PADRE)
10	13 EKKIAKMEKASSVFNV	Malaria CS: epítoto T3
	14 FELLTRTLTI	Antígeno de superficie Hepatitis B: HB _s Ag ₁₉₋₂₈
	15 DQSIGDLIAEMDKVGNeg	Proteína 65 de choque térmico: hsp65 ₁₅₃₋₁₇₁
15	16 QVHFQPLPPAWKL	Bacillus Calmette-Guerin (BCG)
	17 QYIKANSKFIGITEL	Toxoide de tetanos: TT ₈₃₀₋₈₄₄
	18 FNNFTVSFWLRPKVSASHLE	Toxoide de tetanos: TT ₉₄₇₋₉₆₇
20	19 KQIINMWQEVGKAMY	VIH gp120 T1
	20 DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL-C- FNNFTVSFWLRPKVSASHLE- DAEFRHD	A β ₁₋₇ / TT ₈₃₀₋₈₄₄ /C/ TT ₉₄₇₋₉₆₇ / A β ₁₋₇
25	21 DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSN KGAIIGLMVGGVVIA	A β ₁₋₄₂
	22 DAEFRHDQYIKANSKFIGITEL	AN90549: A β ₁₋₇ TT ₈₃₀₋₈₄₄ (usado en configuración PAM4)
30	23 DAEFRHDFNNFTVSFWLRPKVSASHLE	AN90550: A β ₁₋₇ TT ₉₄₇₋₉₆₇ (usado en configuración PAM4)
	24 DAEFRHD- QYIKANSKFIGITELFNNFTVSFWLRPK	AN90542: A β ₁₋₇ TT ₈₃₀₋₈₄₄ + TT ₉₄₇₋₉₆₇ (usado en configuración PAM4)
35	25 EFRHDSG-QYIKANSKFIGITEL	AN90576: A β ₃₋₉ TT ₈₃₀₋₈₄₄ (usado en configuración PAM4)
40	26 AKXVAAWTLKAAA-DAEFRHD	AN90562: A β ₁₋₇ /PADRE
	27 DAEFRHD-DAEFRHDD- AEFRHDAKXVAAWTLKAAA	AN90543: A β ₁₋₇ x 3/PADRE
45	28 AKXVAAWTLKAAA-DAEFRHD- DAEFRHD-DAEFRHD	PADRE/ A β ₁₋₇ x 3
	29 DAEFRHD-AKXVAAWTLKAAA	A β ₁₋₇ x 3/PADRE
50	30 DAEFRHD-ISQAVHAAHAEINEAGR	A β ₁₋₇ /fragmento de albúmina
	31 FRHDSGY-ISQAVHAAHAEINEAGR	A β ₄₋₁₀ /fragmento de albúmina
55	32 EFRHDSG-ISQAVHAAHAEINEAGR	A β ₃₋₉ /fragmento de albúmina
60	33 PKYVKQNTLKLAT-DAEFRHD- DAEFRHD-DAEFRHD	HA ₃₀₇₋₃₁₉ / A β ₁₋₇ x 3
65	34 DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT- DAEFRHD	A β ₁₋₇ / HA ₃₀₇₋₃₁₉ / A β ₁₋₇

SEQ ID NO:	Secuencia	Descripción
5	35 DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT	Aβ ₁₋₇ x 3/ HA ₃₀₇₋₃₁₉
	36 DAEFRHD-DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT	Aβ ₁₋₇ x 2/ A ₃₀₇₋₃₁₉
10	37 DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT-EKKIAKMEKASSVFNV-QYIKANSKFIGITEL-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-DAEFRHD	Aβ ₁₋₇ / HA ₃₀₇₋₃₁₉ / Malaria CS/ TT _{830-844/947-967} / Aβ ₁₋₇
15	38 DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL-C-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE	Aβ ₁₋₇ x 3/ TT ₈₃₀₋₄₄ /CTT ₉₄₇₋₉₆₇
20	39 DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL-C-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE	Aβ ₁₋₇ / TT ₈₃₀₋₈₄₄ /CTT ₉₄₇₋₉₆₇
25	40 GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPGY VDSIQKGIQPKSGTQGNYYDDWKEFY STDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVV KVTYYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLS LTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLS LPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEIN FETRGRGQDAMYEMAQACAGNRVR RSVGSSSLCINLDWDVIRDKTKTKIESLK EHGPIKNKMSSEPNKTVSEKAKQYLEE	CRMβ ₁₉₇
30		
35		
40		
45		
	41 ISQAVHAAHAEINEAGR	Fragmento de albúmina
	42 DAEFGHDSGEVRHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA	Murina A(1-42)
50	43 VFFAEDVG-C	A(18-25-C)
	44 LVFFAEDV-C	A(17-24-C)
	45 KLVFFAED-C	A(16-23-C)
	46 C-VFFAEDVG	C-A-(18-25)
55	47 C-CLVFFAEDV	C-A-(17-24)
	48 C-KLVFFAEDV	C-A-(16-23)
	49 VFFAEDV-C	A(18-24-C)
60	50 LVFFAED-C	A(17-23-C)
	51 KLVFFAED-C	A(16-22-C)
	52 C-VFFAEDV	C-Aβ ₁₈₋₂₄
65	53 C-LVFFAED	C-Aβ ₁₇₋₂₃
	54 C-KLVFFAE	C-Aβ ₁₆₋₂₂

Descripción detallada de la invención

La presente invención también se dirige a composiciones inmunogénicas que comprenden dichos conjugados.

El planteamiento para aumentar la inmunogenicidad de moléculas pequeñas o pobremente inmunogénicas, tales como sacáridos, por medio de conjugación se ha utilizado con éxito durante décadas (véase, por ejemplo, Goebel et al. (1939) J. Exp. Med. 69:53), y se han descrito muchas composiciones inmunogénica en las cuales los polímeros capsulares se han conjugado con proteínas transportadoras para crear composiciones inmunogénicas más efectivas al explotar este "efecto transportador". Por ejemplo, Schneerson et al. (J. Exp. Med. 152: 361-376, 1980), describen conjugados de proteína de polisacárido de *Haemophilus influenzae* b que confieren inmunidad a enfermedades invasivas causadas por microorganismos. Los conjugados de PRP (polirribosilribitol fosfato, un polímero capsular de *H. influenzae* b) han demostrado ser más efectivos que las composiciones inmunogénicas basadas en el polisacárido solo (Chu et al. (1983) Infect. Immun. 40: 245; Schneerson et al. (1984), Infect. Immun. 45: 582-591). La conjugación también ha demostrado evitar la respuesta pobre del anticuerpo observada en niños cuando se inmunizaron con un polisacárido libre (Anderson et al. (1985) J. Pediatr. 107:346; Insel et al. (1986) J. Exp. Med. 158:294).

Una ventaja más de usar como transportador de proteína una toxina o toxoide bacteriano contra el que la inmunización rutinaria de humanos (por ejemplo, tétano o difteria) es una práctica estándar es que se induce una inmunidad deseada a la toxina o toxoide junto con la inmunidad contra los patógenos asociados al polímero capsular.

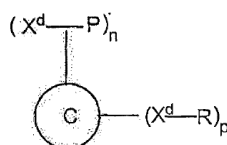
Los conjugados de determinante antigénico/hapteno-transportador también se están usando para producir anticuerpos monoclonales muy específicos que puedan reconocer epítopes químicos distintos en el hapteno acoplado. Los monoclonales resultantes a menudo se usan para investigar la estructura epitópica y las interacciones entre proteínas nativas. En muchos casos los determinantes antigénicos/haptenos usados para generar estos monoclonales son segmentos pequeños de péptido que representan sitios antigénicos cruciales sobre la superficie de proteínas más grandes. Los criterios para un transportador con éxito que se usará en la generación de un conjugado determinante antigénico/hapteno-transportador son el potencial para inmunogenicidad, la presencia de grupos funcionales adecuados para conjugación con un determinante antigénico/hapteno, propiedades de solubilidad razonable incluso después de la derivatización y falta de toxicidad *in vivo*.

Estos criterios los cumplen los conjugados generados por los métodos de la presente divulgación. Los conjugados pueden ser cualquier conjugado de transportador de inmunógeno peptídico generado usando el proceso de conjugación aquí descrito. Los conjugados se generan usando un proceso en el que un transportador de proteína/polipéptido que tiene la siguiente estructura:



está covalentemente unido a un transportador de proteína/polipéptido, donde,

C es un transportador de proteína CRM₁₉₇/polipéptido y X es un grupo funcional derivatizado en un residuo de aminoácido en el transportador de proteína/polipéptido u opcionalmente en un residuo de aminoácido en un enlazador de péptido covalentemente unido al transportador de proteína/polipéptido, y donde m es un número entero superior a 0, pero inferior o igual a 85, está covalentemente unido a un inmunógeno peptídico y donde el conjugado de inmunógeno peptídico-transportador de proteína/ polipéptido tiene la siguiente fórmula, está representado por la siguiente fórmula:



donde

C es el transportador de proteína CRM₁₉₇/polipéptido y X^d es un grupo funcional derivatizado en un residuo de aminoácido en el transportador de proteína/polipéptido u opcionalmente en un residuo de aminoácido en un enlazador de péptido covalentemente unido al transportador de proteína/polipéptido, P es un inmunógeno peptídico covalentemente unido al grupo funcional derivatizado en el residuo de aminoácido en el transportador de

proteína/polipéptido u opcionalmente en un residuo de aminoácido en un enlazador de péptido covalentemente unido a un transportador de proteína/polipéptido, R es una molécula de restricción covalentemente unida al grupo funcional derivatizado en un residuo de aminoácido en el transportador de proteína/polipéptido u opcionalmente en un residuo de aminoácido de un enlazador de péptido covalentemente unido a un transportador de proteína/polipéptido, conservando de este modo la funcionalidad del transportador, de tal manera que retiene su habilidad para obtener las respuestas inmunes deseadas contra el inmunógeno peptídico que de otra manera no se darían sin un transportador, n es un número entero superior a 0, pero inferior o igual a 85, y p es un número entero superior a 0, pero inferior a 85.

10 Selección de transportadores

Algunos inmunógenos peptídicos contienen el epítipo apropiado para inducir una respuesta inmune, pero son demasiado pequeños para ser inmunogénicos. En esta situación, los inmunógenos peptídicos se unen a un transportador adecuado para ayudar a obtener una respuesta inmune. En la representación esquemática anterior del conjugado inmunógenos peptídicos-transportador generados mediante un proceso de la presente invención, C es un transportador de proteína/polipéptido con el que los inmunógenos peptídicos se conjugan directamente mediante grupos funcionales derivatizados en residuos de aminoácido en los propios transportadores o mediante grupos funcionales derivatizados en enlazadores de péptido covalentemente unidos a los transportadores. Los transportadores de proteína/polipéptido adecuados incluyen, aunque no se limitan a, albúmina (incluyendo albúmina de suero humano), hemocianina de lapa californiana, moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovalbúmina, MSCRAMMS, toxoide de tétanos o un toxoide de otras bacterias patógenas que tienen toxicidad reducida, incluyendo mutantes, tales como difteria, E. coli, cólera o H. pylori, o un derivado atenuado de toxina. El transportador de la invención es la proteína CRM197 (SEQ ID NO: 40) que es reactiva de cruce con toxina de difteria.

Otros transportadores incluyen epítopes de célula T que se unen a múltiples alelos MHG, por ejemplo, al menos 75% de todos los alelos humanos MHC. Tales transportadores algunas veces se conocen en la técnica como "epítopes universales de célula T". Los transportadores ejemplares con epítopes universales de célula T incluyen:

30	Hemaglutinina de Influenza: HA307-319	PKYVKQNTLKLAT (SEQ ID NO. 11)
	Péptido PAN-DR (péptido PADRE)	AKWVAAWTLKAAA (SEQ ID NO. 12)
	Malaria CS: epítipo T3	EKKIAKMEKASSVFNV (SEQ ID NO. 13)
	Antígeno de superficie Hepatitis B: HB _s Ag ₁₉₋₂₈	FELLTRILTI (SEQ ID NO. 14)
	Proteína de choque térmico: hsp65 ₁₅₃₋₁₇₁	QSIGDLIAEAMDKVGN (SEQ ID NO. 15)
35	Bacillus Calmette-Guerin (BCG)	QVHFQPLPPAVVKL (SEQ ID NO. 16)
	Toxoide de tétanos: TT ₈₃₀₋₈₄₄	QYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO. 17)
	Toxoide de tétanos: TT ₉₄₇₋₉₆₇	NNFTVSWFLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO. 18)
	VIH GP120 T1:	KQIINMWQEVGKAMY (SEQ ID NO. 19)
40	CRM ₁₉₇	Véase la Breve Descripción de las Secuencias (SEQ ID NO: 40)
	Fragmento de albúmina	ISQAVHAAHAEINEAGR (SEQ ID NO: 41)

Otros transportadores para estimular o mejorar una respuesta inmune y con los que un inmunógeno peptídico o un hapteno se pueden conjugar incluyen citoquinas tales como IL-1, IL-1 α y péptidos β , IL-2, γ INF, IL-10, GM-CSF, y quimioquinas, tales como MIP 1 α y β y RANTES. Los péptidos inmunogénicos también pueden unirse a transportadores de proteínas/péptidos que mejoran el transporte a través de tejidos, como se describe en O'Mahony, WO 97/171163 y WO 97/17614.

Aún más transportadores incluyen peptidasa C5a estreptococal recombinante, *Streptococcus pyogenes* ORFs 1224, 1664 y 2452, *Chlamydia pneumoniae* ORFs T367 y T858, *Streptococcus pneumoniae* pneumolisina, mutantes de pneumolisina con toxicidad reducida, factores de crecimiento y hormonas.

En la presente invención, la proteína transportadora es CRM₁₉₇, un mutante no tóxico de toxina de difteria con un cambio de aminoácido en su secuencia primaria. La glicina presente en la posición de aminoácido 52 de la molécula se sustituye por un ácido glutámico debido a un único cambio de codón de ácido nucleico. Debido a este cambio, la proteína carece de actividad ADP-ribosil transferasa y se convierte en no tóxica. Tiene un peso molecular de 58.408 Da. CRM₁₉₇ se produce en grandes cantidades mediante expresión recombinante de acuerdo con la patente de Estados Unidos 5.614.382. Las conjugaciones de sacáridos así como los péptidos para CRM₁₉₇ se realizan mediante unión a través de los grupos amino ϵ de residuos de lisina. Mediante varios productos comerciales se ha establecido que CRM₁₉₇ es un transportador excelente y seguro para epítopes de célula B.

65 Péptidos inmunogénicos

Como aquí se usan, los términos "inmunógeno peptídico" o "hapteno" es cualquier proteína o estructura/fragmento/análogo de subunidad derivada de los mismos que puede obtener, facilitar o ser inducida para producir una respuesta inmune en la administración a un mamífero. En particular, los términos se usan para referirse

a un determinante antigénico polipéptido de cualquier fuente (bacteria, virus o eucariota), que puede acoplarse a un transportador usando un método aquí descrito. Tales determinantes de inmunógeno peptídico/antigénico pueden ser de origen viral, bacteriano o de célula eucariótica.

5 Los inmunógenos peptídicos pueden conjugarse con un transportador para su uso como un agente inmunoterapéutico en la prevención, tratamiento, profilaxis o mejora de varias enfermedades humanas. Tales inmunógenos peptídicos incluyen aquellos derivados de A β un péptido de 39-43 aminoácidos, preferentemente 42 aminoácidos, que es el principal componente de placas características de enfermedad de Alzheimer (EA) (véase US 4.666.829; Glenner & Wong (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120: 1131, Hardy (1984) *TINS* 20: 1131; Hardy (1977) *TINS* 20: 154), aquellos derivados de péptidos amiloides de amilina, un material polipéptido producido por células islotes pancreáticas que ha estado implicado en diabetes tipo II, péptidos derivados de productos genéticos de lipoproteína de baja densidad, que han estado implicados en aterosclerosis y péptidos antigénicos derivados de citoquinas y factores del crecimiento tales como interleuquina 6 (IL-6), factor α de necrosis tumoral (TNF- α) y GDF-8. Tales inmunógenos peptídicos eucarióticos pueden incluir epítipo de célula T (CTL) o de célula B, también conocido como proteína β -amiloide, o péptido A4.

10 A β , también conocido como péptido β -amiloide, o péptido A4 (véase US 4.666.829; Glenner & Wong, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 120, 1131 (1984)), es un péptido de 39-43 aminoácidos, que es el componente principal de placas características de enfermedad de Alzheimer. A β se genera procesando una proteína más grande APP por dos enzimas, denominadas secretasas β y γ (véase Hardy, *TINS* 20, 154 (1997)). Las mutaciones conocidas en APP asociada con enfermedad de Alzheimer ocurren próximas al sitio de secretasa β y γ , o en A β . Por ejemplo, la posición 771 está próxima al sitio de segmentación de secretasa γ de APP en su procesamiento a A β , y las posiciones 670/671 están próximas al sitio de segmentación de secretasa β . Se cree que las mutaciones causan AD al interactuar con los sitios de segmentación por los que se forma A β para aumentar la cantidad de la forma de aminoácido 42/43 de A β generado.

20 A β tiene la propiedad inusual de que puede fijar y activar cascadas complementarias clásicas y alternativas. En particular, se une a C1q y por último a C3bi. Esta asociación facilita en enlace con macrófagos que llevan a la activación de células B. Además, C3bi se descompone y después se enlaza con CR2 en células B de una manera dependiente de célula T llevando a un aumento de 10.000 en la activación de estas células. Este mecanismo provoca que A β genere una respuesta inmune en exceso de la de otros antígenos.

25 A β tienen varias formas de darse de manera natural. Las formas humanas de A β se refieren como A β 39, A β 40, A β 41, A β 42 y A β 43. Las secuencias de estos péptidos y su relación con el precursor APP se ilustran en la Figura 1 de Hardy et al., *TINS* 20, 155-158 (1997). Por ejemplo, A β 42 tiene la secuencia.

H₂N-Asp-Ala-Glu-Fe-Arg-His-Asp-Ser-Gli-Tir-Glu-Val-His-His-Gln-Lis-Leu-Val-Fe-Fe-Ala-Glu-Asp-Val-Gli-Ser-Asn-Lis-Gli-Ala-Ile-Ile-Gli-Leu-Met-Val-Gli-Gli-Val-Val-Ile-Ala-OH (SEQ ID NO. 21).

35 A β 41, A β 40 y A β 39 difieren de A β 42 en la omisión de Ala, Ala-Ile y Ala-Ile-Val respectivamente del extremo de terminal C. A β 43 difiere de A β 42 en la presencia de un residuo de treonina en la terminal C.

40 Los inmunógenos peptídicos que son fragmentos de A β son ventajosos en relación con la molécula intacta para su uso en el presente método por varias razones. En primer lugar, debido a que solamente ciertos epítopos en A β inducen una respuesta inmunogénica útil para el tratamiento de Alzheimer, una dosis igual de masa de un fragmento que contiene tales epítopos proporciona una mayor concentración molar de los epítopos inmunogénicos útiles que una dosis de A β intacto. En segundo lugar, ciertos inmunógenos peptídicos de A β generan una respuesta inmune contra depósitos de amiloides sin generar una respuesta inmunogénica significativa contra proteína APP de la que se deriva A β . En tercer lugar, los inmunógenos peptídicos de A β son más simples de fabricar que A β intacto debido a su tamaño más corto. En cuarto lugar, los inmunógenos peptídicos de A β no se agregan de la misma manera que A β intacto, simplificando la generación de conjugados con transportadores.

45 Algunos inmunógenos peptídicos de A β tienen una secuencia de al menos 2, 3, 5, 6, 10 o 20 aminoácidos contiguos de un péptido natural. Algunos inmunógenos peptídicos no tienen más de 10, 9, 8, 7, 5 o 3 residuos contiguos de A β . En una realización preferente, los inmunógenos peptídicos de la mitad de terminal N de A β se usan para preparar conjugados. Los inmunógenos peptídicos preferentes incluyen A β 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-11, 3-7, 1-3 y 1-4. La designación A β 1-5 por ejemplo, indica un fragmento de terminal N que incluye residuos 1-5 de A β . Los fragmentos de A β que comienzan en un fragmento de terminal N y que acaban en un residuo dentro de los residuos 7-11 de A β son particularmente preferentes. El fragmento A β 1-12 también puede usarse pero es menos preferente. En algunos métodos, el fragmento es un fragmento de terminal N diferente a A β 1-10. Otros fragmentos preferentes incluyen A β 13-28, 15-24, 1-28, 25-35, 35-40, 35-42 y otros fragmentos internos y fragmentos de terminal C.

50 Algunos péptidos A β de la invención son péptidos inmunogénicos que en la administración a un paciente humano o animal generan anticuerpos que específicamente se enlazan con uno o más epítopos entre los residuos 16 y 25 de A β . Los fragmentos preferentes incluyen A β 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24 y 18-25. Los anticuerpos que específicamente se enlazan con epítopos entre los residuos 16 y 25 se enlazan específicamente con A β soluble

sin enlazarse con las placas de A β . Estos tipos de anticuerpo pueden enlazarse específicamente con A β soluble en la circulación de un paciente o modelo animal sin enlazarse específicamente con placas de depósitos de A β en el cerebro del paciente o modelo. El enlace específico de anticuerpos con A β soluble inhibe a A β de ser incorporado en placas inhibiendo de este modo el desarrollo de placas en un paciente e inhibiendo un mayor aumento en el tamaño o frecuencia de placas si tales placas ya se han desarrollado antes de administrar el tratamiento.

Preferentemente, el fragmento de A β administrado carece de un epítoto que generaría una repuesta de célula T al fragmento. Generalmente, los epítotos de célula T tienen más de 10 aminoácidos contiguos. Por lo tanto, los fragmentos preferentes de A β tienen un tamaño de 5-10 o preferentemente 7-10 aminoácidos contiguos o más preferentemente 7 aminoácidos contiguos; esto es, una longitud suficiente para generar una respuesta de anticuerpo sin generar una respuesta de célula T. La ausencia de epítotos de célula T es preferente porque estos epítotos no son necesarios para la actividad inmunogénica de fragmentos, y pueden provocar una respuesta inflamatoria no deseada en un subconjunto de pacientes (Anderson et al., (2002) J. Immunol. 168, 3697-3701; Senior (2002) Lancet Neurol., 1,3).

El fragmento A β 15-25 y los sub-fragmentos de los 7-8 aminoácidos contiguos del mismo son preferentes porque estos péptidos generar de manera consistente una alta repuesta inmunogénica para el péptido A β . Estos fragmentos incluyen A β 16-22, A β 16-23, A β 16-24, A β 17-23, A β 17-24, A β 18-24 y A β 18-25. Los fragmentos A β 15-25 particularmente preferente tienen 7 aminoácidos contiguos de longitud. La designación A β 15-21 por ejemplo, indica un fragmento que incluye 15-21 residuos de A β y que carece de otros residuos de A β y preferentemente 7-10 aminoácidos contiguos. Estos fragmentos pueden generar una respuesta de anticuerpo que incluye anticuerpos específicos del extremo.

Los inmunógenos peptídicos de A β requieren una exploración para actividad en la limpieza o prevención de depósitos de amiloide (véase WO 00/72880). La administración de fragmentos de terminal N de A β induce la producción de anticuerpos que reconocen depósitos de A β *in vivo* e *in vitro*. En estos métodos se usan fragmentos que carecen al menos de uno, y a veces al menos 5 o 10 aminoácidos de terminal C presentes en formas que ocurren de manera natural de A β . Por ejemplo, un fragmento que carece de 5 aminoácidos de extremo de terminal C de A β 43 induce los primeros 38 aminoácidos del extremo de terminal N de A β .

A menos que se indique lo contrario, la referencia a A β incluye las secuencias de aminoácido humano natural indicadas anteriormente así como análogos que incluyen alélicos, especies y variantes inducidas. Los análogos típicamente difieren de los péptidos que ocurren de manera natural en una, dos o unas pocas posiciones, a menudo en virtud de sustituciones conservadoras. Los análogos típicamente muestran al menos 80 o 90% de identidad de secuencia con péptidos naturales. Algunos análogos también incluyen aminoácidos no naturales o modificaciones de aminoácidos de terminal N o C en una, dos o unas pocas posiciones. Por ejemplo, el residuo de ácido aspártico natural en la posición 1 y/o 7 de A β puede sustituirse por ácido iso-aspártico.

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

Los inmunógenos peptídicos también incluyen polipéptidos más largos que incluyen, por ejemplo, un inmunogénico de péptido A β , junto con otros aminoácidos. Por ejemplo, los péptidos inmunogénicos preferentes incluyen proteínas de fusión que comprenden un segmento de A β unido a una secuencia heteróloga de aminoácido que induce una respuesta de célula T ayudante contra la secuencia heteróloga de aminoácido y de este modo una respuesta de célula B contra el segmento A β . Tales polipéptidos pueden explorarse para eficacia profiláctica o terapéutica en modelos de animales en comparación con controles no tratados o con placebo como se describe en WO/72880.

El péptido A β , análogo, fragmento inmunogénico u otro polipéptido puede administrarse en forma desagregada o agregada. A β desagregado o fragmentos del mismo significan unidades monoméricas de péptido. A β desagregado o fragmentos del mismo son generalmente solubles, y son capaces de auto-agregarse para formar oligómeros solubles, protofibrillas y ADDLs. Los oligómeros de A β o fragmentos de los mismos son normalmente solubles y existen predominantemente como hélices alfa o espirales aleatorias. A β agregado o fragmentos del mismo significa oligómeros de A β o fragmentos de los mismos que se han asociado en montajes insolubles de lámina beta. A β agregado o fragmentos del mismo también significan polímeros fibrilares. Las fibrillas son normalmente insolubles. Algunos anticuerpos se enlazan con A β soluble o fragmentos del mismo o A β agregado o fragmentos del mismo. Algunos anticuerpos se enlazan con A β soluble o fragmentos del mismo y con A β agregado o fragmentos del mismo.

Los péptidos inmunogénicos también incluyen multímeros de péptidos inmunogénicos monoméricos. Los péptidos inmunogénicos diferentes a los péptidos A β deberían inducir una respuesta inmunogénica contra uno o más de los fragmentos preferentes de A β listados anteriormente (por ejemplo, A β 1-3, 1-7, 1-10 y 3-7).

Los péptidos inmunogénicos de la presente invención están unidos a un transportador usando un método de la presente divulgación para formar un conjugado. El péptido inmunogénico puede unirse en su terminal amino, su terminal carboxilo o en ambas a un transportador para formar un conjugado. Opcionalmente, pueden estar presente múltiples repeticiones del péptido inmunogénico en el conjugado.

Un fragmento de terminal N de A β puede estar unida en su terminal C a un péptido transportador para formar un conjugado. En tales conjugados, el residuo de terminal N del fragmento de A β constituye el residuo de terminal N del conjugado. Por consiguiente, tales conjugados son efectivos para inducir anticuerpos que se enlazan con un epítipo que requiere que el residuo de terminal N de A β esté en forma libre. Algunos péptidos inmunogénicos de la invención comprenden una pluralidad de repeticiones de un segmento de terminal N de A β unido en la terminal C a uno o más copias del péptido transportador para formar in conjugado. El fragmento de terminal N de A β incorporado a tales conjugados a menudo empieza en A β 1-3 y acaba en A β 7-11. A β 1-7, 1-3, 1-4, 1-5 y 3-7 son fragmentos de A β de terminal N preferentes. Algunos conjugados comprenden diferentes segmentos de terminal N de A β en tándem. Por ejemplo, un conjugado puede comprender A β 1-7 seguido de A β 1-3 unido al transportador.

En algunos conjugados, un segmento de terminal N de A β se une en su extremo de terminal N a un péptido transportador. La misma variedad de segmentos de terminal N de A β pueden usarse con unión de terminal C. Algunos conjugados comprenden un péptido transportador unido a la terminal N de un segmento de terminal N de A β , que a su vez está unido a uno o más segmentos adicionales de terminal N de A β en tándem. Preferentemente, tales fragmentos inmunogénicos de A β , una vez conjugados con un transportador adecuado, inducen una repuesta inmunogénica que está específicamente dirigida al fragmento A β sin dirigirse a otros fragmentos de A β .

Los péptidos inmunogénicos de la invención incluyen péptidos heterólogos inmunogénicos. En algunos péptidos inmunogénicos, un fragmento A β se une a un transportador para formar un péptido heterólogo inmunogénico. Este péptido heterólogo está unido a un transportador usando un método de la presente divulgación para formar un conjugado. Algunos de estos péptidos heterólogos inmunogénicos comprenden fragmentos de A β unidos a epítopes de toxoide del tétanos como se describe en US 5.196.512, EP 378.881 y EP 427.347. Opcionalmente, un péptido inmunogénico puede unirse a una o más copias de un transportador, por ejemplo, en las terminales N y C del transportador para formar un péptido heterólogo inmunogénico. Otros de estos péptidos heterólogos inmunogénicos comprende fragmentos de A β unidos a péptidos transportadores descritos en US 5.736.142. Por ejemplo, un péptido heterólogo inmunogénico puede comprender A β 1-7 seguido de A β 1-3 seguido de un transportador. Ejemplos de tales péptidos heterólogos inmunogénicos incluyen:

A β 1-7/toxoide de tétanos 830-844 + 947-967 en una configuración lineal
DAEFRHD-QYIKANSKFIGITELFNNFTVSFWRVLPKVSASHLE (SEQ ID NO.:24)

Péptidos descritos en US 5.736.142 (todos en configuraciones lineales):

PADRE/A β 1-7:
AKXVAAWTLKAAA-DAEFRHD (SEQ ID NO.:26)

A β 1-7 x 3/PADRE:
DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-AKXVAAWTLKAAA (SEQ ID NO.:27)

PADRE/A β 1-7 x 3:
AKXVAAWTLKAAA-DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD (SEQ ID NO.:28)

A β 1-7/PADRE:
DAEFRHD-AKXVAAWTLKAAA (SEQ ID NO.:29)

A β 4-10/fragmento de albúmina:
DAEFRHD-ISQAVHAAHAEINEAGR (SEQ ID NO.:30)

A β 4-10/fragmento de albúmina:
FRHDSGY-ISQAVHAAHAEINEAGR (SEQ ID NO.:31)

EFRHSG-ISQAVHAAHAEINEAGR (SEQ ID NO.:32)

5 HA₃₀₇₋₃₁₉/A β ₁₋₇ x 3:
PKYVKQNTLKLAT-DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD (SEQ ID NO.:33)

A β ₁₋₇/HA₃₀₇₋₃₁₉/A β ₁₋₇:
DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT-DAEFRHD (SEQ ID NO.:34)

10 A β ₁₋₇x 3/HA₃₀₇₋₃₁₉:
DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT (SEQ ID NO.:35)

15 A β ₁₋₇x 2/HA₃₀₇₋₃₁₉:
DAEFRHD-DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT (SEQ ID NO.:36)

A β ₁₋₇/HA₃₀₇₋₃₁₉/Malaria CS/TT₈₃₀₋₈₄₄/TT₉₄₇₋₉₆₇/A β ₁₋₇

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

A β ₁₋₇ x 3/TT₈₃₀₋₈₄₄/C/TT₉₄₇₋₉₆₇

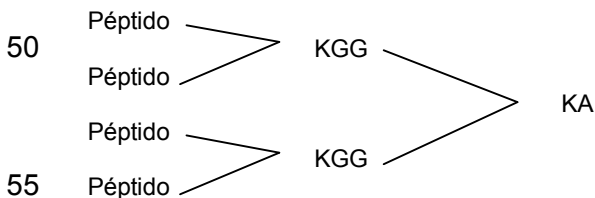
25 **DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL-C-
FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO.:38)**

30 A β ₁₋₇/TT₈₃₀₋₈₄₄/C/TT₉₄₇₋₉₆₇
DAEFRHD-QYIKANSKFIGITELCFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO.:39)

35 A β ₁₋₇/TT₈₃₀₋₈₄₄/C/TT₉₄₇₋₉₆₇-A β ₁₋₇
DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL-C-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-DAEFRHD (SEQ ID NO.:20)

40 Algunos péptidos heterólogos inmunogénicos comprenden un multímero de péptidos inmunogénicos representados por la fórmula 2^x, donde x es un número entero de 1-5. Preferentemente x es 1, 2 ó 3, siendo 2 el más preferente. Cuando x es dos, tal multímero tiene cuatro péptidos inmunogénicos unidos en una configuración preferente referida como PAM4 (véase US 5.229.490). Tales péptidos inmunogénicos se unen después a un transportador usando un método de la presente invención para formar un conjugado.

45 La configuración PAM4 se muestra más abajo, donde las estructuras ramificadas se producen iniciando síntesis de péptido en la terminal N y las aminas de cadena lateral de lisina. Dependiendo del número de veces se incorpore la lisina a la secuencia y se deje ramificar, la estructura resultante presentará múltiples terminales N. En este ejemplo, se han producido cuatro terminales N idénticas en el núcleo que contiene lisina ramificada. Tal multiplicidad mejora en gran medida la sensibilidad de células B similares.




Ejemplos de tales péptidos heterólogos inmunogénicos incluyen:

60 A β 1-7/toxoide de tétanos 830-844 en una configuración PAM4:
DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO: 22)

A β 1-7/toxoide de tétanos 947-967 en una configuración PAM4:
DAEFRHD-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO: 23)

A β 3-9/toxoide de tétanos 830-844 en una configuración PAM4:
EFRHDSG-QYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO: 25)

65 DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL en una resina con 2 ramas

Péptido
 Péptido  Lis-Gli-Cis

5

El péptido A β , análogo, fragmento activo y otros polipéptido puede administrarse en forma asociadas o multimérica o en forma disasociada. Los agentes terapéuticos también incluyen multímeros de agentes inmunogénicos monoméricos. Los agentes diferentes a los péptidos A β deberían inducir una respuesta inmunogénica contra uno más de los fragmentos preferentes de A β listados anteriormente (por ejemplo, 1-10, 1-7, 1-3 y 3-7), y pueden también conjugarse con un transportador usando un método de la presente invención. Preferentemente, tales agentes, una vez conjugados con un transportador apropiado, inducen una respuesta inmunogénica que se dirige específicamente a uno de estos fragmentos in dirigirs a otros fragmentos de A β . Para facilitar la conjugación de un inmunógeno peptídico con un transportador, pueden añadirse aminoácidos adicionales a las terminales de los determinantes antigénicos. Los residuos adicionales también pueden usarse para modificar las propiedades físicas o químicas del inmunógeno peptídico. Los aminoácidos tales como tirosina, cisteína, lisina, ácido glutámico o aspártico pueden introducirse en la terminal C o N del inmunógeno peptídico. Además, los enlazadores peptídicos que contienen aminoácidos tales como glicina y alanina también pueden introducirse. Además, los determinantes antigénicos pueden diferir de la secuencia natural al modificarse mediante acetilación de grupo NH₂ de terminal, por ejemplo, mediante alcanoil (C1-C20) o acetilación de tioglicolil, amidación de terminal-carboxi, por ejemplo, amoniaco, metilamina, etc. En algunos casos estas modificaciones pueden proporcionar sitios para unir a un soporte u otra molécula.

10

15

20

25

30

Los inmunógenos peptídicos usados para generar conjugados de la presente invención que usan un proceso aquí desvelado pueden combinarse mediante unión para formar polímeros (multímeros), o pueden formularse en una composición sin unión, como una mezcla. Donde un péptido se une a un péptido idéntico, formando de este modo un homopolímero, se presentan una pluralidad de unidades epitópicas repetidas. Por ejemplo, la tecnología de péptidos de antígenos múltiples (PAM) se usa para construir polímeros que contienen CTL y/o péptidos de anticuerpo y péptidos. Un "epitope CTL" es uno que se deriva de regiones epitópicas seleccionadas de antígenos dianas potenciales. Cuando los péptidos difieren, por ejemplo, un cocktail que representa diferentes subtipos virales, se proporcionan diferentes epitopes en un subtipo, diferentes especificidades de restricción HLA o péptidos que contienen epitopes ayudantes T, heteropolímeros con unidades repetidas. Además de las uniones covalentes, también se contemplan uniones no covalentes capaces de formar enlaces intermoleculares e intraestructurales.

35

Tales inmunógenos peptídicos y sus análogos se sintetizan mediante síntesis de péptido en fase sólida o expresión recombinante, o se obtienen a partir de fuentes naturales. Los sintetizadores automáticos de péptidos están disponibles en el mercado por parte de numerosos proveedores, tales como Applied Biosystems, Foster City, California.

40

La expresión recombinante puede ser en bacterias (tales como *E. coli*), levadura, células de insectos o células de mamífero. Los procedimientos para expresión recombinante los describen Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, NY, 2^a ed., 1989). Algunos péptidos inmunogénicos también están disponibles en el mercado (por ejemplo, American Peptides Company, Inc., Sunnyvale, CA, y California Peptide Research, Inc., Napa, CA):

45

50

Las bibliotecas aleatorias de péptidos u otros compuestos también pueden explorarse para su idoneidad como un inmunógeno peptídico. Las bibliotecas combinatorias pueden producirse para muchos tipos de compuestos que pueden sintetizarse de una manera paso a paso. Tales compuestos incluyen polipéptidos, imitadores de giro beta, hormonas, glicinas sustituidas por N oligomérico y oligocarbamatos y similares. Las bibliotecas combinatorias grandes de los compuestos pueden construirse mediante el método de bibliotecas sintéticas codificadas (BSC) descrito en WO 95/12608, WO 93/06121, WO 94/08051, WO 95/35503 y WO 95/30642. Las bibliotecas de péptidos también pueden generarse mediante métodos de expresión en fago (véase, por ejemplo, Devlin, WO 91/18980).

55

Derivatización y conjugación de un péptido inmunogénico con un transportador de proteína

60

65

El sitio de unión de un inmunógeno peptídico con un transportador de proteína/polipéptido, y la naturaleza del agente de enlace cruzado que se usa para unir un inmunógeno peptídico con el transportador son importantes para la especificidad del anticuerpo resultante generado contra él. Para un reconocimiento adecuado, el inmunógeno peptídico debe acoplarse al transportador con la orientación apropiada. Para que un anticuerpo reconozca posteriormente los inmunógenos peptídicos libres sin el transportador, el conjugado de inmunógeno peptídico-transportador de proteína/polipéptido debe presentar los inmunógenos peptídicos en una forma expuesta y accesible. La orientación óptima a menudo se consigue dirigiendo la reacción de enlace cruzado a sitios específicos en los inmunógenos peptídicos. Una manera de conseguir esto con un inmunógeno peptídico es uniendo un residuo de cisteína de terminal durante la síntesis de péptidos. Esto proporciona un grupo de sulfhidrilo en un extremo del péptido para su conjugación con el transportador. El enlace cruzado a través de este grupo proporciona la unión del inmunógeno peptídico solamente en un extremo, asegurando de este modo una orientación consistente.

En la conjugación inmunógeno peptídico-transportador, el objetivo no es mantener el estado nativo o la estabilidad nativa del transportador, sino presentar el hapteno de la mejor manera posible para el sistema inmune. Para conseguir este objetivo, la elección de química de conjugación puede controlar el título resultante, afinidad y especificidad de los anticuerpos generados contra el hapteno. Puede ser importante en algunos casos elegir un agente de enlace cruzado que contenga un brazo espaciador lo suficientemente largo para presentar el antígeno de una manera no restringida. También puede ser importante controlar la densidad del inmunógeno peptídico sobre la superficie del transportador. Una sustitución de inmunógeno peptídico demasiado pequeño puede dar como resultado en una respuesta muy pequeña o respuesta nula. Una densidad e inmunógeno peptídico demasiado alta puede provocar supresión inmunológica y disminuir la respuesta. Además, el propio enlazador cruzado puede generar una respuesta inmune no deseada. Estos tejidos necesitan tomarse en consideración en la selección no solamente de los reactivos apropiados de enlace cruzado, sino también las proporciones apropiadas de transportador de proteína/polipéptido e inmunógeno peptídico.

Son posibles una variedad de medios para unir los transportadores de proteína/polipéptido a los inmunógenos peptídicos. Las interacciones iónicas son posibles a través de terminales o a través del grupo ϵ amino de lisina. En enlace de hidrógeno entre los grupos laterales de los residuos y el inmunógeno peptídico también son posibles. Finalmente, las interacciones de conformación entre los transportadores de proteína/péptido y el péptido inmunogénico pueden dar lugar a una unión estable.

Se han generado de manera exitosa conjugados de inmunógenos peptídicos-transportador usando varios reactivos de enlace cruzado tales como enlazadores de cruce de longitud cero, homobifuncionales o heterobifuncionales. Los sistemas reactivos más pequeños disponibles para conjugación son los llamados enlazadores de cruce de longitud cero. Estos compuestos median la conjugación de dos moléculas mediante la formación de un enlace que no contiene átomos adicionales. De este modo, un átomo de una molécula es un espaciador. En muchos diseños de conjugación, el complejo final se une en virtud de componentes químicos que añaden estructuras externas a las sustancias que se están sometiendo a enlace cruzado. En algunas aplicaciones, la presencia de estos enlazadores intermedios puede ser perjudicial para el uso planeado. Por ejemplo, en la preparación de conjugados inmunógeno peptídico-transportador el complejo se forma con la intención de generar una respuesta inmune al hapteno unido. Ocasionalmente, una parte de los anticuerpos producidos mediante esta respuesta tendrá la especificidad para el agente de enlace cruzado usado en el procedimiento de conjugación. Los agentes de enlace cruzado de longitud cero eliminan el potencial para este tipo de reactividad cruzada al mediar una unión directa entre dos sustancias.

Los reactivos homobifuncionales, que primero fueron los reactivos de enlace cruzado para la modificación y conjugación de macromoléculas, consistían en compuestos bireactivos que contienen el mismo grupo funcional en ambos extremos (Hartman y Wold, 1966). Estos reactivos podían atar una proteína a otra mediante reacción covalente con los mismos grupos comunes en ambas moléculas. De este modo, las aminas ϵ lisina o aminas de terminal N de una proteína podrían someterse a enlace cruzado para los mismos grupos funcionales en una segunda proteína simplemente mezclando iso dos en presencia del reactivo homobifuncional.

Los reactivos de conjugación heterobifuncionales contienen dos grupos reactivos diferentes que pueden acoplarse a dos objetivos funcionales diferentes en proteínas y otras macromoléculas. Por ejemplo, una parte de un enlazador cruzado puede contener un grupo reactivo de amina, mientras otra parte puede consistir en un grupo reactivo sulfhidrilo. El resultado es la habilidad para dirigir la reacción de enlace cruzado a partes seleccionadas de moléculas dianas, consiguiendo de este modo un mejor control sobre el proceso de conjugación.

Los reactivos heterobifuncionales se usaron para proteínas de enlace cruzado y otras moléculas en un proceso de dos o tres etapas que limita el grado de polimerización a menudo obtenida usando enlazadores cruzados homobifuncionales.

Muchos métodos están actualmente disponibles para acoplar inmunógenos peptídicos a transportadores de proteína/polipéptido que usan enlazadores cruzados de longitud cero, homobifuncionales o heterobifuncionales. La mayoría de los métodos usan enlaces de amina, amida, uretano, isotiurea o disulfuro o en algunos casos tioéteres. El método más general acoplar proteínas o péptidos a péptidos utiliza reactivos de enlace cruzado bifuncionales. Estos son moléculas pequeñas espaciadoras que tienen grupos activos en cada extremo. Las moléculas espaciadoras pueden tener grupos activos idénticos o diferentes en cada extremo. Las funcionalidades activas más comunes, grupos de acoplamiento, y enlaces formados son:

1. Aldehído – amino \rightarrow amina secundaria
2. Maleimido – sulfhidrilo (tioéter)
2. Succinimido – amino (amida)
4. Ésteres de imidato – amino (-amida)
5. Fenil azida – amino (fenil amino)
6. Acil haluro – sulfhidrilo (tioéter)
7. Plridilsulfido – sulfhidrilo (disulfuro)

8. Isotiocionato – amino (isotiourea)

La reactividad de una proteína transportadoras dada, en términos de su habilidad para modificarse mediante un agente de enlace cruzado de tal manera que pueda conjugarse con un inmunógeno peptídico, se determina mediante su composición de aminoácido y la localización de secuencia de los aminoácidos individuales en la estructura tridimensional de la molécula, así como por la composición de aminoácido del inmunógeno peptídico.

En el caso de enlazadores ("L") en transportadores de proteína/péptido y otros péptidos (por ejemplo, transportadores de proteína/péptido y un inmunógeno peptídico), los espaciadores se seleccionan típicamente de Ala, Gli u otros espaciadores de aminoácidos no polares o aminoácidos polares neutrales. En ciertas realizaciones el espaciador neutral es Ala. Se entenderá que el espaciador opcionalmente presente no necesitar estar comprendido por los mismos residuos y por lo tanto puede ser un hetero- u homo-oligómero. Espaciadores ejemplares incluyen homo-oligómeros de Ala. Cuando está presente, el espaciador será tendrá normalmente al menos uno o dos residuos, más normalmente de tres a seis residuos. En otras realizaciones el transportador de proteína/polipéptido se conjuga con un inmunógeno peptídico, preferentemente con el transportador de proteína/polipéptido colocado en la terminal amino. El péptido puede unirse mediante un enlazador neutral, tal como Ala-Ala-Ala o similar, y preferentemente contiene además un residuo lípido tal como ácido palmítico o similar que está unido a grupos amino alfa o épsilon de un residuo Lis ((PAM)2Lis), que está unido al terminal amino del conjugado de péptido, típicamente por medio de unión Ser-Ser o similares.

En algunos aspectos de la invención, el inmunógeno peptídico es un fragmento A β seleccionado del grupo consistente en A β 1-5-L, A β 1-7-L, A β 1-9-L y A β 1-12-L. En algunos aspectos de la invención el enlazador es GAGA (SEQ ID NO: 10).

Para facilitar la conjugación de un inmunógeno peptídico con un transportador, puede añadirse aminoácidos adicionales a los terminales de los determinantes antigénicos. Los residuos adicionales pueden también usarse para modificar las propiedades físicas o químicas del inmunógeno peptídico. Los aminoácidos tales como tirosina, cisteína, lisina, ácido glutámico o aspártico, o similares, pueden introducirse en la terminal C- o N- del inmunógeno peptídico. Además, los enlazadores de péptido que contienen aminoácidos tales como glicina y alanina también pueden introducirse. Además, los determinantes antigénicos pueden diferir de la secuencia natural modificándose por acilación de grupo NH₂ de terminal, por ejemplo, mediante acetilación de alcanoil (C1-C20) o tioalcol, amidación de terminal carboxi, por ejemplo, amoniaco, metilamina, etc. En algunos caso estas modificaciones pueden proporcionar sitios para unirse a un soporte u otras moléculas.

En algunos aspectos de la invención, el inmunógeno peptídico es un fragmento A β seleccionado del grupo consistente en A β 1-5-C, A β 1-7-C, A β 1-9-C y A β 1-12-C, donde C es un residuo de aminoácido de cisteína. En algunos aspectos de la invención, el inmunógeno peptídico es un fragmento A β seleccionado del grupo consistente en A β 1-5-L-C, A β 1-7-L-C, A β 1-9-L-C y A β 1-12-L-C.

El inmunógeno peptídico está unido al transportador de proteína/polipéptido directamente o por medio de un enlazador en la terminal amino o carboxi del inmunógeno peptídico. La terminal amino de inmunógeno peptídico o el transportador de proteína/polipéptido puede acilarse. Además, el conjugado de inmunógeno peptídico-transportador de proteína/polipéptido puede unirse a ciertos lípidos de alcanilol (C1-C20) por medio de uno o más residuos de unión tales como Gli, Gli-Gli, Ser, Ser-Ser como se ha descrito anteriormente. Otras fracciones de lípido útiles incluyen colesterol, ácidos grasos y similares.

Los inmunógenos peptídicos pueden unirse a un transportador por medio de enlace cruzado químico. Las técnicas para unir un inmunógeno a un transportador incluyen la formación de uniones de disulfuro usando N-succinimidil-3-(2-piridil-tio) propionato (SPDP) (Carlsson, J et al. (1978) *Biochem J*, 173: 723) y succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC) (si el péptido carece de un grupo sulfhidrilo, esto puede proporcionarse mediante la adición de un residuo de cisteína al hapteno). Estos reactivos forman una unión de disulfuro entre ellos y la cisteína de péptido reside en una unión de una proteína y una amida a través de ϵ -amino en una lisina, u otro grupo amino libre en otras aminoácidos. Una variedad de tales agentes que forman disulfuro/amida se describen en *Immuno. Rev.* 62: 85 (1982). Otros agentes de acoplamiento bifuncionales forman una unión tioéter más que una unión disulfuro. Los agentes que forman tioéter incluyen ésteres reactivos de ácido 6-maleimidocaproico, ácido 2-bromoacético y ácido 2-iodoacético, ácido 4-(N-maleimido-metil)ciclohexano-1-carboxílico. Los grupos carboxilo pueden activarse combinándolos con succinimida o ácido 1-hidroxil-2-nitro-4-sulfónico, sal de sodio.

Con más frecuencia, los residuos de lisina son los residuos de aminoácido más abundantes encontrados en las proteínas transportadoras, y estos residuos se modifican usando reactivos de enlace cruzado para generar sitios nucleofílicos que después se acoplan a un hapteno. Este acoplamiento se consigue por medio de cualquiera de las cadenas laterales hidrofílicas en las moléculas de hapteno que están químicamente activas. Estas incluyen el grupo guanidil de arginina, los grupos carboxilo de glutamato y ácido aspártico, el grupo sulfhidrilo de cisteína, y el grupo ϵ -amina de lisina, por nombrar algunos. Las modificaciones de proteínas tales como que ahora se pueden acoplar a

otras fracciones se consiguen usando reactivos de enlace cruzado, que reaccionan con cualquiera de las cadenas laterales en el transportador de proteína o molécula de haptenos.

En un aspecto de la presente invención, la proteínas transportadora con o sin una molécula enlazadora se funcionaliza (derivatiza) con un reactivo que introduce sitios reactivos en la molécula de proteína transportadora que están dispuestos a más modificaciones para introducir grupos nucleofílicos. En una realización, el transportador reacciona con un reactivo de haloacetilación, que preferentemente reacciona con un número de grupos funcionales en residuos de aminoácido de proteínas tale como el grupo sulfhidrilo de cisteína, el grupo primario ϵ -amina en residuos de lisina, la terminal α de α -aminas, el tioéter de metionina y ambos nitrógenos de cadena lateral imidazoil de histidina (Gurd, 1967). En una realización preferente, los grupos primarios ϵ -amina en residuos de lisina de la proteína transportadora se derivatizan con b N-hidroxisuccinimidil bromoacetato para generar un transportador de bromoacetato. La conjugación de inmunógeno peptídico y el transportador de proteína activada se realizó añadiendo lentamente la proteína activada a la solución que contenía el inmunógeno peptídico.

Al usar el proceso de esta divulgación, los inmunógenos peptídicos analizadas en la sección B, anteriormente, pueden conjugarse con cualquiera de los transportadores analizados en la sección A, anteriormente. Los conjugados que resultan del proceso de esta divulgación se usan como inmunógenos para la preparación de anticuerpos contra A β para su uso en inmunoterapia pasiva/activa. Además, A β o un fragmento de A β unido a un transportador puede administrarse a un animal de laboratorio en la producción de anticuerpos monoclonales de A β .

En un aspecto de la invención, el conjugado es un conjugado seleccionado del grupo consistente en A β 1-7-CRM₁₉₇, (A β 1-7 x 3)-CRM₁₉₇ y (A β 1-7 x 5)-CRM₁₉₇. En un aspecto de la invención, el conjugado es un conjugado seleccionado del grupo consistente en CRM₁₉₇-A β 1-5, CRM₁₉₇-A β 1-7, CRM₁₉₇-A β 1-9 y CRM₁₉₇-A β 1-12. En otro aspecto de la invención, el conjugado es un conjugado seleccionado del grupo consistente en A β 1-5-C-CRM₁₉₇, A β 1-7-C-CRM₁₉₇, A β 1-9-C-CRM₁₉₇ y A β 1-12-C-CRM₁₉₇, A β 16-23-C-CRM₁₉₇, A β 17-24-C-CRM₁₉₇, A β 18-25-C-CRM₁₉₇, CRM₁₉₇-C-A β 16-23, CRM₁₉₇-C-A β 17-24, CRM₁₉₇-C-A β 18-25, A β 16-22-C-CRM₁₉₇, A β 17-23-C-CRM₁₉₇, A β 18-24-C-CRM₁₉₇, CRM₁₉₇-C-A β 16-22, CRM₁₉₇-C-A β 17-23 y CRM₁₉₇-C-A β 18-24. A β 1-9-C-CRM₁₉₇ y A β 1-12-C-CRM₁₉₇. En otro aspecto más de la invención, el conjugado es un conjugado seleccionado del grupo consistente en la selección del grupo consistente en A β 1-5-L-C-CRM₁₉₇, A β 1-7-L-C-CRM₁₉₇, A β 1-9-L-C-CRM₁₉₇ y A β 1-12-L-C-CRM₁₉₇.

Restricción

Un inconveniente del uso de reactivos de acoplamiento, que introducen sitios reactivos a las cadenas laterales de moléculas reactivas de aminoácido en moléculas de transportador y/o hapteno, es que los sitios reactivos, si no se neutralizan, son libres de reaccionar con cualquier molécula no deseada *in vitro* o *in vivo*. En el proceso de la presente invención, la restricción de grupos funcionales no tratados se lleva a cabo mediante reacción de los conjugados con grupos reactivos colgantes con reactivos que inactivan/restringen los grupos reactivos. Reactivos ejemplares de inactivación/restricción para su uso con el proceso de conjugación de la presente invención incluyen cisteamina, N-acetilcisteamina y etanolamina. Alternativamente, la restricción se lleva a cabo mediante reacción con amoniaco o bicarbonato de amoniaco, cualquier de ellos convierte a los grupos de haloacetilo en grupos de aminoacetilo. La restricción también se lleva a cabo en alcalino pH (9.0-9.8) usando hidróxido de sodio o carbonato de sodio, que convierte a los grupos de haloacetilo en grupos de hidroxiacetilo. Una ventaja potencial de convertir a los grupos de haloacetilo en grupos de aminoacetilo o hidroxiacetilo, en oposición a la reacción con derivados de cisteamina, etanolamina, etc., es la introducción e funcionalidades químicas de tamaño relativamente pequeño, mediante la reacción con amoniaco o hidróxido/carbonato. Los grupos funcionales restringidos resultantes, por ejemplo, aminoacetilo o hidroxiacetilo, proporcionan una perturbación relativamente inferior en la parte de proteína transportadora del conjugado. El inmunógeno peptídico-proteína transportadora restringida se purifica como sea necesario usando métodos conocidos, tales como cromatografía (filtración de gel, intercambio de ión, interacción hidrofóbica o afinidad), diálisis, ultrafiltración-diafiltración, precipitación selectiva usando sulfato de amoniaco o alcohol, y similares.

Conjugados y composiciones inmunogénicas

Los conjugados de inmunógeno peptídico-proteína transportadora restringida se administran en una composición inmunogénica a mamíferos, particularmente humanos, para fines profilácticos y/o terapéuticos. Los conjugados de la presente invención se usan para obtener y/o mejorar respuestas inmunes contra inmunógenos. Por ejemplo, conjugados CTL-transportador se usan para tratar y/o prevenir infección viral, enfermedades amiloidogénicas, cáncer, etc. Alternativamente, los conjugados inmunógeno peptídico-transportador, que inducen respuestas inmunes, también se usan.

En aplicaciones terapéuticas, un conjugado de la presente invención se administra a un individuo que ya sufre una enfermedad amiloidogénica tal como enfermedad de Alzheimer. Aquellos en la fase de incubación o la fase aguda de la enfermedad pueden tratarse con el conjugado de la presente invención por separado o en conjunto con otros tratamientos, como se apropiado.

En aplicaciones terapéuticas, una composición inmunogénica de la presente invención se administra a un paciente en una cantidad suficiente para obtener una respuesta CTL efectiva o respuesta humoral a la placa amiloide, y para curar, o al menos para detener parcialmente la progresión, síntomas y/o complicaciones de la enfermedad. Una cantidad adecuada para llevar a cabo esto se define como "dosis terapéuticamente efectiva". Las cantidades efectivas para este uso dependerán en parte de la composición de péptido, la manera de administración, la fase y severidad de la enfermedad que se está tratando, el peso y estado de salud general del paciente y el juicio del médico que prescriba.

Las cantidades terapéuticamente efectivas de las composiciones inmunogénicas de la presente invención normalmente estarán en el rango para la inmunización inicial para administración terapéutica o profiláctica, desde aproximadamente 0,1 µg a aproximadamente 10.000 µg de péptido para un paciente de 70 kg, normalmente de aproximadamente 0,1 µg a aproximadamente 8.000 µg, preferentemente entre 0,1 y aproximadamente 5.000 µg, y más preferentemente entre 0,1 y aproximadamente 1.000 µg. estas dosis están seguidas de dosis de refuerzo de aproximadamente 0,1 µg a aproximadamente 1.000 µg de péptido de acuerdo con un régimen de refuerzo durante semanas a meses dependiendo de la respuesta y condición del paciente al medir las respuestas inmunes específicas.

Además, la presente invención se usa profilácticamente para prevenir y/o mejorar enfermedad amiloidogénica. Las cantidades efectivas se han descrito anteriormente. Además, un experto en la técnica también sabrá cómo ajustar o modificar tratamientos profilácticos, como sea apropiado, por ejemplo mediante dosis de refuerzo y ajustando dosis y regímenes de dosis.

La administración terapéutica puede empezar al primer signo de la enfermedad. Esta es seguida por dosis de refuerzo hasta que la progresión de la enfermedad se detiene o invierte o los síntomas se reducen sustancialmente y durante un periodo de tiempo después.

Las composiciones inmunogénicas de la presente invención para tratamiento terapéutico o profiláctico pueden administrarse mediante medios parenterales, tópicos, intravenosos, orales, subcutáneos, intra-arteriales, intra-craneales, intra-peritoneales, intra-nasales o intra-musculares para tratamiento profiláctico y/o terapéutico. Un ruta típica de administración de un agente inmunogénico es la subcutánea, aunque otras rutas pueden ser igualmente efectivas. Otra ruta común es la inyección intramuscular. Este tipo de inyección se realiza más típicamente en los músculos del brazo o la pierna. En algunos métodos, los agentes se inyectan directamente en un tejido particular donde se han acumulado depósitos, por ejemplo, inyección intracraneal. La inyección intramuscular o infusión intravenosa es preferente para la administración del anticuerpo. En algunos métodos, se inyectan anticuerpos intravenosos particulares directamente en el cráneo. Debido a la facilidad de administración, las composiciones inmunogénicas de la invención son particularmente adecuadas para administración oral. La invención proporciona además composiciones inmunogénicas para administración parenteral, que comprenden una solución de los péptidos o conjugados, disueltos o suspendidos en un transportador aceptable, preferentemente un transportador acuoso.

Puede usarse una variedad de diluyentes, excipientes y tampones, por ejemplo, agua, agua amortiguada, tampón fosfato salino, 0,3% glicina, ácido hialurónico y similares. Estas composiciones puede esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas, o pueden filtrarse estériles. Las soluciones acuosas resultantes pueden empaquetarse para su uso como están, o liofilizarse, la preparación liofilizada se combina con una solución estéril antes de su administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables como sea necesario para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de amortiguación, agentes que ajustan la tonicidad, agentes humectantes y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina, etc.

Para composiciones sólidas, pueden usarse transportadores sólidos no tóxicos convencionales. Estos pueden incluir, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, levadura, estearato de magnesio, sacarina de sodio, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio y similares. Para administración oral, se forma una composición no tóxica farmacéuticamente aceptable incorporando cualquiera de los excipientes normalmente empleados, tales como los transportadores previamente listados, y generalmente 10-95% de ingrediente activo, esto es, uno o más conjugados de la invención, y más preferentemente en una concentración de 25-75%.

La concentración de composiciones inmunogénicas de la presente invención en las formulaciones farmacéuticas puede variar ampliamente, esto es, de menos de aproximadamente 0,1%, normalmente al menos aproximadamente 2% hasta tanto como 20% o 50%, o más por peso, y se seleccionará principalmente por volúmenes de fluido, viscosidades, etc., de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado.

Los conjugados de la presente invención pueden también administrarse mediante liposomas, que sirven para dirigir los conjugados a un tejido particular, tal como tejido linfoide, o selectividad dirigida a células infectadas, así como para aumentar la vida media de la composición de péptidos. Los liposomas incluyen emulsiones, espumas, micelas, monocapas insolubles, cristales líquidos, dispersiones fosfolípidas, capas lamelares y similares. En estas

preparaciones la composición que se administrará se incorpora como parte de un liposoma, solo o en conjunto con una molécula, que se enlaza, por ejemplo, con un receptor prevalente entre células linfoides. Estas moléculas incluirán anticuerpos monoclonales, que se enlazan con el antígeno CD45, o con otras composiciones terapéuticas o inmunogénicas. De este modo, los liposomas llenos de una composición deseada de la presente invención pueden dirigirse al sitio de células linfoides, donde los liposomas después administran las composiciones de péptido terapéuticas/inmunogénicas seleccionadas. Los liposomas para su uso en la invención está formado por lípidos estándares que forman la vesícula, que generalmente incluyen fosfolípidos con carga neutral y negativa y un esteroles, tal como colesterol. La selección de lípidos está generalmente guiada por la consideración del tamaño de liposoma, labilidad ácida y estabilidad de los liposomas en el torrente sanguíneo. Están disponibles una variedad de métodos para preparar liposomas, como se describe en, por ejemplo, Szoka, et al., Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467 (1980), U.S. Números de Patente 4.235.871, 4.501.728, 4.837.028 y 5.019.369.

Para administración con aerosol, las composiciones de la presente invención se suministran preferentemente en forma finamente dividida junto con un surfactante o propulsor. Los porcentajes típicos de las composiciones son 0,01-20% por peso, preferentemente 1-10%. El surfactante, por supuesto, debe ser no tóxico, y preferentemente soluble en el propulsor. Los representantes de tales agentes son los ésteres de ácidos grasos que contienen de 6 a 22 átomos de carbono, tales como ácidos caproicos, octanoicos, palmíticos, esteáricos, linoleicos, linolénicos, olestéricos y oleicos con un alcohol polihídrico alifático o su anhídrido cíclico. Pueden emplearse ésteres mezclados, tales como glicéricos mezclados o naturales. El surfactante puede constituir 0-1-20% por peso de la composición, preferentemente 0,25-5%. El equilibrio de la composición es generalmente propulsor. También puede incluirse un transportador, si se desea, como con lecitina para administración intranasal.

Los conjugados de la presente invención pueden administrarse opcionalmente en combinación con otros agentes que son al menos parcialmente efectivos en el tratamiento y/o mejora de una enfermedad amiloide y/o sus síntomas. En el caso de enfermedad de Alzheimer o síndrome de Down, en el que se dan depósitos amiloides en el cerebro, los conjugados de la invención pueden administrarse junto con otros agentes para aumentar el paso de los agentes de la invención a través de la barrera sangre-cerebro.

La composición inmunogénica típicamente contiene un adyuvante. Un adyuvante es una sustancia que mejora la respuesta inmune cuando se administra junto con un inmunógeno o antígeno. Un número de citoquinas o linfoquinas han demostrado tener actividad moduladora inmune, y de este modo pueden usarse como adyuvantes, incluyendo, pero sin limitar a, las interleuquinas 1- α , 1- β , 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 (véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos N1 5.723.127), 13, 14, 15, 16, 17 y 18 (y sus formas mutantes), los interferones - α , β y γ , factor estimulador de colonia granulocito-macrófago (véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos N° 5.078.996), factor estimulador de colonia de macrófagos, factor estimulador de colonia de granulocitos, GSF y el factor α y β de necrosis tumoral. Otros adyuvantes útiles en esta invención incluyen una quimioquina, incluyendo pero sin limitación, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β y RANTES. Las moléculas de adhesión, tales como una selectina, por ejemplo, L-selectina, P-selectina y E-selectina pueden también ser útiles como adyuvantes. Otros adyuvantes útiles incluyen, sin limitación, una molécula de tipo mucina, por ejemplo, CD34, GliCAM-1 y MadCAM-1, un miembro de la familia de integrinas tales como LFA-1, VLA-1, Mac-1 y p150.95, un miembro de la súper familia de inmunoglobulinas tales como PECAM, ICAMs, por ejemplo, ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-3, CD2 y LFA-3, moléculas co-estimuladoras tales como CD40 y CD40L, factores de crecimiento que incluyen factor de crecimiento vascular, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento de fibroblasto, factor de crecimiento epidérmico, B7.2, PDGF, BL-1 y factor de crecimiento endotelial vascular, moléculas de receptor que incluyen Fas, receptor TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2 y DR6. Otras molécula adyuvante incluye Caspase (ICE). Véase, también la publicación de patente internacional n° WO98/17799 y n° WO99/43839.

Los adyuvantes adecuados para mejorar una respuesta inmune incluyen, sin limitación, MPLTM (lípidos 3-O-monofosforil deacilado A; Corixa, Hamilton, MT), que se describe en la patente de Estados Unidos n° 4.912.094. también adecuados para uso como adyuvantes son los análogos sintéticos de lípidos A o compuestos de fosfato de aminoalquil glucosamina (AGP), o derivados o análogos de los mismos, que están disponibles en Corixa (Hamilton, MT), y que se describen en la patente de Estados Unidos n° 6.113.918. Un AGP es 2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecancilamino] etil 2-Deoxi-4-O-fosfono-3-O-[(S)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-2-[(R)-3-tetradecanoiloxi-tetradecanoil-amino]-b-D-glicopiranosida, que es conocido como 529 (también conocido con RC529; Corixa). Este adyuvante 529 se formula como una forma acuosa (529 AF) o como una emulsión estable (529 SE).

Otros adyuvantes incluyen emulsiones de aceite mineral y agua, sales de calcio tales como fosfato de calcio, sales de aluminio (alumbre), tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, etc., Amphigen, Avridine, L212/escualeno, D-láctido-poliláctido/glicósido, ácidos plurónicos, polioles, dipéptido de muramil, *Bordetella* muerta, saponinas, tales como StimulonTM QS-21 (Antigenics, Framingham, MA), descrito en patente de Estados Unidos n° 5.057.540, y las partículas generadas de los mismos tales como ISCOMS (Complejos inmunoestimuladores), *Mycobacterium tuberculosis*, lipopolisacáridos bacterianos, polinucleótidos sintéticos tales como oligonucleótidos que contienen un motivo CpG (Patente de Estados Unidos n° 6.207.646), una toxina pertussis (PT) o una toxina termolábil de *E. coli* (LT), particularmente LT-K63, LT-R72, PT-K9/G129; véase, por ejemplo, publicación de patente internacional n° WO 93/13302 y WO 92/19265.

También útiles como adyuvantes son toxinas de cólera y mutantes de las mismas, incluyendo aquellas descritas en la solicitud de patente internacional publicada nº WO 00/18434 (donde el ácido glutámico en la posición 29 de aminoácido se sustituye por otro aminoácido (diferente a ácido aspártico, preferentemente una histidina). Toxinas CT o mutantes similares se describen en la solicitud de patente internacional publicada número WO 02/098368 (donde isoleucina en la posición 16 de aminoácido se sustituye por otro aminoácido, bien solo o en combinación con la sustitución de la serina en la posición 68 de aminoácido por otro aminoácido; y/o donde la valina en la posición 72 de aminoácido se sustituye por otro aminoácido). Otras toxinas CT se describen en la solicitud de patente internacional publicada número WO 02/098369 (donde la arginina en la posición 25 de aminoácido se sustituye por otro aminoácido; y/o un aminoácido se inserta en la posición 49 de aminoácido; y/o dos aminoácidos se insertan en la posición 35 y 36 de aminoácido).

Se entenderá que la referencia a lo largo de esta especificación a cualquier teoría para explicar los resultados descritos no es para limitar el alcance de la invención. Independientemente del método por medio del cual la invención funciona, los resultados y ventajas aquí descritos pueden conseguirse mediante referencia a los siguientes ejemplos de la invención.

EJEMPLO 1

Conjugación de CRM₁₉₇ con Péptido A β

La conjugación de haptenos/péptidos antigénicos se realizó haciendo reaccionar transportador activado CRM₁₉₇, que tiene treinta y nueve residuos de lisina, con un hapteno/péptido antigénico que tiene un grupo tiol colgante usando el método descrito más abajo (Figura 1). Todos los péptidos A β obtenidos contenían un residuo de cisteína en la terminal carboxi para facilitar la conjugación de estos péptidos a través del grupo cistenil sulfhidrilo con la proteína transportadoras. Estos péptidos se produjeron mediante síntesis en fase sólida.

I. Activación

Grupos amino libres de CRM₁₉₇ se sometieron a bromoacetilación mediante reacción con un exceso de éster N-hidroxisuccinimida de ácido bromoacético (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (Bernatowicz y Matsueda, 1986). Se añadió 10% (v/v) 1.0 M NaHCO₃ (pH 8,4) a una solución helada de CRM₁₉₇ (~15 mg). El éster N-hidroxisuccinimida de ácido bromoacético, igual en peso que el CRM₁₉₇ usado, se disolvió en 200 μ l dimetilformadida (DMF), se añadió lentamente a CRM₁₉₇, y se mezcló cuidadosamente a temperatura ambiente en la oscuridad durante 1 horas. La proteína bromoacetilada (activada) resultante se purificó mediante paso a través de una columna de desalación (P6-DG) usando PBS / 1 mM EDTA (pH 7,0) como el eluyente. Después de la purificación, las fracciones correspondientes a CRM₁₉₇ activado se agruparon y el ensayo de proteína BCA estimó la concentración de proteína. Los grupos amino de proteína, tanto antes como después del tratamiento con éster N-hidroxisuccinimida de ácido bromoacético, reaccionaron con ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBSA), que sirvió como un indicador de bromoacetilación (Means et al., 1972).

II. Conjugación

Antes de la conjugación, los péptidos reaccionaron con 5,5'-ditio-bis(2-ácido nitrobenzoico) [reactivo de Ellman] para verificar el contenido de grupos SH libres (entre 62-88% de reducción). Para los primeros cuatro péptidos A β (aminoácidos 1-7 sin enlazador, aminoácidos 1-12 con enlazador GAGA (SEQ ID NO: 10), aminoácidos 1-9 con enlazador GAGA (SEQ ID NO: 10) y aminoácidos 1-7 con enlazador GAGA (SEQ ID NO: 10), aproximadamente 8.0-10,0 mg de péptido se disolvió en agua destilada estéril hasta una concentración aproximada de 20 mg/ml. El péptido se añadió lentamente a CRM₁₉₇ frío activado en una proporción 1:1 (p/p) y el pH se ajustó a aproximadamente 7,0-7,2 con la adición de 20-36 μ l de 1 N NaOH. El material resultante se mezcló cuidadosamente durante la noche a 4 °C en la oscuridad seguido de diálisis en la oscuridad contra dos cambios 1L de PBS, pH 7. Para los siguientes cuatro péptidos A β (aminoácidos 1-5 sin enlazador, aminoácidos 1-9 sin enlazador, aminoácidos 1-12 sin enlazador y aminoácidos 1-5 con enlazador), se usó la reacción con reactivo de Ellman para verificar los grupos SH libres. CRM₁₉₇ se sometió bromoacetilación, purificó y reaccionó con TNBSA como se ha descrito previamente. El pH de cada péptido se ajustó a 7.0 con la adición de 0,1 M NaPO₄ (pH 8,5) e 2,2x el volumen del péptido disuelto. El péptido se añadió lentamente a CRM₁₉₇ frío activado en una proporción 1:1 y se dejó reaccionar durante la noche a 4 °C en la oscuridad. El material resultante se dializó. Un péptido control final (1-12mer en orientación inversa) se conjugó con CRM₁₉₇ como se ha descrito anteriormente con la siguiente modificación. En lugar de ajustar el pH del péptido a 7,0, el pH de CRM₁₉₇ activado se ajustó aproximadamente a 7,5 con la adición de 20% (v/v) 0,5 M NaPO₄ (pH 8,0). Cada conjugado, después de diálisis, se transfirió a un tubo de propileno de 15 mL, se envolvió en papel de aluminio y se almacenó a 4 °C. La activación de los residuos reactivos de amino en el transportador se verificó posteriormente usando espectrometría de masas.

Conjugado

Péptido inmunogénico

65

	Conjugado	Péptido Inmunogénico
5	A β 1-5-C-CRM ₁₉₇	DAEFR-C (SEQ. ID. NO.:1)
	A β 1-7-C-CRM ₁₉₇	DAEFRHD-C (SEQ. ID NO.:2)
	A β 1-9-C-CRM ₁₉₇	DAEFRHDSG-C (SEQ ID NO:3)
	A β 1-12-C-CRM ₁₉₇	DAEFRHDSGYEV-C (SEQ ID NO:4)
	A β 1-5-L-C-CRM ₁₉₇	DAEFR-GAGA-C (SEQ ID NO.:5)
10	A β 1-7-L-C-CRM ₁₉₇	DAEFRHD-GAGA-C (SEQ ID NO.:6)
	A β 1-9-L-C-CRM ₁₉₇	DAEFRHDSG-GAGA-C (SEQ ID NO.:7)
	A β 1-12-L-C-CRM ₁₉₇	DAEFRHDSGYEV-GAGA-C (SEQ ID NO.:8)
	A β 12-1-C-CRM ₁₉₇ (-VE CONTROL)	VEYGSDDRFEAD-C (SEQ ID NO.: 9)
15	L = Enlazador (GAGA) (SEQ ID NO: 10)	

EJEMPLO 2

Preparación de Conjugado Péptido A β -CRM₁₉₇ y Purificación mediante Bromoacetilación con Ultrafiltración de CRM₁₉₇

20 CRM₁₉₇ (100 mg) en tampón fosfato salino, 0,9% NaCl, pH 7,0 reaccionó con éster N-hidroxisuccinimida de ácido bromoacético (disuelto en 20 mg/ml en DMSO) en una proporción de peso de 1:1 bajo una atmósfera de argón. La reacción se tituló como fue necesario para mantener el pH en 7,0. La mezcla se agitó en la oscuridad durante 1,5 horas a temperatura ambiente. La mezcla de la reacción se filtró 1,2 μ m en un depósito con fracción retenida de un sistema UF/DF (Millipore LabScale TFF, Billerica, MA). La purificación se hizo usando una membrana UF de 10K o 30K mediante diafiltración (30 veces) contra 0,01 M tampón fosfato salino / 0,9% NaCl, pH 7,0. CRM₁₉₇ bromoacetilado se filtró pasando a través de un filtro de 0,2 μ m. El grado de bromoacetilación se determinó reaccionando CRM₁₉₇ activado con cisteína, seguido de análisis de aminoácido y cuantificación de carboximetilcisteína (CMC) resultante.

Conjugación de Péptido A β y CRM₁₉₇ Bromoacetilado y Restricción con N-Acetilcisteamina

35 CRM₁₉₇ bromoacetilado (50 mg) se transfirió a un recipiente de reacción. A la solución agitada, mantenida a 2-8°C, se añadió 1 M de carbonato de sodio/bicarbonato. La titulación se realizó para conseguir un pH diana de 9,0, bajo atmósfera de argón. Por separado, se pesaron 50 mg de péptido A β y se disolvieron en agua por inyección (WFI) a 20 mg/ml. A esta solución se añadió 1 M de carbonato de sodio/bicarbonato hasta que se alcanzó pH 9,0. La solución de péptido se añadió a la solución de CRM₁₉₇ bromoacetilado, y la mezcla se agitó a 2-8 °C durante 14-18 horas. Los grupos restantes de bromoacetil se restringieron con un exceso molar de 20 veces de N-acetilcisteamina durante 3-6 horas a 2-8 °C.

40 La mezcla de la reacción se filtró a través de un filtro de 1,2 μ m en el depósito con fracción retenida del sistema UF/DF (Millipore XL) y el conjugado se purificó a temperatura ambiente mediante diafiltración 30 veces en una membrana MWCO de 10K o 30K (Millipore) mediante diafiltración contra 0,01 M tampón fosfato salino / 0,9% NaCl, pH 7,0. La fracción retenida se recogió y 0,2 μ m se filtraron y analizaron para contenido de proteína (ensayo colorimétrico Lowry o Micro-BCA) mediante SDS-PAGE, mediante análisis de aminoácido, y para inmunogenicidad en ratones.

EJEMPLO 3

Conversión mediante Restricción de los Grupos de Bromoacetil No Reaccionados con Grupos de Aminocetil

50 CRM₁₉₇ bromoacetilado (50 mg), preparado como se ha descrito en el Ejemplo 2, se transfirió a un recipiente de reacción. A la solución agitada, mantenida a 2-8°C, se añadió 1 M de carbonato de sodio/bicarbonato. La titulación se realizó para conseguir un pH diana de 9,0, bajo atmósfera de argón. Por separado, se pesaron 50 mg de péptido A β y se disolvieron en WFI a 20 mg/ml. A esta solución se añadió 1 M de carbonato de sodio/bicarbonato hasta que se alcanzó pH 9,0. La solución de péptido se añadió a la solución de CRM₁₉₇ bromoacetilado, y la mezcla se agitó a 2-8 °C durante 14-18 horas. Los grupos restantes de bromoacetil se restringieron usando 8% de solución de bicarbonato de amoniacio durante 4 horas a 2-8 °C.

60 La mezcla de la reacción se filtró con 1,2 μ m en el depósito con fracción retenida del sistema UF/DF (Millipore XL) y el conjugado se purificó a temperatura ambiente mediante diafiltración 30 veces en una membrana MWCO de 10K o 30K (Millipore) mediante diafiltración contra 0,01 M tampón fosfato salino / 0,9% NaCl, pH 7,0. La fracción retenida se recogió y 0,2 μ m se filtraron y analizaron para contenido de proteína (ensayo colorimétrico Lowry o Micro-BCA) mediante SDS-PAGE, mediante análisis de aminoácido, y para inmunogenicidad en ratones.

EJEMPLO 4

Determinación Cuantitativa de S-Carboximetilcisteína y S-Carboximetilcisteamina como Evaluación del Grado de Conjugación y Restricción de Conjugados Inmunógeno Peptídico-Proteína/Polipéptido

65

La hidrólisis ácida de conjugados proteína-polipéptido generada usando química de activación de bromoacetil dio como resultado la formación de S-carboximetilcisteína (CMC) ácida estable de las cisteínas en los sitios conjugados y la formación de S-carboximetilcisteamina (CMCA) ácida estable de la cisteamina en los sitios restringidos (Figura 2). Todas las lisinas conjugadas y restringidas se convirtieron en lisina y se detectaron como tales. Todos los demás aminoácidos se hidrolizaron a aminoácidos libres excepto para triptófano y cisteína, que se destruyeron mediante condiciones de hidrólisis. Asparagina y glutamina se convirtieron en ácido aspártico y ácido glutámico respectivamente.

Las muestras de conjugado se diluyeron con agua desionizada hasta una concentración total de proteínas de menos de 1 mg/mL. Dos alícuotas de 10 microgramos de cada conjugado se secaron y volvieron a suspender en 100 µL de 6N HCl [Pierce], 5 µL de fenol fundido [Sigma-Aldrich], y 1 µL de 2-mercaptoetanol [Sigma-Aldrich]. Las muestras después se incubaron bajo vacío (100 mT) a 110 °C durante 22 horas. Los hidrosilados resultantes se secaron, volvieron a suspender en 250 µL de tampón dilución de muestra de citrato de sódio Na-S de Beckman (pH 2,2) [Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA], y filtraron usando filtros con punta de jeringa de nylon de 0,2 µm de Whatman y jeringas de 1 mL.

Cada muestra se cargó después en un circuito cerrado de muestra de aminoácido 6300 Beckman y se colocó en el analizador. Los aminoácidos de cada muestra hidrolizada y el control se separaron usando cromatografía de intercambio de ión seguida de reacción con solución Beckman Ninhydrin NinRX a 135 °C. Los aminoácidos derivatizados se detectaron después en el rango visible a 570 nm y 440 nm (véase Tabla 1). Un conjunto estándar de aminoácidos [Pierce Amino Acid Standard H] que contenía 500 picomoles de cada aminoácido se mantuvo junto con las muestras y controles para cada conjunto de análisis. Se añadió S-carboximetilcisteína [Sigma-Aldrich] al estándar.

Tabla 1

Tiempos de Retención para Aminoácidos Usado Programas de Gradiente 1 en el Analizador de Aminoácido Beckman 6300			
Tiempo de Retención (min.)	Aminoácido		Longitud de Onda usada para Detección
8,3	Carboximetilcisteína	CMC	570
9,6	Ácido aspártico y Asparagina	Asx	570
11,3	Treonina	Tr	570
12,2	Serina	Ser	570
15,8	Ácido glutámico y glutamina	Glx	570 y 440
18,5	Prolina	Pro	440
21,8	Glicina	Gli	570
23,3	Alanina	Ala	570
29,0	Valina	Val	570
32,8	Metionina	Met	570
35,5	Isoleucina	Ile	570
36,8	Leucina	Leu	570
40,5	Tirosina	Tir	570
42,3	Fenilalanina	Fe	570
45,4	Carboximetilcisteamina	CMCA	570
48,8	Histidina	His	570
53,6	Lisina	Lis	570
70,8	Arginina	Arg	570

Tiempos de Retención para Aminoácidos Usando Programa de Gradiente 1 en Analizador de Aminoácido 6300 Beckman

5 Las áreas de cada pico estándar se usaron como una equivalencia cuantitativa para evaluación proporcional de cada muestra. La prolina se determinó de 400 nm y se convirtió en una equivalencia en 570 nm usando ácido glutámico, el aminoácido más cercano.

10 Cada uno estos valores de picomol se convirtió en una proporción molar de residuos de aminoácido usando una comparación de picomoles de lisina con el valor teórico de lisina presente en la proteína. Se eligió lisina para esta evaluación en base a su unión covalente con cisteína y cisteamina y la esperada hidrólisis similar. Los números resultantes de moles de aminoácido se compararon después con la composición de aminoácido de la proteína y se presentaron junto con los valores para CMC y CMCA. El valor CMC se usó directamente para evaluación del grado de conjugación y el valor CMCA se usó directamente para evaluación del grado de restricción.

15 EJEMPLO 5

Caracterización y Optimización de Conjugados de Péptido A β -CRM₁₉₇ B

20 Para verificar la conjugación, todos los conjugados péptido-CRM₁₉₇ se analizaron mediante análisis de aminoácido y espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz – tiempo de vuelo (MALDI-TOF). Para cada conjugado, los moles de péptido conjugado con cada CRM₁₉₇ mol se determinó mediante análisis de aminoácido (número de residuos de S-carboximetilcisteína) y espectrometría de masas MALDI-TOF. Los valores determinados por cada método estuvieron generalmente de acuerdo.

25 I. Cromatografía de exclusión por tamaños

30 Las muestras del concentrado del lote se sacaron del almacenaje y se dejaron calentar a temperatura ambiente. La muestra de conjugado péptido A β se mezcló cuidadosamente para asegurar una preparación homogénea. La muestra de conjugado péptido A β giró en una microcentrífuga Eppendorf para retirar cualquier partícula. El sobrenadante se retiró para cromatografía TosoHaas TSK-Gel G3000SW (TosoHaas, Stuttgart, Alemania). Una columna TosoHaas TSK-Gel G3000SW se conectó al sistema HPLC y el límite de presión se fijó en 1,4 MPa. La columna se equilibró con al menos 30 mL de PBS (10 mM fosfato de sodio, 150 mM NaCl, pH 7,2 \pm 0,1) a una velocidad de flujo de 0,75 mL/min. La muestra de conjugado de péptido A β se cargó en la columna TosoHaas TSK-Gel G3000SW usando los siguientes parámetros:

35 Concentración de muestra de conjugado de péptido A β : 1,5 \pm 1,0 mg/mL
Velocidad de flujo: 0,75 mL/min
Volumen de muestra: 0,1 mL
Tiempo de ejecución: 30 minutos

40 La absorbancia se controló en 280nm y 210nm. Para almacenaje de largo plazo, la columna TosoHaas TSK-Gel G3000SW se equilibró al menos con 50 mL de 20% etanol a una velocidad de flujo de 0,5 – 1,0 mL/min.

II. PAGE (Electroforesis en Gel de Poliacrilamida)

45 CRM₁₉₇ activado (bromoacetilado) y los conjugados péptido A β - CRM₁₉₇ se examinaron mediante geles SDS usando electroforesis NuPAGE Bis-Tris (Novex, Frankfurt, Alemania) con un pH neutro, sistema con mini-gel de poliacrilamida prefabricada y Tampón de Ejecución NuPAGE MES SDS. Una alícuota de 8ug de cada CRM activado o conjugado se mezcló con la el tampón reductor de muestra y se calentó a 100 °C durante 5 minutos. Los conjugados y los estándares de peso molecular (PM) (Invitrogen, Carlsbad, CA) se cargaron en un gel NuPage (Novex) 10% (p/v, acrilamida) en un sistema amortiguado Bis-Tris-HCl y funcionó en el Tampón de Ejecución PAGE MES SDS (Laemmli). Después de SDS-PAGE, el gel se tiñó con gel Pierce Código Azul (Pierce, Rockford, IL). El conjugado péptido A β - CRM₁₉₇ se representó mediante una banda grande de aproximadamente 66 kDa, por encima de la banda de CRM nativo y una banda más tenue de alrededor de 120 kDa, junto con bandas menores de multímero (datos no mostrados)

55 III. Análisis de Espectrometría de Masas MALDI-TOF de Conjugados Péptido- CRM₁₉₇:

60 La espectrometría de masas se usó para una aproximación inmediata del grado de conjugación. Alícuotas adecuadas de CRM₁₉₇ activado y las muestra del conjugado se analizaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF usando 3,5-dimetoxi-4-hidroxi-ácido cinámico (ácido sinapínico) como la matriz. El peso molecular de CRM₁₉₇ activado determinado mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (Espectrómetro de Masas Finningan MAT Lasermat 2000, Ringoes, NY) resultó estar centrado alrededor de 60,5 kDa y para conjugados varió de 65 kDa a 74 kDa dependiendo del grado de conjugación (datos no mostrados). Se descubrió que hasta 22 de las lisinas (~50) en CRM₁₉₇ se modificaron en una proporción 1:1.

65 IV. Experimentos de Optimización:

El grado de activación y conjugación son una función de la proporción reactivo:proteína, temperatura de la reacción y pH del tampón de reacción. Más abajo se dan algunos ejemplos para ilustrar las condiciones óptimas de conjugación realizadas para identificar las condiciones óptimas de pH con el fin de tener parámetros reproducibles del control del proceso para las reacciones de conjugación. Los resultados (Figura 3) mostraron que la reacción de conjugación para Aβ 5mer (DAEFRC) (SEQ ID NO: 1) así como para Aβ 7mer (DAEFRHDC) (SEQ ID NO: 2) es dependiente de pH y produce un mayor grado de modificación/conjugación cuando el pH de la condición de la reacción aumenta. Usando sal TFA de péptidos 5mer y 7mer, el grado de conjugación se evaluó en pH 9,0 con cantidades variables de carga de péptido (Figura 4). A partir de estos resultados, es evidente que los conjugados de péptido con un número definido de copias de péptido por molécula CRM pueden generarse variando la proporción péptido/CRM activado durante el proceso de conjugación. Se hicieron experimentos similares usando sal de acetato de péptido Aβ 7mer.

Para la conjugación Aβ1-7/CRM, el proceso de restricción se evaluó comparando los moles de CMCA por CRM con los moles de CMC por CRM. Ya que el total de CMC y CMCA fue constante para cada proporción péptido:CRM testada, se supuso que el proceso de restricción se completó (Figura 5). La modificación total en el conjugado estuvo entre 19 y 21, comparable con el número de lisinas bromoacetiladas (Figura 5). Estos experimentos se hicieron con TFA como el contra-ión para el péptido. La conjugación Aβ1-7/CRM se repitió usando la sal de acetato del péptido en lugar de la sal TFA, y estos datos se muestran en la Figura 5 y 6. El proceso de restricción pareció completarse, con el total de CMC y CMCA para cada punto entre 20 y 22. Las condiciones para la reacción de conjugación Aβ/CRM se han optimizado en pH 9,0, con el grado de conjugación controlado por la proporción de péptido con CRM en la reacción. Al variar la proporción de 0,1 a 1,5, el grado de conjugación varió (Figura 6).

El grado de activación y conjugación son una función de la proporción reactivo-proteína, temperatura de la reacción y pH del tampón de reacción. El grado de modificación (conjugación) para cada conjugado se calculó restando el valor de masa de CRM₁₉₇ activado del valor de masa de cada conjugado y dividiendo entre la masa del péptido usado para preparar el conjugado. El grado de modificación (conjugación) para todos los conjugados se describe en la Tabla 2.

El grado de conjugación también se comparó con los valores determinados por la cantidad estimada de residuos de S-carboximetilcisteína formados por mol de CRM₁₉₇ (también mostrado en la Tabla 2)

Tabla 2

Grado de Modificación: Comparación de MALDI-TOF y Datos AAA			
Muestra	Da (De Espectrometría de Masas)	Grado de conjugación (De Espectrometría de Masas)	Grado de conjugación (De Análisis CMC-Aminoácido)
CRM ₁₉₇	58.408	----	----
BrAc-CRM	60.752	19	----
Aβ1-7/CRM	74.463	14	15
Aβ1-7/CRM	72.375	12	14
Aβ1-5/CRM	75.425	20	21
Aβ1-5/CRM	71.690	15	18

EJEMPLO 6
Estudios de Inmunogenicidad de Conjugados Aβ Péptido

Los péptidos que abarcan los residuos de terminal N 1-5, 1-7, 1-9 y 1-12 de Aβ (con y sin la secuencia enlazadora GAGAC) y un péptido correspondiente al terminal N de Aβ en la secuencia inversa de aminoácido doce a aminoácido uno (1-12mer en secuencia inversa), conjugado cada uno con CRM₁₉₇, se usaron para inmunizar ratones junto con un péptido Aβ 1-12 mer no conjugado en una formulación con STIMULON™ QS-21. Cada grupo de ratones fue inmunizado subcutáneamente con una dosis de 30 µg o 5 µg de una las muestras formuladas con 20 µg del adyuvante STIMULON™ QS-21, al inicio del estudio (semanas 0) y posteriormente las semanas 3 y 6. El protocolo del estudio se ilustra en la Tabla 3.

Como se muestra en la Tabla 3, los péptidos que abarcan los residuos de terminal N 1-5, 1-7, 1-9 y 1-12 de Aβ (con y sin la secuencia enlazadora GAGAC) y un péptido correspondiente al terminal N de Aβ en la secuencia inversa de aminoácido doce a aminoácido uno (1-12mer en secuencia inversa), conjugado con CRM₁₉₇, se usaron para inmunizar ratones junto con un péptido Aβ 1-12 mer no conjugado en una formulación con QS-21. Cada grupo

de ratones fue vacunado subcutáneamente con una dosis de 30 µg o 5 µg de una las muestras formuladas con 20 µg del adyuvante QS-21, al inicio del estudio (semanas 0) y posteriormente las semanas 3 y 6. El protocolo del estudio se ilustra en la Tabla 3. Se usaron ratones Swiss Webster para el estudio completo con 5 ratones en cada grupo. Volumen de inyección = 100 µl; S = Sangrar; V = Vacunar; E = Exanguinar.

Los títulos anti-Aβ se midieron con ELISA contra Aβ y CRM₁₉₇ como se describe más abajo. En resumen, placas de 96 pozos Costar (#3591) se cubrieron durante la noche a temperatura ambiente con 2 µg/mL Aβ1-42 en tampón estéril carbonato/bicarbonato, pH 9.6. Las placas se vaciaron y bloquearon durante dos horas a temperatura ambiente con 200 µl/pozo de 0,05% BSA en 1X PBS/0,05% Tween 20. Las placas bloqueadas se vaciaron y lavaron con un lavador de placas que contenía TBS, 0,1% tampón de lavado Brij-35 (sin azida). Todos los antisueros primarios se diluyeron en serie y después se transfirieron a los pozos apropiados de placa e incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. Las placas después se vaciaron/lavaron como se ha descrito anteriormente. Anticuerpo secundario IgG de cabra anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina de Southern Biotech (ciudad, estado) se diluyó 1:1000 con 0,05% BSA en PBS que contenía 0,05% Tween 20/0,02% Azida y se añadieron 100 µL a cada pozo y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas después se vaciaron/lavaron como se ha descrito anteriormente y finalmente se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora con 100 µL/pozo de 1 mg/mL solución de sustrato p-nitrofenil fosfato preparado en dietanolamina/MgCl₂, pH 9,8. El desarrollo de color se detuvo con la adición de 50 µL/pozo de 3N NaOH. Las palcas se leyeron en 405 nM con una referencia de 690 nM. Los títulos del punto final se calcularon en O.D de 0,1 AU.

Tabla 3

Protocolo de Estudio de Inmunización de Ratones								
Código de Grupo	Descripción	Dosis (µg)	Sem 0	Sem 3	Sem 6	Sem 8	Sem 13	Sem 16
AE488	CRM/1-7 sin enlazador	30	S, V	S, V	S, V	S	S	E
AE489	CRM/1-12 con enlazador	30	S, V	S, V	S, V	S	S	E
AE490	CRM/1-9 con enlazador	30	S, V	S, V	S, V	S	S	E
AE491	CRM/1-7 con enlazador	30	S, V	S, V	S, V	S	S	E
AE492	CRM/1-5 sin enlazador	30	S, V	S, V	S, V	S	S	E
AE493	CRM/1-9 sin enlazador	30	S, V	S, V	S, V	S	S	E
AE494	CRM/1-12 sin enlazador	30	S, V	S, V	S, V	S	S	E
AE495	CRM/1-5 con enlazador	30	S, V	S, V	S, V	S	S	E
AE496	CRM/1-7 sin enlazador	5	S, V	S, V	S, V	S	S	E
AE497	CRM/1-12 con enlazador	5	S, V	S, V	S, V	S	S	E
AE498	CRM/1-9 con enlazador	5	S, V	S, V	S, V	S	S	E
AE499	CRM/1-7 con enlazador	5	S, V	S, V	S, V	S	S	E

Código de Grupo	Descripción	Dosis (µg)	Sem 0	Sem 3	Sem 6	Sem 8	Sem 13	Sem 16
AE500	CRM/1-5 sin enlazador	5	S, V	S, V	S, V	S	S	E
AE501	CRM/1-9 sin enlazador	5	S, V	S, V	S, V	S	S	E
AE502	CRM/1-12 sin enlazador	5	S, V	S, V	S, V	S	S	E
AE503	CRM/1-5 con enlazador	5	S, V	S, V	S, V	S	S	E
AE504	CRM ₁₉₇ C1-6151	30	S, V	S, V	S, V	S	S	E
AE505	CRM ₁₉₇ C1-6151	5	S, V	S, V	S, V	S	S	E
AE506	CRM/12-1mer	30	S, V	S, V	S, V	S	S	E
AE507	CRM/12-1mer	5	S, V	S, V	S, V	S	S	E
AE508	1-12mer péptido	30	S, V	S, V	S, V	S	S	E
AE509	1-12mer péptido	5	S, V	S, V	S, V	S	S	E
AE510	Ab	30	S, V	S, V	S, V	S	S	E
AE511	Ab	5	S, V	S, V	S, V	S	S	E

ELISA CRM₁₉₇

Placas Greiner con 96 pozos (#650011) se cubrieron a 37 °C durante 90 minutos con 5,0 µg/mL (100 µg/pozo) de CRM₁₉₇ en tampón estéril carbonato/bicarbonato, pH 9.6. Las placas se vaciaron y lavaron con un lavador de placas que contenía 1X TBS, 0,1% tampón de lavado Brij-35. Todos los antisueros primarios se diluyeron en serie y después se transfirieron a los pozos apropiados de placa e incubaron a 37 °C durante 1 hora. Las placas después se vaciaron/lavaron como se ha descrito anteriormente. Anticuerpo secundario IgG de cabra anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina de Southern Biotech se diluyó 1:1000 con 1X PBS que contenía 0,05% Tween 20/0,02% Azida y se añadieron 100 µL a cada pozo y se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Las placas después se vaciaron/lavaron como se ha descrito anteriormente y finalmente se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora con 100 µL/pozo de 1 mg/mL solución de sustrato p-nitrofenil fosfato preparado en dietanolamina/MgCl₂, pH 9,8. El desarrollo de color se detuvo con la adición de 50 µL/pozo de 3N NaOH. Las placas se leyeron en 405 nM con una referencia de 690 nM. Los títulos del punto final se calcularon en O.D de 0,1 AU.

Las Tablas 4-6 ilustran los títulos del punto final ELISA contra Aβ. Después de la inmunización primaria, los ocho conjugados (excluyendo el control negativo) indujeron respuesta inmunes medibles anti-Aβ IgG. Sin embargo, la dosis de 30µg, pero o la dosis de 5µg, de Aβ dio una respuesta positiva la semana 3 después de la inmunización primaria. Entre todos los conjugados, parece que el péptido Aβ 1-7 conjugado sin enlazador obtuvo una repuesta tan buena o mejor que los conjugados estudiados. En la dosis de 5µg, Aβ 1-5C hizo mejor en las semanas 8-16. Aβ 1-7C fue mejor en la dosis de 30µg. El análisis de títulos de anticuerpo después de la segunda y tercera inmunización con dosis de 5 o 30µg indico que la respuesta inmune máxima para Aβ para la mayoría de los conjugados se vio después de la segunda inmunización. Al menos en ratones, la tercera inmunización no pareció mejorar la respuesta inmune. El péptido Aβ sin embargo, necesitó tres inmunizaciones con la dosis de 30µg para alcanzar la máxima respuesta inmune contra el péptido (Tabla 5). En términos de descomposición de anticuerpos durante un periodo extenso de tiempo, el nivel de anticuerpo de los grupos inmunizados con conjugados se redujo en 2 o 3 veces en comparación con el nivel más alto dentro del grupo. Las muestras individuales de semanas 6 y 8 se analizaron para calcular GMTs contra Aβ para cada uno del grupo (Tabla 6) para ver si algún grupo conjugado era sustancialmente mejor que los otros. El análisis estadístico de los títulos de semana 6 de conjugados Aβ 1-5C, Aβ 1-7C y Aβ 1-9C indicaron que el conjugado Aβ 1-7 indujo un título significativamente mayor. A partir de este experimento, es también evidente que la secuencia enlazadora GAGAC no contribuyó a mejorar la respuesta inmune al péptido.

Tabla 4

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

Tabla 4. Semanas 0, 3, 6, 8, 13 y 16 títulos de referencia ELISA contra A β usando antisuero de dosis de 5 μ g de conjugados de péptido que abarcan varias longitudes de la terminal N de Amiloide A β péptido; Ref: Elan policlonal hiperinmune #592= 3.073.307. Referencia en O. D 0,1 A.U. Ratones Swiss Webster se inmunizaron con SC-N con 5 μ g de antígenos anteriores formulados con 20 μ g STIMULON™ QS-21 las semanas 0, 3 y 6.

Tabla 5

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

Tabla 5. Semanas 0, 3, 6, 8, 13 y 16 títulos de referencia ELISA contra A β usando antisuero de dosis de 30 μ g de conjugados de péptido que abarcan varias longitudes de la terminal N de Amiloide A β péptido; Ref: Elan policlonal hiperinmune #592= 3.073.307. Referencia en O. D 0,1 A.U. Ratones Swiss Webster se inmunizaron con SC-N con 30 μ g de antígenos anteriores formulados con 20 μ g STIMULON™ QS-21 las semanas 0, 3 y 6.

Tabla 6

Grupo	Semana 6	Semana 8
1-5C	237.668 ^a	161.671 ^b
1-7C	1.866.702 ^a	881.146 ^b
1-9C	963.323 ^a	595.414 ^b
1-12C	940.260	955.470

Grupo	Semana 6	Semana 8
1-5LC	395.553	141.084
1-7LC	516.921	394.521
1-9LC	826.773	562.458
1-12LC	544.768	376.952
1-42	365	4.565

Tabla 6. Semanas 6 y 8 títulos de referencia ELISA GMTs contra A β usando antisuero de dosis de 30 μ g de conjugados de péptido que abarcan varias longitudes de la terminal N de Amiloide- A β . Ref: Elan policlonal hiperinmune #592= 3.073.307. Referencia en O. D 0,1 A.U. Ratones Swiss Webster se inmunizaron con SC-N con 30 μ g de antígenos anteriores formulados con 20 μ g STIMULON™ QS-21 las semanas 0, 3 y 6.

a. Análisis estadístico de títulos de semana 6 de 1-5C, 1-7C y 1-9C usando Tukey-Kramer muestra una diferencia estadística entre 1-5C y 1-7C solamente, mientras, el análisis que usa Prueba T de Student muestra una diferencia estadística entre 1-5C contra 1-7C y 1-5C contra 1-9C.

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

Tinción de Tejido de Cerebro de Ratón PDAPP

El ensayo de tinción de tejido de cerebro PDAPP proporciona una indicación de la funcionalidad de los conjugados de péptido A β y/o antisuero A β 1-42. Las muestras de suero de grupos de ratones individuales se analizaron por separado para su habilidad para reconocer placas de tejido de cerebro de ratón PDAPP que contenían péptido amiloide. Los resultados se muestran en la Tabla 7A y 7B. con la excepción del antisuero conjugado A β 5mer, hubo una respuesta relacionada con la dosis en el reconocimiento de placas. Independientemente del enlazador, el antisuero inducido por el conjugado de 30 μ g tuvo mejores patrones de reactividad en comparación con el antisuero conjugado de 5 μ g. sin embargo, con el antisuero conjugado A β 5 mer, se concluyó que los conjugados hechos de A β 1-5 mer a A β 1-9 mer son suficientes para obtener placa que reconocen respuestas inmune en ratones y la presencia de enlazador no es esencial. A partir de este estudio pueden sacarse las siguientes conclusiones: (a) Todos los conjugados de péptido indujeron antisuero de título alto contra la proteína transportadora CRM₁₉₇ hasta niveles iguales o ligeramente más altos en comparación con el control CRM₁₉₇ se no conjugado (no mostrado).(b) Los conjugados con el enlazador GAGAC no obtuvieron inmunogenicidad o funcionalidad en comparación con los conjugados sin el enlazador. (c) Los datos de inmunogenicidad y la tinción de tejido de cerebro PDAPP (una indicación inicial de anticuerpo funcional) muestran que los conjugados A β 1-5mer y A β 1-7mer parecieron ser los inmunógenos preferentes para posterior desarrollo.

Tabla 7A. Tinción de tejido de ratón PDAPP

Dosis de 5 μ g					
Sin enlazador			Con enlazador		
Vacuna	Animal #	Tinción PDAPP	Vacuna	Animal #	Tinción PDAPP
CRM/ A β 1-5	1	+	CRM/ A β 1-5	1	-
	2	++/+++		2	-
	3	++/+++		3	±
	4	++		4	±
	5	++		5	±
CRM/ A β 1-7	1	++	CRM/ A β 1-7	1	+
	2	++		2	++
	3	++		3	++
	4	++		4	+
	5	++		5	++

Dosis de 5 µg					
Sin enlazador			Con enlazador		
Vacuna	Animal #	Tinción PDAPP	Vacuna	Animal #	Tinción PDAPP
CRM/ Aβ1-9	1	+	CRM/ Aβ1-9	1	++
	2	+ / ++		2	++
	3	±		3	+
	4	±		4	+
	5	±		5	+
CRM/ Aβ1-12	1	-	CRM/ Aβ1-12	1	+
	2	?		2	+
	3	±		3	++
	4	-		4	-
	5	±		5	±
CRM/ Aβ12-1-mer	1	-	CRM/ Aβ42	1	-
	2	-		2	-
	3	±		3	-
	4	-		4	-
	5	±		5	-

Todo el antisuero se diluyó 1:1000 para el procedimiento de tinción

Tabla 7B. Tinción de tejido de ratón PDAPP

Dosis de 30 µg					
Sin enlazador			Con enlazador		
Vacuna	Animal #	Tinción PDAPP	Vacuna	Animal #	Tinción PDAPP
CRM/ Aβ1-5	1	-	CRM/ Aβ1-5	1	+
	2	+ / ++		2	-
	3	-		3	-
	4	±		4	±
	5	++		5	-
CRM/ Aβ1-7	1	+ / ++	CRM/ Aβ1-7	1	+
	2	++		2	± / +
	3	++		3	+ / ++
	4	++		4	± / +
	5	++ / +++		5	+ / ++
CRM/ Aβ1-9	1	++ / +++	CRM/ Aβ1-9	1	+ / ++
	2	++		2	++
	3	++		3	++
	4	+		4	±
	5	+		5	+ / ++

Dosis de 30 µg					
Sin enlazador			Con enlazador		
Vacuna	Animal #	Tinción PDAPP	Vacuna	Animal #	Tinción PDAPP
CRM/ Aβ1-12	1	-	CRM/ Aβ1-12	1	+ / ++
	2	+ / ++		2	+
	3	+ / ++		3	-
	4	±		4	+ / ++
	5	±		5	+
CRM/ Aβ12-1 mer	1	-	Aβ 42	1	-
	2	-		2	-
	3	-		3	-
	4	-		4	-
	5	-		5	-

EJEMPLO 7**Estudios de Inmunogenicidad en Monos**

Grupos de 6 monos recibieron 30 µg de conjugado 7mer (conjugado total) adyuvantado con STIMULON™ QS-21, alumbre o formulación RC529 SE los días 0, 29 y 58. Los grupos adicionales incluidos fueron 30 µg conjugado 5mer con alumbre (Al(OH)3) o RC529 SE, 75 y 300µg de Aβ con STIMULON™ QS-21 como controles positivos. Los controles positivos se inmunizaron cada dos semanas. El día 36 y 64 se determinaron los títulos de anticuerpo anti-Aβ (Figuras 7-9). El día 36, los conjugados 7mer/CRM con STIMULON™ QS-21, Alumbre y RC529 obtuvieron títulos GMT de 10110, 13330 y 17090 respectivamente (Figura 7). Sin embargo, Aβ 1-42 más STIMULON™ QS-21 obtuvo GMTs de 223 y 1735 en niveles de dosis de 75 y 300µg, respectivamente. El conjugado Aβ 5mer obtuvo un título de 2134 con alumbre y 15980 con RC529 SE. El día 64, esto es, después de 3 dosis de conjugados con STIMULON™ QS-21 o RC-529 SE se indujeron títulos sustancialmente más altos que después de la segunda dosis (GMTs 69910 para 7 mer/RC-529 SE; 21640 para Aβ 5mer/RC-529 SE y 30310 para Aβ 7mer/STIMULON™ QS-21) (Figura 8). Los conjugados con alumbre obtuvieron títulos reducidos después de la tercera inmunización en comparación con después de la segunda inmunización. Parece que el conjugado Aβ 7mer obtuvo una respuesta mejor en comparación con el conjugado Aβ 5mer. En monos, la adyuvantación del conjugado Aβ 7mer con RC-529 SE o STIMULON™ QS-21 obtuvo la respuesta más alta (Figura 9). La respuesta al conjugado Aβ 7mer con alumbre fue moderada y similar a la de 300 µg Aβ con STIMULON™ QS-21.

A partir del presente ejemplo pueden sacarse las siguientes conclusiones. En primer lugar, ambos conjugados son muy inmunogénicos en especies de primates. En segundo lugar, la presencia de adyuvantes en la formulación de inmunización influye de manera significativa en la respuesta inmune. En tercer lugar, excepto el adyuvante de aluminio, RC-529 SE y STIMULON™ QS-21 mejoran la respuesta inmune después de cada dosis de inmunización al menos hasta tres dosis (Figuras 9). En general, el conjugado Aβ 7mer indujo una respuesta de anticuerpo más alta en presencia de 529, seguido de STIMULON™ QS-21 (véase Figura 9).

EJEMPLO 8**Preparación de Conjugados de Péptido Antigénico Múltiple (PAM) y su Estudio Inmunogénico**

Hay disponibles varios métodos para generar sitios antigénicos múltiples en los transportadores. En los ejemplos previos, cada sitio antigénico se conjuga por separado con el transportador mediante químicas de conjugación definida y restricción. En este ejemplo, se construyen múltiples sitios antigénicos mediante síntesis en fase sólida de repeticiones tándem de Aβ 7mer. Alternativamente estas repeticiones tándem pueden acoplarse con epítopes de célula T con o sin unión a través de un núcleo de lisina como se describe en otra parte. Estos péptidos antigénicos múltiples se sintetizaron con un residuo cisteinil residual para conjugación con la proteína transportadora. Se sintetizaron péptidos que contenían una unidad de repetición (1-7), tres unidades de repetición (1-7)3 y cinco unidades de repetición (1-7)5 con un residuo cisteinil adicional en el extremo carboxil. Estos péptidos se unieron covalentemente a CRM bromoacetilado durante la noche a través de sus residuos de cisteína de terminal C. la reacción se realizó a pH 9,0-9,2 con proporciones péptido:CRM añadidas como se resume en la Tabla 8. Los grupos de bromoacetilo, que no reaccionaron con péptido, se restringieron con N-acetilcisteamina. Estos lotes representan conjugados que contienen una única copia, tres copias tándem y cinco copias tándem del péptido Aβ1-7 conjugado con CRM, respectivamente. La tabla 8 resume brevemente las propiedades de las muestras.

Tabla 8
Muestra de Conjugado de Péptido Antigénico Múltiple (PAM)

Conjugado	Péptido: CRM (p/p)	pH de reacción
Ab(1-7) ₁ /CRM	0,37	8,99
Ab(1-7) ₃ /CRM	1,02	8,95
Ab(1-7) ₅ /CRM	1,67	9,17

La carga de péptido (el número medio de péptido Aβ 1-7 por transportador) y los números de restricción (Tabla 9) son los números de aminoácidos únicos (CMC o CMCA) por transportador como lo determina el análisis de aminoácido. Los valores CMC y CMCA se citaron para lisina.

Tabla 9
Grado de Conjugación y Restricción de Cada Conjugado

Conjugado	Carga de péptido (CMC)	Restricción (CMCA)
Aβ(1-7) ₁ /CRM	12,5	11,7
Aβ(1-7) ₃ /CRM	10,4	15,2
Aβ(1-7) ₅ /CRM	9,8	15,9

Ratones Swiss-Webster (10 por grupo) se inmunizaron subcutáneamente con 1 o 0,1 µg de péptido conjugado Aβ/CRM. La mitad de los ratones se inmunizaron con la composición formulada con 100 µg del adyuvante Al(OH)₃, y la mitad se inmunizaron sin adyuvante. La inmunización se programó las semanas 0 y 3. Los sangrados se programaron las semanas 0, 3 y 6. Las muestras de suero se analizaron para respuesta de anticuerpo contra péptido Aβ1-42. Los resultados se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10
Títulos de Referencia Anti-Aβ para Conjugados de Péptido Antigénico Múltiple (PAM)

Código de Grupo	Descripción de Muestra	Adyuvante	Agrupación Sem 0	GMT Sem 3	GMT Sem 6
AG332	1 µg Aβ (1-7) ₁ /CRM	Al(OH) ₃	<100	18.096	100.279
AG333	1 µg Aβ (1-7) ₃ /CRM	Al(OH) ₃	<100	44.911	420.235
AG334	1 µg Aβ (1-7) ₅ /CRM	Al(OH) ₃	<100	27.032	394.488
AG335	0,1 µg Aβ (1-7) ₁ /CRM	Al(OH) ₃	<100	19.350	66.834
AG336	0,1 µg Aβ (1-7) ₃ /CRM	Al(OH) ₃	<100	13.307	208.272
AG337	0,1 µg Aβ (1-7) ₅ /CRM	Al(OH) ₃	<100	1.196	22.665
AG338	1 µg Aβ (1-7) ₁ /CRM	Ninguno	<100	5.273	370.980
AG339	1 µg Aβ (1-7) ₃ /CRM	Ninguno	<100	9.299	541.093
AG340	1 µg Aβ (1-7) ₅ /CRM	Ninguno	<100	3.100	185.272
AG341	0,1 µg Aβ (1-7) ₁ /CRM	Ninguno	<100	340	25.839
AG342	0,1 µg Aβ (1-7) ₃ /CRM	Ninguno	<100	128	5.553
AG343	0,1 µg Aβ (1-7) ₅ /CRM	Ninguno	<100	668	2.098

Todos los conjugados indujeron título de anticuerpo anti- Aβ 1-42 después de inmunización primaria y los niveles aumentaron sustancialmente después de la dosis de refuerzo. En ausencia de adyuvante de aluminio, las diferencias en la repuesta a la dosis fueron evidentes tanto en el sangrado de la semana 3 como el de la semana 6. La dosis más alta obtuvo respuesta de anticuerpo con título más alto. El adyuvante de aluminio obtuvo una respuesta de anticuerpo sustancialmente más alta la semana 3 en ambos niveles de dosis (0,1 y 1 µg) en comparación con los grupos no adyuvantados. Después de inmunización secundaria, los conjugados que se dieron en una dosis de 1 µg obtuvieron un incremento de 5 y 10 veces en los niveles de anticuerpo. En este nivel de dosis los conjugados de péptido con 3 y 5 repeticiones indujeron una mayor respuesta de anticuerpo que un conjugado

que contenía una única repetición. También se determinaron los títulos contra el transportador CRM, y estos se enumeran en la Tabla 11.

Tabla 11
Títulos de Referencia Anti-CRM para Conjugados de Péptido Antigénico Múltiple (PAM)

	Código de Grupo	Descripción de Muestra	Adyuvante	Agrupación Sem 0	GMT Sem 3	GMT Sem 6
10	AG332	1 µg Aβ (1-7) ₁ /CRM	Al(OH) ₃	<50	10.531	114.602
	AG333	1 µg Aβ (1-7) ₃ /CRM	Al(OH) ₃	<50	4.274	83.065
	AG334	1 µg Aβ (1-7) ₅ /CRM	Al(OH) ₃	<50	1.680	49.320
15	AG335	0,1 µg Aβ (1-7) ₁ /CRM	Al(OH) ₃	<50	1.114	13.231
	AG336	0,1 µg Aβ (1-7) ₃ /CRM	Al(OH) ₃	<50	197	1.484
	AG337	0,1 µg Aβ (1-7) ₅ /CRM	Al(OH) ₃	<50	65	222
20	AG338	1 µg Aβ (1-7) ₁ /CRM	Ninguno	<50	35	309
	AG339	1 µg Aβ (1-7) ₃ /CRM	Ninguno	<50	29	1.085
	AG340	1 µg Aβ (1-7) ₅ /CRM	Ninguno	<50	29	542
	AG341	0,1 µg Aβ (1-7) ₁ /CRM	Ninguno	<50	25	55
25	AG342	0,1 µg Aβ (1-7) ₃ /CRM	Ninguno	<50	25	34
	AG343	0,1 µg Aβ (1-7) ₅ /CRM	Ninguno	<50	29	ND

Los animales se inmunizaron las semanas 0 y 3 y sangraron las semanas 0, 3 y 6. Adyuvante: 100 µg

(Al)OH₃ o ninguno: ND=No Determinado

Los datos en la Tabla 11 indican que los grupos no adyuvantados indujeron niveles muy bajos de respuesta de anticuerpo anti-CRM en niveles de dosis de 1 µg así como de 0,1 µg incluso después de dos inmunizaciones. Sin embargo, conjugados con adyuvante de hidróxido de aluminio indujeron niveles sustanciales de respuesta de anticuerpo anti-CRM en dosis de 1 µg y una respuesta mucho más baja en dosis de 0,1 µg. En presencia del adyuvante, los títulos CRM fueron los más altos para el conjugado con una sola repetición, intermedios para el conjugado con triple repetición y los más bajos para el conjugación con quintuples repeticiones. Esto se espera, ya que la dosis de CRM por péptido es la más baja para Aβ(1-7)₅/CRM, y la más alta para Aβ(1-7)₁/CRM. Las diferencias fueron solamente estadísticamente significativas la semana 6 para la dosis de 0,1 µg.

El objetivo de la presente invención es obtener respuesta inmunogénica con alto título contra el hapteno antigénico y no necesariamente contra la proteína transportadora. Bajo ciertas circunstancias es deseable obtener una respuesta inmune óptima contra el determinante antigénico de hapteno con menos o ninguna respuesta inmune contra la proteína transportadora. Para tales aplicaciones, servirán los conjugados con repeticiones tándem de determinantes antigénicos múltiples con formulación no adyuvantada.

EJEMPLO 9

Preparación de Conjugados Aβ-Péptido con Varias Proteínas Transportadoras y su Inmunogenicidad

Este ejemplo compara la inmunogenicidad de conjugados usando seis proteínas transportadoras diferentes. La sal de acetato de Aβ1-7 se añadió a transportadores bromoacetilados en una proporción 1:1 por peso a pH 9. Todos los conjugados excepto Aβ1-7/rC5ap se restringieron con N-acetilcisteamina. Todos los transportadores alternativos son proteínas bacterianas recombinantes, incluyendo CRM (toxide de difteria), peptidasa recombinante C5a (rC5ap; clonada de *Streptococcus agalactiae*, incluye mutaciones D130A y S512A), ORFs 1224, 1664, 2452 (todas clonadas de *Streptococcus pyogenes*) y T367, T858 (cada una clonada de *Chlamydia pneumoniae*). En la Tabla 12 se encuentra un resumen de los transportadores usados. El grado de conjugación y restricción de cada conjugado Aβ 1-7 con estos transportadores se presenta en la Tabla 13.

Este estudio mostró que el conjugado de peptidasa recombinante C5a indujo títulos más altos contra Aβ que la mayoría de los transportadores testados, incluyendo CRM. Esta diferencia fue estadísticamente significativa para los títulos de la semana 6 de grupos que recibieron hidróxido de aluminio. Además, el conjugado Aβ1-7/T858 fue significativamente más inmunogénico que la mayoría del resto de conjugados en ausencia de adyuvante. El único conjugado que actuó mal en relación con el conjugado control de CRM fue Aβ1-7/T367, un conjugado que tampoco reaccionó con un anticuerpo monoclonal específico Aβ mediante análisis de transferencia Western. Este estudio confirma que otros numerosos transportadores pueden usarse de manera exitosa para inmunizar contra el péptido Aβ.

Tabla 12
Lista de Transportadores y Propiedades de Conjugado

	Proteína Transportadora	PM de transportador (Da)	# de lisinas
5	CRM	58.408	39
	rC5ap	108.560	85
10	ORF1224	30.950	18
	ORF1664	31.270	38
	ORF2452	31.790	29
15	T367	49.700	29
	T858	37.190	23

Tabla 13
Grado de Conjugación y Restricción de Cada Conjugado

	Conjugado	Carga de Péptido (CMC)	Restricción (CMCA)
20	A β 1-7/rC5ap	25,9	-
	A β 1-7/ORF1224	12,8	5,7
25	A β 1-7/ORF1664	13,4	10,8
	A β 1-7/ORF2452	12,03	10,5
	A β 1-7/T367	13,2	8,2
30	A β 1-7/T858	5,2	1,7

Resultados de conjugación: Carga de péptido (el número medio de péptido A β 1-7 por transportador) y los números de restricción son los números de aminoácidos únicos (CMC o CMCA) por transportador como lo determina el análisis de aminoácido. Los valores CMC y CMCA se citaron para lisina.

Resultados de inmunización

El título medio geométrico para cada grupo en este estudio está enumerado en la Tabla 14. La semana 3, a pesar de la presencia de adyuvante, A β 1-7/rC5ap indujo títulos anti- A β significativamente más altos que los conjugados correspondientes preparados para *Streptococcus pyogenes* ORFs 1224, 1664, 2542 o *Chlamydia pneumoniae* ORFs T367 y T858. La semana 3, en ausencia de adyuvante, A β 1-7/rC5ap fue también más inmunogénico que el resto de conjugados excepto A β 1-7/T858. El conjugado T858 sin Al(OH)₃ indujo títulos más altos que los conjugados ORF1224, ORF1664, ORF2452 y CRM sin adyuvante. El único adyuvante que fue significativamente menos inmunogénico que A β 1-7/CRM fue A β 1-7/T367 ($p < 0,00002$). El transportador de T367 actuó mal con o sin adyuvante la semana 3 y la 6. La semana 6, el conjugado rC5ap con hidróxido de aluminio fue más inmunogénico ($p < 0,04$) que el resto de conjugados excepto A β 1-7/ORF2452. En ausencia de adyuvante, A β 1-7/rC5ap y A β 1-7/T858 indujeron títulos significativamente más altos que los conjugados de ORF1224, ORF1664 o T367. A β 1-7/CRM sin hidróxido de aluminio indujo títulos más altos que A β 1-7/ORF1664 o A β 1-7-T367.

Tabla 14
Títulos de Referencia Anti-A β 1-42

	CÓDIGO DE GRUPO	DESCRIPCIÓN DE MUESTRA	ADYUVANTE	AGRUPACIÓN SEM 0	GMT SEM 3	GMT SEM 6
55	AG344	5 μ g A β 1-7/CRM	Al(OH) ₃	<100	21.404	54.157
	AG345	5 μ g A β 1-7/ rC5ap	Al(OH) ₃	<100	61.967	402.972
	AG346	5 μ g A β 1-7/ORF1224	Al(OH) ₃	<100	10.711	30.084
60	AG347	5 μ g A β 1-7/ORF1664	Al(OH) ₃	<100	7.188	43.226
	AG348	5 μ g A β 1-7/ORF2452	Al(OH) ₃	<100	11.437	109.091
	AG349	5 μ g A β 1-7/T367	Al(OH) ₃	<100	321	5.139
65	AG350	5 μ g A β 1-7/T858	Al(OH) ₃	<100	16.656	33.328

	CÓDIGO DE GRUPO	DESCRIPCIÓN DE MUESTRA	ADYUVANTE	AGRUPACIÓN SEM 0	GMT SEM 3	GMT SEM 6
5	AG351	5 µg Aβ1-7/CRM	Ninguno	<100	2.615	119.488
	AG352	5 µg Aβ1-7/ rC5ap	Ninguno	<100	11.858	279.113
	AG353	5 µg Aβ1-7/ORF1224	Ninguno	<100	1.674	18.719
10	AG354	5 µg Aβ1-7/ORF1664	Ninguno	<100	119	9.832
	AG355	5 µg Aβ1-7/ORF2452	Ninguno	<100	2.493	76.038
	AG356	5 µg Aβ1-7/T367	Ninguno	<100	50	620
15	AG357	5 µg Aβ1-7/T858	Ninguno	<100	28.820	275.202

Los animales se inmunizaron la semana 0 y 3 y sangraron las semana 0, 3 y 6. La dosis se basa en la cantidad total de conjugado. Adyuvante: 100 µg Al(OH)₃ o ninguno.

EJEMPLO 10

Preparación de Conjugados Adicionales Péptido Aβ-Proteína I. Activación

CRM₁₉₇ descongelado (8 mL, 59,84 mg, a 7,48 mg/mL) se disolvió en 0,1 M tampón de borato (pH 9, 3,968 mL) para conseguir una concentración hasta 5 mg/mL. La solución se enfrió en un baño helado a 0.5 °C. N-hidroxisuccinimida de ácido bromoacético (59,9 mg) (Aldrich-Sigma) se disolvió en DMF (100 µL) (Aldrich-Sigma) y se añadió en forma de gotas a la solución de CRM₁₉₇. Después de la adición de N-hidroxisuccinimida de ácido bromoacético, se observó un precipitado. Cuando se comprobó el pH, descendió a pH 6. El pH de la mezcla de reacción se recuperó a pH 9 añadiendo más 0.1 M tampón de borato. La mezcla de la reacción después se agitó a 4 °C durante 1 h, con remolinos. La mezcla se purificó y concentró usando concentración centrifuga Centriprep YM-10 y se volvió a purificar en Sephadex G-25 usando 10 mM borato como el eluyente. Las fracciones positivas para Reactivo de Bradford se agruparon y concentración usando Centriprep YM-10. El grado de bromoacetilación se determinó mediante ensayo de Bradford (lineal). La concentración resultó ser 5,36 mg/mL (Producida 30 mg). La concentración final se ajustó después para ser 5 mg/mL y se almacenó en el congelador en 5% sacarosa hasta posterior uso.

II. Conjugación

Para cada conjugación, se usó CRM₁₉₇ bromoacetilado descongelado. Los péptidos se disolvieron en tampón de borato (2,5 mg en 125 ml de 0,1 M tampón de borato). Se observó ligera insolubilidad con péptidos Aβ KLVFFAEDC (SEQ ID NO: 45), CLVFFAEDV (SEQ ID NO: 47), CKLVFFAED (SEQ ID NO: 48) y LVFFAEDC (SEQ ID NO: 50). CRM₁₉₇ bromoacetilado (5 mg/mL) se trató con las suspensiones/soluciones de péptido. La proporción del péptido y la proteína en la mezcla fue 1:2. Se observó turbiedad en las mezclas conjugadas con péptidos KLVFFAEDC (SEQ ID NO: 45), CLVFFAEDV (SEQ ID NO: 47), CKLVFFAED (SEQ ID NO: 48) y KLVFFAEDC (SEQ ID NO: 45) (creo que es una errata, está repetida). Las mezclas después se comprobaron para pH (pH 9) e incubaron a 4 °C durante la noche con remolinos lentos. Las concentraciones finales de las mezclas se hicieron a 3 mg/mL antes de la incubación. La turbiedad de las mezclas de conjugado con péptidos CLVFFAEDV (SEQ ID NO: 47) y LVFFAEDC (SEQ ID NO: 50) desaparecieron después de la incubación. Sin embargo, KLVFFAEDC (SEQ ID NO: 45) y CKLVFFAED (SEQ ID NO: 48) se mantuvieron ligeramente turbios. También se preparó un conjugado de proteína soluble simulada con cisteamina en una proporción de 1:1 (p/p). Se obtuvieron péptidos sintetizados de BIOSOURCE con aproximadamente 95% de pureza:

Octámeros:

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

Heptámeros:

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

III. Grupos de Lisina No reaccionada Restringida en Proteína:

Las lisinas no reaccionadas se restringieron con N-acetilcisteamina (CMCA; Aldrich-Sigma) en una proporción de 1/1 (p/p) durante 4 horas a 4 °C mientras se giraba en la oscuridad. Los péptidos no reaccionados y

los reactivos de restricción se sacaron de los conjugados mediante diálisis usando casete Lide-A-Lyzer (M_w corte 10.000) (Pierce) contra tampón PBS (2 L) durante la noche (13 horas). El intercambio de tampón y diálisis se realizó dos veces (2 x 14 horas). Se observó una ligera insolubilidad en los conjugados con péptidos KLVFFAEDC (SEQ ID NO: 45) y CKLVFFAED (SEQ ID NO: 48). Todos los conjugados se almacenaron después en el refrigerador a 4 °C en un conservante.

IV. Caracterización del Transportador de Proteína:

Se usó MALDI-TOF MS para determinar la masa de CRM₁₉₇ y la masa del conjugado N-acetilcisteamina-CRM₁₉₇ simulado. En base a las masas de CRM₁₉₇ y CRM₁₉₇ bromoacetilado, se modificaron 11 residuos de lisina.

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

Donde; M_w de CRM₁₉₇ es 58590,29
 M_w de CRM₁₉₇ bromoacetilado es 59941,46
 M_w de bromoacetato es 122

El grado de bromoacetilación fue superior a 28%. (El número total de lisinas en CRM₁₉₇ fue 39). de estos 11 residuos de lisina modificados, 10 se acoplaron con cisteamina. La eficiencia de acoplamiento fue 90%.

$$(61143-59941)/119 = 10$$

Donde; M_w de CRM₁₉₇ bromoacetilado es 59941,46
 M_w de conjugado simulado es 61143
 M_w de la N-acetilcisteamina es 119

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

V. Caracterización de los Conjugados Péptido-Proteína mediante análisis de transferencia Western con Gel Tris-Tricina Prefabricado

Los conjugados proteína-péptido se analizaron mediante análisis de transferencia Western. Las calles son: marcador (calle 1); L-28375 24/01 (calle 2); L-28375 24/02 (calle 3); L-28375 24/03 (calle 4); L-28375 24/04 (calle 5); L-28375 24/05 (calle 6); L-28375 24/06 (calle 7) L-28375 24/07 (calle 8); L-28375 24/08 (calle 9); L-28375 24/09 (Simulación) (calle 10); y BrAcCRM₁₉₇ (calle 11). Se usó un anticuerpo monoclonal específico de péptido de ratones (248-6H9-806 A β 17-28) como el anticuerpo primario (antisuero) (diluciones 1:3000 resultaron ser las mejores). (H+L)-HPR IgG de cabra anti-ratón fue el anticuerpo secundario (dilución 1:1000). Se observó que todos los conjugados fueron reconocidos por el anticuerpo primario, excepto el conjugado de simulación y el CRM₁₉₇ activado (véase Figura 10).

Concentración de Proteína

Las concentraciones de proteína de la muestra de conjugado se determinaron mediante ensayo Pierce BCA (véase Tabla 15).

Análisis de Aminoácido

Se realizó análisis de aminoácido para determinar el grado de conjugación. El grado T de conjugación se calculó en base a los residuos de CMCA (carboximetilcisteamina) encontrados en los conjugados. Se usó CMCA para restringir los sitios activados no reaccionados después de la conjugación con los péptidos. (Véase Tabla 15).

Tabla 15

Grado de Conjugación de Péptidos con BrAccCRM₁₉₇			
Código de Conjugado	Secuencia de Péptido (SEQ ID NO:)	Concentración Final (mg/mL)	Grado de Conjugación (En Base a CMCA)
L-28375 24/01	LVFFAEDV-C (SEQ ID NO:44)	1,67	8/10
L-28375 24/02	KLVFFAED-C (SEQ ID NO:45)	0,82	5/10
L-28375 24/03	VFFAEDVG-C (SEQ ID NO:43)	1,43	8/10
L-28375 24/04	C-LVFFAEDV (SEQ ID NO:47)	1,04	9/10
L-28375 24/05	C-KLVFFAED (SEQ ID NO:48)	0,78	1/10

	Código de Conjugado	Secuencia de Péptido (SEQ ID NO:)	Concentración Final (mg/mL)	Grado de Conjugación (En Base a CMCA)
5	L-28375 24/06	C-VFFAEDVG (SEQ ID NO:46)	0,97	9/10
	L-28375 24/07	VFFAEDV-C (SEQ ID NO:49)	1,00	7/10
	L-28375 24/08	LVFFAED-C (SEQ ID NO:50)	0,99	8/10
10	L-28375 24/09 (Simulado)		1,89	10/11

Todos los ensayos colorimétricos se realizaron usando espectrómetro de microplaca y SOFTmax Pro.

15 EJEMPLO 11

Estudios Inmunogénicos de Conjugados de Péptido A β en Ratones Swiss Webster

Ratones Swiss Webster exogámicos se inmunizaron con VFFAEDVG-C (SEQ ID NO: 43), LVFFAEDV-C (SEQ ID NO: 44), KLVFFAED-C (SEQ ID NO: 45), C-VFFAEDVG (SEQ ID NO: 46), C-LVFFAEDV (SEQ ID NO: 47), C-KLVFFAED (SEQ ID NO: 48), VFFAEDV-C (SEQ ID NO: 49), LVFFAED-C (SEQ ID NO: 50) cada uno conjugado con CRM₁₉₇, o con A β 1-7- CRM₁₉₇, todos formulados con el adyuvante RC 529 SE. Se inmunizaron nueve grupos de 10 animales por grupo subcutáneamente con uno de los conjugados de péptido A β al inicio del estudio (semana 0) y posteriormente la semana 4. El suero se recogió antes, pero los mismos días que la inmunización.

25

Estudios Inmunogénicos de Conjugados de Péptido A β en Ratones Balb/c Exogénicos

Ratones Balb/c exogénicos se inmunizaron como en el párrafo anterior, pero también se les administró una dosis de refuerzo con conjugado y adyuvante la semana 12.

30

Resultados

Se recoge suero de ambos estudios para análisis de título IgG específico de péptido A β ₁₃₋₂₈. El suero de ratones Balb/c también se recoge para análisis un día antes del refuerzo de la semana 12, y una semana después. Las células del bazo de animales usados en el Ejemplo 11 se evalúan para su potencial para responder a estimulación in vitro con un grupo superpuesto de péptidos que abarca A β ₁₋₄₂, A β ₁₋₄₂ de longitud completa, CRM₁₉₇ o activadores policlonales. El análisis comprende una lectura Elispot para interleuquinas 4 y 5, e interferón-gamma. Después de su finalización, los conjugados de péptido A β se evaluarán como se ha descrito anteriormente y como se describe en el Ejemplo 6.

40

EJEMPLO 12

Estudios Inmunogénicos de Conjugados de Péptido A β en Ratones PSAPP

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

Estudios Inmunogénicos de Conjugados de Péptido A β en Ratones PDAPP

Ratones PDAPP se inmunizaron con VFFAEDVG-C (SEQ ID NO: 43), LVFFAEDV-C (SEQ ID NO: 44), KLVFFAED-C (SEQ ID NO: 45), C-VFFAEDVG (SEQ ID NO: 46), C-LVFFAEDV (SEQ ID NO: 47), C-KLVFFAED (SEQ ID NO: 48), VFFAEDV-C (SEQ ID NO: 49), LVFFAED-C (SEQ ID NO: 50). El ratón PDAPP sobreexpresa una forma mutante de APP humano (App^{V71F}) y desarrolla enfermedad de Alzheimer a edad temprana (Bard, et al. (2000) Nature Medicine 6:916-919; Maslia E, et al. (1996) J Neurosci. 15; 16 (18):5795-811).

Resultados

Se recogió suero de ambos estudios para análisis de título IgG específico de péptido A β ₁₃₋₂₈. Después de su finalización, los conjugados de péptido A β se evaluará como se ha descrito anteriormente y como se describe en los Ejemplos 6 y 11, así como en el ensayo de acondicionamiento de miedo contextual (CFC).

El acondicionamiento de miedo contextual es una forma común que es excepcionalmente fiable y se adquiere rápidamente en la mayoría de animales, por ejemplo, mamíferos. Los animales del test aprenden a temer un estímulo y/o medio neutras previamente debido a su asociación con una experiencia aversiva. (véase, por

65

ejemplo, Fanselow, Anim. Learn. Behav. 18:264-270 (1990); Wehner et al., Nature Genet. 17:331-334. (1997); Caldarone et al., Nature Genet. 17:335-337 (1997)).

5 El acondicionamiento de miedo contextual es especialmente útil para determinar la función o disfunción cognitiva, por ejemplo, como resultado de enfermedad o trastorno, tal como una enfermedad o trastorno degenerativo, una enfermedad o trastorno relacionado con A β , una enfermedad o trastorno amiloide, la presencia de una alteración genética desfavorable que efectúa una función cognitiva (por ejemplo, mutación genética, alteración genética o genotipo no deseado), y/o la eficacia de un agente, por ejemplo, un agente de conjugado A β , o habilidad cognitiva. Por consiguiente, el ensayo CFC proporciona un método para testar independientemente y/o validar el efecto terapéutico de agentes para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno cognitivo, y en particular, una enfermedad o trastorno que afecta a una o más regiones del cerebro, por ejemplo, el hipocampo, subículo, corteza cingulada, corteza prefrontal, corteza peririnal, corteza sensorial y lóbulo temporal medial.

15 Típicamente, el ensayo CFC se realiza usando cámaras de animales estándares y la utilización de entrenamiento de acondicionamiento que comprende un choque leve (por ejemplo, un choque de pie de 0,35mA) emparejado con una indicación auditiva (por ejemplo, un periodo de 85 db de ruido blanco), olfativa (por ejemplo, extracto de almendra o limón), táctil (por ejemplo, textura de jaula en el suelo) y/o visual (destello de luz). La respuesta a la experiencia aversiva (choque) es típicamente una de congelación (ausencia de movimiento excepto para la respiración) pero también puede incluir parpadeo de ojos o cambio en el reflejo de la membrana nictitante, dependiendo del animal seleccionado para el test. La respuesta aversiva se caracteriza normalmente el primer día de entrenamiento para determinar el punto de referencia para miedo incondicionado, con resultados de la respuesta aversiva los posteriores días del test, por ejemplo, congelación en presencia del contexto y/o indicación pero en ausencia de la experiencia aversiva, caracterizándose como el miedo condicionado por el contexto o indicación, respectivamente. Para una mejor fiabilidad, los animales del test típicamente se analizan por separado por técnicos independientes y se anotan conforme avanza el tiempo. Los detalles adicionales del diseño experimental pueden encontrarse en la técnica, por ejemplo, en Crawley, JN, What's Wrong with my Mouse; Behavioural Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice, Wiley-Liss, NY (2000).

30 Los animales ejemplares del test (por ejemplo, animales modelo) incluyen mamíferos (por ejemplo, roedores o primates no humanos) que muestran síntomas prominentes o patología que es característica de un trastorno amiloidogénico tal como enfermedad de Alzheimer. Los animales modelo pueden crearse mediante endogamia selectiva como se desee o pueden crearse genéticamente usando técnicas transgénicas que son bien conocidas en la técnica, tales como alteración genética dirigida (por ejemplo, una mutación genética, alteración genética), en un gen asociado con el trastorno de demencia, llevando a una expresión o función aberrante del gen dirigido. Por ejemplo, hay disponibles varias razas de ratón transgénico que sobreexpresan APP y desarrollan patología de placa amiloide y/o desarrollan déficits cognitivos que son característicos de enfermedad de Alzheimer (véase, por ejemplo, Games et al., supra, Johnson-Wood et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:1550 (1997); Masliah E y Rockenstein E. (2000) J Neural Transm Suppl.; 59:175-83).

40 Alternativamente, el animal modelo pueden crearse usando compuesto químicos (por ejemplo, neurotoxinas, anestésicos) o técnicas quirúrgicas (por ejemplo, ablación estereotáctica, axotomización, transección, aspiración) que extirpan o interfieren de otra manera con la función normal de una región anatómica cerebral (por ejemplo, hipocampo, amígdala, corteza pirrinal, núcleo septal medio, locus cerúleo, cuerpos mamilares) o neuronas específicas (por ejemplo, neuronas serotoninérgicas, colinérgicas o dopaminérgicas) que se asocian con síntomas o patología característicos del trastorno amiloidogénico. En ciertas realizaciones preferentes, el modelo animal muestra un déficit cognitivo prominente asociado con el aprendizaje o memoria además de la patología neurodegenerativa que se asocia con un trastorno amiloidogénico. Más preferentemente, el déficit cognitivo empeora progresivamente según avanza la edad, de tal manera que la progresión de la enfermedad en el animal modelo se iguala a la progresión de la enfermedad en un sujeto que sufre el trastorno amiloidogénico.

50 El acondicionamiento de miedo contextual y otros ensayos *in vivo* para analizar la funcionalidad de los conjugados aquí descritos pueden realizarse usando ratones de tipo salvaje o ratones que tienen cierta alteración genética lo que lleva a una memoria dañada o modelos de ratón de enfermedad neurodegenerativa, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, incluyendo modelos de animales que muestran niveles elevados de A β soluble en el fluido cerebroespinal (FCE) o plasma. Por ejemplo, los modelos de animal para enfermedad de Alzheimer incluyen ratones transgénicos que sobreexpresan la mutación "Suiza" de proteína precursora amiloide humana (hAPP^{Swe}; Tg2576) que muestran déficits y placas de memoria dependiente de edad (Hsiao et al. (1996) Science 274:99-102). La funcionalidad *in vivo* de los conjugados aquí descritos también puede analizarse usando ratón mutante PS-1, descrito en Duff, et al. (1996) Nature 383, 710-713. Otros modelos transgénicos alterados de enfermedad de Alzheimer se describen en Masliah E y Rockenstein E. (2000) J Neural Transm Suppl. 59:175-83.

60 En varios aspectos, los métodos de la divulgación comprenden la administración de un conjugado A β que es capaz de mejorar la cognición en un sujeto donde el conjugado A β se ha identificado usando un ensayo que es adecuadamente predictivo de eficacia inmunoterapéutica en el sujeto. En realizaciones ejemplares, el ensayo es un ensayo con animal modelo que se basa, al menos en parte, en comparar cognición, como se determina a partir de un estudio de acondicionamiento de miedo contextual, de un animal después de la administración e un reactivo

inmunológico del test al animal, en comparación con un control adecuado. El ensayo CFC evalúa cambios en la cognición de un animal (típicamente un ratón o rata) después del tratamiento con un compuesto terapéutico convencional. En ciertas realizaciones, el cambio en la cognición evaluada es una mejora en el estado de deficiencia de memoria o una inversión de déficit de memoria. Por consiguiente, el ensayo CFC proporciona un método directo para determinar el efecto terapéutico de agentes para prevenir o tratar enfermedad cognitiva, y en particular, una enfermedad o trastorno que afecta a una o más regiones del cerebro, por ejemplo, el hipocampo, subículo, corteza cingulada, corteza prefrontal, corteza peririnal, corteza sensorial y lóbulo temporal medial. Tales ensayos CFC se analizan en la solicitud de patente de Estados Unidos co-pendiente con número de serie 60/XXX.XXX titulada "Acondicionamiento de Miedo Contextual para Predecir Eficacia Inmunoterapéutica" (Número de Expediente: ELN-058-1), presentada el 15 de diciembre, y la solicitud de patente de Estados Unidos con número de serie 60/XXX.XXX titulada "Acondicionamiento de Miedo Contextual para Predecir Eficacia Inmunoterapéutica" (Número de Expediente: ELN-058-2).

15 BIBLIOGRAFÍA

- Bernatowicz, M. S. y Matsueda, G. R. (1986) *Analytical Biochemistry* 155: 95-102.
- Kniskern, P. J. y Marburg, S. (1994) *Development and Clinical Uses of Haemophilus b Conjugate Vaccine: Conjugation: Design, Chemistry and Analysis* Ellis, R. W. y Granoff, D. M., Eds; Marcel Dekker, Inc: Nueva York, NY, 37-70.
- Arrizon, V., Biechler, R., Cummings, J. y Harbaugh, J. (1991) *High-Performance Liquid Chromatography of Peptide and Proteins: Separation, Analysis and Conformation* Mant, C. T. y Hodges, R. S.; Eds; CRC Press: Boca Raton, FL, 859-863.
- Carlsson, J. et al. (1978) *Biochem J.* 173: 723.
- Means, G. E., Cangdon, W.I. y Bender, M. I. (1972) *Biochemistry* 11: 3564-3574.
- Glenner y Wong (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120: 1131
- Hardy (1984) *Trends in Neurosciences* 20: 1131.
- Hardy (1977) *Trends in Neurosciences* 20: 154
- Stoute et al. (1997) *N. Engl. J. Med.* 336: 86-91.
- Goebel et al. (1939) *J. Exp. Med.* 152: 361-376.
- Schneerson et al. (1980) *J. Exp. Med.* 152: 361-376.
- Chu et al. (1983) *Infect. Immun.* 40: 245.
- Schneerson et al. (1984) *Infect. Immun.* 45: 582-591.
- Anderson et al. (1985) *J. Pediatr.* 107: 346.
- Insel et al. (1986) *J. Exp. Med.* 158: 294.
- Patente de Estados Unidos Nº 4.673.574 Jun., 1987 Anderson
- Patente de Estados Unidos Nº 4.902.506 Feb., 1990 Anderson et al.
- Patente de Estados Unidos Nº 5.192.540 Mar., 1993 Kuo et al.
- Patente de Estados Unidos Nº 5.306.492 Abr., 1994 Porro
- Patente de Estados Unidos Nº 5.360.897 Nov., 1994 Anderson et al.
- Patente de Estados Unidos Nº 5.785.973 Jul., 1998 Bixler et al.
- Patente de Estados Unidos Nº 6.361.777 Mar., 2002 Hoogerhout
- Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (C. S. H. P. Press, NY 2ª ed., 1989).
- Bernatowicz, M. S., y Matsueda, G. R. (1986) *Analytical Biochemistry* 155, 95-102.
- Kniskern, P. J. y Marburg, S. (1994) *Development and Clinical Uses of Haemophilus b Conjugate Vaccine: Conjugation: Design, Chemistry and Analysis* Ellis, R. W. y Granoff, D. M., Eds; Marcel Dekker, Inc: Nueva York, NY, 37-70.
- Arrizon, V., Biechler, R., Cummings, J. y Harbaugh, J. (1991) *High-Performance Liquid Chromatography of Peptide and Proteins: Separation, Analysis and Conformation* Mant, C. T. y Hodges, R. S.; Eds; CRC Press: Boca Raton, FL, 859-863. (ESTAS 3 REFERENCIAS SE REPITEN, ESTÁN TAMBIÉN AL PRINCIPIO)

55

60

65

LISTADO SECUENCIAL

<110> Arumugham, Rasappa Prasad, A. Krishna

5 <120> Conjugados de Transportador Peptídico Inmunogénico A-Beta y Métodos de Producir los Mismo

<130> 15270C-000110EP

10 <140> Aún no conocido
<141> 2004-12-17

<150> EP 04817081.5
<151> 2004-12-17

15 <150> WO 2005/58941
<151> 2004-12-17

20 <150> US 60/530.481
<151> 2003-12-17

<160> 54

<170> PatentIn versión 3.3

25 <210> 1
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30 <400> 1

Asp Ala Glu Phe Arg Cys
1 5

35 <210> 2
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

40 <400> 2

45 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Cys
1 5

50

55

60

65

ES 2 474 173 T3

<210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

 <400> 3

 10 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Cys
 1 5 10

 <210> 4
 <211> 13
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens

 <400> 4

 20 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val Cys
 1 5 10

 <210> 5
 <211> 10
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens

 <400> 5

 30 Asp Ala Glu Phe Arg Gly Ala Gly Ala Cys
 1 5 10

 <210> 6
 <211> 12
 <212> PRT
 35 <213> Homo sapiens

 <400> 6

 40 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Gly Ala Gly Ala Cys
 1 5 10

 <210> 7
 <211> 14
 <212> PRT
 45 <213> Homo sapiens

 <400> 7

 50 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Gly Ala Gly Ala Cys
 1 5 10

 <210> 8
 <211> 17
 <212> PRT
 55

 60

 65

ES 2 474 173 T3

<213> Homo sapiens
 <400> 8

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

Cys

10 <210> 9
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9

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

20 <210> 10
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

25 Gly Ala Gly Ala
 1

30 <210> 11
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11

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

40 <210> 12
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<221> variación
 <222> (3)..(3)
 <223> /sustituir=fenilalanina/sustituir=ciclohexilalanina

45 <400> 12

50 Ala Lys Tyr Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala
 1 5 10

<210> 13

ES 2 474 173 T3

<211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 13

 Glu Lys Lys Ile Ala Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser Val Phe Asn Val
 1 5 10 15
 10
 <210> 14
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 14

 Phe Glu Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile
 1 5 10
 20
 <210> 15
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 15

 Asp Gln Ser Ile Gly Asp Leu Ile Ala Glu Ala Met Asp Lys Val Gly
 1 5 10 15
 30
 Asn Glu Gly
 35
 <210> 16
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 16

 Gln Val His Phe Gln Pro Leu Pro Pro Ala Val Val Lys Leu
 1 5 10
 45
 <210> 17
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 17

 Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu
 1 5 10 15
 55
 <210> 18
 60

ES 2 474 173 T3

<211> 21
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 18
 Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
 1 5 10 15
 Ala Ser His Leu Glu
 20
 <210> 19
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20
 <400> 19
 Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr
 1 5 10 15
 <210> 20
 <211> 51
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30
 <400> 20
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe
 1 5 10 15
 Ile Gly Ile Thr Glu Leu Cys Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp
 20 25 30
 Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Asp Ala Glu Phe
 35 40 45
 Arg His Asp
 50
 <210> 21
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 21
 55
 60

ES 2 474 173 T3

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15
 5
 Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 20 25 30
 10
 Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
 35 40
 <210> 22
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 22
 20
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe
 1 5 10 15
 25
 Ile Gly Ile Thr Glu Leu
 20
 <210> 23
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 23
 35
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp
 1 5 10 15
 40
 Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu
 20 25
 <210> 24
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 24
 50
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe
 1 5 10 15
 55
 Ile Gly Ile Thr Glu Leu Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu
 20 25 30
 60
 Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu
 35 40
 65

5 <210> 25
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 25

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

15

Ile Gly Ile Thr Glu Leu
 20

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

25 <220>
 <221> variación
 <222> (3)..(3)
 <223> /sustituir=fenilalanina/sustituir=ciclohexilalanina

30 <400> 26

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

35

Phe Arg His Asp
 20

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

45 <220>
 <221> variación
 <222> (3)..(3)
 <223> /sustituir=fenilalanina/sustituir=ciclohexilalanina

50 <400> 27

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

55

Glu Phe Arg His Asp Ala Lys Tyr Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala
 20 25 30

60

Ala Ala

65 <210> 28
 <211> 34
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

5 <221> variación

<222> (3)..(3)

<223> /sustituir=fenilalanina/sustituir=ciclohexilalanina

<400> 28

10

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

15

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

20

25

30

20

His Asp

<210> 29

25

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

30 <221> variación

<222> (3)..(3)

<223> /sustituir=fenilalanina/sustituir=ciclohexilalanina

<400> 29

35

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

40

Lys Ala Ala Ala
20

<210> 30

45

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

50

<400> 30

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

55

Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg
20

60

<210> 31

<211> 24

<212> PRT

65

ES 2 474 173 T3

<213> Homo sapiens

5 <400> 31

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

10 Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg
 20

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

15 <400> 32

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

25 Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg
 20

<210> 33
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <400> 33

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

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

His Asp

45 <210> 34
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

50 <400> 34

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

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

60 <210> 35
 <211> 34

65

ES 2 474 173 T3

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 35

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

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

15 Ala Thr

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

20 <400> 36

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

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

30 <210> 37
 <211> 79
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35 <400> 37

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

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

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

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

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

<210> 38
 <211> 58
 <212> PRT

60

65

ES 2 474 173 T3

<213> Homo sapiens

5 <400> 38

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

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

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

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

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

25 <400> 39

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

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

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

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

40 <400> 40

45

50

55

60

65

ES 2 474 173 T3

Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu Asn
 1 5 10 15
 5 Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln
 20 25 30
 10 Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp
 35 40 45
 15 Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly
 50 55 60
 20 Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val
 65 70 75 80
 25 Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val
 85 90 95
 30 Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu
 100 105 110
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

ES 2 474 173 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro Val
260 265 270

35 Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln Val
275 280 285

40 Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala Leu
290 295 300

Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly Ala
305 310 315 320

45 Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser
325 330 335

50 Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp
340 345 350

55

60

65

ES 2 474 173 T3

Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu Phe
 355 360 365
 5 Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly His
 370 375 380
 10 Lys Thr Gln Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val Ser Trp Asn Thr
 385 390 395 400
 Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg Thr Gly Phe Gln Gly Glu Ser Gly His
 405 410 415
 15 Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu Asn Thr Pro Leu Pro Ile Ala Gly Val
 420 425 430
 20 Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr
 435 440 445
 His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile
 450 455 460
 25 Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro Lys Ser Pro Val Tyr Val Gly
 465 470 475 480
 30 Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val Ala Phe His Arg Ser Ser Ser
 485 490 495
 Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu
 500 505 510
 35 Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His Thr Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser
 515 520 525
 40 Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser
 530 535
 <210> 41
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 41
 50 Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly
 1 5 10 15
 Arg

ES 2 474 173 T3

5 <210> 42
<211> 42
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 42

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

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

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

20 <210> 43
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> A-beta 18-25 + C

<400> 43

30 Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Cys
1 5

35 <210> 44
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> A-beta 17-24 + C

<400> 44

45 Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Cys
1 5

50 <210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

55 <220>
<223> A-beta 16-23 + C

<400> 45

60 Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Cys

65

ES 2 474 173 T3

1 5

5

<210> 46
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

10

<220>
<223> A-beta 18-25 + C

<400> 46

15

Cys Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly
1 5

20

<210> 47
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

25

<220>
<223> C + A-beta 18-25

<400> 47

30

Cys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val
1 5

35

<210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

40

<220>
<223> C + A-beta 16-23

<400> 48

45

Cys Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp
1 5

<210> 49
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

50

<220>
<223> A-beta 18-24 + C

<400> 49

55

Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Cys
1 5

60

65

5
 <210> 50
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> A-beta 17-23 + C

10
 <400> 50

15
 Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Cys
 1 5

20
 <210> 51
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

25
 <220>
 <223> A-beta 16-22 + C

30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)...(8)
 <223> CRM 197 añadido por medio de cisteína terminal

<400> 51

35
 Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Cys
 1 5

40
 <210> 52
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

45
 <220>
 <223> C + A-beta 18-24

50
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)...(1)
 <223> CRM 197 añadido por medio de cisteína terminal N

<400> 52

55
 Cys Val Phe Phe Ala Glu Asp Val
 1 5

60
 <210> 53
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

65
 <220>
 <223> C + A-beta 17-23

<400> 53

5

Cys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp
1 5

10

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

15

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

20

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)...(1)
<223> CRM 197 añadido por medio de cisteína terminal N

25

<400> 54

30

Cys Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu
1 5

35

40

45

50

55

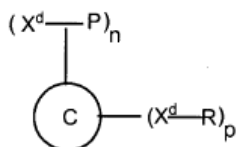
60

65

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado inmunógeno peptídico/transportador de proteína/polipéptido que tiene la fórmula:

5



10

donde

C es un transportador de proteína CRM₁₉₇/polipéptido,

X^d es un grupo funcional derivatizado de un residuo de aminoácido del transportador de proteína/polipéptido,

15

P es una molécula de inmunógeno peptídico de un fragmento de Aβ covalentemente unida al grupo funcional derivatizado del residuo de aminoácido del transportador de proteína/polipéptido, donde el fragmento de Aβ se selecciona del grupo consistente en residuos: 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-9, 1-10, 1-11, 1-12, 1-16, 1-28, 3-6, 3-7, 13-28, 15-24, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 25-35, 33-42, 35-40 y 35-42 de Aβ (SEQ ID NO: 21),

20

R es una molécula de restricción covalentemente unida a su grupo funcional derivatizado de un residuo de aminoácido del transportador de proteína/polipéptido, conservando así la funcionalidad del transportador de tal manera que retiene su habilidad para obtener las respuestas inmunes deseadas contra el inmunógeno peptídico que de otra manera se darían sin un transportador,

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

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

25

2. El conjugado de la reivindicación 1, donde el inmunógeno peptídico comprende además un residuo de cisteína terminal y el inmunógeno peptídico está covalentemente unido al grupo funcional derivatizado del residuo de aminoácido del transportador de proteína/polipéptido por medio del residuo de cisteína terminal.

30

3. El conjugado de la reivindicación 2, donde el residuo de cisteína terminal está situado en la terminal carboxi o la terminal amino del inmunógeno peptídico.

4. El conjugado de la reivindicación 3, donde el residuo de cisteína terminal está situado en el terminal carboxi del inmunógeno peptídico.

35

5. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el fragmento de Aβ comprende residuos 1-7 de Aβ (SEQ ID NO. 21).

40

6. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la molécula de restricción está formada por la reacción del conjugado con un reactivo de restricción seleccionado del grupo consistente en cisteamina, C-acetilcisteamina, etanolamina, amoniaco, bicarbonato de amonio, hidróxido de sodio y carbonato de sodio.

7. El conjugado de la reivindicación 5, donde el fragmento de Aβ es residuos 1-7 de Aβ (SEQ ID NO. 21).

45

8. El conjugado de la reivindicación 7, donde el inmunógeno peptídico es DAEFRHD-C (SEQ ID NO: 2).

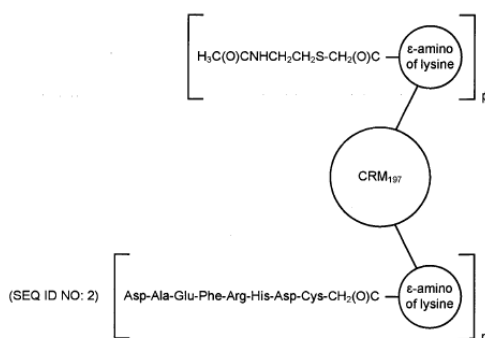
9. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde la molécula de restricción está formada por la reacción del conjugado con N-acetilcisteamina.

50

10. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde X^d es un grupo funcional derivatizado de un residuo de lisina.

11. El conjugado de la reivindicación 1 que tiene la fórmula:

55



60

65

12. El conjugado de la reivindicación 11, donde n es 12, 14 ó 15.

5 13. Una composición inmunogénica, que comprende un conjugado de un inmunógeno peptídico con un transportador de proteína/polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, junto con uno o más excipientes, diluyentes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables.

10 14. La composición inmunogénica de la reivindicación 13, donde uno o más adyuvantes se seleccionan del grupo consistente en GM-CSF, 529 SE, IL-12, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, *Mycobacterium tuberculosis*, *Bordetella pertussis*, lipopolisacáridos bacterianos, compuestos de fosfato de aminoalquil glucosamina, MPL™ (3-O-lípido A de monofosforil deacilado), un polipéptido, Quil A, STIMULON™ QS-21, una toxina de pertussis (TP), y toxina termolábil de E. coli (LT), IL-1 α, IL-1 β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, interferón-α, interferón-β, interferón-γ, G-CSF, TNF-α y TNF-β.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

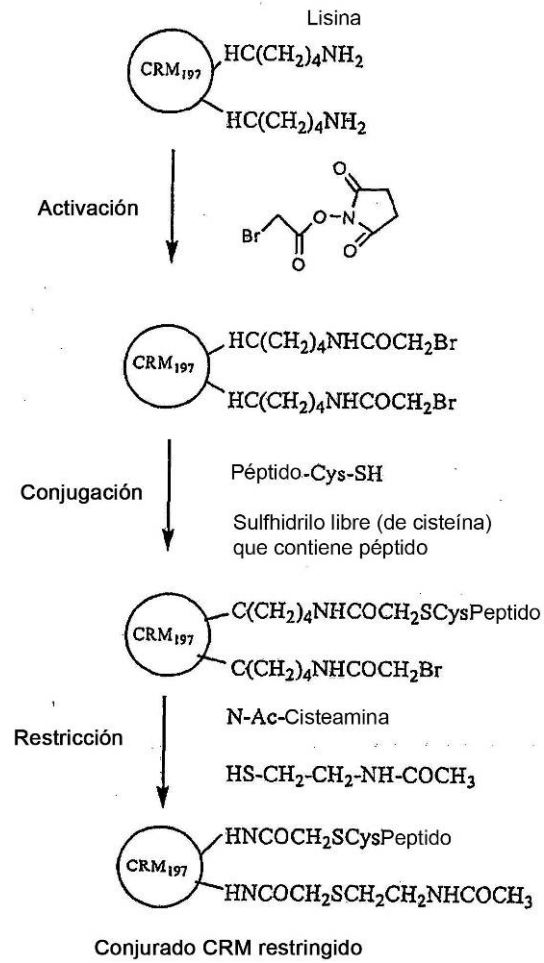


Figura 1

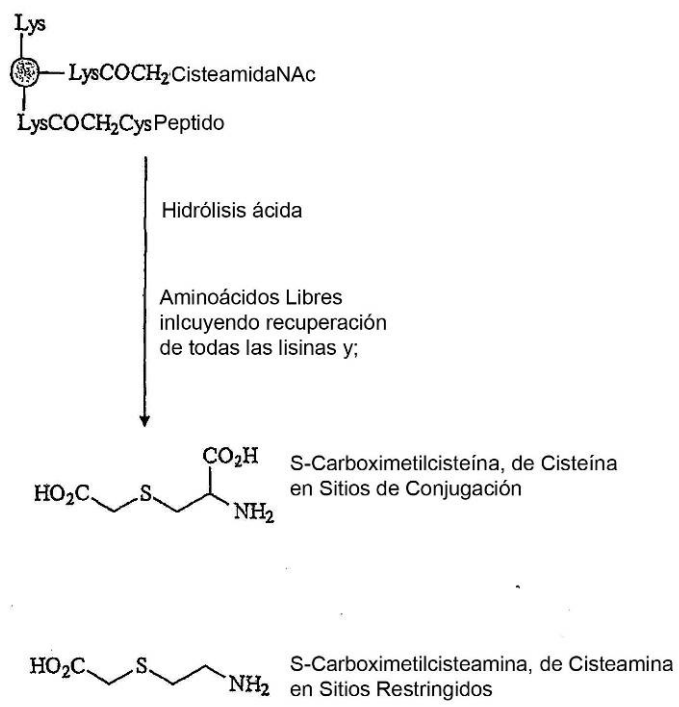


Figura 2

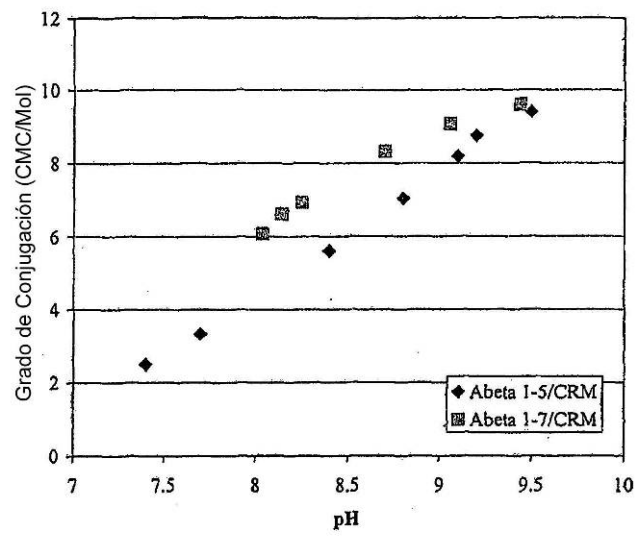


Figura 3

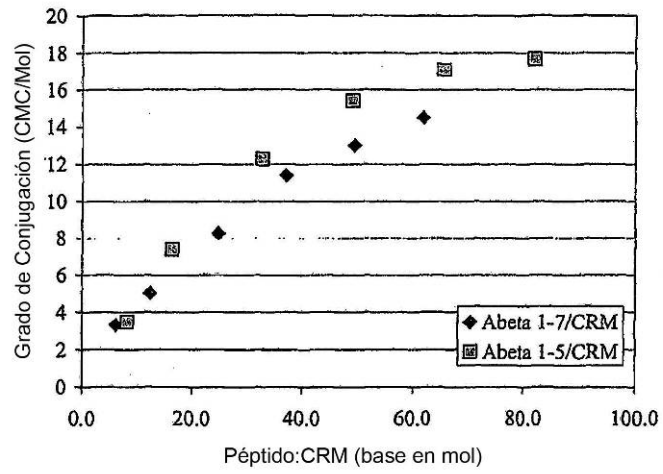


Figura 4

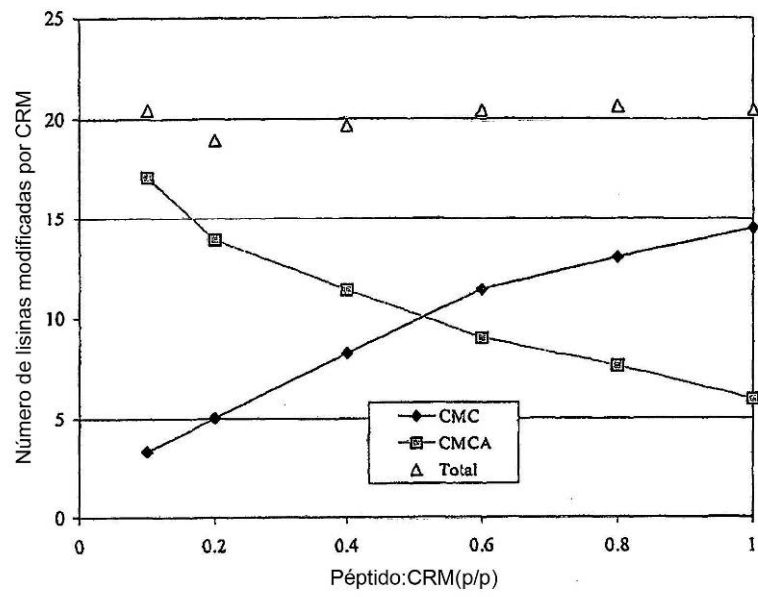


Figura 5

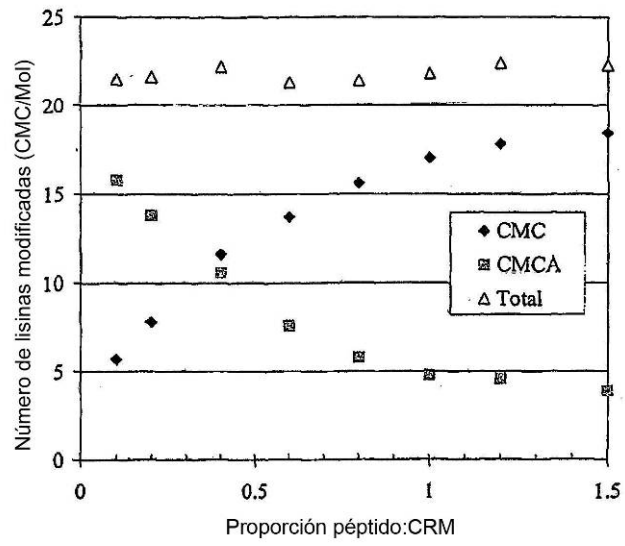


Figura 6

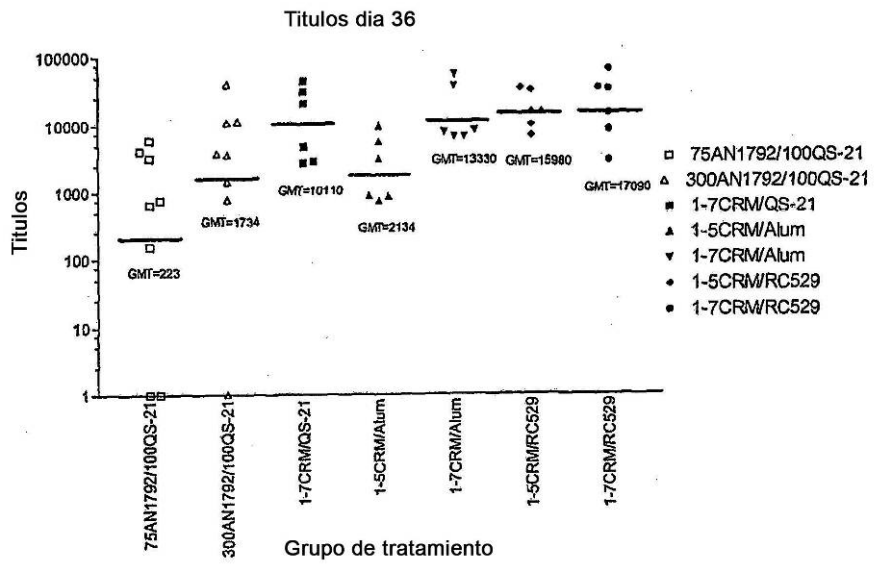


Figura 7

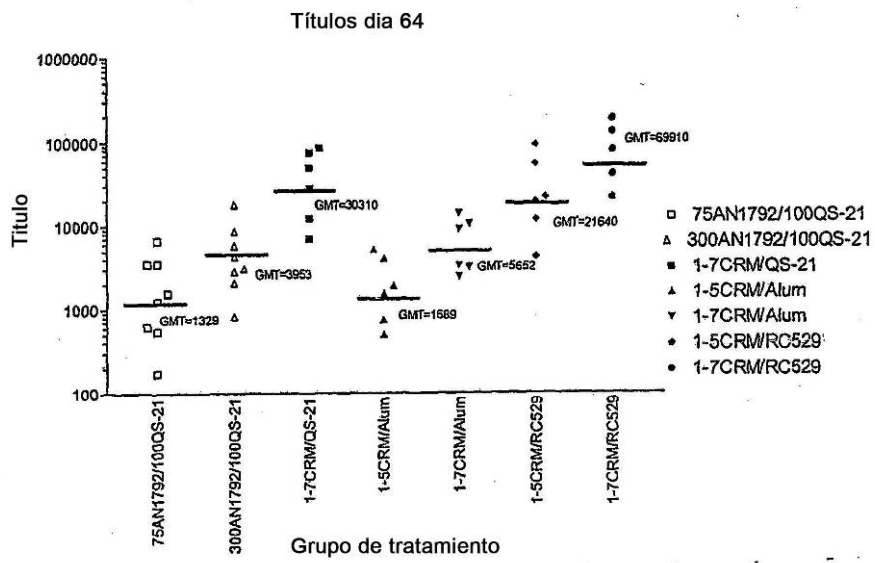


Figura 8

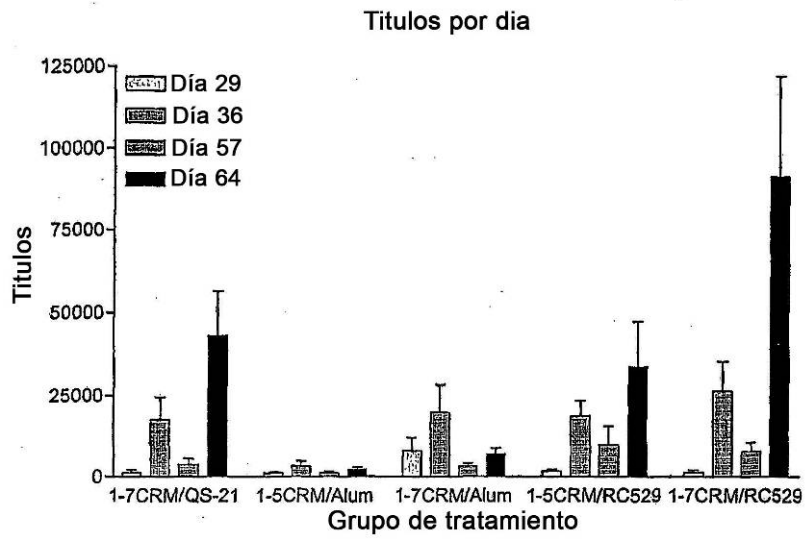


Figura 9

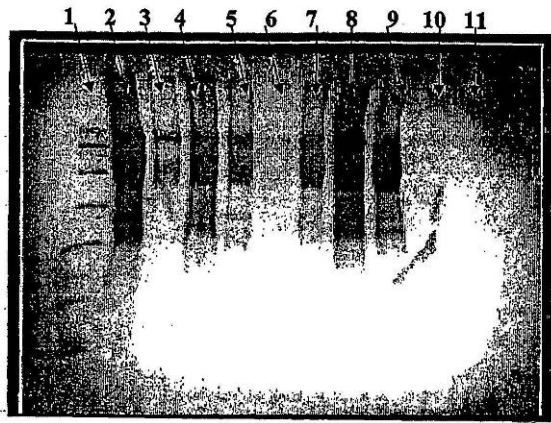


Figura 10