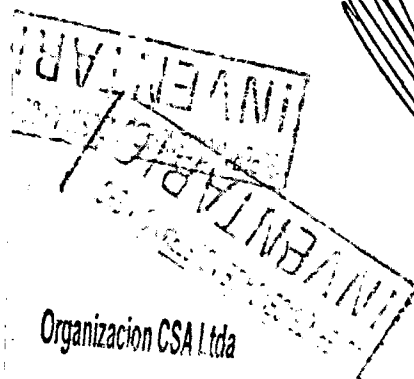


Industria y Comercio

INVERSIÓN

* 2 TRASPASOS
OK ✓



Inscrito el

P/ 31-05-12 VENCION

1/3

00-39177

1. EXPEDIENTE No.

4. TITULO

COMPOSICIONES FARMACEUTICAS PARA PREVENCION

TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES AMILOIDOGENICAS

1. CLASIFICACION INTERNACIONAL

A61K³⁹/395.

1. SOLICITANTE

NEUTRALAB LIMITED

DOMICILIO

Smiths F.A., Bermuda.

4. APODERADO

EMILIO FERRERO

Código NV. 1092

2. SANTAFE DE BOGOTA, D.C.

57

62

Industria y Comercio

* 2 TRASPASOS
OK ✓

Inscritoj el

P/

31-05-12

VENCION

Organizacion CSA Ltda

00-39177

1. EXPEDIENTE No.

4. TITULO

COMPOSICIONES FARMACEUTICAS PARA PREVENCION

TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES AMILOIDOGENICAS

1. CLASIFICACION INTERNACIONAL

A61K³⁹/395.

1. SOLICITANTE

NEUTRALAB LIMITED

DOMICILIO

Smiths F.A., Bermuda.

4. APODERADO

EMILIO FERRERO

Código NV. 1092

2. SANTAFE DE BOGOTA, D.C.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA



00 39177

DDI
DE
ON

Radicacion : 00039177 00000000

Fecha (AMD): 2000-05-26 16:51:23

Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

12 EVENTO: 01 ACTUACION: 01

DATOS DEL SOLICITANTE

NEURALAB LIMITED

(71) Nombres y Apellidos o Razón Social

No. de Identificación

Representante Legal (Persona Jurídica)

País de Domicilio

Bermuda

Departamento o Estado

Dirección

102 St. James Court, Flatts,

Ciudad

Smiths FL04,

(74) DATOS DEL APODERADO

Nombre

EMILIO FERRERO

Dirección y Domicilio

Carrera 4 No. 72-35 Piso 4o.

Ciudad

Bogotá, Colombia

DATOS DEL INVENTOR

(72) Nombre del Inventor (es)

1- Dale B. SCHENK
3- Nicki VASQUEZ

2- Frederique BARD
4- Ted YEDNOCK

Identificación

1- 1542 Los Altos Drive, Burlingame, CA 94010, Estados Unidos.
2- 1111 Park Pacifica Avenue, Pacifica, CA 94044, Estados Unidos.
3- 310 Sanchez Street, San Francisco, CA 94114, Estados Unidos.
4- 184 Arroyo Road, Forest Knolls, CA 94933, Estados Unidos.

Dirección

Ciudad

DATOS DE LA PATENTE DE INVENCIÓN

(54) Título de la Invención

COMPOSICIONES FARMACEUTICAS PARA PREVENCIÓN Y
TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES AMILOIDOGENICAS

PRIORIDAD REIVINDICADA SI ☒ NO ☐ TIPO DE PRIORIDAD ANDINA ☐ UNIONISTA ☒

(33) País

Fecha

No. Solicitud

-US.

28 de Mayo de 1999

09/322.289

Convención de París

Para Publicar a los ☐ 6 meses ☐ 12 meses ☒ 18 meses a partir de la fecha de la presente solicitud
Colo: 12184-801-001-7
MLR/mrm-Id-2

(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL

A67K 03

RESUMEN CON EL OBJETO Y LA FINALIDAD DE LA INVENCION

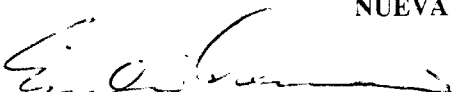
La presente invención provee agentes mejorados y métodos para el tratamiento de enfermedades que están asociadas con depósitos amiloides de A β en el cerebro de un paciente. Dichos métodos comprenden administrar agentes que inducen una respuesta inmunogénica beneficiosa contra el depósito amiloide. Los métodos se usan para tratamiento profiláctico y terapéutico de la enfermedad de Alzheimer. Los agentes preferidos incluyen fragmentos N-terminales de A β y anticuerpos que se adhieren a los mismos.

ANEXOS DE LA SOLICITUD

- | | |
|--|-------------------------------------|
| Certificado de Existencia y Representación Legal cuando el solicitante sea Persona Jurídica | ☐ |
| Los poderes debidamente otorgados, o mención de su protocolización ante la SIC | ☐ |
| Recibo de la tasa respectiva <i>por un valor de \$ 608.000.</i> | ☒ |
| Recibo de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación | ☐ |
| Si se reivindica prioridad Andina: | |
| Copia de la primera solicitud | ☐ |
| Traducción oficial | ☐ |
| Si se reivindica prioridad Unionista: | |
| Copia certificada de la primera solicitud: | ☐ |
| Nota: Debe presentarse dentro de los tres (3) meses, contados a partir de la fecha de radicación de la solicitud posterior | |
| Traducción simple | ☐ |
| Capítulo descriptivo | ☒ |
| Dibujos, planos necesarios | ☒ |
| Capítulo reivindicatorio | ☒ |
| Tarjeta archivo propietarios según formato | ☒ |
| Tarjeta archivo temático según formato | ☒ |
| Extracto para publicación según formato | ☒ |
| Arte final 12 x 12 cms Y 6x6 cms | ☐ |
| Otros Documentos | ☐ |

SOLICITO LA CONCESION DE LA PATENTE DE INVENCION Y DECLARO QUE LA INVENCION ES NUEVA Y DE MI PROPIEDAD

FIRMA



NOMBRE EMILIO FERRERO

CC. 438.019 de Usaquén

T.P.No. 31.929

**COMPOSICIONES FARMACEUTICAS PARA PREVENCIÓN Y
TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES AMILOIDOGÉNICAS**

CAMPO TÉCNICO

La invención se refiere a los campos técnicos de la inmunología y medicina

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La enfermedad de Alzheimer (AD) es una enfermedad progresiva que da como resultado demencia senil. Ver en general Selkoe, *TINS* 16, 403-409 (1993); Hardy et al., WO 92/13069; Selkoe, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 53, 438-447 (1994); Duff et al., *Nature* 373, 476-477 (1995); Games et al., *Nature* 373, 523 (1995). Hablando en términos generales, la enfermedad entra dentro de dos categorías: aparición tardía, que ocurre en edad avanzada (65 + años) y aparición precoz que se desarrolla mucho antes del período senil, es decir entre los 35 y 60 años. En ambos tipos de enfermedad, la patología es la misma, pero las anormalidades tienden a ser más graves y más amplias en los casos en que los que comienzan a una edad precoz. La enfermedad se caracteriza por al menos dos tipos de lesiones en el cerebro, placas seniles y enmarañamientos neurofibrilares. Las placas seniles son áreas de neurópilas desorganizadas a través de hasta 150 μ m con depósitos amiloides extracelulares en el centro visibles por análisis de microscopio de secciones del tejido cerebral. Los enmarañamientos neurofibrilares son depósitos intracelulares de microtúbulos asociados con proteína tau que consisten en dos filamentos retorcidos uno alrededor del otro en pares.

El constituyente principal de las placas es un péptido denominado A β o β -amiloide. El péptido A β es un fragmento interno de 39-43 aminoácidos de una proteína precursora denominada proteína precursora amiloide (APP). Varias mutaciones dentro de la proteína APP han sido correlacionadas con la presencia

de la enfermedad de Alzheimer. Ver, por ejemplo, Goate et al., *Nature* 349, 704) (1991) (valina⁷¹⁷ a isoleucina); Chartier Harlan et al. *Nature* 353, 844 (1991) (valina⁷¹⁷ a glicina); Murrell et al., *Science* 254, 97 (1991) (valina⁷¹⁷ a fenilalanina); Mullan et al., *Nature Genet.* 1, 345 (1992) (una doble mutación que cambia lisina⁵⁹⁵-metionina⁵⁹⁶-leucina⁵⁹⁶). Se cree que dichas mutaciones causan la enfermedad de Alzheimer al incrementar o alterar el procesamiento de APP a A β , particularmente el procesamiento de APP hasta cantidades crecientes de la forma larga de A β -42 y A β -43). Se cree que las mutaciones en otros genes, tales como los genes de presenilina, PS1 y PS2, afectan indirectamente el procesamiento de APP para generar cantidades crecientes de la forma larga de A β (ver Hardy, *TINS* 20, 154 (1997)). Estas observaciones indican que A β , y particularmente su forma larga es el elemento causante de la enfermedad de Alzheimer.

McMichael, en la patente Europea 526.511 propone la administración de dosis homeopáticas (inferiores a o iguales a 10^{-2} mg/día) de A β a pacientes con AD preestablecido. En un ser humano típico con aproximadamente 5 litros de plasma, incluso el límite más alto de esta dosis, se supone que generaría una concentración de no más de 2 pg/ml. Las concentraciones normales de A β en el plasma humano están situadas típicamente dentro del rango de 50-200 pg/ml (Seubert et al., *Nature* 325-327 (1992)). Debido a que la dosis propuesta en la patente europea 526.511 escasamente alteraría el nivel de A β endógeno circulante y debido a que la patente europea 526.511 no recomienda el uso de un coadyuvante como inmunoestimulante, parece poco posible que pudiera obtenerse ningún beneficio terapéutico.

En contraste, la presente invención está dirigida entre otras cosas al tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y a otras enfermedades amoloidogénicas mediante la administración de fragmentos de A β o anticuerpos para algunos epitopos dentro de A β a un paciente bajo condiciones que generan

una respuesta inmunitaria beneficiosa en el paciente. La invención viene por lo tanto a llenar una necesidad de larga data para regímenes terapéuticos que eviten o mejoren la neuropatología y, en algunos pacientes, el deterioro cognitivo asociado con la enfermedad de Alzheimer.

Esta solicitud está relacionada con WO99/27944, presentada el 30 de noviembre de 1998, la solicitud de patente norteamericana 60/067.740, presentada el 2 de diciembre de 1997, la solicitud de patente norteamericana 60/080.970, presentada el 7 de abril de 1998, y la solicitud de patente norteamericana 09/201.430, presentada el 30 de noviembre de 1998, cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia en su totalidad para cualquier propósito.

COMPENDIO DE LA INVENCION REIVINDICADA

En un aspecto la invención provee métodos para evitar o para tratar una enfermedad asociada con depósitos amiloides de A β en el cerebro de un paciente. Dichas enfermedades incluyen la enfermedad de Alzheimer, el síndrome de Down y el deterioro cognitivo. Esto último puede ocurrir con o sin otras características de una enfermedad amiloidogénica. Algunos métodos de la invención comprenden administrar una dosis eficaz de un anticuerpo que se adhiere específicamente a un componente de un depósito amiloide en el paciente. Dichos métodos son particularmente útiles para evitar o para tratar la enfermedad de Alzheimer en pacientes humanos. Algunos métodos comprenden administrar una dosis eficaz de un anticuerpo que se adhiere a A β . Algunos métodos comprenden administrar una dosis eficaz de un anticuerpo que se adhiere específicamente a un epitopo dentro de los residuos 1-10 de A β . En algunos métodos, el anticuerpo se adhiere específicamente a un epitopo dentro de los residuos 1-6 de A β . En algunos métodos el anticuerpo se adhiere específicamente

a un epitopo dentro de los residuos 1-5 de A β . En algunos métodos, el anticuerpo se adhiere específicamente a un epitopo dentro de los residuos 1-7 de A β . En algunos métodos, el anticuerpo se adhiere específicamente a un epitopo dentro de los residuos 3-7 de A β . En algunos métodos, el anticuerpo se adhiere específicamente a un epitopo dentro de los residuos 1-3 de A β . En algunos métodos, el anticuerpo se adhiere específicamente a un epitopo dentro de los residuos 1-4 de A β . En algunos métodos, el anticuerpo se adhiere específicamente a un epitopo que comprende un residuo N-terminal libre de A β . En algunos métodos, el anticuerpo se adhiere específicamente a un epitopo dentro de los residuos 1-10 de A β donde el residuo 1 y/o el residuo 7 de A β es ácido aspártico. En algunos métodos, el anticuerpo se adhiere específicamente al péptido A β sin adherirse a la proteína precursora amiloide de longitud total (APP). En algunos métodos, el isotipo del anticuerpo es IgG1 humano.

En algunos métodos, el anticuerpo se adhiere a un depósito amiloide en el paciente e induce una respuesta de evacuación contra el depósito amiloide. Por ejemplo, dicha respuesta de evacuación puede ser efectuada mediante fagocitosis intermediada por el receptor Fc.

Los métodos puede usarse tanto en pacientes asintomáticos como en los que muestran corrientemente síntomas de la enfermedad. El anticuerpo usado en dichos métodos puede ser un anticuerpo humano, humanizado, quimérico o no humano y puede ser monoclonal o policlonal. En algunos métodos el anticuerpo se prepara a partir de un ser humano inmunizado con el péptido A β , cuyo ser humano puede ser un paciente que debe ser tratado con anticuerpos.

En algunos métodos el anticuerpo se administra con un portador farmacéutico en forma de una composición farmacéutica. En algunos métodos el anticuerpo se administra en una dosis de por lo menos 1 mg/kg de anticuerpo por peso del cuerpo. En algunos métodos el anticuerpo se administra en dosis

múltiples en un período de por lo menos 6 meses. En algunos métodos el anticuerpo se administra como composición de liberación sostenida. El anticuerpo puede administrarse por ejemplo, intraperitonealmente, oralmente, subcutáneamente, intracranealmente, intramuscularmente, tópicamente o por vía intravenosa.

En algunos métodos el anticuerpo se administra, por medio de la administración de un polinucleótido que codifica por lo menos una cadena de anticuerpos para el paciente. El polinucleótido se expresa para producir la cadena de anticuerpos en el paciente. Opcionalmente, el polinucleótido codifica cadenas pesadas y livianas del anticuerpo. El polinucleótido se expresa para producir las cadenas pesadas y livianas en el paciente. En algunos métodos el paciente es monitoreado para determinar el nivel de anticuerpo administrado en la sangre del paciente.

En otro aspecto, la invención provee métodos para evitar o para tratar una enfermedad que está asociada con depósitos amiloides de $A\beta$ en el cerebro de un paciente. Por ejemplo, pueden usarse métodos para tratar la enfermedad de Alzheimer o en Síndrome de Down o el deterioro cognitivo. Dichos métodos abarcan administrar fragmentos de $A\beta$ o análogos de los mismos que desarrollan una respuesta inmunogénica contra ciertos epitopos dentro de $A\beta$. Algunos métodos comprenden administrar a un paciente la dosis eficaz de un polinucleótido que comprende un segmento N-terminal de por lo menos los residuos 1-5 de $A\beta$, siendo el primer residuo de $A\beta$ el residuo N-terminal del polipéptido, donde el polipéptido está libre de un segmento C-terminal de $A\beta$. Algunos métodos comprenden administrar a un paciente una dosis eficaz de un polipéptido que comprende un segmento N-terminal de $A\beta$, comenzando dicho segmento en el residuo 1-3 de $A\beta$ y terminando en los residuos 7-11 de $A\beta$. Algunos métodos comprenden administrar a un paciente una dosis eficaz de un

agente que induce una respuesta inmunogénica contra un segmento N-terminal de A β , comenzando dicho segmento en el residuo 1-3 de A β y terminando en los residuos 7-11 de A β sin inducir una respuesta inmunogénica contra un epitopo dentro de los residuos 12-43 de A β 43.

En algunos de los métodos precedentes, el segmento N-terminal de A β está ligado en su C-término a un polipéptido heterólogo. En algunos de los métodos precedentes, el segmento N-terminal de A β está ligado en su N-término con un polipéptido heterólogo. En algunos de los métodos precedentes, el segmento N-terminal de A β está ligado en sus términos N y C a un primer y segundo polipéptidos heterólogos. En algunos de los métodos anteriores, el segmento N-terminal de A β está ligado en su N-término a un polipéptido heterólogo, y en su C-término a por lo menos una copia adicional del segmento N-terminal.

En algunos de los métodos precedentes, el polipéptido heterólogo, por lo tanto la respuesta de la célula A β contra el segmento N-terminal. En algunos de los métodos anteriores, el polipéptido comprenden además por lo menos una copia adicional del segmento N-terminal. En algunos de los métodos anteriores el polipéptido comprende desde el N-término al C-término, el segmento N-terminal de A β , una pluralidad de copias adicionales del segmento N-terminal, y el segmento aminoácido heterólogo. En algunos de los métodos anteriores, el segmento N-terminal consiste en A β 1-7. En algunos de los métodos anteriores el segmento N-terminal consiste en A β 3-7.

En algunos métodos, el segmento está libre de por lo menos 5 aminoácidos C-terminales en A β 43. En algunos métodos el fragmento comprende hasta 120 aminoácidos contiguos de A β . Los fragmentos se administran típicamente a razón de más de 10 microgramos por dosis por paciente.

En algunos métodos, el fragmento se administra con un coadyuvante que mejora la respuesta de inmunidad para el péptido A β . El coadyuvante y el fragmento pueden ser administrados en cualquier orden o conjuntamente como una composición. El coadyuvante puede ser por ejemplo, alumbre, MPL, QS-21 o un coadyuvante incompleto de Freund.

La invención provee además composiciones farmacéuticas que contienen fragmentos de A β o de otros agentes que producen una respuesta inmunogénica para los mismos epitopos de A β tal como se describió más arriba y un coadyuvante. La invención provee también composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden cualquiera de los anticuerpos descritos más arriba y un portador farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la invención provee métodos para rastrear un anticuerpo con el fin de determinar la actividad para tratar una enfermedad asociada con depósitos de A β en el cerebro de un paciente (por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer). Dichos métodos comprenden poner en contacto el anticuerpo con un polipéptido que comprende por lo menos cinco aminoácidos contiguos de un segmento N-terminal de A β que se inicia en un residuo entre 1 y 3 de A β , estando el polipéptido libre de un segmento C-terminal de A β . Luego se determina si el anticuerpo se adhiere específicamente al polipéptido, proporcionando dicha adhesión específica una indicación de que el anticuerpo tiene actividad para tratar la enfermedad.

En otro aspecto, la invención provee métodos para rastrear un anticuerpo con el fin de determinar su actividad para evacuar una entidad biológica asociada con el antígeno. Dichos métodos comprenden combinar la entidad biológica asociada con el antígeno, y el anticuerpo y las células fagocíticas, portadoras de los receptores FC en un medio. La cantidad de entidad biológica asociada con el antígeno que permanece en el medio es luego monitoreada. Una reducción de la

cantidad de la entidad biológica asociada con el antígeno indica que el anticuerpo tiene actividad de evacuación contra la entidad biológica asociada con el antígeno. El antígeno puede proveerse en forma de una muestra de tejido o en forma aislada. Por ejemplo, el antígeno puede proveerse en forma de una muestra de tejido del cerebro de un paciente que sufre de la enfermedad de Alzheimer o de un animal mamífero que tiene patología Alzheimer. Otras muestras de tejido contra las cuales pueden ensayarse los anticuerpos para determinar la actividad de evacuación incluyen muestras de tejidos canceroso, muestras de tejido finalmente infectados, muestras de tejidos que comprenden células inflamatorias, crecimientos de células no malignas anormales, o muestras de tejidos que comprenden una matriz extracelular anormal.

En otro aspecto, la invención provee métodos para detectar un depósito amiloide en un paciente. Dicho método comprende administrar al paciente un anticuerpo que se adhiere específicamente a un epitopo dentro de los aminoácidos 1-10 de $A\beta$ y detecta la presencia del anticuerpo en el cerebro del paciente. En algunos métodos, el anticuerpo se adhiere a un epitopo dentro de los residuos 4-10 de $A\beta$. En algunos métodos, el anticuerpo está rotulado con un rótulo paramagnético y es detectado con tomografía de resonancia magnética nuclear.

La invención provee además equipos de diagnóstico que son apropiados para ser usados en los métodos precedentes. Dichos equipos comprenden un anticuerpo que se adhiere específicamente a un epitopo con los residuos 1-10 de $A\beta$. Algunos equipos son portadores de un rótulo que describe el uso de un anticuerpo para el diagnóstico in vivo o para monitorear la enfermedad de Alzheimer.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1: Título del anticuerpo después de inyección de ratones transgénicos con A β 1-42.

Figura 2: Carga amiloide en el hipocampo. El porcentaje del área de la región hipocampal ocupada por las placas amiloides, definido por la reactividad con el anticuerpo monoclonal 3D6 específico para A β , fue determinado mediante análisis de imágenes cuantitativas asistido por computadora de las secciones de cerebro inmunorreaccionadas. Los valores para ratones individuales se muestran seguidos del grupo de tratamiento. La línea horizontal para cada agrupación indica el valor medio de la distribución.

Figura 3: distrofia neurítica en el hipocampo. El porcentaje del área de la región del hipocampo ocupada por neuritas distróficas, definido por su reactividad con el APP-específico monoclonal 8E5 humano, se determinó por análisis de imagen cuantitativa asistida por computadora de las secciones de cerebro inmunorreaccionada. Los valores par ratones individuales se muestran para el grupo tratado con AN1792 t para el grupo de control tratado con PBS. La línea horizontal para cada agrupación indica el valor medio de la distribución.

Figura 4: Astrocitosis en la corteza retrosplenial. El porcentaje del área de la región cortical ocupada por la proteína ácida fibrilar glial (GFAP)-positiva a los astrocitos se determinó por análisis de imagen cuantitativa asistida por computadora de secciones de cerebro inmunorreaccionadas. Los valores para ratones individuales se muestran extraídos del grupo de tratamiento los valores medios del grupo se indican por líneas horizontales.

Figura 5: Títulos de anticuerpo de promedio geométrico de A β 1-42 después de la inmunización con un rango de 8 dosis de AN1792 que contiene 0,14, 0,4, 1,2, 3,7, 11, 33, 100, o 300 μ g.

Figura 6: Cinética de la respuesta de los anticuerpos a la inmunización con AN1792. Los títulos se expresan como media geométrica de valores para los seis animales de cada grupo.

Figura 7: Análisis de imagen cuantitativa de la carga amiloide cortical en ratones tratados con PBS- y AN1792.

Figura 8: Análisis de imagen cuantitativa de la carga de placas neuríticas en ratones tratados con PBS- y AN1792.

Figura 9: Análisis de imagen cuantitativa del porcentaje de corteza retrosplenial ocupada por astrocitosis en ratones tratados con PBS- y AN1792.

Figura 10: Ensayo de proliferación de linfocitos en células del bazo de ratones tratados con AN1792 (panel superior) o tratados con PBS (panel inferior).

Figura 11: Niveles totales de A β en la corteza. Un gráfico de los perfiles individuales de A β en ratones inmunizados con derivados A β o APP combinados con coadyuvante de Freund.

Figura 12: La carga amiloide en la corteza se determinó mediante análisis de imagen cuantitativa de secciones inmunorreaccionadas del cerebro para ratones inmunizados con los conjugados peptídicos A β , A β 1-5, A β 1-12, y A β 13-28; los agregados A β de longitud total AN1792 (A β 1-42) y AN1528 (A β 1-40) y el grupo de control tratado con PBS.

Figura 13: Títulos medios geométricos de anticuerpos específicos A β para grupos de ratones inmunizados A β o APP combinados con coadyuvante de Freund.

Figura 14: Títulos medios geométricos de anticuerpos específicos A β para grupos de cobayos inmunizados con AN1792 o con un derivado palmitoilado del mismo, combinado con varios coadyuvantes.

Figura 15: Niveles de A β en la corteza de ratones PDAPP de doce meses de vida tratados con AN1792 o AN1528 con coadyuvantes.

Figura 16: Título medio de ratones tratados con anticuerpos policlona para A β .

Figura 17: Título medio de ratones tratados con anticuerpo monoclonal 10D5 a A β .

Figura 18: Título medio de ratones tratados con anticuerpo monoclonal 2F12 a A β .

DEFINICIONES

El término "identidad sustancia" se refiere al hecho de que dos secuencias peptídicas, cuando están óptimamente alineadas, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando pesos de por default GAP comparten por lo menos 65 porciento de identidad de secuencia preferiblemente por lo menos 80 o 90 porciento de identidad de secuencia, más preferiblemente por lo menos 95 porciento de identidad de secuencia o más (por ejemplo, 99 porciento de identidad de secuencia o más). Preferiblemente las posiciones de los residuos que no son idénticas difieren por las sustituciones de aminoácidos conservativas.

Para comparaciones de secuencias típicamente una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la cual se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de referencia y ensayo se ingresan en una computadora, se designan las coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmos de secuencia. El algoritmo de comparación de secuencias calcula luego la identidad porcentual de secuencia para las secuencias de ensayo relativas a la secuencia de referencia en base a los parámetros designados para el programa.

La alineación óptima de secuencias para comparación puede llevarse a cabo por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith &

Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman / Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), mediante la búsqueda por el método de similaridad de Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) o por inspección visual (*ver en general Ausubel et al, supra*). Un ejemplo de algoritmo que es apropiado para determinar la identidad de secuencia porcentual y la similaridad de secuencia es el algoritmo BLAST, que ha sido descrito en Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 215:403-410 (1990). El software para llevar a cabo los análisis BLAST está públicamente disponible a través de National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Típicamente, pueden usarse programas de default para llevar a cabo la comparación de secuencia, aunque también pueden usarse parámetros hechos a medida. Para secuencias de aminoácido, el programa BLAST usa como default una longitud de palabras (W) de 3, una expectación (C) de 10 y una matriz de marcado BLOSUM62 (*ver Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10195 (1989)).

Con el propósito de clasificar las sustituciones de aminoácidos como conservativas o no conservativas, los aminoácidos se agruparon de las maneras siguientes: Grupo I (cadenas laterales hidrofóbicas): norleucina, met, ala, val, leu, ile; Grupo II (cadenas laterales hidrofílicas neutras): cis, ser, tre; Grupo III (cadenas laterales acídicas): asp, glu; Grupo IV (cadenas laterales básicas): asn, gln, his, lys, arg; Grupo V (residuos que influyen la orientación de cadena): gly, pro; y Grupo VI (cadenas laterales aromáticas): tro, tir, fen. Las sustituciones conservativas involucran sustituciones entre aminoácidos en la misma clase. Las sustituciones no conservativas constituyen un intercambio de miembros de una de estas clases por un miembro de otra.

Los agentes terapéuticos de la invención son típicamente sustancialmente puros libres de cualquier contaminante indeseable. Esto significa que un agente es típicamente aproximadamente de una pureza de 50% p/p (peso/peso), al mismo tiempo que está sustancialmente libre de proteínas y contaminantes interferentes. Algunos de los agentes son de por lo menos una pureza del 80 % p/p y aun más preferiblemente de por lo menos 90 o aproximadamente 95 % p/p de pureza. Sin embargo, usando técnicas convencionales de purificación de proteínas, pueden obtenerse péptidos homogéneos de por lo menos 90 % p/p.

Adhesión específica entre dos entidades representa una afinidad de por lo menos 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 M^{-1} , o 10^{10} M^{-1} . Se prefieren afinidades superiores a 10^8 M^{-1} .

El término "anticuerpo" o "inmunoglobulinas" se usa para incluir anticuerpos intactos y los fragmentos de adhesión de los mismos. Típicamente los fragmentos compiten con el anticuerpo intacto del cual derivan para la adhesión específica a fragmentos antigénicos para cadenas pesadas separadas, cadenas livianas Fab, Fab' F(ab')₂, Fabc, y Fv. Los fragmentos se producen mediante técnicas de ADN recombinante o mediante separación enzimática o química de inmunoglobulinas intactas. El término "anticuerpo" incluye también una o más cadenas de inmunoglobulina que están químicamente conjugadas o que son expresadas como proteínas de fusión con otras proteínas. El término "anticuerpo" incluye también anticuerpos biespecíficos. Un anticuerpo biespecífico o bifuncional en un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares diferentes de cadena pesada/liviana y dos sitios de adhesión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos pueden producirse mediante una variedad de métodos que incluyen la fusión de hibridomas o la adhesión de fragmentos Fab'. Ver por ejemplo, Songsivilai / Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321 (1990); Kostelny et al., *J. Immunol.* 148, 1547-1553 (1992).

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

Un "antígeno" es una entidad a la cual se adhiere específicamente un anticuerpo.

El término "epitopo" o "determinante antigénico" se refiere a un sitio en un antígeno al cual responden las células B y/o T. Los epitopos de la célula B pueden formarse ambos a partir de aminoácidos contiguos o aminoácidos no contiguos, yuxtapuesto por plegado terciario de una proteína. Los epitopos formados a partir de aminoácidos contiguos son típicamente retenidos por exposición a solventes desnaturizantes mientras que los epitopos formados por plegado terciario se pierden típicamente en el tratamiento con solventes desnaturizantes. Un epitopo incluye típicamente por lo menos tres y más usualmente por lo menos 5 o 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos para determinar la conformación espacial de los epitopos incluyen por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Ver, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocols in Molecular Biology*, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996). Los anticuerpos que reconocen el mismo epitopo pueden identificarse en un inmunoensayo simple que muestra la capacidad de un anticuerpo para bloquear la afinidad de otro anticuerpo con un antígeno objetivo. Las células T reconocen los epitopos continuos de aproximadamente 9 aminoácidos para las células CD8o aproximadamente 13-15 aminoácidos para las células CD4. Las células T que

reconocen el epitopo pueden identificarse mediante ensayos in vitro que miden la proliferación que depende del antígeno, determinada por incorporación de 3H-timidina por medio de células T cebadas en respuesta a un epitopo (Burke et al., *J. Inf. Dis.* 170, 1110-19 (1994)), mediante muerte que depende del antígeno (ensayo de linfocitos T citotóxicos, Tigges et al., *J. Immunol.* 156, 3901-3910) o por secreción de citoquinas.

El término "respuesta inmunológica" o "inmune", representa el desarrollo de una respuesta humoral beneficiosa (intermediada por anticuerpo) y/o celular (intermediadas por células T específicas de antígeno o sus productos de secreción), dirigida contra un péptido amiloide en un paciente receptor. Dicha respuesta puede ser una respuesta activa inducida por la administración de un inmunógeno o una respuesta pasiva inducida por la administración del anticuerpo o las células cebadas T. Se obtiene una respuesta inmunitaria celular mediante la presentación de los epitopos polipéptídicos en asociación con las moléculas MHC de clase 1 o clase 2 para activar las células auxiliares T CD4⁺ específicas de antígeno y/o las células T citotóxicas CD8⁺. La respuesta puede involucrar también la activación de monocitos, macrófagos, células NK, basófilos, células dendríticas, astrocitos, células microgliales, eosinófilos u otros componentes de inmunidad innata. La presencia de una respuesta inmunológica intermediada por células puede determinarse por ensayos de proliferación (células CD4⁺ T) o ensayos de CTL (linfocito T citotóxico) (ver Burke, *supra*; Tigges, *supra*). Las contribuciones relativas de las respuestas humorales y celulares para el efecto terapéutico o protector de un inmunógeno pueden distinguirse por anticuerpos aislados por separado y por las células T de un animal singénico inmunizado y midiendo el efecto protector o terapéutico en un segundo sujeto.

Un "agente inmunogénico" o "inmunógeno" es capaz de inducir una respuesta inmunológica contra sí mismo mediante administración a un mamífero, opcionalmente conjuntamente con un coadyuvante.

El término "polinucleótido desnudo" se refiere a un polinucleótido que no forma complejo con materiales coloidales. Los polinucleótidos desnudos algunas veces están clonados en un vector plásmido.

El término "coadyuvante" se refiere a un compuesto que cuando es administrado conjuntamente con un antígeno aumenta la respuesta de inmunidad para el antígeno, pero que cuando es administrado solo no genera una respuesta inmunitaria para el antígeno. Los coadyuvantes pueden aumentar una respuesta inmunitaria mediante varios mecanismos que incluyen reclutamiento de linfocitos estimulación de células B y/o T y estimulación de macrófagos.

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

A β desagregado o monomérico significa unidades peptídicas solubles monoméricas de A β . Un método para preparar A β monomérico consiste en disolver el péptido liofilizado en DMSO neto con sonicación. La solución resultante se centrifuga para eliminar cualquier partícula insoluble. A β agregado es una mezcla de oligómeros en los cuales las unidades monoméricas se mantienen juntas por enlaces no covalentes.

La competición entre los anticuerpos se determina mediante un ensayo en el cual la inmunoglobulina bajo ensayo inhibe la adhesión específica de un anticuerpo de referencia para un antígeno común tal como A β . Se conocen numerosos tipos de ensayos de adhesión competitivos por ejemplo: radioinmunoensayo directo o indirecto de fase sólida (RIA), inmunoensayo de enzima directa o indirecta de fase sólida (EIA), ensayo de competición sándwich (ver Stahli et al., Methods in Enzymology 9:242-253 (1983)); EIA de biotina-

avidina directo de fase sólida (ver Kirkland et al. (1986)); ensayo rotulado directo de fase sólida, ensa de fase sólida (ver Harlow y Lane, "Antibodies, A Labor Harbor Press (1988)); RIA de rótulo directo de fase sólida (ver Morel et al., Molec. Immunol. 25(1):7-15 (1988)); EIA de bió una directo de fase sólida (Cheung et al., Virology 176:546-552 (1990)); y RIA rotulado directo (Moldenhauer et al., Scand J. Immunol. 32:77-82 (1990)). Típicamente, dicho ensayo involucra el uso de antígeno purificado ligado a una superficie sólida o a células portadoras de las mismas, una inmunoglobulina de ensayo no rotulada y una inmunoglobulina de referencia rotulada. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de rótulo fijado a la superficie sólida o a las células en presencia de la inmunoglobulina de ensayo. Usualmente la inmunoglobulina de ensayo está presente en exceso. Los anticuerpos identificados para el ensayo competitivo (anticuerpos competitivos) incluyen anticuerpos que se adhieren al mismo epítipo como anticuerpo de referencia y anticuerpos que se adhieren a un epítipo adyacente suficientemente próximo al epítipo unido por el anticuerpo de referencia para que ocurra el impedimento estérico. Usualmente cuando está presente un anticuerpo competitivo en exceso, inhibirá la adhesión específica de un anticuerpo de referencia para un antígeno común en por lo menos un 50 o un 75%.

Las composiciones o métodos que "comprenden" uno o más de los elementos mencionados pueden incluir otros elementos que no han sido específicamente mencionados. Por ejemplo, una composición que comprende el péptido A β abarca tanto el péptido A β aislado como el péptido A β como componente de una secuencia polipéptídica más grande.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

I. General

Varias enfermedades y condiciones amiloidogénicas se caracterizan por la presencia de depósitos del péptido A β agregado a una masa insoluble en el cerebro de un paciente. Dichas enfermedades incluyen la enfermedad de Alzheimer, el Síndrome de Down y deterioro cognitivo. Este último es un síntoma de la enfermedad de Alzheimer y de Síndrome de Down pero puede carecer también de cualquier otra característica de cualquiera de estas enfermedades. Por ejemplo, el deterioro cognitivo liviano o pérdida de memoria asociada con la edad ocurre en algún paciente que no ha desarrollado todavía o que quizás nunca desarrollará una enfermedad completa de Alzheimer. Deterioro cognitivo liviano puede definirse por una graduación del Examen de Estado Mini-mental de acuerdo con la convención. Dichas enfermedades se caracterizan por agregados de A β que tiene una estructura de lámina β -plegada y que se tiñen con tinte de Rojo Kongo. La realización básica para evitar o para tratar la enfermedad de Alzheimer u otras enfermedades amiloidogénicas generando una respuesta inmunogénica para un componente del depósito amiloide en un paciente ha sido descrita en la WO 99/27944 (que se incorpora aquí como referencia). La presente solicitud reitera y confirma la eficacia de la realización básica. La presente solicitud está, sin embargo, principalmente dirigida a reactivos y métodos mejorados. Estas mejoras se basan en la premisa, en parte, de la localización efectuada por los presente inventores de los epitopos preferidos dentro de A β contra los cuales debe dirigirse una respuesta inmunogénica. La identificación de los epitopos preferidos dentro de A β da como resultado agentes y métodos que tienen eficacia incrementada, un potencial reducido para los efectos secundarios, y/o mayor facilidad de manufactura, formulación y administración.

II. Agentes Terapéuticos

Una respuesta inmunogénica puede ser activa tal como cuando se administra un inmunógeno para inducir anticuerpos reactivos con A β en un paciente o pasiva, tal como se administra un anticuerpo que por si mismo se adhiere a A β en un paciente.

1. Agentes que Inducen Respuesta de Inmunidad Activa

Los agentes terapéuticos inducen una respuesta inmunogénica específicamente dirigida contra ciertos epitopos dentro de los péptidos A β . Los agentes preferidos son los péptidos A β mismos y los segmentos de los mismos. Las variantes de dichos segmentos, los análogos y miméticos del péptido A β natural que inducen y/o tienen reacción cruzada con los anticuerpos para los epitopos preferidos del péptido A β también pueden utilizarse.

A β , conocido también como el péptido-amiloide, o el péptido A4 (ver patente norteamericana 4.668.829; 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 la enfermedad de Alzheimer. A β es generado por el procesamiento de la proteína APP más grande mediante dos enzimas denominadas secretasas β y γ (ver Hardy, TINS 20, 154 (1997)). Las mutaciones conocidas en APP que están asociadas con la enfermedad de Alzheimer ocurren próximas al sitio de las secretasas β o γ , o dentro de A β . Por ejemplo, la posición 717 está próxima al sitio de la disociación de la γ -secretasa de APP en su procesamiento para A β , y las posiciones 670/671 están próximas al sitio de la disociación de la β -secretasa. Se cree que las mutaciones causan la AD por la interacción con las reacciones de disociación por las cuales se forma A β para aumentar la cantidad de la forma de aminoácido 42-43 generada por A β .

A β tiene la inusual propiedad de que puede fijarse y activar tanto las cascadas complementarias clásicas como alternadas. En particular, se adhiere a C1q y finalmente a C3bi. Esta asociación facilita la adhesión a los macrófagos lo

cual conduce a la activación de las células B. Además, la C3bi se descompone adicionalmente y luego se adhiere a CR2 en las células B en una manera que depende de las células T lo cual conduce a un incremento de 10.000 en la activación de estas células. Este mecanismo causa que A β genere una respuesta de inmunidad en exceso de la de otros antígenos.

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

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

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

Los fragmentos inmunogénicos de A β son ventajosos en relación a la molécula intacta en los presentes métodos por varias razones. La primera es que debido a que únicamente ciertos epitopos dentro de A β inducen una respuesta inmunogénica útil para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, una dosis igual de masa de un fragmento que contiene dichos epitopos provee una concentración molar mayor de los epitopos inmunogénicos útiles que una dosis del A β intacto, algunos fragmentos inmunogénicos de A β generan una respuesta inmunogénica contra los depósitos amiloides, sin generar una respuesta inmunogénica significativa contra la proteína APP de la cual deriva A β . En tercer lugar los fragmentos de A β son más simples de manufacturar que el A β intacto debido a su tamaño más corto. En cuarto lugar, los fragmentos de A β no se

agregan de la misma manera que A β intacto, simplificando la preparación de las composiciones farmacéuticas y administración de las mismas.

Algunos fragmentos inmunogénicos de A β tienen una secuencias de por lo menos 2, 3, 5, 6, 10 o 20 aminoácidos contiguos de un péptido natural. Algunos fragmentos inmunogénicos no tienen más de 10, 7, 5 o 3 residuos contiguos de A β . Se prefieren los fragmentos de la mitad de N-terminal de A β . Los fragmentos inmunogénicos preferidos incluyen A β 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 3-7, y 1-4. Las designaciones A β 1-5 por ejemplo, indican un fragmento que incluye los residuos 1-5 de A β y carecen de otros residuos de A β . Los fragmentos que comienzan en los residuos 1-3 de A β y que finalizan en los residuos 7-11 de A β son particularmente preferidos. El fragmento 1-12 puede usarse también pero es menos preferido. Otros fragmentos preferidos incluyen A β 13-28, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40 y 35-42. Estos fragmentos requieren rastrear para determinar la actividad en la evacuación y prevención de depósitos amiloides tal como se describió en los ejemplos antes del uso. Los fragmentos que carecen de por lo menos uno y algunas veces por lo menos 5 o 10 aminoácidos C-terminales presentes en una forma natural de A β se usan también en algunos métodos. Por ejemplo, un fragmento que carece de los 5 aminoácidos del extremos C-terminal de A β 43 incluye los primeros 38 aminoácidos del extremo N-terminal de A β . Otros componentes de placas amiloides, por ejemplo, cinucleína y los fragmentos epitopos de la misma pueden usarse también para inducir una respuesta inmunogénica.

A menos que se indique lo contrario, la referencia a A β incluye las secuencias de aminoácidos naturales indicadas más arriba así como también los análogos que incluyen especies alélicas y variantes inducidas. Los análogos difieren típicamente de los péptidos naturales en 1, 2 o unas pocas posiciones a menudo en virtud de las sustituciones conservativas. Los análogos exhiben típicamente

por lo menos 80 o 90% de identidad de secuencia con los péptido naturales. Algunos análogos incluyen también aminoácidos no naturales o modificaciones de aminoácidos terminales NOC en 1, 2 o unas pocas posiciones. Por ejemplo, el residuo de ácido aspártico natural en la posición 1 y/o 7 de A β puede reemplazarse con ácido isoaspártico. Ejemplos de aminoácidos no naturales son los aminoácidos α , α -disustituidos, los N-alquilaminoácidos, ácido láctico, 4-hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, γ -N,N,N-trimetilisina, γ -N-acetilisina, O-fosfoserina, N-acetilselina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, ω -N-metilarginina, y ácido isoaspártico. Los fragmentos de análogos pueden ser rastreados para determinar la eficacia profiláctica o terapéutica en modelos de animales transgénicos en comparación con controles de placebo o no tratados tal como se describirá a continuación.

A β sus fragmentos de análogos pueden sintetizarse mediante síntesis de péptidos de fase sólida o por expresión recombinante o pueden obtenerse a partir de fuentes naturales. Los sintetizadores de péptidos automáticos son comercialmente obtenibles en numerosos proveedores tales como Applied Biosystems, Foster City, California. La expresión recombinante puede estar en bacterias tanto como E. Coli, levaduras, células de insectos o células de mamíferos. Los procedimientos para la expresión recombinante han sido descritos por Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (C.H.P. Press, NY 2d ed., 1989). Algunas formas del péptido A β están también disponibles en el comercio (por ejemplo, American Peptides Company, Inc., Sunnyvale, CA y California Peptide Research, Inc. Napa, CA).

Los agentes terapéuticos incluyen también polipéptidos más largos que incluyen por ejemplo, un fragmento activo del péptido A β conjuntamente con otros aminoácidos. Por ejemplo, los agentes preferidos incluyen proteínas de fusión que comprenden un segmento de A β fusionado con una secuencia de aminoácido

heteróloga que induce una respuesta de célula T-auxiliar contra la secuencia de aminoácido heteróloga y por lo tanto una respuesta de célula B contra el segmento A β . Dichos polipéptidos pueden ser rastreados para determinar la eficacia profiláctica o terapéutica en modelos de animales en comparación con controles no tratados o placebos tal como se describirá a continuación. El péptido A β , el análogo, el fragmento activo u otros polipéptidos pueden administrarse en asociación o en forma multimérica o en forma disociada. Los agentes terapéuticos incluyen también multímeros de agentes inmunogénicos monoméricos.

En otra variación, puede presentarse un péptido inmunogénico tal como un fragmento de A β , como una vacuna viral o bacteriana. Un ácido nucleico que codifica el péptido inmunogénico se incorpora a un genoma o a un episoma del virus o bacteria. Opcionalmente, el ácido nucleico se incorpora de tal manera que el péptido inmunogénico se expresa como proteína secretada o como proteína de fusión con una proteína de superficie externa de un virus, una proteína de transmembrana de una bacteria de manera que se exhiba el péptido. Los virus o bacterias usados en dicho métodos deberían ser no patógenos o atenuados. Entre los virus apropiados se incluye adenovirus, HSV, baccinia y erupciones pustulosas. La fusión de un péptido inmunogénico con HbsAg de HBV es particularmente apropiada. Los agentes terapéuticos incluyen también péptidos y otros compuestos que no necesariamente tienen una similaridad de secuencia de aminoácidos significativa con A β pero que, sin embargo, sirven como miméticos de A β e inducen respuestas inmunitarias similares. Por ejemplo, cualquier péptido y proteína que forma láminas plegadas en β puede ser rastreado para determinar su conveniencia. También pueden usarse anticuerpos anti-ideotípicos contra anticuerpos monoclonales para A β o para otros péptido amiloidogénicos. Dichos anticuerpos anti-Id imitan el antígeno y generan una respuesta inmunitaria para el mismo (ver *Essential Immunology* (Roid ed., Blackwell Scientific Publications, Palo

Alto, 6th ed), p. 181). Los agentes distintos de péptidos A β deberían inducir una respuesta inmunogénica contra uno o más de los segmentos preferidos de A β enumerados más arriba (por ejemplo, 1-10, 1-7, 1-3 y 3-7). Preferiblemente dichos agentes inducen una respuesta inmunogénica que está especialmente dirigida a uno de estos segmento sin estar dirigida a los otros segmentos de A β .

También pueden rastrearse colecciones de péptidos u otros compuestos al azar par determinar la conveniencia. Las colecciones combinatorias pueden producirse para muchos tipos de compuestos que pueden sintetizarse de manera de etapa en etapa. Dichos compuestos incluyen polipéptidos, miméticos de β -vuelta, polisacáridos, fosfolípidos, hormonas, prostaglandinas, esteroides, compuestos aromáticos, compuestos heterocíclicos, benzodiazepinas, glisinas oligoméricas N-sustituidas y oligocarbamatos. Pueden construirse grandes colecciones combinatorias de los compuestos mediante el método de colecciones de síntesis codificadas (ESL) descripto en Affymax, WO 95/12608, Affymax, WO 93/06121, Columbia University, WO 94/08051, Pharmacopeia, WO 95/35503 y Scripps, WO 95/30642 (cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia para cualquier propósito). Las colecciones de péptidos también pueden generarse mediante métodos de exhibición de fagos. Ver por ejemplo, Devlin, WO 91/18980.

Las colecciones combinatorias y otros compuestos son inicialmente rastreados para determinar la conveniencia mediante la determinación de su capacidad para adherirse a los anticuerpos a los linfocitos (B o T) que se sabe que son específicos para A β o para otros péptidos amiloidogénicos. Por ejemplo, pueden efectuarse rastreos iniciales con cualquier suero policlonal o anticuerpo monoclonal para A β o para un fragmento de los mismos. Los compuestos pueden ser luego rastreados para determinar la adhesión a un epitopo específico dentro de A β (por ejemplo, 1-10, 1-7, 1-3, 1-4, 1-5, y 3-7). Los compuestos pueden ensayarse mediante los mismos procedimientos descriptos para el mapeo de las

especificidades de los epitopos y anticuerpos. Los compuestos identificados mediante dicho rastreo son luego analizados para determinar la capacidad de inducir anticuerpos linfocitos reactivos para A β o fragmentos de los mismo, por ejemplo, pueden ensayarse múltiples diluciones suero en placas microtituladoras que han sido pre-recubiertas con A β y con fragmentos del mismo y puede llevarse a cabo un ELISA convencional para ensayar los anticuerpos reactivos para A β o el fragmento. Luego pueden ensayarse compuestos para determinar la eficacia profiláctica terapéutica en animales transgénicos predispuestos para una enfermedad amiloidogénica, tal como se describió en los ejemplos. Dichos animales incluyen por ejemplo, ratones portadores de la mutación 717 de la APP descritos por Games et al, supra, y ratones portadores de la mutación sueca de la APP tal como ha sido descrito por McColongue et al., US 5.612.486 y Hsiao et al., *Science* 274 99 (1996); Staufenbiel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13287-13292 (1997); Sturchler-Pierrat et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13287-13292 (1997); Borchelt et al., *Neuron* 19, 939-945 (1997). Puede usarse la misma realización de rastreo en otros análogos de agentes potenciales de A β y el péptidos más largos incluyendo los fragmentos de A β , que se han descrito precedentemente.

2. Agentes que inducen Respuesta Inmunitaria Pasiva

Los agentes terapéuticos de la invención incluyen también anticuerpos que pueden adherirse específicamente a A β o a otros componentes de placas amiloides. Dichos anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales. Algunos de dichos anticuerpos se adhieren específicamente a la forma agregada de A β sin adherirse a la forma disociada. Alguno se adhiere específicamente ala forma disociada sin adherirse a la forma agregada. Algunos se adhieren a ambas formas, la agregada y la disociada. Algunos de dichos anticuerpos se adhieren a una forma corta natural de A β (es decir A β A β 39, 40 o 41) sin adherirse a una

forma larga natural de A β (es decir A β 42 y A β 43). Algunos anticuerpos se adhieren a una forma larga sin adherirse a una forma corta. Algunos anticuerpos se adhieren a A β sin adherirse a la proteína precursora amiloide de longitud total.

Los anticuerpos que se usan en método terapéuticos usualmente tienen una región constante intacta o por lo menos suficiente de la región constante para interactuar con un receptor FC. Se prefiere el IgG1 de isotipo humano debido a que tiene mayor afinidad de isotipos humanos para el receptor FcRI en las células fagocíticas. También pueden usarse fragmentos Fab biespecíficos en los cuales un brazo del anticuerpo tiene especificidad para A β y el otro para un receptor Fc. Algunos anticuerpos se adhieren a A β con una afinidad de adhesión superior a o igual a aproximadamente 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , o 10^{10} M $^{-1}$.

Los sueros policlonales contienen típicamente poblaciones mixtas de anticuerpos que se adhieren a varios epitopos a lo largo de la longitud de A β . Sin embargo, los sueros policlonales pueden ser específicos para un segmento particular de A β , tal como A β -10. Los anticuerpos monoclonales se adhieren a un epitopo específico dentro de A β que puede ser un epitopo conformacional o no conformacional. La eficacia profiláctica terapéutica de los anticuerpos puede ensayarse usando los procedimientos de modelo de animal transgénico descriptos en los ejemplos. Los anticuerpos monoclonales preferidos se adhieren a un epitopo dentro de los residuos 1-10 de A β (donde el primer residuo N-terminal de A β natural se designa 1). Algunos anticuerpos monoclonales preferidos se adhieren a un epitopo dentro de los aminoácidos 1-5 y algunos a un epitopo dentro de 5-10. Algunos anticuerpos preferidos se adhieren a los epitopos dentro de los aminoácidos 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, o 3-7. Algunos anticuerpos preferidos se adhieren a un epitopo a partir de los residuos 1-3 y terminan en los residuos 7-11 de A β . Los anticuerpos menos preferidos incluyen los que se adhieren a los epitopos con los residuos 10-15, 15-20, 25-30, 10-20, 20, 30, o 10-25 de A β . E recomienda que dichos

anticuerpos sean rastreados para determinar la actividad en el modelo de ratones descriptos en los ejemplos antes del uso. Por ejemplo, se ha hallado que algunos anticuerpos para los epitopos dentro de los residuos 10-18, 16-24, 18-21, y 33-42 carecen de actividad. En algunos métodos, se usan anticuerpos monoclonales múltiples que tienen especificidades de adhesión para diferentes epitopos. Dichos anticuerpos pueden administrarse secuencialmente o en forma simultánea. También pueden usarse anticuerpos para componentes amiloides distintos de A β . Por ejemplo, pueden dirigirse anticuerpos a la sinucleína de proteína asociada a amiloide.

Cuando se dice que un anticuerpo se adhiere a un epitopo dentro de residuos especificados tales como 1-5, por ejemplo, lo que se quiere decir es que el anticuerpo se adhiere específicamente a un polipéptido que contiene los residuos especificados (es decir, 1-5 en este ejemplo). Dicho anticuerpo no necesariamente entra en contacto con cada residuo dentro de 1-5. Ni tampoco ninguna sustitución o delección de aminoácido única con A β 1-5 necesariamente afecta en forma significativa la afinidad de adhesión. La especificidad del epitopo de un anticuerpo puede determinarse, por ejemplo, formando una colección de exhibición de fagos en la cual los diferentes miembros exhiben diferentes subsecuencias de A β . La colección de exhibición de fagos se selecciona luego para miembros que se adhieren específicamente a un anticuerpo bajo ensayo. Se aísla una familia de secuencias. Teóricamente dicha familia contiene una secuencia de núcleo común, y longitudes varias de secuencias flanqueadoras en diferentes miembros. La secuencia de núcleo más corta que muestra adhesión específica por el anticuerpo define el epitopo adherido al anticuerpo. También pueden ensayarse anticuerpos para la especificidad de epitopos en un ensayo de competición con un anticuerpo cuya especificidad de epitopo ha sido ya determinada. Por ejemplo, los anticuerpos que compiten con el anticuerpo 3D6

para la adhesión a A β se adhieren al mismo epitopo o uno similar como 3D6, es decir, dentro de los residuos 1-5. Asimismo, los anticuerpos que compiten con el anticuerpo 10D5 se adhieren al mismo epitopo o a otro similar, es decir, dentro de los residuos 3-6. El rastreo de anticuerpos para la especificidad de los epitopos es una forma útil de predecir la eficacia terapéutica. Por ejemplo, un anticuerpo determinado para adherirse a un epitopo dentro de los residuos 1-7 de A β probablemente será eficaz para evitar y tratar la enfermedad de Alzheimer.

Los anticuerpos monoclonales o policlonales que se adhieren específicamente a un segmento preferido de A β sin adherirse a otras regiones de A β , tienen una variedad de ventajas en relación a los anticuerpos monoclonales que se adhieren a otras regiones o sobre los policlonales a A β intacto. En primer lugar, para dosis de masas iguales, las dosis de anticuerpos que se adhieren específicamente a los segmentos preferidos contienen una dosis molar superior de anticuerpos que es eficaz para evacuar las placas amiloides. En segundo lugar, los anticuerpos que se adhieren específicamente a segmentos preferidos pueden inducir a una respuesta de evacuación contra los depósitos amiloides sin inducir a una respuesta de evacuación contra el polipéptido APP intacto, lo cual reduce el potencial para los efectos secundarios.

i. Características Generales de las Inmunoglobulina

Se sabe que la unidad estructural básica de anticuerpos comprende un tetrámero de subunidades. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipéptídicas, teniendo cada para una cadena "liviana" (de aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (de aproximadamente 50-70 kDa). La porción amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígenos. La porción carboxi-terminal de cada cadena define una región constante principalmente responsable de la función del efector.

Las cadenas livianas se clasifican como Kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gama, alfa, delta o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD y IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas liviana y pesada, las regiones variable y constante se unen mediante una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, donde la cadena pesada incluye también una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más (ver en general *Fundamental Immunology* (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.T. , 1989), Ch. 7 (que se incorpora aquí como referencia en su totalidad para todos los propósitos.

Las regiones variables de cada par de cadena liviana/pesada forman el sitio de adhesión de anticuerpo. Por lo tanto, un anticuerpo intacto tiene dos sitios de adhesión. Excepto en los anticuerpos bifuncionales o biespecíficos, los dos sitios de adhesión son iguales. Las cadenas exhiben todas la misma estructura general de las regiones estructurales relativamente conservadas (FR) unidas por tres regiones hipervariables, denominadas también regiones determinadoras de complementariedad o CDR. La CDR de las dos cadenas de cada par están alineadas mediante las regiones estructurales, lo cual permite la adhesión a un epitopo específico. Desde N-terminal a C-terminal, ambas cadenas, la liviana y la pesada, comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio está de acuerdo con las definiciones de Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 y 1991), o Clothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Clothia et al., *Nature* 342:878-883 (1989).

ii. Producción de anticuerpos no Humanos

La producción de anticuerpos monoclonales no humanos, por ejemplo, mурidos, conejillos de india, primates, conejos o ratas, puede llevarse a acabo mediante por ejemplo inmunización del animal con Aβ. Un polipéptido más largo

comprende A β o un fragmento inmunogénico de A β o anticuerpos anti-ideotípicos para un anticuerpo para A β . Ver Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (CSHP NY, 1988) (que se incorpora aquí como referencia para cualquier propósito). Dicho inmunógeno puede obtenerse mediante una fuente natural, mediante síntesis de péptidos o mediante expresión recombinante. Opcionalmente el inmunógeno puede administrarse en forma fusionada o en complejo de otra forma con una proteína portadora, tal como se describirá a continuación. Opcionalmente, el inmunógeno puede administrarse con un coadyuvante. Pueden usarse varios tipos de coadyuvantes tal como se describirá a continuación. El coadyuvante completo de Freund seguido de coadyuvante incompleto será preferido para la inmunización para animales de laboratorio. Los conejos o conejillos de indias se usan típicamente para preparar anticuerpos policlonales. Los ratones se usan típicamente para preparar anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos son rastreados para determinar la actividad específica de A β . Opcionalmente, los anticuerpos son además rastreados para determinar la adhesión a una región específica de A β . Este último rastreo puede llevarse a cabo determinando la adhesión de un anticuerpo a una colección de mutantes de delección de un péptido anticuerpo y determinar cual mutante de delección de adhiere al anticuerpo. La adhesión puede verificarse, por ejemplo, mediante Borron Western o ELISA. El fragmento más pequeño que muestra adhesión específica al anticuerpo define el epitopo del anticuerpo. Alternativamente, la especificidad de epitopos puede determinarse mediante un ensayo competitivo en el cual una prueba y un anticuerpo de referencia compiten para la adhesión a A β . Si la prueba y los anticuerpos de referencia compiten, entonces se adhieren al mismo epitopo o epitopos en una forma suficientemente próxima para que la adhesión de un anticuerpo interfiera con la adhesión del otro. El isotipo preferido para dichos anticuerpos es el isotipo IgG2a de ratón o un

isotipo equivalente en otras especies. El isotipo IgG2a de ratón es el equivalente de un isotipo IgG1 humano.

iii. Anticuerpos Quiméricos y Humanizados

Los anticuerpos quiméricos y humanizados tienen la misma o similar especificidad de adhesión y afinidad que un anticuerpo de ratón u otro no humano que provee el material de partida para la construcción de un anticuerpo quimérico humanizado. Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos cuyos genes livianos y pesados han sido contruidos típicamente por ingeniería genética a partir de segmentos génicos de inmunoglobulina que pertenecen a diferentes especies. Por ejemplo, los segmentos variables (V) de los genes de un anticuerpo monoclonal de ratón pueden estar unidos a segmentos humanos constantes (C), tales como IgG1 y IgG4. El isotipo humano IgG1 es el isotipo preferido. Un anticuerpo quimérico típico consiste por lo tanto en una proteína híbrida que consiste en el dominio de adhesión de antígeno o V de un anticuerpo de ratón y el dominio efector C de un anticuerpo humano.

Los anticuerpos humanizados tienen residuos de un marco de trabajo de región variable substancialmente de un anticuerpo humano (denominado un anticuerpo aceptador) y regiones que determinan la complementariedad substancialmente de un anticuerpo de ratón, (descrito como una inmunoglobulina dadora). Ver, Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989) y WO 90/07861, US 5.693.762, US 5.693.761, US 5.585.089, US 5.530.101 y Winter, US 5.225.539 (que se incorporan aquí como referencia en su totalidad para cualquier propósito). Las regiones constantes, si están presentes, son también substancialmente o enteramente de una inmunoglobulina humana. Los dominios variables humanos usualmente se eligen de anticuerpos humanos cuyas secuencias estructurales exhiben un alto de identidad de secuencia con los dominios de la región variable murina de los cuales derivan CDR. Los residuos

estructurales de la región variable de cadena liviana y pesada pueden derivar de las mismas secuencias de anticuerpos o de diferentes secuencias. Las secuencias de anticuerpos humanos pueden ser las secuencias de anticuerpos humanos naturales o pueden ser secuencias de consenso de varios anticuerpos humanos. Ver Carter et al., WO 92/22653. Algunos aminoácidos de los residuos estructurales de la región variable humano se seleccionan para sustitución en base a su posible influencia sobre la conformación de CDR y/o la adhesión al antígeno. La investigación de dichas posibles influencias se efectúa por modelación, examen de las características de los aminoácidos en lugares particulares, o por observaciones empíricas de los efectos de sustitución o mutagénesis de aminoácidos particulares.

Por ejemplo, cuando un aminoácido difiere entre un residuo de estructura de región variable de muridos y un residuo de estructura de la región variable humana seleccionado, el aminoácido de estructura humana debería estar usualmente sustituido por el aminoácido de estructura equivalente del anticuerpo de ratón cuando se espera razonablemente que el aminoácido:

- (1) se adhiere no covalentemente al antígeno en forma directa,
- (2) es adyacente a la región CDR,
- (3) interactúa por otra parte con una región CDR (por ejemplo, está dentro de aproximadamente 6 Å de una región CDR), o
- (4) participa en la interface VL-VH.

Otros candidatos para la sustitución son aminoácidos aceptores de estructura humana que son inusuales para una inmunoglobulina humana en esta posición. Estos aminoácidos pueden substituirse con aminoácidos de posición equivalente del anticuerpo dador del ratón o de posiciones equivalentes de inmunoglobulina humanas más típicas. Otros candidatos para sustitución son los aminoácidos aceptores de estructura humana que son inusuales para una

inmunoglobulina humana en esta posición. Las estructuras de región variable de las inmunoglobulinas humanizadas usualmente muestran por lo menos 85% de identidad de secuencia con una secuencia de estructura de región variable humana o de consenso de dichas secuencias.

iv. Anticuerpos Humanos

Los anticuerpos humanos contra A β se proveen mediante una variedad de técnicas que se describirán a continuación. Algunos anticuerpos humanos están seleccionados mediante experimentos de adhesión competitiva, o de otra forma, tienen la misma especificidad de epitopos que un anticuerpo de ratón particular, tal como uno de los monoclonales de ratón descritos en el ejemplo XI. Los anticuerpos humanos pueden ser también rastreados para una especificidad de epitopo particular mediante el uso únicamente de un fragmento de A β como inmunógeno, y/o mediante anticuerpos de rastreo contra una colección de mutantes de delección de A β . Los anticuerpos humanos tienen preferiblemente IgG1 humano de especificidad de isotipos.

(1) Metodología de Trioma

La realización básica y un ejemplo del par de fusión de células, SPAZ-4, para ser usado en esta realización han sido descritos por Oestberg et al., *Hybridoma* 2:361-367 (1983); Oestberg, de la patente norteamericana N° 4.634.664; y Engleman et al., de la patente norteamericana 4.634.666 (cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia en su totalidad para cualquier propósito). Las líneas de células productoras de anticuerpos obtenidas mediante este método se denominan triomas debido a que descienden de tres células-dos humanas y una de ratón. Inicialmente, se fusiona una línea de mieloma de ratón con un linfocito B humano para obtener una célula híbrida xenogénica no productora de anticuerpos, tal como la línea SPAZ-4 descrita por Oestberg, supra. La célula xenogénica se fusiona luego con un linfocito B humano

inmunizado para obtener una línea de células trioma productora de anticuerpos. Se ha hallado que los triomas producen anticuerpos en forma más estable que los hibridomas comunes preparados a partir de células humanas.

Los linfocitos B inmunizados se obtienen a partir de sangre, bazo, nódulos linfáticos o médula ósea de un dador humano. Si se desean anticuerpos contra un epitopo o antígeno específico, se usa preferiblemente el antígeno o epitopo de los mismos para inmunización. La inmunización puede efectuarse in vivo o in vitro. Para la inmunización in vivo, las células B se aíslan típicamente a partir de un ser humano inmunizado con A β , un fragmento del mismo, un polipéptido más largo que contiene A β o el fragmento, o un anticuerpo anti-idiotípico para un anticuerpo para A β . En algunos métodos, las células B se aíslan a partir del mismo paciente al cual se administrará finalmente la terapia de anticuerpo. Para la inmunización in vitro, los linfocitos B se exponen típicamente al antígeno por un período de 7-14 días en un medio tal como RPMI-1640 (ver Engleman, *supra*) suplementado con 10% de plasma humano.

Los linfocitos B inmunizados se fusionan con una célula híbrida xenogénica tal como SPAZ-4 mediante métodos bien conocidos. Por ejemplo, las células se tratan con 40-50% de polietien glicol de un MW de 1.000-4.000 a aproximadamente 37 grados, durante aproximadamente 5-10 minutos. Las células se separan de la mezcla de fusión y se propagan en un medio selectivo para obtener los híbridos deseados (por ejemplo, HAT o AH). Los clones que secretan los anticuerpos que tienen la especificidad de adhesión requerida se identifican mediante el ensayo del medio de cultivo de trioma para determinar la capacidad de adherirse a A β o a un fragmento del mismo. Los triomas que producen los anticuerpos humanos que tienen la especificidad deseada se subclonan mediante técnica de dilución limitativa y se cultivan in vitro en un medio de cultivo. Las

líneas de células de trioma obtenidas son luego ensayadas para determinar la capacidad de adherirse a A β o a un fragmento de los mismos.

Aunque los triomas son genéticamente estables no producen anticuerpos a niveles muy altos. Los niveles de expresión pueden incrementarse clonando los genes de anticuerpos del trioma en uno o más vectores de expresión, y transformando el vector en líneas de células de levadura o bacterianas, convencionales de este mamífero.

(2) Mamíferos Transgénicos no Humanos

También pueden producirse anticuerpos humanos contra A β a partir de mamíferos transgénicos no humanos que tienen transgenes que codifican por lo menos un segmento del lugar de la inmunoglobulina humana. Usualmente, el lugar de la inmunoglobulina endógena de dichos mamíferos transgénicos está funcionalmente inactivada. Preferiblemente, el segmento de la inmunoglobulina humana incluye secuencias desordenadas de componentes de cadena pesada y liviana. Tanto la inactivación de los genes endógenos de inmunoglobulina como la introducción de los genes exógenos de inmunoglobulina pueden lograrse mediante recombinación homóloga objetivo o por introducción de los cromosomas YAC. Los mamíferos transgénicos resultantes de este procedimiento son capaces de reordenar funcionalmente las secuencias componentes de inmunoglobulina, y expresar un repertorio de anticuerpos de varios isotipos codificados por los genes de inmunoglobulina humana, sin expresar genes de inmunoglobulina endógena. La producción y propiedades de los mamíferos que tienen estas propiedades ha sido descripta detalladamente por ejemplo por Lonberg et al., WO 93/12227 (1993); US 5.877.397, US 5.874.299, US 5.814.318, US 5.789.650, US 5.770.429, US 5.661.016, US 5.633.425, US 5.625.126, US 5.569.825, US 5.545.806, *Nature* 148, 1547-1553 (1994), *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996), Kucherlapati, WO 91/10741 (1991) (cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia en su

totalidad para cualquier propósito). Los ratones transgénicos son particularmente apropiados. Se obtienen anticuerpos A β mediante la inmunización de un mamífero no humano transgénico tal como ha sido descrito por Lonberg o Kucherlapati, *supra*, con A β o con un fragmento del mismo. Se preparan anticuerpos monoclonales por ejemplo mediante fusión de las células B a partir de dichos mamíferos para células de línea de mieloma apropiados usando tecnología convencional de Kohler-Milstein. También pueden proveerse anticuerpos policlonales humanos en forma de suero proveniente de seres humanos inmunizados con un agente inmunogénico. Opcionalmente, dichos anticuerpos policlonales pueden concentrarse mediante purificación de afinidad usando A β u otro péptido amiloide como reactivo de afinidad.

(3) Métodos de Exhibición de Fagos

En otra realización para obtener anticuerpos anti-A β humanos consiste en rastrear una colección de ADN de células B humanas de acuerdo con el protocolo general diseñado por Huse et al., *Science* 246:1275-1281 (1989). Tal como se describió para la metodología de triomas, dichas células B pueden obtenerse a partir de un ser humano inmunizado con fragmentos A β , polipéptidos más largos que contienen A β o fragmentos o anticuerpos anti-idiotípicos. Opcionalmente, dichas células B se obtienen a partir de un paciente que está recibiendo últimamente tratamiento con anticuerpos. Se seleccionan anticuerpos que se adhieren a A β o a un fragmento de los mismos. Las secuencias que codifican dichos anticuerpos (o los fragmentos de adhesión) son luego clonados y amplificados. El protocolo descrito por Huse se torna más eficiente en combinación con tecnología de exhibición de fagos. Ver por ejemplo, Dower et al., WO 91/17271 y McCafferty et al., WO 92/01047, US 5.877.218, US 5.871.907, US 5.858.657, US 5.837.242, US 5.733.743 y US 5.565.332 (cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia en su totalidad para cualquier propósito). En

estos métodos, se producen colecciones de fagos en las cuales los miembros exhiben diferentes anticuerpos en sus superficies externas. Los anticuerpos son usualmente exhibidos como fragmentos Fv o Fab. Los anticuerpos que exhiben fagos con una especificidad deseada se seleccionan mediante enriquecimiento por afinidad de un péptido A β o un fragmento del mismo.

En una variación del método de exhibición de fagos, pueden producirse anticuerpos humanos que tienen la especificidad de adhesión de un anticuerpo de murino seleccionado. Ver Winter, WO 92/20791. En este método, la región variable pesada o bien la región variable liviana del anticuerpo de murino seleccionado se usa como material de partida. Si, por ejemplo, se selecciona una región variable de cadena liviana como material de partida, se construye una colección de fagos en la cual los miembros exhiben la misma región variable de cadena liviana (es decir, el material de partida murino) y una región variable de cadena pesada diferente. Las regiones variables de cadena pesada se obtienen a partir de una colección de regiones variables de cadena pesada humana reordenadas. Se selecciona un fago que muestra una fuerte adhesión específica para A β (por ejemplo, por lo menos 10^8 y preferiblemente por lo menos 10^9 M $^{-1}$). La región variable de cadena pesada humana de este fago sirve luego como material de partida para construir otra colección de fagos adicional. En esta colección cada fago exhibe la misma región variable de cadena pesada (es decir, la región identificada en la primera colección de exhibición), y una región variable diferente de cadena liviana. Las regiones variables de cadena liviana se obtienen a partir de una colección de regiones de cadena liviana variable humana reordenada. Nuevamente, se seleccionan fagos que muestran una fuerte adhesión específica para A β . Estos fagos exhiben las regiones variables de anticuerpos anti-A β completamente humanos. Estos anticuerpos usualmente tienen la especificidad de epitopos que el material murino.

v. Selección de Región Constante

Las regiones variables de cadena pesada y liviana de anticuerpos quiméricos humanizados o humanos puede ligarse a por lo menos una porción de una región constante humana. La elección de la región constante depende en parte de si se desea toxicidad intermediada por células y/o de complemento dependiente de anticuerpo. Por ejemplo, los isotipos IgG1 e IgG3 tienen actividad de complemento y los isotipos IgG2 e IgG4 no. La elección del isotipo puede afectar el pasaje del anticuerpo en el cerebro. Se prefiere el isotipo IgG1 humano. Las regiones constantes de cadena liviana pueden ser lambda o kappa. Los anticuerpos pueden expresarse como tetrámeros que contienen dos cadenas livianas y dos pesadas, en forma de cadenas pesadas separadas, cadenas livianas como Fab, Fab'F(ab')₂, y Fv, o como anticuerpos de cadena simple donde los dominios variables de cadena pesada y cadena liviana están ligados a través de un espaciador.

vi. Expresión de Anticuerpos Recombinantes

Los anticuerpos quiméricos humanizados y humanos se producen típicamente mediante expresión recombinante. Las construcciones polinucleotídicas recombinantes incluyen típicamente una secuencia de control de expresión ligado operativamente a las secuencias codificadoras de las cadenas de anticuerpo incluyendo regiones promotoras heterólogas o naturalmente asociadas. Preferiblemente, las secuencias de control de expresión son sistemas promotores eucarióticos en vectores capaces de transformar o transfectar células huéspedes eucarióticas. Una vez incorporado el vector en el huésped apropiado, el huésped se mantiene bajo condiciones apropiadas para la expresión de alto nivel de las secuencias nucleotídicas, y para la recolección y purificación de los anticuerpos de reacción cruzada.

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

E. coli es un huésped procariótico que es particularmente útil para clonar las secuencias de ADN de la presente invención. Los microbios, tales como levadura son también útiles para la expresión. Los *saccharomyces* constituyen un huésped de levadura preferido, con vectores apropiados que tienen secuencias de control de la expresión, un origen de réplica, secuencias de terminación y similares según se desee. Los promotores típicos incluyen 3-fosfoglicerato quinasa y otras enzimas glicolíticas. Los promotores de levadura inducibles incluyen entre otros promotores del alcohol deshidrogenasa, isocitocromo C y enzimas responsables para la utilización de maltosa y galactosa.

Las células de mamíferos son el huésped preferido para expresar los segmentos nucleotídicos que codifican las inmunoglobulinas o los fragmentos de las mismas. Ver Winnacker, *From Genes to Clones*, (VCH Publishers, NY, 1987). Una variedad de líneas de células huésped apropiadas capaces de secretar proteínas heterólogas intactas ha sido desarrollada en el arte e incluye las líneas de células CHO, varias líneas de células COS, células HeLa, células L y líneas de células de mieloma. Preferiblemente, las células son no humanas. Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de expresión tales como origen de réplica, un promotor y un mejorador (Queen et al., *Immunol. Rev.* 89:49 (1986)), y los sitios de información de procesamiento necesarios tales como los sitios de adhesión de ribosoma, sitios de empalme de ARN, sitios de poliadenilación y secuencias de terminación de transcripción. Las secuencias de

control de expresión preferidas son promotores derivados de genes endógenos, citomegalovirus, SV40, adenovirus, papilomavirus bovinos y similares. Ver Co et al., *J. Immunol.* 148:1149 (1992).

Alternativamente, las secuencias codificadoras de anticuerpos pueden incorporarse a los transgenes para la introducción en el genoma de un animal transgénico y para la subsiguiente expresión en la leche del animal transgénico (ver por ejemplo, patentes norteamericanas US 5.741.957, US 5.304.489. US 5.849.992). Los transgenes apropiados incluyen secuencias codificadoras para cadenas livianas y/o pesadas en enlaces operables con un promotor y un mejorador de un gen específico de glándula de mamífero tal como caseína o beta lactoglobulina.

Los vectores que contienen los segmentos de ADN de interés pueden ser transferidos a la célula huésped mediante métodos bien conocidos que dependen del tipo de huésped celular. Por ejemplo, la transfección de cloruro de calcio se utiliza comúnmente para células procarióticas, mientras que el tratamiento con fosfato de calcio, la electroporación, la lipofección, la biolística o la transfección de base viral puede usarse para otras huéspedes celulares. Otros métodos usados para transformar células de mamífero incluyen el uso de polibreno, fusión protoplástica, liposomas, electroporación y microinyección (ver en general, Sambrook et al., supra). Para la producción de animales transgénicos, los transgenes pueden ser microinyectados en oocitos fertilizados o pueden incorporarse al genoma de células embriónicas de origen de estirpe, y los núcleos de dichas células pueden transferirse a los oocitos enucleados.

Una vez expresados los anticuerpos pueden purificarse de acuerdo con procedimientos convencionales en el arte, incluyen purificación de HPLC, cromatografía en columna, electroforesis de gel y similares (ver en general, Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, NY, 1982)).

3. Proteínas Portadoras

Algunos agentes para inducir una respuesta inmunitaria contienen el epitopo apropiado para inducir una respuesta de inmunidad contra depósitos amiloides pero son demasiado pequeños para ser inmunogénicos. En esta situación, un inmunógeno peptídico puede ligarse a un portador apropiado para ayudar a producir una respuesta inmunitaria. Los portadores apropiados incluyen albúminas, hemocianina de lapa *Fissurella*, moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovalbúmina, toxoide del tétanos o un toxoide de otras bacterias patógenas tales como difteria, *E. coli*, cólera o *H. pylori*, o un derivado de toxina atenuado. Otros portadores incluyen epitopos de célula T que se adhieren a múltiples alelos MHC, por ejemplo a por lo menos 75% de todos los alelos MHC humanos. Dichos portadores se conocen algunas veces en el arte como epitopos de célula T universal". Ejemplos de epitopos de célula T universal incluyen:

Hemaglutanina de Influenza: HA₃₀₇₋₃₁₉ PKYVVKQNTLKLAT

PADRE AKXVAAWTLKAAA

Malaria CS: T3 epitopo EKKIAKMEKASSVFNV

Antígeno superficial de Hepatitis B: HBsAg₁₉₋₂₈ FFLLTRILTI

Proteína 65 de shock de calor: hsp65₁₅₃₋₁₇₁ DQSIGDLIAEAMDKVGNEG

Bacilo Calmette-Guerin QVHFQPLPPAVVKL

Toxoide del tétanos: TT₈₃₀₋₈₄₄ QYIKANSKFIGITEL

Toxoide del tétanos: TT₉₄₇₋₉₆₇ FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE

HIV gp120 T1: KQIINMWQEVGKAMYA.

Otros portadores para estimular o para mejorar una respuesta de inmunidad incluyen citoquinas tales como IL-1, IL-1 α y β péptidos, IL-2, γ INF, IL-10, GM-CSF y quemoquinas, tales como MIPI α y β y RANTES. Los agentes inmunogénicos pueden ligarse también a péptidos que mejoran los tejidos a

través de transporte tal como ha sido descrito en O'Mahony, WO 97/17613 y WO 97/17614.

Los agentes inmunogénicos pueden ligarse a portadores mediante entrecruzamiento químico. Las técnicas para ligar un inmunógeno con un portador incluyen la formación de enlaces disulfuro de N-succinimidil-3-(2-piridil-tio)-propionato (SPDP) y 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimido (SMCC) (si el péptido carece de grupo sulfhidrilo este podrá proveerse mediante adición de un residuo cisteína). Estos reactivos crean un enlace disulfuro entre sí mismos y los residuos de péptido cisteína en una proteína y un enlace amida a través del ϵ -amino en una lisina, u otro grupo amino libre en otros aminoácidos. Se describe una amplia de dichos agentes formadores de disulfuro/amida en *Immun. Rev.* 62, 185 (1982). Otros agentes de acoplamiento forman un tioéter en vez de un enlace disulfuro. Muchos de estos agentes formadores de tioéter son obtenibles comercialmente e incluyen los ésteres reactivos del ácido 6-maleimidocaproico, ácido 2-bromoacético, y ácido iodoacético, ácido 4-(N-maleimido-metil)ciclohexano-1-carboxílico. Los grupos carboxilo pueden activarse combinándolos con succinimida o con la sal de sodio del ácido 1-hidroxilo-2-nitro-4-sulfónico.

También pueden expresarse los péptidos inmunogénicos como proteínas de fusión con portadores (es decir, péptidos heterólogos). El péptido inmunogénico puede ligarse a su término amino, a su término carboxilo o ambos con un portador. Opcionalmente, pueden estar presentes repeticiones múltiples del péptido inmunogénico en la proteína de fusión. Opcionalmente, puede ligarse un péptido inmunogénico a múltiples copias de un péptido heterólogo, por ejemplo, tanto en los términos N y C del péptido. Algunos péptidos portadores sirven para inducir una respuesta de célula T auxiliar contra el péptido portador.

Las células T auxiliares inducidas a su vez inducen una respuesta de célula B contra el péptido inmunogénico ligado al péptido portador.

Algunos agentes de la invención comprenden una proteína de fusión en la cual el fragmento N-terminal de A β está ligado a su término C con un péptido portador. En dichos agentes, el residuo N-terminal del fragmento de A β constituye el residuo N-terminal de la proteína de fusión. Por consiguiente, dichas proteínas de fusión son eficaces para inducir anticuerpos que se adhieren a un epítopo que requiere que el residuo N-terminal de A β esté en forma libre. Algunos agentes de la invención comprenden una pluralidad de repeticiones de un segmento N-terminal de A β ligado al C término de una o más copias de un péptido portador. El fragmento N-terminal de A β incorporado a dichas proteínas de fusión comienza algunas veces en A β 1-3 y termina en A β 7-11. El fragmento N-terminal de A β es A β 1-7, A β 1-3,1-4, 1-5, y 3-7. Algunas proteínas de fusión comprenden diferentes segmentos N-terminales de A β en tandem. Por ejemplo, una proteína de fusión puede comprender A β 1-7 seguido de A β 1-3 seguido de un péptido heterólogo.

En algunas proteínas de fusión, un segmento N-terminal de A β está fusionado como su extremo N-terminal a un péptido portador heterólogo. Puede usarse la misma variedad de segmentos N-terminales de A β con las fusiones C-terminales. Algunas proteínas de fusión comprenden un péptido heterólogo ligado al N-término de un segmento N-terminal de A β , el cual está a su vez ligado con uno o más segmentos N-terminales adicionales de A β en tandem.

Algunos ejemplos de proteínas de fusión apropiados para ser usadas en la invención se muestran a continuación. Algunas de las proteínas de fusión comprenden segmentos de A β ligados a los epítopos toxoide del tétanos tal como los descritos en la patente norteamericana 5.196.512, la patente europea 378.881 y la patente europea 427.347. Algunas proteínas de fusión comprenden segmentos de A β ligados a los péptidos portadores descritos en la patente

norteamericana 5.736.142. Algunos péptidos heterólogos son epitopos de célula T universales. En algunos métodos, el agente para la administración es simplemente una proteína de fusión simple con un segmento A β ligado a un segmento heterólogo en configuración lineal. En algunos métodos, el agente es un multímero de proteínas de fusión representadas por la fórmula 2^x, en la cual x es un número de 1-5. Preferiblemente, x es 1, 2 ó 3, prefiriéndose 2. Cuando x es dos dicho multímero tiene cuatro proteínas de fusión ligadas en una configuración preferida referida como MAP4 (ver patente norteamericana 5.229.490).

AN90549 (A β 1-7/toxoide del tétanos 830-844 en una configuración MAP4):

DAEFRHDQYIKANSKFIGITEL

AN90550 (A β 1-7/toxoide del tétanos 947-967 en una configuración MAP4):

DAEFRHDFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE

AN90542 (A β 1-7/toxoide del tétanos 830-844 + 947-967 en una configuración lineal):

DAEFRHDQYIKANSKFIGITELFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE

AN90576 (A β 3-9/toxoide del tétanos 830-944 en una configuración MAP4):

EFRHDSGQYIKANSKFIGITEL

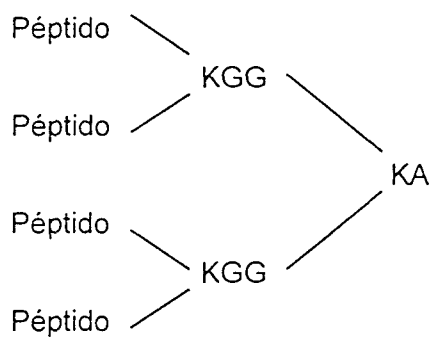
Péptido descrito en la patente norteamericana 5.736.142 (todos en configuración lineal):

AN90562 (A β 1-7/péptido) AKXVAAWTLKAAADAEFRHD

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

La configuración MAP4 se muestra a continuación, y en la misma las estructuras ramificadas se producen iniciando la síntesis del péptido en ambos lugares, las aminas de lisina de cadena lateral y N-terminal. Dependiendo de la

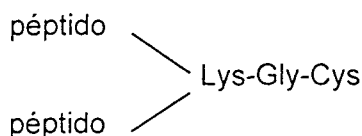
cantidad de veces en la que se incorpora la lisina a la secuencia y se la deja ramificar, la estructura resultante presentará múltiples términos N. En este ejemplo, se produjeron cuatro términos N idénticos en el núcleo que contiene lisina ramificada. Dicha multiplicidad mejora enormemente la respuesta de las células B relacionadas.



Otros ejemplos de proteínas de fusión (epitopo inmunogénico de A β en **negrita**) incluyen

AKXVAAWTLKAAA-**DAEFRHD**-**DAEFRHD**-**DAEFRHD**
DAEFRHD-AKXVAAWTLKAAA
DAEFRHD-ISQAVHAAHAEINEAGR
 FRHDSGY-ISQAVHAAHAEINEAGR
 EFRHDSG-ISQAVHAAHAEINEAGR
 PKYVKQNTLKLAT-**DAEFRHD**-**DAEFRHD**-**DAEFRHD**
DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT-**DAEFRHD**
DAEFRHD-**DAEFRHD**-**DAEFRHD**-PKYVKQNTLKLAT
DAEFRHD-**DAEFRHD**-PKYVKQNTLKLAT
DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT-EKKIAKMEKASSVFNV-
 QYIKANSKFIGITEL-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-**DAEFRHD**
DAEFRHD-**DAEFRHD**-**DAEFRHD**-QYIKANSKFIGITEL-
 FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE

DAEFRHD-QYIKANSKFIGITELCFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE
 DAEFRHD-QYIKANSKFIGITELCFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-
 DAEFRHD
 DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL en una resina de 2 ramificaciones



EQVTNVGGAISQAVHAAHAEINEAGR (Proteína de fusión de sinucleína en configuración MAP-4).

Pueden usarse las mismas proteínas portadoras y métodos de enlace o similares para generar inmunógenos para usarlos en la generación de anticuerpos contra Aβ para ser usados en la inmunización pasiva. Por ejemplo, Aβ o un fragmento ligado a un portador pueden administrarse a un animal de laboratorio para la producción de anticuerpos monoclonales para Aβ.

4. Agentes Terapéuticos que Codifican Acido Nucleico

Las respuestas inmunitarias contra depósitos amiloides pueden ser también inducidas por la administración de ácidos nucleicos que codifican segmentos del péptido Aβ y fragmentos del mismo, otros inmunógenos de péptidos, o anticuerpos y sus cadenas componentes usadas para la inmunización pasiva. Dichos ácidos nucleicos pueden ser ADN o ARN. Un segmento de ácido nucleico que codifica un inmunógeno está ligado típicamente a elementos reguladores tales como un promotor y un mejorador, que permiten la expresión del segmento ADN en las células objetivo propuestas de un paciente. Para la expresión en las células de la sangre, tal como es deseable para la inducción de una respuesta inmunitaria, los elementos promotores y mejoradores de los genes de inmunoglobulina de cadena liviana y pesada o el promotor y mejorador precoz

intermediario principal CMV son apropiados para dirigir la expresión. Los elementos reguladores ligados y las secuencias codificadoras son a menudo clonados en un vector. Para la administración de anticuerpos de doble cadena, las dos cadenas pueden clonarse en el mismo o en vectores separados.

Se encuentran disponibles una cantidad de sistemas vectores virales que incluyen sistemas retrovirales (ver por ejemplo, Lawrie y Tumin, *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3, 102-109 (1993)); vectores adenovirales (ver, por ejemplo, Bett et al., *J. Virol.* 67, 5911 (1993)); vectores de virus adeno-asociados (ver, por ejemplo, Zhou et al., *J. Exp. Med.* 179, 1867 (1994)), vectores virales de la familia de las erupciones pustulosas incluyendo el virus de vaccinia y los virus de erupciones de aves, vectores virales de los géneros de virus alfa tales como los derivados de los virus Sindbis y Semliki (ver, por ejemplo, Dubensky et al., *J. Virol.* 70, 508-519 (1996)), y virus de papiloma (Ohe et al., *Human Gene Therapy* 6, 325-333 (1995); Woo et al., WO 94/12629 y Xiao & Brandsma, *Nucleic Acids. Res.* 24, 2630-2622 (1996)).

El ADN que codifica un inmunógeno, o un vector que contiene el mismo, pueden envasarse en liposomas. Los lípidos apropiados y los análogos relacionados han sido descriptos en las patentes norteamericanas 5.208.036, 5.264.618, 5.279.833 y 5.283.185. Los vectores y el ADN que codifica un inmunógeno pueden ser también adsorbidos o asociados con portadores en partículas, ejemplos de los cuales incluyen polímeros de metacrilato de polimetilo y poliláctidos y poli(láctido-co-glicólidos), ver, por ejemplo McGee et al., *J. Micro Encap.* (1996).

Los vectores de terapia génica o los ADN desnudos pueden ser liberados in vivo por administración a un paciente individual, típicamente por administración sistémica (por ejemplo, por infusión intravenosa, intraperitoneal, nasal, gástrica, intradérmica, intramuscular, subdérmica o intracraneal) o por aplicación tópica

(ver por ejemplo, la patente norteamericana 5.399.346). El ADN puede administrarse también usando una pistola génica. Ver Xiao & Brandsma, *supra*. El ADN que codifica un inmunógeno precipita sobre la superficie de los gránulos de metal microscópicos. Los microproyectiles son acelerados con una onda shock o con gas de helio expandido que penetra los tejidos hasta una profundidad de varias capas de células. Por ejemplo, el Accel™ Gene Delivery Device manufacturado por Agacetus, Inc. Middleton WI es apropiado. Alternativamente, el ADN desnudo puede pasar a través de la piel hasta una corriente sanguínea simplemente salpicando ADN sobre la piel con irritación química o mecánica (ver WO 95/05853).

En otra variación, pueden administrarse vectores que codifican inmunógenos a las células ex vivo, tal como células explantadas de un paciente individual (por ejemplo linfocitos, aspirados de médula ósea, biopsia de tejido) o células generadores de linaje hematopoyéticas dadoras universales, seguido de reimplante de las células en un paciente, usualmente después de la selección de células que tienen el vector incorporado.

III. Anticuerpos Rastreadores para Actividad de Evacuación

La invención provee métodos para rastrear un anticuerpo para determinar la actividad en la evacuación de un depósito amiloide o cualquier otro antígeno, o una entidad biológica asociada, para lo cual se desea actividad de evacuación. Para rastrear la actividad contra un depósito amiloide, se pone en contacto una muestra de tejido de un cerebro de un paciente que sufre de la enfermedad de Alzheimer o de un modelo de animal que tiene la patología característica Alzheimer, con células fagocíticas portadoras de un receptor Fc, tal como células microgliales, y el anticuerpo bajo ensayo en un medio in vitro. En algunos métodos se combinan los componentes en una platina de microscopio para facilitar el monitoreo microscópico. Preferiblemente, se efectúa una serie de

medidas de la cantidad de depósito amiloide en la mezcla de reacción in vitro, a partir de un valor de línea de base antes de que prosiga la reacción, y uno o más de los valores de ensayo durante la reacción. El antígeno puede detectarse mediante tinción, por ejemplo, con un anticuerpo fluorescentemente rotulado, para A β u otro componente de placas amiloides. El anticuerpo usado para la tinción puede ser o no el mismo que el anticuerpo sometido a ensayo para la actividad de evacuación. Una reducción en relación a la línea de base durante la reacción de los depósitos amiloides indica que el anticuerpo sometido a ensayo tiene actividad evacuadora. Dichos anticuerpos son probablemente útiles para evitar o para tratar la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades amiloidogénicas.

Pueden usarse métodos análogos para rastrear anticuerpos para actividad en la evacuación de otros tipos de entidades biológicas. El ensayo puede usarse para detectar actividad evacuadora contra virtualmente cualquier clase de entidad biológica. Típicamente, la entidad biológica tiene algún rol en las enfermedades humanas o animales. La entidad biológica puede proveerse en forma de una muestra de tejido o en forma aislada. Si se provee como una muestra de tejido, la muestra de tejido está preferiblemente sin fijar para permitir un rápido acceso a los componentes de la muestra de tejido y para evitar perturbar la conformación de los componentes incidentes para la fijación. Ejemplos de muestras de tejido que pueden ensayarse en este ensayo incluyen tejido canceroso, tejido precanceroso, tejidos que contienen crecimiento de tejido benigno tales como verrugas o pecas, tejido infectado con microorganismos patógenos, tejidos infiltrados con células inflamatorias, tejidos portadores de matrices patológicas entre las células (por ejemplo pericarditis fibrinosa), tejido portador de antígenos aberrantes, y tejido de cicatrices. Ejemplos de entidades biológicas aisladas que pueden usarse incluyen A β , antígenos virales o virus, proteoglicanos, antígenos de otros microorganismos patógenos, antígenos tumorales, y moléculas de

adhesión. Dichos antígenos pueden obtenerse de fuentes naturales, por síntesis química o de expresión recombinante entre otros medios. La muestra de tejido o entidad biológica aislada se pone en contacto con células fagocíticas portadoras de los receptores Fc, tales como monocitos o células microgliales y un anticuerpo para ser ensayado en un medio. El anticuerpo puede dirigirse a la entidad biológica bajo ensayo o a un antígeno asociado con la entidad. En esta última situación el objetivo es ensayar si la entidad biológica ha sido indirectamente fagocitosada con el antígeno. Usualmente, aunque no necesariamente, el anticuerpo y la entidad biológica (algunas veces con un antígeno asociado) entran en contacto uno con el otro antes de agregado de las células fagocíticas. La concentración de la entidad biológica y/o del antígeno asociado, si está presente, que permanece en el medio, es luego monitoreada. Una reducción en la cantidad o concentración de antígeno o de entidad biológica asociada en el medio indica que el anticuerpo tiene una respuesta de evacuación contra el antígeno y/o la entidad biológica asociada conjuntamente con las células fagocíticas (ver por ejemplo, Ejemplo 14).

IV. PACIENTES QUE PUEDEN SER SOMETIDOS A TRATAMIENTO

Los pacientes que pueden ser sometidos a tratamiento incluyen individuos con riesgo de sufrir la enfermedad pero que no muestran ningún síntoma, así como también pacientes que están mostrando síntomas. En el caso de la enfermedad de Alzheimer, virtualmente cualquiera está en situación de riesgo de sufrir la enfermedad de Alzheimer si vive durante el tiempo suficiente. Por lo tanto, los presentes métodos pueden administrarse profilácticamente para la población en general sin ninguna verificación del riesgo al que está sometido el paciente. Los presentes métodos son especialmente útiles para individuos que tienen un riesgo genético conocido de la enfermedad de Alzheimer. Dichos individuos incluyen aquellos que tienen familiares que han sufrido esta enfermedad y

aquellos cuyo riesgo es determinado por el análisis de los marcadores genéticos o bioquímicos. Los marcadores genéticos que muestran el riesgo hacia la enfermedad de Alzheimer incluyen mutaciones en el gen APP, particularmente mutaciones en la posición 717 y en las posiciones 670 y 671 denominadas como mutación Hardy y Swedish respectivamente (ver Hardy, TINS, supra). Otros marcadores de riesgo son las mutaciones en los genes de presenilina, PS1 y PS2, y ApoE4, historia familiar de AD, hipercolesterolemia o aterosclerosis. Los individuos que sufren actualmente la enfermedad de Alzheimer pueden ser reconocidos por la característica demencia así como también por la presencia de los factores de riesgo descritos más arriba. Además, se encuentran disponibles una variedad de ensayos de diagnóstico para identificar individuos que tienen AD. Estos incluyen la medición de los niveles de CSF tau y A β 42. Los niveles tau elevados y A β 42 disminuidos significan presencia de AD. Los individuos que sufren de la enfermedad de Alzheimer pueden ser diagnosticados mediante criterios de ADRDA que han sido discutidos en la sección de los Ejemplos.

En los pacientes asintomáticos, el tratamiento puede comenzar a cualquier edad (por ejemplo, 10, 20, 30). Usualmente, sin embargo, no es necesario comenzar el tratamiento hasta que un paciente alcanza los 40, 50, 60 ó 70. El tratamiento típicamente abarca dosis múltiples en un período determinado de tiempo. El tratamiento puede ser monitoreado mediante ensayo de anticuerpos o por las respuestas de célula B o célula T activadas a los agentes terapéuticos (por ejemplo, el péptido A β) a lo largo del tiempo. Si la respuesta fracasa, se indica una dosis de refuerzo. En el caso de pacientes con síndrome Down's potencial, el tratamiento puede comenzar prenatalmente mediante la administración de agentes terapéuticos a la madre o poco tiempo después del nacimiento.

V. REGIMENES DE TRATAMIENTO

En aplicaciones profilácticas, los medicamentos o composiciones farmacéuticas se administran a un paciente susceptible o que corre el riesgo de sufrir la enfermedad de Alzheimer en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo, disminuir la gravedad o demorar el comienzo de la enfermedad incluyendo síntomas bioquímicos, histológicos y/o de comportamiento de la enfermedad, sus complicaciones y os fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. En aplicaciones terapéuticas las composiciones o medicamentos se administran a un paciente del cual se sospecha que sufre o que ya se sabe que sufre dicha enfermedad, en una cantidad suficiente para curarlo o por lo menos para detener parcialmente los síntomas de la enfermedad (bioquímicos, histológicos y/o de comportamiento), incluyendo sus complicaciones y los fenotipos patológicos intermedios en el desarrollo de la enfermedad. En algunos métodos, la administración del agente reduce o elimina el deterioro miocognitivo de pacientes que todavía no han desarrollado la característica de la patología Alzheimer. Una cantidad adecuada para lograr el tratamiento terapéutico se define como una dosis terapéutica o farmacéuticamente eficaz. Tanto los regímenes profilácticos como terapéuticos, usualmente los agentes se administran en varias dosis hasta que se logra una respuesta inmunitaria suficiente. Típicamente, la respuesta inmunitaria es monitoreada y se administran dosis repetidas si la respuesta inmunitaria comienza a desaparecer.

Las dosis eficaces de las composiciones de la presente invención para el tratamiento de las condiciones previamente descritas varían dependiendo de muchos factores diferentes que incluyen los medios de administración, el sitio al que va dirigido, el estado fisiológico del paciente, si el paciente es un ser humano o un animal, las otras medicaciones administradas, y si el tratamiento es

profiláctico o terapéutico. Usualmente, el paciente es un ser humano pero también pueden tratarse mamíferos no humanos incluyendo mamíferos transgénicos. Las dosis de tratamiento deben ser tituladas para optimizar la seguridad y eficacia. La cantidad de inmunógeno depende de si se administra también coadyuvante, requiriéndose dosis más altas en ausencia del coadyuvante. La cantidad de inmunógeno para la administración varía algunas veces de 1-500 μg por paciente y más usualmente de 5-500 μg por inyección para administración humana. Ocasionalmente, se usa una dosis superior de 1-2 mg para inyección. Típicamente, se usan aproximadamente 10, 20, 50 ó 100 μg para cada inyección en humanos. La masa de inmunógeno depende también de la relación de masa del epitopo inmunogénico dentro del inmunógeno a la masa de inmunógeno en general. Típicamente, se usan 10^3 a 10^5 micromoles de epitopo inmunogénico por microgramo de inmunógeno. El tiempo de aplicación de las inyecciones puede variar significativamente y va desde una vez por día, hasta una vez por año, hasta una vez por década. En cualquier día determinado en el que se administran la dosis de inmunógeno, la dosis es de más de 1 gramo/paciente y usualmente más de 10 μg /paciente si se administra también coadyuvante, y de más de 10 μg /paciente y usualmente más de 100 μg /paciente en ausencia de coadyuvante. Un régimen típico consiste en una inmunización seguida de inyecciones de refuerzo a intervalos de 6 semanas. Otro régimen consiste en una inmunización seguida de inyecciones de refuerzo a 1, 2 y 12 meses más tarde. Otro régimen comprende una inyección cada dos meses durante toda la vida. Alternativamente, pueden aplicarse inyecciones de refuerzo en una base irregular de acuerdo a lo que indique el monitoreo de la respuesta de inmunidad.

Para la inmunización pasiva con un anticuerpo, las dosis están en un rango de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg y más usualmente 0,01 a 5 mg/kg del peso corporal del huésped. Por ejemplo las dosis pueden ser 1 mg/kg de peso del

cuerpo ó 10 mg/kg de peso del cuerpo. Un régimen de tratamiento que constituye un ejemplo comprende la administración de una vez por día durante dos semanas o una vez por mes o una vez cada 3 a 6 meses. En algunos métodos, se administran simultáneamente dos o más anticuerpos monoclonales diferentes especificidades de adhesión, en cuyo caso la dosis de cada anticuerpo administrado está dentro de los rangos indicados. El anticuerpo usualmente se administra en ocasiones múltiples. Los intervalos entre dosis simples pueden ser semanales, mensuales o anuales. Los intervalos pueden ser también irregulares según se indica por la medición de los niveles de anticuerpo a A β en la sangre del paciente. En algunos métodos la dosis se ajusta para lograr una concentración de anticuerpo de plasma de 1-1000 μ g/ml y en algunos métodos de 25-300 μ g/ml.

Alternativamente, el anticuerpo puede administrarse en forma de una formulación de liberación sostenida en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosis y la frecuencia varían dependiendo de la vida media del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la vida media más prolongada; seguido de anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, y anticuerpos no humanos. La dosis y frecuencia de administración puede variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosis relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes por un período de tiempo prolongado. Algunos pacientes siguen recibiendo tratamiento durante el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, algunas veces se requiere una dosis relativamente elevada a intervalos relativamente cortos hasta que la enfermedad avanza se reduce o termina, y preferiblemente hasta que el paciente muestra una mejoría parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. A continuación, pueden administrarse al paciente un régimen profiláctico.

Las dosis para los ácidos nucleicos que codifican inmunógenos varían desde aproximadamente 10 ng hasta 1 g, 100 ng hasta 100 mg, 1 μ g a 10 mg, ó 30-300 μ g de ADN por paciente. La dosis para vectores virales infecciosos varían desde 10-100, o más, viriones por dosis.

Los agentes para inducir una respuesta inmunitaria pueden administrarse por medios parenterales, tópicos, intravenosos, orales, subcutáneos, intraperitoneales, intranasales o intramusculares para tratamiento profiláctico y/o terapéutico. La vía más típica de administración de un agente inmunogénico es la vía subcutánea aunque pueden ser igualmente eficaces otras. La siguiente más común es la inyección intramuscular. Este tipo de inyección se lleva a cabo muy típicamente en los músculos del brazo o la pierna. Las inyecciones intravenosas así como también las inyecciones intraperitoneales, intraarteriales, intracraneanas o intradérmicas son también eficaces para generar una respuesta inmunitaria. En algunos métodos, se inyectan agentes directamente a un tejido particular donde se han acumulado los depósitos por ejemplo inyección intracraneal. Se prefiere la inyección intramuscular o infusión intravenosa para la administración del anticuerpo. En algunos métodos, se inyectan anticuerpos terapéuticos particulares directamente en el cráneo. En algunos métodos se administran anticuerpos en forma de una composición o dispositivo de liberación sostenida tal como un dispositivo MedipadTM.

Los agentes de la invención pueden administrarse opcionalmente en combinación con otros agentes que son por lo menos parcialmente eficaces para el tratamiento de la enfermedad amiloidogénica. En el caso de la enfermedad de Alzheimer y el síndrome de Down, donde los depósitos amiloides se producen en el cerebro, pueden administrarse también los agentes de la invención conjuntamente con otros agentes que incrementan el pasaje de los agentes de la invención a través de la barrera de sangre-cerebro.

Los agentes inmunogénicos de la invención, tales como los péptidos se administran algunas veces en combinación con un coadyuvante. Puede usarse una variedad de coadyuvantes en combinación con un péptido tal como A β para obtener una respuesta inmunitaria. Los coadyuvantes preferidos aumentan la respuesta intrínseca para un inmunógeno sin causar cambios conformacionales en el inmunógeno que afecten la forma cualitativa de la respuesta. Los coadyuvantes preferidos incluyen alumbre, lípido A de monofosforilo 3 De-O-acilado (MPL) (ver patente británica 2220211). El QS-21 es un triterpeno glicósido o saponina aislado de la corteza del árbol Quillaja Saponaria Molina se encuentra en Sudamérica (ver Kensil et al., in *Vaccine Design: The Subunit and Ajuvant Approach* (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); patente US N° 5.057.540). Otros coadyuvantes son emulsiones de aceite en agua (tales como escualeno o aceite de maní), opcionalmente en combinación con estimulantes inmunes tales como el lípido A de monofosforilo (ver Stoute et al., *N. Engl. J. Med.* 336, 86-91 (1997)). Otro coadyuvante es CpG (*Bioworld Today*, Nov. 15, 1998). Alternativamente, puede acoplarse A β a un coadyuvante. Sin embargo, dicho acoplamiento no cambiar sustancialmente la conformación de A β como para aceptar la naturaleza de la respuesta inmunitaria para el mismo. Los coadyuvantes pueden administrarse en forma de componentes de una composición terapéutica con un agente activo o pueden administrarse por separado, antes, concurrentemente, o después de la administración del agente terapéutico.

Una clase preferida de coadyuvantes es son las sales de aluminio (alumbre), tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio. Dichos coadyuvantes pueden usarse con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como MPL ó 3-DMP, QS-21, aminoácidos poliméricos o monoméricos tales como ácido poliglutámico o polilisina. Otra clase

de coadyuvantes son las formulaciones de emulsión de aceite en agua. Dichos coadyuvantes pueden usarse con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como péptidos de muramilo (por ejemplo, N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicerol-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), N-acetilglucaminil-N-acetilmuramil-L-Al-D-isoglu-L-Ala-dipalmitoxi propilamida (DTP-DPP) teramida TM), u otros componentes de la pared celular bacteriana. Las emulsiones de aceite en agua incluyen (a) MF59 (WO 90/14837), que contiene 5% de Squalene, 0,5% de Tween 80, y 0,5% de Span 85 (opcionalmente contiene varias cantidades de MTP-PE) formulado en partículas submicrónicas usando un microfluidificador tal como el microfluidificador Modelo 110Y (Microfluidics, Newton MA), (b) SAF, que contiene 10% de Squalene, 0,4% de Tween 80, 5% polímero L121 bloqueado con pluronic y tre-MP, ya sea microfluidificado en una emulsión submicrónica o agitado hasta vórtice para generar una emulsión de un tamaño de partícula más grande y (c) el sistema coadyuvante RibiTM (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) que contiene 2% de escualeno, 0,2% de Tween 80, y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste en lípido de monofosforilo A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM), y el esqueleto de la pared celular (CWS), preferiblemente MPL + CWS (DetoxTM). Otra clase de coadyuvantes preferidos son los coadyuvantes de saponina, tales como StimulonTM (QS-21, Aquila, Worcester, MA) o las partículas generadas a partir de los mismos tales como ISCOM (complejos inmunes estimuladores) y ISCOMATRIX. Otros coadyuvantes incluyen el coadyuvante completo de Freund (CFA) y el coadyuvante incompleto de Freund (IFA). Otros coadyuvantes incluyen citoquinas tales como interleuquinas (IL-1, IL-2 y IL-12), factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF).

Un coadyuvante puede administrarse con un inmunógeno en forma de una composición simple o puede administrarse antes, concurrentemente o después de la administración del inmunógeno. El inmunógeno y el coadyuvante pueden ser envasados y suministrados en el mismo envase o pueden envasarse en envases separados y mezclarse antes del uso. El inmunógeno y los coadyuvantes se envasan típicamente con un rótulo que indica la aplicación terapéutica propuesta. Si el inmunógeno y el coadyuvante se envasan por separado, el envase incluye típicamente instrucciones para mezclar antes del uso. La elección del coadyuvante y/o portador depende de la estabilidad de la vacuna que contiene el coadyuvante, la ruta de administración, el programa de dosificación, la eficacia del coadyuvante para la especie que se está vacunando y en los seres humanos un coadyuvante farmacéuticamente aceptable es uno que ha sido aprobado o que puede ser aprobado para administración humana por los cuerpos reguladores pertinentes. Por ejemplo, el coadyuvante completo de Freund no es apropiado para administración humana. Se prefiere alumbre, MPL y QS-21. Opcionalmente, pueden usarse simultáneamente dos o más coadyuvantes diferentes. Las combinaciones preferidas incluyen alumbre con MPL, alumbre con QS-21, MPL con QS-21 y alumbre, QS-21 y MPL conjuntamente. Asimismo, puede usarse el coadyuvante incompleto de Freund (Chang et al., *Advanced Drug Delivery Reviews* 32, 173-186 (1998)), opcionalmente en combinación con cualquiera de alumbre, QS-21 y MPL y todas las combinaciones de los mismos.

Los agentes de la invención a menudo se administran en forma de composiciones farmacéuticas que comprenden un agente terapéutico activo y una variedad de otros componentes farmacéuticamente aceptables. Ver *Remington's Pharmaceutical Science* (15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1980). La forma preferida depende del modo de administración y de la aplicación terapéutica propuestas. Las composiciones pueden incluir

también dependiendo de la formulación deseada, diluyentes o portadores no tóxicos farmacéuticamente aceptables que se definen como vehículos comúnmente usados para formular composiciones farmacéuticas para administración humana o animal. El diluyente se selecciona de modo que no afecte la actividad biológica de la combinación. Ejemplos de dichos diluyentes son agua destilada, solución salina fisiológica regulada con fosfato, soluciones de Ringer, solución de dextrosa, y solución de Hank. Además, la composición o formulación farmacéutica puede incluir también otros portadores, coadyuvantes o estabilizadores no tóxicos, no terapéuticos, no inmunogénicos y similares. Sin embargo, algunos reactivos que son apropiados para la administración a los animales tales como el coadyuvante completo de Freund no están típicamente incluidos en las composiciones para uso humano.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir también macromoléculas grandes, metabolizadas en forma lenta, tales como proteínas, polisacáridos tales como quitosan, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos y copolímeros (tales como sefaroza funcionalizada al látex, agarosa, celulosa, y similares), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y agregados lípidos (tales como liposomas o gotas de aceite). Adicionalmente, estos portadores pueden funcionar como agentes inmunoestimulantes (es decir, coadyuvantes).

Para la administración parenteral, los agentes de la invención pueden administrarse como dosis inyectables de una solución o suspensión de la sustancia en un diluyente fisiológicamente aceptable con un portador farmacéutico que puede ser un líquido estéril tal como agua, aceite, solución salina, glicerol o etanol. Adicionalmente, pueden estar presentes en las composiciones sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tensoactivos, sustancias reguladores de pH y similares. Otros componentes de las composiciones farmacéuticas son los de petróleo, de

origen animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de maní, aceite de soja, y aceite mineral. En general, se prefieren portadores líquidos de glicoles tales como propilen glicol o polietilen glicol, particularmente para soluciones inyectables. Los anticuerpos pueden administrarse en forma de una inyección de depósito o una preparación de implante que puede formularse de tal manera que permita una liberación sostenida del ingrediente activo.

Un ejemplo de la composición comprende un anticuerpo monoclonal a 5 mg/mL, formulado en un buffer acuoso que consiste en 50 mM de L-histidina, 150 mM de NaCl, ajustado a un pH de 6,0 con HCl.

Típicamente, se preparan composiciones en forma de inyectable ya sea como soluciones o suspensiones líquidas; las formas sólidas apropiadas para solución, o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección también pueden prepararse. La preparación puede emulsionarse o encapsularse o en liposomas o en micropartículas tales como polilácteo, poliglicólido o copolímero para mejorar el efecto coadyuvante según se discutirá más arriba (ver Langer, *Science* 249, 1527 (1990) y Hanes, *Advanced Drug Delivery Reviews* 28, 97-119 (1997). Los agentes de esta invención pueden administrarse en forma de una inyección de depósito o una preparación de implante que puede formularse de tal manera que permita una liberación sostenida o pulsátil del ingrediente activo.

Las formulaciones adicionales apropiadas para otros modos de administración incluyen formulaciones orales, intranasales y pulmonares, supositorios y aplicaciones transdérmicas.

Para los supositorios, los aglutinantes y portadores incluyen por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; dichos supositorios pueden formarse a partir de mezclas que contienen el ingrediente activo en el rango de 0,5% a 10%, preferiblemente 1%-2%. Las formulaciones orales incluyen excipientes tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio,

sacarina de sodio, celulosa y carbonato de magnesio. Estas composiciones tienen la forma de soluciones, suspensiones, tabletas, pastillas, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y contienen 10%-95% del ingrediente activo, preferiblemente 25%-70%.

La aplicación tópica puede dar como resultado liberación transdérmica o intradérmica. Una administración tópica puede estar facilitada por la co-administración del agente con la toxina del cólera o con derivados destoxificados o con sub-unidades de los mismos u otras toxinas bacterianas similares (ver Glenn *et al.*, *Nature* 391, 851 (1998)). La co-administración puede lograrse mediante el uso de componentes tales como una mezcla o moléculas ligadas obtenidas mediante entrecruzamiento químico o expresión como proteína de fusión.

Alternativamente puede lograrse la liberación transdérmica usando una vía dérmica o usando transferosomas (Paul *et al.*, *Eur. J. Immunol*, 25, 3521-24(1995); Ceve *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta* 1368,201-15 (1998)).

VI. Métodos de Diagnóstico

La invención provee métodos para detectar una respuesta inmunitaria contra el péptido A β en un paciente que sufre o que es susceptible de sufrir la enfermedad de Alzheimer. Los métodos son particularmente útiles para monitorear un curso de tratamiento que se administra a un paciente. Los métodos pueden usarse para monitorear tanto el tratamiento terapéutico en pacientes sintomáticos como el tratamiento profiláctico en pacientes asintomáticos. Los métodos son útiles para monitorear la inmunización activa (por ejemplo, anticuerpos producidos en respuesta a la administración de inmunógeno), y la inmunización pasiva (por ejemplo, para medir el nivel de anticuerpo administrado).

1. Inmunización Activa

Algunos métodos abarcan la determinación de un valor de línea de base de una respuesta de inmunidad en un paciente antes de administrar una dosis del agente y comparar esto con un valor para la respuesta inmunitaria después del tratamiento. Un incremento significativo (es decir superior al margen típico del error experimental en mediciones repetidas de la misma muestra expresado como desviación estándar, desde el promedio de dichas mediciones) en valor de la respuesta inmunitaria señala un resultado positivo del tratamiento (es decir, que la administración del agente ha logrado o ha aumentado una respuesta inmunitaria). Si el valor de la respuesta inmunitaria no cambia significativamente, o si disminuye, se indica un resultado de tratamiento negativo. En general, se espera que los pacientes sometidos a un curso inicial de tratamiento con un agente inmunógeno mostrarán un aumento de respuesta inmunitaria a lo largo de dosis sucesivas que alcanzarán eventualmente una meseta. La administración del agente generalmente continúa mientras se incrementa la respuesta inmunitaria. Llegar a la meseta significa un indicador de que la administración del tratamiento puede interrumpirse o reducirse la dosis o la frecuencia.

En otros métodos, se determina un valor de control (es decir, la desviación media y estándar) de la respuesta inmunitaria para una población de control. Típicamente los individuos de la población de control no han recibido un tratamiento previo. Los valores medidos de respuesta inmunitaria en un paciente después de administrar un agente terapéutico se comparan luego con el valor de control. Un incremento significativo en relación al valor de control (por ejemplo superior a una desviación estándar del promedio) señala un resultado positivo del tratamiento. Una falta de incremento significativa o señales de disminución indican un resultado negativo para el tratamiento. La administración del agente generalmente se continúa mientras la respuesta inmunitaria crece en relación al

valor de control. Tal como precedentemente, cuando se llega a una meseta en relación a los valores de control se considera que es un indicador de que puede interrumpirse la administración del tratamiento o puede reducirse la dosis o frecuencia.

En otros métodos, se determina un valor de control de la respuesta de inmunidad (por ejemplo una desviación promedio y estándar) de la población de control en individuos que han sido sometidos a un tratamiento con un agente terapéutico y cuyas respuestas de inmunidad han llegado a una meseta en respuesta al tratamiento. Los valores de respuesta inmunitaria medidos en un paciente se comparan con el valor de control. Si el nivel medido en un paciente no es significativamente diferente, (por ejemplo de más de una desviación estándar) desde el valor de control, puede interrumpirse el tratamiento. Si el nivel en un paciente está significativamente por debajo del valor de control, se garantiza la continuación de la administración del agente. Si el nivel en el paciente persiste por debajo del valor de control, entonces puede indicarse un cambio del régimen de tratamiento, por ejemplo el uso de un coadyuvante diferente.

En otros métodos, un paciente que no está recibiendo actualmente tratamiento pero que ha sido sometido a un curso previo de tratamiento, es monitoreado para la respuesta inmunitaria a fin de determinar si se requiere reanudar el tratamiento. El valor medido de respuesta inmunitaria en el paciente puede compararse con un valor de la respuesta inmunitaria logrado previamente en el paciente después de un curso de tratamiento previo. Una disminución significativa en relación a la medición previa (es decir, de más de un margen típico de error en mediciones repetidas de la misma muestra), constituye una indicación de que puede resumirse el tratamiento. Alternativamente, el valor medido en un paciente puede compararse con un valor de control (desviación promedio además de estándar) determinada en una población de pacientes después de sufrir un

curso de tratamiento. Alternativamente el valor medido en un paciente puede compararse con un valor de control en poblaciones de pacientes profilácticamente tratados que permanecen libres de síntomas de la enfermedad o poblaciones de pacientes terapéuticamente tratados que muestran una mejora de las características de la enfermedad. En todos estos casos, una disminución significativa en relación al nivel de control (es decir de más de una desviación estándar) constituye una indicación de que el tratamiento debe ser reanudado por el paciente.

La muestra de tejido para análisis es típicamente sangre, plasma, suero, mucosa o fluido cerebroespinal de un paciente. La muestra es analizada para una indicación de una respuesta inmunitaria para cualquier forma de péptido A β típicamente A β 42. La respuesta inmunitaria puede determinarse por la presencia de por ejemplo anticuerpos o células T que se adhieren específicamente al péptido A β . Los métodos ELISA para detectar anticuerpos específicos para A β han sido descritos en la sección de ejemplos. Los métodos para detectar células T reactivas han sido descritas precedentemente (ver definiciones).

2. Inmunización Pasiva

En general, los procedimientos para monitorear la inmunización pasiva son similares a los que se usan para monitorear la inmunización activa descrita precedentemente. Sin embargo, el perfil de anticuerpos siguiendo la inmunización pasiva muestra típicamente un pico inmediato en la concentración de anticuerpos seguido de una disminución exponencial. Sin dosificación adicional la disminución se acerca a los niveles de pre-tratamiento dentro de un período de días hasta meses dependiendo de la vida media del anticuerpo administrado. Por ejemplo, la vida media de algunos anticuerpos humanos es del orden de 20 días.

En algunos métodos, una medición de la línea de base del anticuerpo para A β en el paciente se efectúa antes de la administración, y se efectúa una segunda medición poco tiempo después de determinar el nivel pico de anticuerpos, y una o más mediciones adicionales a intervalos para monitorear la disminución de los niveles de anticuerpo. Cuando declina el nivel de anticuerpo hasta la línea de base o hasta un porcentaje predeterminado de la línea de base menos pico (por ejemplo 50%, 25%, 10%), se administra la administración de una dosis adicional de anticuerpos. En algunos métodos, los niveles pico o medidos subsiguientemente menos la base se comparan con los niveles de referencia previamente determinados para constituir un régimen de tratamiento profiláctico o terapéutico beneficioso para otros pacientes. Si el nivel de anticuerpo medido es significativamente inferior al nivel de referencia (por ejemplo menos del promedio menos una desviación estándar del valor de referencia en la población de pacientes que se beneficia del tratamiento) está indicada la administración de una dosis adicional de anticuerpos.

3. Equipos de Diagnóstico

La invención provee además equipos de diagnóstico para llevar a cabo los métodos de diagnóstico descritos más arriba. Típicamente dichos equipos contienen un agente que se adhiere específicamente a los anticuerpos para A β . El equipo puede incluir también un rótulo. Para la detección de anticuerpos para A β , el rótulo tiene típicamente la forma de anticuerpos anti-idiotípicos rotulados. Para la detección de anticuerpos el agente puede suministrarse pre-adherido a una fase sólida tal como a los receptáculos de una placa microtituladora. Los equipos contienen también típicamente rotulación que provee las instrucciones para usar el equipo. La rotulación puede incluir también un programa u otro régimen de correspondencia que correlaciona los niveles de rótulo medidos con los niveles de

anticuerpos para A β . El término rotulación se refiere a cualquier material escrito o registrado que es adherido a, o que acompaña de cualquier otra manera el equipo en cualquier momento durante su manufactura, transporte, venta o uso. Por ejemplo, el término rotular abarca rótulos o folletos de publicidad, materiales de empaque, instrucciones, audio, o video cassetes, disquetes de computadora y como también escritura impresa directamente sobre los equipos.

La invención provee también equipos para diagnóstico para llevar a cabo formación de imágenes *in vivo*. Dichos equipos contienen típicamente un anticuerpo que se adhiere a un epitopo de A β preferiblemente dentro de los residuos 1-10. Preferiblemente, el anticuerpo está rotulado o se incluye un reactivo rotulador secundario en el equipo. Preferiblemente el equipo está rotulado con instrucciones para llevar a cabo un ensayo de formación de imágenes *in vivo*.

VII. Formación de Imágenes *in vivo*

La invención provee métodos de formación de imágenes *in vivo* de depósitos amiloides en un paciente. Dichos métodos son útiles para diagnosticar o confirmar el diagnóstico de enfermedad de Alzheimer o susceptibilidad a la misma. Por ejemplo, los métodos pueden usarse en un paciente que presenta síntomas de demencia. Si el paciente tiene depósitos amiloides anormales entonces dicho paciente sufrirá probablemente de la enfermedad de Alzheimer. El método puede usarse también en pacientes asintomáticos. La presencia de depósitos anormales de amiloides indica susceptibilidad a la futura enfermedad sintomática. Los métodos son también útiles para monitorear el avance de la enfermedad y/o para responder al tratamiento en pacientes a los que se les ha diagnosticado previamente enfermedad de Alzheimer.

Los métodos funcionan mediante la administración de un reactivo, tal como un anticuerpo que se adhiere a A β en el paciente y luego detectar el agente una vez fijado. Los anticuerpos preferidos se adhieren a los depósitos A β en un paciente sin adherirse al polipéptido APP de longitud total. Los anticuerpos que se adhieren a un epitopo de A β con los aminoácidos 1-10 son particularmente preferidos. En algunos métodos el anticuerpo se adhiere a un epitopo dentro de los aminoácidos 7-10 de A β . Dichos anticuerpos se adhieren típicamente sin introducir una respuesta sustancial de evacuación. En otros métodos el anticuerpo se adhiere a un epitopo dentro de los aminoácidos 1-7 de A β . Dichos anticuerpos típicamente se adhieren e inducen una respuesta de evacuación para A β . Sin embargo la respuesta de evacuación puede evitarse mediante el uso de fragmentos de anticuerpos que carecen de una región constante de longitud total tal como Fabs. En algunos métodos, el mismo anticuerpo puede servir como tratamiento o como reactivo de diagnóstico. En general los anticuerpos que se adhieren a los epitopos C-terminales del residuo 10 de A β no muestran una señal tan fuerte como la de los anticuerpos que se adhieren a los epitopos dentro de los residuos 1-10 presumiblemente debido a que los epitopos C-terminales son inaccesibles en los depósitos amiloides. Por consiguiente dichos anticuerpos son menos preferidos.

Los reactivos de diagnóstico pueden administrarse mediante inyección intravenosa en el cuerpo del paciente o directamente en el cerebro mediante inyección intracraneana o por perforación de un orificio a través del cráneo. La dosis de reactivo debería estar dentro de los mismos rangos que en los métodos de tratamiento. Típicamente, el reactivo es rotulado, aunque en algunos métodos, el reactivo primario con afinidad para A β no se rotula y se usa un segundo agente rotulador para adherirlo al primer reactivo. La elección del rótulo depende del medio de detección. Por ejemplo, un rótulo fluorescente es apropiado para

detección óptica. El uso de rótulos paramagnéticos es adecuado para la detección tomográfica sin intervención quirúrgica. Los rótulos radioactivos pueden ser también detectados usando PET o SPECT.

El diagnóstico se lleva a cabo comparando el número, el tamaño, y/o la intensidad de los lugares rotulados para los correspondientes valores de la línea de base. Los valores de la línea de base pueden representar los niveles medios en una población de individuos sin la enfermedad. Los valores de línea de base pueden representar también niveles previos determinados en el mismo paciente. Por ejemplo, los valores de línea de base pueden determinarse en un paciente antes de comenzar el tratamiento, y medirse luego los valores, comparándolos con los valores de la línea de base. Una disminución en los valores en relación a las señales de la línea de base significa una respuesta positiva al tratamiento.

EJEMPLOS

I. EFICACIA PROFILÁCTICA DE A β CONTRA AD

Estos ejemplos describen la administración del péptido A β 42 para ratones transgénicos que sobre-expresan APP con una mutación en la posición 717 (APP_{717→F}) que los predispone a desarrollar neuropatología de tipo Alzheimer. La producción y las características de estos ratones (ratones PDAPP) ha sido descrita en Games et al., *Nature, supra*. Estos animales, en su forma heterocigota comienzan a depositar A β desde los seis meses de edad en adelante. A los 15 meses de edad exhiben niveles de deposición de A β equivalentes a los que se observan en la enfermedad de Alzheimer. Se inyectaron ratones de PDAPP con A β ₄₂ agregado (A β ₄₂ agregados) o solución salina regulada con fosfato. Se elige el A β ₄₂ agregado debido a su capacidad para inducir a los anticuerpos a multiplicar epitopos de A β .

A. METODOS

1. Fuente de los Ratones

Treinta ratones hembra heterogénicos PDAPP se dividieron al azar en los siguientes grupos: 10 ratones fueron inyectados con $A\beta_{42}$ agregado (uno de ellos murió en tránsito), 5 ratones fueron inyectados con PBS/adyuvante o PBS, y 10 fueron controles no inyectados. Cinco ratones fueron inyectados con péptidos derivados de la secuencia de la proteína amiloide de suero (SAP).

2. Preparación de Inmunógenos

Preparación de Ab_{42} agregado: dos miligramos de $A\beta_{42}$ (US Peptides Inc. lot K-42-12) se disolvieron en 0,9 ml de agua y se completó hasta 1 ml mediante el agregado de 0,1 ml de 10 x PBS. Esto se agitó hasta torbellino y se dejó incubar durante la noche a 37°C bajo cuyas condiciones se agregó el péptido. Cualquier $A\beta$ no usado fue almacenado como polvo liofilizado seco a -20°C hasta la siguiente inyección.

3. Preparación de Inyecciones

Para cada inyección se emulsionaron 100 μ g de $A\beta_{42}$ agregado en PBS por ratón a razón de 1:1 con coadyuvante completo de Freund (CFA) hasta un volumen final de 400 μ l de emulsión para la primera inmunización, seguido de un refuerzo de la misma cantidad de inmunógeno en coadyuvante incompleto de Freund (IFA) a las dos semanas. Se administraron dos dosis adicionales de IFA a intervalos mensuales. Las siguientes inmunizaciones se efectuaron a intervalos mensuales en 500 μ l de PBS. Las inyecciones fueron administradas intraperitonealmente (i.p.).

Las inyecciones de PBS siguieron el mismo programa y los ratones fueron inyectados con una mezcla de 1:1 de PBS/coadyuvante a razón de 400 μ l por

ratón, o 500 μ l de PBS por ratón. Las inyecciones SAP siguieron también el mismo programa usando una dosis de 100 μ g por inyección.

4. Titulación de Sangre de Ratón, Preparación del Tejido e Inmunohistoquímica

Los métodos precedentes se describen infra en Materiales y Métodos Generales.

B. RESULTADOS

Se inyectaron ratones PDAPP con A β 42 agregado (A β 42 agregado), péptidos SAP, o solución salina regulada con fosfato. También se dejó sin inyectar un grupo de ratones PDAPP, como controles positivos. Los títulos de los ratones A β 42 agregado se monitorearon cada mes por medio a partir del cuarto refuerzo hasta que los ratones tuvieron un año de edad. Los ratones se sacrificaron a los 13 meses. En todos los momentos en los que se los examinó a los nueve ratones con A β 42 agregado desarrollaron un título elevado de anticuerpos, que permaneció alto a través de toda la serie de inyecciones (títulos de más de 1/10000). El noveno ratón tenía un título bajo pero mensurable de aproximadamente 1/1000 (Figura 1, Tabla 1). Los ratones inyectados con SAPP tenían títulos de 1:1000 a 1:30000 para este inmunógeno, y uno de los ratones solamente excedía solamente 1:10000.

Los ratones tratados con PBS se titularon contra A β 42 a los seis, diez y doce meses. A una dilución de 1/100 los ratones con PBS, cuando se titularon contra A β 42 agregado excedieron únicamente 4 veces la base en un punto de tiempo, y por otra parte en menos de cuatro veces la base en todos los períodos de tiempo (Tabla 1). La respuesta específica a SAP fue insignificante en estos períodos de tiempo y todos los títulos fueron inferiores a 300.

Siete de cada nueve ratones del grupo del grupo tratado con A β 1-42 no mostraron amiloides detectables en sus cerebros. En contraste, el tejido cerebral de ratones en los grupos SAP y PBS contenían numerosos depósitos amiloides en el hipocampo, también en las cortezas frontales y cinguladas. El patrón de deposición fue similar al de los controles no tratados, con una característica involucración de las sub-regiones vulnerables, tal como la capa molecular externa del giro dentado hipocampal. Un ratón del grupo inyectado con A β 1-42 tenía una carga amiloide enormemente reducida, confinada en el hipocampo. Se identificó una placa aislada en otro ratón tratado con A β 1-42.

Los análisis de imagen cuantitativos de la carga amiloide en el hipocampo verificaron la dramática reducción lograda en los animales tratados con A β 42(AN1792) (Figura 2). Los valores medios de la carga amiloide para el grupo PBS (2,22%), y para el grupo de control no tratado (2,65%) fueron significativamente superiores a la de los ratones inmunizados con AN1792 (0,00%, $p=0,0005$). En contraste, el valor medio del grupo inmunizado con los péptidos SAP (SAPP) fue de 5,74%. El tejido de los cerebros de los ratones de control no tratados contenía numerosos depósitos amiloides A β visualizados con el anticuerpo monoclonal específico de A β (mAb) 3D6 en el hipocampo así como también en la corteza retrosplenial. También se observó un patrón de deposición similar en ratones inmunizados con SAPP o PBS (fig.2). Además, en estos últimos tres grupos se observó una característica involucración de las subregiones vulnerables del cerebro que se observa clásicamente en AD, tal como la capa molecular externa del giro dentado hipocampal en la totalidad de estos tres grupos.

Los cerebros que no contenían depósitos A β estaban también libres de placas neuríticas que son visualizadas típicamente en los ratones PDAPP con el anticuerpo APP humano 8E5. Todos los cerebros de los grupos remanentes

(ratones inyectados con SAP, PBS y no inyectados) tenían numerosas placas neuríticas típicas de los ratones PDAPP no tratados. Estaba presente una pequeña cantidad de placas neuríticas en un ratón tratado con AN1792, y un cúmulo simple de neuritas distróficas se encontró en un segundo ratón tratado con AN1792. Los análisis de imagen del hipocampo, que se muestran en la figura 3, demuestran la virtual eliminación de las neuritas distróficas y los ratones tratados con An1792 (promedio 0,00%), en comparación con los receptores de PBS (promedio 0,28%, $p=0,0005$).

La astrocitosis característica de la inflamación asociada con placas también estaba ausente de los cerebros del grupo inyectado con A β 1-42. Los cerebros de los ratones de los otros grupos contenían abundantes astrocitos positivos de GFAP y en racimos, típicos de la gliosis asociada con placas de A β . Un subgrupo de las platinas reaccionadas con GFAP fue contra teñido con Tioflabina S para localizar los depósitos A β . Los astrocitos positivos a GFAP estaban asociados con las placas A β en los controles SAP, PBS y los no tratados. No se encontró ninguna de dichas asociaciones en los ratones A β 1-42 negativos a las placas mientras que se identificó una mínima gliosis asociada con placas en un ratón tratado con AN1792.

Los análisis de imagen que se muestran en la figura 4 para la corteza retroesplénica verificaron que la reducción de astrocitosis fue significativa, con un valor promedio de 1,56% para aquellos tratados con AN1792 versus valores medios superiores a 6% para los grupos inmunizados para los péptidos SAP, PBS o los no tratados ($p=0,0017$).

La evidencia de un subgrupo de los ratones inyectados con A β 1-42 y PBS indicó inmunoreactividad MHC II asociado con placas que estaba ausente en los ratones inyectados con A β 1-42 que coincidió con la falta de respuesta inflamatoria relacionada con A β .

Las secciones de los cerebros de los ratones reaccionaron también con mAB específico con un anticuerpo monoclonal específico para mAC-1, una proteína superficial de células. La MAC-1 (CD11b) es un miembro de la familia de las integrinas y existe en un heterodímero con CD18. El complejo CD11b/CD18 está presente en monocitos macrófagos neutrófilos y células asesinas naturales (Mak and Simard). El tipo de célula MAC-1-reactiva del cerebro está probablemente basada en microglías en una morfología fenotípica similar en las secciones MAC-1 inmunoreaccionadas. La rotulación MAC-1 asociada con placas fue inferior en los cerebros de los ratones tratados con AN1792 en comparación con el grupo de control PBS, un descubrimiento que coincide con la falta de una respuesta inflamatoria inducida por A β .

C. CONCLUSIÓN

La falta de placas A β y de cambios glióticos y neuronales reactivos en los cerebros de los ratones inyectados con A β 1-42 indican que no se depositó ningún amiloide o un aniloide extremadamente pequeño en los cerebros, y estaban ausentes las consecuencias patológicas tales como gliosis y patología neurítica. Los ratones PDAPP tratados con A β 1-42 muestran esencialmente la misma falta de patología que los ratones no transgénicos de control. Por lo tanto, las inyecciones A β 1-42 son muy eficaces para la prevención de la deposición o evacuación de A β humano de los tejidos cerebrales y la eliminación de los subsiguientes cambios degenerativos neuronales e inflamatorios. Por lo tanto la administración del péptido A β puede tener un beneficio preventivo y terapéutico para la prevención de AD.

II. ESTUDIO DE RESPUESTA A LA DOSIS

Se inmunizaron grupos de ratones hembra Swiss Webster de 5 semanas de vida (N=6 por grupo) con 300, 100, 33, 11, 3,7, 1,2, 0,4 o 0,13 μg de A β formulados en CFA/IFA y administrados por vía intraperitoneal. Se administraron tres dosis a intervalos de dos semanas seguido de una cuarta dosis un mes después. La primera dosis se emulsionó con CFA y las dosis restantes se emulsionaron con IFA. Se tomó sangre de los animales a los 4-7 días después de cada inmunización comenzando después de la segunda dosis para medir los títulos de anticuerpos. Los animales en un subgrupo de tres grupos, los que fueron inmunizados con 11, 33 o 300 μg de antígeno, fueron adicionalmente pinchados a aproximadamente intervalos mensuales durante cuatro meses siguiendo la cuarta inmunización para monitorear la disminución de la respuesta a la dosis a través de un rango de dosis de vacunas. Estos animales recibieron una quinta inmunización final a los 7 meses después de la iniciación del estudio. Se sacrificaron un mes más tarde para medir las respuestas de anticuerpos para AN1792 y para efectuar análisis toxicológicos.

Se observó una respuesta de declinación de dosis desde 300 a 3,7 μg con ninguna respuesta en las dos dosis más bajas. Los títulos de anticuerpo promedio eran aproximadamente 1:1000 después de 3 dosis y de aproximadamente 1:10000 después de 4 dosis de 11-300 μg de antígeno (fig. 5).

Los títulos de anticuerpos se elevaron dramáticamente para todos excepto por los del grupo más bajo después de la tercera inmunización con aumentos de GMT comprendidos entre desde 5 a 25 veces. Luego fueron detectables respuestas bajas a los anticuerpos para incluso los receptores de 0,4 μg . Los grupos de 1,2 y 3,7 μg tenían títulos comparables con GMT de aproximadamente 1000 y con las 4 dosis más altas agrupadas conjuntamente con GMT de aproximadamente 25000 con excepción del grupo de dosis de 33 μg con el GMT más bajo de 3000. Después de la cuarta inmunización, el incremento del título fue

más modesto para la mayoría de los grupos. Existió una clara respuesta a la dosis a través de los grupos de dosis de antígeno más baja desde 0,14 μg a 11 μg pasando desde ningún anticuerpo detectable para los receptores de 0,14 μg hasta un GMT de 36000 para los receptores de 11 μg . Nuevamente, los títulos para los 4 grupos de dosis más altas de 11 a 300 μg se agruparon conjuntamente. Por lo tanto, después de dos inmunizaciones el título de anticuerpos dependió de la dosis de antígeno a través de un amplio rango de desde 0,4 a 300 μg . En la tercera inmunización, los títulos de las 4 dosis más elevadas fueron todos comparables y permanecieron en una meseta después de una inmunización adicional.

Un mes después de las cuatro inmunizaciones, los títulos fueron de 2 a 3 veces más altos en el grupo de 300 μg que los medidos a partir de sangre extraída 5 días después de la inmunización (fig. 6). Esta observación sugiere que el pico de respuesta a los anticuerpos anaamnética ocurrió posteriormente a los 5 días después de la inmunización. Un incremento más modesto (50%) pudo observarse en este momento en el grupo de 33 μg . En el grupo con una dosis de 300 μg a los 2 meses después de la última dosis, la GMT declinó abruptamente en aproximadamente un 70%. Después de otro mes, la declinación fue menos aguda a 45% (100 μg) y aproximadamente 14% para las dosis de 33 y de 11 μg . Por lo tanto, el régimen de declinación en el título de anticuerpos circulantes una vez que se interrumpió la inmunización parece ser bifásica, con una abrupta declinación el primer mes después de la respuesta pico, seguida de un régimen más modesto de disminución a continuación.

Los títulos de anticuerpos y la cinética de estas respuestas de estos ratones Swiss Webster son similares a los de los ratones transgénicos PDAPP heterocigotas jóvenes inmunizados de manera paralela. Las dosis eficaces para

inducir una respuesta inmunitaria en seres humanos son típicamente similares a las dosis eficaces para ratones.

III. RASTREO PARA DETERMINAR LA EFICACIA TERAPÉUTICA CONTRA AD ESTABLECIDO

Este ensayo está diseñado para probar los agentes inmunogénicos en cuanto a su actividad para detener o para revertir las características neuropatológicas de AD en animales viejos. Las inmunizaciones con ácidos de una longitud A β de 42 (AN1792) se iniciaron en un punto de tiempo en el que las placas amiloides estaban ya presentes en los cerebros de los ratones PDAPP.

En el curso del tiempo empleado en este estudio, los ratones PDAPP no tratados desarrollaron una cantidad de cambios neurodegenerativos parecido a los que se encuentran en AD (*Games et al., supra* and Johnson-Wood et al., *Proc.Natl. Acad.Sci. USA* 94, 1550-1555 (1997)). La deposición de A β en las placas amiloides está asociada con una respuesta neuronal degenerativa que consiste en elementos dendríticos y axonales aberrantes, denominados neuritas distróficas. Los depósitos amiloides que están rodeados y que contienen neuritas distróficas se denominan placas neuríticas. Tanto en el ratón con AD como el PDAPP las neuritas distróficas tienen una clara estructura globular, son inmuno reactivas con un panel de anticuerpos que reconocen a APP y los componentes citoesqueletales, y exhiben complejos cambios degenerativos celulares en el nivel ultraestructural. Estas características permiten mediciones relevantes de la enfermedad selectivas y reproducibles de la formación de placas neuríticas en los cerebros de PDAPP. El componente neurobal distrófico de las placas neuríticas de PDAPP es fácilmente visualizado con un anticuerpo específico para APP humano (anticuerpo monoclonal 8E5), y es fácilmente mensurable mediante análisis de imagen asistida por computadora. Por lo tanto, además de medir los

efectos de AN1792 en la formación de placas amiloides, se monitorearon los efectos de este tratamiento en el desarrollo de distrofia neurítica.

Los astrocitos y microglías son células no neuronales que responden y reflejan el grado de lesión neuronal. Los astrocitos positivos a GFAP y las microglías positivas a MHC II se observan comúnmente en AD, y su activación aumenta de acuerdo con la gravedad de la enfermedad. Por lo tanto, también se monitoreó el desarrollo de astrocitosis reactiva y microgliosis en los ratones tratados con AN1792.

A. Materiales y Métodos

Cuarenta y ocho ratones PDAPP hembra heterocigotas, de 11 a 11,5 meses de edad, obtenidos en Charles River, fueron divididos al azar en dos grupos: 24 ratones fueron inmunizados con 100 μ g de AN1792 y 24 ratones fueron inmunizados con PBS, y cada uno se combinó con coadyuvante de Freund. Los grupos AN1792 y PBS fueron divididos nuevamente cuando alcanzaron aproximadamente 15 meses de edad. A los 15 meses de edad aproximadamente la mitad de cada grupo de los animales tratados con AN1792 y PBS fueron eutanizados ($n=10$ y 9 , respectivamente), y el resto continuó recibiendo inmunizaciones hasta terminar a aproximadamente 18 meses ($n=9$ y 12 , respectivamente). Murió un total de 8 animales (5 AN1792, 3 PBS) durante el estudio. Además de los animales inmunizados, se incluyeron ratones PDAPP de un año ($n=10$), de 15 meses de vida ($n=10$) y de 18 meses de vida ($n=10$) no tratados para efectos comparativos en los ensayos ELISA para medir los niveles de A β y APP en el cerebro; también se incluyeron animales de 1 año de vida en los análisis inmunohistoquímicos.

La metodología fue igual que para el ejemplo 1 a menos que se indicara lo contrario. Se usaron péptidos US lote 12, y péptidos de California lote ME0339 de

AN1792 para preparar el antígeno para las seis inmunizaciones administradas antes del punto de tiempo de 15 meses. Se usaron péptidos de California lotes IME0339 y ME 0439 para tres inmunizaciones adicionales administradas entre los 15 y 18 meses.

Para las inmunizaciones, 100 µg de AN1792 en 200 µl de PBS o de PBS fueron emulsionados solos 1:1 (vol:vol) con coadyuvante completo de Freund (CFA) o con coadyuvante incompleto de Freund (CFA) o PBS hasta un volumen final de 400 µl. La primera inmunización se administró con CFA como coadyuvante, las siguientes cuatro dosis se administraron con IFA, y las cuatro dosis finales con PBS sola sin agregar coadyuvante. Se administró un total de 9 inmunizaciones a lo largo de un período de 7 meses en un programa de dos semanas para las tres primeras dosis seguido de un intervalo de cuatro semanas para las inyecciones remanentes. El grupo de tratamiento de 4 meses eutanizado a los 15 meses de vida recibió únicamente las primeras seis inmunizaciones.

B. Resultados

1. Efectos del Tratamiento de AN1792 con Carga Amiloide

Los resultados del tratamiento AN1792 sobre cierta carga amiloide cortical determinada por análisis de imagen cuantitativa se muestran en la figura 7. El valor promedio de la carga amiloide cortical fue de 0,28% en un grupo de ratones PDAPP de 12 meses de edad no tratados, un valor representativo de la carga de placas en los ratones al comenzar el estudio. A los 18 meses, la carga amiloide se incrementó en 17 veces a 4,87% en ratones tratados con PBS, mientras que los ratones tratados con AN1792 tuvieron una carga amiloide enormemente reducida de únicamente 0,01%, notablemente menos de 12 meses sin tratamiento, y ambos grupos los de 15 y 18 meses tratados con PBS. La carga amiloide se

redujo significativamente en los receptores de AN1792 en ambos los de 15 meses (reducción del 96%; $p=0,003$) y los de 18 meses (reducción de >99%); $p=0,0002$).

Típicamente la deposición de amiloides corticales en ratones PDAPP se inicia en las cortezas frontal y retrosplenial (RSC) y avanza en una dirección ventral-lateral que involucra las cortezas temporal y entorhinal (EC). Se encontró muy poco o ningún amiloide en los ratones EC de 12 meses de vida, la edad aproximada en la cual el AN1792 fue administrado por primera vez. Después de 4 meses de tratamiento con AN1792, la deposición de amiloides disminuyó enormemente en el RSC, y la involucración progresiva del EC se eliminó completamente por tratamiento con AN1792. Esta última observación demuestra que el AN1792 detuvo completamente el avance de los amiloides que normalmente hubieran invadido las cortezas temporal y ventral así como también hubieran detenido o posiblemente invertido la deposición en el RSC. Los profundos efectos del tratamiento con AN1792 sobre el desarrollo de la carga amiloide cortical en los ratones PDAPP, quedaron adicionalmente demostrados en el grupo de 18 meses, el cual había sido tratado durante 7 meses. Se halló una completa ausencia de amiloide cortical en el ratón tratado con AN1792, con una falta total de placas difusas así como también con una reducción de los depósitos compactados.

2. Tratamiento de AN1792 Asociado con Cambios Celulares y Morfológicos

Se halló una población de células positivas A β en las regiones cerebrales que contienen típicamente depósitos amiloides. Cabe observar que en varios cerebros de los receptores de AN1792, se hallaron muy pocas o ninguna placa amiloide cortical extracelular. La mayor parte de la inmunoreactividad A β pareció estar contenida dentro de células con soma lobular o aglutinado más grande.

Fenotípicamente, estas células se parecen a microglías o monocitos activados. Fueron inmunoreactivas con los anticuerpos que reconocen ligandos expresados por los monocitos y microglías activadas (MHC II y CD11b) y ocasionalmente se asociaron con la pared o lumen de los vasos sanguíneos. La comparación de las secciones adyacentes próximas rotuladas con anticuerpos específicos de A β y MHC II reveló que se reconocían patrones similares de estas células en ambas clases de anticuerpos. Un examen detallado de los cerebros tratados con AN1792 reveló que las células positivas a MHC II estaban restringidas a la vecindad de los amiloides limitados remanentes en estos animales. Bajo las condiciones de fijación empleadas, las células no eran inmunoreactivas con anticuerpos que reconocían ligandos células T.(CD3, CD3e) o células B (CD45RA, CD45RB) pero fueron reactivos con un anticuerpo que reconocía leucocialina (CD43) que tiene actividad de reacción cruzada con monocitos. Ninguna de dichas células se encontró en ninguno de los ratones tratados con PBS.

Los ratones PDAPP invariablemente desarrollan una pesada deposición de amiloides en la capa molecular externa del giro dentado hipocampal. La deposición forma una clara veta dentro de la vía perforante, una sub-región que contiene clásicamente placas amiloides en AD. La característica aparición de estos depósitos en los ratones tratados con PBS es parecida a la previamente caracterizada en ratones PDAPP no tratados. La deposición de amiloides consistía en placas difusas y compactadas en una banda continua. En contraste, en una variedad de cerebros de ratones tratados con AN1792 este patrón fue drásticamente alterado. La deposición amiloide hipocampal no contenía más amiloide difuso, y el patrón de bandas fue completamente distorsionado. En su lugar, estaban presentes una cantidad inusual de estructuras moteadas que eran reactivos con los anticuerpos anti-A β , varias de las cuales parecieron ser células que contenían amiloides.

Frecuentemente se observaron células positivas a MHC II en la vecindad de amiloides extracelulares en animales tratados con AN1792. El patrón de asociación de las células positivas a A β con amiloides fue muy similar en varios cerebros de ratones tratados con AN1792. La distribución de estas células monocíticas se restringió a la proximidad del amiloide depositado y estuvo enteramente ausente de otras regiones cerebrales libres de placas A β . La sección de microscopía confocal rotuladas con MHC II y A β revelaron que el material de las placas estaba contenido en muchas de las células monocíticas.

El análisis de imagen cuantitativo de las secciones rotuladas con MHC II y MAC I revelaron una tendencia al incremento de inmunoreactividad en el RSC y en el hipocampo de los ratones tratados con AN1792 en comparación con el grupo PBS que alcanzó significado con la medición de reactividad MAC I y en el hipocampo.

Estos resultados son indicativos de la evacuación activa intermediada por células de los amiloides en las regiones cerebrales portadoras de placas.

3. Efectos a AN1792 en los Niveles A β : Determinaciones ELISA

(a) Niveles Corticales

En ratones PDAPP, el nivel medio de A β total en la corteza a los 12 meses fue de 1600 ng/g, y se incrementó hasta 8.700 ng/g a los 15 meses (tabla 2). A los 18 meses el valor fue de 22.000 ng/g, un incremento de más de 10 veces durante el curso de tiempo del experimento. Los animales tratados con PBS tenían 8600 ng/g de A β total a los 15 meses de vida que se incrementó hasta 19000 ng/g a los 18 meses. En contraste, los animales tratados con AN1792 tenían 81% menos de A β total a los 15 meses (1600 ng/g) que el grupo inmunizado con PBS. Se halló significativamente menos ($p=0,0001$) de A β total (5200 ng/g) a los 18 meses cuando se comparó el AN1792 y el PBS de los grupos (tabla 2) que representaba

una reducción del 72% en el Aβ que de otra manera hubiera estado presente. Se obtuvieron resultados similares cuando se compararon los niveles corticales de Aβ42, es decir el grupo tratado con AN1792 que contenía mucho menos Aβ42, pero en este caso, las diferencias entre los grupos AN1792 y PBS fueron significativas tanto en los 15 meses ($p=0,04$) y 18 meses ($p=0,0001$, Tabla 2).

Tabla 2: Niveles Aβ Promedio (ng/g) en la Corteza

Edad	No Tratados			PBS			AN1792		
	Total	Aβ42	(n)	Total	Aβ42	(n)	Total	Aβ42	(n)
12	1.600	1.300	(10)						
15	8.700	8.300	(10)	8.600	7.200	(9)	1.600	1.300*	(10)
18	22.200	18.500	(10)	19.000	15.900	(12)	5.200**	4.000**	(9)

* $p= 0,0412$

** $p= 0,0001$

(b) Niveles hipocampales

En los ratones PDAPP no tratados, los niveles medios del hipocampo del Aβ total a los 12 meses de vida era de 15.000 ng/g, que se incrementó hasta 51.000 ng/g a los 15 meses y adicionalmente a 81.000 ng/g a los 18 meses (tabla 3). De manera similar, los ratones inmunizados con PBS mostraron valores de 40.000 ng/g y 65.000 ng/g a los 15 meses y a los 18 meses, respectivamente. Los animales inmunizados con AN1792 exhibieron menos Aβ total, específicamente 25.000 ng/g y 51.000 ng/g en los respectivos puntos de tiempo de 15 meses y 18

meses. El grupo de 18 meses tratado con AN1792 fue significativamente inferior que el del grupo tratado con PBS ($p=0,0105$; Tabla 3). La medición de A β 42 proporcionó el mismo patrón de resultados, es decir que los niveles en el grupo tratado con AN1792 fueron significativamente inferiores a los del grupo PBS (39.000 ng/g versus 57.000 ng/g, respectivamente; $p=0,002$) en una evaluación de 18 meses (Tabla 3).

Tabla 3: Niveles A β Promedio (ng/g) en Hipocampus

Edad	No Tratados			PBS			AN1792		
	Total	A β 42	(n)	Total	A β 42	(n)	Total	A β 42	(n)
12	15.500	11.100	(10)						
15	51.500	44.400	(10)	40.100	35,70	(9)	24,50	22.100	(10)
18	80.800	64.200	(10)	65.400	57,10	(12)	50,90	38.900	(9)

* $p= 0,0105'$

** $p= 0,0022$

(c) Niveles del Cerebelo

En los ratones PDAPP no tratados, de 12 meses, el nivel medio del cerebelo de A β total fue de 15 ng/g (Tabla 4). A los 15 meses, esta media se incrementó a 28 ng/g y a los 18 meses se había elevado hasta 35 ng/g. Los animales tratados con PBS exhibieron valores medios totales de A β de 21 ng/g a los 15 meses y 43 ng/g a los 18 meses. Los animales tratados con AN1792 tenían 22 ng/g de A β total y a los 15 meses, y significativamente menos A β total ($p=0,002$) a los 18 meses (25 ng/g) que el correspondiente grupo PBS (Tabla 4).

Tabla 4: Niveles A β Medios (ng/g) en el Cerebelo

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

* p= 0,0018

4. Efectos de Tratamiento con AN1792 en los Niveles de APP

Ambas moléculas la de APP- α y APP de longitud total contenían la totalidad o parte de la secuencia A β y por lo tanto podían ser potencialmente impactadas por la generación de una respuesta de inmunidad dirigida a AN1792. En estudios actuales, se ha observado un leve aumento de los niveles de APP como aumentos neuropatológicos en los ratones PDAPP. En la corteza los niveles de cualquiera de APP- α /FL (longitud total) o APP- α no cambiaron esencialmente con el tratamiento con excepción de que se redujo el APP- α en 19% en el punto de tiempo de 18 meses en el grupo tratado con AN1792 versus el grupo tratado con PBS. Los valores de AN1792 a los 18 meses en los tratados con APP no fueron significativamente diferentes de los valores de los de 12 meses y 15 meses no tratados y de los grupos de 15 meses con PBS.

En todos los casos, los valores de APP permanecieron dentro de los rangos que se encuentran normalmente en los ratones PDAPP.

5. Efectos del Tratamiento AN1792 Sobre la Patología Neurodegenerativa y Gliótica

La carga de placas neurítica se redujo significativamente en la corteza frontal de los ratones con AN1792 en comparación con el grupo de PBS en ambos, el de 15 meses de edad (84%; $p=0,03$) y 18 meses de edad (55%; $p=0,01$) (fig. 8). El valor medio de la carga de placa neurítica se incrementó desde 0,32% hasta 0,49% en el grupo con PBS de entre 15 y 18 meses de edad. Esto contrastó con el desarrollo normal con el desarrollo enormemente reducido de placas neuríticas en el grupo AN1792 con valores medios de carga de placa neurítica de 0,05% y 0,22%, en los grupos de 15 y 18 meses, respectivamente.

Las inmunizaciones con AN1792 fueron aparentemente bien toleradas y también se redujo significativamente las astrocitosis reactiva en los ratones tratados con RSC de AN1792 cuando se comparó con el grupo PBS tanto a los 15 meses (56%; $p=0,011$) como a los 18 meses (39%; $p=0,028$) (fig. 9). Los valores medios del porcentaje de astrocitosis en el grupo de PBS se incrementaron entre los 15 y 18 meses desde 4,26% hasta 5,21%. El tratamiento con AN1792 suprimió el desarrollo de astrocitosis en ambos puntos de tiempo, el de 1,89% y el de 3,2%, respectivamente. Esto sugiere que las neuropilas no fueron dañadas por el proceso de evacuación.

6. Respuestas de los Anticuerpos

Tal como se describió previamente, ratones PDAPP heterocigotas, de 11 meses de vida ($N=24$) recibieron una serie de 5 inmunizaciones de 100 μ g de AN1792 emulsionado con coadyuvante de Freund, y administrado por vía intraperitoneal a las 0, 2, 4, 8 y 12 semanas, y una sexta inmunización con PBS solamente (sin coadyuvante de Freund) a las 16 semanas. Como control negativo, un conjunto paralelo de 24 ratones transgénicos de la misma edad recibieron

inmunizaciones de PBS emulsionadas con los mismos coadyuvantes y liberadas bajo el mismo programa. Se extrajo sangre de los animales dentro de los 3 a 7 días después de cada inmunización a partir de la segunda dosis. Las respuestas a los anticuerpos para AN1792 se midieron mediante el ensayo ELISA. Los títulos geométricos promedio (GMT) para los animales que fueron inmunizados con AN1792 fueron aproximadamente de 1900, 7600 y 45000 después de la segunda, tercera y última (sexta) dosis respectivamente. No se detectó ningún anticuerpo específico para A β en los animales de control después de la sexta inmunización.

Aproximadamente la mitad de los animales fueron tratados durante 3 meses adicionales, recibiendo inmunizaciones a aproximadamente 20, 24 y 27 semanas. Cada una de las dosis fue administrada en un vehículo de PBS solo sin coadyuvante de Freund. Los títulos promedio de los anticuerpos permanecieron invariables durante este período de tiempo. En realidad, los títulos de anticuerpos parecieron permanecer estables desde la cuarta a octava extracción, lo cual correspondió a un período que cubría la quinta hasta la novena inyección.

Para determinar si los anticuerpos específicos para A β proporcionaban inmunización detectable en los sueros de ratones tratados con AN1792, también fueron asociados con amiloide depositado en el cerebro, un subconjunto de secciones de ratones tratados con AN 1792 y PBS que se hicieron reaccionar con un anticuerpo específico para IgG de ratón. En contraste con el grupo de PBS, las placas de A β en los cerebros tratados con AN1792 fueron recubiertos con IgG endógeno. Esta diferencia entre los dos grupos se observó en los grupos de 15 y de 18 meses. Es particularmente sorprendente la falta de rotulación en el grupo PBS, a pesar de la presencia de una pesada carga amiloide en estos ratones. Estos resultados muestran que la inmunización con una proteína A β sintética genera anticuerpos que reconocen y se adhieren *in vivo* al A β en las placas amiloides.

7. Respuestas de Inmunidad Intermediadas por Células

Se extrajeron los bazos de 9 ratones inmunizados con AN1792 y de 12 ratones PDAPP de 18 meses de vida inmunizados con PBS después de la quinta inmunización. Se aislaron esplenocitos y se cultivaron durante 72 horas en presencia de A β 40, A β 42, o A β 40-1 (proteína de orden inverso). El Con A mitógeno sirvió como control positivo. Se obtuvieron óptimas respuestas con >1,7 μ M de proteína. Las células de los 9 animales tratados con AN1792 proliferaron en respuesta a cualquiera de las proteínas A β 1-40 ó A β -142, con niveles iguales de incorporación para ambas proteínas (fig. 10, Panel Superior). No hubo ninguna respuesta para la proteína inversa A β -40-1. Las células de los animales de control no respondieron a ninguna de las proteínas A β (fig. 10, panel inferior).

C. Conclusión

Los resultados de este estudio muestran que la inmunización con AN1792 de los ratones PDAPP que poseían depósitos amiloides existentes, hace más lenta y evita la progresiva deposición de amiloides y retarda los consiguientes cambios neuropatológicos en el cerebro de ratones PDAPP viejos. Las inmunizaciones con AN1792 detuvieron esencialmente el desarrollo amiloide en estructuras que normalmente hubieran sucumbido a la amiloidosis. Por lo tanto, la administración del péptido A β tiene un beneficio terapéutico para el tratamiento de AD.

IV. RASTREO DE FRAGMENTOS A β

100 ratones PDAPP de 9-11 meses de vida fueron inmunizados con 9 regiones diferentes de APP y A β para determinar cuales eran los epitopos que proporcionaban una respuesta de eficacia. Los nueve inmunógenos diferentes y

uno de control fueron inyectados por vía i.p. tal como se describió anteriormente. Los inmunógenos incluyen 4 conjugados peptídicos A β humanos 1-12, 13-28, 32-42, 1-5, todos acoplados con IgG anti-ratón de ovinos a través de un enlace cistina; y los aminoácidos polipeptídicos APP 592-695, A β 1-40 agregado humano, y A β 25-35 agregado humano, y A β 42 agregado de roedores. Se usaron A β 42 agregado y PBS como controles positivo y negativo respectivamente. Se usaron 10 ratones por cada grupo de tratamiento. Los títulos fueron monitoreados tal como precedentemente, y los ratones fueron eutanizados al final de 4 meses de inyecciones. La histoquímica, los niveles de A β y los análisis de toxicología fueron determinados post-mortem.

A. Materiales y Métodos

1. Preparación de Inmunógenos

Preparación de los péptidos A β acoplados: para los conjugados de péptidos A β humanos (residuos aminoácidos 1-5, 1-12, 13-28, 33-42, cada uno conjugado con IgG anti-ratón de oveja) se prepararon mediante acoplamiento a través de una cisteína artificial agregada a un péptido A β usando el reactivo de entrecruzamiento sulfo-EMCS. Los derivados peptídicos A β se sintetizaron con la siguiente secuencia de aminoácido final. En cada caso, el lugar del residuo de cisteína insertado se indica mediante un subrayado. El derivado peptídico A β 13-28 tenía también dos residuos glicina agregados antes de la cisteína carboxilo terminal tal como se indicó.

A β -12 péptido	NH ₂ -DAEFRHDSGYEV <u>C</u> -COOH
A β -5 péptido	NH ₂ -DAEFR <u>C</u> -COOH
A β 33-péptido	NH ₂ - <u>C</u> -ácido amino-heptanoicoGLMVGGVVIA-COOH
A β 13-28 péptido	Ac-NH-HHQLVFFAEDVGSNKG <u>G</u> C-COOH

Para preparar la reacción de acoplamiento, se dializaron 10 mg de IgG anti-ratón de oveja (Jackson ImmunoResearch Laboratories) durante la noche contra 10 mM de buffer de borato de sodio a pH 8,5. El anticuerpo dializado se concentró luego hasta un volumen de 2 mL usando un tubo Amicon Centriprep. Diez miligramos de sulfo-EMCS de [N(γ - maleimidocaproyloxi)succinimida (Molecular Sciences Co.) se disolvieron en un mL de agua desionizada. Se agregó un exceso molar de 40 de sulfo-EMCS por goteo por agitación al IgG anti-ratón de oveja y luego la solución se agitó durante 10 minutos adicionales. El IgG anti-ratón de oveja activado se purificó y se intercambió buffer mediante pasaje sobre una columna de filtración de gel de 10 mL (Pierce Presto Column, obtenida en Pierce Chemicals) equilibrada con 0,1 M NaPO 4,5 mM EDTA, pH 6,5. Las fracciones que contenían el anticuerpo, identificadas por la absorbancia a 280 nm, se reunieron y se diluyeron hasta una concentración de aproximadamente 1 mg/mL, usando 1,4 mg por OD como coeficiente de extinción. Se disolvió un exceso molar de 40 veces el péptido A β en 20 mL de 10 mM NaPO₄, pH 8,0, con excepción del péptido A β 33-42 para el cual se disolvieron primero 10 mg en 0,5 mL de DMSO y luego se diluyeron hasta 20 mL con 10 mM de buffer NaPO₄. Cada una de las soluciones de péptidos se agregaron a 10 mL de IgG anti-ratón de oveja activada, y se sacudieron a temperatura ambiente durante 4 horas. Los conjugados resultantes se concentraron hasta un volumen final de menos de 10 mL usando un tubo Amicon Centriprep y luego se dializaron contra PBS para intercambiar el buffer y eliminar el péptido libre. Los conjugados se hicieron pasar a través de filtros de un tamaño de poro de 0,22 μ m para la esterilización y luego se sacaron alícuotas en fracciones de 1 mg y se almacenaron en forma congelada a -20°C. Las concentraciones de los conjugados se determinaron usando el ensayo de proteína BCA (Pierce Chemicals) con IgG de caballo para la curva standard. La conjugación se documentó mediante el aumento del peso molecular

de los péptidos conjugados en relación al de IgG anti-ratón de oveja activada. El conjugado anti-ratón de oveja A β 1-5 era la acumulación de dos conjugaciones, y el resto provenía de una sola preparación.

2.Preparación de péptidos A β agregados

Péptidos 1-40 humanos (AN1528; Californie Péptides Inc., Lote ME0541), 1-41 humanos (AN1792; California Peptides Inc., Lotes ME0339 y ME0439), 25-35 humanos, y 1-42 de roedores (California Peptides Inc., Lote ME0218) se solubilizaron en el momento para la preparación de cada conjunto de inyecciones a partir de polvos liofilizados que habían sido almacenados en forma de secada a -20°C . para tal propósito, se agregaron dos mg a 0,9 ml de agua desionizada y la mezcla se sometió a torbellino para genera una solución o suspensión relativamente uniforme. De los cuatro, el AN1528 fue el único péptido soluble en esta etapa. Luego se agregaron 100 μl de una alícuota de 10X PBS (1X PBS: 0,15 M NaCl, 0,01 fosfato de sodio, pH 7,5) en cuyo punto comenzó a precipitar el AN1528. La suspensión se agito en torbellino nuevamente y se incubó durante la noche a 37°C para ser usada al día siguiente.

Preparación de la proteína pBx6: Se construyó un plásmido de expresión que codifica pBx6, una proteína de fusión que consiste en la secuencia líder de polimerasa N-terminal MS-2 del bacteriófago de 100 amino ácidos, seguido de los amino ácidos 592-695 de APP (βAPP) se construyó de la manera descrita por Oltersdorf et al., J. Biol. Chem. 265, 4492-4497 (1990). El plásmido fue transfectado en E. coli y la proteína se expresó después de la inducción del promotor. Las bacterias se lisaron en urea 8M y pBx6 se purificó parcialmente mediante SDS PAGE preparativa. Las fracciones que contenían pBx6 se identificaron mediante borrarón Western usando anti-cuerpo policlonal anti-pBx6 de conejo, se reunieron, se concentraron usando un tubo Amicon Centriprep y se

dializaron contra PBS. La pureza de la preparación, estimada mediante SDS PAGE teñido con Azul de Coomassie, fue de aproximadamente 5 a 10%.

B. Resultados y Discusión

1. Diseño del Estudio

Se obtuvieron en Charles River laboratory y Taconic Laboratory cien ratones trasgénicos PDAPP heterozigotas, machos y hembras, de nueve a once meses de vida. Los ratones se distribuyeron en diez grupos para inmunizarlos con diferentes regiones de A β o APP combinado con coadyuvante de Freund. Los animales fueron distribuidos de manera de aparearlos por género, edad, parentesco y fuente de donde provenían los animales dentro de los grupos en la forma más estrecha posible. Los inmunógenos incluyen cuatro péptidos A β derivados de la secuencia humana, 1-5, 1,12, 13-28, y 33-42, cada uno conjugado con IgG anti-ratón de oveja; para los péptidos A β agregados, 1-140 humano 1-40 (AN1528), 1-42 humano (AN1792), 25-35 humano, y 1-42 de roedores; y un polipéptido de fusión, designado pBx6, que contenía los residuos de amino ácido APP 592-695. Un décimo grupo se inmunizó con PBS combinado con el coadyuvante como control.

Para cada inmunización, 100 μ g de cada péptido A β en 200 μ l de PBS o 200 μ g del derivado de pBx6 de APP en el mismo volumen de PBS o PBS solo se emulsionaron a 1:1 (vol:vol) con coadyuvante Completo de Freund (CFA) hasta un volumen final de 400 μ l para la primera inmunización, seguido de un refuerzo de la misma cantidad de inmunógeno en coadyuvante Incompleto de Freund (IFA) para las cuatro dosis subsiguientes y con el PBS para la dosis final. Las inmunizaciones fueron liberadas interperitonealmente en un programa bisemanal durante las primeras tres dosis, luego en un programa mensual. Se extrajo sangre de los animales de cuatro a siete días después de cada inmunización

comenzando por la segunda dosis para medir los títulos de anticuerpos. Los animales fueron eutanizados aproximadamente una semana después de la administración de la dosis final.

2. Niveles de A β y APP en el Cerebro

Después de aproximadamente cuatro meses de inmunización con los varios péptidos A β o los derivados APP, se extrajeron los cerebros de los animales perfusionados con solución salina. Se preparó un hemisferio para los análisis inmunohistoquímicos, y el segundo se usó para la cuantificación de los niveles de A β y APP. Para medir la concentración de varias formas de péptido beta amiloide y de proteína precursora amiloide, el hemisferio fue disectado y los homogenizados de las regiones hipocampales, corticales, y del cerebelo se prepararon en guanidina 5M. Estas fueron diluidas y el nivel de amiloide o APP fue cuantificado por comparación con una serie de diluciones del péptido A β o APP convencionales de concentraciones conocidas de formato ELISA.

La concentración media de A β total para el grupo de control inmunizado con PBS fue 5,8 veces superior en el hipocampo que en la corteza (media de 24,318 ng/g de tejido hipocampal comparado con 4,221 ng/g para la corteza). El nivel medio del cerebelo del grupo del control (23,4 ng/g de tejido) fue de aproximadamente 1.000 veces inferior al del hipocampo. Estos niveles son similares a los que hemos mencionado previamente para los ratones transgénicos PDAPP heterozigotas de esta edad (Johnson-Woods et al., 1997, supra).

Para la corteza, un subgrupo de grupos de tratamiento tenía niveles totales medios de A β y A β 1-42 que diferían significativamente de los del grupo de control ($p < 0,05$), recibiendo dichos animales un conjugado de péptido AN1792, A β 1-42 de roedor o A β 1-5 tal como se muestra en la figura 11. Los niveles medios del A β total se redujeron en 75%, 79% y 61% respectivamente, en comparación para el

control para estos grupos de tratamientos. No se observaron correlaciones discernibles entre los títulos de anticuerpos específicos A β y los niveles de A β en la región cortical del cerebro para cualquiera de los grupos.

En el hipocampo la reducción media de A β total asociado con el tratamiento AN1792 (46%, $p=0,0543$) no fue tan grande como la que se observó en la corteza (75%, $p=0,0021$). Sin embargo, la magnitud de la reducción fue muy superior en el hipocampo que en la corteza, con una reducción de 11,186 ng/g de tejido en el hipocampo versus 3,171 ng/g de tejido en la corteza. Para grupos de animales que recibieron A β 1-42 o A β 1-5 de roedores, los niveles totales de A β promedio se redujeron en 36% y 26% respectivamente. Sin embargo, dado el pequeño tamaño de los grupos y la alta variabilidad de los niveles de péptido amiloide de un animal a otro animal dentro de ambos grupos, estas reducciones no fueron significativas. Cuando se midieron los niveles de A β 42 en el hipocampo, ninguna de las reducciones inducidas por el tratamiento alcanzó significado. Por lo tanto, debido a la carga de A β más pequeña en la corteza, los caminos en esta región son un indicador más sensibles de los efectos del tratamiento. Los cambios en los niveles de A β medidos mediante ELISA en la corteza son similares, pero no idénticos, a los resultados a los análisis inmunohistoquímicos (ver a continuación).

El A β total se midió también en el cerebelo, una región típicamente mínimamente afectada por la patología AD. Ninguna de las concentraciones A β medias de cualquiera de los grupos inmunizados con los varios péptidos A β o con el derivado APP difirió del grupo del control en esta región del cerebro. Este resultado sugiere que no son afectados por tratamiento niveles no patológicos de A β .

Se determinó también la concentración de APP mediante un ensayo ELISA en la corteza y en el cerebelo de ratones tratados y de control. Se utilizaron dos

ensayos APP diferentes. El primero, designado APP- α /FL, reconoce a ambas la APP-alfa (α , la forma secretada de APP que ha sido disociada dentro de la secuencia A β), y las formas de longitud total (FL) de APP, mientras que la segunda reconoce únicamente APP- α . En contraste con la disminución asociada con el tratamiento de A β en un subgrupo de grupos de tratamiento, los niveles de APP permanecieron invariables en todos los animales tratados en comparación con los animales de control. Estos resultados indican que las inmunizaciones con los péptidos A β no están vaciando APP; más bien el efecto del tratamiento es específico para A β .

Resumiendo, se redujeron significativamente los niveles totales de A β y A β 1-42 en la corteza mediante tratamientos con conjugado de AN1792, A β 1-42 de roedores o A β 1-5. En el hipocampo, el A β total se redujo significativamente únicamente mediante tratamiento con AN1792. Ninguno de los otros cambios asociados al tratamiento en los niveles de A β o APP en las regiones del hipocampo, corticales o del cerebelo fueron significativas.

2. Análisis Histoquímicos

Los cerebros de un subgrupo de seis grupos se prepararon para el análisis inmunohistoquímico, y tres grupos fueron inmunizados con los conjugados del péptido A β de A β 1-5, A β 1-12, y A β 13-28; dos grupos fueron inmunizados con los agregados A β de longitud total AN1792 y AN1528 y el grupo de control tratado con PBS. Los resultados de los análisis de imagen de la carga amiloide en las secciones del cerebro a partir de estos grupos se muestran en la Figura 12. Se observaron significativas reducciones de la carga amiloide en las regiones corticales de tres de los grupos de tratamiento versus de los animales de control. La mayor reducción de carga amiloide se observó en el grupo que recibió AN1792 donde el valor promedio se redujo en un 97% ($P=0,001$). También se observaron

reducciones significativas para los animales tratados con AN1528 (95%, $p=0,005$) y el conjugado de péptido A β 1-5 (67%, $p=0,02$).

Los resultados obtenidos mediante la cuantificación de A β o A β 1-42 mediante ELISA y la carga amiloide por análisis de imagen difieren en cierto grado. El tratamiento con AN1528 tubo un impacto significativo sobre el nivel de carga amiloide cortical cuando se midió mediante el análisis de imagen cuantitativa pero no en la concentración de A β total en la misma región cuando se midió mediante ELISA. La diferencia entre estos dos resultados se debe probablemente a las especificidades de los ensayos. El análisis de imagen mide únicamente el A β insoluble agregado en las placas. En contraste, ELISA mide todas las formas de A β , tanto las solubles como las insolubles, monoméricas y agregadas. Debido a que la patología de la enfermedad se supone que está asociada con la forma insoluble asociada a placas de A β , la técnica de análisis por formación de imagen puede tener más sensibilidad par revelar los efectos del tratamiento. Sin embargo debido a que el ELISA es un ensayo más rápido y más fácil, resulta muy útil para los propósitos de rastreo. Además puede revelar que la reducción asociada al tratamiento de A β es superior para el que está asociado a placas que para el A β total.

Para determinar si los anticuerpos específicos de A β producidos mediante inmunización en los animales tratados reaccionaron con el amiloide cerebral depositado, un sub conjunto de las secciones de os animales tratados y de los ratones de control se hicieron reaccionar con un anticuerpo específico para IgG de ratón. En contraste con e grupo PBS, las placas que contenían A β fueron recubiertas con IgG endógeno para los animales inmunizados con los conjugados del péptido A β A β 1-5, A β 1-12 , y A β 13-28, y los agregados A β de longitud total AN1792 y AN1528. Los cerebros de animales inmunizados con los otros péptidos A β o con el péptido de pBx6 de APP no fueron analizados en este ensayo.

3. Medición de los Títulos de Anticuerpo

Se extrajo sangre de los ratones cuatro a siete días después de cada inmunización comenzando después de la segunda inmunización por un total de cinco extracciones desangre. Los títulos de anticuerpos se midieron como anticuerpos que se adhieren a A β 1-42 usando un ensayo ELISA en sandwich, con placas de plástico de múltiples receptáculos recubiertos con A β 1-42. Tal como se muestra en la Figura 13, los títulos de anticuerpo pico se obtuvieron después de la cuarta dosis para las cuatro vacunas que produjeron los títulos más elevados de anticuerpos específicos AN1792: AN1792 (pico GMT: 94,647), AN1528 (pico GMT: 88,231), A β 1- conjugado 12 (pico GMT: 47,216) y A β 1-42 de roedores (pico GMT: 10,766). Los títulos para estos grupos declinaron en cierta forma después de la quinta y sexta dosis. Para los cinco inmunógenos remanentes, se alcanzaron los títulos pico después de la quinta o sexta dosis y fueron de una magnitud muy inferior a la de los cuatro grupos de título más alta: conjugado A β 1-5 (pico GMT: 2,356), PBx6 (pico GMT: 1,986); conjugado A β 13-35 (pico GMT: 1,183), conjugado A β 33-42 (pico GMT: 658), A β 25-35 (pico GMT: 125). También se midieron los títulos de anticuerpos contra los péptidos homólogos usando el mismo formato de sandwich ELISA para un subconjunto de los inmunógenos, estando estos grupos inmunizados con A β 1-5, A13-28, β 25-35, A β 33-42 o A1-42 de roedores. Estos títulos fueron aproximadamente los mismos que se midieron β 1-42 excepto por el inmunógeno A β 1-42 de roedores en el cual los títulos de anticuerpos del caso contra el inmunógeno homólogo fueron aproximadamente dos veces más elevados. La magnitud del título de anticuerpos específico AN1792 de los animales individuales a los valores medios de los grupos de tratamiento no estaban correlacionados con la eficacia media como reducción de A β en la corteza.

4. Respuesta Limfoproliferativa

Se midió la limfoproliferación dependiente de A β usando células de bazo cosechadas aproximadamente una semana después de la sexta inmunización final. La célula recientemente cosechada, a razón de 105 por receptáculo, se cultivaron durante 5 días en presencia de A β 1-40 en una concentración de 5 μ M para estimulación. Las células de un subgrupo de siete de los diez grupos fueron también cultivadas en presencia del péptido inverso A β 40-1. Como control positivo, se cultivaron células adicionales con el mitógeno de la célula T, PHA, y, como control negativo se cultivaron células sin agregar péptido.

Los limfocitos de una gran parte de los animales proliferaron en respuesta a PHA. No se observó ninguna respuesta significativa para el péptido inverso A β 40-1. Las células de animales inmunizados con los péptidos A β agregados más grandes, AN1792, A β 1-42 de roedor y AN1528 proliferaron robustamente cuando fueron estimulados con A β 1-40, con el cpm más alto en los receptores e AN1792. Un animal de cada uno de los grupos inmunizado con el conjugado A β 1-12, el conjugado A β 13-28, y A β 25-35 proliferaron en respuesta a A β 1-40. Los grupos remanentes que recibieron el conjugado A β 1-5, el conjugado pBx6 de A β 33-42 o PBS no tenían animales con una respuesta estimulada por A β . Estos resultados se resumen en la Tabla 5 siguiente.

Tabla 5			
Inmunógeno	Conjugado	Aβ Amino Acido	Respondieron
Aβ1-5	Si	5-mer	0/7
Aβ1-12	Si	12-mer	1/8
Aβ13-28	Si	16-mer	1/9
Aβ25-35		11-mer	1/9
Aβ33-42	Si	10-mer	0/10
Aβ1-40		40-mer	5/8
Aβ1-42		42-mer	9/9
r Aβ1-42		42-mer	8/8
pBx6			0/8
PBS		0-mer	0/8

Estos resultados muestran que AN1792 y AN1528 estimulan fuertes respuestas a la célula T, muy probablemente del fenotipo CD4+. La ausencia de la respuesta de célula T específica de Aβ en animales inmunizados con Aβ1-5 no es sorprendente debido a que los epitopos de los péptidos no es sorprendente debido a que los epitopos de los péptidos reconocidos por las células CD4+ T son usualmente de aproximadamente 15 amino ácidos de longitud, aunque algunas veces péptidos más cortos pueden funcionar con menos eficiencia. Por lo tanto la mayor parte de los epitopos de las células T auxiliares para los cuatro péptidos conjugados residirán probablemente en el par conjugado IgG y no en la región Aβ. Esta hipótesis está apoyada por la muy baja incidencias de respuestas proliferativas para animales en cada uno de estos grupos de tratamiento. Debido a que el conjunto conjugado Aβ1-5 fue eficaz para reducir significativamente el nivel de Aβ en el cerebro, la ausencia aparente de células T específicas de Aβ,

la respuesta inmunitaria efectora primordial inducida por inmunización con este péptido parece ser el anticuerpo.

La falta de células T y baja respuesta de los anticuerpos del péptido de fusión pBx6, que abarca 592-695 amino ácidos de APP incluyendo la totalidad de los residuos A β puede deberse a la baja inmunogenicidad de esta preparación particular. La baja inmunogenicidad del agregado A β 25-35 se debe probablemente a que el péptido es demasiado pequeño para contener probablemente un buen epitopo de la célula T que ayude a la inducción de la respuesta de un anticuerpo. Si este péptido estuviera conjugado con una proteína portadora, probablemente sería más inmunogénico.

V. Preparación de Anticuerpos Policlonales para Protección Pasiva

Se inmunizaron 125 ratones no transgénicos con A β , además de coadyuvante, y se eutanizaron a los 4-5 meses. Se recogió sangre de los ratones inmunizados. Se separó IgG de los otros componentes de la sangre. El anticuerpo específico por el inmunógeno puede estar parcialmente purificado por cromatografía de afinidad. Se obtuvo un promedio de aproximadamente 0,5-1 mg de anticuerpo específico de inmunógeno por ratón, obteniéndose un total de 60-120 mg.

VI. Inmunización Pasiva con Anticuerpos para A β

Se inyectaron grupos de ratones PDAPP de 7-9 meses de vida con 0,5 mg en PBS de anti-A β policlonal o anti-A β monoclonales específicos tal como se muestra a continuación. Todas las preparaciones de anticuerpos se purificaron de manera de tener bajos niveles de endotoxina. Los monoclonales pueden prepararse contra un fragmento mediante inyección del fragmento o una forma más larga de A β en un ratón, preparar hibridomas y rastrear los hibridomas para

un anticuerpo que se adhiere específicamente a un fragmento deseado de A β sin adherirse a otros fragmentos superpuestos de A β .

Tabla 6

Anticuerpo	Epitopo
2H3	A β 1-12
10D5	A β 1-12
266	A β 13-28
21F12	A β 33-42
Mousse policlonal anti-humano A β 42	Anti-agregado A β 42

Se inyectaron ratones por vía ip según fuera necesario en un período de 4 meses para mantener una concentración de anticuerpos circulantes medido mediante un título ELISA mayor de 1/1000 definido por ELISA para A β 42 u otro inmunógeno. Los títulos se monitorearon tal como precedentemente y los ratones fueron eutanizados al final de 6 meses de inyecciones. La histoquímica, los niveles de A β y la toxicología se efectuaron post mortem. Se usaron diez ratones por grupo.

VII. Comparación de Diferentes Coadyuvantes

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

A. Materiales y Métodos

1. Diseño del Estudio

Cien conejillos de indias hembra, de seis semanas de vida, de la raza hartley obtenidos en Elm Hill, se distribuyeron en 10 grupos para inmunizarlos con AN1792 o con un derivado palmitoilado del mismo combinado con varios coadyuvantes. Siete grupos recibieron inyecciones de AN1792 (33 μ g a menos que se especifique lo contrario) combinado con a) PBS, b) coadyuvante de Freund, c) MPL, d) escualeno, e) MPL/escualeno f) una baja dosis de alumbre, o g) una alta dosis de alumbre (300 μ g de AN1792). Dos grupos recibieron inyecciones de un derivado palmitoilado de AN1792 (33 μ g) combinados con a) PBS o b) escualeno. Un décimo grupo final, recibió PBS solo sin antígeno o con coadyuvante adicional. Para el grupo que recibió el coadyuvante de Freund, la primera dosis fue emulsionado con CFA, y las cuatro dosis remanentes con IFA. El antígeno se administró a una dosis de 33 μ g para todos los grupos exceptuando el grupo con alta dosis de alumbre el cual recibió 300 μ g de AN1792. Las inyecciones se administraron por vía intraperitoneal para CFA/IFA y por vía intramuscular en el cuadrice de la extremidad trasera alternadamente con el lado derecho e izquierdo para todos los otros grupos. Las primeras tres dosis se administraron en un programa bisemanal seguido de dos dosis a intervalos mensuales). Se extrajo sangre seis a siete días después de cada inmunización, comenzando después de la segunda dosis, para medir los títulos de anticuerpos.

2. Preparación de Inmunógenos

Se agregaron dos mg de A β -42 (California peptide, Lote ME0339) a 0,9 ml de agua desionizada y la mezcla se agitó bajo torbellino para generar una suspensión relativamente uniforme. Se agregó una alícuota de 100 μ l de 10X PBS (1X PBS, 0,15 M NaCl, fosfato de sodio 0,01M, pH 7,5). La suspensión se agitó

bajo torbellino nuevamente y se incubó durante la noche a 37°C para usarlo en la etapa siguiente. Se almacenó el A β -42 no usado con disecante en forma de un polvo liofilizado a -20°C.

Se preparó un derivado palmitoilado de AN1792 acoplando anhídrido palmítico, disuelto en dimetil formamida, con el residuo amino terminal de AN1792 antes de la remoción del péptido naciente a partir de la resina a partir del tratamiento con ácido fluorhídrico.

Para preparara dosis de vacunas con coadyuvante Completo de Freund (CFA) (grupo 2), se emulsionaron 33 μ g de AN1792 en 200 μ l de PBS 1:1 (vol:vol) con CFA en un volumen final de 400 μ l para la primera inmunización. Para las inmunizaciones sub-siguientes, el antígeno se emulsionó de manera similar con coadyuvante Incompleto de Freund (IFA).

Para preparar dosis de vacunas con MPL para los grupos 5 y 8, se agregó polvo liofilizado (Ribi ImmunoChem rsearch, Inc., Hamilton, MT) a 0,4% de trietilamina acuosa hasta una concentración final de 1m/ml y se agitó bajo torbellino. La mezcla se calentó a 65 hasta 70°C durante 30 segundos para crear una suspensión de micelas uniforme levemente opaca. La solución se preparó por lo menos frescamente para cada conjunto de inyecciones. Para cada inyección ene l grupo 5, 33 μ g de AN1792 en 16,5 μ l de PBS, 50 μ g de MPL (50 μ l) y 162 μ l de PBS en un tubo de borosilicato inmediatamente antes del uso.

Para preparar dosis de vacunas con una baja emulsión en aceite en agua, se agrego AN1792 en PBS a 5% de escualeno, 0,5% de Tween 80, 0,5% Span 85 en PBS hasta alcanzar una concentración de dosis única final de 33 μ g de AN1792 en 250 μ l (grupo 6). La mezcla se emulsionó pasándola a través de un dispositivo manual de dos cámaras durante 15 a 20 minutos hasta que las gotas de emulsión parecieron ser aproximadamente de un diámetro igual a 1,0 μ m standard de gránulos de látex cuando se observaron bajo un microscopio. La

suspensión resultante fue opalescente, blanca lechosa. Las emulsiones se prepararon frescamente para cada serie de inyecciones. Para el grupo 8, SE agregó MPL en 0,2% de trietilamina en una concentración de 50 μg por dosis al escualeno y a la mezcla detergente para la emulsificación tal como se indicó más arriba. Para el derivado palmitoilo (grupo 7), se agregaron 33 μg por dosis de palmitoil-Nh-A β 1-42 al escualeno y se agitaron bajo torbellino. Luego se agregaron con agitación bajo torbellino Tween 80 y Span 85. Esta mezcla se agregó a PBS hasta alcanzar concentraciones finales de 5% de escualeno, 0,5% Tween 80, 0,5% Span 85 y la mezcla se emulsionó tal como se indicó precedentemente.

Para preparar dosis de vacunas con alumbre (grupos 9 y 10), se agregó AN1792 en PBS a Alhydrogel (gel de hidróxido de aluminio, Accurate, Westbury, NY) hasta alcanzar concentraciones de 33 μg (dosis baja, grupo 9) o 300 μg (dosis elevada, grupo 10) de AN1792 por cada 5 mg de alumbre hasta un volumen de dosis final de 250 μl . La suspensión se mezcló suavemente durante 4 horas a temperatura ambiente.

3. Medición de Títulos de Anticuerpos

Se extrajo sangre e conejillo de indias siete días después de la inmunización a partir de la segunda inmunización para un total de cuatro extracciones. Los títulos de anticuerpos contra A β 42 se midieron mediante ELISA tal como se describió en Materiales y Métodos Generales.

4. Preparación del Tejido

Después de aproximadamente 14 semanas, se administró a todos los conejillos de india CO2. Se recogió fluido cerebroespinal y los cerebros se extrajeron y se disecaron tres regiones del cerebro (hipocampo, corteza y

cerebelo), y se usaron para medir la concentración de la proteína A β total usando ELISA.

B. Resultados

1. Respuestas de Anticuerpos

Habría un amplio rango en la potencia de los varios coadyuvantes cuando se midieron como respuestas a los anticuerpos para AN1792 después de la inmunización. Tal como se muestra e en la Figura 14, cuando se administró AN1792 en PBS, no se detectó ningún anticuerpo después de dos o tres inmunizaciones y se detectaron insignificantes respuestas después de la cuarta y quinta dosis con títulos medios geométricos (GMT) de únicamente aproximadamente 45. La emulsión o/w indujo modestos títulos después de la tercera dosis (GMT 255) que se mantuvieron después de la cuarta dosis (GMT 301), y que cayeron con la dosis final (GMT 54). Hubo una clara respuesta a la dosis de antígeno para AN1792 adherida a alumbre con 300 μ g que fueron más inmunogénicos en todos los puntos de tiempo que los 33 μ g. en el pico de la respuesta de anticuerpos después de la cuarta inmunización, la diferencia entre las dos dosis fue de 43% con GMT de aproximadamente 1940 (33 μ g) y 3400 (300 μ g). La respuesta a la dosis para 33 μ g de AN1792 además de MPL fue muy similar a la generada con una dosis casi 10 veces superior de antígeno (300 μ g) adherido a alumbre. La adición de MPL para una emulsión o/w disminuyó la potencia de la vacuna en relación a la de MPL como único coadyuvante tanto como un 75%. Un derivado palmitoilado de AN1792 fue completamente no inmunogénico cuando se administró un PBS y proporcionó modestos títulos cuando se presentó en una emulsión o/w con GMT de 340 y 105 para la tercera y cuarta extracción. Los títulos de anticuerpo más elevadas se generaron con coadyuvantes de Freund con un GMT pico de aproximadamente 87.000, un valor

casi 30 veces superior al de GMT de las dos siguientes vacunas más potentes, MPL y una alta dosis de AN1972/alumbre.

Los coadyuvantes más prometedores identificados en este estudio son MPL y alumbre. Entre estos dos, el MPL parece ser preferible debido a que se requiere una dosis de antígeno 10 veces más baja para generar la misma respuesta de anticuerpos que la que se obtiene con alumbre. La respuesta puede incrementarse aumentando la dosis de antígeno y/o coadyuvante para optimizar el programa de inmunización. La emulsión o/w consistió en un coadyuvante muy débil para AN1792 y agregando una emulsión o/w al coadyuvante MPL disminuía la actividad coadyuvante intrínseca de MPL solo.

2. Niveles A β en el Cerebro

Aproximadamente a las 14 semanas los conejillos de india fueron profundamente anestesiados, se les extrajo fluido cerebroespinal (CSF), y se extrajeron los cerebros de los animales en un subgrupo de los grupos, aquellos que habían sido inmunizados con coadyuvantes de Freund (grupo 2), MPL (grupo 5), alumbre con una alta dosis de 300 μ g, de AN1792 (grupo 10) y el grupo de control inmunizado con PBS (Grupo 3). Para medir el nivel de péptido A β , se disectó un hemisferio y se prepararon homogeneizados de las regiones hipocampal, cortical, y de cerebelo en guanidina 5M. Estos se diluyeron y cuantificaron por comparación con una serie de diluciones de la proteína convencional A β de concentraciones conocidas en un formato ELISA. Los niveles de proteína A β en el hipocampo, la corteza y el cerebelo fueron muy similares para los cuatro grupos a pesar de amplio rango de respuestas de anticuerpo para A β obtenidas mediante estas vacunas. Los niveles medios de A β de aproximadamente 25ng/g de tejido se midieron en el hipocampo, 21 ng/g en la corteza, y 12 ng/g en el cerebelo, Por lo tanto, la presencia de un elevado título de

anticuerpos circulantes para A β durante casi tres meses en algunos de estos animales no alteraron los niveles totales de A β en su cerebro. Los niveles de A β en CSF fueron bastantes similares entre los grupos. La falta de un efecto más importante de la inmunización AN1792 sobre A β endógeno indica que la respuesta inmunitaria está enfocada en las formaciones patológicas de A β .

VIII. Respuesta de Inmunidad para diferentes Coadyuvantes en Ratones

Ratones Swiss Webster de seis semanas de vida se usaron para este estudio con 10-13 animales por grupo. Las inmunizaciones se efectuaron los días 0, 14, 28, 60, 90 y 20 administrándose pro vía subcutánea en un volumen de 100 μ l. Se usó PBS como buffer para todas las formulaciones. Se extrajo sangre de los animales siete días después de cada inmunización a partir de la segunda dosis para el análisis de los títulos de anticuerpos mediante ELISA. El régimen de tratamiento de cada grupo se resume en la Tabla 7.

Tabla 7

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

Notas de pie de paginas:

^a Cantidad de ratones en cada grupo al iniciarse el experimento.

^b Se tomó nota de los coadyuvantes. El buffer para todas estas formulaciones fue PBS. Para el grupo 8, no había coadyuvante no antígeno.

8. Las
ubaron

agregó
uminio
μg del
olumna
urante

polvo
96B) a
ometió
undos
ión se
éptido
3S por

polvo
ta una
ión se
μg de
PBS y
l uso.
4), se
ivante
neras
o se

Tabla 9

Títulos de Anticuerpos de Promedio Geométrico ^a					
Semana de Extracción					
Tratamiento	3,3	5,0	9,0	13,0	17,0
Alumbre/ An1792	102 (12/12) ^b	1,081 (17/20)	2,366 (21/21)	1,083 (19/21)	572 (18/21)
MPL/ AN1792	6241 (21/21)	28.867 (21/21)	1.1242 (21/21)	5.665 (20/20)	8.204 (20/20)
QS-21/ AN1792	30 (1/20)	227 (10/19)	327 (10/19)	1.511 (17/18)	1.188 (14/18)
Alumbre/ AN1528	10.076 (15/15)	61.279 (15/15)	75.386 (15/15)	41.628 (15/15)	30.574 (15/15)
MPL/ AN1528	25 (0/21)	33 (1/21)	39 (3/20)	37 (1/20)	31 (2/20)
QS-21/ AN1528	184 (15/21)	2.591 (20/21)	1.653 (21/21)	1.156 (20/20)	3.099 (20/20)
QS-21/ AN1528	29 (1/22)	221 (13/22)	51 (4/22)	820 (20/22)	2.994 (21/22)
PBS más Timerosal	25 (0/16)	33 (2/16)	39 (4/16)	37 (3/16)	47 (4/16)
PBS	25 (0/16)	25 (0/16)	25 (0/15)	25 (0/12)	25 (0/16)

Notas al pie de página:

^a Títulos de anticuerpos promedio geométricos medidos contra Aβ1-42

^b Cantidad de respuestas por grupo

Los resultados del tratamiento con AN1792 y 1528 con varios coadyuvantes, o con timerosal sobre la carga amiloide cortical en ratones de 12 meses e vida determinadas mediante ELISA se muestra en la Figura 15. En los ratones PDAPP de control con PBS, el nivel medio de A β total en la corteza a los 12 meses fue de 1.817 ng/g. Se observaron niveles de notablemente reducidos de A β en ratones tratados con AN1792, más CFA/IFA, AN1792 más alumbre, AN1792 más MPL y QS-21 más AN1792. La reducción alcanzó significado estadístico ($p < 0,05$) únicamente para N1792 además de CFA/IFA. Sin embargo, tal como se muestran en los ejemplos I y III, los efectos de la inmunización para reducir los niveles de A β , fueron substancialmente superiores en ratones de 15 meses y de 18 meses. Además se espera que por lo menos las composiciones de AN1792 más alumbre, AN1792 más MPL y AN1792 más QS-21 lograrán un significado estadístico para el tratamiento de los ratones más viejos. En contraste, el AN1792 además del timerosal preservador mostró un nivel medio de A β que era aproximadamente igual que el de los ratones tratados con PBS. Se obtuvieron resultados similares cuando se compararon niveles corticales de A β 42. El nivel medio de A β 42 en los controles PBS fue de 1624 ng/g. SE observaron niveles medios notablemente reducidos de 403, 1149, 620 y 714 en los ratones tratados con An1792 más CFA/IFA, AN1792 más lumbre, AN1792 más MPL y AN1792 más QA-21 respectivamente, lográndose una reducción estadísticamente significativa ($p=0,05$) para el grupo de tratamiento AN1792 CFA/IFA. El nivel medio en los ratones tratados con AN1792 timerosal fue de 1619 ng/g A β 42.

X. Análisis de la Toxicidad

SE recogieron tejidos para exámenes histopatológicos al terminar los estudios descritos en los Ejemplos 2, 3 y 7. Además, se efectuó hematología y clínica química en muestras de sangre terminal de los ejemplos 3 y 7. Se evaluó

la mayor parte de los órganos principales, incluyendo cerebro, pulmones, linfoides, gastrointestinales, hígado, riñón, adrenal y gónadas. Aunque se observaron lesiones esporádicas en los animales bajo estudio, no se notaron diferencias obvias, ni en los tejidos afectados ni en la gravedad de las lesiones, entre los animales tratados con AN1792 y los animales no tratados. No se observaron lesiones histopatológicas únicas en animales inmunizados con AN1528 ni en comparación con los animales tratados con PBS o no tratados. Tampoco hubo diferencias en el perfil de química clínica entre los grupos coadyuvantes y los animales tratados con PBS en el Ejemplo 7. Aunque se produjeron aumentos significativos en varios de los parámetros hematológicos entre los animales tratados con AN1792 y coadyuvante de Freund en el Ejemplo 7 en relación a los animales tratados con PBS, este tipo de efectos se esperaba en un tratamiento con coadyuvante de Freund, y las peritonitis que la acompañaron no indicaron ningún efecto adverso del tratamiento de AN1792. Aunque no formó parte de la evaluación toxicológica, la patología cerebral de ratón PDAPP fue extensamente examinada como parte de los puntos finales de eficacia. No se notó ningún signo de efecto adverso relacionado con el tratamiento en la morfología del cerebro en ninguno de los estudios. Estos resultados indican que el tratamiento con AN1792 es muy bien tolerado y está por lo menos substancialmente libre de efectos secundarios.

XI. Tratamiento Terapéuticos con anticuerpos Anti-A β

Estos ejemplos prueban la capacidad de varios anticuerpos monoclonales y policlonales para A β para inhibir la acumulación de A β en el cerebro de ratones transgénicos heterozigóticos.

1. Diseños de Estudio

Dieciséis ratones transgénicos PDAPP heterozigotas, machos y hembras, de 8,5 a 10,5 mese de vida fueron obtenido en Charles River Laboratoy. Los ratones fueron clasificados en seis grupos para ser tratados con varios anticuerpos dirigidos a A β . Los animales fueron distribuidos para aparear, por edad, aparentes de fuentes de los animales dentro de los grupos en la forma más próxima posible.

Tal como se muestra en la Tabla 10 los anticuerpos incluyeron cuatro anticuerpos monoclonales específicos de A β murinos, 2H3 (dirigidos a A β residuos 1-12), 10D5 (dirigido a A β residuos 1-16), 266 (dirigido a A β residuos 13-28 y se adhiere a AN1792 monomérico pero no agregado), 21F12 (dirigido a los residuos A β 33-42). Un quinto grupo se trató con una fracción de anticuerpo policlonal específica de A β (creada por inmunización con AN1792 agregado). El grupo de control negativo recibió el diluyente, PBS, sólo sin anticuerpo.

Se inyectaron anticuerpos monoclonales en una dosis de aproximadamente 10 mg/kg (suponiendo que los ratones pesaban 50 g). Se administraron inyecciones intraperitonealmente cada 7 días en promedio para mantener títulos de anti-A β por arriba 1.000. Aunque se midieron títulos inferiores para mAb 266 debido a que no se adhiere bien al AN1792 agregado usado como antígeno de captura en el ensayo, se mantuvo el mismo programa de dosificación para este grupo. El grupo que recibía anticuerpo monoclonal 2H3 fue discontinuado dentro de las primeras tres semanas debido a que el anticuerpo se evacuó demasiado rápidamente in vivo. Se extrajo sangre de los animales antes de cada dosis para medir los títulos de anticuerpo. El tratamiento se prosiguió en un período de seis meses para un total de 196 días. Los animales fueron eutanizados una semana después de la dosis final.

Tabla 10

DISEÑO EXPERIMENTAL				
Grupo de Tratamiento	No.	Anticuerpo de Tratamiento	Especificidad de Anticuerpo	Isotipo de Anticuerpo
1	9	ninguno (PBS solo)	NA ^b	NA
2	10	Policlonal	Aβ1-42 ^c	mixto
3	0	mAb ^c 2H3	Aβ1-12 ^c	IgG1
4	8	mAb 10D5	Aβ1-16 ^c	IgG1
5	6	mAb 266	Aβ13-28 ^c	IgG1
6	8	mAb 12F12	Aβ33-42	IgG2a

Notas de pie de página

- a. Cantidad de ratones por grupo al terminar el experimento. Todos los grupos comenzaron con 10 animales por grupo.
- b. NA: no aplicable
- c. mAb: anticuerpo monoclonal

2. Materiales y Métodos

a. Preparación de los Anticuerpos

El anticuerpo policlonal Aβ se preparó a partir de la sangre recogida de dos grupos de animales. El primer grupo consistía en 100 ratones de la raza Swiss Webster hembras, de 6 a 8 semanas de edad. Se inmunizaron los días 0, 15, y 29 con 100 µg de AN1792 combinado con CFA/IFA. Se administró una cuarta inyección a los 36 días con la mitad de dosis de AN1792. Los animales fueron desangrados después de sacrificarlos a los 42 días, se preparó suero, y el suero se reunió para crear un total de 64 ml. El segundo grupo consistía en 24 ratones hembra isogénicos con el ratón PDAPP pero no transgénico para el gen APP humano, de 6 a 9 semanas de vida. Se inmunizaron los días 0, 14, 28 y 56

con 100 μ g de AN1792 combinado con CFA/IFA. Estos animales fueron también desangrados mediante sacrificio a los 63 días, se preparó suero y se reunió para un total de 14 ml. Los dos bloques de suero se reunieron. La fracción de anticuerpo se purificó usando dos vueltas secuenciales de precipitación con 50% de sulfato de amonio saturado. El precipitado final fue dializado contra PBS y se ensayó para la endotoxina. El nivel de endotoxina fue de menos de 1 EU/mg. Los anticuerpos monoclonales anti-A β se prepararon a partir de fluido ascítico. El fluido fue primero deslipidado y por adición de sulfato de dextrano de sodio concentrado a fluido ascítico enfriado con hielo mediante agitación en hielo hasta alcanzar una concentración final de 0,238%. Luego se agregó CaCl₂ concentrado con agitación para alcanzar una concentración final de 64mM. Esta solución se centrifugó a 10.000 x g y los gránulos se descartaron. El sobrenadante se agitó en hielo con un volumen igual de sulfato de amonio saturado agregado por goteo. La solución se centrifugó nuevamente a 10.000 x g y el sobrenadante se descartó. Los gránulos se resuspendieron y dializaron contra 20 mM Tris-HCl, 0,4 M NaCl, pH 7,5. Esta fracción se aplicó a una columna de Pharmacia FPLC Sepharose Q y se eluyó con un gradiente inverso de 0,4 M a 0,275 M NaCl en 20 mM Tris-HCl, pH 7,5.

El pico de anticuerpo se identificó por absorción a 280 nM y se reunieron las fracciones apropiadas. La purificación de anticuerpos purificados se caracterizó por medición de la concentración de proteína usando el método BCA y la pureza usando SDS-PAGE. El grupo se ensayo para determinar las endotoxinas. El nivel de endotoxina fue inferior que en los títulos de 1 EU/mg y a títulos inferiores a 100 se les asignó arbitrariamente un valor de título de 25.

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

Después de aproximadamente seis meses de tratamiento con las varias preparaciones de anticuerpos anti-A β , se extrajeron los cerebros de los animales después de perfusión salina. Se preparó un hemisferio para el análisis inmunohistoquímico y el segundo se usó para la cuantificación de los niveles de A β y APP. Para medir las concentraciones de varias formas de péptido beta amiloide y de proteína precursora amiloide (APP), el hemisferio fue disectado, y se preparon homogenizados de las regiones hipocampal, cortical, y de cerebelo en guanidina 5M. Estos fueron diluidos seriadamente y el nivel de péptido amiloide o APP se cuantificó por comparación con una serie de diluciones de patrones del péptido A β o de APP de una concentración conocida en un formato ELISA.

Los niveles de A β y de A β 1-42 medidos por ELISA en homogenizados de la corteza, y del hipocampo y el nivel de A β total en el cerebelo se muestran en las tablas 11, 12, y 13, respectivamente. La concentración media de A β total para el grupo de control, inoculado con PBS, fue 3,6 veces superior en el hipocampo que en la corteza (media de 63,389 ng/g de tejido hipocampal en comparación con 17.818 ng/g para la corteza). El nivel medio del grupo de control en el cerebelo (30,6 ng/g de tejido) fue más de 2.000 veces menor que en el hipocampo. Estos niveles son similares a los que se informaron previamente para ratones transgénicos PDAPP heterozigotas de esta edad (Johnson-Wood et al., 1997).

Para la corteza, un grupo de tratamiento tenía un nivel A β medio medido como A β 1-42, que difirió significativamente del grupo de control ($p < 0,05$), y los animales que recibieron el anticuerpo anti-A β policlonal tal como se muestra en la Tabla 11. El nivel medio de A β 1-42 se redujo en un 65% en comparación con el control para este grupo de tratamiento. Los niveles medios de A β 1-42 se redujeron también significativamente en un 55% en comparación con el control en

un grupo de tratamiento adicional, en aquellos animales dosificados con mAb 10D5 ($p = 0,0433$).

Tabla 11

CORTEZA									
Grupo de Tratamiento	No.	Media						Medios	
		Total A β			A β 42			Total A β	A β 42
		valor ^b ELISA	valor ^c P	% de cambio	valor ELISA	valor P	% de cambio	valor ELISA	valor ELISA
PBS	9	17818	NA ^d	NA	13802	NA	NA	16150+/-7456 ^e	12621+/-5738
anti- A β 42 Policlonal	10	6160	0,0055	-65	4892	0,0071	-65	5912+/-4492	4454+/-3347
mAb 10D5	8	7915	0,1019	-56	6214	0,0433	-55	9695+/-6929	6943+/-3351
mAb 266	6	9144	0,1255	-49	8481	0,1255	-39	9204+/-9293	7489+/-6921
mAb 21F12	8	15158	0,2898	-15	13578	0,7003	-2	12481+/-7082	11005+/-6324

Notas al pie de página:

- f. Cantidad de animales por grupo al finalizar el experimento
- g. ng/g de tejido
- h. Análisis Mann Whitney
- i. NA: no aplicable
- j. Desviación Standard

En el hipocampo, la reducción porcentual media de A β total asociado con el tratamiento con anticuerpos anti-A β policlonales (50%, $p = 0,0055$) no fue tan grande como el que se observó en la corteza (65%) (Tabla 12). Sin embargo, la magnitud absoluta de la reducción fue casi 3 veces mayor en el hipocampo que en la corteza, una reducción neta de 31.683 ng/g de tejido en el hipocampo versus 11.658 ng/g de tejido en la corteza. Cuando se midió como nivel de la forma más amiloidogénica de A β , A β 1-42, en vez de cómo A β total, la reducción que se logró con el anticuerpo policlonal fue significativa ($p = 0,0025$). Los niveles medios en los grupos tratados con mAbs 10D5 y 266 se redujeron en un 33% y 21%, respectivamente.

Tabla 12

HIPOCAMPO									
Grupo de Tratamiento	No.	Media						Medios	
		Total A β			A β 42			Total A β	A β 42
		valor ^b ELISA	valor ^c P	% de cambio	valor ELISA	valor P	% de cambio	valor ELISA	valor ELISA
PBS	9	63389	NA ^d	NA	54429	NA	NA	58351+/-13308 ^e	52801+/-14701
anti- A β 42 Policlonal	10	31706	0,0055	-50	27127	0,0025	-50	30058+/-22454	24853+/-18262
mAb 10D5	8	46779	0,0675	-26	36290	0,0543	-33	44581+/-18632	36465+/-17146
mAb 266	6	48689	0,0990	-23	43034	0,0990	-21	36419+/-27304	32919+/-25372
mAb 21F12	8	51563	0,7728	-19	47961	0,8099	-12	57327+/-28927	50305+/-23927

Notas al pie de página:

- a. Cantidad de animales por grupo al finalizar el experimento
- b. ng/g de tejido
- c. Análisis Mann Whitney
- d. NA: no aplicable
- e. Desviación Standard

Oct

También se midió el A β total en el cerebelo (Tabla 13). Los grupos dosificados con el anti-A β policlonal y los 266 anticuerpos mostraron significativas reducciones de los niveles de A β total (43% y 46%, $p = 0,0033$ y $p = 0.0184$, respectivamente) y el grupo tratado con 10D5 tuvo una reducción casi significativa (29%, $p = 0,0675$).

Tabla 13

CEREBELO					
Grupo de Tratamiento	No.	Media			Medios
		Total A β			Total A β
		valor ^b ELISA	valor ^c P	% Cambio	valor ELISA
PBS	9	30,64	NA ^d	NA	40,00+/-31,89 ^e
anti-A β 42 Policlonal	10	17,61	0,0033	-43	18,15+/-4,36
mAb 10D5	8	21,68	0,0675	-29	27,29+/-19,43
mAb 266	6	16,59	0,0184	-46	19,59+/-6,59
mAb 21F12	8	29,80	>0,9999	-3	32,88+/-9,90

Notas al pie de página:

- a. Cantidad de animales por grupo al finalizar el experimento
- b. ng/g de tejido
- c. Análisis Mann Whitney
- d. NA: no aplicable
- e. Desviación Standard

También se determinó la concentración de APP mediante ELISA en la corteza y el cerebelo de ratones tratados con anticuerpos, y los de control, y tratados con PBS. Se usaron dos ensayos de APP diferentes. El primero, designado APP- α /FL, reconoce ambos APP-alfa (α , la forma secretada de APP

que fue desdoblada dentro de la secuencia $\alpha\beta$), y las formas de longitud total (FL) de APP, mientras que el segundo reconoce únicamente APP- α . En contraste con la disminución de A β asociada con el tratamiento en un subgrupo de grupos de tratamiento, los niveles de APP permanecieron virtualmente invariables en todos los animales tratados en comparación con los animales de control. Estos resultados indican que las inmunizaciones con los anticuerpos A β yacían en A β sin vaciar el APP.

Resumiendo, los niveles de A β se redujeron significativamente en la corteza hipocampo y cerebelo en animales tratados con el anticuerpo policlonal creado contra AN1792. En menor grado, los anticuerpos monoclonales para la región amino terminal de A β 1-42, específicamente los amino ácidos 1-16 y 13-28 mostraron también efectos de tratamientos significativos.

4. Análisis Histoquímico:

La morfología de las placas A β -inmunoreactivas en los subgrupos de cerebros de ratones en grupos de tratamiento con PBS, A β 42 policlonal, 21F12, 266 y 10D5 se compararon cualitativamente con los de los estudios previos en los cuales se siguieron los procedimientos de inmunización convencional con A β 42.

La alteración más importante tanto en la extensión como en la apariencia de placas amiloides ocurrió en animales inmunizados con el anticuerpo A β 42 policlonal. La reducción de la carga amiloide, la morfología de la placa erosionada, y la inmunoreactividad A β asociada a las células, fue estrechamente parecida a los efectos producidos por el procedimiento de inmunización convencional. Estas observaciones apoyan los resultados de ELISA donde se lograron reducciones significativas tanto en el A β total como en el A β 42 mediante la administración del anticuerpo policlonal A β 42.

En evaluaciones cualitativas similares, las placas amiloides en el grupo 10D5 también se redujeron en cantidad y en apariencia, con cierta evidencia de inmunoreactividad A β asociada a células. En relación a los animales tratados con control, la fracción policlonal Ig contra A β y uno de los anticuerpos monoclonales (10D5) redujo la carga de placas en un 93% y 81%, respectivamente ($p < 0,005$). El 21F12 pareció tener un efecto relativamente molesto sobre la carga de placas. Las micrografías de cerebro después del tratamiento con pabA β_{1-42} muestran depósitos difusos y ausencia de muchas de las placas compactadas más grandes en el grupo tratado con pabA β_{1-42} en relación a los animales tratados con control.

5. Medición de los Títulos de Anticuerpo:

Se extrajo sangre de un subgrupo de res ratones elegidos al azar de cada grupo justo antes de cada inoculación intraperitoneal, con un total de 30 extracciones. Se midieron los títulos de anticuerpos como anticuerpo de adhesión a A β_{1-42} usando un sandwich ELISA con placas de multi-receptáculos plásticos revestidos con A β_{1-42} como se describió en forma detallada en Materiales y Métodos Generales. Los títulos medios de cada extracción se muestra en las Figuras 16-18 para el anticuerpo policlonal y los monoclonales 10D5 y 21F12, respectivamente. Los títulos promediaron aproximadamente 1.000 a lo largo de este período de tiempo para la preparación de los anticuerpos policlonales y estuvieron levemente por arriba de este nivel para los animales tratados con 10D5- y 21F12-.

6. Respuestas Linfoproliferativas

Se midió la linfoproliferación dependiente de A β usando células de bazo cosechadas ocho días después de la infusión final de anticuerpo. Células recientemente cosechadas, a razón de 10^5 por receptáculo, se cultivaron durante

5 días en presencia de A β 1-40 en una concentración de 5 μ M para estimulación. Como control positivo se cultivaron células adicionales con el mitógeno de célula T, PHA, y, como control negativo, las células se cultivaron sin agregado de péptido.

Los esplenocitos de ratones PDAPP viejos inmunizados pasivamente con varios anticuerpos anti-A β , fueron estimulados *in vitro* con AN1792, y se midieron las respuestas proliferativas y de citoquina. El propósito de estos ensayos fue determinar si una inmunización pasiva facilitaba la presentación de antígeno, y por lo tanto el cebado de respuestas de célula T específicas para AN1792. No se observó ninguna respuesta específica para AN1792 proliferativa o de citoquina en ratones inmunizados pasivamente con los anticuerpos anti-A β .

XII: ESTUDIO ADICIONAL DE INMUNIZACION PASIVA

En un segundo estudio, se repitió el tratamiento con 10D5 y se ensayaron dos anticuerpos anti-A β adicionales 3D6 (A β ₁₋₅) y 16C11 (A β ₃₃₋₄₂). Los grupos de control recibieron PBS o bien un anticuerpo apareado con isotipos irrelevante (TM2a). Los ratones eran más viejos (heterozigotas de 11,5-12 meses de vida) en comparación con el estudio previo, pero por otra parte el diseño experimental fue el mismo. Nuevamente después de seis meses de tratamiento, el 10D5 redujo la carga de placas en más del 80% en relación a cualquiera de los controles de PBS o de anticuerpo apareado con isotipo ($p=0,003$). Uno de los otros anticuerpos contra A β , el 3D6, fue igualmente eficaz, produciendo una reducción del 86% ($p=0,003$). En contraste, el tercer anticuerpo contra el péptido 16C11, fracasó en producir algún efecto sobre la carga de placas. Se obtuvieron resultados similares con las mediciones de A β ₄₂ en ELISA. Estos resultados demuestran que una respuesta de anticuerpo contra el péptido A β , en ausencia de la inmunidad de la célula T, es suficiente para disminuir la deposición de amiloides en los ratones

PDAPP, pero no todos los anticuerpos anti-A β son eficaces. Los anticuerpos dirigidos a los epitopos que comprenden los amino ácidos 1-5 o 3-7 de A β son particularmente eficaces.

Resumiendo, hemos demostrado que los anticuerpos administrados pasivamente contra A β redujeron el grado de deposición de placas en un modelo de ratón de enfermedad de Alzheimer. Cuando se mantuvieron en modestas concentraciones de suero (25-70 μ g/ml), los anticuerpos tuvieron acceso al CNS a niveles suficientes para decorar placas β -amiloides. La entrada de anticuerpos en el CNS no fue debida a una fuga anormal en la barrera de sangre-cerebro, ya que no hubo ningún incremento de permeabilidad vascular medida por Evans Blue en ratones PDAPP. Además la concentración de anticuerpos en el parenquima del cerebro de ratones PDAPP viejos fue igual que en los ratones no transgénicos, lo cual representó 0,1% de la concentración de anticuerpo en el suero. (independientemente del isotipo).

XIII: MONITOREO DE UNA ADHESION DE ANTICUERPO

Para determinarse los anticuerpos contra A β podían actuar directamente dentro del CNS, se examinaron cerebros tomados de ratones perfusionados con solución salina al finalizar el segundo estudio, con el fin de determinar la presencia de los anticuerpos administrados periféricamente. Se expusieron secciones de cerebro criostáticas no fijadas a un reactivo fluorescente contra inmunoglobulina de ratón (IgG-Cy3 anti-ratón de cabra). Las placas dentro de los cerebros de los grupos 10D5 y 3D6 fueron fuertemente decoradas con anticuerpo, mientras que no se observó ninguna tinción en el grupo 16C11. Para revelar el grado total de deposición de placas, se inmunoreaccionaron primero secciones seriadas de cada cerebro con un anticuerpo anti-A β , y luego con el reactivo secundario. 10D5 y 3D6, después de administración periférica, tuvieron acceso a

la mayoría de las placas dentro del CNS. La carga de placas se redujo enormemente en estos grupos de tratamiento en comparación con el grupo 16C11. Estos datos indican que los anticuerpos periféricamente administrados pueden entrar al CNS donde pueden desencadenar directamente la evacuación de amiloides. Probablemente el 16C11 tuvo también acceso a las placas pero fue incapaz de adherirse a las mismas.

XIV: ENSAYO DE RASTREO EX VIVO PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD DE UN ANTICUERPO CONTRA DEPOSITOS AMILOIDES

Para examinar el efecto de anticuerpos de la evacuación de placas, hemos establecido un ensayo *ex vivo* en el cual se cultivan células microgliales primarias con secciones criostáticas no fijadas de cerebros de PDAPP de ratón o AD humano. Se obtuvieron células microgliales de las cortezas cerebrales de ratones DBA/2N neonatos (1-3 días). Las cortezas fueron disociadas mecánicamente en HBSS (Hanks Balanced Salt Solution, Sigma) con 50 µg/ml DNase I (Sigma). Las células disociadas se filtraron con un colador de células de 100 µm (Falcon), y se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos. Los gránulos se resuspendieron en un medio de cultivo (DMEM de alto contenido de glucosa, 10% de FBS, 25 ng/ml rmGM-CSF), y las células se depositaron a una densidad de dos cerebros por frasco de cultivo plástico de T-75. Después de 7-9 días, los frascos se hicieron girar en un agitador orbital a 200 rpm durante 2 horas a 37°C. La suspensión de células se centrifugó a 1.000 rpm y se resuspendió en el medio de ensayo.

Se descongelaron secciones criostáticas de 10 µm de cerebros de ratón con PDAPP o con AD humano (post-mortem, intervalo <3 hr) sobre platinas de vidrio redondas recubiertas con poli-lisina y se colocaron en receptáculos de placas de cultivo de tejidos de 24 receptáculos. Las platinas se lavaron dos veces con el medio de ensayo que consistía en H-SFM (Medio libre de hibridoma-suero,

Gibco BRL) con 1% de FBS, glutamina, penicilina/estreptomicina, y 5 ng/ml rmGN-CSF (R&D). Se agregaron anticuerpos antio-A β o de control en concentraciones de 2x (5 μ g/ml final) durante 1 hora. Las células microgliales fueron luego sembradas a una densidad de $0,8 \times 10^6$ células /ml de medio de ensayo. Los cultivos se mantuvieron en un incubador humedecido (37°C, 5%CO₂) durante 24 horas o más. Al finalizar la incubación se fijaron los cultivos con 4% de paraformaldehído y se permeabilizaron con 0,1% de Triton-X100. Se tiñeron las secciones con 3D6 biotinilado seguido de un conjugado de estreptavidina/Cy3 (Jackson ImmunoResearch). Las células microgliales exógenas fueron visualizadas mediante tinción nuclear (DAPI). Se observaron los cultivos con un microscopio fluorescente invertido (Nikon, TE300) y se tomaron fotomicrografías con una cámara digital SPOT usando software SPOT (instrumentos de diagnósticos). Para el análisis del bórñon Western los cultivos se extrajeron en urea 8M, se diluyeron a 1:1 en un buffer de muestra reductor de tricina y se cargaron en un gel al 16% de tricina (Novex). Después de transferir sobre inmóbilon, los bórñones se expusieron a 5 μ g/ml del pabA β 42 seguido de un anticuerpo anti-ratón conjugado con HRP, y se desarrollaron con ECL (Amesham).

Cuando el ensayo se llevó a cabo con secciones de cerebro de PDAPP en presencia de 16C11 (uno de los anticuerpos contra A β no fue eficaz *in vivo*), las placas β -amiloide permanecieron intactas y no se observó fagocitosis. En contraste, cuando se cultivaron secciones adyacentes en presencia de 10D5, los depósitos amiloides desaparecieron ampliamente y las células microgliales mostraron numerosas vesículas fagocíticas que contenían A β . Se obtuvieron resultados idénticos con secciones de cerebro de AD; 10D5 indujo fagocitosis de las placas AD mientras que 16C11 fue ineficaz. Además, el ensayo proporcionó

resultables comparables cuando se llevó a cabo con células microgliales humanas o de ratón y con anticuerpos de ratón, conejo, o primate contra A β .

La Tabla 14 muestra si se obtiene la adhesión y/o fagocitosis para varias especificidades de adición de anticuerpo diferentes. Puede observarse que los anticuerpos que se adhieren a los epitopos dentro de aa 1-7 se fijan ambos y vacían los depósitos amiloides mientras que los anticuerpos que se adhieren a los epitopos dentro de los amino ácidos 4-10 se adhieren sin evacuar los depósitos amiloides. Los anticuerpos que se adhieren a los epitopos C-terminales al residuo 10 ni se adhieren ni limpian los depósitos amiloides.

Tabla 14: Análisis de Especificidad de Epitopos

	Anticuerpo		Coloración	Fagocitosis
	epitope	isotipo		
N-Term				
mab				
3D6	1-5	IgG2b	+	+
10D5	3-6	IgG1	+	+
22C8	3-7	IgG2a	+	+
6E10	5-10	IgG1	+	-
14A8	4-10	rat IgG1	+	-
13-28				
18G11	10-18	rat IgG1	-	-
266	16-24	IgG1	-	-
22D12	18-21	IgG2b	-	-
C-Term				
2G3	-40	IgG1	-	-
16C11	-40/-42	IgG1	-	-
21F12	-42	IgG2a	-	-
Suero Inmune				
conejo (CFA)	1-6		+	+
ratón (CFA)	3-7		+	+
ratón (QS-21)	3-7		+	+
mono (QS-21)	1-5		+	+
ratón (MAP1-7)			+	+

La tabla 15 muestra los resultados obtenidos con varios anticuerpos contra A β , comparando sus capacidades para inducir fagocitosis en el ensayo *ex vivo* y para reducir la carga de placas *in vivo* en estudios de transferencia pasiva. Aunque 16C11 y 21F12 se adhieren al péptido A β sintético agregado con enorme avidéz (Tabla 1), como estos anticuerpos fueron incapaces de reacciones con las placas β -amiloides en secciones de cerebro no fijadas, no pudieron desencadenar fagocitosis en el ensayo *ex vivo*, y no fueron eficaces *in vivo*. 10D5, 3D6 y el anticuerpo policlonal contra A β fueron activos en las tres otras mediciones. El anticuerpo 22C8⁸ se adhiere más fuertemente a una forma análoga de A β natural en la cual el ácido aspártico en posiciones 1 y 7 es reemplazado con ácido iso-aspártico. Estos resultados muestran que la eficacia *in vivo* se debe a la evacuación directa intermediada por anticuerpos de las placas dentro del CNS, y que el ensayo *ex vivo* es predictivo de la eficacia *in vivo*.

Se uso el mismo ensayo para probar la evacuación de un anticuerpo contra un fragmento de sinucleína que se menciona como NAC. Se demostró que la sinucleína era la proteína asociada a una placa amiloide. Se puso en contacto un anticuerpo para NAC con una muestra de tejido cerebral que contenía placas amiloides, y células microgliales tal como anteriormente. Se uso suero de conejo como control. El monitoreo subsiguiente mostró una marca reducción en la cantidad y tamaño de placas lo cual es indicativo de la actividad evacuadora del anticuerpo.

Tabla 15 Ensayo *ex vivo* como predicción para la eficacia *in vivo*.

Tabla 1					
Anticuerpo	Isotipo	Avidez para A β agregada (pM)	Adhesión placas β -amiloides	Eficacia <i>Ex vivo</i>	Eficacia <i>In vivo</i>
monoclonal					
3D6	IgG2b	470	+	+	+
10D5	IgG1	43	+	+	+
16C11	IgG1	90	-	-	-
21F12	IgG2a	500	-	-	-
TM2a	IgG1	-	-	-	-
policlonal					
1-42	mezcla	600	+	+	+

Se uso microscopio confocal para confirmar que A β había sido internalizado durante el curso del ensayo *ex vivo*. En presencia de los anticuerpos de control, las células microgliales exógenas permanecieron en un plano confocal por arriba del tejido, no se observaron vesículas fagocíticas que contuvieran A β , y las placas permanecieron intactas dentro de la sección. En presencia de 10D5, casi todo el material de placas estaba contenido en vesículas dentro de las células microgliales exógenas. Para determinar el destino del péptido internalizado, cultivos tratados con 10D5 fueron extraídos con urea 8M en varios puntos de tiempo y se examinaron mediante análisis de bórón Western. Al cabo de una hora cuando no había ocurrido todavía fagocitosis, la reacción con un anticuerpo policlonal contra A β reveló una fuerte banda de 4 kD (que corresponde

al péptido A β). La inmunoreactividad A β disminuyo el día 1 y estuvo ausente en el día 3. Por lo tanto la fagocitosis intermediada por anticuerpos de A β puede conducir a su degradación.

Para determinarse la fagocitosis en el ensayo *ex vivo* estaba intermediada por Fc, se prepararon fragmentos de F(ab')₂ del anticuerpo anti-A β 3D6. Aunque los fragmentos F(ab')₂ retuvieron su capacidad total para reaccionar con las placas, fueron incapaces de desencadenar fagocitosis mediante células microgiales. Además, la fagocitosis con el anticuerpo entero pudo ser bloqueado mediante un agente contra receptores Fc murinas (anti-CD16/32). Estos datos indican que la evacuación *in vivo* de A β ocurre a través de la fagocitosis intermediada por el receptor Fc.

XV: PASAJE DE ANTICUERPOS A TRAVES DE LA BARRERA DE SANGRE CEREBRAL

Este ejemplo determina la concentración de anticuerpo liberado al cerebro después de inyección intravenosa en un tejido periférico de ratones PDAPP o normales. Los ratones PDAPP o normales de control se perfusionaron con 0,9% de NaCl. Se disectaron regiones del cerebro (hipocampo o corteza) y se congelaron rápidamente. El cerebro se homogenizó en 0,1% de triton + inhibidores de proteasa. Se detectó inmunoglobulina en los extractos mediante el ELISA. Se recubrió IgG anti-ratón de cabra Fab'2 sobre una placa RIA como reactivo de captura. El suero o los extractos del cerebro se incubaron durante 1 hora. Los isotipos se detectaron con IgG1-HRP o IgG2a-HRP o IgG2b-HRP (Caltag) de ratón. Los anticuerpos, independientemente del isotipo estaban presentes en el CNS en una concentración que es de 1:1000 y que se encuentra en la sangre. Por ejemplo, cuando la concentración de IgG1 era tres veces la de IgG2a en la sangre, estaba tres veces la IgG2a también en el cerebro, estando

ambas presentes a razón de 0,1% de sus respectivos niveles en la sangre. Este resultado se observó tanto en los ratones transgénicos como en los no transgénicos de manera que el PDAPP no tiene solamente una fuga en la barrera de cerebro/sangre.

XVI. PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DE SUJETOS

Se efectuó la prueba de dosis única de fase I para determinar la seguridad. Se administró un agente terapéutico en cantidades crecientes a diferentes pacientes a partir de desde aproximadamente 0,01 en el nivel de eficacia presumida y se incremento en un factor de tres hasta alcanzar un nivel de aproximadamente 10 veces la dosis eficaz en ratones.

Se llevo a cabo una prueba de fase II para determinar la eficacia terapéutica. Se seleccionaron pacientes con enfermedad precoz a media de Alzheimer definidos usando los criterios de la enfermedad de Alzheimer y de la Asociación de Desordenes Relacionados (ADRDA) para los probables AD. Los pacientes apropiados están en el rango de 12-26 en el Examen de Estado Mini-Mental (MMSE). Otros criterios de selección son los pacientes que probablemente sobrevivirán a la duración del estudio y que carecen de complicaciones tales como el uso de medicaciones con comitantes que pudieran interferir. Las evaluaciones de línea de base de la función del paciente se efectuaron usando mediciones psicométricas clásicas tales como MMSE, y ADAS, que es una escala comprensiva para evaluar pacientes con la función y estado de la enfermedad de Alzheimer. Estas escalas psicométricas proveen una medición del avance de la condición de Alzheimer. Las escalas de vida cualitativa apropiadas pueden usarse, también para monitorear el tratamiento. El avance de la enfermedad puede monitorearse también mediante MRI. Los perfiles de sangre de pacientes pueden

monitorearse también incluyendo ensayos de anticuerpos específicos para inmunogenos y respuestas a las células T.

Siguiendo las medidas de la línea de base, los pacientes comenzaron a recibir tratamiento. Fueron elegidos al azar y tratados con el agente terapéutico o bien con placebo en una forma a ciegas. Los pacientes fueron monitoreados por lo menos cada seis meses. La eficacia se determinó mediante una reducción significativa en el avance de un grupo de tratamiento en relación al grupo con placebo. Se efectuó una segunda prueba de fase II para evaluar la conversión de pacientes que sufrían de pérdida de memoria precoz que no era causada por la enfermedad de Alzheimer, que se denomina algunas veces deterioro de memoria asociado con la edad (AAMI) o con deterioro cognitivo leve (MCI), a probable enfermedad de Alzheimer según se define por los criterios de ADRDA. Los pacientes con riesgo elevado de convertirse a la enfermedad de Alzheimer fueron seleccionados entre una población no clínica rastreando poblaciones de referencia para determinar signos precoces de pérdida de memoria u otras dificultades asociadas con la sintomatología pre-Alzheimer, una historia familiar de enfermedad de Alzheimer, factores de riesgo genético, edad, sexo y otras características que se halló que podían predecir alto riesgo de sufrir la enfermedad de Alzheimer. Se recogieron resultados de línea de base en métricas apropiadas que incluyen el MMSE y ADAS conjuntamente con otras métricas diseñadas para evaluar una población más normal. Estas poblaciones de pacientes se dividieron en grupos apropiados con comparaciones con placebo contra dosis alternativas con el agente. Estas poblaciones de pacientes fueron seguidas a intervalos de aproximadamente seis meses, y el punto final para cada paciente es determinar si se convertirá o no a un probable enfermo de Alzheimer según se define por los criterios de ADRDA al final de la observación.

XIII. MATERIALES Y METODOS GENERALES

1. Medición de Títulos de Anticuerpos

Se extrajo sangre de ratones haciendo una pequeña muesca en la vena de la cola y recogiendo aproximadamente 200 μ l de sangre en un tubo de microcentrifugadora. Se extrajo sangre de conejillos de india rasurando primero el área dorsal del jarrete y usando luego una aguja de calibre 18 para perforar la vena metatarsal y recoger la sangre en tubos de microcentrifugadora. La sangre se dejó coagular durante 1 hora a temperatura ambiente, se sometió a torbellino y luego se centrifugó a 14.000 x g durante 10 minutos para separar los coágulos del suero. Luego el suero fue transferido a un tubo limpio de microcentrifugadora y se almacenó a 4°C hasta el momento de la titulación.

Se midieron los títulos de anticuerpo mediante ELISA. Se recubrieron placas microtituladoras de 96 receptáculos (placas Costar EIA) con 100 μ l de una solución que contenía o bien 10 μ l/ml de cualquiera de A β 42 o SAPP o bien otros antígenos tal como se indica en cada uno de los informes individuales en Well Coating Buffer (fosfato de sodio 0,1 M, pH 8,5, 0,1% de azida de sodio), y se mantuvo durante toda la noche a temperatura ambiente. Los receptáculos fueron aspirados y se agregaron sueros a los receptáculos comenzando con una dilución de 1/100 en el Diluyente de Espécimen (fosfato de sodio 0,014 M, pH 7,4, 0,15 M de NaCl, 0,6% de albumina de suero bovino, 0,05% de timerosal). Se prepararon directamente 7 diluciones seriadas de las muestras en tres etapas hasta alcanzar una dilución final de 1/218.700. Las diluciones se incubaron en los receptáculos de la placa recubierta durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego las placas se lavaron cuatro veces con PBS que contenía 0,05% de Tween 20. El segundo anticuerpo, un Ig anti-ratón de cabra conjugado de peroxidasa de rabano picante (obtenido en Boehringer Mannheim), se agregó a los receptáculos a razón de 100 μ l de una dilución 1/3000 en el Diluyente de Espécimen y se incubó durante 1

hora a temperatura ambiente. Nuevamente se lavaron las placas cuatro veces en PBS, Tween 20. Para desarrollar el cromogeno, se agregaron a cada receptáculo 100 μ l de Slow TMB (3, 3', 5, 5'-tetramil bencidina obtenida en Pierce Chemicals) y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. La reacción se interrumpió mediante la adición de 25 μ l de 2 M H_2SO_4 . La intensidad de color fue luego leída en un Molecular Devices Vmax a (450 nm - 650 nm).

Los títulos se definen como la reciproca de la dilución de suero que proporciona la mitad del OD máximo. El OD máximo generalmente se toma a partir de una dilución inicial de 1/100 excepto en casos con títulos muy elevados en cuyo caso es necesaria una dilución inicial más elevada para establecer el OD máximo. Si el punto de 50% cae entre las dos diluciones, se efectuó una extrapolación lineal para calcular el título final. Para calcular los títulos promedio de anticuerpos en forma geométrica, se les asigna a los títulos inferiores a 100 en forma arbitraria un valor de título de 25.

2. Ensayo de proliferación de linfocitos

Se anestesiaron ratones con isoflurano. Se extrajeron los bazo y se enjuagaron dos veces con 5 ml de PBS que contenía 10% de suero bovino fetal inactivado por calor (PBS-FBS) y luego se homogenizaron en una unidad Centricon a 50° (Dako A/S, Dinamarca) en 1,5 ml de PBS-FBS durante 10 segundos a 100 rpm en una Medimachine (Dako) seguido de filtración a través de una malla de nylon de un tamaño de poro de 100 micrones. Se lavaron los esplenocitos una vez con 15 ml de PBS-FBS, luego se granularon por centrifugación a 200 x g durante 5 minutos. Las células rojas de la sangre se lisaron mediante resuspensión de los gránulos en 5 ml de buffer que contenía 0,15 M NH_4Cl , 1 M $KHCO_3$, 0,1 M $NaEDTA$, pH 7,4 durante cinco minutos a temperatura ambiente. Luego se lavaron los leucocitos tal como

precedentemente. Se cultivaron células de bazo recientemente aisladas (10^5 células por receptáculo) en grupos por triplicado en placas microtituladoras tratadas con cultivos de tejido en una placa de fondo en forma de U de 96 receptáculos (Corning, Cambridge, MA) en RPMI 1640 medio (JRH Biosciences, Lenexa, KS) suplementado con 2,05 mM de L-glutamina, 1% de Penicilina/Estreptomicina, y 10% de FBS inactivado por calor durante 96 horas a 37°C. También se agregaron varios péptidos A β , la proteína de secuencia inversa A β 1-16, A β 1-40, A β 1-42 o A β 40-1 en dosis comprendidas entre los 5 a 0,18 micromoles en cuatro etapas. Las células de los receptáculos de control se cultivaron con Concanavalin A (Con A) (Sigma, cat. # C-5275, a 1 microgramo/ml) sin agregado de proteína. Las células fueron pulsadas durante las 24 horas finales con 3H-timidina (1 μ Ci/receptáculo obtenido en Amersham Corp., Arlington Heights IL). Luego se cosecharon las células sobre placas UniFilter y se contaron en un Contador de Centelleo de Microplacas de Recuento Superior (Packard Instruments, Downers Grove, IL). Los resultados se expresan como el recuento por minuto (cpm) de radioactividad incorporada a macromolécula insolubles.

4. Preparación de Tejido Cerebral

Después de la eutanasia, se extrajeron los cerebros y se preparó un hemisferio para análisis inmunohistoquímico, mientras que tres regiones cerebrales (hipocampo, corteza y cerebelo) se disectaron del otro hemisferio y se usaron para medir la concentración de varias proteínas A β y APP usando ELISAs específicas (Johnson-Wood et al., supra).

Los tejidos destinados a ELISA homogeneizaron en 10 volúmenes de buffer de guanidina enfriado con hielo (guanidina 5,0 M HCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0). Los homogeneizados se mezclaron mediante suave agitación usando un Adams Nutator (Fisher) durante 3 ó 4 horas a temperatura ambiente y luego se

almacenaron a -20°C antes de la cuantificación de $\text{A}\beta$ y APP. Los experimentos previos demostraron que los analitos eran estables bajo estas condiciones de almacenamiento, y que la proteína sintética $\text{A}\beta$ (Bachem) pudo ser cuantitativamente recuperada cuando se depositó en homogeneizados de tejido para el control del cerebro provenientes de camadas de ratones (Johnson-Wood et al., supra).

5. Medición de los Niveles de $\text{A}\beta$

Se diluyeron los homogeneizados de cerebro a razón de 1:10 con diluyente de caseína enfriado con hielo (0,25% de caseína, PBS, 0,05% de azida de sodio, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de aprotinina, 5 mM EDTA pH 8,0, 0,10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptina) y luego se centrifugaron a 16000 x g durante 20 minutos a 4°C . Los patrones de proteína $\text{A}\beta$ sintética (1-42 aminoácidos), y los patrones de APP se prepararon de manera de incluir 0,5 M de guanidina y 0,1% de albúmina de suero bovino (BSA) en la composición final. El sandwich ELISA $\text{A}\beta$ "total" utiliza anticuerpos 266 monoclonal de anticuerpo monoclonal específico para los aminoácidos 13-28 de $\text{A}\beta$ (Seubert, et al.), como anticuerpo de captura, y el anticuerpo 3D6 monoclonal biotinilado, específico para los aminoácidos 1-5 de $\text{A}\beta$ (Johnson-Wood, et al.), como anticuerpo informante. El anticuerpo monoclonal 3D6 no reconoce el APP secretado o el APP de longitud total, sino que detecta únicamente las especies $\text{A}\beta$ con un ácido aspártico aminoterminal. Este ensayo tiene un límite inferior de sensibilidad de $\sim 50 \text{ ng}/\text{ml}$ (11 nM) y no muestra reactividad cruzada con la proteína $\text{A}\beta$ murina endógena en concentraciones de hasta 1 ng/ml (Johnson-Wood et al., supra).

El sandwich específico de $\text{A}\beta$ -42 ELISA emplea m $\text{A}\beta$ 21F12, específico para los aminoácidos 33-42 de $\text{A}\beta$ (Johnson-Wood, et al.), como anticuerpo de captura. El m $\text{A}\beta$ 3D6 biotinilado es también el anticuerpo informante en este

ensayo que tiene un límite inferior de sensibilidad de aproximadamente 125 $\mu\text{g/ml}$ (28 μM , Johnson-Wood et al). Para los A β ELISA, 100 μl de cualquiera de mA β 266 (a 10 $\mu\text{g/ml}$) o mA β 21F12 a (5 $\mu\text{g/ml}$) se depositó como recubrimiento dentro de los receptáculos de placas de inmunoensayo de 96 receptáculos (Costar) mediante incubación nocturna a temperatura ambiente. La solución se extrajo mediante aspiración y los receptáculos fueron bloqueados mediante adición de 200 μl de 0,25% de albúmina de suero humano en buffer de PBS durante por lo menos 1 hora a temperatura ambiente. Se extrajo la solución bloqueadora y las placas se almacenaron desecadas a 4°C hasta el momento de usarlas. Las placas se rehidrataron con buffer para lavado [solución salina de pH regulado con Tris (0,15 M NaCl, 0,01 M Tris-HCl, pH 7,5) además de 0,05% de Tween 20] antes de usarlo. Las muestras y los modelos se agregaron en alícuotas por triplicado de 100 μl por receptáculo y luego se incubaron durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron por lo menos tres veces con buffer de lavado entre cada etapa de ensayo. El mA β 3D6 biotinilado diluido a 0,5 $\mu\text{g/ml}$ en buffer de ensayo de caseína (0,25% de caseína, PBS, 0,05% Tween 20, pH 7,4) se agregó e incubó en los receptáculos durante una hora a temperatura ambiente. Se agregó un conjugado de avidina-peroxidasa de rábano picante (Avidina-HRP obtenida en Vector, Burlingame, CA), diluido en 1:4000 en buffer de ensayo de caseína, en los pozos durante 1 hora a temperatura ambiente. El sustrato colorimétrico Slow TMB-ELISA (Pierce), se agregó y se dejó reaccionar durante 15 minutos a temperatura ambiente después de lo cual se interrumpió la reacción enzimática mediante la adición de 25 μl 2N H₂SO₄. La mezcla de reacción se cuantificó usando un Vmax de Molecular Devices que mide la diferencia de absorbancia a 450nm y 650 nm.

6. Medición de los Niveles de APP

Se utilizaron dos ensayos diferentes de APP. El primero, designado APP- α /FL, reconoce ambas formas la APP-alfa (α) y la de longitud total (FL) de APP. El segundo ensayo es específico para APP- α . El ensayo APP- α /FL reconoce APP secretado incluyendo los primeros 12 aminoácidos de A β . Debido a que el anticuerpo informante (2H3) no es específico para el sitio de α -clip, que ocurre entre los aminoácidos 612-613 de APP695 (Esch et al., Science 248, 1122-1124 (1990)); este ensayo reconoce también el APP de longitud total (APP-FL). Los experimentos preliminares usando anticuerpos APP inmovilizados para la cola citoplásmica de APP-FL para vaciar los homogeneizados del cerebro de APP-FL sugiere que aproximadamente 30-40% del APP- α /FL APP es FL (no se muestran datos). El anticuerpo de captura para ambos ensayos el de APP- α /FL y de APP α es mAb 8E5, creado contra los aminoácidos 444 a 592 de la forma APP695 (Games et al., supra). El informante mAb para el ensayo APP- α /FL es mAb 2H3, específico para los aminoácidos 597-608 de APP695 (Johnson-Wood et al., supra) y el anticuerpo informante para el ensayo APP- α es un derivado biotinilado de mAb 16H9, para los aminoácidos 605 a 611 de APP. El límite inferior de sensibilidad del ensayo APP- α FL es de aproximadamente 11 ng/ml (150 pM) (Johnson-Wood et al.) y el de el ensayo específico para APP- α es 22 ng/ml (0,3 nM). Para ambos ensayos de APP, el mAb 8E5 se aplicó como recubrimiento en los receptáculos de placas EIA de 96 receptáculos tal como se describió más arriba para mAb 266. El APP- α secretado recombinante purificado se usó como patrón de referencia para el ensayo APP- α , y para el ensayo APP- α /FL (Esch et al., supra). Las muestras de homogeneizado de cerebro en guanidina 5M se diluyeron a 1:10 en Diluyente de Especimen ELISA (0,014 M de buffer de fosfato, pH 7,4, 0,6% de albúmina de suero bovino, 0,05% de timerosal, 0,5 M de NaCl, 0,1% NP40). Luego se diluyeron en 1:4 en Diluyente de

Especimen que contenía 0,5 M de guanidina. Luego se centrifugaron los homogeneizados diluidos a 16000x g durante 15 segundos a temperatura ambiente. Se agregaron los patrones de APP y las muestras a la placa por alícuotas en duplicado y se incubaron durante 1,5 horas a temperatura ambiente. El anticuerpo 2H3 ó 16H9 informante y biotinilado se incubó con las muestras durante 1 hora a temperatura ambiente. La fosfatasa alcalina-estreptavidina (Boehringer Mannheim), diluída a 1:1000 en el diluyente especimen se incubó en los receptáculos durante 1 hora a temperatura ambiente. Se agregó el sustrato fluorescente 4-metil-umbeliferil-fosfato para una incubación a temperatura ambiente de 30 minutos y se leyeron las placas, en un fluorímetro Cytofluor tm 2350 (Millipore) con una excitación de 365 nm y una emisión de 450 nm.

7. Inmunohistoquímica

Se fijaron los cerebros durante 3 días a 40°C en 4% de paraformaldehído en PBS y luego se almacenaron de 1 a 7 días a 4°C en 15 de paraformaldehído, y PBS hasta que se seccionaron. Se cortaron secciones en corona de un espesor de 40 micrones en un vibratomo a temperatura ambiente y se almacenaron con un crioprotector (30% de glicerol, 30% de etilenglicol en buffer de fosfato) a -20°C antes del proceso inmunohistoquímico. Para cada cerebro, seis secciones del nivel del hipocampo dorsal, cada una separada por intervalos consecutivos de 240 µm, se incubaron durante la noche con uno de los siguientes anticuerpos: (1) anti-Aβ biotinilado (mAb, 3D6, específico para Aβ humano) diluído hasta una concentración de 2 µg/ml en PBS al 1% de suero equino; o (2) un mAb biotinilado específico para APP humano, 8E5 diluido en una concentración de 3 µg/ml en PBS y 1,0% de suero equino; o (3) un mAb específico para proteína acilica fibrilar glial (GFAP, Sigma Chemical Co.) diluida a 1:500 con 0,25% de Triton X-100 y 1% de suero equino en solución salina de pH

regulado con Tris, a pH 7,4 (TBS); o (4) un mAb específico para el antígeno CD11b, MAC-1 (Chemicon International) diluido a 1:100 con 0,25% de Triton X-100 y 1% de suero de conejo en TBS; o (5) un mAb específico para el antígeno MHC II, (Pharmingen) diluido a 1:100 con 0,25% de Triton X-100 y 1% de suero de conejo en TBS; o (6) un mAb de rata específico para CD 43 (Pharmingen) diluido a 1:100 con 1% de suero de conejo en PBS o (7) un mAb específico para rata para CD 45 RA (Pharmingen) diluido a 1:100 con 15 de suero de conejo en PBS; o (8) un A β monoclonal de rata específico para CD 45RB (Pharmingen) diluido a 1:100 con 1% de suero de conejo en PBS; o (9) un A β monoclonal específico para CD 45 (Pharmingen) diluido a 1:100 con 1% de suero de conejo en PBS; o (10) un A β de hamster policlonal biotinilado específico para CD3e (Pharmingen) diluido a 1:100 con 1% de suero de conejo en PBS o (11) un mAb de rata específico para CD3 (Serotec) diluido a 1:200 con 1% de suero de conejo en PBS; o con (12) una solución de PBS que carece de un anticuerpo primario que contiene 1% de suero equino normal.

Las secciones reaccionadas con las soluciones de anticuerpo enumeradas en 1,2 y 6-12 precedentemente, fueron pretratadas con 1,0% de Triton X-100, 0,4% de peróxido de hidrógeno en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente para bloquear la peroxidasa endógena. A continuación se incubaron durante la noche a 4°C con anticuerpo primario. Las secciones reaccionaron con 3D6 o 8E5 o CD3e mAbs y luego se hicieron reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente con un complejo de peroxidasa de rábano picante-avidina-biotina con componentes del equipo "A" y "B" diluido a 1:75 en PBS (Vector EliteStandard Kit, Vector Labs, Burlingame, CA.). Las secciones que reaccionaron con los anticuerpos específicos para CD 45 RA, CD 45RB, CD 45, CD3 y la solución de PBS libre de anticuerpos primarios se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con IgG anti-rata biotinilado (Vector), diluido a 1:75 en PBS

o IgG anti-ratón biotinilado (Vector), diluido a 1:75 en PBS, respectivamente. Luego se hicieron reaccionar secciones durante 1 hora a temperatura ambiente con un complejo de peroxidasa de rábano picante-avidina-biotina con los componentes del equipo "A" y "B" diluido a 1:75 en PBS (Vector Elite Standard Kit, Vector Labs, Burlingame, CA.).

Se desarrollaron secciones en 0,01% de peróxido de hidrógeno, 0,05% de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) a temperatura ambiente. Las secciones destinadas a la incubación con los anticuerpos específicos de GFAP-, MAC- 1-AND MHC II fueron pretratados con 0,6% de peróxido de hidrógeno a temperatura ambiente para bloquear la peroxidasa endógena y luego se incubaron durante la noche con el anticuerpo primario a 4°C. Las secciones que reaccionaron con el anticuerpo GFAP, se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con IgG anti-ratón biotinilado preparado en caballos (Vector Laboratories; Vectastain Elite ABC Kit) diluido a 1:200 con TBS. A continuación se hicieron reaccionar las secciones durante 1 hora con un complejo de avidina-biotina-peroxidasa (Vector Laboratories; Vectastain Elite ABC Kit) diluida a 1:1000 con TBS. Las secciones incubadas con el anticuerpo monoclonal específico de MAC-1 ó MHC II como anticuerpo primario se hicieron reaccionar subsiguientemente durante 1 hora a temperatura ambiente con IgG anti-rata biotinilado preparado con conejos y diluido a 1:200 con TBS, seguido de incubación durante 1 hora con un complejo de avidina-biotina-peroxidasa diluido a 1:1000 con TBS. Luego se visualizaron las secciones incubadas con anticuerpos específicos para GFAP-, MAC-1 y MHC II por tratamiento a temperatura ambiente con 0,05% de DAB, 0,01% de peróxido de hidrógeno, 0,04% de cloruro de níquel, TBS durante 4 y 11 minutos, respectivamente.

Se montaron secciones inmuno-rotuladas sobre platinas de vidrio (VWR, Superfrost slides), y se secaron durante la noche, se sumergieron en Propar

(Anatech) y se cubrieron con tapas de platinas usando Permout (Fisher) como medio de montaje.

Para contrateñir las placas de A β , un subgrupo de secciones positivas a GFAP, se montó sobre platinas Superfrost y se incubó en 1% de Tioflavina S (Sigma) acuosa, durante 7 minutos después del procesamiento inmunohistoquímico. Luego se deshidrataron las secciones y se aclararon en Propar y luego se cubrieron con las tapas de platinas montadas con Permout.

8. Análisis por Imágen

Un Sistema de Análisis de Imágen Videometric 150 (Oncor, Inc., Gaithersburg, MD) ligado a un microscopio Nikon Microphot-FX a través de una video cámara de CCD y un monitor Sony Trinitron fueron utilizados para la cuantificación de las platinas inmunoreactivas. La imagen de la sección se guardó en un buffer de video y se determinó el umbral en base al color y la saturación para seleccionar y calcular el área total de pixeles ocupada por las estructuras inmuno-rotuladas. Para cada sección el hipocampo se diseñó manualmente y se calculó el área total de pixel ocupada por el hipocampo. Se midió la carga porcentual amiloide como: (la fracción del área del hipocampo que contenía los depósitos A β inmuno-reactivos con mAb 3D6) x 100. De manera similar, la carga porcentual neurítica se midió como: (la fracción del área del hipocampo que contenía neuritas distróficas reactivas con anticuerpos monoclonales 8E5) x 100. El Sistema de Formación de Imágenes C (Compix, Inc., Cranberry Township, PA) que funciona en el programa de aplicación de Software Simple 32 se ligó a un microscopio Nikon Microphot-FX a través de una cámara Optronics y se usó para cuantificar el porcentaje de corteza retrosplenial ocupada por astrocitos positivos a GFAP y microglia positivas a MAC-1 y MHC II. La imagen de la sección inmuno-reaccionada se guardó en un video buffer y se determinó el umbral de base

monocrónica para seleccionar y calcular el área total de pixel ocupada por las células inmuno-rotuladas. Para cada sección, la corteza retrosplenial (RSC) se diseñó manualmente y se calculó el área total de pixel ocupada por el RSC. La astrocitosis porcentual se definió como: (la fracción de RSC ocupada por astrocitos reactivos a GFAP) x100. De manera similar, el porcentaje de microgliosis se define como: (la fracción de RSC ocupada por microglías reactivas con MAC-1 o MHC II) x 100. Para todos los análisis de imágenes, seis secciones a nivel del hipocampo dorsal, cada una separada por intervalos consecutivos de 240 μ m, fueron cuantificadas para cada animal. En todos los casos el status del tratamiento de los animales fue desconocido para el observador.

Aunque la precedente invención ha sido descrita en forma detallada con propósitos de claridad de comprensión, resultará obvio que puede llevarse a la práctica algunas modificaciones que están dentro del alcance de las reivindicaciones anexas. Todas las publicaciones y documentos de patentes citados aquí se incorporan como referencia en su totalidad para cualquier propósito en el mismo grado que si se indicara cada una individualmente.

Por lo que antecede resultará aparente que la invención provee una variedad de usos. Por ejemplo la invención provee el uso de cualquiera de los anticuerpos para A β descritos más arriba en el tratamiento, la profilaxis o diagnóstico de la enfermedad amiloidogénica, o la manufactura de un medicamento o una composición para diagnóstico para usar los mismos. Asimismo, la invención provee el uso de cualquiera de los fragmentos epitópicos de A β descritos precedentemente para el tratamiento o profilaxis de la enfermedad amiloidogénica o para la manufactura de un medicamento que se usará en la misma.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para evitar o tratar una enfermedad asociada con depósitos amiloides de $A\beta$ en el cerebro de un paciente que comprende un anticuerpo que se adhiere a un componente del depósito amiloide en el paciente y un portador farmacéutica aceptable.
2. La composición de la reivindicación 1, donde el componente es $A\beta$.
3. La composición de la reivindicación 1, donde el componente es sinucleína. V
4. La composición de la reivindicación 1, donde la enfermedad se caracteriza por deterioro cognitivo. C
5. La composición de la reivindicación 1, donde la enfermedad es la enfermedad de Alzheimer. C
6. La composición de la reivindicación 1, donde la enfermedad es el síndrome de Down. C
7. La composición de la reivindicación 1, donde la enfermedad es deterioro cognitivo leve. C

8. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el anticuerpo es isotipo IgG1 humana.

9. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el paciente es un ser humano. ^C

10. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el anticuerpo se adhiere específicamente a un epitopo dentro de los residuos 1-10 de A β .

11. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde el anticuerpo se adhiere específicamente a un epitopo dentro de los residuos 1-6 de A β .

12. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde el anticuerpo se adhiere específicamente a un epitopo dentro de los residuos 1-5 de A β .

13. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde el anticuerpo se adhiere específicamente a un epitopo dentro de los residuos 1-7 de A β .

14. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde el anticuerpo se adhiere específicamente a un epitopo dentro de los residuos 3-7 de A β .

15. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde el anticuerpo se adhiere específicamente a un epitopo dentro de los residuos 1-3 de A β .

16. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde el anticuerpo se adhiere específicamente a un epitopo dentro de los residuos 1-4 de A β .

17. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde después de la administración de la composición el anticuerpo se adhiere a un depósito amiloide en el paciente e induce una respuesta de evacuación (clearing) contra el depósito amiloide. C

18. La composición de la reivindicación 17, donde la respuesta de evacuación es una respuesta de fagocitosis intermediada por el receptor Fc. C

19. La composición de la reivindicación 17 ó 18, que comprende además monitorear la respuesta de evacuación. C

20. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el ^{? cual.} anticuerpo se adhiere específicamente a un epitopo que comprende un residuo N-terminal libre de A β . ?

21. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo se adhiere a un epítopo dentro de los residuos de 1-10 de A β donde el residuo 1 y/o el residuo 7 de A β es ácido iso-aspartico.

22. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el paciente es asintomático.

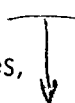
23. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el paciente es de menos de 50.

24. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el paciente ha heredado factores de riesgo que indican susceptibilidad a la enfermedad de Alzheimer.

25. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-23, donde el paciente no tiene factores de riesgo conocidos para la enfermedad de Alzheimer.

26. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el anticuerpo es un anticuerpo humano.

27. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-25, donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

28. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-25, donde el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. ✓
29. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-25, donde el anticuerpo es un anticuerpo de ratón. ✓
30. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. ✓
31. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-29, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. ✓
32. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además una cantidad eficaz de por lo menos otro anticuerpo que se adhiere a un epitopo diferente de A β .  otro. 
33. La composición de las reivindicaciones 1-7 o de las reivindicaciones 9-32, donde el isotipo del anticuerpo es IgG1 o IgG4.
34. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o 9-32, donde el isotipo del anticuerpo es IgG2 o IgG3.
35. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-34, donde el anticuerpo comprende dos copias del mismo par de cadenas liviana y pesada. ✓

36. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-34, donde el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende un primer par de cadena liviana y cadena pesada que se adhiere específicamente al epitopo de $A\beta$ y un segundo par de cadena liviana y cadena pesada que se adhiere específicamente a un receptor Fc en células microgliales.

37. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde una cadena del anticuerpo está fusionada con un polipéptido heterólogo.

38. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la dosis de anticuerpo es de por lo menos 1 mg/kg de peso del cuerpo del paciente. C

39. La composición de la reivindicación 38, donde la dosis de anticuerpo es de por lo menos 10 mg/kg de peso del cuerpo del paciente. C

40. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el anticuerpo se administra con un portador como composición farmacéutica.

41. La composición de las reivindicaciones 1, 26, 30 y 32-40, donde el anticuerpo es un anticuerpo humano de $A\beta$ preparado a partir de células B de un ser humano inmunizado con un péptido $A\beta$. A -

42. La composición de la reivindicación 41, donde el ser humano inmunizado con el péptido A β es el paciente.

43. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el anticuerpo se adhiere específicamente al péptido A β sin adherirse a la proteína precursora amiloide de longitud total (APP).

44. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la composición es administrada por vía intraperitoneal, oral, subcutánea, intramuscular, tópica o intravenosa.

45. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el anticuerpo se administra mediante la administración de un polinucleótido que codifica por lo menos una cadena de anticuerpo para el paciente donde el polinucleótido se expresa para producir la cadena de anticuerpos en el paciente.

46. La composición de la reivindicación 43, donde el polinucleótido codifica cadenas pesadas y livianas del anticuerpo, cuyo polinucleótido se expresa para producir las cadenas pesadas y livianas en el paciente.

47. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además de su administración, monitorear al paciente para determinar el nivel de anticuerpo administrado en la sangre del paciente.

48. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el anticuerpo se administra en dosis múltiples por un período de por lo menos seis meses.

49. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-47, donde el anticuerpo se administra en forma de una composición de liberación sostenida.

50. Una composición para evitar o tratar una enfermedad asociada con depósitos amiloides $A\beta$ en el cerebro de un paciente, que comprende un polipéptido que comprende un segmento N-terminal de por lo menos los residuos 1-5 de $A\beta$, siendo el primer residuo de $A\beta$ el residuo N-terminal del polipéptido donde el polipéptido está libre de un segmento C-terminal de $A\beta$, y un portador farmacéuticamente aceptable.

51. La composición de la reivindicación 50, donde la enfermedad es deterioro cognitivo leve.

52. La composición de la reivindicación 50, donde la enfermedad es enfermedad de Alzheimer.

53. La composición de la reivindicación 50, donde la enfermedad es el síndrome de Down.

54. Una composición para evitar o tratar una enfermedad asociada con depósitos amiloides de $A\beta$ en el cerebro de un paciente que comprenda un polipéptido que comprende un segmento N-terminal de $A\beta$, comenzando dicho segmento en el residuo 1-3 de $A\beta$ y terminando en los residuos 7-11 de $A\beta$, y un portador farmacéutica aceptable.

55. La composición de la reivindicación 54, donde la enfermedad es un deterioro cognitivo leve.

56. La composición de la reivindicación 54, donde la enfermedad es una enfermedad de Alzheimer.

57. La composición de la reivindicación 54, donde la enfermedad es el síndrome de Down.

58. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 52-57, donde el segmento N-terminal de $A\beta$ está ligado en su término C a un polipéptido heterólogo.

59. La composición de la reivindicación 58, donde el segmento N-terminal consiste en la secuencia de aminoácido DAEFRHD.

60. La composición de la reivindicación 58, donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácido DAEFRHDQYIKANSKFIGITEL.

61. La composición de la reivindicación 54, donde el segmento N-terminal de A β está ligado en su N-término a un polipéptido heterólogo.
62. La composición de la reivindicación 61, donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácido AKXVAAWTLKAAADAEFRHD.
63. La composición de la reivindicación 54, donde el segmento N-terminal de A β está ligado en sus términos N y C a primer y segundo polipéptidos heterólogos.
64. La composición de la reivindicación 54, donde el segmento N-terminal de A β a su N-término a un polipéptido heterólogo, y en su C-término a por lo menos una copia adicional del segmento N-terminal.
65. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 58, 62 y 64, donde el polipéptido heterólogo induce una respuesta de célula T contra el polipéptido heterólogo y por lo tanto una respuesta de la célula B contra el segmento N-terminal.
66. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 50-65, donde el polipéptido comprende además por lo menos una copia adicional del segmento N-terminal.
67. La composición de la reivindicación 58, donde el polipéptido comprende desde el N-término al C-término, el segmento N-terminal de A β ,

una pluralidad de copias adicionales del segmento N-terminal y el segmento de aminoácido heterólogo.

68. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 50-67, donde el segmento N-terminal consiste de $A\beta 1-7$.

69. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 50-67, donde el segmento N-terminal consiste de $A\beta 3-7$.

70. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 50-57, donde el polipéptido consiste de $A\beta 1-7$.

71. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 50-57, donde el polipéptido consiste de $A\beta 3-7$.

72. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 50-67, donde el polipéptido libre de por lo menos los cinco aminoácidos C-terminales en $A\beta 43$.

73. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 50-67, donde el polipéptido se administra con un coadyuvante que mejora una respuesta de inmunidad para el segmento N-terminal.

74. La composición de la reivindicación 73, donde el coadyuvante y el polipéptido se administran conjuntamente.

75. La composición de la reivindicación 74, donde el coadyuvante se administra antes del polipéptido.

76. La composición de la reivindicación 75, donde el coadyuvante se administra después del polipéptido.

77. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 73-76, donde el coadyuvante es alumbre.

78. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 73-76, donde el coadyuvante es MPL.

79. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 73-76, donde el coadyuvante es QS-21.

80. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 73-76, donde el coadyuvante es coadyuvante incompleto de Freund.

81. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 50-80, donde la dosis de polipéptido es de más de 10 microgramos.

✓ 82. Una composición para evitar o tratar una enfermedad asociada con depósitos amiloides de A β en el cerebro de un paciente que comprende un agente que induce una respuesta inmunogénica contra un segmento N-terminal de A β , comenzando el segmento en el residuo 1-3 de A β y

terminando en los residuos 7-11 de A β sin inducir una respuesta inmunogénica contra un epítipo dentro de los residuos 12-43 de A β 43, y un portador farmacéuticamente aceptable.

83. La composición de la reivindicación 82, donde la enfermedad es deterioro cognitivo.

84. La composición de la reivindicación 82, donde la enfermedad es la enfermedad de Alzheimer.

85. La composición de la reivindicación 82, donde la enfermedad es el síndrome de Down.

86. Una composición farmacéutica que comprende a un polipéptido tal como se definió en cualquiera de las reivindicaciones 50, 72 y un coadyuvante.

87. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo tal como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-21, 26-31, 33-37, y 41-43, y un portador farmacéuticamente aceptable.

88. Un método para rastrear un anticuerpo para determinar la actividad para tratar una enfermedad asociada con depósitos amiloides de A β en el cerebro de un paciente que comprende poner en contacto el anticuerpo con un polipéptido que comprende por lo menos cinco aminoácidos

contiguos de un segmento N-terminal de $A\beta$ que comienza en un residuo entre 1 y 3 de $A\beta$, estando el polipéptido libre de un segmento C-terminal de $A\beta$ y determinar si el anticuerpo se adhiere específicamente al polipéptido, proporcionando la adhesión específica una indicación de que el anticuerpo tiene actividad para tratar la enfermedad de Alzheimer.

89. El método de la reivindicación 88, donde la enfermedad es la enfermedad de Alzheimer.

90. Un método para rastrear un anticuerpo para determinar la actividad de la evacuación de una entidad biológica que está físicamente asociada con un antígeno, que comprende combinar la entidad biológica asociada con el antígeno, el anticuerpo y las células fagocíticas portadores de receptores Fc en el medio; monitorear la cantidad de entidad biológica asociada con el antígeno que permanece en el medio, y siendo la reducción de la cantidad de la entidad biológica asociada con el antígeno una indicación de que el anticuerpo tiene actividad evacuadora contra el antígeno.

91. El método de la reivindicación 90, donde la etapa de monitoreo monitorea la cantidad de antígeno remanente en el medio.

92. El método de la reivindicación 90 ó 91, donde la combinación comprende agregar una entidad biológica asociada al antígeno al medio,

y poner en contacto el medio con las células fagocíticas portadoras de los receptores Fc.

93. El método de cualquiera de las reivindicaciones 90 a 92, en el cual la entidad biológica asociada con antígeno se provee en forma de una muestra de tejido.

94. El método de cualquiera de las reivindicaciones 90 a 93, en el cual el antígeno es la entidad biológica.

95. El método de la reivindicación 93, en el cual la muestra de tejido comprende un depósito amiloide.

96. El método de cualquiera de las reivindicaciones 93 a 95, en el cual la muestra de tejido proviene del cerebro de un paciente con la enfermedad de Alzheimer o de un animal mamífero que tiene patología Alzheimer.

97. El método de cualquiera de las reivindicaciones 90 a 96, en el cual el antígeno es A β .

98. El método de cualquiera de las reivindicaciones 90 a 96, en el cual las células fagocíticas son células microgliales.

99. El método de cualquiera de las reivindicaciones 93 a 98, en el cual la muestra de tejido está seleccionada del grupo que consiste en una muestra

de tejido cancerosa, en la muestra de tejido viralmente infectada, una muestra de tejido que comprende células inflamatorias, un desarrollo anormal no maligno de células, y una muestra de tejido que comprende una matriz extracelular anormal.

100. Un método para detectar un depósito amiloide en un paciente, que comprende administrar al paciente un anticuerpo que se adhiere específicamente a un epitopo dentro de los aminoácidos 1-10 de A β , detectar la presencia del anticuerpo en el cerebro del paciente.

101. El método de la reivindicación 100, donde el anticuerpo se adhiere a un epitopo dentro de los residuos 4-10 de A β .

102. El método de la reivindicación 100, donde el anticuerpo se adhiere a un epitopo dentro de los residuos 8-10 de A β .

103. El método de cualquiera de las reivindicaciones 100-102, donde el anticuerpo está rotulado.

104. El método de la reivindicación 103, donde el anticuerpo está rotulado con un rótulo paramagnético.

105. El método de la reivindicación 103, donde el anticuerpo rotulado se detecta mediante resonancia magnética nuclear.

-165-

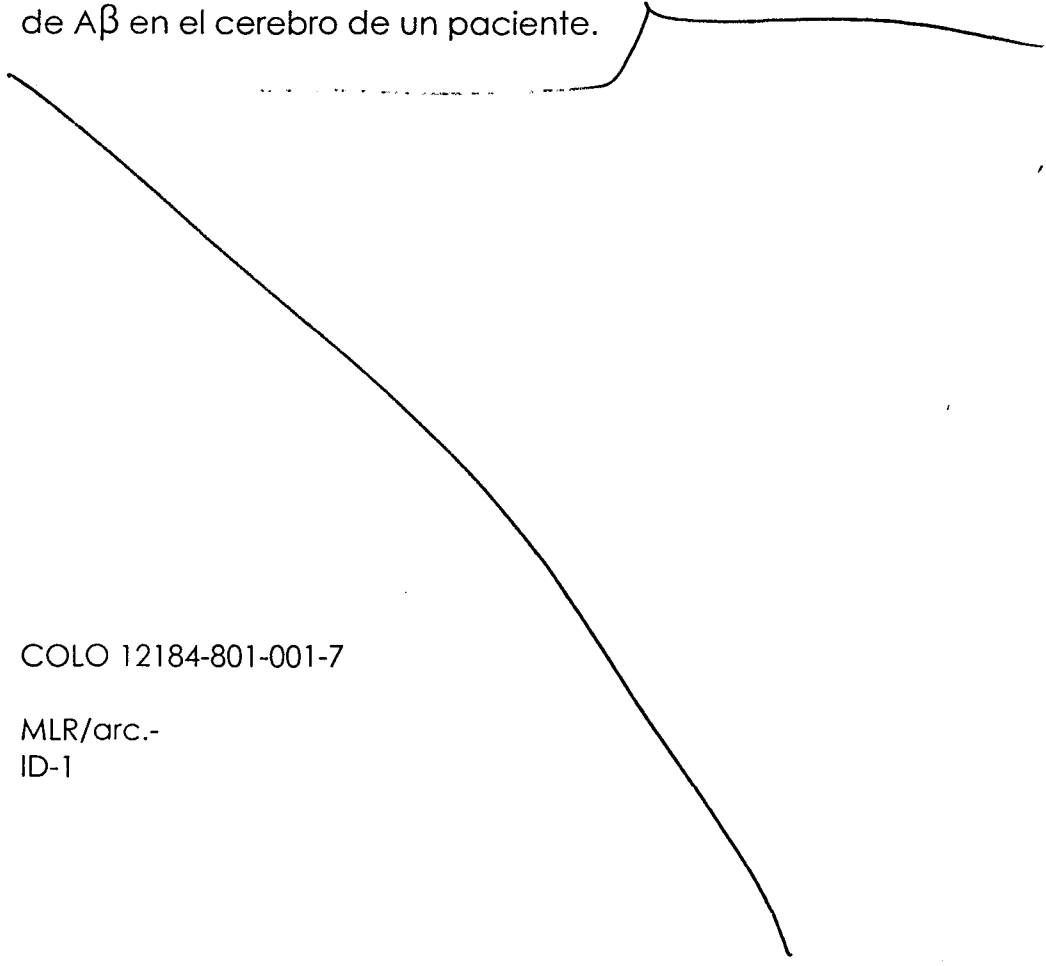
106. El método de cualquiera de las reivindicaciones 100-105, donde el anticuerpo carece de capacidad para inducir una respuesta de evacuación por adhesión con un depósito amiloide en el paciente.



mal

107. Un equipo de diagnóstico que comprende un anticuerpo que se adhiere específicamente a un epitopo con los residuos 1-10 de A β .

108. El equipo de la reivindicación 107, que comprende además rotulación que describe el uso del anticuerpo para el diagnóstico in vivo o para el monitoreo de una enfermedad que está asociada con los depósitos amiloide de A β en el cerebro de un paciente.



COLO 12184-801-001-7

MLR/arc.-
ID-1

PREVENCION Y TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES AMILOIDOGENICAS

RESUMEN DE LA DESCRIPCION

La invención provee agentes mejorados y métodos para el tratamiento de enfermedades que están asociadas con depósitos amiloides de A β en el cerebro de un paciente. Dichos métodos comprenden administrar agentes que inducen una respuesta inmunogénica beneficiosa contra el depósito amiloide. Los métodos se usan para tratamiento profiláctico y terapéutico de la enfermedad de Alzheimer. Los agentes preferidos incluyen fragmentos N-terminales de A β y anticuerpos que se adhieren a los mismos.

TITULO EN RATONES PDAPP CON A β AGREGADO INYECTADO EN EL TIEMPO

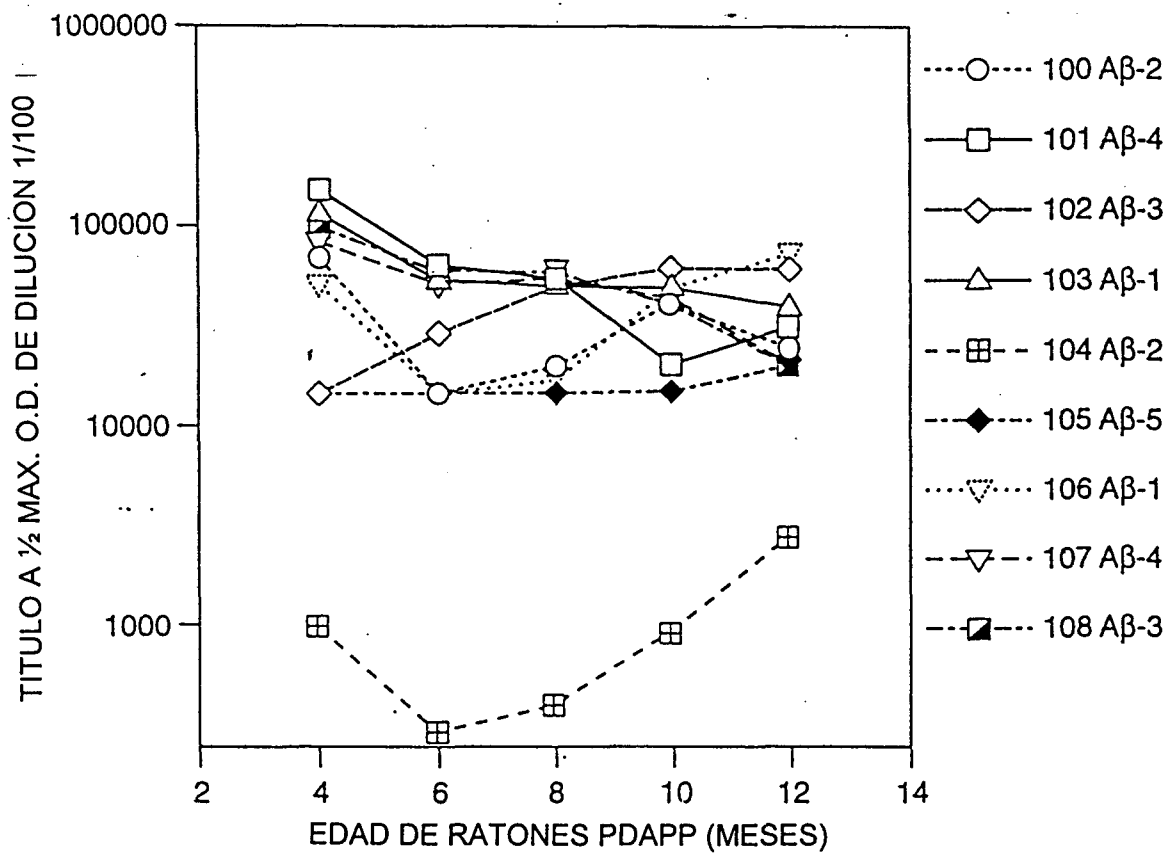


FIG. 1

ESTUDIO 001
CARGA AMILOIDE EN EL HIPOCAMPO

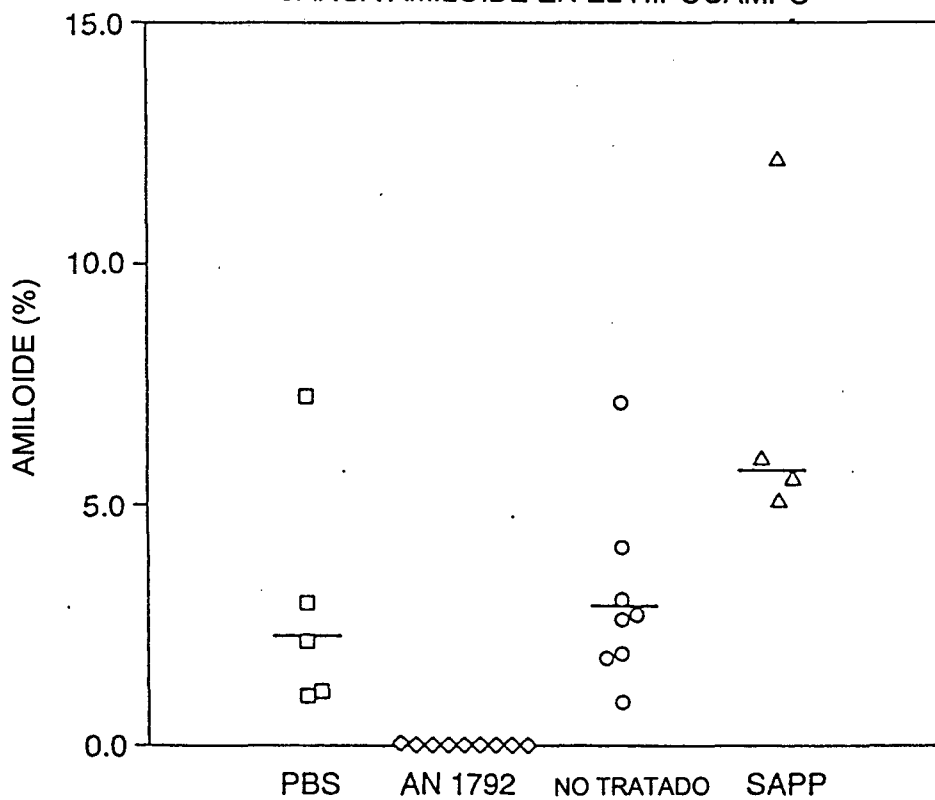


FIG. 2

263
165

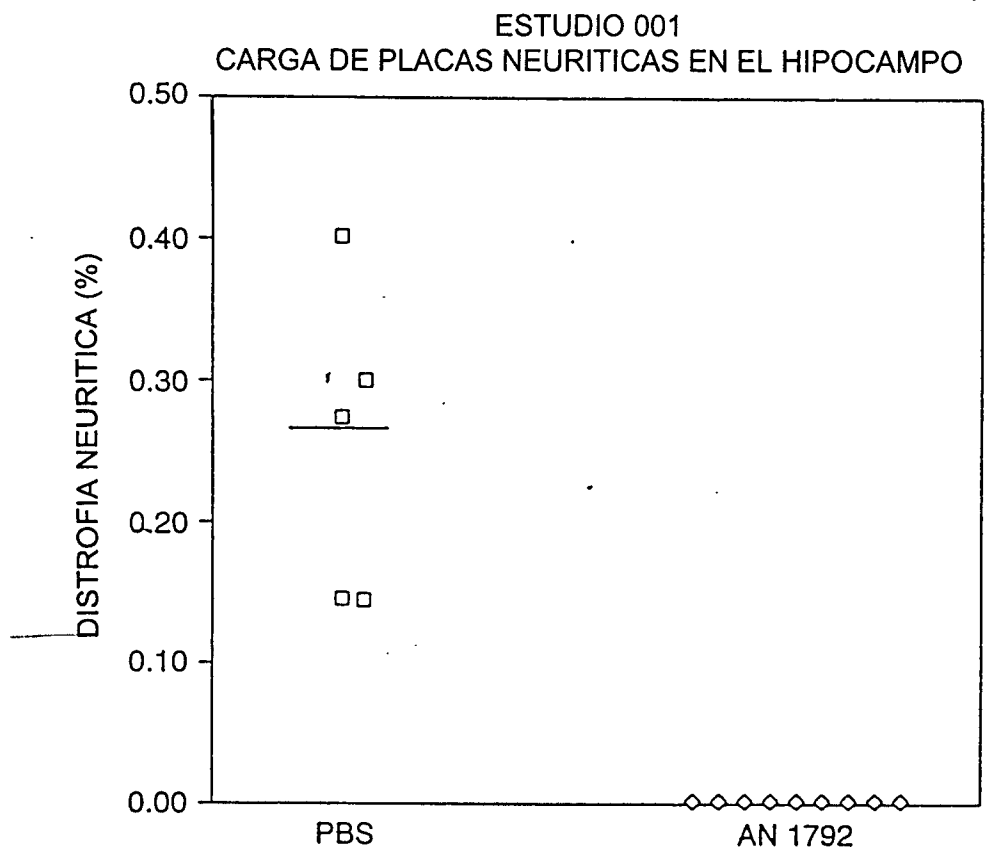


FIG. 3

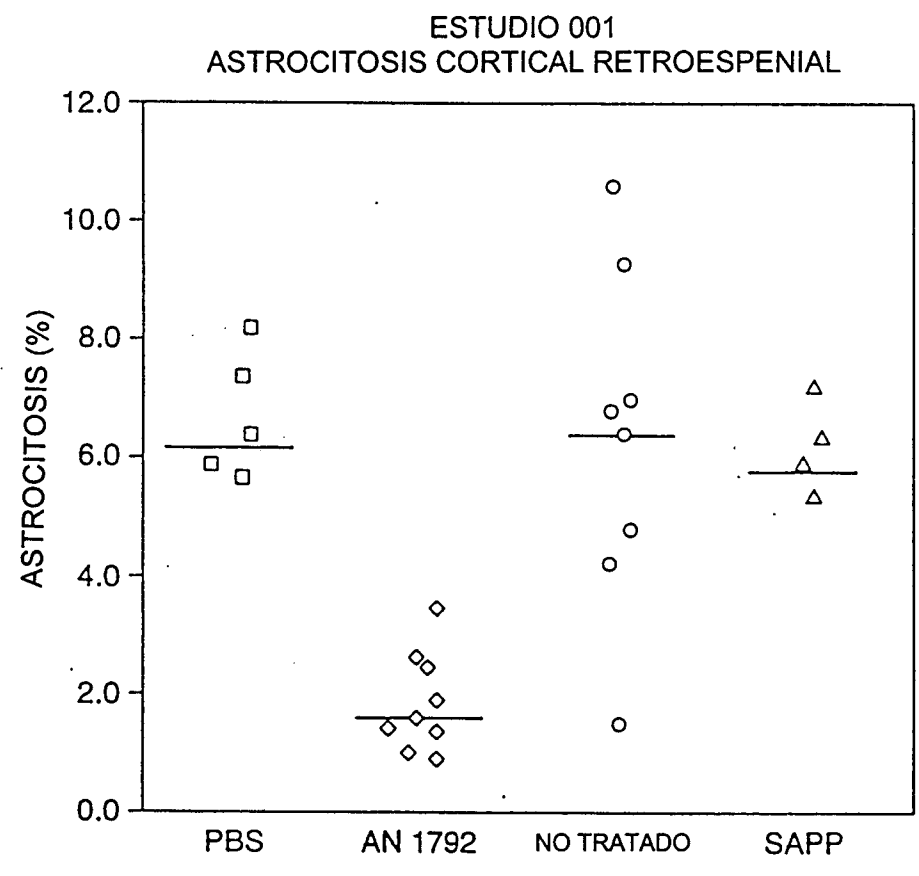


FIG. 4

266
166

RESPUESTA DEL TITULO DE ANTICUERPOS PARA VARIAS DOSIS
DE UN 1792 DESPUES DE 2, 3 Y 4 INMUNIZACIONES

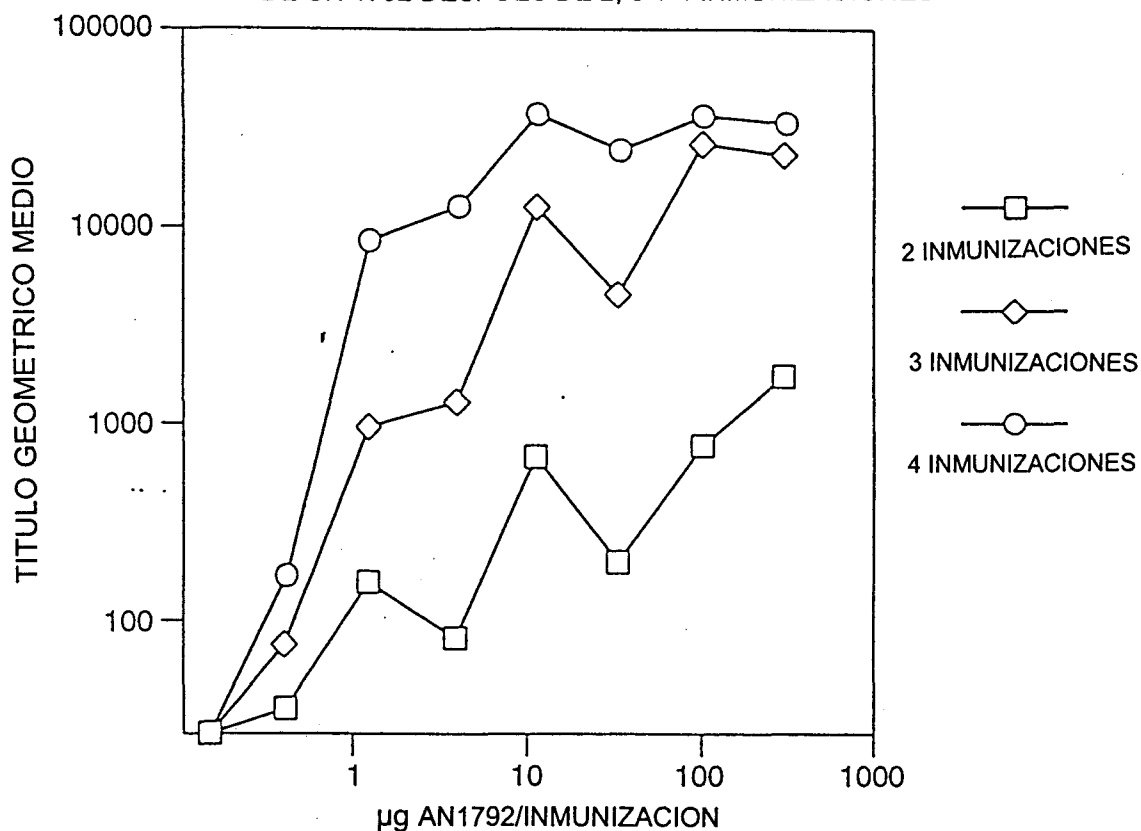


FIG. 5

CINETICA DE LA RESPUESTA DE ANTICUERPOS PARA AN1792

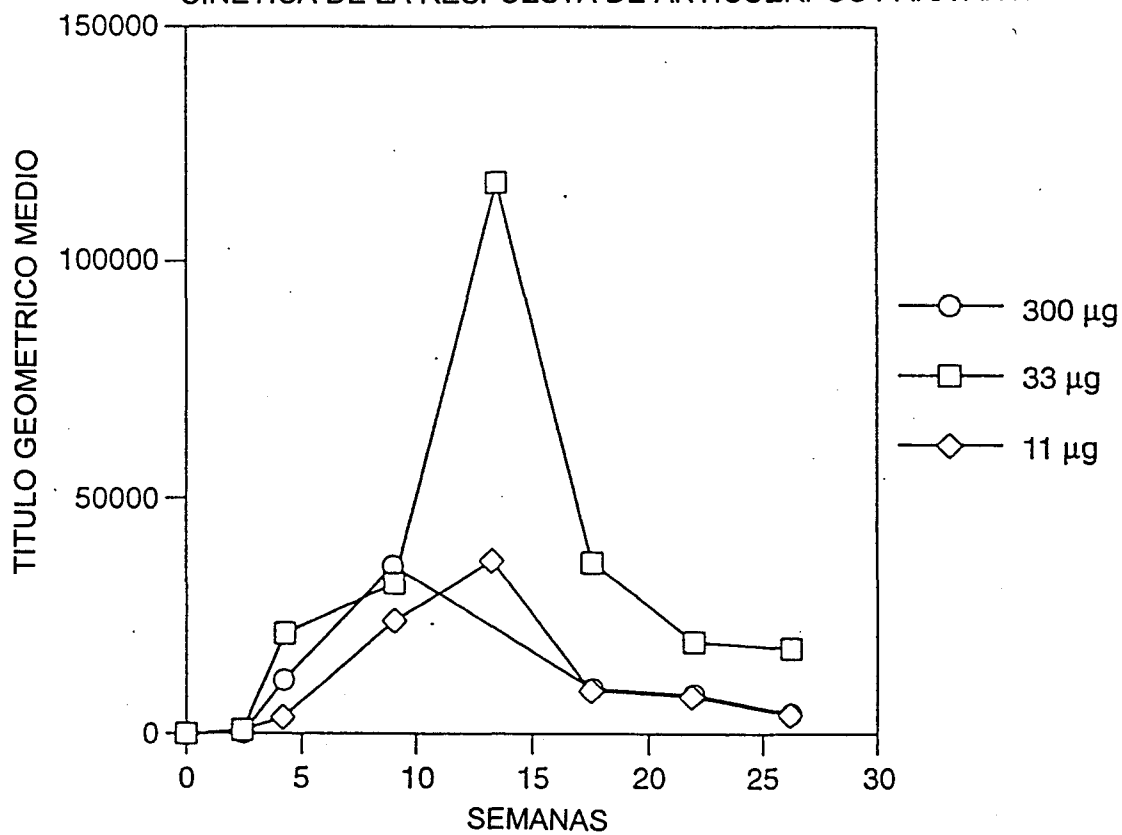


FIG. 6

ESTUDIO 002
CARGA AMILOIDE CORTICAL

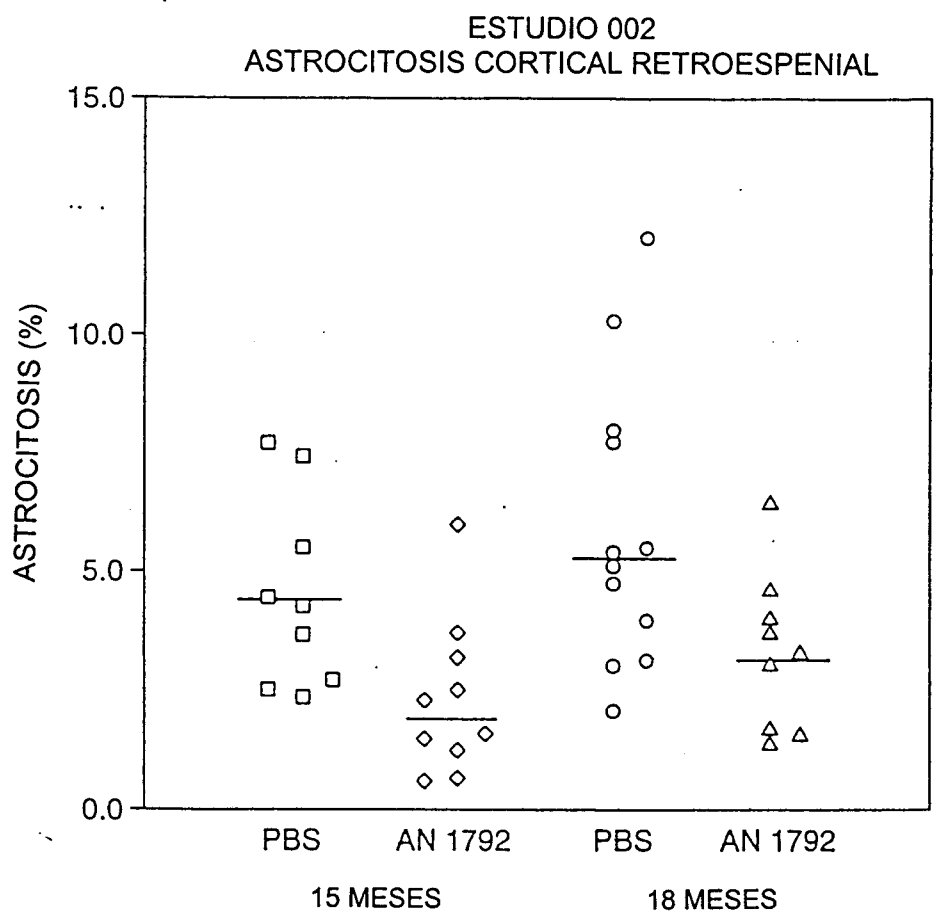


FIG. 9

ESTUDIO 002
ASTROCITOSIS CORTICAL RETROESPIENAL

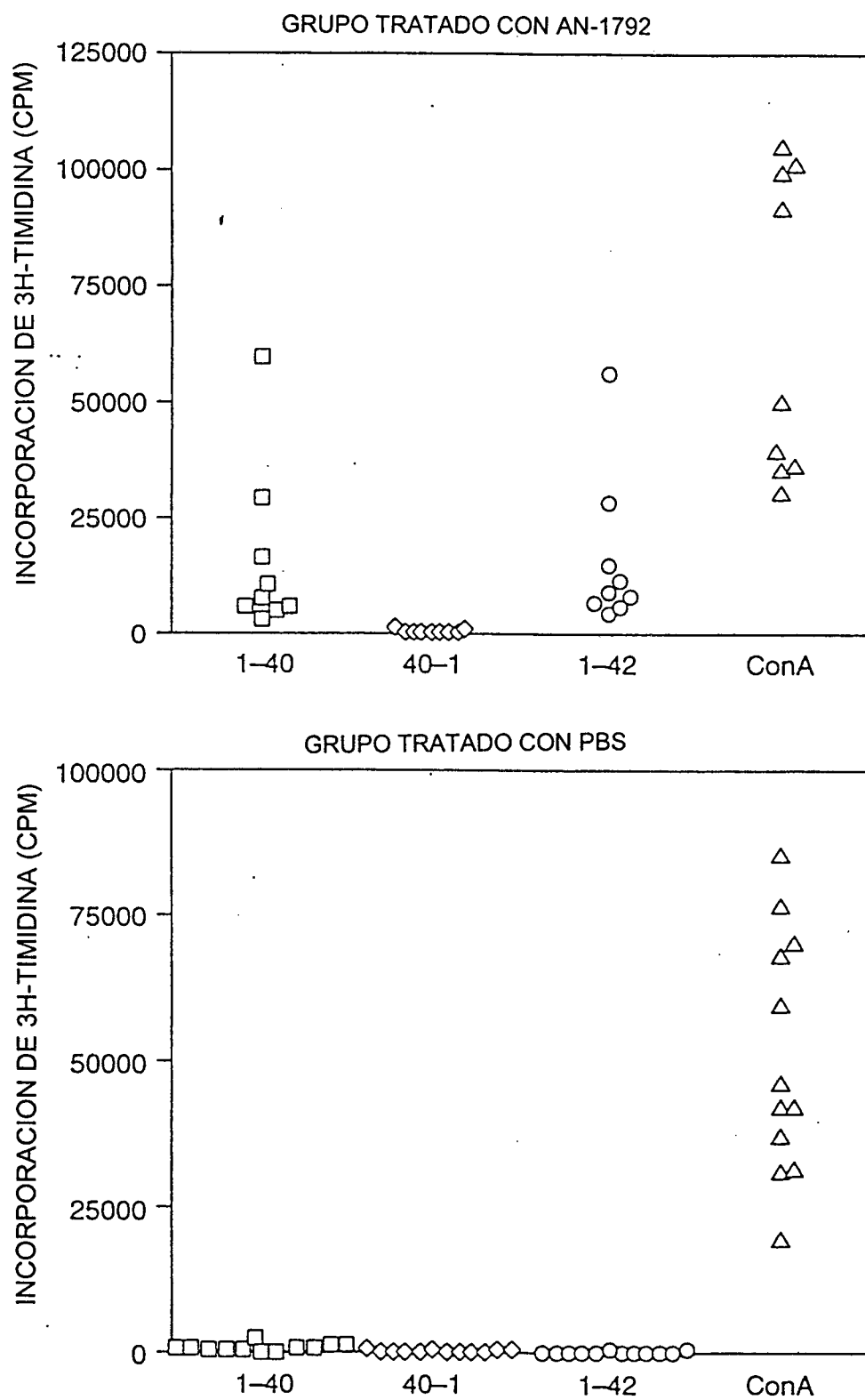


FIG. 10

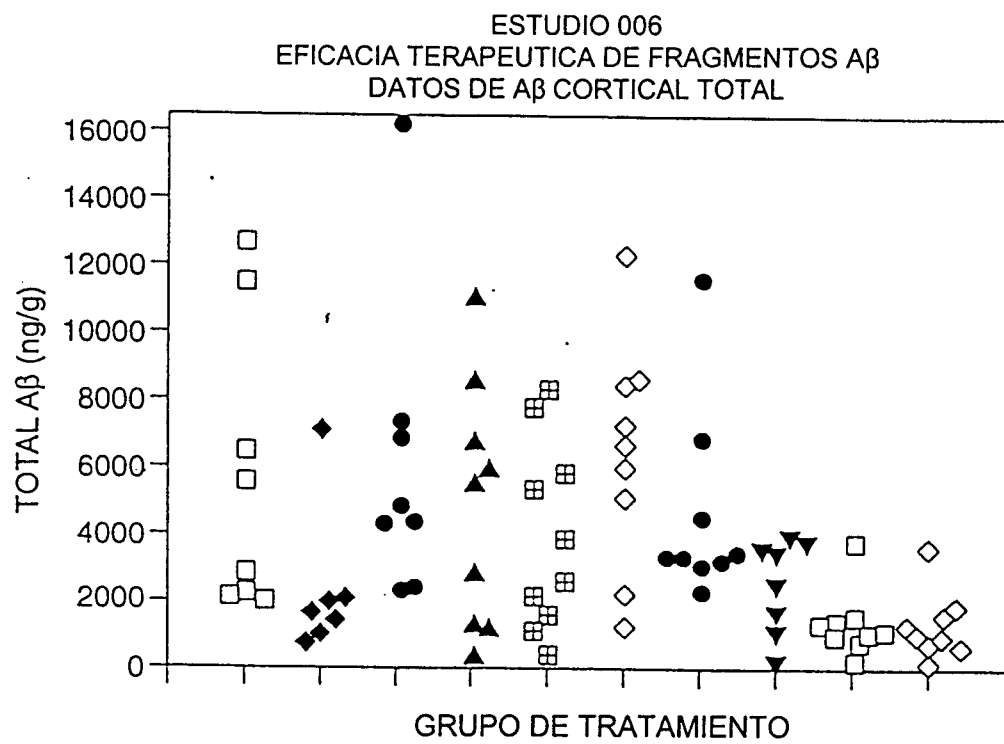


FIG. 11

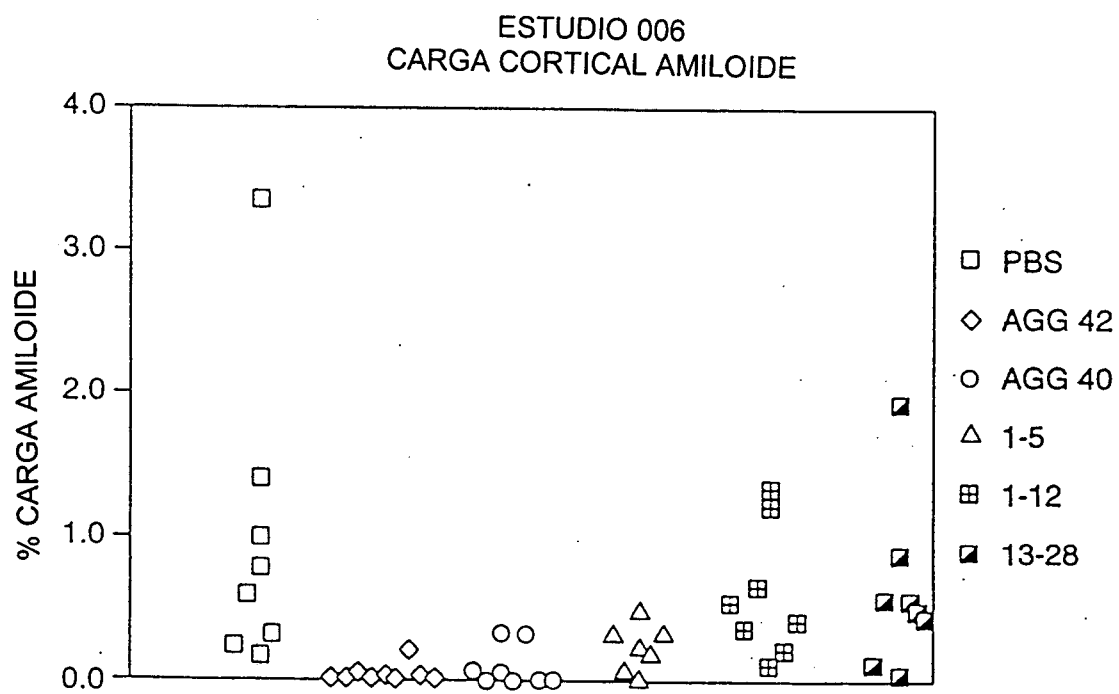


FIG. 12

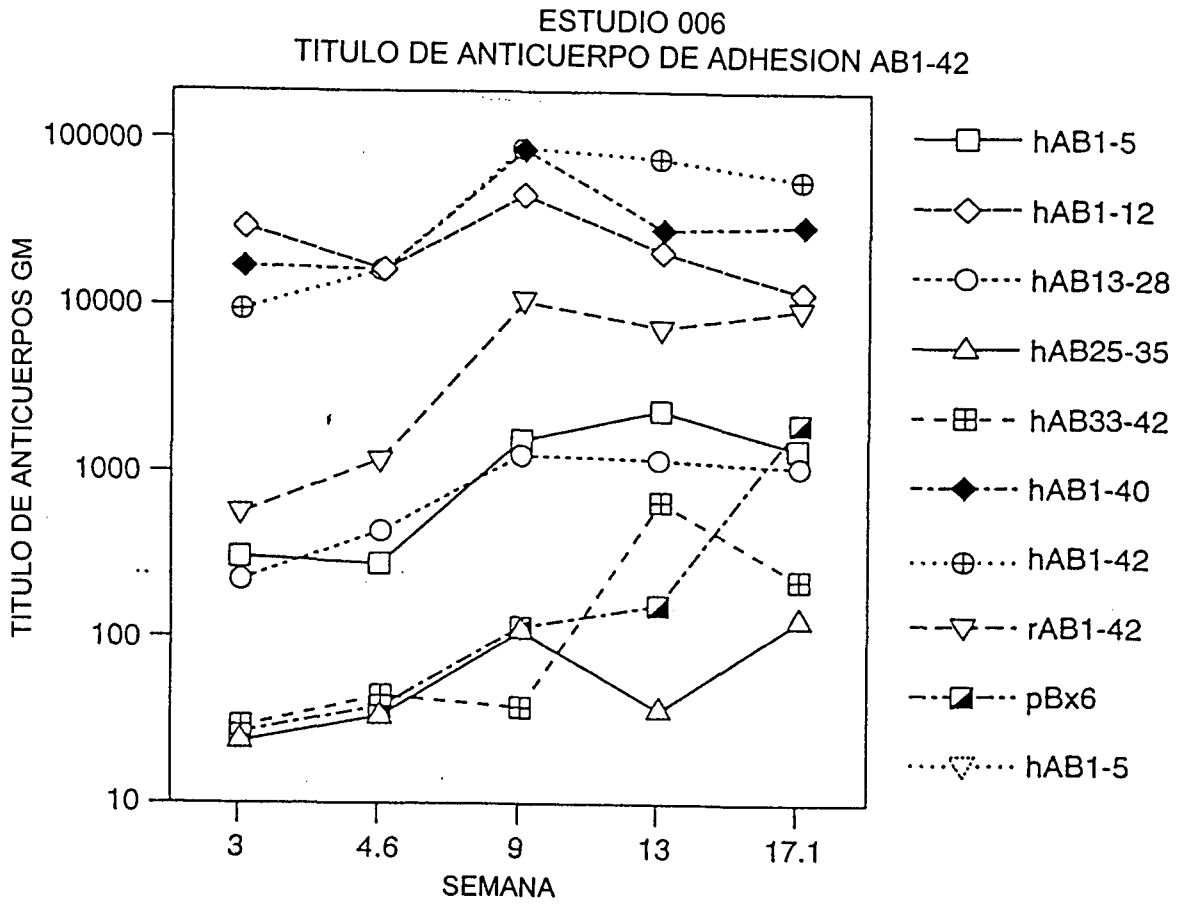


FIG. 13

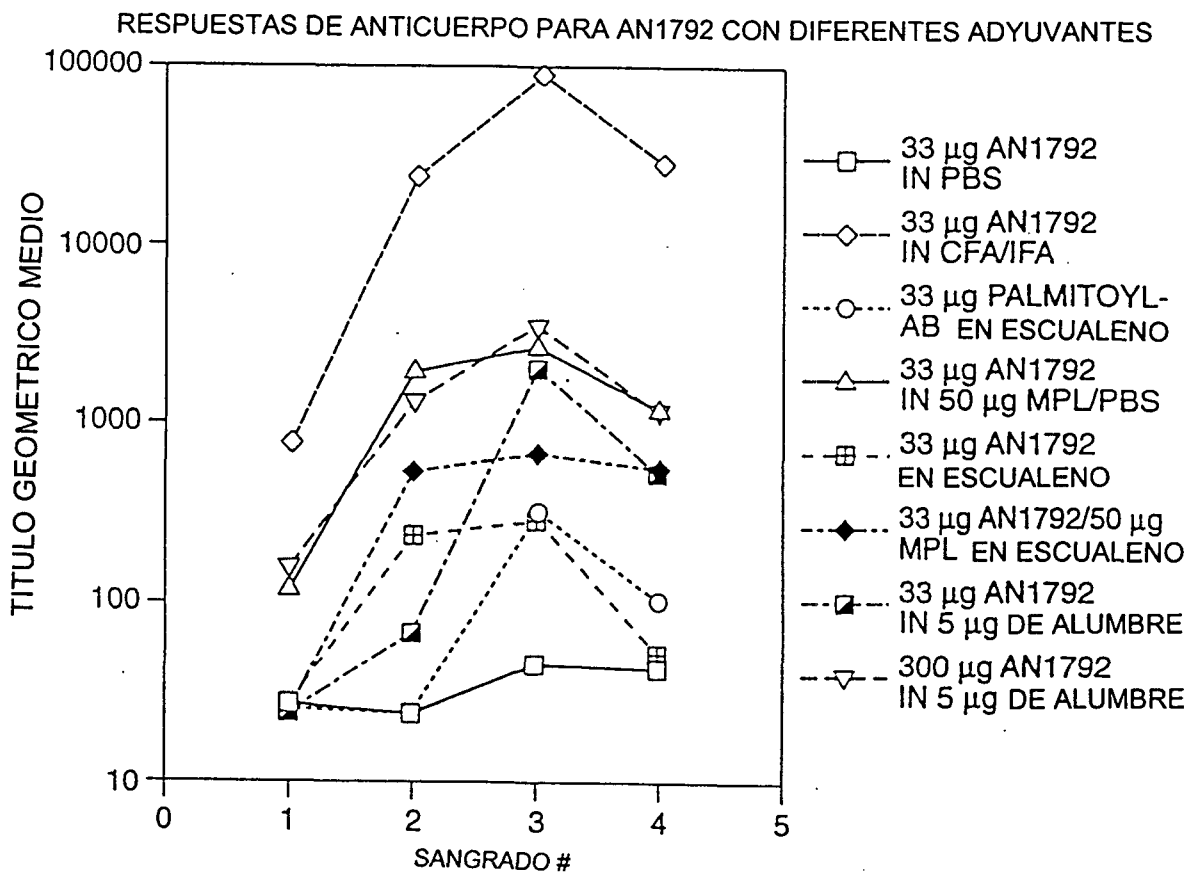


FIG. 14

CORTEZA

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

FIG. 15A

172
173

CORTEZA

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

FIG. 15B

CORTEZA

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

FIG. 15C

CORTEZA

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

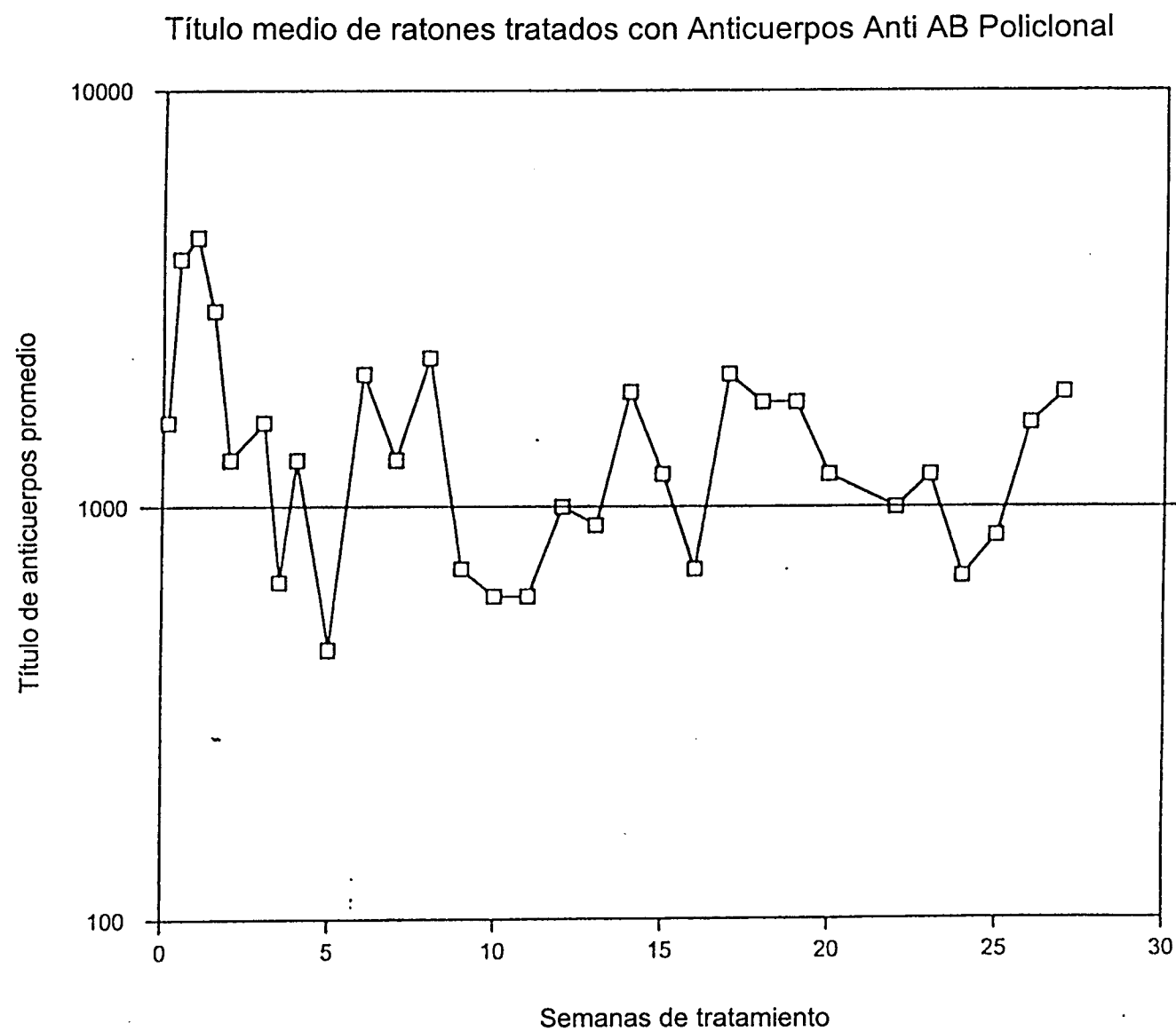
FIG. 15D

CORTEZA

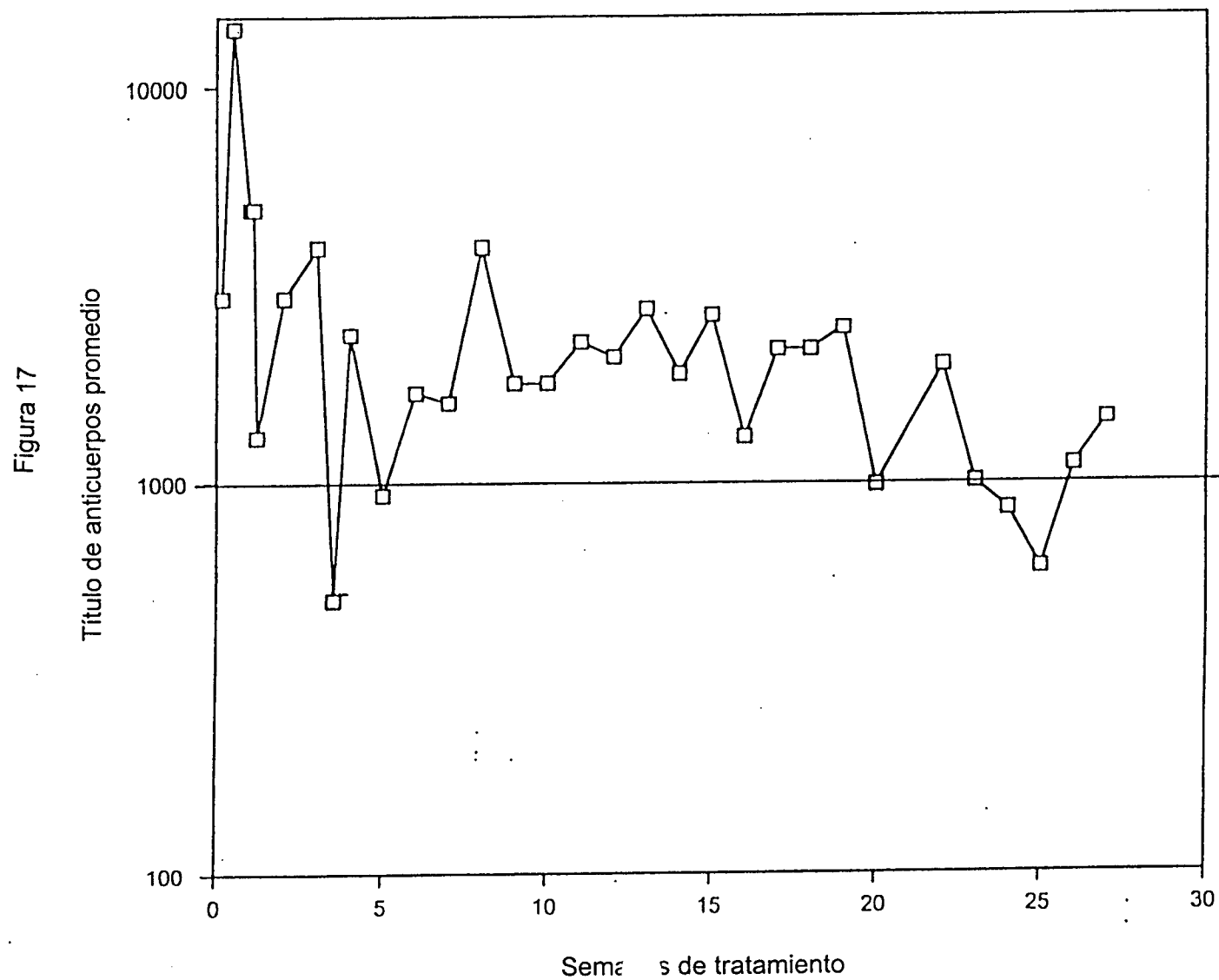
50 µg MPL 100 µg AN1792		25 µg QS21 100 µg AN1792	
646-023	2002	627-045	91
647-024	147	628-046	3397
648-025	1304	631-049	3702
649-026	34	632-050	1776
650-027	980	667-052	1832
724-028	1282	668-053	3023
726-030	1966	686-054	189
727-031	733	687-055	891
720-032	2563	688-056	240
721-033	5563	689-057	110
802-034	113	712-059	3311
803-035	671	825-061	1009
804-036	51	826-082	18165
811-037	613	827-063	73
812-038	332	828-064	78
813-039	1454	837-065	1051
814-040	2441	838-066	270
833-014	742	839-067	371
834-042	40		
836-044	807		
MEDIA	774	MEDIA	950
p MALUE (M-W)	0.1710	p MALUE (M-W)	0.4076
MEDIA	1192	MEDIA	2199
DEV. EST.	1299	DEV. EST.	4187
% CV	109	% CV	190
VALOR p (ENSAYO t)	0.1506	VALOR p (ENSAYO t)	0.8131
n=21		n=18	

FIG. 15E

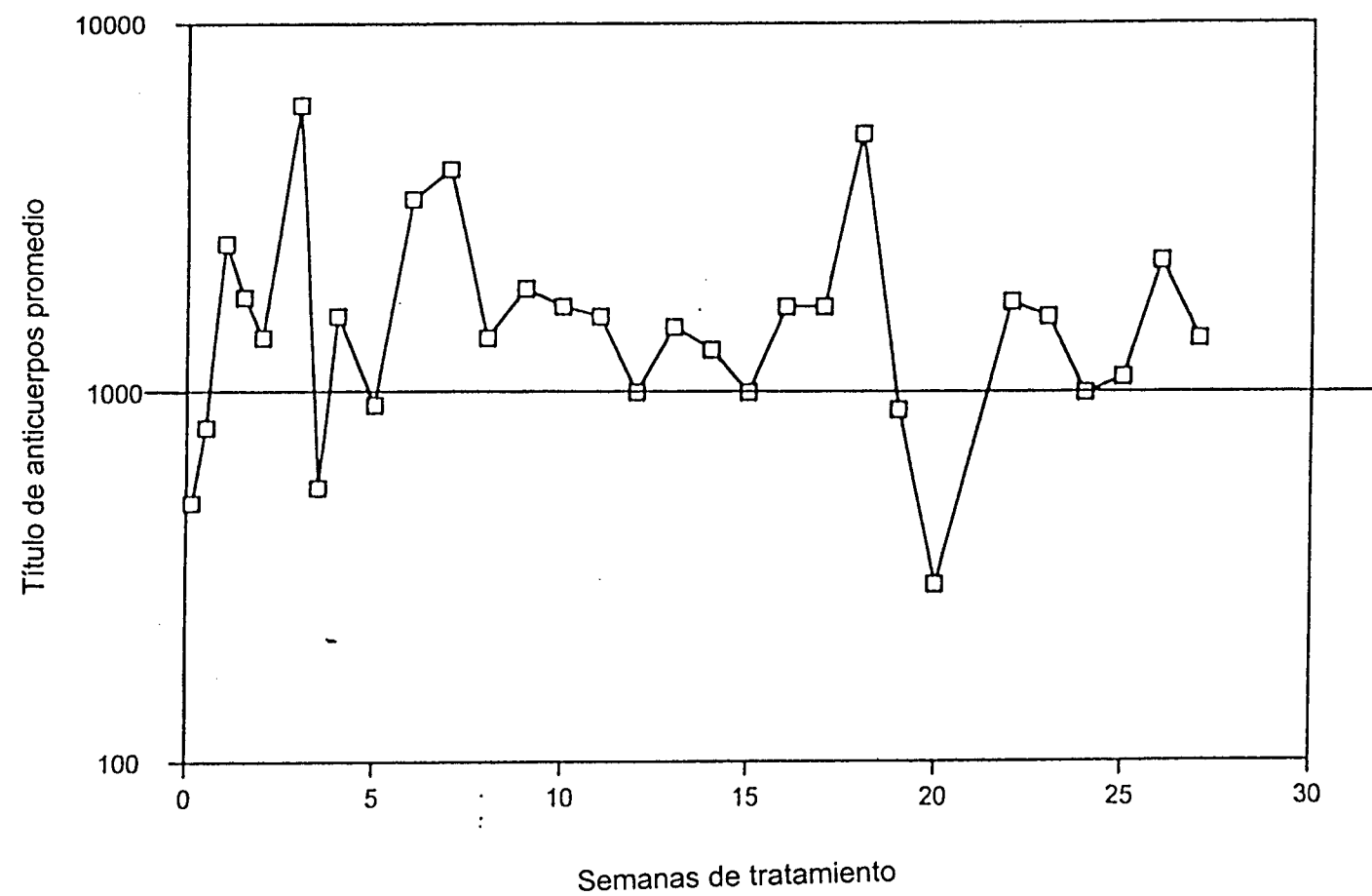
Figura 16



Título medio de ratones tratados con Anticuerpos Anti AB Monoclonal 10D5



Título medio de ratones tratados con Anticuerpos Anti AB Monoclonal 21F12





EXTRACTO PARA PUBLICACION
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

(21) No.SOLICITUD:	(51) INT.CL:	A61K 039/395
(22) FECHA DE PRESENTACIÓN:	(71) SOLICITANTE:	NEURALAB LIMITED
(30) PRIORIDAD:		
	SI	
(31) No.DE SOLICITUD:	(72) INVENTOR(ES):	1- Dale B. SCHENK 2- Frederique BARD 3- Nicki VASQUEZ 4- Ted YEDNOCK
	09/322.289	
(32) FECHA DE PRESENTACIÓN:		28-V- 1999
(33) PAÍS:	US.	(74) APODERADO: EMILIO FERRERO

(54) TÍTULO COMPOSICIONES FARMACEUTICAS PARA PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES AMILOIDOGÉNICAS

(57) RESUMEN: REIVINDICACION:

1. Una composición farmacéutica para evitar o tratar una enfermedad asociada con depósitos amiloides de A β en el cerebro de un paciente que comprende un anticuerpo que se adhiere a un componente del depósito amiloide en el paciente y un portador farmacéuticamente aceptable.

NOTA: favor no publicar antes de los 18 meses a partir de la fecha de presentación de la solicitud.



181

22

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
 Radicacion : 00039177 00000000 Folios: 182
 Fecha (AMD): 2000-05-26 16:51:23
 Trámite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
 Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800174099-2

ACORDO OFICIAL DE CABA : 31,850
 FECHA : MAYO 22 DE 2000

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	SUCURSAL	CUENTA	Nº. PAGO	Vr. PAGO
CAJALIERES ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	SUCURSA	050-00024-9	960418	22,150,000.00

***** CONCEPTOS *****

CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005 01-01 SOLICITUDES	500,000.00
1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	500,000.00
TOTAL :	1,000,000.00

CONV. OCHOCIENTOS OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CABA APLICADO AL EXPEDIENTE No.



Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5 y 10
 Conmutador: 334 12 21
 Fax: 281 31 25
 Santa Fe de Bogotá, D.C., Colombia

182
+23



REQUISITOS MINIMOS PARA ADV

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 00039177 00000000 Folios: 182
Fecha (AMD): 2000-05-26 16:51:23
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION []

MODELO DE UTILIDAD []

- 1 Nombre e identificación del Solicitante []
- 1 Nombre e identificación del Inventor []
- 1 Título o nombre de la Invención []
- 3 Descripción []
- 14 Reivindicaciones []
- 6 Resumen []
- 1 Comprobante de Pago []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- Nombre e identificación del peticionario []
- Nombre e identificación del inventor o diseñador []
- Indicación del género de productos para los cuales debe utilizarse []
- Representación gráfica []
- Comprobante de pago []

COMPLETA []

INCOMPLETA []



Firma Responsable

Fecha: _____

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
PRIMER EXAMEN DE FORMA

183
2000-05-29
430

EXPEDIENTE 00-39177

Practicado el examen jurídico de acuerdo con lo establecido en el art. 21 de la Decisión 344 se determinó que esta solicitud de **Patente de Invención**:

- | | | |
|--------|--------|---|
| SI [] | NO [X] | NO APLICABLE [] Presentó los poderes necesarios en forma correcta (Decisión 344, art. 14-a). |
| SI [] | NO [X] | NO APLICABLE [] Acreditó, en forma correcta, la existencia y representación de la persona jurídica solicitante (art. 14-c de la Decisión 344; literal g) del art. 4 del Decreto 117/94). |
| SI [x] | NO [] | NO APLICABLE [] Presentó, en forma correcta, el comprobante de pago por la tasa de presentación establecida (art. 13-f de la Decisión 344 y la Resolución 002 del 4 de enero del 2000). |
| SI [x] | NO [] | EXTEMPORANEAMENTE [] Reivindicó prioridad, dentro del plazo y de acuerdo con lo previsto en el Artículo 4 del Convenio de París. |
| SI [] | NO [X] | NO APLICABLE [] Presentó copia, certificada su conformidad por la Administración que recibió la solicitud de la cual reivindica prioridad, al momento de radicar la solicitud nacional. |
| SI [] | NO [X] | NO APLICABLE [] Presentó la traducción del capítulo reivindicatorio de la solicitud de la cual se reivindica prioridad (Art. 4, D-3 Convenio de París; Concepto: 5 de enero de 1999 S.I.C.). |
| SI [] | NO [X] | CUMPLE LOS REQUISITOS JURIDICOS |

OBSERVACIONES JURÍDICAS CONVENIO DE PARIS: Deberá presentar copia certificada su conformidad por la Administración que recibió la solicitud de la cual reivindica prioridad, en cualquier momento dentro del plazo de tres (3) meses, contados a partir de la fecha de depósito de la solicitud posterior. La omisión de esta formalidad implicará la pérdida del derecho de prioridad.

En consecuencia, se conceptúa que esta solicitud:

- | | | |
|--------|--------|--|
| SI [] | NO [X] | Se ajusta a los aspectos FORMALES indicados en la Decisión 344 y por tanto, |
| SI [] | NO [X] | Se recomienda PUBLICAR el extracto correspondiente. |

Santafé de Bogotá, D.C., 29 de Mayo del 2000

EXAMINADOR JURIDICO.
202022

184

Folio 185.

2000-08-15
430

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
1º EXAMEN DE FORMA

Radicación no 00039177.

Concepto Técnico no 1335. Clasificación Internacional de Patentes A61K 39/395.

Practicado el examen de acuerdo a lo establecido en el Art. 21 de la Decisión 344 se determinó que esta solicitud de **Patente de Invención**:

- SI ☒ NO ☐ Contiene la identificación correcta del inventor (Art.8, Art.13-a).
- SI ☒ NO ☐ Contiene la identificación correcta del solicitante (Artículo 13-a).
- SI ☒ NO ☐ Contiene el resumen con el objeto y finalidad de la invención en forma correcta (Art.13-e).
- SI ☒ NO ☐ Contiene el título o nombre de la invención en forma correcta (Art.13-b).
- SI ☐ NO ☒ Contiene la descripción clara y completa de la invención (Art.13-c).
- SI ☒ NO ☐ Contiene los dibujos correctos (Art.14-c junto con el literal d) del Art. 4 del Dto. 117 del 94).
- SI ☒ NO ☐ Contiene las unidades de medida en el sistema exigido (Art.14-c junto con el Decreto 3464 del 26 de diciembre de 1980).
- SI ☐ NO ☒ Contiene una o más reivindicaciones, en forma correcta, que precisen la materia para la cual se solicita la protección mediante la patente (Art.13-d).
- SI ☒ NO ☐ Contiene el extracto de acuerdo con el literal c) del artículo 4 del Dto. 117 /94.
- SI ☐ NO ☒ Contiene el arte final del dibujo característico de acuerdo con el literal c) del artículo 4 y el artículo 27 del Dto. 117 /94.
- SI ☒ NO ☐ Contiene la tarjeta del Archivo Temático [formato P-104] en forma correcta (Art.14-c junto con el literal b) del artículo 4 del Dto. 117 /94).
- SI ☒ NO ☐ Contiene la tarjeta del Archivo de Propietarios [formato P-105] en forma correcta (Art.14-c junto con el literal b) del artículo 4 del Dto. 117 /94).
- SI ☐ NO ☒ **CUMPLE LOS REQUISITOS TÉCNICOS**

OBSERVACIONES Y OTROS: SI ☒ NO ☐ ver hoja(s) anexa(s)

Santa Fe de Bogotá, D.C., 15 de Agosto/00

202016
EXAMINADOR TÉCNICO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
PRIMER EXAMEN DE FORMA

185

CONCEPTO TÉCNICO: 1335
EXPEDIENTE: 00039177
IPC: A61K 39/395

Realizado el Primer Examen de Forma se hace la siguiente observación:

1. La descripción no es clara pues no define cual es la proteína A β y sin la descripción de la secuencia de dicha proteína no es posible saber sobre cual es la molécula a partir de la cual se centra la invención. Por consiguiente se requiere que se anexe la secuencia de aminoácidos de la proteína que el solicitante reporta como proteína A β .
2. De acuerdo a la descripción y a las reivindicaciones, el objeto de la solicitud es una composición que comprende un anticuerpo que se adhiere a un componente del depósito amiloide en el paciente y un portador farmacéuticamente aceptable. Dado que dicho anticuerpo no se encuentra definido de manera precisa, pues no se conoce la secuencia de aminoácidos de su estructura ni su número de depósito, y lo único que se sabe del es que se une específicamente a la proteína A β o a un fragmento de dicha proteína, dicho anticuerpo no se encuentra definido pues es claro que a una proteína determinada o aun fragmento de ella puede unirsele específicamente más de un anticuerpo y el solicitante no ha precisado cual es dicho anticuerpo, por lo cual, tampoco es posible precisar cual es la composición para la que el solicitante desea protección. Sírvasse definir el anticuerpo que constituye la composición en términos de su secuencia de aminoácidos o del número de depósito del hibridoma que lo produce, de lo contrario las reivindicaciones 1 a 87 no cumplen con el literal d) del artículo 13 de la Decisión 344 donde se indica que *"Las solicitudes para obtener patentes de invención deberán presentarse ante la oficina nacional competente y deberán contener: Una o más reivindicaciones que precisen la materia para la cual se solicita la protección mediante la patente"*. En conclusión, precise exactamente en la reivindicación 1 el anticuerpo que constituye la composición que se desea reivindicar, y a partir de esta reivindicación señale las propiedades de dicho anticuerpo, como son el que dicho anticuerpo se une específicamente al epítopo... dentro de los residuos... de la proteína A β , que sea un anticuerpo isotipo IgG1 humana, que sea quimérico, mono o policlonal, y demás características del anticuerpo en sí.
3. Sírvasse aclarar si el anticuerpo que reconoce la proteína A β o un fragmento de dicha proteína es el mismo que se une específicamente a la sinucleína, pues si dichos anticuerpos son distintos, la composición de la reivindicación 3 es completamente diferente a la composición de las restantes reivindicaciones y por consiguiente, dado que el objeto de invención no tendría ninguna relación y por ende dicha reivindicación 3 carece de unidad de invención y debe ser objeto de una solicitud diferente.
4. Por otro lado, se requiere eliminar las reivindicaciones 3 a 7, 9, 17 a 19, 22 a 26, 38 a 42, 44, 47 a 48, 51 a 53, 55 a 57, 81 y 83 a 85 puesto que ellas no definen ni precisan características de una composición. Una composición farmacéutica solo puede ser definida en términos de la naturaleza de los elementos presentes en la composición y la proporción en que se hallan. Siendo que estas reivindicaciones no definen ni tratan sobre los elementos que constituyen la composición objeto de la invención, sino que se dirigen a establecer las características del paciente que va a ser el usuario de dicha invención o los efectos que dicha composición va a producir en el paciente se establece que las reivindicaciones en cuestión no precisan ni delimitan la invención y por ende deben ser suprimidas. Decir que la composición es para tratar o evita una enfermedad y definir dicha enfermedad o la cantidad de composición que se va a necesitar para lograr un efecto en el paciente no permite establecer de que objeto, en este caso composición, estamos hablando y por ende no se puede establecer el objeto para el que se solicita protección. En resumen, las características de estas reivindicaciones no precisan el objeto de la invención que es una composición.

5. La reivindicación 20 no es clara pues la traducción parece estar errónea y referirse a una composición... el anticuerpo se adhiere específicamente a un epítipo que comprende el residuo N-terminal libre de la proteína A β .
6. Las reivindicaciones 32 a 36 no son clara pues definen una composición en función de dos anticuerpos no conocidos o indefinidos pues no se sabe, como se expuso anteriormente, cual es el anticuerpo que es el elemento activo de la composición 1, y ahora se mezcla dicho elemento no definido con otro elemento no definido como es este segundo anticuerpo cuya secuencia o número de depósito es desconocido y lo único que se sabe es que se adhiere a un epítipo diferente de la proteína A β . Como se indicó anteriormente, a un epítipo puede unirse de manera específica más de un anticuerpo, y si dicho anticuerpo no se define en función de su secuencia o del número de depósito mediante el cual se puede ubicar no es posible precisar cual es el objeto para el cual el solicitante exige protección.
7. La reivindicación 41 no es clara pues ella define una composición en virtud a un método para producir un anticuerpo que va a estar presente en la composición. Siendo así se requiere esta reivindicación sea eliminada pues no precisa el objeto de la invención.
8. La reivindicación 45 no es clara puesto que en ella se dice que la composición administra un anticuerpo mediante la administración de un polinucleótido que codifica dicho anticuerpo. Ante esto la primera incoherencia se presenta en la composición, al fin qué, la composición comprende una anticuerpo o comprende un polinucleótido que codifica el anticuerpo o un polinucleótido que al ser suministrado hace que el paciente produzca anticuerpos anti- la proteína A β ?. El otro punto es que como se estableció anteriormente, no se conoce cual es el anticuerpo que constituye la composición para la cual se desea protección, en ninguna parte de la solicitud se establece cual es la secuencia de nucleótidos que va a codificar dicho anticuerpo, por tanto, no se sabe cual es el polinucleótido que conforma dicha composición y no se puede establecer cual es la composición para la que se exige protección. Para subsanar esta falta de claridad se requiere que se indique que elemento comprende la composición que se desea proteger y si es el anticuerpo o el polinucleótido se precise la secuencia de aminoácidos o de nucleótidos que define dicho anticuerpo o dicho polinucleótido de acuerdo al caso.
9. La reivindicación 63 no se encuentra bien traducida, al parecer lo que quiere decir es que ...el segmento N-terminal de A β está ligado en sus extremos N y C-terminal a un primer y un segundo polipéptidos heterólogos. Sírvase revisar la traducción de esta reivindicación y de las siguientes 4 reivindicaciones.
10. La reivindicación 82 no es precisa el objeto de la invención puesto caracteriza la composición objeto de la invención por comprender "un agente que induce respuesta inmunogénica contra el segmento terminal de la proteína A β " pero no indica que tipo de molécula es dicho agente ni define de manera exacta de que elemento se está hablando. Por consiguiente, se requiere que se establezca claramente cual es el agente o elemento que constituye el objeto de la invención.
11. La reivindicación 107 no es clara, precise la secuencia o número de depósito del anticuerpo que comprende el kit de diagnóstico pues de lo contrario dicho objeto no se encuentra precisado y no cumple con el artículo 13 de la Decisión 344 de la Comisión del Acuerdo de Cartagena.
12. Se requiere eliminar la reivindicación 108 por no definir el objeto de la invención, un kit o equipo de diagnóstico está compuesto por la combinación de sustancias o compuestos necesarias para realizar un método de diagnóstico, dicho objeto solo puede caracterizarse en términos de los compuestos que intervienen en la prueba para determinar si un paciente presenta o no una enfermedad y no en función de las instrucciones para poder desarrollar el método de diagnóstico.

13. En consecuencia a lo anterior, sirvase presentar nueva tarjeta temática, nueva tarjeta para el archivo de propietarios y nuevo extracto de publicación.

Santa Fe de Bogotá,

/202016

189

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
PRIMER EXAMEN DE FORMA

CONCEPTO TÉCNICO: 1335
EXPEDIENTE: 00039177
IPC: A61K 39/395

Realizado el Primer Examen de Forma se hace la siguiente observación:

1. La descripción no es clara pues no define cual es la proteína A β y sin la descripción de la secuencia de dicha proteína no es posible saber sobre cual es la molécula a partir de la cual se centra la invención. Por consiguiente se requiere que se anexe la secuencia de aminoácidos de la proteína que el solicitante reporta como proteína A β .
2. De acuerdo a la descripción y a las reivindicaciones, el objeto de la solicitud es una composición que comprende un anticuerpo que se adhiere a un componente del depósito amiloide en el paciente y un portador farmacéuticamente aceptable. Dado que dicho anticuerpo no se encuentra definido de manera precisa, pues no se conoce la secuencia de aminoácidos de su estructura ni su número de depósito, y lo único que se sabe del es que se une específicamente a la proteína A β o a un fragmento de dicha proteína, dicho anticuerpo no se encuentra definido pues es claro que a una proteína determinada o aun fragmento de ella puede unírsele específicamente más de un anticuerpo y el solicitante no ha precisado cual es dicho anticuerpo, por lo cual, tampoco es posible precisar cual es la composición para la que el solicitante desea protección. Sírvasse definir el anticuerpo que constituye la composición en términos de su secuencia de aminoácidos o del número de depósito del hibridoma que lo produce, de lo contrario las reivindicaciones 1 a 87 no cumplen con el literal d) del artículo 13 de la Decisión 344 donde se indica que *"Las solicitudes para obtener patentes de invención deberán presentarse ante la oficina nacional competente y deberán contener: Una o más reivindicaciones que precisen la materia para la cual se solicita la protección mediante la patente"*. En conclusión, precise exactamente en la reivindicación 1 el anticuerpo que constituye la composición que se desea reivindicar, y a partir de esta reivindicación señale las propiedades de dicho anticuerpo, como son el que dicho anticuerpo se une específicamente al epítipo... dentro de los residuos... de la proteína A β , que sea un anticuerpo isotipo IgG1 humana, que sea quimérico, mono o policlonal, y demás características del anticuerpo en sí. pero
precise
y en la
reivindicación
1.
3. Sírvasse aclarar si el anticuerpo que reconoce la proteína A β o un fragmento de dicha proteína es el mismo que se une específicamente a la sinucleína, pues si dichos anticuerpos son distintos, la composición de la reivindicación 3 es completamente diferente a la composición de las restantes reivindicaciones y por consiguiente, dado que el objeto de invención no tendría ninguna relación y por ende dicha reivindicación 3 carece de unidad de invención y debe ser objeto de una solicitud diferente.
4. Por otro lado, se requiere eliminar las reivindicaciones 3 a 7, 9, 17 a 19, 22 a 26, 38 a 42, 44, 47 a 48, 51 a 53, 55 a 57, 81 y 83 a 85 puesto que ellas no definen ni precisan características de una composición. Una composición farmacéutica solo puede ser definida en términos de la naturaleza de los elementos presentes en la composición y la proporción en que se hallan. Siendo que estas reivindicaciones no definen ni tratan sobre los elementos que constituyen la composición objeto de la invención, sino que se dirigen a establecer las características del paciente que va a ser el usuario de dicha invención o los efectos que dicha composición va a producir en el paciente se establece que las reivindicaciones en cuestión no precisan ni delimitan la invención y por ende deben ser suprimidas. Decir que la composición es para tratar o evita una enfermedad y definir dicha enfermedad o la cantidad de composición que se va a necesitar para lograr un efecto en el paciente no permite establecer de que objeto, en este caso composición, estamos hablando y por ende no se puede establecer el objeto para el que se solicita protección. En resumen, las características de estas reivindicaciones no precisan el objeto de la invención que es una composición.

190

5. La reivindicación 20 no es clara pues la traducción parece estar errónea y referirse a una composición... el anticuerpo se adhiere específicamente a un epítipo que comprende el residuo N-terminal libre de la proteína A β .
6. Las reivindicaciones 32 a 36 no son clara pues definen una composición en función de dos anticuerpos no conocidos o indefinidos pues no se sabe, como se expuso anteriormente, cual es el anticuerpo que es el elemento activo de la composición 1, y ahora se mezcla dicho elemento no definido con otro elemento no definido como es este segundo anticuerpo cuya secuencia o número de depósito es desconocido y lo único que se sabe es que se adhiere a un epítipo diferente de la proteína A β . Como se indicó anteriormente, a un epítipo puede unirse de manera específica más de un anticuerpo, y si dicho anticuerpo no se define en función de su secuencia o del número de depósito mediante el cual se puede ubicar no es posible precisar cual es el objeto para el cual el solicitante exige protección.
7. La reivindicación 41 no es clara pues ella define una composición en virtud a un método para producir un anticuerpo que va a estar presente en la composición. Siendo así se requiere esta reivindicación sea eliminada pues no precisa el objeto de la invención.
8. La reivindicación 45 no es clara puesto que en ella se dice que la composición administra un anticuerpo mediante la administración de un polinucleótido que codifica dicho anticuerpo. Ante esto la primera incoherencia se presenta en la composición, al fin qué, la composición comprende una anticuerpo o comprende un polinucleótido que codifica el anticuerpo o un polinucleótido que al ser suministrado hace que el paciente produzca anticuerpos anti- la proteína A β ? El otro punto es que como se estableció anteriormente, no se conoce cual es el anticuerpo que constituye la composición para la cual se desea protección, en ninguna parte de la solicitud se establece cual es la secuencia de nucleótidos que va a codificar dicho anticuerpo, por tanto, no se sabe cual es el polinucleótido que conforma dicha composición y no se puede establecer cual es la composición para la que se exige protección. Para subsanar esta falta de claridad se requiere que se indique que elemento comprende la composición que se desea proteger y si es el anticuerpo o el polinucleótido se precise la secuencia de aminoácidos o de nucleótidos que define dicho anticuerpo o dicho polinucleótido de acuerdo al caso.
9. La reivindicación 63 no se encuentra bien traducida, al parecer lo que quiere decir es que ...el segmento N-terminal de A β está ligado en sus extremos N y C-terminal a un primer y un segundo polipéptidos heterólogos. Sírvase revisar la traducción de esta reivindicación y de las siguientes 4 reivindicaciones.
10. La reivindicación 82 no es precisa el objeto de la invención puesto caracteriza la composición objeto de la invención por comprender "un agente que induce respuesta inmunogénica contra el segmento terminal de la proteína A β " pero no indica que tipo de molécula es dicho agente ni define de manera exacta de que elemento se está hablando. Por consiguiente, se requiere que se establezca claramente cual es el agente o elemento que constituye el objeto de la invención.
11. La reivindicación 107 no es clara, precise la secuencia o número de depósito del anticuerpo que comprende el kit de diagnóstico pues de lo contrario dicho objeto no se encuentra precisado y no cumple con el artículo 13 de la Decisión 344 de la Comisión del Acuerdo de Cartagena.
12. Se requiere eliminar la reivindicación 108 por no definir el objeto de la invención, un kit o equipo de diagnóstico está compuesto por la combinación de sustancias o compuestos necesarias para realizar un método de diagnóstico, dicho objeto solo puede caracterizarse en términos de los compuestos que intervienen en la prueba para determinar si un paciente presenta o no una enfermedad y no en función de las instrucciones para poder desarrollar el método de diagnóstico.

13. En consecuencia a lo anterior, sírvase presentar nueva tarjeta temática, nueva tarjeta para el archivo de propietarios y nuevo extracto de publicación.

Santa Fe de Bogotá,

/202016

COPIA PARA EL SOLICITANTE

108
2000-08-24
430

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

EXPEDIENTE 00-39177

AUTO 1929

DISPONE

ARTICULO PRIMERO: Conforme lo establece el artículo 22 de la Decisión 344 de la Comisión del Acuerdo de Cartagena, requiérese al solicitante, para que dentro del plazo de treinta (30) días hábiles siguientes a la fecha de notificación del auto, presente respuesta a las observaciones o complemente los antecedentes señalados en el examen de forma.

ARTICULO SEGUNDO: Notificar por estado el presente auto, advirtiéndolo que contra el no procede recurso alguno en la vía gubernativa.

NOTIFIQUESE Y CUMPLASE

22 AGO 2000

Dado en Santafé de Bogotá D.C., a los _____

EL JEFE DE LA DIVISION DE NUEVAS CREACIONES,

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL

NOTIFICADO POR ESTADO

Santafé de Bogotá D.C., 24 AGO. 2000 notificado por anotación en estado de esta misma fecha.

VENCIMIENTO NOTIFICACION ESTADO

SOLICITO PRORROGA TERMINO SI _____ NO _____

VENCIMIENTO TERMINO PRORROGA
202022