Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

PCT

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

06-59320

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.** 06-59320

54. **TÍTULO** Conjugados de peptido inmunogenico AB Vehiculo. y Metodos para su producción

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** C07K 1/00

71. **SOLICITANTE** Elan pharmaceuticals, INC. y Wyeth.

DOMICILIO New jersey 07940, Estados Unidos de America.

74. **APODERADO** Emilio ferrero. cc. 138, 019 de Usaquén

22. **BOGOTÁ, D. C.,** _____

S.S.

(FORMA P-10)

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-059320- -00000-0000
Fec: 2005-06-16 16:02:09 Dep: 2020 NUECREACIONES 1
Tra: 11 PATENTEIYII
Cla: 370 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 386

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1 SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad.
☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.

2 SOLICITANTE (71)

Nombre: **ELAN PHARMACEUTICALS, INC. y WYETH**
sociedades constituidas y existentes bajo las leyes del estado de Delaware, Estados Unidos de América

Dirección: 800 Gateway Boulevard
South San Francisco
California 94080
Estados Unidos de América

y

Five Giralda Farms
Madison
New Jersey 07940
Estados Unidos de América

Domicilio: South San Francisco
California 94080
Estados Unidos de América

y

Madison,
New Jersey 07940
Estados Unidos de América

respectivamente

IDENTIFICACIÓN
C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número _____

3 REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: EMILIO FERRERO
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@carnyp.com.
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN
C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número 438.019 T.P 31.929

4 INVENTOR (ES) (72)

1. **Rasappa G. ARUMUGHAM**
102 Barton Lane
Chapel Hill
Carolina del Norte 27516
Estados Unidos de América

2. **Krishna PRASAD A.**
105 Worsham Drive
Chapel Hill
Carolina del Norte 27516
Estados Unidos de América

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2004/044093 Fecha: 17 de diciembre de 2004
Publicación Internacional No. WO 2005/058941 A2 Fecha: 30 de junio de 2005

6 TÍTULO (54)

C NJUGAD S DE PEPTIDO INMUNOGENIC AB-VEHICULO Y MET DOS PARA SU PRODUCCI N

7 Clasificación Internacional (51) C07K 1/80

2

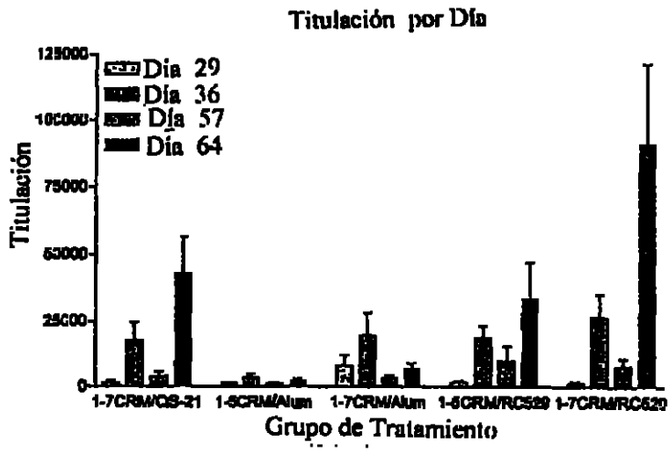
8 Prioridad SI☒ NO☐	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	US	17 de diciembre de 2003	60/530,481

9 **Comprobante de pago No.: 06-44,162** **Fecha: 12 de Junio de 2006**

10 **Anexos:**

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por $ 463.000.oo.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☒ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

(11) **FIGURA CARACTERÍSTICA**



(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERRERO

FIRMA : _____

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

JDF

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2005/058941 A2
2. ☒Extracto de publicación.

NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN FASE INTERNACIONAL

4676 5

CAVELIER
ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a Nº 72-35
BOGOTÁ, D – COLOMBIA

193

Representación, Ratificación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation, Ratification and Power-of-Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

REPRESENTACIÓN Y PODER

REPRESENTATION AND POWER OF ATTORNEY

13170
6654

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

ELAN PHARMACEUTICALS, INC.

domiciliado (s) en/of 800 Gateway Boulevard, South San Francisco, California 94080, United States of America.

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tps. 31939; GONZALO PERDOMO, tps. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tps. 23555 y GERMAN CAVELIER, tps. 832, domiciliados en la Carrera 4a Nº 72-35, Bogotá, Colombia, en obedecimiento a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (confirimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso- administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del

In due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tps. 31939; GONZALO PERDOMO, tps. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tps. 23555 and GERMAN CAVELIER, tps. 832, domiciled at Carrera 4a Nº 72 -35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall make their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative or of the first or second alternate in their turn ceases, the [illegible] in their sequence, by the principal, the first [illegible] as case, and the mere fact of its [illegible] the representation by the first, second or third alternate in their turns shall end at such time. In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above named attorneys at law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property [illegible] competition, for which purpose I (we) authorize said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer,

14 JUN 2006
PABLO BENDEK BARBOSA
NOTARIO (E)

© CAVELIER ABOGADOS
WPPODB01-121 (MINUTA Nº12.1.1.2.6 USA)

consumidor, oposiciones o observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la acción de amparo, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovemos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, consentir, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, consent, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this September 2, 2005

en/in South San Francisco, CA 94080, USA

Firma/Signature

Carl W. Battle, Senior Vice President
Chief Intellectual Property Counsel

14 JUN 2006

PABLO ENRIQUE BARAJAS
NOTARIO

SEE ATTACHED NOTARY CERTIFICATE

CERTIFICACIÓN NOTARIAL (SOCIEDAD)

A los _____ días del mes de _____ de 200 __ compareció(eron) ante mí, Carl W. Battle, Senior Vice President, Chief Intellectual Property Counsel

Quien(es) conozco personalmente y que firma(n) este documento en representación de la Sociedad/compañía denominada ELAN PHARMACEUTICALS, INC.

Certifico:

1. Que he visto los siguientes documentos:*

2. Que dichos documentos prueban lo siguiente:

2.1. Que ELAN PHARMACEUTICALS, INC. es una Sociedad/Compañía legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América

2.2. Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es 800 Gateway Boulevard, South San Francisco, California 94080, Estados Unidos de América.

2.3. Que el objeto u objetos para los cuales se otorga el presente poder están comprendidos dentro del objeto social de la mencionada Sociedad/Compañía.

2.4. Que el(los) Sr.(Sres.) Carl W. Battle, Senior Vice President, Chief Intellectual Property Counsel está(n) autorizado(s) para otorgar el presente Poder.

Ciudad _____

Estado _____

Hoy _____ de 200 __

NOTARIAL CERTIFICATION (CORPORATION)

On this _____ day of _____ 200 __ appeared before me Carl W. Battle, Senior Vice President, Chief Intellectual Property Counsel who(m) I know personally and who(m) signed this document as representative(s) of the Corporation/Company named ELAN PHARMACEUTICALS, INC.

I certify:

1. That I have seen the following documents:*

- Articles of Incorporation

2. That the above documents duly prove the following:

2.1. That ELAN PHARMACEUTICALS, INC. is a Corporation/Company legally constituted and in existence in accordance with the laws of The State of Delaware, United States of America.

2.2. That the domicile of said Corporation/Company is 800 Gateway Boulevard, South San Francisco, California 94080, United States of America.

2.3. That the purpose or purposes for which the present Power of Attorney is granted are comprised within the corporation purposes set forth in the charter of the mentioned Corporation/Company.

2.4. That Mr.(Messrs.) Carl W. Battle, Senior Vice President, Chief Intellectual Property Counsel is(are) authorized to grant the present Power of Attorney

City South San Francisco

State California

This _____ day of _____ 200 __

_____ NOTARIO PÚBLICO O FUNCIONARIO AUTORIZADO — NOTARY PUBLIC OR ATTESTING OFICIAL _____

* Los documentos que certifican la existencia de la compañía deben identificarse con fecha y origen

* The documents that certify the existance of the company must be identified with date and origin

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: _____
   This public document
2. has been signed by: _____
3. acting in the capacity of: _____
4. bears the seal/stamp of: _____

Certified

5. at: _____ 6. the _____
7. by _____
8. No. _____
9. Seal/stamp 10. Signature

14 JUN 2006

© CAVELIER ABOGADOS

State of California

SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. *Country: United States of America*
   This public document
2. *has been signed by PETER SURLA*
3. *acting in the capacity of Notary Public, State of California*
4. *bears the seal/stamp of PETER SURLA, Notary Public, State of California*

CERTIFIED

5. *At Sacramento, California*
6. *the 3rd day of October 2005*
7. *by Deputy Secretary of State, State of California*
8. *No. 257972*
9. *Seal/Stamp:*

10. *Signature*

SOLO NOTARIO SEXTO (6) DEL CANTÓN DE PUNTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA

14 JUN 2006

PABLO MENÉNDEZ BARAJAS
NOTARIO (6)

OFFICE OF THE SECRETARY OF STATE

Secretary of State

BY

NP-24 A (REV. 4-05)

OSP 05 80772

ALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKN WLEDGMENT

State of California
County of SAN MATEO } ss.

On SEPTEMBER 2, 2005 (Date) before me, PETER SURLA, NOTARY PUBLIC (Name and Title of Officer (e.g., "Jane Doe, Notary Public"))
personally appeared CARL W. BATTLE (Name(s) of Signer(s))

☒ personally known to me
☐ proved to me on the basis of satisfactory evidence

to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

WITNESS my hand and official seal.

PETER SURLA
Commission # 1538923
Notary Public - California
San Mateo County
My Comm. Expires Dec 24, 2008

Signature of Notary Public

OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document: REPRESENTATION AND ORDER PURSUANT TO HSR 2005 CIVIL

Document Date: N/A

Number of Pages: 2

Signer(s) Other Than Named Above: N/A

Capacity(ies) Claimed by Signer

Signer's Name: CARL W. BATTLE
SENIOR VICE PRESIDENT,

☐ Individual
☒ Corporate Officer — Title(s): CHIEF INTELLECTUAL PROPERTY COUNSEL
☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
☐ Attorney-in-Fact
☐ Trustee
☐ Guardian or Conservator
☐ Other:

Signer Is Representing: ELAN PHARMACEUTICALS, INC.

RIGHT THUMBPRINT OF SIGNER
Top of thumb here

© 1999 National Notary Association • 9350 De Soto Ave., P.O. Box 2402 • Chatsworth, CA 91313-2402 • www.nationalnotary.org Prod. No. 5907 Reorder: Call Toll-Free 1-800-876-6827

10

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country : United States Of America
2. This public document has been signed by **LORRAINE F STRUNK**
3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC
4. bears the seal/stamp LORRAINE F STRUNK, NOTARY PUBLIC, MONTGOMERY COUNTY, COMMONWEALTH OF PENNSYLVANIA

Certified

5. at Harrisburg, Pennsylvania
6. The 3rd day of October, 2005
7. by Pedro A. Cortés, Secretary of the Commonwealth of Pennsylvania
8. No : 200536342
9. Seal/Stamp
10. Signature



Pedro A. Cortés

[redacted]

CERTIFICATION OF AUTHORITY

1. I, Richard Collier (name), Executive Vice President, General Counsel & Secretary (title) of ELAN PHARMACEUTICALS, INC. do hereby certify that:

1.1. Carl W. Battle is the Senior Vice President, Chief Intellectual Property Counsel of ELAN PHARMACEUTICALS, INC. and that he/she is the authorized by ELAN PHARMACEUTICALS, INC. to execute this Power of Attorney on its behalf.

1.2. That ELAN PHARMACEUTICALS, INC. is a corporation/company legally constituted and in existence in accordance with the laws of the State of Delaware, United States of America.

1.3. That the domicile of said corporation/company is 800 Gateway Boulevard, South San Francisco, California 94080, United States of America.

1.4. That the purpose or purposes for which the present Power of Attorney is granted are comprised within the corporation purposes set forth in the charter of the mentioned corporation/company.

2. For issuing this certification that I have seen the following documents:

2.1. The Articles of Incorporation of ELAN PHARMACEUTICALS, INC., dated March 19, 2004

2.2. The Resolution of the Board of Directors and/or the By-Laws of ELAN PHARMACEUTICALS, INC., dated

Signed this 6th of SEPTEMBER Of the year 2005

Richard F. Collier
(name)
(Title)

14 JUN 2006

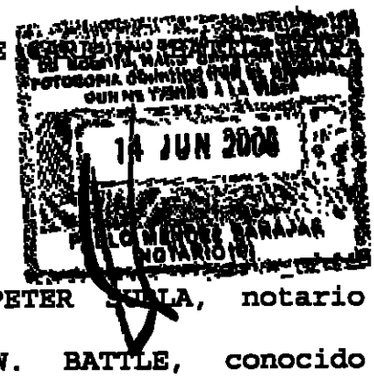
Richard Collier
Executive Vice President, General Counsel & Secretary
Elan Pharmaceuticals, Inc.

COMMONWEALTH OF PENNSYLVANIA
Notarial Seal
Lorraine F. Strunk, Notary Public
Upper Marion Twp., Montgomery County
My Commission Expires Apr. 4, 2009
Member, Pennsylvania Association of Notaries

Lorraine F. Strunk 9-6-05

TRADUCCIÓN OFICIAL 243/2005 DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLÉS Y EN ESPAÑOL, REALIZADA POR EDUARDO CALADO NOGUERA, TRADUCTOR OFICIAL APROBADO POR RESOLUCIÓN 541 DEL 27 DE FEBRERO DE 1976 POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEBIDAMENTE REGISTRADO ANTE EL MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES DE LA REPÚBLICA DE COLOMBIA Y MEDIANTE EL CUAL **ELAN PHARMACEUTICALS, INC.**, EMPRESA DOMICILIADA EN 800 GATEWAY BOULEVARD, SOUTH SAN FRANCISCO, CALIFORNIA 94080, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA, OTORGA PODER A EMILIO FERRERO, TPA 31929, GONZALO PERDOMO, TPA 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ TPA 23555 Y A GERMÁN CAVELIER, TPA 832. EXPEDIDO Y FIRMADO HOY 2 DE SEPTIEMBRE DE 2005 EN SOUTH SAN FRANCISCO CA 94080, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA. FIRMADO: CARL W. BATTLE, VICEPRESIDENTE PRINCIPAL, JEFE DE ASUNTOS JURÍDICOS DE PROPIEDAD INTELECTUAL.

CERTIFICADO NOTARIAL EN INGLES Y EN ESPAÑOL POR EL CUAL SE CERTIFICA LA COMPARECENCIA DE CARL W. BATTLE, VICEPRESIDENTE PRINCIPAL, JEFE DE ASUNTOS JURÍDICOS DE PROPIEDAD INTELECTUAL PARA FIRMAR EL PODER ARRIBA CITADO A NOMBRE DE ELAN PHARMACEUTICALS INC. Y PARA CERTIFICAR LA EXISTENCIA LEGAL, EL DOMICILIO DE DICHA EMPRESA Y LA CAPACIDAD DE COMPROMETER A DICHA FIRMA.



RECONOCIMIENTO MULTIPROPÓSITO DE CALIFORNIA

ESTADO DE CALIFORNIA, CONDADO DE SAN MATEO

El 2 de septiembre de 2005, ante mi, PETER SURLA, notario público, compareció personalmente CARL W. BATTLE, conocido personalmente por mi como la persona cuyo nombre está escrito en el documento adjunto y reconoció ante mi que ella firmó el mismo en su calidad autorizada y que mediante su firma en el documento la persona o entidad a cuyo nombre actuaba, firmó el documento.

Atestiguo mediante mi firma y sello oficial

Peter Surla

Sello: PETER SURLA, Cargo 1538923, notario público, California. Condado de San Mateo. Mi cargo vence el 26 de diciembre de 2008.

Descripción del documento adjunto: Poder y representación.

Calidad reclamada por el firmante

Nombre del firmante: Carl W. Battle, vice-presidente principal, Jefe de asuntos jurídicos de propiedad intelectual

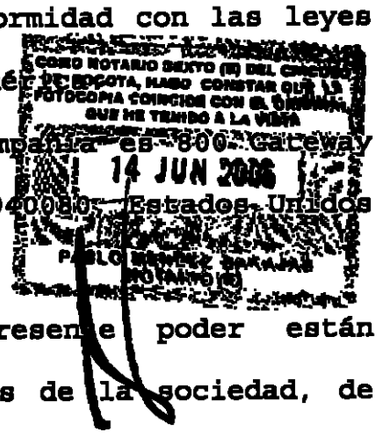
El firmante representa a ELAN PHARMACEUTICALS, INC.

CERTIFICACIÓN DE AUTORIZACIÓN

1. Yo, Richard Collier, vicepresidente ejecutivo, abogado general y secretario de ELAN PHARMACEUTICALS INC., por la presente certifico que:

1.1. Carl W. Battle es el vicepresidente principal, abogado principal de propiedad intelectual, de ELAN PHARMACEUTICALS INC, y que se encuentra autorizado por ELAN PHARMACEUTICALS, INC para firmar este poder a su nombre.

1.2. Que ELAN PHARMACEUTICALS INC, es una sociedad/compañía legalmente constituida y existente de conformidad con las leyes del estado de Delaware, Estados Unidos de Amé



1.3. Que el domicilio de dicha sociedad/compañía es 800 Gateway Boulevard, South San Francisco, California 94080, Estados Unidos de América.

1.4. Que el objeto u objetos del presente poder están comprendidos dentro de los objetos sociales de la sociedad, de acuerdo con lo que se expone en el documento de constitución de dicha sociedad/entidad.

2. Con el fin de emitir esta certificación he visto los siguientes documentos:

2.1. El documento de constitución de ELAN PHARMACEUTICALS INC, de fecha 19 de marzo de 2004.

2.2. La Resolución de la Junta directiva y o los estatutos de ELAN PHARMACEUTICALS, INC de fecha (dato en blanco)

Firmado hoy 6 de septiembre de 2005.

Firmado: Richard Collier

Vicepresidente ejecutivo, abogado y secretario de Elan Pharmaceuticals Inc.

SELLO: ESTADO DE PENSILVANIA

SELLO NOTARIAL, Lorraine F. Strunk, notario público

Upper Merion Twp. Condado de Montgomery

Mi cargo vence el 4 de abril de 2009

Miembro de la asociación de notarios de Pensilvania.

FIRMADO: LORRAINE F. STRUNK, 9-6-05

ESTADO DE CALIFORNIA

APOSTILLA:

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. Estados Unidos de América

Este documento público

2. ha sido firmado por PETER SURLA

3. quien actúa en su calidad de NOTARIO PÚBLICO, ESTADO DE CALIFORNIA

4. lleva el sello de PETER SURLA NOTARIO PÚBLICO, ESTADO DE CALIFORNIA

CERTIFICADO

5. en SACRAMENTO, CALIFORNIA

6. el 3 de octubre de 2005

7. por el Secretario de estado suplente, estado de California

8. Número 257972

9. Sello:

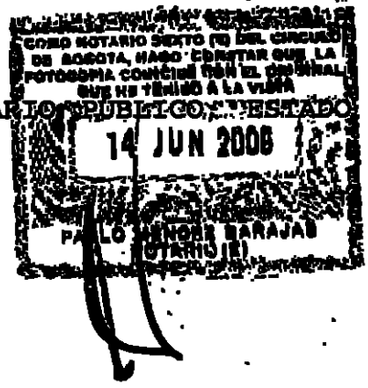
GRAN SELLO DEL ESTADO DE CALIFORNIA

10. Firma: (ILEGIBLE) secretario de estado de Ohio.

APOSTILLA:

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. Estados Unidos de América



Eduardo Calado Nogueira
TRADUCTOR OFICIAL
INGLÉS - ESPAÑOL
Res. 541 Febrero de 1996

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 OCT 20 P 1:51

Eduardo Galvis

COYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.





Este documento público

2. ha sido firmado por LORRAINE F STRUNK

3. quien actúa en su calidad de NOTARIO PÚBLICO

4. lleva el sello de LORRAINE F STRUNK NOTARIO PÚBLICO, CONDADO DE MONTGOMERY, ESTADO DE PENSILVANIA

CERTIFICADO

5. en Harrisburg, Pensilvania

6. El 3 de octubre de 2005

7. por Pedro A. Cortés, secretario de estado de Pensilvania

8. Número 200536342

9. Sello: SECRETARIO DEL ESTADO DE PENSILVANIA

10. Firma: PEDRO A. CORTÉS.

COLO-13562-841-001-5

WPCL002G ID 7193

Bogotá, 20 de octubre de 2005.

Eduardo Calado M.
Eduardo Calado Nogueira
"TRADUCTOR OFICIAL"
[illegible]
Res. 841. Febrero de 1996

DUMA NOTARIO SIETO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA CORRESPONDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
14 JUN 2006
PABLO [illegible] BARAJAS
NOTARIO(A)

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

171118

Eduardo Galeano

CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 OCT 20 P 1:51

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

14 JUN 2006

PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE MAS(I) FIRMA(S) DE

Eduardo Galeano

COINCIDE(N) CON LA FIRMA REGISTRADA POR EL(LOS) EN ESTA NOTARIA

SANTAFE DE BOGOTA,

20 OCT 2005

NOTARIA SEXTA
PABLO MENDEZ BARAJAS

16

1/2

13665
8070

APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA

2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
MARILYN L MITCHELL

3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY

4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
MARILYN L MITCHELL, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY

6. THE 26TH DAY OF JUNE 2003

7. BY: John E McCormac, CPA, NEW JERSEY TREASURER

8. NO. A175618

9. SEAL/STAMP:

10. SIGNATURE

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA

12 JUN 2006

JUAN MANUEL BO[illegible]RO LEDINA
NOTARIO

CAVELIER
ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a Nº 72-35
BOGOTA 8 - COLOMBIA

181

Representación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation and Power-of-Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado (a)/I (we), the undersigned

Wyeth

domiciliado (s) en/of Five Giralda Farms

Madison, NJ 07940, United States of America

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tps. 31929; GONZALO PERDOMO, tps. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tps. 23555 y GERMAN CAVELIER, tps. 832, domiciliados en la Carrera 4a Nº 72-35, Bogotá, Colombia, en obedecimiento a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración rendida por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso- administrativo y judicial, así como los Tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso administrativos relacionados con

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tps. 31929; GONZALO PERDOMO, tps. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tps. 23555 and GERMAN CAVELIER, tps. 832, domiciled at Carrera 4a Nº 72 35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact of its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time. In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above named attorneys at law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits

© CAVELIER ABOGADOS
WPPODE01-181 (MINUTA Nº12.1.1.2.6 USA)

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA CONCUERDA CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
12 JUN 2006
JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO

estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan otorgar este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, renunciar, recibir, reasumir, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Wyeth

Dado y firmado hoy/Given and signed this 16th JUNE 2003

en/in Madison, New Jersey 07940; USA

por/by William H. Calnan

Assistant Secretary

Firma _____ Signature

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA

12 JUN 2006

JUAN MANUEL GO[illegible] EDINA

NOTARIO

CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUO)

s _____ días del mes de _____
200___ ante mí, Notario Público o Funcionario Autorizado
_____
parecié(eron) personalmente _____
_____
nica(os) day fe de conocer y me consta que es(son) la(s)
sona(s) firmante(s) del documento que precede, y quien(es)
e(n) capacidad legal para otorgarlo

_____ Notario Público o Funcionario Autorizado

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

a 16 de Junio de 200 3
mparació(eron) ante mí
William H. Calnan
lo(s) conozco personalmente y que firma(n) este
cumento en representación de la Sociedad/compañía
ominada Wyeth

rifico:

Que he visto los siguientes documentos: Certificado de Constitución replanteado
Restated Certificate of Incorporation filed April 22, 1988 with Secretary of State of Delaware
Que dichos documentos prueban lo siguiente:

1. Que Wyeth
una Sociedad/Compañía legalmente constituida y existente
acuerdo con las leyes de Delaware

2. Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es:
Five Giralda Farms, Madison, New Jersey 07940, United States of America

3. Que el objeto u objetos para los cuales se otorga el presente
oder están comprendidos dentro del objeto social de la
encionada Sociedad/Compañía.

4. Que el(los) Sr.(Sres.) William H. Calnan
(n) autorizado(s) para otorgar el presente Poder.
udad Morristown
tado New Jersey
ay 16 de Junio de 200 3

_____ Notario Público o Funcionario Autorizado

Los documentos deben identificarse con fecha y origen

CAVELIER ABOGADOS
PPODE01-181 (MINUTA N°12.1.1.3.6 USA)

NOTARIAL CERTIFICATE (INDIVIDUAL)

On this _____ day of _____
200___ before me, a Notary Public or Attesting Official of
_____
personally appeared _____
_____
to me known, and known to me to be the person(s) who executed that foregoing document, and who has(have) legal capacity to execute it.

_____ Notary Public or Attesting Oficial

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 16th day of June 2003
appeared before me
William H. Calnan
who(m) I know personally and who(m) signed this document as representative(s) of the Corporation/Company named
WYETH

I certify:

1. That I have seen the following documents:
Restated Certificate of Incorporation filed April 22, 1988 with Secretary of State of Delaware
2. That the above documents duly prove the following:

2.1. That Wyeth
is a Corporation/Company legally constituted and in existence in accordance with the laws Delaware

2.2. That the domicile of said Corporation/Company is
Five Giralda Farms, Madison, New Jersey 07940; United States of America

2.3. That the purpose or purposes for which the present Power of Attorney is granted are comprised within the corporation purposes set forth in the charter of the mentioned Corporation/Company.

2.4. That Mr.(Messrs.) William H. Calnan
is(are) authorized to grant the present Power of Attorney.

City Morristown
State New Jersey
This 16th day of June 200 3

Marilyn L. Mitchell
_____ Notary Public or Attesting Oficial

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE BOGOTÁ, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA QUE ME PRESENTARON COINCIDE CON EL DOCUMENTO QUE HE TENIDO A LA VISTA
12 JUN 2006
JUAN MANUEL ROTERO LEDINA
NOTARIO

MARILYN L. MITCHELL
NOTARY PUBLIC, STATE OF NEW JERSEY
My Commission Expires February 6, 2006

TRADUCCIÓN OFICIAL 101/2003 DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLÉS Y EN ESPAÑOL, REALIZADA POR EDUARDO CALADO NOGUERA, TRADUCTOR OFICIAL APROBADO POR RESOLUCIÓN 541 DEL 27 DE FEBRERO DE 1976 POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEBIDAMENTE REGISTRADO ANTE EL MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES DE LA REPÚBLICA DE COLOMBIA Y MEDIANTE EL CUAL **WYETH**, EMPRESA DOMICILIADA EN FIVE GIRALDA FARMS, MADISON, NJ 07940 ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA OTORGA PODER A EMILIO FERRERO, TPA 31929, GONZALO PERDOMO, TPA 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ TPA 23555 Y A GERMÁN CAVELIER, TPA 832. EXPEDIDO Y FIRMADO EL 16 DE JUNIO DE 2003 EN MADISON, NEW JERSEY 07940, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA. FIRMADO: WILLIAM H. CALNAN, SUBSECRETARIO.

CERTIFICADO NOTARIAL EN INGLES Y EN ESPAÑOL DE FECHA 16 DE JUNIO DE 2003 POR EL CUAL SE CERTIFICA LA COMPARECENCIA DE WILLIAM H. CALNAN PARA FIRMAR EL PODER ARRIBA CITADO A NOMBRE DE WYETH Y PARA CERTIFICAR LA EXISTENCIA LEGAL, EL DOMICILIO DE DICHA EMPRESA Y LA CAPACIDAD DE WILLIAM H. CALNAN PARA COMPROMETER A DICHA FIRMA. FIRMADO: MARILYN L. MITCHELL. SELLO: MARILYN L. MITCHELL, NOTARIO PÚBLICO, ESTADO DE NUEVA JERSEY, MI CARGO VENCE EL 6 DE FEBRERO DE 2005.

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
12 JUN 2006
JUAN GARCIA CISNEROS MEDINA
NOTARIO

APOSTILLA:

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. Estados Unidos de América

Este documento público

2. ha sido firmado por MARILYN L. MITCHELL

3. quien actúa en su calidad de NOTARIO PÚBLICO DE NUEVA JERSEY

4. lleva el sello de MARILYN L. MITCHELL, NOTARIO CERTIFICADO

5. en TRENTON, NUEVA JERSEY

6. el 26 DE JUNIO DE 2003

7. por JOHN E. MCCORMAC, CONTADOR PÚBLICO AUTORIZADO, TESORERO DE NUEVA JERSEY

8. Número A175618

9. Sello:

El sello del estado de Nueva Jersey

10. Firma: (ilegible)

COLO-13798-841-001-5

WPCL002G. ID. 4628

Bogotá, 12 de julio de 2003.

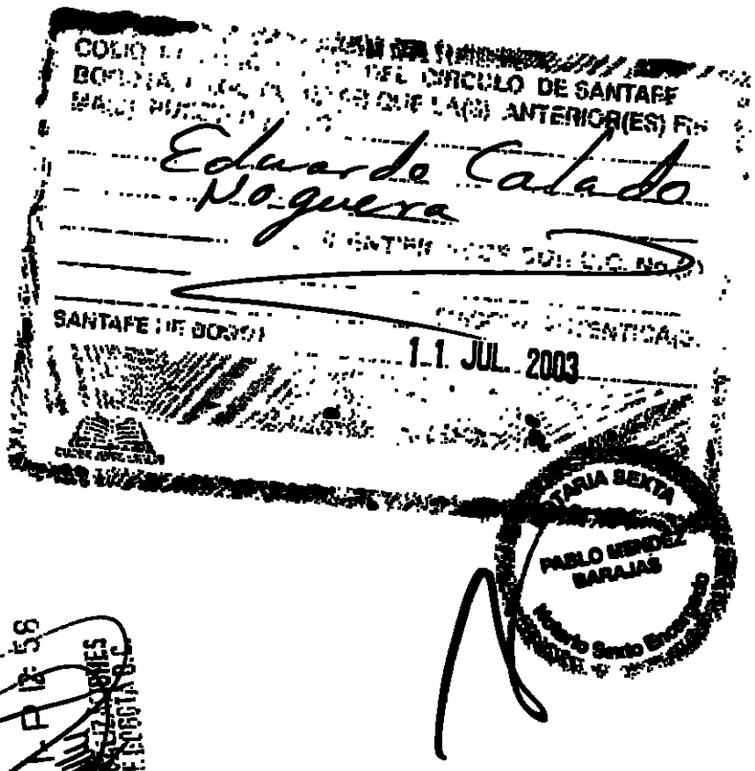
Eduardo Calad[illegible]

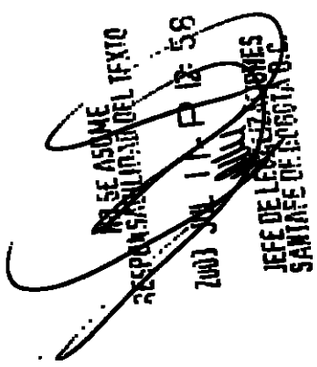
Eduardo Calad[illegible] Negrete
TRADUCTOR OFICIAL
[illegible]
Res. 54[illegible] Febrero de [illegible]

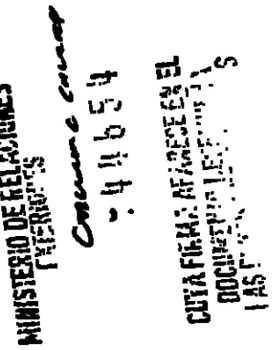
COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA

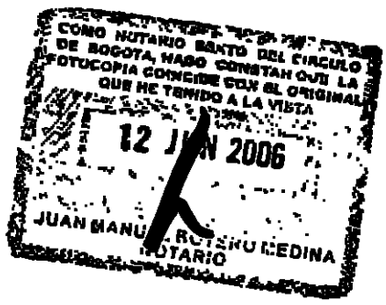
12 JUN 2006

JUAN MANUEL BOTE[illegible] LEDINA
NOTARIO


DEL CIRCULO DE SANTAFE
ANTERIOR(ES) FI
Eduardo Calado
Noguera
SANTAFE DE BOGOTA
11 JUL 2003
NOTARIA SEXTA
PABLO MENDEZ
BARAJAS
Notario Santa Fe de Bogotá


SE ASUME
JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.


MINISTERIO DE RELACIONES


COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA
12 JUN 2006
JUAN MANUEL
NOTARIO

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization International Bureau

(43) International Publication Date
30 June 2005 (30.06.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/058941 A2

(51) International Patent Classification⁷: C07K

(21) International Application Number:
PCT/US2004/044093

(22) International Filing Date:
17 December 2004 (17.12.2004)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/530,481 17 December 2003 (17.12.2003) US

(71) Applicants *(for all designated States except US)*: ELAN PHARMACEUTICALS, INC. [US/US]; 800 Gateway Boulevard, South San Francisco, CA 94080 (US). WYETH [US/US]; Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: ARUMUGHAM, Ramppa, G. [US/US]; 102 Barton Lane, Chapel Hill, NC 27516 (US). PRASAD, A., Krishna [IN/US]; 105 Wenham Drive, Chapel Hill, NC 27516 (US).

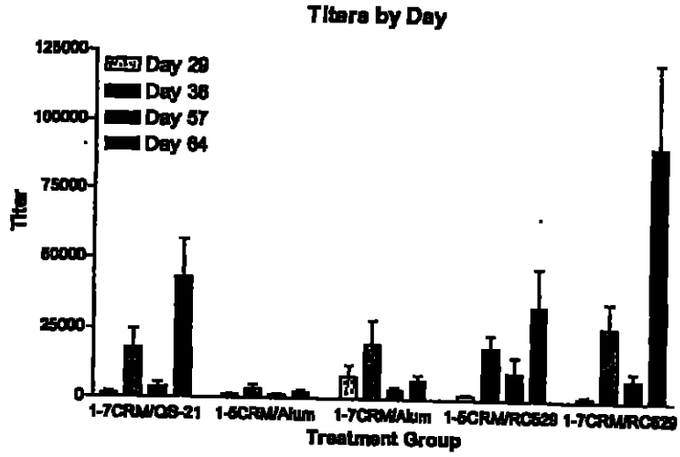
(74) Agents: CELLI, Rosemarie, L. et al.; Townsend and Townsend and Crew LLP, Two Embarcadero Center, 8th Floor, San Francisco, CA 94111-3834 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: Aβ IMMUNOGENIC PEPTIDE CARRIER-CONJUGATES AND METHODS OF PRODUCING SAME



(57) Abstract: The present invention is directed to methods of producing conjugates of Aβ peptide immunogens with protein/polypeptide carrier molecules, which are useful as immunogens, wherein peptide immunogens are conjugated to protein carriers via activated functional groups on amino acid residues of the carrier or of the optionally attached linker molecule, and wherein any unconjugated reactive functional groups on amino acid residues are inactivated via capping, thus retaining the immunological functionality of the carrier molecule, but reducing the propensity for undesirable reactions that could render the conjugate less safe or effective. Furthermore, the invention also relates to such immunogenic products and immunogenic compositions containing such immunogenic products made by such methods.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

WO 2005/058941 A2

Published:

— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Aβ IMMUNOGENIC PEPTIDE CARRIER CONJUGATES AND METHODS OF PRODUCING SAME

CROSS-REFERENCES TO RELATED APPLICATIONS

[0001] This application claims the benefit under 35 U.S.C. § 119(e) of U.S. Provisional Patent Application Serial No. 60/530,481, filed December 17, 2003, which is incorporated herein by reference in its entirety for all purposes

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0002] The essence of adaptive immunity is the ability of an organism to react to the presence of foreign substances and produce components (antibodies and cells) capable of specifically interacting with and protecting the host from their invasion. An "*antigen*" or "*immunogen*" is a substance that is able to elicit this type of immune response and also is capable of interacting with the sensitized cells and antibodies that are manufactured against it.

[0003] Antigens or immunogens are usually macromolecules that contain distinct antigenic sites or "*epitopes*" that are recognized and interact with the various components of the immune system. They can exist as individual molecules composed of synthetic organic chemicals, proteins, lipoproteins, glycoproteins, RNA, DNA, or polysaccharides, or they may be parts of cellular structures (bacteria or fungi) or viruses (Harlow and Lane 1988a,b, c; Male *et al.*, 1987).

[0004] Small molecules like short peptides, although normally able to interact with the products of an immune response, often cannot cause a response on their own. These peptide immunogens or "*haptens*" as they are also called, are actually incomplete antigens, and, although not able by themselves to cause immunogenicity or to elicit antibody production, can be made immunogenic by coupling them to a suitable carrier. Carriers typically are protein antigens of higher molecular weight that are able to cause an immunological response when administered *in vivo*.

[0005] In an immune response, antibodies are produced and secreted by the B-lymphocytes in conjunction with the T-helper (T_H) cells. In the majority of hapten-carrier systems, the B cells produce antibodies that are specific for both the hapten and the carrier. In these cases, the T lymphocytes will have specific binding domains on the carrier, but will not recognize the hapten alone. In a kind of synergism, the B and T cells cooperate to induce a hapten-

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

specific antibody response. After such an immune response has taken place, if the host is subsequently challenged with only the hapten, usually it will respond by producing hapten-specific antibodies from memory cells formed after the initial immunization.

[0006] Synthetic haptens mimicking some critical epitopic structures on larger macromolecules are often conjugated to carriers to create an immune response to the larger "parent" molecule. For instance, short peptide segments can be synthesized from the known sequence of a protein and coupled to a carrier to induce immunogenicity toward the native protein. This type of synthetic approach to the immunogen production has become the basis of much of the current research into the creation of vaccines. However, in many instances, merely creating a B-cell response by using synthetic peptide-carrier conjugates, however well designed, will not always guarantee complete protective immunity toward an intact antigen. The immune response generated by a short peptide epitope from a larger viral particle or bacterial cell may only be sufficient to generate memory at the B cell level. In these cases it is generally now accepted that a cytotoxic T-cell response is a more important indicator of protective immunity. Designing peptide immunogens with the proper epitopic binding sites for both B-cell and T-cell recognition is one of the most challenging research areas in immunology today.

[0007] The approach to increasing immunogenicity of small or poorly immunogenic molecules by conjugating these molecules to large "carrier" molecules has been utilized successfully for decades (see, *e.g.*, Goebel *et al.* (1939) *J. Exp. Med.* 69: 53). For example, many immunogenic compositions have been described in which purified capsular polymers have been conjugated to carrier proteins to create more effective immunogenic compositions by exploiting this "carrier effect." Schneerson *et al.* (1984) *Infect. Immun.* 45: 582-591). Conjugation has also been shown to bypass the poor antibody response usually observed in infants when immunized with a free polysaccharide (Anderson *et al.* (1985) *J. Pediatr.* 107: 346; Insel *et al.* (1986) *J. Exp. Med.* 158: 294).

[0008] Hapten-carrier conjugates have been successfully generated using various cross-linking/coupling reagents such as homobifunctional, heterobifunctional, or zero-length cross linkers. Many such methods are currently available for coupling of saccharides, proteins, and peptides to peptide carriers. Most methods create amine, amide, urethane, isothiourea, or disulfide bonds, or in some cases thioethers. A disadvantage to the use of coupling reagents, which introduce reactive sites in to the side chains of reactive amino acid molecules on carrier and/or hapten molecules, is that the reactive sites if not neutralized are free to react

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

with any unwanted molecule either *in vitro* (thus adversely affecting the functionality or stability of the conjugate(s)) or *in vivo* (thus posing a potential risk of adverse events in persons or animals immunized with the preparations). Such excess reactive sites can be reacted or "capped", so as to inactivate these sites, utilizing various known chemical reactions, but these reactions may be otherwise disruptive to the functionality of the conjugates. This may be particularly problematic when attempting to create a conjugate by introducing the reactive sites into the carrier molecule, as its larger size and more complex structure (relative to the hapten) may render it more vulnerable to the disruptive effects of chemical treatment. In fact, no examples are known of methods whereby a conjugate is made by first activating the carrier, then reacting with the hapten in a conjugation reaction, and finally "capping" the remaining reactive sites, while preserving the ability of the resulting conjugate to function as an immunogenic composition having the desired properties of the "carrier effect".

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

[0009] The present invention is directed to methods of producing an immunogenic conjugate of a peptide immunogen comprising Aβ peptide or fragments of Aβ or analogs thereof with a protein/polypeptide carrier, wherein the Aβ peptide or fragments of Aβ or analogs thereof is conjugated to the carrier via derivatized functional groups of amino acid residues of the carrier such as lysine residues, and wherein any unconjugated, derivatized functional groups of the amino acid residues are inactivated via capping to block them from reacting with other molecules, including proteins/polypeptides thereby preserving the functionality of the carrier, such that it retains its ability to elicit the desired immune responses against the peptide immunogen that would otherwise not occur without a carrier. Furthermore, the invention also relates to conjugates produced by the above methods, and to immunogenic compositions containing such conjugates.

[0010] In one embodiment, the invention is directed to a first method for conjugating a peptide immunogen comprising Aβ peptide or fragments of Aβ or analogs thereof via a reactive group of an amino acid residue of the peptide immunogen to a protein/polypeptide carrier having one or more functional groups, the method comprising the steps of: (a) derivatizing one or more of the functional groups of the protein/polypeptide carrier to generate a derivatized molecule with reactive sites; (b) reacting the derivatized protein/polypeptide carrier of step (a) with a reactive group of an amino acid residue of the

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

peptide immunogen under reaction conditions such that the peptide immunogen is conjugated to the derivatized protein/polypeptide carrier via the functional groups; and (c) further reacting the conjugate with a capping reagent to inactivate free, reactive functional groups on the activated protein/polypeptide carrier, thereby preserving the functionality of the carrier such that itretains its abilityto elicit the desired immune responses against the peptide immunogen that would otherwise not occur without a carrier.

[0011] In one embodiment, the protein/polypeptide carrier is selected from the group consisting of human serum albumin, keyhole limpet hemocyanin, immunoglobulin molecules, thyroglobulin, ovalbumin, influenza hemagglutinin, PAN-DR binding peptide (PADRE polypeptide), malaria circumsporozite (CS) protein, hepatitis B surface antigen (HB_sAg_{19-28}), Heat Shock Protein (HSP) 65, Bacillus Calmette-Guerin (BCG), cholera toxin, cholera toxin mutants with reduced toxicity, diphtheria toxin, CRM_{197} protein that is cross-reactive with diphtheria toxin, recombinant Streptococcal C5a peptidase, *Streptococcus pyogenes* ORF122A, *Streptococcus pyogenes* ORF1664, *Streptococcus pyogenes* ORF 2452, *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin, pneumolysin mutants with reduced toxicity, *Chlamydia pneumoniae* ORF T367, *Chlamydia pneumoniae* ORF T858, Tetanus toxoid, HIV gp120 T1, microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMMS), growth factor / hormone, cytokines and chemokines.

[0012] In another embodiment, the protein/polypeptide carrier contains a T-cell epitope.

[0013] In yet another embodiment, the protein/polypeptide carrier is a bacterial toxoid such as a tetanus toxoid, cholera toxin or cholera toxin mutant as described above. In a preferred embodiment, the protein/polypeptide carrier is CRM_{197}.

[0014] In still yet another embodiment, the protein/polypeptide carrier may be an influenza hemagglutinin, a PADRE polypeptide, a malaria CS protein, a Hepatitis B surface antigen ($HSBAg_{19-28}$), a heat shock protein 65 (HSP 65), or a polypeptide from *Mycobacterium tuberculosis* (BCG).

[0015] In a preferred embodiment, the protein/polypeptide carrier is selected from Streptococcal rC5a peptidase, *Streptococcus pyogenes* ORF122A, *Streptococcus pyogenes* ORF1664 or *Streptococcus pyogenes* ORF2452, *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin, pneumolysin mutants with reduced toxicity, *Chlamydia pneumoniae* ORF T367, and *Chlamydia pneumoniae* ORF T858.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

[0016] In one embodiment, protein/polypeptide carrier is a growth factor or hormone, which stimulates or enhances immune response and is selected from the group consisting of IL-1, IL-2, γ-interferon, IL-10, GM-CSF, MIP-1α, MIP-1β, and RANTES.

[0017] In one aspect, the invention provides a peptide immunogen comprising Aβ peptide or fragments of Aβ or analogs thereof eliciting an immunogenic response against certain epitopes within Aβ. Immunogenic peptides of the invention include immunogenic heterologous peptides. In some immunogenic peptides, an Aβ fragment is linked to a carrier to form an immunogenic heterologous peptide, and then this heterologous peptide is linked to a carrier using a method of the present invention to form a conjugate.

[0018] In another aspect of the invention, the peptide immunogen is a polypeptide comprising an N-terminal segment of at least residues 1-5 of Aβ, the first residue of Aβ being the N-terminal residue of the polypeptide, wherein the polypeptide is free of a C-terminal segment of Aβ. In yet another aspect of the invention, the peptide immunogen is a polypeptide comprising an N-terminal segment of Aβ, the segment beginning at residue 1-3 of Aβ and ending at residues 7-11 of Aβ. In some aspects of the invention, the peptide immunogen is an agent that induces an immunogenic response against an N-terminal segment of Aβ, the segment beginning at residue 1-3 of Aβ and ending at residues 7-11 of Aβ without inducing an immunogenic response against an epitope within residues 12-43 of Aβ43. In another aspect of the invention, the peptide immunogen is a heterologous polypeptide comprising a segment of Aβ linked to a heterologous amino acid sequence that induces a helper T-cell response against the heterologous amino acid sequence and thereby a B-cell response against the N-terminal segment.

[0019] In some peptide immunogens, the N-terminal segment of Aβ is linked at its C-terminus to a heterologous polypeptide. In some peptide immunogens, the N-terminal segment of Aβ is linked at its N-terminus to a heterologous polypeptide. In some peptide immunogens, the N-terminal segment of Aβ is linked at its N and C termini to first and second heterologous polypeptides. In some peptide immunogens, the N-terminal segment of Aβ is linked at its N terminus to a heterologous polypeptide, and at its C-terminus to at least one additional copy of the N-terminal segment. In some peptide immunogens, the polypeptide comprises from N-terminus to C-terminus, the N-terminal segment of Aβ, a plurality of additional copies of the N-terminal segment, and the heterologous amino acid segment.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

[0020] In some of the above peptide immunogens, the polypeptide further comprises at least one additional copy of the N-terminal segment. In some of the above peptide immunogens, the fragment is free of at least the 5 C-terminal amino acids in Aβ43.

[0021] In some aspects of the above peptide immunogens, the fragment comprises up to 10 contiguous amino acids from Aβ.

[0022] In another aspect, the invention provides a peptide immunogen comprising Aβ peptide or fragments of Aβ or analogs thereof eliciting an immunogenic response against certain epitopes within Aβ may be in a configuration referred to as a multiple antigenic peptide (MAP) configuration.

[0023] In some of the above aspects of the invention, the peptide immunogen from the N-terminal half of Aβ. In some aspects of the invention, the peptide immunogen is an Aβ fragment selected from the group consisting of Aβ1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-11, 1-12, 1-16, 3-6, and 3-7. In some of the above aspects of the invention, the peptide immunogen is from the internal region of Aβ. In some aspects of the invention, the peptide immunogen is an Aβ fragment selected from the group consisting of Aβ13-28, 15-24, 17-28, and 25-35. In some of the above aspects of the invention, the peptide immunogen from the C-terminal end of Aβ. In some aspects of the invention, the peptide immunogen is an Aβ fragment selected from the group consisting of Aβ33-42, 35-40, and 35-42. In some aspects of the invention, the peptide immunogen is an Aβ fragment selected from the group consisting of Aβ1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-11, 1-12, 1-16, 1-28, 3-6, 3-7, 13-28, 15-24, 17-28, 25-35, 33-42, 35-40, and 35-42. In some aspects of the invention, the peptide immunogen is an Aβ fragment selected from the group consisting of Aβ1-5, Aβ1-7, Aβ1-9, and Aβ1-12. In some aspects of the invention, the peptide immunogen is an Aβ fragment selected from the group consisting of Aβ1-5-L, Aβ1-7-L, Aβ1-9-L, and Aβ1-12-L, where L is a linker. In some aspects of the invention, the peptide immunogen is an Aβ fragment selected from the group consisting of Aβ1-5-L-C, Aβ1-7-L-C, Aβ1-9-L-C, and Aβ1-12-L-C, where C is a cysteine amino acid residue.

[0024] In some aspects of the invention, the peptide immunogen is an Aβ fragment selected from the group consisting of Aβ16-22, Aβ16-23, Aβ17-23, Aβ17-24, Aβ18-24, and Aβ18-25. In some aspects of the invention, the peptide immunogen is an Aβ fragment selected from the group consisting of Aβ16-22-C, Aβ16-23-C, Aβ17-23-C, Aβ17-24-C, Aβ18-24-C, and Aβ18-25-C, where C is a cysteine amino acid residue. In other aspects of the invention, the peptide

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

immunogen is an Aβ fragment selected from the group consisting of C-Aβ16-22, C-Aβ16-23, C-Aβ17-23, C-Aβ17-24, C-Aβ18-24, and C-Aβ18-25, where C is a cysteine amino acid residue.

[0025] In some of the above peptide immunogens, the heterologous polypeptide is selected from the group consisting of peptides having a T-cell epitope, a B-cell epitope and combinations thereof.

[0026] In one embodiment, the functional group of one or more amino acid molecules of the protein/polypeptide carrier or of the optionally attached polypeptide linker is derivatized using a cross-linking reagent. In another embodiment, the derivatizing reagent is a zero-length cross-linking reagent. In another embodiment, the derivatizing reagent is a homobifunctional cross-linking reagent. In yet another embodiment, the derivatizing reagent is a heterobifunctional cross-linking reagent.

[0027] In a preferred embodiment, the heterobifunctional reagent is a reagent that reacts with a primary or a ϵ-amine functional group of one or more amino acid molecules of the protein/polypeptide carrier and a pendant thiol group of one or more amino acid molecules of the peptide immunogen. In one embodiment, the heterobifunctional reagent is N-succinimidyl bromoacetate.

[0028] In another embodiment, the primary or ϵ-amine functional group is lysine. In yet another embodiment, the derivatization of the primary or ϵ-amine functional group of the lysine of the protein/polypeptide carrier with N-succinimidyl bromoacetate results in the bromoacetylation of the primary or ϵ-amine residues on lysine molecules on the protein/polypeptide carrier. In a more preferred embodiment, the pendant thiol group is a cysteine residue of the peptide immunogen, which may be localized at the amino-terminus of the peptide immunogen, at the carboxy-terminus of the peptide immunogen or internally in the peptide immunogen.

[0029] In another embodiment, the pendant thiol group is generated by a thiolating reagent such as N-acetyl homocysteinethio lactone, Traut's reagent (2-iminothilane) SATA (N-Succinimidyl S-acetylthioacetate), SMPT (4-Succinimidyloxycarbonyl-methyl2-pyridyldithio toluene), Sulfo LC SPDP (Sulfo Succinimidyl pyridyl dithio propionamido hexanoate), SPDP (Succinimidyl pyridyl dithio propionate). In a preferred embodiment, the capping reagent that is used to inactivate free reactive, functional groups on the activated protein/polypeptide

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

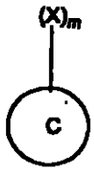
carrier is selected from the reagent group consisting of cysteamine, *N*-acetylcysteamine, and ethanolamine.

[0030] In a particularly preferred embodiment, the capping reagent that is used to inactivate free reactive functional groups on the activated protein/polypeptide carrier is selected from the reagent group consisting of sodium hydroxide, sodium carbonate, ammonium bicarbonate and ammonia.

[0031] In one embodiment, the reactive group of the amino acid residue of the peptide immunogen is a free sulfhydryl group.

[0032] In another embodiment, one or more of the functional groups are on a linker, which is optionally attached to the protein/polypeptide carrier. In a preferred embodiment, the linker is a peptide linker. In a more preferred embodiment, the peptide linker is polylysine.

[0033] In another embodiment, the invention is directed to a second method for conjugating a peptide immunogen comprising Aβ peptide or fragments of Aβ or analogs thereof Aβ or analogs thereof with a protein/polypeptide carrier having the structure:

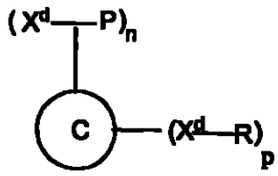


wherein,

[0034] C is a protein/polypeptide carrier and X is a derivatizable functional group of an amino acid residue on the protein/polypeptide carrier or optionally of an amino acid residue of a peptide linker covalently attached to the protein/polypeptide carrier, and wherein m is an integer greater than 0, but less than or equal to 85, the method comprising the steps of: (a) derivatizing one or more of the functional groups of the protein/polypeptide carrier or of the optionally attached linker molecule to generate a derivatized molecule with reactive sites; (b) reacting the derivatized protein/polypeptide carrier of step (a) with a reactive group of an amino acid residue of the peptide immunogen to form a covalently coupled peptide immunogen-protein/polypeptide carrier conjugate; and (c) further reacting the said conjugate with a capping reagent to inactive the free reactive functional groups on the activated protein/polypeptide carrier, such that the capped groups are not free to react with other molecules, including proteins/polypeptides thereby preserving the functionality of the carrier,

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

such that it retains its ability to elicit the desired immune responses against the peptide immunogen that would otherwise not occur without a carrier so as to generate a capped peptide immunogen-protein/polypeptide carrier conjugate having the formula:



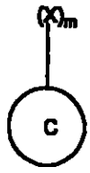
wherein,

[0035] C is the protein/polypeptide carrier and X^d is a derivatized functional group of an amino acid residue of the protein/polypeptide carrier or optionally of an amino acid residue of a peptide linker covalently attached to the protein/polypeptide carrier, and, wherein,

[0036] P is the peptide immunogen molecule covalently attached to the derivatized functional group on the amino acid residue on the protein carrier or optionally on an amino acid residue on a peptide linker covalently attached to a protein/polypeptide carrier, R is a capping molecule covalently attached to the derivatized functional group on an amino acid residue on the protein/polypeptide carrier or optionally on an amino acid residue on a peptide linker covalently attached to a protein/polypeptide carrier, n is an integer greater than 0, but less than or equal to 85, and p is an integer greater than 0, but less than 85.

[0037] The detailed embodiments for the first method described above are also applicable to the conjugates just described prepared by the second method.

[0038] In one embodiment, the invention is directed to peptide immunogen-comprising Aβ peptide or fragments fo Aβ or analogs thereof/polypeptide carrier conjugates wherein the protein/polypeptide carrier has the formula:

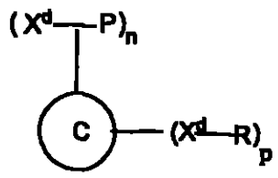


wherein,

[0039] C is a protein/polypeptide carrier and X is a derivatizable functional group of an amino acid residue on the protein/polypeptide carrier or optionally of an amino acid residue of a peptide linker covalently attached to the protein/polypeptide carrier, and, wherein, m is

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

an integer greater than 0, but less than or equal to 85, and wherein the capped peptide immunogen-protein/polypeptide carrier conjugate has the formula:

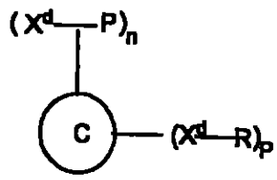


wherein,

[0040] C is the protein/polypeptide carrier and X^d is a derivatized functional group of an amino acid residue of the protein/polypeptide carrier or optionally of an amino acid residue of a peptide linker covalently attached to the protein/polypeptide carrier, and, wherein, P is the peptide immunogen molecule covalently attached to the derivatized functional group of the amino acid residue of the protein carrier or optionally of an amino acid residue of a peptide linker covalently attached to a protein/polypeptide carrier, R is a capping molecule covalently attached to the derivatized functional group of an amino acid residue of the protein/polypeptide carrier or optionally of an amino acid residue of a peptide linker covalently attached to a protein/polypeptide carrier, thereby preserving the functionality of the carrier, such that it retains its ability to elicit the desired immune responses against the peptide immunogen that would otherwise not occur without a carrier., n is an integer greater than 0, but less than or equal to 85, and p is an integer greater than 0, but less than 85.

[0041] The detailed embodiments for the first and second methods described above are also applicable to the conjugates just described.

[0042] In another embodiment, the invention is directed to peptide immunogen- comprising Aβ peptide or fragments of Aβ or analogs thereof/polypeptide carrier conjugates generated according to the second method of the invention and having the formula:



wherein,

[0043] C is the protein/polypeptide carrier and X^d is a derivatized functional group of an amino acid residue of the protein/polypeptide carrier or optionally of an amino acid residue of

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

a peptide linker covalently attached to the protein/polypeptide carrier, and, wherein, P is the peptide immunogen molecule covalently attached to the derivatized functional group of the amino acid residue of the protein carrier or optionally of an amino acid residue of a peptide linker covalently attached to a protein/polypeptide carrier, R is a capping molecule covalently attached to the derivatized functional group of an amino acid residue of the protein/polypeptide carrier or optionally of an amino acid residue of a peptide linker covalently attached to a protein/polypeptide carrier thereby preserving the functionality of the carrier, such that it retains its ability to elicit the desired immune responses against the peptide immunogen that would otherwise not occur without a carrier., n is an integer greater than 0, but less than or equal to 85, and p is an integer greater than 0, but less than 85.

[0044] The detailed embodiments for the second method described above are also applicable to the conjugates generated by the second method, as just described.

[0045] In another embodiment, the invention is directed to immunogenic compositions comprising a conjugate of a peptide immunogen with a protein/polypeptide carrier generated by the second method of the invention, together with one or more pharmaceutically acceptable excipients, diluents, and adjuvants.

[0046] The detailed embodiments for the second method and the conjugates generated thereby described above are also applicable to immunogenic compositions containing those conjugates as just described.

[0047] In another embodiment, the invention is directed to a method for inducing an immune response in a mammalian subject, which comprises administering an effective amount of an immunogenic composition of the present invention to the subject.

[0048] The detailed embodiments applicable to the immunogenic composition containing the conjugates of the present invention are also applicable to the embodiment of the invention directed to the method of use of these immunogenic compositions.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0049] Figure 1: Flow chart depicting the process chemistry used for conjugation of Aβ peptide fragments to protein/polypeptide carrier CRM_{197} to form the Aβ / CRM_{197} conjugate.

[0050] Figure 2: Flow chart depicting acid hydrolysis chemistry used for quantitative determination of S-carboxymethylcysteine and S-carboxymethylcysteamine as evaluation of

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

the degree of conjugation of peptide immunogen-protein/polypeptide conjugates such as the Aβ/CRM_{197} conjugate.

[0051] Figure 3: This figure depicts the pH dependence of the Aβ peptide/CRM conjugation reaction.

[0052] Figure 4: This figure depicts the dependence of Aβ-peptide/CRM conjugation on peptide: CRM ratio.

[0053] Figure 5: Verification of capping process for Aβ1-7/CRM conjugation. The pH of the reaction was 9.15. Reaction time with peptide was 16 hrs, capping with *N*-acetylcysteamine was 8 hrs.

[0054] Figure 6: Conjugation and capping with various peptide: CRM ratios with peptide. The pH of the reaction was 9.0. Reaction time with peptide was 16 hrs, capping with *N*-acetylcysteamine was 8 hrs.

[0055] Figure 7: Day 36 titers of primate sera following immunization of primates with Aβ peptide conjugates with various adjuvants.

[0056] Figure 8: Day 64 titers of primate sera following immunization of primates with Aβ-peptide conjugates with various adjuvants.

[0057] Figure 9: Primate titers by day and treatment group. Primates were immunized with Aβ 1-7 or Aβ 1-5 CRM_{197} conjugates with alum or RC529 as adjuvants and titers of anti-Aβ antibodies were measured at day 29, 36, 57 and 54.

[0058] Figure 10: Peptide-protein conjugates were characterized using SDS-PAGE Western blot analysis with a tris-tricine precast gel. The lanes are: marker (lane 1); L-28375 24/01 (lane 2); L-28375 24/02 (lane 3); L-28375 24/03 (lane 4); L-28375 24/04 (lane 5); L-28375 24/05 (lane 6); L-28375 24/06 (lane 7) L-28375 24/07 (lane 8); L-28375 24/08 (lane 9); L-28375 24/09 (Mock) (lane 10); and, $BrAcCRM_{197}$ (lane 11).

BRIEF DESCRIPTION OF SEQUENCES

SEQ ID NO:	Sequence	Description
1	DAEFR-C	Aβ1-5-C
2	DAEFRHD-C	Aβ 1-7-C
3	DAEFRHDSG-C	Aβ 1-9-C

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

SEQ ID NO:	Sequence	Description
4	DAEFRHDSGYEV-C	Aβ1-12-C
5	DAEFR-GAGA-C	Aβ1-5-L-C
6	DAEFRHD-GAGA-C	Aβ1-7-L-C
7	DAEFRHDSG-GAGA-C	Aβ1-9-L-C
8	DAEFRHDSGYEV-GAGA-C	Aβ1-12-L-C
9	VEYGSDHRFEAD-C	Aβ12-1-C
10	GAGA	Linker peptide
11	PKYVKQNTLKLAT	Influenza Hemagglutinin: $HA_{307-319}$
12	AKXVAAWTLKAAA	PAN-DR Peptide (PADRE peptide)
13	EKKIAKMEKASSVFNV	Malaria CS: T3 epitope
14	FELLTRILTI	Hepatitis B surface antigen: HB_sAg_{19-28}
15	DQSIGDLIAEAMDKVGNEG	Heat Shock Protein 65: $hsp65_{153-171}$
16	QVHFQPLPPAVVKL	Bacillus Calmette-Guerin (BCG)
17	QYIKANSKFIGITEL	Tetanus toxoid: $TT_{830-844}$
18	FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE	Tetanus toxoid: $TT_{947-967}$
19	KQIINMWQEVGKAMY	HIV gp120 T1
20	DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL-C-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-DAEFRHD	$Aβ_{1-7}/TT_{830-844}/C/TT_{947-967}/Aβ_{1-7}$
21	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA	$Aβ_{1-42}$
22	DAEFRHDQYIKANSKFIGITEL	AN90549: $Aβ_{1-7}/TT_{830-844}$ (used in a MAP4 configuration)
23	DAEFRHDFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE	AN90550: $Aβ_{1-7}/TT_{947-967}$ (used in a MAP4 configuration)
24	DAEFRHD-QYIKANSKFIGITELFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE	AN90542: $Aβ_{1-7}/TT_{830-844} + TT_{947-967}$ (used in a linear configuration)
25	EFRHDSG-QYIKANSKFIGITEL	AN90576: $Aβ_{3-9}/TT_{830-844}$ (used in a MAP4 configuration)

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

SEQ ID NO:	Sequence	Description
26	AKXVAAWTLKAAA-DAEFRHD	AN90562: $A\beta_{1-7}$/PADRE
27	DAEFRHD-DAEFRHDD-AEFRHDAKXVAAWTLKAAA	AN90543: $A\beta_{1-7}$ x 3/PADRE
28	AKXVAAWTLKAAA-DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD	PADRE/$A\beta_{1-7}$ x 3
29	DAEFRHD-AKXVAAWTLKAAA	$A\beta_{1-7}$ x 3/PADRE
30	DAEFRHD-ISQAVHAAHAEINEAGR	$A\beta_{1-7}$/albumin fragment
31	FRHDSGY-ISQAVHAAHAEINEAGR	$A\beta_{4-10}$/ albumin fragment
32	EFRHDSG-ISQAVHAAHAEINEAGR	$A\beta_{3-9}$/ albumin fragment
33	PKYVKQNTLKLAT-DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD	$HA_{307-319}$/$A\beta_{1-7}$ x 3
34	DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT-DAEFRHD	$A\beta_{1-7}$/$HA_{307-319}$/$A\beta_{1-7}$
35	DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT	$A\beta_{1-7}$ x 3/ $HA_{307-319}$
36	DAEFRHD-DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT	$A\beta_{1-7}$ x 2/ $HA_{307-319}$
37	DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT-EKKIAKMEKASSVFNV-QYIKANSKFIGITEL-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-DAEFRHD	$A\beta_{1-7}$/$HA_{307-319}$/Malaria CS/ $TT_{830-844}$/$TT_{947-967}$/$A\beta_{1-7}$
38	DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL-C-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE	$A\beta_{1-7}$ x 3/$TT_{830-844}$/C/$TT_{947-967}$
39	DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL-C-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE	$A\beta_{1-7}$/$TT_{830-844}$/C/$TT_{947-967}$
40	GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTKPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYDDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGKRGQDAMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSLSCINLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPIKNKMSESPNKTVSEEKAKQYLEE	CRMβ_{197}

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

SEQ ID NO:	Sequence	Description
	FHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGAN YAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAAL SILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSI ALSSLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYNFV ESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPFL HDGYAVSWNTVEDSIIRTGFQGESGHDI KITAENTPLPIAGVLLPTIPGKLDVNKSK THISVNGRKIRMRCRAIDGDVTFCRPKSP VYVGNGVHANLHVAFHRSSSEKIHSNEI SSDSIGVLGYQKTVDHTKVNSKLSLFFEI KS	
41	ISQAVHAAHAEINEAGR	Albumin fragment
42	DAEFGHDSGFEVRHQKLVFFAEDVGSNKG AIIGLMVGGVVIA	Murine Aβ(1-42
43	VFFAEDVG-C	Aβ(18-25 -C
44	LVFFAEDV-C	Aβ(17-24 -C
45	KLVFFAED-C	Aβ(16-23 -C
46	C-VFFAEDVG	C-Aβ(18-25
47	C-LVFFAEDV	C-Aβ(17-24
48	C-KLVFFAED	C-Aβ(16-23
49	VFFAEDV-C	Aβ(18-24 -C
50	LVFFAED-C	Aβ(17-23 -C
51	KLVFFAE-C	Aβ(16-22 -C
52	C-VFFAEDV	C-$A\beta_{18-24}$
53	C-LVFFAED	C-$A\beta_{17-23}$
54	C-KLVFFAE	C-$A\beta_{16-22}$

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0059] The present invention is directed to methods of generating peptide immunogen-carrier conjugates wherein the unreacted active functional groups on the carrier which are generated during activation are inactivated by using capping reagents such as *N*-Acetylcysteamine in order to prevent them from reacting further. The present invention is

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

also directed to capped carrier-peptide immunogen conjugates generated by those methods and to immunogenic compositions comprising said conjugates.

[0060] The approach of increasing immunogenicity of small or poorly immunogenic molecules, such as saccharides, through conjugation has been utilized successfully for decades (see, *e.g.*, Goebel *et al.* (1939) *J. Exp. Med.* 69: 53), and many immunogenic compositions have been described in which purified capsular polymers have been conjugated to carrier proteins to create more effective immunogenic compositions by exploiting this "carrier effect". For example, Schneerson *et al.* (*J. Exp. Med.* 152: 361-376, 1980), describe *Haemophilus influenzae* b polysaccharide protein conjugates that confer immunity to invasive diseases caused by that microorganism. Conjugates of PRP (polyribosylribitol phosphate, a capsular polymer of *H. influenzae* b) have been shown to be more effective than immunogenic compositions based on the polysaccharide alone (Chu *et al.*, (1983) *Infect. Immun.* 40: 245; Schneerson *et al.* (1984), *Infect. Immun.* 45: 582-591). Conjugation has also been shown to bypass the poor antibody response usually observed in infants when immunized with a free polysaccharide (Anderson *et al.* (1985) *J. Pediatr.* 107: 346; Insel *et al.* (1986) *J. Exp. Med.* 158: 294).

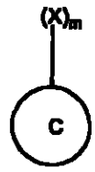
[0061] A further advantage of using as the protein carrier a bacterial toxin or toxoid against which routine immunization of humans (*e.g.*, tetanus or diphtheria) is a standard practice is that a desired immunity to the toxin or toxoid is induced along with immunity against the pathogens associated with the capsular polymer.

[0062] Antigenic determinant/hapten-carrier conjugates also are being used to produce highly specific monoclonal antibodies that can recognize discrete chemical epitopes on the coupled hapten. The resulting monoclonals often are used to investigate the epitopic structure and interactions between native proteins. In many cases, the antigenic determinants/haptens used to generate these monoclonals are small peptide segments representing crucial antigenic sites on the surface of larger proteins. The criteria for a successful carrier to be used in generating an antigenic determinant/hapten-carrier conjugate are the potential for immunogenicity, the presence of suitable functional groups for conjugation with an antigenic determinant/hapten, reasonable solubility properties even after derivatization and lack of toxicity *in vivo*.

[0063] These criteria are met by the conjugates generated by the methods of the instant invention. The conjugates may be any stable peptide immunogen-carrier conjugates generated using the conjugation process described herein. The conjugates are generated using

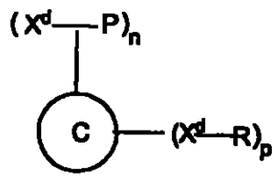
Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

a process of the instant invention wherein a protein/polypeptide carrier having the following structure:



is covalently attached to a protein/polypeptide carrier,
wherein,

[0064] C is a protein/polypeptide carrier and X is a derivatizable functional group on an amino acid residue on the protein/polypeptide carrier or optionally on an amino acid residue on a peptide linker covalently attached to the protein/polypeptide carrier, and wherein m is an integer greater than 0, but less than or equal to 85, is covalently attached to a peptide immunogen and wherein the peptide immunogen-protein/polypeptide carrier conjugate has the following formula, is represented by the following formula:



wherein,

[0065] C is the protein/polypeptide carrier and X^d is a derivatized functional group on an amino acid residue on the protein/polypeptide carrier or optionally on an amino acid residue on a peptide linker covalently attached to the protein/polypeptide carrier, P is a peptide immunogen covalently attached to the derivatized functional group on the amino acid residue on the protein/polypeptide carrier or optionally on an amino acid residue on a peptide linker covalently attached to a protein/polypeptide carrier, R is a capping molecule covalently attached to the derivatized functional group on an amino acid residue on the protein/polypeptide carrier or optionally on an amino acid residue on a peptide linker covalently attached to a protein/polypeptide carrier thereby preserving the functionality of the carrier, such that it retains its ability to elicit the desired immune responses against the peptide immunogen that would otherwise not occur without a carrier., n is an integer greater than 0, but less than or equal to 85, and p is an integer greater than 0, but less than 85.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Selection Of Carriers

[0066] Some peptide immunogens contain the appropriate epitope for inducing an immune response, but are too small to be immunogenic. In this situation, the peptide immunogens are linked to a suitable carrier to help elicit an immune response. In the above schematic representation of the peptide immunogens-carrier conjugate generated by a process of the present invention, C, is a protein/polypeptide carrier to which peptide immunogens are conjugated directly via derivatized functional groups on amino acid residues on the carrier themselves or indirectly via derivatized functional groups on peptide linkers covalently attached to the carriers. Suitable protein/polypeptide carriers include, but are not limited to, albumin (including humanserum albumin), keyhole limpet hemocyanin, immunoglobulin molecules, thyroglobulin, ovalbumin, MSCRAMMS, tetanus toxoid, or a toxoid from other pathogenic bacteria having reduced toxicity, including mutants, such as diphtheria, *E. coli*, cholera, or *H. pylori*, or an attenuated toxin derivative. One such carrier is the CRM_{197} protein (SEQ ID NO.:40) that is cross-reactive with diphtheria toxin.

[0067] Other carriers include T-cell epitopes that bind to multiple MHC alleles, *e.g.*, at least 75% of all human MHC alleles. Such carriers are sometimes known in the art as "universal T-cell epitopes." Exemplary carriers with universal T-cell epitopes include:

Influenza Hemagglutinin: $HA_{307-319}$	PKYVKQNTLKLAT (SEQ. ID NO. 11)
PAN-DR Peptide (PADRE peptide)	AKXVAAWTLKAAA (SEQ. ID NO. 12)
Malaria CS: T3 epitope	EKKIAKMEKASSVFNV (SEQ. ID NO. 13)
Hepatitis B surface antigen: HB_sAg_{19-28}	FELLTRILTI (SEQ. ID NO. 14)
Heat Shock Protein 65: $hsp65_{153-171}$	QSIGDLIARAMDKVGNEG (SEQ. ID NO. 15)
Bacillus Calmette-Guerin (BCG)	QVHFQPLPPAVVKL (SEQ. ID NO. 16)
Tetanus toxoid: $TT_{830-844}$	QYIKANSKFIGITEL (SEQ. ID NO. 17)
Tetanus toxoid: $TT_{947-967}$	NNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ. ID NO. 18)
HIV gp120 T1:	KQIINMWQEVGKAMY (SEQ. ID NO. 19)

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

CRM_{197}	*See* the Brief Description of the Sequences (SEQ ID NO.:40)
Albumin fragment	ISQAVHAAHAEINEAGR (SEQ ID NO: 41)

[0068] Other carriers for stimulating or enhancing an immune response and to which a peptide immunogen or a hapten can be conjugated include cytokines such as IL-1, IL-1 α and β peptides, IL-2, γINF, IL-10, GM-CSF, and chemokines, such as MIP 1α and β and RANTES. Immunogenic peptides can also be linked to proteins/peptide carriers that enhance transport across tissues, as described in O'Mahony, WO 97/17163 and WO 97/17614, which are hereby incorporated by reference in their entirety for all purposes.

[0069] Still further carriers include recombinant Streptococcal C5a peptidase, *Streptococcus pyogenes* ORFs 1224, 1664 and 2452, *Chlamydia pneumoniae* ORFs T367 and T858, *Streptococcus pneumonia* pneumolysin, pneumolysin mutants with reduced toxicity, growth factors, and hormones.

[0070] In one preferred embodiment of the present invention, the carrier protein is CRM_{197}, a non-toxic mutant of diphtheria toxin with one amino acid change in its primary sequence. The glycine present at the amino acid position 52 of the molecule is replaced with a glutamic acid due to a single nucleic acid codon change. Due to this change, the protein lacks ADP-ribosyl transferase activity and becomes non-toxic. It has a molecular weight of 58,408 Da. CRM_{197} is produced in large quantities by recombinant expression in accordance with U.S. Patent 5,614,382, which is hereby incorporated by reference. Conjugations of saccharides as well as peptides to CRM_{197} are carried out by linking through the ε-amino groups of lysine residues. It has been well established through several commercial products that CRM_{197} is an excellent and safe carrier for B-cell epitopes.

Immunogenic Peptides

[0071] As used herein, the term *"peptide immunogen" or "hapten"* is any protein or subunit structure/fragment/analog derived therefrom that can elicit, facilitate, or be induced to produce an immune response on administration to a mammal. In particular, the term is used to refer to a polypeptide antigenic determinant from any source (bacteria, virus or eukaryote), which may be coupled to a carrier using a method disclosed herein. Such polypeptide immunogen/antigenic determinants may be of viral, bacterial or eukaryotic cell origin.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

[0072] Peptide immunogens can be conjugated to a carrier for use as an immunotherapeutic in the prevention, treatment, prophylaxis or amelioration of various human diseases. Such peptide immunogens include those derived from Aβ a peptide of 39-43 amino acids, preferably 42 amino acids, which is the principal component of characteristic plaques of Alzheimer's disease (AD) (*see* US 4,666,829; Glenner & Wong (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120: 1131, Hardy (1984) *TINS* 20: 1131; Hardy (1977) *TINS* 20: 154), those derived from amyloid peptides of amylin, a polypeptide material produced by pancreatic islet cells that has been implicated in type II diabetes, peptides derived from low density lipoprotein gene products, which have been implicated in atherosclerosis and antigenic peptides derived from inflammatory cytokines and growth factors such as interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor α (TNF-α) and GDF-8. Such eukaryotic peptide immunogens may include either T-cell (CTL) or B-cell epitope, also known as β-amyloid protein, or A4 peptide.

[0073] Aβ, also known as β-amyloid peptide, or A4 peptide (*see* US 4,666,829; Glenner & Wong, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 120, 1131 (1984)), is a peptide of 39-43 amino acids, which is the principal component of characteristic plaques of Alzheimer's disease. Aβ is generated by processing of a larger protein APP by two enzymes, termed β and γ secretases (*see* Hardy, TINS 20, 154 (1997)). Known mutations in APP associated with Alzheimer's disease occur proximate to the site of β or γ secretase, or within Aβ. For example, position 717 is proximate to the site of γ-secretase cleavage of APP in its processing to Aβ, and positions 670/671 are proximate to the site of β-secretase cleavage. It is believed that the mutations cause AD by interacting with the cleavage reactions by which Aβ is formed so as to increase the amount of the 42/43 amino acid form of Aβ generated.

[0074] Aβ has the unusual property that it can fix and activate both classical and alternate complement cascades. In particular, it binds to Clq and ultimately to C3bi. This association facilitates binding to macrophages leading to activation of B cells. In addition, C3bi breaks down further and then binds to CR2 on B cells in a T cell dependent manner leading to a 10,000-fold increase in activation of these cells. This mechanism causes Aβ to generate an immune response in excess of that of other antigens.

[0075] Aβ has several natural occurring forms. The human forms of Aβ are referred to as Aβ39, Aβ40, Aβ41, Aβ42 and Aβ43. The sequences of these peptides and their relationship

Patent provided by Sughrue-Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

to the APP precursor are illustrated by Figure 1 of Hardy et al., TINS 20, 155-158 (1997). For example, Aβ42 has the sequence:

H_2N-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-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala-OH (SEQ ID NO. 21).

Aβ41, Aβ40 and Aβ39 differ from Aβ42 by the omission of Ala, Ala-Ile, and Ala-Ile-Val respectively from the C-terminal end. Aβ43 differs from Aβ42 by the presence of a threonine residue at the C-terminus.

[0076] Peptide immunogens which are fragments of Aβ are advantageous relative to the intact molecule for use in the present methods for several reasons. First, because only certain epitopes within Aβ induce a useful immunogenic response for treatment of Alzheimer's disease, an equal dosage of mass of a fragment containing such epitopes provides a greater molar concentration of the useful immunogenic epitopes than a dosage of intact Aβ. Second, certain peptide immunogens of Aβ generate an immunogenic response against amyloid deposits without generating a significant immunogenic response against APP protein from which Aβ derives. Third, peptide immunogens of Aβ are simpler to manufacture than intact Aβ due to their shorter size. Fourth, peptide immunogens of Aβ do not aggregate in the same manner as intact Aβ, simplifying preparation of conjugates with carriers.

[0077] Some peptide immunogens of Aβ have a sequence of at least 2, 3, 5, 6, 10, or 20 contiguous amino acids from a natural peptide. Some peptide immunogens have no more than 10, 9, 8, 7, 5 or 3 contiguous residues from Aβ. In a preferred embodiment, peptide immunogens from the N-terminal half of Aβ are used for preparing conjugates. Preferred peptide immunogens include Aβ1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-11, 3-7, 1-3, and 1-4. The designation Aβ1-5 for example, indicates an N-terminal fragment including residues 1-5 of Aβ. Aβ fragments beginning at the N-terminus and ending at a residue within residues 7-11 of Aβ are particularly preferred. The fragment Aβ1-12 can also be used but is less preferred. In some methods, the fragment is an N-terminal fragment other than Aβ1-10. Other preferred fragments include Aβ13-28, 15-24, 1-28, 25-35, 35-40, 35-42 and other internal fragments and C-terminus fragments.

[0078] Some Aβ peptides of the invention are immunogenic peptides that on administration to a human patient or animal generate antibodies that specifically bind to one or more

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

epitopes between residues 16 and 25 of Aβ. Preferred fragments include Aβ16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, and 18-25. Antibodies specifically binding to epitopes between residues 16 and 25 specifically bind to soluble Aβ without binding to plaques of Aβ. These types of antibody can specifically bind to soluble Aβ in the circulation of a patient or animal model without specifically binding to plaques of Aβ deposits in the brain of the patient or model. The specific binding of antibodies to soluble Aβ inhibits the Aβ from being incorporated into plaques thus either inhibiting development of the plaques in a patient or inhibiting a further increase in the size or frequency of plaques if such plaques have already developed before treatment is administered.

[0079] Preferably, the fragment of Aβ administered lacks an epitope that would generate a T-cell response to the fragment. Generally, T-cell epitopes are greater than 10 contiguous amino acids. Therefore, preferred fragments of Aβ are of size 5-10 or preferably 7-10 contiguous amino acids or most preferably 7 contiguous amino acids; *i.e.*, sufficient length to generate an antibody response without generating a T-cell response. Absence of T-cell epitopes is preferred because these epitopes are not needed for immunogenic activity of fragments, and may cause an undesired inflammatory response in a subset of patients (Anderson et al., (2002) *J. Immunol.* 168, 3697-3701; Senior (2002) Lancet *Neurol.* 1, 3).

[0080] Fragment Aβ15-25 and subfragments of 7-8 contiguous amino acids thereof are preferred because these peptides consistently generate a high immunogenic response to Aβ peptide. These fragments include Aβ16-22, Aβ16-23, Aβ16-24, Aβ17-23, Aβ17-24, Aβ18-24, and Aβ18-25. Particularly preferred Aβ15-25 subfragments are 7 contiguous amino acids in length. The designation Aβ15-21 for example, indicates a fragment including residues 15-21 of Aβ and lacking other residues of Aβ. and preferably 7-10 contiguous amino acids. These fragments can generate an antibody response that includes end-specific antibodies.

[0081] Peptide immunogens of Aβs require screening for activity in clearing or preventing amyloid deposits (*see* WO 00/72880, which is incorporated herein in its entirety for all purposes). Administration of N-terminal fragments of Aβ induces the production of antibodies that recognize Aβ deposits *in vivo* and *in vitro*. Fragments lacking at least one, and sometimes at least 5 or 10 C-terminal amino acids present in naturally occurring forms of Aβ are used in some methods. For example, a fragment lacking 5 amino acids from the C-terminal end of Aβ43 includes the first 38 amino acids from the N-terminal end of Aβ.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

[0082] Unless otherwise indicated, reference to Aβ includes the natural human amino acid sequences indicated above as well as analogs including allelic, species and induced variants. Analogs typically differ from naturally occurring peptides at one, two or a few positions, often by virtue of conservative substitutions. Analogs typically exhibit at least 80 or 90% sequence identity with natural peptides. Some analogs also include unnatural amino acids or modifications of N- or C-terminal amino acids at one, two, or a few positions. For example, the natural aspartic acid residue at position 1 and/or 7 of Aβ can be replaced with iso-aspartic acid.

[0083] Examples of unnatural amino acids are D, alpha, alpha-disubstituted amino acids, N-alkyl amino acids, lactic acid, 4-hydroxyproline, gamma-carboxyglutamate, epsilon-N,N,N-trimethyllysine, epsilon-N-acetyllysine, O-phosphoserine, N-acetylserine, N-formylmethionine, 3-methylhistidine, 5-hydroxylysine, omega-N-methylarginine, β-alanine, ornithine, norleucine, norvaline, hydroxproline, thyroxine, gamma-amino butyric acid, homoserine, citrulline, and isoaspartic acid. Immunogenic peptides also include analogs of Aβ and fragments thereof. Some therapeutic agents of the invention are all-D peptides, *e.g.*, all-D Aβ, all-D Aβ fragment, or analogs of all-D Aβ or all-D Aβ fragment. Fragments and analogs can be screened for prophylactic or therapeutic efficacy in transgenic animal models in comparison with untreated or placebo controls as described in WO 00/72880.

[0084] Peptide immunogens also include longer polypeptides that include, for example, an immunogenic of Aβ peptide, together with other amino acids. For example, preferred immunogenic peptides include fusion proteins comprising a segment of Aβ linked to a heterologous amino acid sequence that induces a helper T-cell response against the heterologous amino acid sequence and thereby a B-cell response against the Aβ segment. Such polypeptides can be screened for prophylactic or therapeutic efficacy in animal models in comparison with untreated or placebo controls as described in WO 00/72880.

[0085] The Aβ peptide, analog, immunogenic fragment or other polypeptide can be administered in disaggregated or aggregated form. Disaggregated Aβ or fragments thereof means monomeric peptide units. Disaggregated Aβ or fragments thereof are generally soluble, and are capable of self-aggregating to form soluble oligomers, protofibrils and ADDLs. Oligomers of Aβ and fragments thereof are usually soluble and exist predominantly as alpha-helices or random coils. Aggregated Aβ or fragments thereof means oligomers of Aβ or fragments thereof that have associate into insoluble beta-sheet assemblies. Aggregated Aβ or fragments thereof also means fibrillar polymers. Fibrils are usually insoluble. Some

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

antibodies bind either soluble Aβ or fragments thereof or aggregated Aβ or fragments thereof. Some antibodies bind both soluble Aβ or fragments thereof and aggregated Aβ or fragments thereof.

[0086] Immunogenic peptides also include multimers of monomeric immunogenic peptides. Immunogenic peptides other than Aβ peptides should induce an immunogenic response against one or more of the preferred fragments of Aβ listed above (e.g., Aβ1-3, 1-7, 1-10, and 3-7).

[0087] Immunogenic peptides of the present invention are linked to a carrier using a method of the present invention to form a conjugate. The immunogenic peptide can be linked at its amino terminus, its carboxyl terminus, or both to a carrier to form a conjugate. Optionally, multiple repeats of the immunogenic peptide can be present in the conjugate.

[0088] An N-terminal fragment of Aβ can be linked at its C-terminus to a carrier peptide to form a conjugate. In such conjugates, the N-terminal residue of the fragment of Aβ constitutes the N-terminal residue of the conjugate. Accordingly, such conjugates are effective in inducing antibodies that bind to an epitope that requires the N-terminal residue of Aβ to be in free form. Some immunogenic peptides of the invention comprise a plurality of repeats of an N-terminal segment of Aβ linked at the C-terminus to one or more copy of a carrier peptide to form a conjugate. The N-terminal fragment of Aβ incorporated into such conjugates sometimes begins at Aβ1-3 and ends at Aβ7-11. Aβ1-7, 1-3, 1-4, 1-5, and 3-7 are preferred N-terminal fragment of Aβ. Some conjugates comprise different N-terminal segments of Aβ in tandem. For example, a conjugate can comprise Aβ1-7 followed by Aβ1-3 linked to a carrier.

[0089] In some conjugates, an N-terminal segment of Aβ is linked at its N-terminal end to a carrier peptide. The same variety of N-terminal segments of Aβ can be used as with C-terminal linkage. Some conjugates comprise a carrier peptide linked to the N-terminus of an N-terminal segment of Aβ, which is in turn linked to one or more additional N-terminal segments of Aβ in tandem. Preferably, such immunogenic Aβ fragments, once conjugated to an appropriate carrier, induce an immunogenic response that is specifically directed to the Aβ fragment without being directed to other fragments of Aβ.

[0090] Immunogenic peptides of the invention include immunogenic heterologous peptides. In some immunogenic peptides, an Aβ fragment is linked to a carrier to form an

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

immunogenic heterologous peptide. This heterologous peptide is linked to a carrier using a method of the present invention to form a conjugate. Some of these immunogenic heterologous peptides comprise fragments of Aβ linked to tetanus toxoid epitopes such as described in US 5,196,512, EP 378,881 and EP 427,347. Optionally, an immunogenic peptide can be linked to one or multiple copies of a carrier, for example, at both the N and C termini of the carrier to form an immunogenic heterologous peptide. Other of these immunogenic heterologous peptides comprise fragments of Aβ linked to carrier peptides described in US 5,736,142. For example, an immunogenic heterologous peptide can comprise Aβ1-7 followed by Aβ1-3 followed by a carrier. Examples of such immunogenic heterologous peptides include:

Aβ 1-7/Tetanus toxoid 830-844 + 947-967 in a linear configuration
DAEFRHD-QYIKANSKFIGITELFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE
(SEQ ID NO.:24)

[0091] Peptides described in US 5,736,142 (all in linear configurations):

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

Aβ1-7 x 3/PADRE:
DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-AKXVAAWTLKAAA (SEQ ID NO.:27)

PADRE/Aβ1-7 x 3:
AKXVAAWTLKAAA-DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD (SEQ ID NO.:28)

Aβ1-7/PADRE:
DAEFRHD-AKXVAAWTLKAAA (SEQ ID NO.:29)

Aβ1-7/albumin fragment:
DAEFRHD-ISQAVHAAHAEINEAGR (SEQ ID NO.:30)

Aβ4-10/albumin fragment:
FRHDSGY-ISQAVHAAHAEINEAGR (SEQ ID NO.:31)

Aβ3-9/albumin fragment:
EFRHDSG-ISQAVHAAHAEINEAGR (SEQ ID NO.:32)

$HA_{307-319}/A\beta_{1-7}$ x 3:

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

PKYVKQNTLKLAT-DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD (SEQ ID NO.:33)

$A\beta_{1-7}/HA_{307-319}/A\beta_{1-7}$:

DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT-DAEFRHD (SEQ ID NO.:34)

$A\beta_{1-7}$x 3/$HA_{307-319}$:

DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT (SEQ ID NO.:35)

$A\beta_{1-7}$x 2/$HA_{307-319}$:

DAEFRHD-DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT (SEQ ID NO.:36)

$A\beta_{1-7}/HA_{307-319}$/Malaria CS/$TT_{830-844}/TT_{947-967}/A\beta_{1-7}$

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

$A\beta_{1-7}$ x 3/$TT_{830-844}$/C/$TT_{947-967}$

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

$A\beta_{1-7}/TT_{830-844}$/C/$TT_{947-967}$

DAEFRHD-QYIKANSKFIGITELCFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO.:39)

$A\beta_{1-7}/TT_{830-844}$/C/$TT_{947-967}/A\beta_{1-7}$

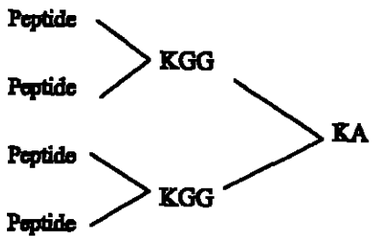
DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL-C-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-DAEFRHD (SEQ ID NO.:20)

[0092] Some immunogenic heterologous peptides comprise a multimer of immunogenic peptides represented by the formula 2^x, in which x is an integer from 1-5. Preferably x is 1, 2 or 3, with 2 being most preferred. When x is two, such a multimer has four immunogenic peptides linked in a preferred configuration referred to as MAP4 (*see* US 5,229,490). Such immunogenic peptides are then linked to a carrier using a method of the present invention to form a conjugate.

[0093] The MAP4 configuration is shown below, where branched structures are produced by initiating peptide synthesis at both the N-terminal and side chain amines of lysine. Depending upon the number of times lysine is incorporated into the sequence and allowed to branch, the resulting structure will present multiple N-termini. In this example, four identical

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

N-termini have been produced on the branched lysine-containing core. Such multiplicity greatly enhances the responsiveness of cognate B cells.



[0094] Examples of such immunogenic heterologous peptides include:

Aβ 1-7/Tetanus toxoid 830-844 in a MAP4 configuration:

DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO.:22)

Aβ 1-7/Tetanus toxoid 947-967 in a MAP4 configuration:

DAEFRHD-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO.:23)

Aβ 3-9/Tetanus toxoid 830-844 in a MAP4 configuration:

EFRHDSG-QYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO.:25)

DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL on a 2 branched resin



[0095] The Aβ peptide, analog, active fragment or other polypeptide can be administered in associated or multimeric form or in dissociated form. Therapeutic agents also include multimers of monomeric immunogenic agents. Agents other than Aβ peptides should induce an immunogenic response against one or more of the preferred fragments of Aβ listed above (e.g., 1-10, 1-7, 1-3, and 3-7), and can also be conjugated to a carrier using a method of the present invention. Preferably, such agents, once conjugated to an appropriate carrier, induce an immunogenic response that is specifically directed to one of these fragments without being directed to other fragments of Aβ. To facilitate the conjugation of an peptide immunogen with a carrier, additional amino acids can be added to the termini of the antigenic determinants. The additional residues can also be used for modifying the physical or chemical properties of the peptide immunogen. Amino acids such as tyrosine, cysteine, lysine, glutamic or aspartic acid, or the like, can be introduced at the C- or N- terminus of the peptide immunogen. Additionally, peptide linkers containing amino acids such as glycine and alanine

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

can also be introduced. In addition, the antigenic determinants can differ from the natural sequence by being modified by terminal NH_2-group acylation, e.g., by alkanoyl (C1-C20) or thioglycolyl acetylation, terminal-carboxy amidation, e.g., ammonia, methylamine, etc. In some instances these modifications may provide sites for linking to a support or other molecule.

[0096] The peptide immunogens used to generate conjugates of the present invention using a process disclosed herein can be combined via linkage to form polymers (multimers), or can be formulated in a composition without linkage, as an admixture. Where a peptide is linked to an identical peptide, thereby forming a homopolymer, a plurality of repeating epitopic units are presented. For example, multiple antigen peptide (MAP) technology is used to construct polymers containing both CTL and/or antibody peptides and peptides. A "CTL epitope" is one derived from selected epitopic regions of potential target antigens. When the peptides differ, *e.g.*, a cocktail representing different viral subtypes, different epitopes within a subtype, different HLA restriction specificities, or peptides which contain T-helper epitopes, heteropolymers with repeating units are provided. In addition to covalent linkages, noncovalent linkages capable of forming intermolecular and intrastructural bonds are also contemplated.

[0097] Such peptide immunogens and their analogs are synthesized by solid phase peptide synthesis or recombinant expression, or are obtained from natural sources. Automatic peptide synthesizers are commercially available from numerous suppliers, such as Applied Biosystems, Foster City, California.

[0098] Recombinant expression can be in bacteria (such as *E. coli*), yeast, insect cells or mammalian cells. Procedures for recombinant expression are described by Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press, NY, 2nd ed., 1989). Some immunogenic peptides are also available commercially (*e.g.*, American Peptides Company, Inc., Sunnyvale, CA, and California Peptide Research, Inc., Napa, CA).

[0099] Random libraries of peptides or other compounds can also be screened for suitability as a peptide immunogen. Combinatorial libraries can be produced for many types of compounds that can be synthesized in a step-by-step fashion. Such compounds include polypeptides, beta-turn mimetics, hormones, oligomeric *N*-substituted glycines, and oligocarbamates and the like. Large combinatorial libraries of the compounds can be constructed by the encoded synthetic libraries (ESL) method described in WO 95/12608, WO 93/06121, WO 94/08051, WO 95/35503 and WO 95/30642 (each of which is incorporated by

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

reference for all purposes). Peptide libraries can also be generated by phage display methods (*see, e.g.*, Devlin, WO 91/18980).

Derivatization and Conjugation of an Immunogenic Peptide to a Protein Carrier

[0100] The site of attachment of a peptide immunogen to a protein/polypeptide carrier, and the nature of the cross-linking agent that is used to attach a peptide immunogen to the carrier are both important to the specificity of the resultant antibody generated against it. For proper recognition, the peptide immunogen must be coupled to the carrier with the appropriate orientation. For an antibody to recognize subsequently the free peptide immunogens without carrier, the peptide immunogen-protein/polypeptide carrier conjugate must present the peptide immunogens in an exposed and accessible form. Optimal orientation is often achieved by directing the cross-linking reaction to specific sites on the peptide immunogens. One way to achieve this with a peptide immunogen is by attaching a terminal cysteine residue during peptide synthesis. This provides a sulfhydryl group on one end of the peptide for conjugation to the carrier. Cross-linking through this group provides attachment of the peptide immunogen only at one end, thereby ensuring consistent orientation.

[0101] In peptide immunogen-carrier conjugation, the goal is not to maintain the native state or stability of the carrier, but to present the hapten in the best possible way to the immune system. In reaching this goal, the choice of conjugation chemistry may control the resultant titer, affinity, and specificity of the antibodies generated against the hapten. It may be important in some cases to choose a cross-linking agent containing a spacer arm long enough to present the antigen in an unrestricted fashion. It also may be important to control the density of the peptide immunogen on the surface of the carrier. Too little peptide immunogen substitution may result in little or no response. A peptide immunogen density too high actually may cause immunological suppression and decrease the response. In addition, the cross-linker itself may generate an undesired immune response. These issues need to be taken into consideration in selecting not only the appropriate cross-linking reagents, but also the appropriate ratios of protein/polypeptide carrier and peptide immunogen.

[0102] A variety of means of attaching the protein/peptide carriers to the peptide immunogens are possible. Ionic interactions are possible through the termini or through the ε-amino group of lysine. Hydrogen bonding between the side groups of the residues and the peptide immunogen are also possible. Finally, conformation interactions between the protein/peptide carriers and the immunogenic peptide may give rise to a stable attachment.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

[0103] Peptide immunogens-carrier conjugates have been successfully generated using various cross-linking reagents such as zero-length, homobifunctional or heterobifunctional cross linkers. The smallest available reagent systems for bioconjugation are the so-called zero-length cross-linkers. These compounds mediate the conjugation of two molecules by forming a bond containing no additional atoms. Thus, one atom of a molecule is spacer. In many conjugation schemes, the final complex is bound together by virtue of chemical components that add foreign structures to the substances being cross-linked. In some applications, the presence of these intervening linkers may be detrimental to the intended use. For instance, in the preparation of peptide immmunogen-carrier conjugates the complex is formed with the intention of generating an immune response to the attached hapten. Occasionally, a portion of the antibodies produced by this response will have specificity for the cross-linking agent used in the conjugation procedure. Zero-length cross-linking agents eliminate the potential for this type of cross-reactivity by mediating a direct linkage between two substances.

[0104] Homobifunctional reagents, which were the first cross-linking reagents used for modification and conjugation of macromolecules, consisted of bireactive compounds containing the same functional group at both ends (Hartman and Wold, 1966). These reagents could tie one protein to another by covalently reacting with the same common groups on both molecules. Thus, the lysine ε-amines or N-terminal amines of one protein could be cross-linked to the same functional groups on a second protein simply by mixing the two together in the presence of the homobifunctional reagent.

[0105] Heterobifunctional conjugation reagents contain two different reactive groups that can couple to two different functional targets on proteins and other macromolecules. For example, one part of a cross-linker may contain an amine-reactive group, while another portion may consist of a sulfhydryl-reactive group. The result is the ability to direct the cross-linking reaction to selected parts of target molecules, thus garnering better control over the conjugation process.

[0106] Heterobifuntional reagents are used to cross-link proteins and other molecules in a two-or three-step process that limits the degree of polymerization often obtained using homobifunctional cross-linkers.

[0107] Many methods are currently available for coupling of peptide immunogens to protein/polypeptide carriers using zero-length, homobifunctional or heterobifunctional crosslinkers. Most methods create amine, amide, urethane, isothiourea, or disulfide bonds,

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

or in some cases thioethers. The more general method of coupling proteins or peptides to peptides utilizes bifunctional crosslinking reagents. These are small spacer molecules having active groups at each end. The spacer molecules can have identical or different active groups at each end. The most common active functionalities, coupling groups, and bonds formed are:

1. Aldehyde - amino → secondary amine
2. Maleimido - sulfhydryl (thioether
3. Succinimido - amino (amide
4. Imidate esters - amino (- amide
5. Phenyl azides - amino (phenyl amine
6. Acyl halide - sulfhydryl (thioether
7. Pyridyldisulfides - sulfhydryl (disulfide
8. Isothiocyanate - amino (isothiourea.

[0108] The reactivity of a given carrier protein, in terms of its ability to be modified by a cross-linking agent such that it can be conjugated to an peptide immunogen, is determined by its amino acid composition and the sequence location of the individual amino acids in the three dimensional structure of the molecule, as well as by the amino acid composition of the peptide immunogen.

[0109] In the case of linkers ("L") between protein/peptide carriers and other peptides (e.g., a protein/peptide carriers and an peptide immunogen), the spacers are typically selected from Ala, Gly, or other neutral spacers of nonpolar amino acids or neutral polar amino acids. In certain embodiments the neutral spacer is Ala. It will be understood that the optionally present spacer need not be comprised of the same residues and thus may be a hetero- or homo-oligomer. Exemplary spacers include homo-oligomers of Ala. When present, the spacer will usually be at least one or two residues, more usually three to six residues. In other embodiments the protein/polypeptide carrier is conjugated to an peptide immunogen, preferably with the protein/peptide carrier positioned at the amino terminus. The peptide may be joined by a neutral linker, such as Ala-Ala-Ala or the like, and preferably further contain a lipid residue such palmitic acid or the like which is attached to alpha and epsilon amino groups of a Lys residue ((PAM)2Lys), which is attached to the amino terminus of the peptide conjugate, typically via Ser-Ser linkage or the like.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

[0121] In some aspects of the invention, the peptide immunogen is an Aβ fragment selected from the group consisting of Aβ1-5-L, Aβ1-7-L, Aβ1-9-L, and Aβ1-12-L. In some aspects of the invention the linker is GAGA (SEQ ID NO:10).

[0122] To facilitate the conjugation of a peptide immunogen with a carrier, additional amino acids can be added to the termini of the antigenic determinants. The additional residues can also be used for modifying the physical or chemical properties of the peptide immunogen. Amino acids such as tyrosine, cysteine, lysine, glutamic or aspartic acid, or the like, can be introduced at the C- or N- terminus of the peptide immunogen. Additionally, peptide linkers containing amino acids such as glycine and alanine can also be introduced. In addition, the antigenic determinants can differ from the natural sequence by being modified by terminal NH_2-group acylation, *e.g.*, by alkanoyl (C1-C20) or thioglycolyl acetylation, terminal-carboxy amidation, *e.g.*, ammonia, methylamine, etc. In some instances these modifications may provide sites for linking to a support or other molecule.

[0110] In some aspects of the invention, the peptide immunogen is an Aβ fragment selected from the group consisting of Aβ1-5-C, Aβ1-7-C, Aβ1-9-C, and Aβ1-12-C, where C is a cysteine amino acid residue. In some aspects of the invention, the peptide immunogen is an Aβ fragment selected from the group consisting of Aβ1-5-L-C, Aβ1-7-L-C, Aβ1-9-L-C, and Aβ1-12-L-C.

[0111] The peptide immunogen is linked to the protein/peptide carrier either directly or via a linker either at the amino or carboxy terminus of the peptide immunogen. The amino terminus of either the peptide immunogen or the protein/peptide carrier may be acylated. In addition, the peptide immunogen -protein/peptide carrier conjugate may be linked to certain alkanyol (C_1-C_{20}) lipids via one or more linking residues such as Gly, Gly-Gly, Ser, Ser-Ser as described below. Other useful lipid moieties include cholesterol, fatty acids, and the like.

[0112] Peptide immunogens can be linked to a carrier by chemical crosslinking. Techniques for linking an immunogen to a carrier include the formation of disulfide linkages using *N*-succinimidyl-3-(2-pyridyl-thio) propionate (SPDP) (Carlsson, J *et al.* (1978) *Biochem J*, 173: 723,) and succinimidyl 4-(*N*-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) (if the peptide lacks a sulfhydryl group, this can be provided by addition of a cysteine residue to the hapten). These reagents create a disulfide linkage between themselves and peptide cysteine resides on one protein and an amide linkage through the ε-amino on a lysine, or other free amino group in other amino acids. A variety of such disulfide/amide-forming agents are described in Immuno. Rev. 62: 85 (1982). Other bifunctional coupling

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

agents form a thioether rather than a disulfide linkage. The thioether forming agents include reactive ester of 6-maleimidocaproic acid, 2-bromoacetic acid, and 2-iodoacetic acid, 4-(*N*-maleimido-methyl) cyclohexane-1-carboxylic acid. The carboxyl groups can be activated by combining them with succinimide or 1-hydroxyl-2-nitro-4-sulfonic acid, sodium salt.

[0113] Most frequently, lysine residues are the most abundant amino acid residues found on carrier proteins, and these residues are modified using cross-linking reagents to generate neucleophilic sites that are then coupled to a hapten. This coupling is achieved via any of the hydrophilic side chains on the hapten molecules that are chemically active. These include the guanidyl group of arginine, the (-carboxyl groups of glutamate and aspartic acid, the sulfhydryl group of cysteine, and the ε-amino group of lysine, to name a few. Modification of proteins such that they can now be coupled to other moieties is achieved using crosslinking reagents, which react with any of the side chains on the protein carrier or hapten molecules.

[0114] In one aspect of the present invention, the carrier protein with or without a linker molecule is functionalized (derivatized) with a reagent that introduces reactive sites into the carrier protein molecule that are amenable to further modification to introduce nucleophilic groups. In one embodiment, the carrier is reacted with a haloacetylating reagent, which preferentially reacts with a number of functional groups on amino acid residues of proteins such as the sulfhydryl group of cysteine, the primary ε-amine group of lysine residue, the α terminal of α-amines, the thioether of methionine and both imidazoyl side chain nitrogens of histidine (Gurd, 1967). In a preferred embodiment, the primary ε-amine groups on lysine residues of the carrier protein are derivatized with b N-hydroxysuccinimidyl bromoacetate to generate a bromoacetylated carrier. Conjugation of peptide immunogen and the activated protein carrier was carried out by slowly adding the activated carrier to the solution containing the peptide immunogen.

[0115] By using the process of this invention, the peptide immunogens discussed in section B, above, may be conjugated to any of the carriers discussed in section A, above. The conjugates resulting from the process of this invention are used as immunogens for the generation of antibodies against Aβ for use in passive/active immunotherapy. Furthermore, Aβ or an Aβ fragment linked to a carrier can be administered to a laboratory animal in the production of monoclonal antibodies to Aβ.

[0116] In one aspect of the invention, the conjugate is a conjugate selected from the group consisting of Aβ1-7-CRM_{197}, (Aβ1-7 x 3)-CRM_{197}, and (Aβ1-7 x 5)-CRM_{197}. In one aspect

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

of the invention, the conjugate is a conjugate selected from the group consisting of CRM_{197}-Aβ1-5, CRM_{197}-Aβ1-7, CRM_{197}-Aβ1-9, and CRM_{197}-Aβ1-12. In another aspect of the invention, the conjugate is a conjugate selected from the group consisting of Aβ1-5-C-CRM_{197}, Aβ1-7-C-CRM_{197}, Aβ1-9-C-CRM_{197}, and Aβ1-12-C-CRM_{197}, Aβ16-23-C-CRM_{197}, Aβ17-24-C-CRM_{197}, Aβ18-25-C-CRM_{197}, CRM_{197}-C-Aβ16-23, CRM_{197}-C-Aβ17-24, CRM_{197}-C-Aβ18-25, Aβ16-22-C-CRM_{197}, Aβ17-23-C-CRM_{197}, Aβ18-24-C-CRM_{197}, CRM_{197}-C-Aβ16-22, CRM_{197}-C-Aβ17-23, and CRM_{197}-C-Aβ18-24. Aβ1-9-C-CRM_{197}, and Aβ1-12-C-CRM_{197}. In yet another aspect of the invention, the conjugate is a conjugate selected from the group consisting of selected from the group consisting of Aβ1-5-L-C-CRM_{197}, Aβ1-7-L-C-CRM_{197}, Aβ1-9-L-C-CRM_{197}, and Aβ1-12-L-C-CRM_{197}.

Capping

[0117] A disadvantage to the use of coupling reagents, which introduce reactive sites into the side chains of reactive amino acid molecules on carrier and /or hapten molecules, is that the reactive sites if not neutralized are free to react with any unwanted molecule either *in vitro* or *in vivo*. In the process of the present invention, capping of the unreacted functional groups is accomplished by reaction of the conjugates with pendant reactive groups with reagents which inactivate/cap the reactive groups. Exemplary inactivating/capping reagents for use with the conjugation process of the present invention include cysteamine, *N*-acetylcysteamine, and ethanolamine. Alternatively, capping is accomplished by reaction with ammonia or ammonium bicarbonate, either of which converts the haloacetyl groups to aminoacetyl groups. Capping is also accomplished at alkaline pH (9.0–9.8) using sodium hydroxide or sodium carbonate, which converts the haloacetyl groups to hydroxyacetyl groups. One potential advantage of converting the haloacetyl groups to aminoacetyl or hydroxyacetyl groups, as opposed to the reaction with cysteamine derivatives, ethanolamine etc., is the introduction of relatively smaller size chemical functionalities, by reaction with ammonia or hydroxide/carbonate. The resulting capped functional groups, e.g. aminoacetyl or hydroxyacetyl, provide relatively less perturbance in the carrier protein portion of the conjugate. The capped peptide immunogen-carrier protein is purified as necessary using known methods, such as chromatography (gel filtration, ion exchange, hydrophobic interaction or affinity), dialysis, ultrafiltration-diafiltration, selective precipitation using ammonium sulfate or alcohol, and the like.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Immunogenic Conjugates and Compositions

[0118] The capped peptide immunogen-carrier protein conjugates are administered in an immunogenic composition to mammals, particularly humans, for prophylactic and/or therapeutic purposes. The conjugates of the present invention are used to elicit and/or enhance immune responses against immunogens. For instance, CTL-carrier conjugates are used to treat and/or prevent viral infection, amyloidogenic diseases, cancer etc. Alternatively, polypeptide immunogen-carrier conjugates, which induce antibody responses, are also used.

[0119] In therapeutic applications, a conjugate of the present invention is administered to an individual already suffering from an amyloidogenic disease such as Alzheimer's disease. Those in the incubation phase or the acute phase of the disease may be treated with the conjugate of the present invention separately or in conjunction with other treatments, as appropriate.

[0120] In therapeutic applications, an immunogenic composition of the present invention is administered to a patient in an amount sufficient to elicit an effective CTL response or humoral response to the amyloid plaque, and to cure, or at least partially arrest disease progression, symptoms and/or complications. An amount adequate to accomplish this is defined as "therapeutically effective dose." Amounts effective for this use will depend in part on the peptide composition, the manner of administration, the stage and severity of the disease being treated, the weight and general state of health of the patient, and the judgment of the prescribing physician.

[0121] Therapeutically effective amounts of the immunogenic compositions of the present invention generally range for the initial immunization for therapeutic or prophylactic administration, from about 0.1 μg to about 10,000 μg of peptide for a 70 kg patient, usually from about 0.1 to about 8000 μg, preferably between about 0.1 to about 5000 μg, and most preferably between 0.1 to about 1,000 μg. These doses are followed by boosting dosages of from about 0.1 μg to about 1000 μg of peptide pursuant to a boosting regimen over weeks to months depending upon the patient's response and condition by measuring specific immune responses.

[0122] Further, the present invention is used prophylactically to prevent and/or ameliorate amyloidogenic disease. Effective amounts are as described above. Additionally, one of ordinary skill in the art would also know how to adjust or modify prophylactic treatments, as appropriate, for example by boosting and adjusting dosages and dosing regimes.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

[0123] Therapeutic administration may begin at the first sign of the disease. This is followed by boosting doses until the disease progression is halted or reversed or the symptoms are substantially abated and for a period thereafter.

[0124] Immunogenic compositions of the present invention for therapeutic or prophylactic treatment can be administered by parenteral, topical, intravenous, oral, subcutaneous, intra-arterial, intra-cranial, intra-peritoneal, intra-nasal or intra-muscular means for prophylactic and/or therapeutic treatment. One typical route of administration of an immunogenic agent is subcutaneous, although other routes can be equally effective. Another common route is intra-muscular injection. This type of injection is most typically performed in the arm or leg muscles. In some methods, agents are injected directly into a particular tissue where deposits have accumulated, for example intra-cranial injection. Intra-muscular injection or intravenous infusion is preferred for administration of antibody. In some methods, particular therapeutic antibodies are injected directly into the cranium. Because of the ease of administration, the immunogenic compositions of the invention are particularly suitable for oral administration. The invention further provides immunogenic compositions for parenteral administration, which comprise a solution of the peptides or conjugates, dissolved or suspended in an acceptable carrier, preferably an aqueous carrier.

[0125] A variety of diluents, excipients and buffers may be used, e.g., water, buffered water, phosphate buffered saline, 0.3% glycine, hyaluronic acid and the like. These compositions may be sterilized by conventional, well-known sterilization techniques, or may be sterile filtered. The resulting aqueous solutions may be packaged for use as is, or lyophilized, the lyophilized preparation being combined with a sterile solution prior to administration. The compositions may contain pharmaceutically acceptable auxiliary substances as required to approximate physiological conditions, such as buffering agents, tonicity adjusting agents, wetting agents and the like, for example, sodium acetate, sodium lactate, sodium chloride, potassium chloride, calcium chloride, sorbitan monolaurate, triethanolamine oleate, etc.

[0126] For solid compositions, conventional nontoxic solid carriers may be used. These may include, for example, pharmaceutical grades of mannitol, lactose, starch, magnesium stearate, sodium saccharin, talcum, cellulose, glucose, sucrose, magnesium carbonate, and the like. For oral administration, a pharmaceutically acceptable nontoxic composition is formed by incorporating any of the normally employed excipients, such as those carriers previously

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

listed, and generally 10-95% of active ingredient, that is, one or more conjugates of the invention, and more preferably at a concentration of 25-75%.

[0127] The concentration of immunogenic compositions of the present invention in the pharmaceutical formulations can vary widely, i.e., from less than about 0. 1%, usually at or at least about 2% to as much as 20% to 50% or more by weight, and will be selected primarily by fluid volumes, viscosities, etc. , in accordance with the particular mode of administration selected.

[0128] The conjugates of the present invention may also be administered via liposomes, which serve to target the conjugates to a particular tissue, such as lymphoid tissue, or targeted selectively to infected cells, as well as increase the half-life of the peptide composition. Liposomes include emulsions, foams, micelles, insoluble monolayers, liquid crystals, phospholipid dispersions, lamellar layers and the like. In these preparations the composition to be delivered is incorporated as part of a liposome, alone or in conjunction with a molecule, which binds to, for example, a receptor prevalent among lymphoid cells. These molecules would include monoclonal antibodies, which bind to the CD45 antigen, or with other therapeutic or immunogenic compositions. Thus, liposomes filled with a desired composition of the present invention can be directed to the site of lymphoid cells, where the liposomes then deliver the selected therapeutic/immunogenic peptide compositions. Liposomes for use in the invention are formed from standard vesicle-forming lipids, which generally include neutral and negatively charged phospholipids and a sterol, such as cholesterol. The selection of lipids is generally guided by consideration of liposome size, acid lability and stability of the liposomes in the blood stream. A variety of methods are available for preparing liposomes, as described in, e.g., Szoka, et al., *Ann. Rev. Biophys. Bioeng* . 9:467 (1980), U.S. Pat. Nos. 4,235,871, 4,501,728, 4,837,028, and 5,019,369, incorporated herein by reference.

[0129] For aerosol administration, the compositions of the present invention are preferably supplied in finely divided form along with a surfactant and propellant. Typical percentages of the composition are 0.01-20% by weight, preferably 1-10%. The surfactant must, of course, be nontoxic, and preferably soluble in the propellant. Representative of such agents are the esters or partial esters of fatty acids containing from 6 to 22 carbon atoms, such as caproic, octanoic, lauric, palmitic, stearic, linoleic, linolenic, olesteric and oleic acids with an aliphatic polyhydric alcohol or its cyclic anhydride. Mixed esters, such as mixed or natural glycerides may be employed. The surfactant may constitute 0.1- 20% by weight of the

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

composition, preferably 0.25-5%. The balance of the composition is ordinarily propellant. A carrier can also be included, if desired, as with lecithin for intranasal delivery.

[0130] Conjugates of the present invention can optionally be administered in combination with other agents that are at least partly effective in treatment and/or amelioration of a an amyloid disease and/or its symptoms. In the case of Alzheimer's and Down's syndrome, in which amyloid deposits occur in the brain, the conjugates of the invention can be administered in conjunction with other agents that increase passage of the agents of the invention across the blood-brain barrier.

[0131] The immunogenic composition typically contains an adjuvant. An adjuvant is a substance that enhances the immune response when administered together with an immunogen or antigen. A number of cytokines or lymphokines have been shown to have immune modulating activity, and thus may be used as adjuvants, including, but not limited to, the interleukins 1-α, 1-β, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 (see, e.g., U.S. Patent No. 5,723,127), 13, 14, 15, 16, 17 and 18 (and its mutant forms), the interferons-α, β and γ, granulocyte-macrophage colony stimulating factor (see, e.g., U.S. Patent No. 5,078,996) macrophage colony stimulating factor, granulocyte colony stimulating factor, GSF, and the tumor necrosis factor α and β. Still other adjuvants useful in this invention include a chemokine, including without limitation, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, and RANTES. Adhesion molecules, such as a selectin, e.g., L-selectin, P-selectin and E-selectin may also be useful as adjuvants. Still other useful adjuvants include, without limitation, a mucin-like molecule, e.g., CD34, GlyCAM-1 and MadCAM-1, a member of the integrin family such as LFA-1, VLA-1, Mac-1 and p150.95, a member of the immunoglobulin super family such as PECAM, ICAMs, e.g., ICAM-1, ICAM-2 and ICAM-3, CD2 and LFA-3, co-stimulatory molecules such as CD40 and CD40L, growth factors including vascular growth factor, nerve growth factor, fibroblast growth factor, epidermal growth factor, B7.2, PDGF, BL-1, and vascular endothelial growth factor, receptor molecules including Fas, TNF receptor, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, and DR6. Still another adjuvant molecule includes Caspase (ICE). See, also International Patent Publication Nos. WO98/17799 and WO99/43839, which are incorporated herein by reference in their entirety for all purposes.

[0132] Suitable adjuvants used to enhance an immune response include, without limitation, MPL™ (3-O-deacylated monophosphoryl lipid A; Corixa, Hamilton, MT), which is described in U.S. Patent No. 4,912,094, which is hereby incorporated by reference for all

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

purposes. Also suitable for use as adjuvants are synthetic lipid A analogs or aminoalkyl glucosamine phosphate compounds (AGP), or derivatives or analogs thereof, which are available from Corixa (Hamilton, MT), and which are described in U.S. Patent No. 6,113,918, which is hereby incorporated by reference. One such AGP is 2-[(R)-3-Tetradecanoyloxytetradecancylamino] ethyl 2-Deoxy-4-O-phosphono-3-O-[(S)-3-tetradecanoyoxytetradecanoyl]-2-[(R)-3-tetradecanoyloxy-tetradecanoyl-amino]-b-D-glycopyranoside, which is known as 529 (also known as RC529; Corixa). This 529 adjuvant is formulated as an aqueous form (529 AF) or as a stable emulsion (529 SE).

[0133] Still other adjuvants include mineral oil and water emulsions, calcium salts such as calcium phosphate, aluminum salts (alum), such as aluminum hydroxide, aluminum phosphate, etc., Amphigen, Avridine, L121/squalene, D-lactide-polylactide/glycoside, pluronic acids, polyols, muramyl dipeptide, killed *Bordetella*, saponins, such as Stimulon™ QS-21 (Antigenics, Framingham, MA), described in U.S. Patent No. 5,057,540, which is hereby incorporated by reference3, and particles generated therefrom such as ISCOMS (immunostimulating complexes), *Mycobacterium tuberculosis*, bacterial lipopolysaccharides, synthetic polynucleotides such as oligonucleotides containing a CpG motif (U.S. Patent No. 6,207,646, which is hereby incorporated by reference), a pertussis toxin (PT), or an *E. coli* heat-labile toxin (LT), particularly LT-K63, LT-R72, PT-K9/G129; see, e.g., International Patent Publication Nos. WO 93/13302 and WO 92/19265, which are/ incorporated herein by reference for all purposes.

[0134] Also useful as adjuvants are cholera toxins and mutants thereof, including those described in published International Patent Application No.WO 00/18434 (wherein the glutamic acid at amino acid position 29 is replaced by another amino acid (other than aspartic acid, preferably a histidine). Similar CT toxins or mutants are described in published International Patent Application number WO 02/098368 (wherein the isoleucine at amino acid position 16 is replaced by another amino acid, either alone or in combination with the replacement of the serine at amino acid position 68 by another amino acid; and/or wherein the valine at amino acid position 72 is replaced by another amino acid). Other CT toxins are described in published International Patent Application number WO 02/098369 (wherein the arginine at amino acid position 25 is replaced by another amino acid; and/or an amino acid is inserted at amino acid position 49; and/or two amino acids are inserted at amino acid position 35 and 36).

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

[0135] It is to be understood that reference throughout this specification to any theory to explain the results described is not to limit the scope of the invention. Independent of the method by which the invention functions, the results and advantages described herein may be achieved by reference to the following examples of the invention.

[0136] It will be apparent to one of ordinary skill in the art that many changes and modifications can be made thereto without departing from the spirit or scope of the appended claims. All publications, patents and patent applications mentioned in this specification are incorporated by reference in their entirety for all purposes to the same extent as if each individual publication, patent or patent application was specifically and individually indicated to be incorporated by reference.

EXAMPLE 1

Conjugation Of CRM_{197} To Aβ Peptide

[0137] Conjugation of haptens/antigenic peptides was carried out by reacting activated carrier CRM_{197}, which has thirty-nine lysine residues, to a hapten/antigenic peptide having a pendant thiol-group using the method described below (Figure 1). All the Aβ peptides contained a cysteine residue at the carboxy terminus to facilitate the conjugation of these peptides through the cysteinyl sulfhydryl group to the carrier protein. These peptides were produced by solid phase synthesis.

I. Activation

[0138] Free amino groups of CRM_{197} were bromoacetylated by reaction with an excess of bromoacetic acid *N*-hydroxysuccinimide ester (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (Bernatowicz and Matsueda, 1986). To an ice-cold solution of CRM_{197} (~15 mg), 10% (v/v) 1.0 M $NaHCO_3$ (pH 8.4) was added. Bromoacetic acid *N*-hydroxysuccinimide ester, equal in weight to that of CRM_{197} used, was dissolved in 200 μL dimethylformamide (DMF), added slowly to the CRM_{197}, and gently mixed at room temperature in the dark for 1 hour. The resulting bromoacetylated (activated) protein was purified by passage through a desalting (P6-DG) column using PBS / 1 mM EDTA (pH 7.0) as the eluent. Following purification, the fractions corresponding to activated CRM_{197} were pooled and the protein concentration was estimated by BCA protein assay. The protein amino groups, both before and after treatment with bromoacetic acid *N*-hydroxysuccinimide ester, were reacted with 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBSA), which served as an indicator of bromoacetylation (Means *et al.*, 1972).

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

II. Conjugation

[0139] Prior to conjugation, the peptides were reacted with 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) [Ellman's reagent] to verify the content of free-SH groups (between 62-88% reduced). For the first four Aβ peptides (amino acids 1-7 without linker, amino acids 1-12 with GAGA (SEQ ID NO.:10) linker, amino acids 1-9 with GAGA (SEQ ID NO.: 10) linker, and amino acids 1-7 with GAGA (SEQ ID NO.: 10) linker), approximately 8.0 – 10.0 mg of peptide was dissolved in sterile distilled water to an approximate concentration of 20 mg/ml. The peptide was slowly added to cold activated CRM_{197} in a 1:1 ratio (w/w) and the pH was adjusted to approximately 7.0-7.2 with the addition of 20-36 μl of 1 N NaOH. The resulting material was gently mixed overnight at 4°C in the dark followed by dialysis in the dark against two 1L changes of PBS, pH 7.2. For the next four Aβ peptides (amino acids 1-5 without linker, amino acids 1-9 without linker, amino acids 1-12 without linker, and amino acids 1-5 with linker), reaction with Ellman's reagent was used to verify the free -SH groups. CRM_{197} was bromoacetylated, purified, and reacted with TNBSA as previously described. The pH of each peptide was adjusted to 7.0 with the addition of 0.1 M $NaPO_4$ (pH 8.5) at 2.2x the volume of the dissolved peptide. The peptide was slowly added to cold activated CRM_{197} in a 1:1 ratio and allowed to react overnight at 4°C in the dark. The resulting material was dialyzed. A final control peptide (1-12mer in reverse orientation) was conjugated to CRM_{197} as described above with the following modification. Rather than adjusting the pH of the peptide to 7.0, the pH of the activated CRM_{197} was adjusted to approximately 7.5 with the addition of 20% (v/v) 0.5 M $NaPO_4$ (pH 8.0). Each conjugate, after dialysis, was transferred into a sterile 15mL polypropylene tube, wrapped in aluminum foil, and stored at 4°C. Activation of the reactive amino residues on the carrier was then subsequently verified using mass spectrometry.

Conjugate	Immunogenic Peptide
A□1-5-C-CRM_{197}	DAEFR-C (SEQ. ID. NO.:1)
A□1-7-C-CRM_{197}	DAEFRHD-C (SEQ. ID NO.:2)
Aβ1-9-C-CRM_{197}	DAEFRHDSG-C (SEQ ID NO:3)
Aβ1-12-C-CRM_{197}	DAEFRHDSGYEV-C (SEQ ID NO:4)
Aβ1-5-L-C-CRM_{197}	DAEFR-GAGA-C (SEQ ID NO.:5)

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Aβ 1-7-L-C-CRM_{197}	DAEFRHD-GAGA-C (SEQ ID NO.:6)
Aβ1-9-L-C-CRM_{197}	DAEFRHDSG-GAGA-C (SEQ ID NO.:7)
Aβ1-12-L-C-CRM_{197}	DAEFRHDSGYEV-GAGA-C (SEQ ID NO.:8)
Aβ12-1-C-CRM_{197} (-VE CONTROL)	VEYGSDHRFEAD-C (SEQ ID NO.: 9)

L= linker (GAGA) (SEQ ID NO.:10)

EXAMPLE 2

Preparation of Aβ Peptide-CRM_{197} Conjugate and Purification By Ultrafiltration

Bromoacetylation of CRM_{197}

[0140] CRM_{197} (100 mg) in 0.01 M sodium phosphate buffer, 0.9% NaCl, pH 7.0, was reacted with bromoacetic acid *N*-hydroxysucinimide ester (dissolved to 20 mg/mL in DMSO) at a 1:1 weight ratio under an argon atmosphere. The reaction was titrated as needed to maintain the pH at 7.0. The mixture was stirred in dark for 1.5 hours at room temperature. The reaction mixture was 1.2μm filtered into the retentate reservoir of a UF/DF system (Millipore Labscale TFF, Billerica, MA). Purification was done using a 10K or 30K UF membrane by diafiltration (30-fold) against 0.01 M sodium phosphate buffer / 0.9% NaCl, pH 7.0. The bromoacetylated CRM_{197} was filtered by passing through a 0.2μm filter. The degree of bromoacetylation was determined by reacting the activated CRM_{197} with cysteine, followed by amino acid analysis and quantitation of the resulting carboxymethylcysteine (CMC).

Conjugation of Aβ Peptide and Bromoacetylated CRM_{197} and Capping with N-Acetylacysteamine

[0141] Bromoacetylated CRM_{197} (50 mg) was transferred to a reaction vessel. To the stirred solution, maintained at 2-8°C, was added 1 M sodium carbonate/bicarbonate. Titration was performed to achieve a target pH of 9.0, under argon atmosphere. Separately, 50 mg of Aβ peptide was weighed out and dissolved in water for injection (WFI) to 20 mg/mL. To this solution was added 1 M sodium carbonate/bicarbonate until pH 9.0 was attained. The peptide solution was added to the bromoacetylated CRM_{197} solution, and the mixture was stirred at 2-8°C for 14-18 hours. The remaining bromoacetyl groups were capped with a 20-fold molar excess of *N*-acetylcysteamine for 3-6 hours at 2-8°C.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

[0142] The reaction mixture was filtered through 1.2μm filter into the retentate reservoir of a UF/DF system (Millipore XL), and the conjugate was purified at room temperature by 30-fold diafiltration on a 10K or 30K MWCO membrane (Millipore) by diafiltering against 0.01 M sodium phosphate buffer / 0.9% NaCl, pH 7.0. The retentate was collected and 0.2μm filtered and analyzed for protein content (Lowry or Micro-BCA colorimetric assay), by SDS-PAGE, by amino acid analysis, and for immunogenicity in mice.

EXAMPLE 3

Conversion by Capping of the Unreacted Bromoacetyl Groups to Aminoacetyl Groups

[0143] Bromoacetylated CRM_{197} (50 mg), prepared as described above in Example 2, was transferred to a reaction vessel. To the stirred solution, maintained at 2-8°C, was added 1M sodium carbonate/bicarbonate. Titration was performed to achieve a target pH of 9.0, under argon atmosphere. Separately, 50 mg of Aβ peptide was weighed out and dissolved in WFI to 20 mg/mL. To this solution was added 1 M sodium carbonate/bicarbonate until pH 9.0 was attained. The peptide solution was added to the bromoacetylated CRM_{197} solution, and the mixture was stirred at 2-8°C for 14-18 hours. The remaining bromoacetyl groups were capped using 8% ammonium bicarbonate solution for 4 hours at 2-8°C.

[0144] The reaction mixture was 1.2μm filtered into the retentate reservoir of a UF/DF system (Millipore XL), and the conjugate was purified at room temperature by 30-fold diafiltration on a 10K or 30K MWCO membrane by diafiltering *vs* 0.01 M sodium phosphate buffer / 0.9% NaCl, pH 7.0. The retentate was collected and 0.2μm filtered and analyzed for protein content (Lowry or Micro-BCA colorimetric assay), by SDS-PAGE, by amino acid analysis, and for immunogenicity in mice.

EXAMPLE 4

Quantitative Determination of *S*-Carboxymethylcysteine and *S*-Carboxymethylcysteamine as Evaluation of Degree of Conjugation and Capping of Peptide Immunogen-Protein/Polypeptide Conjugates

[0145] Acid hydrolysis of protein-peptide conjugates generated using bromoacetyl activation chemistry resulted in the formation of acid stable S-carboxymethylcysteine (CMC) from the cysteines at the conjugated sites and the formation of acid stable S-carboxymethylcysteamine (CMCA) from the cysteamine at the capped sites (Figure 2). All of the conjugated and capped lysines were converted back to lysine and detected as such. All other amino acids were hydrolyzed back to free amino acids except for tryptophan and

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

cysteine, which were destroyed by the hydrolysis conditions. Asparagine and glutamine were converted to aspartic acid and glutamic acid respectively.

[0146] Conjugate samples were diluted with deionized water to a total protein concentration of less then 1 mg/mL. Two 10 microgram aliquots of each conjugate were dried and resuspended in 100 µL of 6N HCl [Pierce], 5 µL of melted phenol [Sigma-Aldrich], and 1 µL of 2-mercaptoethanol [Sigma-Aldrich]. The samples were then incubated under vacuum (100 mT) at 110 °C for 22 hours. The resulting hydrolysates were dried, resuspended in 250 µL of Beckman Na-S sodium citrate sample dilution buffer (pH 2.2) [Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA], and filtered using Whatman 0.2 µm nylon syringe tip filters and 1mL syringes.

[0147] Each sample was then loaded into a Beckman 6300 amino acid analyzer sample loop and placed in the analyzer. The amino acids of each hydrolyzed sample and control were separated using ion exchange chromatography followed by reaction with Beckman Ninhydrin NinRX solution at 135 °C. The derivatized amino acids were then detected in the visible range at 570 nm and 440 nm (*see* Table 1). A standard set of amino acids [Pierce Amino Acid Standard H] containing 500 picomoles of each amino acid was run along with the samples and controls for each set of analysis. S-carboxymethylcysteine [Sigma-Aldrich] was added to the standard.

Table 1
Retention Times for Amino Acids
Using Gradient Program 1 on the Beckman 6300 Amino Acid Analyzer

Retention Time (min.)	Amino Acid		Wavelength used for Detection
8.3	Carboxymethylcysteine	CMC	570
9.6	Aspartic Acid & Asparagine	Asx	570
11.3	Threonine	Thr	570
12.2	Serine	Ser	570
15.8	Glutamic Acid & Glutamine	Glx	570 & 440
18.5	Proline	Pro	440
21.8	Glycine	Gly	570
23.3	Alanine	Ala	570

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Retention Time (min.)	Amino Acid		Wavelength used for Detection
29.0	Valine	Val	570
32.8	Methionine	Met	570
35.5	Isoleucine	Ile	570
36.8	Leucine	Leu	570
40.5	Tyrosine	Tyr	570
42.3	Phenylalanine	Phe	570
45.4	Carboxymethylcysteamine	CMCA	570
48.8	Histidine	His	570
53.6	Lysine	Lys	570
70.8	Arginine	Arg	570

[0148] The areas of each standard peak were used as a quantitative equivalence for proportional evaluation of each sample. Proline was determined from 440 nm and was converted to an equivalence in 570 nm using Glutamic acid, the closest amino acid.

[0149] Each of these picomole values was converted to a molar ratio of amino acid residues using a comparison of picomoles of lysine to the theoretical lysine value present in the protein. Lysine was chosen for this evaluation based on its covalent attachment to Cysteine and Cysteamine and the expected similar hydrolysis. The resulting numbers of moles of amino acids were then compared to the amino acid composition of the protein and reported along with the values for CMC and CMCA. The CMC value was used directly for evaluation of the degree of conjugation and the CMCA value was used directly for evaluation of the degree of capping.

EXAMPLE 5

Characterization and Optimization of Aß-CRM_{197} Peptide Conjugates

[0150] To verify conjugation, all peptide-CRM_{197} conjugates were analyzed by amino acid analysis and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF)mass spectrometry. For each conjugate, the moles of peptide conjugated to each mole CRM_{197} was determined by amino acid analysis (number of S-carboxymethylcysteine residues) and

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

MALDI-TOF mass spectrometry. The values determined by each method were generally in agreement.

I. Size exclusion chromatography:

[0151] Batch concentrate samples were removed from storage and allowed to warm to room temperature. The Aβ peptide conjugate sample was gently mixed to insure a homogeneous preparation. The Aβ peptide conjugate sample was spun in an Eppendorf micro-centrifuge to remove any particulates. The supernatant was withdrawn for TosoHaas TSK-Gel G3000SW chromatography (TosoHaas, Stuttgart, Germany). A TosoHaas TSK-Gel G3000SW column was connected to a HPLC system and the pressure limit was set to 1.4 MPa. The column was equilibrated with at least 30 mL of PBS (10 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.2 ± 0.1) at a flow rate of 0.75 mL/min. The Aβ peptide conjugate sample was loaded onto the TosoHaas TSK-Gel G3000SW column using the following parameters:

Concentration of Aβ peptide conjugate sample: 1.5 ± 1.0 mg/mL
Flow rate: 0.75 mL/min
Sample Volume: 0.1 mL
Run Time: 30 minutes

[0152] The absorbance was monitored at both 280nm and 210nm. For long term storage, the TosoHaas TSK-Gel G3000SW column was equilibrated with at least 50 mL of 20% ethanol at a flow rate of 0.5 – 1.0 mL/min.

II. PAGE (Polyacrylamide Gel Electrophoresis):

[0153] The activated (bromoacetylated) CRM_{197} and the Aβ peptide-CRM_{197} conjugates were examined by SDS-Gels using a NuPAGE Bis-Tris Electrophoresis (Novex, Frankfurt, Germany) with a neutral pH, pre-cast polyacrylamide mini-gel system and NuPAGE MES SDS Running Buffer. An 8ug aliquot of each activated CRM or conjugate was mixed with reducing sample buffer and heated at 100°C for 5 minutes. The conjugates and molecular weight (MW) standards (Invitrogen, Carlsbad, CA) were loaded on a 10% (w/v, acrylamide) NuPage gel (Novex) based upon a Bis-Tris-HCl buffered system and run on MES SDS Running Buffer-PAGE (Laemmli). Following SDS-PAGE, the gel was stained with Pierce Gel Code Blue (Pierce, Rockford, IL). Aβ peptide-CRM_{197} conjugate was represented by a major band around 66 kDa, above the band of native CRM and a dimer band around 120 kDa, along with minor multimer bands (data not shown).

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

III. MALDI-TOF Mass Spectrometry Analysis of Peptide-CRM_{197} Conjugates:

[0154] Mass spectrometry was used for immediate approximation of the degree of conjugation. Suitable aliquots of activated CRM_{197} and conjugate samples were analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry using 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-cinnamic acid (sinapinic acid) as the matrix. The molecular weight of activated CRM_{197} determined by MALDI-TOF mass spectrometry (Finnigan MAT Lasermat 2000 Mass Spectrometer, Ringoes, NY) was found to be centered around 60.5kDa and for conjugates varied from 65kDa to 74kDa depending on the degree of conjugation (data not shown). Up to 22 of the lysines (~50%) in CRM_{197} were found to be modified at 1:1 ratio.

IV. Optimization Experiments:

[0155] The degree of activation and conjugation are a function of reagent:protein ratio, temperature of the reaction and pH of the reaction buffer. Some examples are given below to illustrate the optimal conjugation conditions carried out to identify the optimal pH conditions in order to have reproducible process control parameters for conjugation reactions. Results (Figure 3) showed that the conjugation reaction to Aβ 5mer (DAEFRC)(SEQ ID NO:1) as well as Aβ 7mer (DAEFRHDC)(SEQ ID NO:2) is pH dependent and yields a higher degree of modification/conjugation when the pH of the reaction condition is increased. Using the TFA salt of 5mer and 7mer peptides, the degree of conjugation was evaluated at pH 9.0 with varying amounts of peptide load (Figure 4). It is evident from these results that peptide conjugates with a defined number of peptide copies per CRM molecule can be generated by varying the peptide /activated CRM ratio during the conjugation process. Similar experiments were done using acetate salt of Aβ 7mer peptide.

[0156] For the Aβ1-7/CRM conjugation, the capping process was evaluated by comparing the moles of CMCA per CRM to the moles of CMC per CRM. Since the total of the CMC and CMCA was constant for each peptide:CRM ratio tested, the capping process was presumed to be complete (Figure 5). The total modification in the conjugate stayed between 19 and 21, comparable to the number of lysines bromoacetylated (Figure 5). These experiments were done with TFA as the counterion for the peptide. The Aβ1-7/CRM conjugation was repeated using the acetate salt of the peptide rather than the TFA salt, and these data are shown in Figure 5 and 6. The capping process appeared to go to completion, with the total of the CMC and CMCA for each point staying between 20 and 22. The conditions for the Aβ-CRM conjugation reaction have been optimized at pH 9.0, with the

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

degree of conjugation controlled by the peptide to CRM ratio in the reaction. By varying the ratio from 0.1 to 1.5, the degree of conjugation can be varied (Figure 6).

[0157] The degree of activation and conjugation are a function of reagent:protein ratio, temperature of the reaction and pH of the reaction buffer. The degree of modification (conjugation) for each conjugate was calculated by subtracting the mass value of activated CRM_{197} from the mass value of each conjugate and dividing by the mass of the peptide used to prepare the conjugate. The degree of modification (conjugation) for all of the conjugates is described in the Table 2.

[0158] The degree of conjugation was also compared to the values determined by the estimated amount of S-carboxymethylcysteine residues formed per mole of CRM_{197} (also shown in Table 2).

Table 2
Degree of Modification: Comparison of MALDI-TOF and AAA Data

Sample	Da (From Mass Spectrometry)	Degree of conjugation (From Mass Spectrometry)	Degree of conjugation (From CMC-Amino Acid Analysis)
CRM_{197}	58,408	—	—
BrAc-CRM	60,752	19	—
Aβ1-7/CRM	74,463	14	15
Aβ1-7/CRM	72,375	12	14
Aβ1-5/CRM	75,425	20	21
Aβ1-5/CRM	71,690	15	18

EXAMPLE 6

Immunogenicity Studies of Aβ Peptide Conjugates

[0159] Peptides spanning N-terminal residues 1-5, 1-7, 1-9, and 1-12 of Aβ (with and without the linker sequence GAGAC) and a peptide corresponding to the N-terminus of Aβ in reverse sequence from amino acid twelve to amino acid one (1-12mer in reverse sequence), each conjugated to CRM_{197}, were used to immunize mice along with an unconjugated Aβ 1-12 mer peptide in a formulation with STIMULON™ QS-21. Each group of mice was immunized subcutaneously with a dose of either 30 μg or 5 μg of one of the samples formulated with 20 μg of the adjuvant STIMULON™ QS-21, at the beginning of the study (week 0) and subsequently at weeks 3 and 6. The study protocol is illustrated in Table 3.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

[0160] As shown in Table 3, peptides spanning N-terminal residues 1-5, 1-7, 1-9, and 1-12 of Aβ (with and without the linker sequence GAGAC) and a peptide corresponding to the N-terminus of Aβ in reverse sequence from amino acid twelve to amino acid one (1-12mer in reverse) conjugated to CRM_{197} were used to immunize mice along with unconjugated Aβ 1-12 mer peptide in a formulation with QS-21. Each group of mice was vaccinated subcutaneously with a dose of either 30 μg or 5 μg of one of the samples formulated with 20 μg of the adjuvant QS-21, at the beginning of the study (week 0) and subsequently at weeks 3 and 6. Swiss Webster mice were used for the entire study with 5 mice in each group. Injection volume = 100 μl; B = Bleed; V = vaccinate; E = exsanguinate.

[0161] Anti-Aβ titers were measured by ELISA against Aβ and CRM_{197} as described below. Briefly, Costar 96 well plates (#3591) were coated overnight at room temperature with 2 μg/mL Aβ1-42 in sterile carbonate/bicarbonate buffer, pH 9.6. Plates were emptied and blocked for two hours at room temperature with 200 μl/well of 0.05% BSA in 1X PBS/0.05% Tween 20. Blocked plates were emptied and washed with a plate washer containing TBS, 0.1% Brij-35 (without azide) wash buffer. All primary antisera were serially diluted with 0.05% BSA in 1X PBS containing 0.05% Tween 20/0.02% Azide and 100 μL of each dilution was then transferred to the appropriate plate wells and incubated at room temperature for 2 hours. Plates were then emptied/washed as described above. Alkaline phosphatase conjugated goat anti-mouse IgG secondary antibody from Southern Biotech (city, state) was diluted 1:1000 with 0.05% BSA in PBS containing 0.05% Tween 20/0.02% Azide and 100 μL was added to each well and incubated at room temperature for 1 hour. Plates were then emptied/washed as described above and finally incubated at room temperature for 1 hour with 100 μL/well of a 1 mg/mL solution of p-nitrophenyl phosphate substrate prepared in diethanolamine/$MgCl_2$, pH 9.8. The color development was stopped with the addition of 50 μL/well of 3 N NaOH. Plates were read at 405 nM with a 690 nM reference. Endpoint titers were calculated at an O.D. of 0.1 AU.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Table 3
Mouse Immunization Study Protocol

Group Code	Description	Dose (µg)	Wk 0	Wk 3	Wk 6	Wk 8	Wk 13	Wk 16
AE488	CRM/1 7 w/o linker	30	B V	B V	B V	B	B	E
AE489	CRM/1 12 with linker	30	B V	B V	B V	B	B	E
AE490	CRM/1-9 with linker	30	B V	B V	B V	B	B	E
AE491	CRM/1 7 with linker	30	B V	B V	B V	B	B	E
AE492	CRM/1-5 w/o linker	30	B V	B V	B V	B	B	E
AE493	CRM/1 9 w/o linker	30	B V	B V	B, V	B	B	E
AE494	CRM/1 12 w/o linker	30	B V	B V	B V	B	B	E
AE495	CRM/1 5 with linker	30	B V	B V	B V	B	B	E
AE496	CRM/1 7 w/o linker	5	B V	B, V	B V	B	B	E
AE497	CRM/1-12 with linker	5	B V	B V	B V	B	B	E
AE498	CRM/1 9 with linker	5	B V	B, V	B V	B	B	E
AE499	CRM/1 7 with linker	5	B V	B V	B V	B	B	E
AE500	CRM/1-5 w/o linker	5	B V	B V	B V	B	B	E
AE501	CRM/1 9 w/o linker	5	B V	B V	B V	B	B	E

Patent provided by Daghrow Lytton, PLLC http://www.daghrow.com

Table 3
Mouse Immunization Study Protocol - Continued

Group Code	Description	Dose (µg)	Wk 0	Wk 3	Wk 6	Wk 8	Wk 13	Wk 16
AE502	CRM/1 12 w/o linker	5	B V	B V	B V	B	B	E
AE503	CRM/1-5 with linker	5	B, V	B V	B V	B	B	E
AE504	CRM_{197} C1-6151	30	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE505	CRM_{197} C1-6151	5	B, V	B V	B, V	B	B	E
AE506	CRM/12-1mer	30	B V	B V	B V	B	B	E
AE507	CRM/12-1mer	5	B V	B V	B V	B	B	E
AE508	1 12mer peptide	30	B V	B V	B, V	B	B	E
AE509	1 12mer peptide	5	B V	B V	B, V	B	B	E
AE510	Ab	30	B V	B V	B V	B	B	E
AE511	Ab	5	B V	B, V	B V	B	B	E

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC http://www.sughrue.com

CRM_{197} ELISA

[0162] Greiner 96 well plates (#650011) were coated at 37°C for 90 minutes with 5.0 μg/mL (100 μl/well) of CRM_{197} in sterile carbonate/bicarbonate buffer, pH 9.6. Plates were emptied and washed with a plate washer containing 1X TBS, 0.1% Brij-35 wash buffer. All primary antisera were serially diluted with 1X PBS containing 0.3% Tween 20/EDTA and 100 μL of each dilution was then transferred to the appropriate plate wells and incubated at 37°C for 1 hour. The plates were then emptied/washed as described above. Alkaline phosphatase conjugated goat anti-mouse IgG secondary antibody from Southern Biotech was diluted 1:1000 with 1X PBS containing 0.05% Tween 20/0.02% Azide and 100 μL was added to each well and incubated at 37°C for 1 hour. Plates were then emptied/washed as described above and finally incubated at room temperature for 1 hour with 100 μL/well of a 1 mg/mL solution of p-nitrophenyl phosphate substrate prepared in diethanolamine/$MgCl_2$, pH 9.8. The development was stopped with the addition of 50 μL/well of 3 N NaOH. Plates were read at 405 nM with a 690 nM reference. Endpoint titers were calculated at an O.D. of 0.1 AU.

[0163] Tables 4-6 illustrate end point ELISA titers against Aβ. Following primary immunization, all eight conjugates (excluding the negative control) induced measurable anti-Aβ IgG immune responses. However, the 30μg dose, but not the 5μg dose, of Aβ gave a positive response at week 3 following primary immunization. Among all the conjugates, it appears that Aβ 1-7 peptide conjugated without linker elicited as good as or better response than other conjugates studied. At 5μg dose, Aβ 1-5C did better at weeks 8-16. Aβ 1-7C was best at 30μg dose. Analysis of antibody titers after second and third immunization with either 5 or 30μg dose indicate that the maximal immune response to Aβ for most of the conjugates was seen after the second immunization. At least in mice, the third immunization did not appear to enhance the immune response. Aβ peptide however, needed three immunizations with the 30μg dose to reach maximal immune response against the peptide (Table 5). In terms of antibody decay over an extended period of time, the antibody level from the groups immunized with conjugates was reduced by 2 to 3 fold as compared to the highest level within that group. Individual samples from weeks 6 and 8 were analyzed to calculate GMTs against Aβ for each of the group (Table 6) to see if any conjugate group was substantially better than the others. Statistical analysis of week 6 titers from Aβ1-5C, Aβ 1-7C and Aβ 1-9C conjugates indicated that the Aβ 1-7 conjugate induced a significantly higher titer. It is also evident from this experiment that the linker sequence GAGAC did not contribute to enhancing the immune response to the peptide.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Table 4

Group		Week 3	Week 6	Week 8	Week 13	Week 16
1 5C	<100	14,960	687,691	882,012	625,208	771,828
1 7C	<100	51,253	1,280,181	860,463	520,060	571,043
1 9C	<100	18,615	1,008,872	622,325	348,967	380,755
1 12C	<100	615	132,009	390,624	166,162	184,170
1 5LC	<100	4,999	458,075	454,631	237,573	220,091
1 7LC	<100	17,693	849,170	842,402	446,089	400,536
1-9LC	<100	18,544	1,465,115	1,180,347	571,127	579,477
1 12LC	<100	12,664	908,360	598,867	368,101	316,075
CRM_{197}	<100	<100	<100	<100	<100	<100
1-42	<100	<100	<100	<100	<100	<100
1 12	<100	<100	<100	<100	<100	<100
12-1C	<100	<100	<100	<100	<100	<100

Table 4. Weeks 0, 3, 6, 8, 13, and 16 ELISA endpoint titers against Aβ using antiserum from 5 μg dose of peptide conjugates spanning varying lengths of the N terminus of Amyloid Aβ peptide, Ref: Elan hyperimmune polyclonal #592 = 3,073,307. Endpoint at O.D. 0.1 AU. Swiss Webster mice were immunized SC-N with 5 μg of above antigens formulated with 20 μg STIMULON™ QS-21 at weeks 0, 3, and 6.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC http://www.sughrue.com

Table 5

Group	Week 0	Week 3	Week 6	Week 8	Week 13	Week 16
1 5C	<100	18 150	590 355	332,832	204 645	176,159
1 7C	<100	100 672	1 840 741	647,470	592,638	779 072
1 9C	<100	18 520	1 184,696	713,494	363 459	327 065
1 12C	<100	7 837	1,325 725	1 126,389	681,268	577,604
1 5LC	<100	16,347	469 191	184 077	177,358	164,680
1 7LC	<100	47,866	971 229	462,200	463,466	529 726
1 9LC	<100	59 002	921 544	787,273	405 023	500,468
1 12LC	<100	27,348	697 150	483 320	284,800	397 816
CRM_{197}	<100	<100	<100	<100	<100	<100
1-42	<100	160	3,327	109 718	48 646	27,901
1 12	<100	<100	<100	<100	<100	<100
12-1C	<100	<100	<100	<100	<100	<100

Table 5. Weeks 0 3 6, 8 13 and 16 ELISA endpoint titers against Aβ using antiserum from 30 μg dose of peptide conjugates spanning varying lengths of the N terminus of Amyloid Aβ peptide. Ref[5] Elan hyperimmune polyclonal #592 = 3 073,307 Endpoint at O.D 0 1 AU Swiss Webster mice were immunized SC-N with 30 μg of above antigens formulated with 20 μg STIMULON™ QS 21 at weeks 0, 3 and 6

Patent provided by Daghrus Klein, PLLC http://www.dagkrus.com

Table 6

Group	Week 6	Week 8
1-5C	237,668 [a]	161,671 [b]
1-7C	1,866,702 [a]	881,146 [b]
1-9C	963,323 [a]	595,414 [b]
1-12C	940,260	955,470
1-5LC	395,553	141,084
1-7LC	516,921	394,521
1-9LC	826,773	562,458
1-12LC	544,768	376,952
1-42	365	4,565

Table 6. Weeks 6 and 8 ELISA endpoint GMTs against Aβ using antisera from 30 μg dose of peptide conjugates spanning varying lengths of the N-terminus of Amyloid-Aβ. Ref: Elan Hyperimmune Polyclonal #592 = 3,073,307. Endpoint at O.D. 0.1 AU. Swiss Webster mice were immunized SC-N with 30 μg of above antigens formulated with 20 μg STIMULON™ QS-21 at weeks 0, 3, and 6

a. Statistical analysis of week 6 titers from 1-5C, 1-7C, and 1-9C using Tukey-Kramer show a statistical difference between 1-5C vs 1-7C only, whereas, analysis using Student's T-test shows a statistical difference between 1-5C vs 1-7C and 1-5C vs 1-9C.

b. Statistical analysis of week 8 titers from 1-5C, 1-7C, and 1-9C does not show a statistical difference among the three groups. However, there appears to be a trend that may indicate a difference between 1-5C vs 1-7C.

PDAPP Mouse Brain Tissue Staining

[0164] The PDAPP brain tissue staining assay provides an indication of the functionality of the Aβ peptide conjugates and/or Aβ 1-42 antiserum. Serum samples from individual mouse groups were separately analyzed for their ability to recognize PDAPP mouse brain tissue plaques containing amyloid peptide. The results are shown in Table 7A and 7B. With the exception of the Aβ 5mer conjugate antisera, there was a dose-related response in recognizing the plaques. Independent of the linker, 30μg conjugate-induced antisera had better reactivity patterns as compared to that of 5μg conjugate antisera. However, with the Aβ 5mer conjugate antisera, there seems be similar or better reactivity for the 5μg group. Comparing all these results, it is concluded that conjugates made from Aβ 1-5 mer through Aβ 1-9 mer are sufficient in eliciting plaques recognizing immune response in mice and the presence of linker is not essential. The following conclusions can be drawn from this study: (a) All of

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

the peptide conjugates induced high titered antiserum against the carrier protein CRM_{197} to equal or slightly higher levels as compared to the unconjugated CRM_{197} control (not shown). (b) The conjugates with the GAGAC linker did not enhance immunogenicity or functionality compared to conjugates without the linker. (c) The immunogenicity data and PDAPP brain tissue staining (an initial indication of functional antibody) show that the Aβ 1-5mer and Aβ 1-7mer conjugates appeared to be the preferred immunogens for further development.

Table 7A. PDAPP mouse brain tissue staining.

5 µg Dose					
Without Linker			With Linker		
Vaccine	Animal #	PDAPP Staining	Vaccine	Animal #	PDAPP Staining
CRM/ Aβ 1-5	1	+(no diffuse)	CRM/ Aβ 1-5	1	-
	2	++/+++		2	-
	3	++/+++		3	±
	4	++		4	±
	5	++		5	±
CRM/ Aβ 1-7	1	++	CRM/ Aβ 1-7	1	+
	2	++		2	++
	3	++		3	++
	4	++		4	+
	5	++		5	++
CRM/ Aβ 1-9	1	+	CRM/ Aβ 1-9	1	++
	2	+/++		2	++
	3	±		3	+
	4	±		4	+
	5	±		5	+
CRM/ Aβ 1-12	1	-	CRM/ Aβ 1-12	1	+
	2	?		2	+
	3	±		3	++
	4	-		4	-
	5	±		5	±
CRM/ Aβ 12-1mer	1	-	Aβ42	1	-
	2	-		2	-
	3	±		3	-
	4	-		4	-
	5	±		5	-

All antiserum diluted 1:1000 for staining procedure.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

80

Table 7B. PDAPP mouse brain tissue staining.

30 µg Dose					
Without Linker			With Linker		
Vaccine	Animal #	PDAPP Staining	Vaccine	Animal #	PDAPP Staining
CRM/ Aβ 1-5	1	-	CRM/ Aβ 1-5	1	+
	2	+/++		2	-
	3	-		3	-
	4	±		4	±
	5	++		5	-
CRM/ Aβ 1-7	1	+/++	CRM/ Aβ 1-7	1	+
	2	++		2	±/+
	3	++		3	+/++
	4	++		4	±/+
	5	++/+++		5	+/++
CRM/ Aβ 1-9	1	++/+++	CRM/ Aβ 1-9	1	+/++
	2	++		2	++
	3	++		3	++
	4	+		4	±
	5	+		5	+/++
CRM/ Aβ 1-12	1	-	CRM/ Aβ 1-12	1	+/++
	2	+/++		2	+
	3	+/++		3	-
	4	±		4	+/++
	5	±		5	+
CRM/ Aβ 12-1mer	1	-	Aβ 42	1	±
	2	-		2	-
	3	-		3	-
	4	-		4	-
	5	-		5	-

All antiserum diluted 1:1000 for staining procedure.

EXAMPLE 7

Immunogenicity Studies in Monkeys

[0165] Groups of 6 monkeys received 30 ug of 7mer conjugate (total conjugate) adjuvanted with either STIMULON™ QS-21, alum or RC529 SE formulation at days 0, 29 and 58. Additional groups included were 30 ug 5mer conjugate with either alum ($Al(OH)_3$) or RC529 SE, 75 and 300µg of Aβ with STIMULON™ QS-21 as positive controls. Positive controls were immunized every two weeks. At day 36 and 64 the anti-Aβ antibody titers were determined (Figures 7 - 9). On day 36, 7mer/CRM conjugates with STIMULON™ QS-21,

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Alum and RC529 SE elicited GMT titers of 10110, 13330 and 17090 respectively (Figure 7). In contrast, Aβ 1-42 plus STIMULON™ QS-21 elicited GMTs of 223 and 1734 at 75 and 300μg dose levels, respectively. The Aβ 5mer conjugate elicited a titer of 2134 with alum and 15980 with RC529 SE. On day 64, i.e. after 3 doses of conjugates with either STIMULON™ QS21 or RC-529 SE induced substantially higher titers than post second dose (GMTs 69910 for 7 mer/RC-529 SE; 21640 for Aβ 5mer/RC-529 SE and 30310 for Aβ 7mer/STIMULON™ QS-21) (Figure 8). Conjugates with alum elicited reduced titers at post third immunization compared to post second immunization. It appears that the Aβ 7mer conjugate elicited a better response as compared to the Aβ 5mer conjugate. In monkeys, adjuvanting Aβ 7mer conjugate with RC-529 SE or STIMULON™ QS-21 elicited the highest response (Figure 9). The response to the Aβ 7mer conjugate with alum was moderate and similar to that of 300ug Aβ 1-42 with STIMULON™ QS-21.

[0166] Several conclusions can be drawn from the current example. First, both conjugates are very immunogenic in primate species. Second, the presence of adjuvants in the immunization formulation significantly influences the immune response. Third, except for the aluminum adjuvant, RC-529 SE and STIMULON™ QS-21 enhance the immune response after each dose of immunization at least up to three doses (Figures 9). Overall, Aβ 7mer conjugate induced higher antibody response in the presence of 529, followed by STIMULON™ QS-21 (*see* Figure 9).

EXAMPLE 8

Preparation of Multiple Antigenic Peptide (MAP) Conjugates and their Immunogenicity Study

[0167] Several methods are available for generating multiple antigenic sites on the carriers. In the previous examples, each antigenic site is separately conjugated to the carrier by defined conjugation and capping chemistries. In this example, multiple antigenic sites are constructed by solid phase synthesis of tandem repeats of Aβ1-7 mer. Alternatively these tandem repeats can be coupled with T-cell epitopes with or without linking through a lysine core as described elsewhere. These multiple antigenic peptides were synthesized with an additional cysteinyl residue for conjugation to the carrier protein. Peptides containing one repeat unit (1-7), three repeat units $(1\text{-}7)_3$ and five repeat units $(1\text{-}7)_5$ with an additional cysteinyl residue at the carboxyl end were synthesized. These peptides were covalently attached to bromoacetylated CRM overnight through their C-terminal cysteine residues. The reaction was carried out at pH 9.0-9.2 with peptide:CRM ratios added as outlined in Table 8.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Bromoacetyl groups, which did not react with peptide, were capped with N-acetylcysteamine. These lots represent conjugates containing one single copy, three tandem copies, and five tandem copies of the Aβ1-7 peptide conjugated to CRM, respectively. Table 8 briefly outlines the properties of the samples.

Table 8
Multiple Antigenic Peptide (MAP) Conjugate Samples

Conjugate	Peptide: CRM (w/w)	pH of reaction
$Ab(1\text{-}7)_1$/CRM	0.37	8.99
$Ab(1\text{-}7)_3$/CRM	1.02	8.95
$Ab(1\text{-}7)_5$/CRM	1.67	9.17

[0168] Peptide load (the average number of Aβ 1-7 peptides per carrier) and capping numbers (Table 9) are the numbers of unique amino acids (CMC or CMCA) per carrier as determined by amino acid analysis. The CMC and CMCA values were referenced to lysine.

Table 9
Degree of Conjugation and Capping of Each Conjugate

CONJUGATE	Peptide Load (CMC)	Capping (CMCA)
$A\beta(1\text{-}7)_1$/CRM	12.5	11.7
$A\beta(1\text{-}7)_3$/CRM	10.4	15.2
$A\beta(1\text{-}7)_5$/CRM	9.8	15.9

[0169] Swiss-Webster mice (10 per group) were immunized subcutaneously with 1 or 0.1 μg Aβ/CRM conjugated peptide. Half of the mice were immunized with the composition formulated with 100 μg of the adjuvant $Al(OH)_3$, and half were immunized without adjuvant. Immunizations were scheduled at weeks 0 and 3. Bleeds were scheduled for weeks 0, 3, and 6. Serum samples were analyzed for antibody response against Aβ1-42 mer peptide. The results are shown in Table 10.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Table 10

Anti-Aβ Endpoint Titers for Multiple Antigenic Peptide (MAP) Conjugates

Group Code	Sample Description	Adjuvant	Wk 0 Pool	Wk 3 GMT	Wk 6 GMT
AG332	1 μg Aβ $(1\text{-}7)_1$/CRM	$Al(OH)_3$	<100	18,096	100,279
AG333	1 μg Aβ $(1\text{-}7)_3$/CRM	$Al(OH)_3$	<100	44,911	420,235
AG334	1 μg Aβ $(1\text{-}7)_5$/CRM	$Al(OH)_3$	<100	27,032	394,488
AG335	0.1 μg Aβ $(1\text{-}7)_1$/CRM	$Al(OH)_3$	<100	19,350	66,834
AG336	0.1 μbg Aβ $(1\text{-}7)_3$/CRM	$Al(OH)_3$	<100	13,307	208,272
AG337	0.1 μg Aβ $(1\text{-}7)_5$/CRM	$Al(OH)_3$	<100	1,196	22,665
AG338	1 μg Aβ $(1\text{-}7)_1$/CRM	None	<100	5,273	370,980
AG339	1 μg Aβ $(1\text{-}7)_3$/CRM	None	<100	9,299	541,093
AG340	1 μg Aβ $(1\text{-}7)_5$/CRM	None	<100	3,100	185,272
AG341	0.1 μg Aβ $(1\text{-}7)_1$/CRM	None	<100	340	25,839
AG342	0.1 μg Aβ $(1\text{-}7)_3$/CRM	None	<100	128	5,553
AG343	0.1 μg Aβ $(1\text{-}7)_5$/CRM	None	<100	668	2,098

[0170] All conjugates induced anti-Aβ 1-42 antibody titer after primary immunization and the levels were substantially increased after the booster dose. In the absence of aluminum adjuvant, the differences in dose response were evident both at week 3 and week 6 bleeds. The higher dose elicited high-titered antibody response. Aluminum adjuvant elicited substantially higher antibody response at week 3 at both dose levels (0.1 and 1 μg) as compared to the unadjuvanted groups. After secondary immunization, conjugates given at 1 μg dose elicited 5 to 10 fold increase in antibody levels. At this dose level peptide conjugates with 3 and 5 repeats induced higher antibody response than a single repeat containing conjugate. The titers against the CRM carrier were also determined, and these are listed in Table 11.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Table 11
Anti-CRM Endpoint Titers for Multiple Antigenic Peptide (MAP) Conjugates

Group Code	Sample Description	Adjuvant	Wk 0 Pool	Wk 3 GMT	Wk 6 GMT
AG332	1 μg Aβ(1-7)$_1$/CRM	Al(OH)$_3$	<50	10,531	114,602
AG333	1 μg Aβ(1-7)$_3$/CRM	Al(OH)$_3$	<50	4,274	83,065
AG334	1 μg Aβ(1-7)$_5$/CRM	Al(OH)$_3$	<50	1,680	49,320
AG335	0.1 μg Aβ(1-7)$_1$/CRM	Al(OH)$_3$	<50	1,114	13,231
AG336	0.1 μg Aβ(1-7)$_3$/CRM	Al(OH)$_3$	<50	197	1,484
AG337	0.1 μg Aβ(1-7)$_5$/CRM	Al(OH)$_3$	<50	65	222
AG338	1 μg Aβ(1-7)$_1$/CRM	None	<50	35	309
AG339	1 μg Aβ(1-7)$_3$/CRM	None	<50	29	1,085
AG340	1 μg Aβ(1-7)$_5$/CRM	None	<50	29	542
AG341	0.1 μg Aβ(1-7)$_1$/CRM	None	<50	25	55
AG342	0.1 μg Aβ(1-7)$_3$/CRM	None	<50	25	34
AG343	0.1 μg Aβ(1-7)$_5$/CRM	None	<50	29	ND

Animals were immunized at weeks 0 and 3 and bled at weeks 0, 3, and 6. Adjuvant: 100 μg Al(OH)$_3$ or none. ND=Not Determined.

[0171] Data in Table 11 indicates that the unadjuvanted groups induced very low levels of anti-CRM antibody response at both 1μg as well as 0.1μg dose levels even after two immunizations. However conjugates with aluminum hydroxide adjuvant induced substantial levels of anti-CRM antibody response at 1μg dose and much lower response at 0.1μg dose. In the presence of the adjuvant, CRM titers were highest for the single repeat conjugate, intermediate for the triple repeat conjugate, and lowest for the quintuple repeat conjugate. This is as expected, since the CRM dose per peptide dose is lowest for Aβ(1-7)$_5$/CRM, and highest for Aβ(1-7)$_1$/CRM. The differences were only statistically significant at week 6 for the 0.1μ μg dose.

[0172] The objective of the current invention is to elicit high titered immunogenic response against the antigenic hapten and not necessarily against the carrier protein. Under certain

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

circumstances it is desirable to elicit optimal immune response against the hapten antigenic determinant with least or no immune response against the carrier protein. For such applications, conjugates with tandem repeats of multiple antigenic determinants with unadjuvanted formulation will serve the need.

EXAMPLE 9

Preparation of Aβ-Peptide Conjugates with Various Carrier Proteins and their Immunogenicity

[0173] This example compares the immunogenicity of conjugates using six different carrier proteins. The acetate salt of Aβ1-7 was added to bromoacetylated carriers in a 1:1 ratio by weight at pH 9. All conjugates except Aβ1-7/rC5ap were capped with N-acetylcysteamine. All of the alternative carriers are recombinant bacterial proteins, including CRM (diphtheria toxoid), recombinant C5a peptidase (rC5ap; cloned from *Streptococcus agalactiae*, includes D130A and S512A mutations), ORFs 1224, 1664, 2452 (all cloned from *Streptococcus pyogenes*), and T367, T858 (each cloned from *Chlamydia pneumoniae*). A summary of the carriers used is found in Table 12. The degree of conjugation and capping of each Aβ 1-7 conjugate to these carriers are presented in Table 13.

[0174] This study showed that the recombinant C5a peptidase conjugate induced higher titers against Aβ than most of the other carriers tested, including CRM. This difference was statistically significant for week 6 titers of groups that received aluminum hydroxide. In addition, the Aβ1-7/T858 conjugate was significantly more immunogenic than most other conjugates in the absence of adjuvant. The only conjugate that performed poorly relative to the CRM control conjugate was Aβ1-7/T367, a conjugate that also did not react with an Aβ specific monoclonal antibody by Western blot. This study confirms that numerous other carriers can be successfully used to immunize against the Aβ peptide.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Table 12

List of Carriers and Conjugate Properties

CARRIER PROTEIN	MW of carrier (Da)	# of lysines
CRM	58, 408	39
rC5ap	108, 560	85
ORF1224	30, 950	18
ORF1664	31, 270	38
ORF2452	31, 790	29
T367	49, 700	29
T858	37, 190	23

Table 13

Degree Of Conjugation and Capping of Each Conjugate

CONJUGATE	Peptide load (CMC)	Capping (CMCA)
Aβ1-7/rC5ap	25.9	-
Aβ1-7/ORF1224	12.8	5.7
Aβ1-7/ORF1664	13.4	10.8
Aβ1-7/ORF2452	12.03	10.5
Aβ1-7/T367	13.2	8.2
Aβ1-7/T858	5.2	1.7

Conjugation results: Peptide load (the average number of Aβ1-7 peptides per carrier) and capping number are the numbers of unique amino acids (CMC or CMCA) per carrier as determined by amino acid analysis. The CMC and CMCA values were referenced to lysine.

Immunization Results

[0175] The geometric mean titer for each group in this study is listed in Table 14. At week 3, regardless of the presence of adjuvant, Aβ1-7/rC5ap induced significantly higher anti-Aβ titers than the corresponding conjugates prepared with *Streptococcus pyogenes* ORFs 1224, 1664, 2452, or *Chlamydia pneumoniae* ORFs T367 and T858. At week 3 in the absence of

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

adjuvant, Aβ1-7/rC5ap was also more immunogenic than all other conjugates except Aβ1-7/T858. The T858 conjugate without $Al(OH)_3$ induced higher titers than the ORF1224, ORF1664, ORF2452, and CRM conjugates without adjuvant. The only conjugate that was significantly less immunogenic than Aβ1-7/CRM was Aβ1-7/T367 ($p< 0.00002$). The T367 carrier performed poorly with or without adjuvant at both weeks 3 and 6. At week 6, the rC5ap conjugate with aluminum hydroxide was more immunogenic ($p<0.04$) than all the other conjugates except Aβ 1-7/ORF2452. In the absence of adjuvant, both Aβ1-7/rC5ap and Aβ1-7/T858 induced significantly higher titers than the ORF1224, ORF1664, or T367 conjugates. Aβ1-7/CRM without aluminum hydroxide induced higher titers than either Aβ1-7/ORF1664 or Aβ1-7/T367.

TABLE 14

Anti-Aβ1-42 Endpoint Titers.

GROUP CODE	SAMPLE DESCRIPTION	ADJUVANT	WK 0 POOL	WK 3 GMT	WK 6 GMT
AG344	5 μg Aβ1-7/CRM	$Al(OH)_3$	<100	21,404	54,157
AG345	5 μg Aβ1-7/rC5ap	$Al(OH)_3$	<100	61,967	402,972
AG346	5 μg Aβ1-7/ORF1224	$Al(OH)_3$	<100	10,711	30,084
AG347	5 μg Aβ1-7/ORF1664	$Al(OH)_3$	<100	7,188	43,226
AG348	5 μg Aβ1-7/ORF2452	$Al(OH)_3$	<100	11,437	109,091
AG349	5 μg Aβ1-7/T367	$Al(OH)_3$	<100	321	5,139
AG350	5 μg Aβ1-7/T858	$Al(OH)_3$	<100	16,656	33,328
AG351	5 μg Aβ1-7/CRM	None	<100	2,615	119,488
AG352	5 μg Aβ1-7/rC5ap	None	<100	11,858	279,113
AG353	5 μg Aβ1-7/ORF1224	None	<100	1,674	18,719
AG354	5 μg Aβ1-7/ORF1664	None	<100	119	9,832
AG355	5 μg Aβ1-7/ORF2452	None	<100	2,493	76,038
AG356	5 μg Aβ1-7/T367	None	<100	50	620
AG357	5 μg Aβ1-7/T858	None	<100	28,820	275,202

Animals were immunized at weeks 0 and 3 and bled at weeks 0, 3, and 6. Dose is based on the total amount of conjugate. Adjuvant: 100 μg $Al(OH)_3$ or none.

EXAMPLE 10

Preparation of Additional Aβ Peptide-Protein Conjugates

I. Activation

[0176] Thawed CRM_{197} (8 mL, 59.84 mg, at 7.48mg/mL) was dissolved in 0.1 M borate buffer (pH 9, 3.968 mL) to bring the concentration to 5 mg/mL. The solution was cooled in

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

an ice bath to 0-5°C. Bromoacetic acid N-hydroxysuccinimide (59.9mg) (Aldrich-Sigma) was dissolved in DMF (100 µL) (Aldrich-Sigma) and added dropwise, to the solution of CRM_{197}. Upon addition of the bromoacetic acid N-hydroxysuccinimide, a precipitate was observed. When the pH was checked, it decreased to pH 6. The pH of the reaction mixture was brought back to pH 9 by adding more 0.1 M borate buffer. Reaction mixture was then stirred at 4°C for 1 hr, with gentle swirling. The mixture was purified and concentrated using YM-10 centriprep centrifugal concentration and repurified on Sephadex G-25 using 10 mM borate as the eluent. Fractions positive to Bradford Reagent were pooled and concentrated using centriprep YM-10. The degree of bromoacetylation was determined by Bradford assay (linear). The concentration was found to be 5.36 mg/mL (Yielded 30mg). The final concentration was then adjusted to be 5 mg/mL and was stored in the freezer in 5% sucrose until further use.

II Conjugation

[0177] For each conjugation, thawed bromoacetylated CRM_{197} was used. Peptides were dissolved in borate buffer (2.5mg in 125 ml of 0.1 M borate buffer). Slight insolubility was observed with Aβ peptides KLVFFAEDC (SEQ ID NO:45), CLVFFAEDV (SEQ ID NO:47), CKLVFFAED (SEQ ID NO:48), and LVFFAEDC (SEQ ID NO:50). Bromoacetylated CRM_{197} (5mg/mL) was treated with the peptide solutions/suspensions. The ratio of the peptide and protein in the mixture was 1:2. Turbidity was observed in the conjugate mixtures with peptides KLVFFAEDC (SEQ ID NO:45), CLVFFAEDV (SEQ ID NO:47), CKLVFFAED (SEQ ID NO:48), and KLVFFAEDC (SEQ ID NO:45). The mixtures were then checked for pH (pH 9) and incubated at 4°C overnight with slow swirling. Final concentrations of the mixtures were made to 3 mg/mL before incubation. The turbidity of the conjugate mixtures with peptides CLVFFAEDV (SEQ ID NO:47) and LVFFAEDC (SEQ ID NO:50) disappeared after incubation. However, KLVFFAEDC (SEQ ID NO:45) and CKLVFFAED (SEQ ID NO:48) were still slightly turbid. Soluble mock protein conjugate was also prepared with cysteamine at a ratio of 1: 1 (w/w). Synthesized peptides were obtained from BIOSOURCE with about 95% purity.

Octamers:

LVFFAEDVC (SEQ ID NO:44)

KLVFFAEDC (SEQ ID NO:45)

VFFAEDVGC (SEQ ID NO:43)

CLVFFAEDV (SEQ ID NO:47)

CKLVFFAED (SEQ ID NO:48)

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

CVFFAEDVG (SEQ ID NO:46)

Heptamers:

VFFAEDVC (SEQ ID NO:49)

LVFFAEDC (SEQ ID NO:50)

III. Capping Unreacted Lysine Groups on Protein:

[0178] The unreacted lysines were capped with N-acetylcysteamine (CMCA; Aldrich-Sigma) at a ratio of 1/1 (w/w) for 4 hr at 4°C while swirling in the dark. The unreacted peptides and capping reagents were removed from the conjugates by dialysis using Slide-A-Lyzer cassette (M_w cut off 10,000) (Pierce) against PBS buffer (2 L) overnight (13 hr). Buffer exchange and dialysis was done twice (2 x 14 hr). Slight insolubility was observed in the conjugates with peptides KLVFFAEDC (SEQ ID NO:45) and CKLVFFAED (SEQ ID NO:48). All conjugates were then stored in the refrigerator at 4°C in a perservative.

IV. Characterization of the Protein Carrier:

[0179] MALDI-TOF MS was used to determine the mass of bromoacetylated CRM_{197} and the mass of the mock conjugate N-acetylcysteamine-CRM_{197}.

Based on the masses of the CRM_{197} and bromoacetylated CRM_{197}, 11 lysine residues were modified.

(59941.46- 58590.29)/122 = 11

Where; Mw of CRM_{197} is 58624.29

Mw of bromoacetylated CRM_{197} is 59941.46

Mw of bromoacetate is 122

[0180] The degree of bromoacetylation was more than 28%. (The total number of lysines in CRM_{197} was 39). From these 11 modified lysine residues, 10 were coupled with cysteamine. The coupling efficiency was 90%.

(61143- 59941)/119 = 10

Where; Mw of bromoacetylated CRM_{197} is 59941.46

Mw of mock conjugate is 61143

Mw of the N-acetylcysteamine is 119

(10/11) x 100 = 90

V. Characterization of the Peptide-Protein Conjugates by SDS-PAGE Western Blot Analysis with Tris-Tricine Precast Gel:

[0181] The protein-peptide conjugates were analyzed by Western blot. The lanes are: marker (lane 1); L-28375 24/01 (lane 2); L-28375 24/02 (lane 3); L-28375 24/03 (lane 4); L-28375 24/04 (lane 5); L-28375 24/05 (lane 6); L-28375 24/06 (lane 7) L-28375 24/07 (lane 8); L-

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

28375 24/08 (lane 9); L-28375 24/09 (Mock) (lane 10); and, $BrAcCRM_{197}$ (lane 11). A peptide specific monoclonal antibody from mice (248 – 6H9 – 806 Aβ 17-28) was used as the primary antibody (antisera) (1:3000 dilution was found to be the best). Goat-Anti mouse IgG (H+L)-HPR was the secondary antibody (1:1000 dilution). It was observed that all the conjugates were recognized by the primary antibody, except for the mock conjugate and the activated CRM_{197}. (*See* Figure 10.)

Protein Concentration

[0182] Protein concentrations of the conjugate samples were determined by the Pierce BCA assay. (*See* Table 15.)

Amino Acid Analysis

[0183] Amino acid analysis was carried out to determine the degree of conjugation. T degree of conjugation was calculated based on the CMCA (carboxymethylcysteamine) residues found in the conjugates. CMCA was used to cap the unreacted activated sites after conjugation with the peptides. (*See* Table 15.)

Table 15

Degree of Conjugation of Peptides with $BrAcCRM_{197}$

Conjugate Code	Peptide Sequence (SEQ ID NO:)	Final Concentration (mg/mL)	Degree of Conjugation (Based on CMCA)
L-28375 24/01	LVFFAEDV-C (SEQ ID NO:44)	1.67	8/10
L-28375 24/02	KLVFFAED-C (SEQ ID NO:45)	0.82	5/10
L-28375 24/03	VFFAEDVG-C (SEQ ID NO:43)	1.43	8/10
L-28375 24/04	C-LVFFAEDV (SEQ ID NO:47)	1.04	9/10
L-28375 24/05	C-KLVFFAED (SEQ ID NO:48)	0.78	1/10
L-28375 24/06	C-VFFAEDVG (SEQ ID NO:46)	0.97	9/10
L-28375 24/07	VFFAEDV-C (SEQ ID NO:49)	1.00	7/10
L-28375 24/08	LVFFAED-C	0.99	8/10

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Conjugate Code	Peptide Sequence (SEQ ID NO:)	Final Concentration (mg/mL)	Degree of Conjugation (Based on CMCA)
	(SEQ ID NO:50)		
L-28375 24/09 (Mock)		1.89	10/11

[0184] All colorimetric assays were performed using microplate spectrophotometer and SOFTmax Pro.

EXAMPLE 11

Immunogenic Studies of Aβ Peptide Conjugates in Swiss Webster Mice

[0185] Outbred Swiss Webster mice were immunized with VFFAEDVG-C (SEQ ID NO:43), LVFFAEDV-C (SEQ ID NO:44), KLVFFAED-C (SEQ ID NO:45), C-VFFAEDVG (SEQ ID NO:46), C-LVFFAEDV (SEQ ID NO:47), C-KLVFFAED (SEQ ID NO:48), VFFAEDV-C (SEQ ID NO:49), LVFFAED-C (SEQ ID NO:50) each conjugated to CRM_{197}, or with Aβ1–7CRM_{197}, all formulated with the adjuvant RC 529 SE. Nine groups of 10 animals per group were immunized subcutaneously with one of the Aβ peptide conjugates at the beginning of the study (week 0) and subsequently at week 4. Serum was collected prior to, but on the same days as immunization.

Immunogenic Studies of Aβ Peptide Conjugates in Inbred Balb/c Mice

[0186] Inbred Balb/c mice were immunized as in the preceding paragraph, but were also boosted with conjugate and adjuvant at week 12.

Results

[0187] Sera from both studies are being collected for analysis of $A\beta_{13-28}$ peptide-specific IgG antibody titer. Sera from Balb/c mice are also collected for analysis one day prior to the week 12 boost, and one week thereafter. Spleen cells from animals used in Example 11 are evaluated for their potential to respond *in-vitro* to stimulation with an overlapping pool of peptides spanning $A\beta_{1-42}$, full length $A\beta_{1-42}$, CRM_{197}, or polyclonal activators. Analysis is comprised of Elispot readout for interleukins 4 and 5, and interferon-gamma. Upon completion, the Aβ peptide conjugates are be evaluated as described above and as described in Example 6.

EXAMPLE 12

Immunogenic Studies of Aβ Peptide Conjugates in PSAPP Mice

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

[0188] PSAPP mice are immunized with VFFAEDVG-C (SEQ ID NO:43), LVFFAEDV-C (SEQ ID NO:44), KLVFFAED-C (SEQ ID NO:45), C-VFFAEDVG (SEQ ID NO:46), C-LVFFAEDV (SEQ ID NO:47), C-KLVFFAED (SEQ ID NO:48), VFFAEDV-C (SEQ ID NO:49), LVFFAED-C (SEQ ID NO:50). The PSAPP mouse, a doubly transgenic mouse (PSAPP) overexpressing mutant APP and PS1 transgenes, is described in Holcomb, *et al.* (1998) *Nature Medicine* 4:97-11.

Immunogenic Studies of Aβ Peptide Conjugates in PDAPP Mice

[0189] PDAPP mice are immunized with VFFAEDVG-C (SEQ ID NO:43), LVFFAEDV-C (SEQ ID NO:44), KLVFFAED-C (SEQ ID NO:45), C-VFFAEDVG (SEQ ID NO:46), C-LVFFAEDV (SEQ ID NO:47), C-KLVFFAED (SEQ ID NO:48), VFFAEDV-C (SEQ ID NO:49), LVFFAED-C (SEQ ID NO:50) The PDAPP mouse expresses a mutant form of human APP (APP^{V717F}) and develops Alzheimer's disease at a young age (Bard, *et al.* (2000) *Nature Medicine* 6:916-919; Masliah E, *et al.* (1996) *J Neurosci.* 15;16(18):5795-811).

Results

[0190] Sera from both studies are collected for analysis of $A\beta_{13-28}$ peptide-specific IgG antibody titer. Upon completion, the Aβ peptide conjugates will be evaluated as described above and as described in Examples 6 and 11, as well as in the contextual fear conditioning (CFC) assay.

[0191] Contextual fear conditioning is a common form of learning that is exceptionally reliable and rapidly acquired in most animals, for example, mammals. Test animals learn to fear a previously neutral stimulus and/or environment because of its association with an aversive experience. (*see, e.g.*, Fanselow, *Anim. Learn. Behav.* 18:264-270 (1990); Wehner *et al.*, *Nature Genet.* 17:331-334. (1997); Caldarone *et al.*, *Nature Genet.* 17:335-337 (1997)).

[0192] Contextual fear conditioning is especially useful for determining cognitive function or dysfunction, *e.g.*, as a result of disease or a disorder, such as a neurodegenerative disease or disorder, an Aβ-related disease or disorder, an amyloidogenic disease or disorder, the presence of an unfavorable genetic alteration effecting cognitive function (*e.g.*, genetic mutation, gene disruption, or undesired genotype), and/or the efficacy of an agent, *e.g.*, an Aβ conjugate agent, on cognitive ability. Accordingly, the CFC assay provides a method for independently testing and/or validating the therapeutic effect of agents for preventing or treating a cognitive disease or disorder, and in particular, a disease or disorder affecting one or more regions of the brains, *e.g.*, the hippocampus, subiculum, cingulated cortex, prefrontal cortex, perirhinal cortex, sensory cortex, and medial temporal lobe.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

[0193] Typically, the CFC assay is performed using standard animal chambers and the employment of conditioning training comprising a mild shock (*e.g.*, 0.35mA foot shock) paired with an auditory (*e.g.*, a period of 85 db white noise), olfactory (*e.g.*, almond or lemon extract), touch (*e.g.*, floor cage texture), and/or visual cue (light flash). The response to the aversive experience (shock) is typically one of freezing (absence of movement except for respiration) but may also include eye blink, or change in the nictitating membrane reflex, depending on the test animal selected. The aversive response is usually characterized on the first day of training to determine a baseline for unconditioned fear, with aversive response results on subsequent test days, *e.g.*, freezing in presence of the context and/or cue but in the absence of the aversive experience, being characterized as context and cue conditioned fear, respectively. For improved reliability, test animals are typically tested separately by independent technicians and scored over time. Additional experimental design details can be found in the art, for example, in Crawley, JN, *What's Wrong with my Mouse; Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice*, Wiley-Liss, NY (2000).

[0194] Exemplary test animals (*e.g.*, model animals) include mammals (*e.g.* rodents or non-human primates) that exhibit prominent symptoms or pathology that is characteristic of an amyloidogenic disorder such as Alzheimer's. Model animals may be created by selective inbreeding for a desired or they may genetically engineered using transgenic techniques that are well-known in the art, such that a targeted genetic alteration (*e.g.* a genetic mutation, gene disruption) in a gene that is associated with the dementia disorder, leading to aberrant expression or function of the targeted gene. For example, several transgenic mouse strains are available that overexpress APP and develop amyloid plaque pathology and/or develop cognitive deficits that are characteristic of Alzheimer's disease (see for example, Games *et al.*, *supra*, Johnson-Wood *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:1550 (1997); Masliah E and Rockenstein E. (2000) *J Neural Transm Suppl.*;59:175-83).

[0195] Alternatively, the model animal can be created using chemical compounds (*e.g.* neurotoxins, anesthetics) or surgical techniques (*e.g.* stereotactic ablation, axotomization, transection, aspiration) that ablate or otherwise interfere with the normal function of an anatomical brain region (*e.g.* hippocampus, amygdala, perirhinal cortex, medial septal nucleus, locus coeruleus, mammalary bodies) or specific neurons (*e.g.* serotonergic, cholinergic, or dopaminergic neurons) that are associated with characteristic symptoms or pathology of the amyloidogenic disorder. In certain preferred embodiments, the animal model exhibits a prominent cognitive deficit associated with learning or memory in addition

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

to the neurodegenerative pathology that associated with a amyloidogenic disorder. More preferably, the cognitive deficit progressively worsens with increasing age, such that the disease progression in the model animal parallels the disease progression in a subject suffering from the amyloidogenic disorder.

[0196] Contextual fear conditioning and other *in vivo* assays to test the functionality of the conjugates described herein may be performed using wild-type mice or mice having a certain genetic alteration leading to impaired memory or mouse models of neurodegenerative disease, *e.g.*, Alzheimer's disease, including mouse models which display elevated levels of soluble Aβ in the cerebrospinal fluid (CSF) or plasma. For example, animal models for Alzheimer's disease include transgenic mice that overexpress the "Swedish" mutation of human amyloid precursor protein (*hAPPswe;* Tg2576) which show age-dependent memory deficits and plaques (Hsiao *et al.* (1996) *Science* 274:99-102). The *in vivo* functionality of the conjugates described herein can also be tested using the PS-1 mutant mouse, described in Duff, *et al.* (1996) *Nature* 383, 710-713. Other genetically altered transgenic models of Alzheimer's disease are described in Masliah E and Rockenstein E. (2000) *J Neural Transm Suppl.* 59:175-83.

[0197] In various aspects, the methods of the invention comprise the administration of an Aβ conjugate that is capable of improving cognition in a subject wherein the Aβ conjugate has been identified in using an assay which is suitably predictive of immunotherapeutic efficacy in the subject. In exemplary embodiments, the assay is a model animal assay that is based, at least in part, on comparing cognition, as determined from a contextual fear conditioning study, of an animal after administration of a test immunological reagent to the animal, as compared to a suitable control. The CFC assay evaluates changes in cognition of an animal (typically a mouse or rat) upon treatment with a potential therapeutic compound. In certain embodiments, the change in cognition evaluated is an improvement in memory impairment status or a reversal of memory deficit. Accordingly, the CFC assay provides a direct method for determining the therapeutic effect of agents for preventing or treating cognitive disease, and in particular, a disease or disorder affecting one or more regions of the brains, e.g., the hippocampus, subiculum, cingulated cortex, prefrontal cortex, perirhinal cortex, sensory cortex, and medial temporal lobe. Such CFC assays are discussed in copending U.S. Patent Application Serial No. 60/XXX,XXX entitled "Contextual Fear Conditioning for Predicting Immunotherapeutic Efficacy" (bearing Attorney Docket No. ELN-058-1), filed on December 15, 2004, and U.S. Patent Application Serial No. 60/XXX,XXX entitled "Contextual Fear

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Conditioning for Predicting Immunotherapeutic Efficacy" (bearing Attorney Docket No. ELN-058-2) the entire contents of which are hereby incorporated by reference.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

BIBLIOGRAPHY

Bernatowicz, M.S., and Matsueda, G.R. (1986) *Analytical Biochemistry* 155: 95-102.

Kniskern, P.J., and Marburg, S. (1994) *Development and Clinical Uses of Haemophilus b Conjugate Vaccines: Conjugation: Design, Chemistry, and Analysis* Ellis, R.W., and Granoff, D.M., Eds; Marcel Dekker, Inc: New York, NY, 37-70

Arrizon, V., Biechler, R., Cummings, J., and Harbaugh, J. (1991) *High-Performance Liquid Chromatography of Peptide and Proteins: Separation, Analysis, and Conformation* Mant, C.T. and Hodges, R.S., Eds; CRC Press: Boca Raton, FL, 859-863.

Carlsson, J. *et al.* (1978) *Biochem J*, 173: 723.

Means, G.E., Cangdon, W.L, and Bender, M.I. (1972) *Biochemistry* 11: 3564-3574.

Glenner & Wong (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120: 1131

Hardy (1984) *Trends in Neurosciences* 20: 1131.

Hardy (1977) *Trends in Neurosciences* 20: 154.

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

Goebel *et al.*, (1939) *J. Exp. Med.* 69: 5 3.

Schneerson *et al.* (1980) *J. Exp. Med.* 152: 361-376.

Chu *et al.* (1983) *Infect. Immun.* 40: 245.

Schneerson *et al.* (1984) *Infect. Immun.* 45: 582-591.

Anderson *et al.* (1985) *J. Pediatr.* 107: 346.

Insel *et al.* (1986) *J. Exp. Med.* 158: 294.

U.S. Patent No. 4,673,574 Jun., 1987 Anderson

U.S. Patent No. 4,902,506 Feb., 1990 Anderson et al

U.S. Patent No. 5,192,540 Mar., 1993 Kuo et al.

U.S. Patent No. 5,306,492 Apr., 1994 Porro

U.S. Patent No. 5,360,897 Nov., 1994 Anderson et al.

U.S. Patent No. 5,785,973 Jul., 1998 Bixler et al

U.S. Patent No. 6,361,777 Mar., 2002 Hoogerhout

Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (C.S.H. P. Pres, NY 2d ed., 1989)

Bernatowicz, M. S., and Matsueda, G. R. (1986) *Analytical Biochemistry* 155, 95-102.

Kniskern, P.J., and Marburg, S. (1994) *Development and Clinical Uses of Haemophilus b Conjugate Vaccines: Conjugation: Design, Chemistry, and Analysis* Ellis, R.W., and Granoff, D.M., Eds; Marcel Dekker, Inc: New York, NY, 37-70

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Arrizon, V., Biechler, R., Cummings, J., and Harbaugh, J. (1991) *High-Performance Liquid Chromatography of Peptide and Proteins: Separation, Analysis, and Conformation* Mant, C.T. and Hodges, R.S., Eds; CRC Press: Boca Raton, FL, 859-863.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method for conjugating a peptide immunogen comprising Aβ peptide or fragments of Aβ or analogs thereof via a reactive group of an amino acid residue of the peptide immunogen to a protein/polypeptide carrier having one or more functional groups, the method comprising the steps of:

(a) derivatizing one or more of the functional groups of the protein/polypeptide carrier or optionally to a polypeptide linker attached to the protein/polypeptide carrier to generate a derivatized carrier with reactive sites;

(b) reacting the derivatized protein/polypeptide carrier of step (a) with a reactive group of an amino acid of the peptide immunogen comprising Aβ peptide or fragments of Aβ or analogs thereof under reaction conditions such that the peptide immunogen is conjugated to the derivatized protein/polypeptide carrier via at least one of the reactive sites, thereby forming a conjugate; and

(c) further reacting the conjugate with a capping reagent to inactive free, reactive unreacted reactive sites on the derivatized protein/polypeptide carrier, whereby the conjugate elicits a desired immune against the Aβ peptide.

2. The method of claim 1, wherein the carrier is selected from the group consisting of human serum albumin, keyhole limpet hemocyanin (KLH), immunoglobulin molecules, thyroglobulin, ovalbumin, influenza hemagglutinin, PADRE polypeptide, malaria circumsporozite (CS) protein, hepatitis B surface antigen (HBSAg19-28), Heat Shock Protein (HSP) 65, Mycobacterium tuberculosis, cholera toxin, cholera toxin mutants with reduced toxicity, diphtheria toxin, CRM197 protein that is cross-reactive with diphtheria toxin, recombinant Streptococcal C5a peptidase, Streptococcus pyogenes ORF1224, Streptococcus pyogenes ORF1664, Streptococcus pyogenes ORF2452, Streptococcus pneumoniae pneumolysin, pneumolysin mutants with reduced toxicity, Chlamydia pneumoniae ORF T367, Chlamydia pneumoniae ORF T858, Tetanus toxoid, HIV gp120 T1, components recognizing microbial surface adhesive matrix molecules (MSCRAMMS), growth factors, hormones, cytokines and chemokines.

3. The method according to claim 1, wherein the carrier contains a T-cell epitope.

4. The method according to claim 3, wherein the carrier is a bacterial toxoid.

5. The method according to claim 3, wherein the carrier is influenza hemagglutinin.

6. The method according to claim 3, wherein the carrier is the PADRE polypeptide.

7. The method according to claim 3, wherein the carrier is malaria circumsporozite (CS) protein.

8. The method according to claim 3, wherein the carrier is Hepatitis B surface antigen (HBSAg19-28).

9. The method according to claim 3, wherein the carrier is heat shock protein 65 (HSP 65).

10. The method according to claim 3, wherein the carrier is a polypeptide from Mycobacterium tuberculosis (BCG).

11. The method according to claim 4, wherein the carrier is tetanus toxoid.

12. The method according to claim 4, wherein the bacterial toxoid is CRM 197.

13. The method according to claim 3, wherein the carrier is recombinant Streptococcal C5a peptidase.

14. The method according to claim 3, wherein the carrier is Streptococcus pyogenes ORF 1224.

15. The method according to claim 3, wherein the carrier is Streptococcus pyogenes ORF 1664.

16. The method according to claim 3, wherein the carrier is Streptococcus pyogenes ORF 2452.

17. The method according to claim 3, wherein the carrier is Chlamydia pneumoniae ORF T367.

18. The method according to claim 3, wherein the carrier is Chlamydia pneumoniae ORF T858.

19. The method according to claim 1, wherein the carrier is a growth factor or hormone, which stimulates or enhances immune response.

20. The method according to claim 19, wherein the growth factor or hormone is selected from the group consisting of IL-1, IL-2, γ-interferon, IL-10, GM-CSF, MIP-1α, MIP-1β, and RANTES.

21. The method according to claim 1, wherein the peptide immunogen is an Aβ fragment.

22. The method according to claim 21, wherein the Aβ fragment is from the N-terminal half of Aβ.

23. The method according to claim 22, wherein the Aβ fragment is selected from the group consisting of Aβ1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-9, 1-10, 1-11, 1-12, 1-16, 3-6, and 3-7.

24. The method according to claim 23, wherein the Aβ fragment is selected from the group consisting of Aβ1-5, 1-7, 1-9, and 1-12.

25. The method according to claim 21, wherein the Aβ fragment is from the C-terminal half of Aβ.

26. The method according to claim 25, wherein the Aβ fragment is from the group consisting of Aβ33-42, 35-40, and 35-42.

27. The method according to claim 21, wherein the Aβ fragment is from the internal portion of Aβ.

28. The method according to claim 27, wherein the Aβ fragment is selected from the group consisting of Aβ13-28, 15-24, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, and 25-35.

701

29. The method according to claim 21, wherein the Aβ fragment is selected from the group consisting of Aβ1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-11, 1-12, 1-16, 1-28 3-6, 3-7, 13-28, 15-24, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 25-35, 33-42, 35-40, and 35-42.

30. The method according to claim 21, wherein the peptide immunogen further comprises at least one additional copy of the Aβ fragment.

31. The method according to claim 22, wherein the peptide immunogen further comprises at least one additional copy of the N-terminal fragment of Aβ.

32. The method according to claim 31, wherein the peptide immunogen comprises from N-terminus to C-terminus, a plurality of additional copies of the N-terminal fragment of Aβ.

33. The method according to claim 32, wherein the peptide immunogen is (Aβ1-7)3.

34. The method according to claim 32, wherein the peptide immunogen is (Aβ1-7)5.

35. The method according to claim 21, wherein the peptide immunogen further comprises at least one additional copy of a different Aβ fragment.

36. The method according to claim 30, wherein the Aβ peptide immunogen is a fragment of Aβ selected from the group consisting of Aβ 7-11, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40 and 35-42.

37. The method according to claim 21, 22, 29, or 30, wherein the peptide immunogen is linked at its C-terminus to the N-terminus of a carrier molecule to form a heterologous peptide.

38. The method according to claim 21, 22, 29, or 30, wherein the peptide immunogen is linked at its N-terminus to the C-terminus of a carrier molecule to form a heterologous peptide.

39. The method according to claim 21, 22, 29, or 30, wherein the peptide immunogen comprises from N-terminus to C-terminus, a first carrier molecule linked at its C-terminus to the N-terminus of the Aβ fragment linked at its C-terminus to the N-terminus of a second carrier molecule to form a heterologous peptide.

40. The method of claim 37, further comprising at least one additional copy of the carrier molecule.

41. The method of claim 37, further comprising at least one additional copy of the carrier molecule.

42. The method of claim 37, further comprising at least one copy of a different carrier molecule.

43. The method of claim 38, further comprising at least one additional copy of the carrier molecule.

44. The method of claim 38, further comprising at least one copy of a different carrier molecule.

45. The method of claim 39, wherein the first carrier and the second carrier are the same carrier molecule.

46. The method of claim 39, wherein the first carrier and the second carrier are different carrier molecules.

47. The method according to claim 37, wherein the carrier molecule is selected from the group consisting of a T-cell epitope, a B-cell epitope and combinations thereof.

48. The method according to claim 38, wherein the carrier molecule is selected from the group consisting of a T-cell epitope, a B-cell epitope and combinations thereof.

49. The method according to claim 38, wherein the carrier molecule is selected from the group consisting of a T-cell epitope, a B-cell epitope and combinations thereof.

50. The method according to claim 39, wherein the carrier molecule is selected from the group consisting of a T-cell epitope, a B-cell epitope and combinations thereof.

51. The method according to claim 21, wherein the peptide immunogen is further comprised of one or more molecules of the Aβ fragment are linked together in a multiple antigenic peptide (MAP) configuration.

52. The method according to claim 51, wherein the one or more Aβ fragments are selected from the group consisting of Aβ1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-11, 1-12, 1-16, 1-28 3-6, 3-7, 13-28, 15-24, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 25-35, 33-42, 35-40, and 35-42.

53. The method according to claim 51, wherein the peptide immunogen is Aβ1-7 and the MAP configuration is a MAP4 configuration.

54. The method according to claim 51, wherein the peptide immunogen is (Aβ1-7)3 and the MAP configuration is a MAP4 configuration

55. The method according to claim 51, wherein the peptide immunogen is (Aβ1-7)5 and the MAP configuration is a MAP4 configuration.

56. The method according to claim 1, wherein the functional group of one or more amino acid molecules of the protein/polypeptide carrier or of the optionally attached polypeptide linker is derivatized using a cross-linking reagent.

57. The method of claim 56, wherein the derivatizing reagent is a zero-length cross-linking reagent.

58. The method of claim 56, wherein the derivatizing reagent is a homobifunctional cross-linking reagent.

59. The method of claim 56, wherein the derivatizing reagent is a heterobifunctional cross-linking reagent.

60. The method of claim 56, wherein the protein/polypeptide carrier is reacted with a haloacetylating agent.

61. The method of claim 59, wherein the heterobifunctional reagent is a reagent which reacts with a primary or an ϵ-amine functional group of one or more amino acid residues of the protein/polypeptide carrier and a pendant thiol group of one or more amino acid residues of the peptide immunogen.

62. The method of claim 61, wherein the heterobifunctional reagent is N-succinimdyl bromoacetate, N-succinimidyl-3-(2-pyridyl-thio) propionate (SPDP) and succinimidyl 4-(N-maleimidomehyl) cyclohexane-1-carboxylate (SMCC).

63. The method of claim 62, wherein the primary or ϵ-amine functional group is lysine.

64. The method according to claim 61, wherein the pendant thiol group is a cysteine residue of the peptide immunogen.

65. The method according to claim 64, wherein the cysteine residue is localized at the amino-terminus of the peptide immunogen.

66. The method according to claim 64, wherein the cysteine residue is localized at carboxy-terminus of the peptide immunogen.

67. The method according to claim 64, wherein the cysteine residue is localized internally in the peptide immunogen.

68. The method according to claim 64, wherein the pendant thiol group is generated by a thiolating reagent.

69. The method according to claim 68, wherein the thiolating reagent is N-acetyl homocysteinethio lactone.

70. The method according to claim 1, wherein the capping reagent that is used to inactivate free reactive, functional groups on the activated protein/polypeptide carrier is selected from the reagent group consisting of cysteamine, N-acetylcysteamine, and ethanolamine.

71. The method according to claim 1, wherein the capping reagent that is used to inactivate free reactive, functional groups on the activated protein/polypeptide carrier

105

is selected from the reagent group consisting of sodium hydroxide, sodium carbonate, ammonium bicarbonate and ammonia.

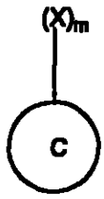
72. The method of claim 1, wherein the reactive group of the amino acid residue of the peptide immunogen is a free sulfhydryl group.

73. The method of claim 1, wherein one or more of the functional groups are on a linker, which is optionally attached to the protein/polypeptide carrier.

74. The method of claim 72, wherein the linker is a peptide linker.

75. The method of claim 73, wherein the peptide linker is polylysine.

76. A method for conjugating a peptide immunogen comprising Aβ peptide or fragments of Aβ or analogs thereof to a protein/polypeptide carrier having the structure:



wherein,

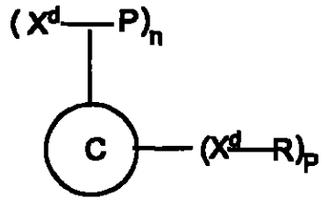
C is a protein/polypeptide carrier and X is a derivatizable functional group of an amino acid residue of the protein/polypeptide carrier or optionally of an amino acid residue of a peptide linker covalently attached to the protein/polypeptide carrier, and wherein m is an integer greater than 0, but less than or equal to 85, the method comprising the steps of:

(a). derivatizing one or more of the functional groups of the protein/polypeptide carrier or of the optionally attached linker molecule to generate a derivatized molecule with reactive sites;

(b). reacting the derivatized protein/polypeptide carrier of step (a) with a reactive group of an amino acid residue of the peptide immunogen comprising Aβ peptide or fragments of Aβ or analogs thereof to form a covalently coupled peptide immunogen-protein/polypeptide carrier conjugate; and

(c). further reacting the said conjugate with a capping reagent to inactivate the free reactive functional groups on the activated protein/polypeptide carrier, such that the

capped groups are not free to react with other molecules, thereby preserving the functionality of the carrier, such that it retains its ability to elicit the desired immune responses against the peptide immunogen that would otherwise not occur without a carrier, so as to generate a capped peptide immunogen-protein/polypeptide carrier conjugate having the formula:



wherein,

C is the protein/polypeptide carrier and Xd is a derivatized functional group of an amino acid residue of the protein/polypeptide carrier or optionally of an amino acid residue of a peptide linker covalently attached to the protein/polypeptide carrier, and, wherein,

P is a peptide immunogen molecule comprising Aβ peptide or fragments of Aβ or analogs thereof covalently attached to the derivatized functional group of the amino acid residue of the protein carrier or optionally of an amino acid residue of a peptide linker covalently attached to a protein/polypeptide carrier,

R is a capping molecule covalently attached to the derivatized functional group of an amino acid residue of the protein/polypeptide carrier or optionally of an amino acid residue of a peptide linker covalently attached to a protein/polypeptide carrier,

n is an integer greater than 0, but less than or equal to 85, and

p is an integer greater than 0, but less than 85.

77. The method of claim 76, wherein the carrier is selected from a group consisting of serum albumin, keyhole limpet hemocyanin (KLH), immunoglobulin molecules, thyroglobulin, ovalbumin, influenza hemagglutinin, PADRE polypeptide, malaria circumsporozite (CS) protein, hepatitis B surface antigen (HBSAg19-28) Heat Shock Protein (HSP) 65, Mycobacterium tuberculosis, cholera toxin, cholera toxin mutants with reduced toxicity, diphtheria toxin, CRM197 protein that is cross-reactive with diphtheria toxin, recombinant Streptococcal C5a peptidase, Streptococcus pyogenes ORF1224, Streptococcus pyogenes ORF1664, Streptococcus pyogenes ORF2452, Streptococcus pneumoniae pneumolysin, pneumolysin mutants with reduced toxicity, Chlamydia pneumoniae ORF T367, Chlamydia pneumoniae ORF T858, Tetanus toxoid, HIV gp120 T1, components

recognizing microbial surface adhesive matrix molecules (MSCRAMMS), growth factors, hormones, cytokines and chemokines.

78. The method according to claim 77, wherein the carrier contains a T cell epitope.

79. The method according to claim 78, wherein the carrier is a bacterial toxoid.

80. The method according to claim 79, wherein the carrier is influenza hemagglutinin.

81. The method according to claim 78, wherein the carrier is PADRE polypeptide.

82. The method according to claim 78, wherein the carrier is malaria circumsporozite (CS) protein.

83. The method according to claim 78, wherein the carrier is Hepatitis B surface antigen (HSBAg19-28).

84. The method according to claim 78, wherein the carrier is heat shock protein 65 (HSP 65).

85. The method according to claim 78, wherein the carrier is a polypeptide from Mycobacterium tuberculosis (BCG).

86. The method according to claim 78, wherein the carrier is tetanus toxoid.

87. The method according to claim 78, wherein the bacterial toxoid is CRM 197.

88. The method according to claim 78, wherein the carrier is Streptococcal rC5a peptidase.

89. The method according to claim 78, wherein the carrier is Streptococcus pyogenes ORF1224.

90. The method according to claim 78, wherein the carrier is Streptococcus pyogenes ORF1664.

91. The method according to claim 78, wherein the carrier is Streptococcus pyogenes ORF2452.

92. The method according to claim 78, wherein the carrier is Chlamydia pneumoniae ORF T367.

93. The method according to claim 78, wherein the carrier is Chlamydia pneumoniae ORF T858.

94. The method according to claim 76, wherein the carrier is a growth factor or hormone, which stimulates or enhances immune response.

95. The method according to claim 94, wherein the growth factor or hormone is selected from a group consisting of IL-1, IL-2, γ-interferon, IL-10, GM-CSF, MIP-1α, MIP-1β, and RANTES.

96. The method according to claim 76, wherein the peptide immunogen is an Aβ fragment.

97. The method according to claim 96, wherein the Aβ fragment is from the N-terminal half of Aβ.

98. The method according to claim 97, wherein the Aβ fragment is selected from the group consisting of Aβ1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-9, 1-10, 1-11, 1-12, 1-16, 3-6, and 3-7.

99. The method according to claim 98, wherein the Aβ fragment is selected from the group consisting of Aβ1-5, 1-7, 1-9, and 1-12.

100. The method according to claim 96, wherein the Aβ fragment is from the C-terminal half of Aβ.

101. The method according to claim 100, wherein the Aβ fragment is from the group consisting of Aβ33-42, 35-40, and 35-42.

102. The method according to claim 96, wherein the Aβ fragment is from the internal portion of Aβ.

103. The method according to claim 102, wherein the Aβ fragment is selected from the group consisting of Aβ13-28, 15-24, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, and 25-35.

104. The method according to claim 96, wherein the Aβ fragment is selected from the group consisting of Aβ1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-11, 1-12, 1-16, 1-28, 3-6, 3-7, 13-28, 15-24, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 25-35, 33-42, 35-40, and 35-42.

105. The method according to claim 96, wherein the peptide immunogen further comprises at least one additional copy of the Aβ fragment.

106. The method according to claim 97, wherein the peptide immunogen further comprises at least one additional copy of the N-terminal fragment of Aβ.

107. The method according to claim 106, wherein the peptide immunogen comprises from N-terminus to C-terminus, a plurality of additional copies of the N-terminal fragment of Aβ.

108. The method according to claim 107, wherein the peptide immunogen is (Aβ1-7)3.

109. The method according to claim 107, wherein the peptide immunogen is (Aβ1-7)5.

110. The method according to claim 96, wherein the peptide immunogen further comprises at least one additional copy of a different Aβ fragment.

111. The method according to claim 105, wherein the Aβ peptide immunogen is a fragment of Aβ selected from the group consisting of Aβ 7-11, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40 and 35-42.

110

112. The method according to claim 96, 97, 104, or 105, wherein the peptide immunogen is linked at its C-terminus to the N-terminus of a carrier molecule to form a heterologous peptide.

113. The method according to claim 96, 97, 104, or 105, wherein the peptide immunogen is linked at its N-terminus to the C-terminus of a carrier molecule to form a heterologous peptide.

114. The method according to claim 96, 97, 104, or 105, wherein the peptide immunogen comprises from N-terminus to C-terminus, a first carrier molecule linked at its C-terminus to the N-terminus of the Aβ fragment linked at its C-terminus to the N-terminus of a second carrier molecule to form a heterologous peptide.

115. The method of claim 112, further comprising at least one additional copy of the carrier molecule.

116. The method of claim 112, further comprising at least one additional copy of the carrier molecule.

117. The method of claim 112, further comprising at least one copy of a different carrier molecule.

118. The method of claim 113, further comprising at least one additional copy of the carrier molecule.

119. The method of claim 113, further comprising at least one copy of a different carrier molecule.

120. The method of claim 114, wherein the first carrier and the second carrier are the same carrier molecule.

121. The method of claim 114, wherein the first carrier and the second carrier are different carrier molecules.

(11

122. The method according to claim 112, wherein the carrier molecule is selected from the group consisting of a T-cell epitope, a B-cell epitope and combinations thereof.

123. The method according to claim 113, wherein the carrier molecule is selected from the group consisting of a T-cell epitope, a B-cell epitope and combinations thereof.

124. The method according to claim 113, wherein the carrier molecule is selected from the group consisting of a T-cell epitope, a B-cell epitope and combinations thereof.

125. The method according to claim 114, wherein the carrier molecule is selected from the group consisting of a T-cell epitope, a B-cell epitope and combinations thereof.

126. The method according to claim 96, wherein the peptide immunogen is further comprised of one or more molecules of the Aβ fragment are linked together in a multiple antigenic peptide (MAP) configuration.

127. The method according to claim 126, wherein the one or more Aβ fragments are selected from the group consisting of Aβ1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-11, 1-12, 1-16, 1-28, 3-6, 3-7, 13-28, 15-24, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 25-35, 33-42, 35-115, and 35-42.

128. The method according to claim 126, wherein the peptide immunogen is Aβ1-7 and the MAP configuration is a MAP4 configuration.

129. The method according to claim 126, wherein the peptide immunogen is (Aβ1-7)3 and the MAP configuration is a MAP4 configuration

130. The method according to claim 126, wherein the peptide immunogen is (Aβ1-7)5 and the MAP configuration is a MAP4 configuration.

131. The method according to claim 76, wherein the functional group of one or more amino acid molecules of the protein/polypeptide carrier or of the optionally attached polypeptide linker is derivatized using a cross-linking reagent.

112

132. The method of claim 131, wherein the derivatizing reagent is a zero-length cross-linking reagent.

133. The method of claim 131, wherein the derivatizing reagent is a homobifunctional cross-linking reagent.

134. The method of claim 131, wherein the derivatizing reagent is a heterobifunctional cross-linking reagent.

135. The method of claim 131, wherein the protein/polypeptide carrier is reacted with a haloacetylating agent.

136. The method of claim 135, wherein the heterobifunctional reagent is a reagent which reacts with a primary or an ϵ-amine functional group of one or more amino acid residues of the protein/polypeptide carrier and a pendant thiol group of one or more amino acid residues of the peptide immunogen.

137. The method of claim 136, wherein the heterobifunctional reagent is M-N-succinimdyl bromoacetate.

138. The method of claim 136, wherein the primary or ϵ-amine functional group is lysine.

139. The method according to claim 138, wherein derivatization of the primary or ϵ-amine functional group of the amino acid residue lysine of the protein/polypeptide carrier with N-succinimidyl bromo acetate results in the bromoacetylation of the primary or ϵ-amine residues on lysine residues on the protein/polypeptide carrier.

140. The method according to claim 136, wherein the pendant thiol group is a cysteine residue of the peptide immunogen.

141. The method according to claim 140, wherein the cysteine residue is localized at the amino-terminus of the peptide immunogen.

142. The method according to claim 140, wherein the cysteine residue is localized at carboxy-terminus of the peptide immunogen.

113

143. The method according to claim 140, wherein the cysteine residue is localized internally in the peptide immunogen.

144. The method according to claim 76, wherein the pendant thiol group is generated by a thiolating reagent.

145. The method according to claim 144, wherein the thiolating reagent is N-acetyl homocysteinethio lactone.

146. The method according to claim 76, wherein the capping reagent that is used to inactivate free reactive, functional groups of the activated protein/polypeptide carrier is selected from the reagent group consisting of cysteamine, N-acetylcysteamine, and ethanolamine.

147. The method according to claim 76, wherein the capping reagent that is used to inactivate free reactive, functional groups on the activated protein/polypeptide carrier is selected from the reagent group consisting of sodium hydroxide, sodium carbonate, ammonium bicarbonate and ammonia.

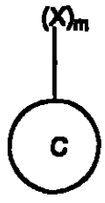
148. The method of claim 76, wherein the reactive group of the amino acid residue of the peptide immunogen is a free sulfhydryl group.

149. The method of claim 76, wherein one or more of the functional groups are on a linker optionally attached to the protein/polypeptide carrier.

150. The method of claim 149, wherein the linker is a peptide linker.

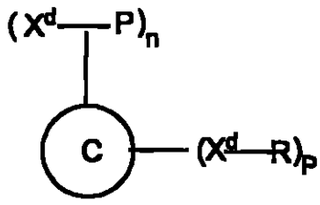
151. The method of claim 150, wherein the peptide linker is polylysine.

152. A composition comprising a peptide immunogen-protein/polypeptide carrier conjugate wherein the protein/polypeptide carrier has the formula:



wherein,

C is a protein/polypeptide carrier and X is a derivatizable functional group of an amino acid residue on the protein/polypeptide carrier or optionally of an amino acid residue of a peptide linker covalently attached to the protein/polypeptide carrier, and, wherein m is an integer greater than 0, but less than or equal to 85, and wherein the peptide immunogen-protein/polypeptide carrier conjugate has the formula:



wherein,

C is the protein/polypeptide carrier and Xd is a derivatized functional group of an amino acid residue of the protein/polypeptide carrier or optionally of an amino acid residue of a peptide linker covalently attached to the protein/polypeptide carrier, and, wherein, P is a peptide immunogen comprising Aβ peptide or fragments of Aβ or analogs thereof covalently attached to the derivatized functional group of the amino acid residue of the protein carrier or optionally of an amino acid residue of a peptide linker covalently attached to a protein/polypeptide carrier, R is a capping molecule covalently attached to the derivatized functional group of an amino acid residue of the protein/polypeptide carrier or optionally of an amino acid residue of a peptide linker covalently attached to a protein/polypeptide carrier, thereby preserving the functionality of the carrier such that it retains its ability to elicit the desired immune responses against the peptide immunogen comprising the Aβ peptide or fragments of Aβ or analogs thereof that would otherwise not occur without a carrier, n is an integer greater than 0, but less than or equal to 85, and p is an integer greater than 0, but less than 85.

153. The conjugate according to claim 150, wherein the carrier is selected from a group consisting of serum albumin, keyhole limpet hemocyanin (KLH), immunoglobulin molecules, thyroglobulin, ovalbumin, influenza hemagglutinin, PADRE polypeptide, malaria circumsporozite (CS) protein, hepatitis B surface antigen (HBSAg19-28), eat Shock Protein (HSP) 65, Mycobacterium tuberculosis, cholera toxin, cholera toxin mutants with reduced toxicity, diphtheria toxin, CRM197 protein that is cross-reactive with diphtheria toxin, recombinant Streptococcal C5a peptidase, Streptococcus pyogenes

ORF1224, Streptococcus pyogenes ORF1664, Streptococcus pyogenes ORF2452, Streptococcus pneumoniae pneumolysin, pneumolysin mutants with reduced toxicity, Chlamydia pneumoniae ORF T367, Chlamydia pneumoniae ORF T858, Tetanus toxoid, HIV gp120 T1, components recognizing microbial surface adhesive matrix molecules (MSCRAMMS), growth factors, hormones, cytokines and chemokines.

154. The conjugate according to claim 150, wherein the carrier contains a T-cell epitope.

155. The conjugate according to claim 154, wherein the carrier is a bacterial toxoid.

156. The conjugate according to claim 154, wherein the carrier is influenza hemagglutinin.

157. The conjugate according to claim 154, wherein the carrier is PADRE polypeptide.

158. The conjugate according to claim 154, wherein the carrier is malaria circumsporozite (CS) protein.

159. The conjugate according to claim 154, wherein the carrier is Hepatitis B surface antigen (HBSAg19-28).

160. The conjugate according to claim 154, wherein the carrier is heat shock protein 65 (HSP 65).

161. The conjugate according to claim 154, wherein the carrier is a polypeptide from Mycobacterium tuberculosis (BCG).

162. The conjugate according to claim 154, wherein the carrier is tetanus toxoid.

163. The conjugate according to claim 154, wherein the bacterial toxoid is CRM 197.

164. The conjugate according to claim 154, wherein the carrier is Streptococcal rC5a peptidase.

165. The conjugate according to claim 154, wherein the carrier is Streptococcus pyogenes ORF1224.

166. The conjugate according to claim 154, wherein the carrier is Streptococcus pyogenes ORF1664.

167. The conjugate according to claim 154, wherein the carrier is Streptococcus pyogenes ORF2452.

168. The conjugate according to claim 154, wherein the carrier is Chlamydia pneumoniae ORF T367.

169. The conjugate according to claim 154, wherein the carrier is Chlamydia pneumoniae ORF T858.

170. The conjugate according to claim 150, wherein the carrier is a growth factor or hormone, which stimulates or enhances immune response.

171. The conjugate according to claim 170, wherein the growth factor or hormone is selected from a group consisting of IL-1, IL-2, γ-interferon, IL-10, GM-CSF, MIP-1α, MIP-1β, and RANTES.

172. The conjugate according to claim 152, wherein the peptide immunogen is an Aβ fragment.

173.. The conjugate according to claim 172, wherein the Aβ fragment is from the N-terminal half of Aβ.

174. The conjugate according to claim 173, wherein the Aβ fragment is selected from the group consisting of Aβ1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-9, 1-10, 1-11, 1-12, 1-16, 3-6, and 3-7.

175. The conjugate according to claim 174, wherein the Aβ fragment is selected from the group consisting of Aβ1-5, 1-7, 1-9, and 1-12.

176. The conjugate according to claim 172, wherein the Aβ fragment is from the C-terminal half of Aβ.

177. The conjugate according to claim 176, wherein the Aβ fragment is from the group consisting of Aβ33-42, 35-40, and 35-42.

178. The conjugate according to claim 172, wherein the Aβ fragment is from the internal portion of Aβ.

179. The conjugate according to claim 178, wherein the Aβ fragment is selected from the group consisting of Aβ13-28, 15-24, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, and 25-35.

180. The conjugate according to claim 172, wherein the Aβ fragment is selected from the group consisting of Aβ1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-11, 1-12, 1-16, 1-28 3-6, 3-7, 13-28, 15-24, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 25-35, 33-42, 35-40, and 35-42.

181. The conjugate according to claim 172, wherein the peptide immunogen further comprises at least one additional copy of the Aβ fragment.

182. The conjugate according to claim 173, wherein the peptide immunogen further comprises at least one additional copy of the N-terminal fragment of Aβ.

183. The conjugate according to claim 182, wherein the peptide immunogen comprises from N-terminus to C-terminus, a plurality of additional copies of the N-terminal fragment of Aβ.

184. The conjugate according to claim 183, wherein the peptide immunogen is (Aβ1-7)3.

185. The conjugate according to claim 183, wherein the peptide immunogen is (Aβ1-7)5.

186. The conjugate according to claim 172, wherein the peptide immunogen further comprises at least one additional copy of a different Aβ fragment.

187. The conjugate according to claim 181, wherein the Aβ peptide immunogen is a fragment of Aβ selected from the group consisting of Aβ 7-11, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40 and 35-42.

188. The conjugate according to claim 172, 173, 180, or 181, wherein the peptide immunogen is linked at its C-terminus to the N-terminus of a carrier molecule to form a heterologous peptide.

189. The conjugate according to claim 172, 173, 180, or 181, wherein the peptide immunogen is linked at its N-terminus to the C-terminus of a carrier molecule to form a heterologous peptide.

190. The conjugate according to claim 172, 173, 180, or 181, wherein the peptide immunogen comprises from N-terminus to C-terminus, a first carrier molecule linked at its C-terminus to the N-terminus of the $A\beta$ fragment linked at its C-terminus to the N-terminus of a second carrier molecule to form a heterologous peptide.

191. The conjugate of claim 188, further comprising at least one additional copy of the carrier molecule.

192. The conjugate of claim 188, further comprising at least one additional copy of the carrier molecule.

193. The conjugate of claim 188, further comprising at least one copy of a different carrier molecule.

194. The conjugate of claim 189, further comprising at least one additional copy of the carrier molecule.

195. The conjugate of claim 189, further comprising at least one copy of a different carrier molecule.

196. The conjugate of claim 190, wherein the first carrier and the second carrier are the same carrier molecule.

197. The conjugate of claim 190, wherein the first carrier and the second carrier are different carrier molecules.

198. The conjugate according to claim 188, wherein the carrier molecule is selected from the group consisting of a T-cell epitope, a B-cell epitope and combinations thereof.

199. The conjugate according to claim 189, wherein the carrier molecule is selected from the group consisting of a T-cell epitope, a B-cell epitope and combinations thereof.

200. The conjugate according to claim 189, wherein the carrier molecule is selected from the group consisting of a T-cell epitope, a B-cell epitope and combinations thereof.

201. The conjugate according to claim 190, wherein the carrier molecule is selected from the group consisting of a T-cell epitope, a B-cell epitope and combinations thereof.

202. The conjugate according to claim 172, wherein the peptide immunogen is further comprised of one or more molecules of the Aβ fragment are linked together in a multiple antigenic peptide (MAP) configuration.

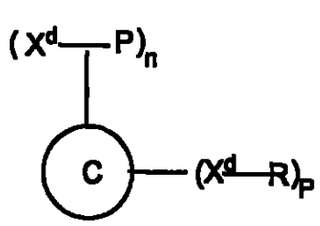
203. The conjugate according to claim 202, wherein the one or more Aβ fragments are selected from the group consisting of Aβ1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-11, 1-12, 1-16, 1-28 3-6, 3-7, 13-28, 15-24, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 25-35, 33-42, 35-40, and 35-42.

204. The conjugate according to claim 202, wherein the peptide immunogen is Aβ1-7 and the MAP configuration is a MAP4 configuration.

205. The conjugate according to claim 202, wherein the peptide immunogen is (Aβ1-7)3 and the MAP configuration is a MAP4 configuration

206. The conjugate according to claim 202, wherein the peptide immunogen is (Aβ1-7)5 and the MAP configuration is a MAP4 configuration.

207. A peptide immunogen-protein/polypeptide carrier conjugate generated according to the method of claim 75 and having the formula:



wherein,

C is the protein/polypeptide carrier and Xd is a derivatized functional group of an amino acid residue of the protein/polypeptide carrier or optionally of an amino acid residue of a peptide linker covalently attached to the protein/polypeptide carrier, and, wherein, P is a peptide immunogen molecule comprising Aβ peptide or fragments of Aβ or analogs thereof covalently attached to the derivatized functional group of the amino acid residue of the protein carrier or optionally of an amino acid residue of a peptide linker covalently attached to a protein/polypeptide carrier, R is a capping molecule covalently attached to the derivatized functional group of an amino acid residue of the protein/polypeptide carrier or optionally of an amino acid residue of a peptide linker covalently attached to a protein/polypeptide carrier, which preserves the functionality of the carrier, such that it retains its ability to elicit the desired immune responses against the peptide immunogen that would otherwise not occur without a carrier, n is an integer greater than 0, but less than or equal to 85, and p is an integer greater than 0, but less than 85.

208. The conjugate according to claim 207 wherein the carrier is selected from the group consisting of human serum albumin, keyhole limpet hemocyanin (KLH), immunoglobulin molecules, thyroglobulin, ovalbumin, influenza hemagglutinin, PADRE polypeptide, malaria circumsporozite (CS) protein, hepatitis B surface antigen (HBSAg19-28), Heat Shock Protein (HSP) 65, Mycobacterium tuberculosis, cholera toxin, cholera toxin mutants with reduced toxicity, diphtheria toxin, CRM197 protein that is cross-reactive with diphtheria toxin, recombinant Streptococcal C5a peptidase, Streptococcus pyogenes ORF1224, Streptococcus pyogenes ORF1664, Streptococcus pyogenes ORF2452, Streptococcus pneumoniae pneumolysin, pneumolysin mutants with reduced toxicity, Chlamydia pneumoniae ORF T367, Chlamydia pneumoniae ORF T858, Tetanus toxoid, HIV gp120 T1, components recognizing microbial surface adhesive matrix molecules (MSCRAMMS), growth factors, hormones, cytokines and chemokines.

209. The conjugate according to claim 207 wherein the carrier contains a T-cell epitope.

210. The conjugate according to claim 209, wherein the carrier is a bacterial toxoid.

(24)

211. The conjugate according to claim 209, wherein the carrier is influenza hemagglutinin.

212. The conjugate according to claim 209, wherein the carrier is PADRE polypeptide.

213. The conjugate according to claim 209, wherein the carrier is malaria circumsporozite (CS) protein.

214. The conjugate according to claim 220, wherein the carrier is Hepatitis B surface antigen (HSBAg19-28).

215. The conjugate according to claim 209, wherein the carrier is heat shock protein 65 (HSP 65).

216. The conjugate according to claim 209, wherein the carrier is a polypeptide from Mycobacterium tuberculosis (BCG).

217. The conjugate according to claim 209, wherein the carrier is tetanus toxoid.

218. The conjugate according to claim 209, wherein the bacterial toxoid is CRM 197.

219. The conjugate according to claim 209, wherein the carrier is Streptococcal rC5a peptidase.

220. The conjugate according to claim 209, wherein the carrier is Streptococcus pyogenes ORF1224.

221. The conjugate according to claim 209, wherein the carrier is Streptococcus pyogenes ORF1664.

222. The conjugate according to claim 209, wherein the carrier is Streptococcus pyogenes ORF2452.

223. The conjugate according to claim 209, wherein the carrier is Chlamydia pneumoniae ORF T367.

224. The conjugate according to claim 209, wherein the carrier is Chlamydia pneumoniae ORF T858.

225. The conjugate according to claim 209, wherein the carrier is a growth factor or hormone, which stimulates or enhances immune response.

226. The conjugate according to claim 225, wherein the growth factor or hormone is selected from a group consisting of IL-1, IL-2, γ-interferon, IL-10, GM-CSF, MIP-1α, MIP-1β, and RANTES.

227. The conjugate according to 207, wherein the peptide immunogen is an Aβ fragment.

228. The conjugate according to claim 227, wherein the Aβ fragment is from the N-terminal half of Aβ.

229. The conjugate according to claim 228, wherein the Aβ fragment is selected from the group consisting of Aβ1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-9, 1-10, 1-11, 1-12, 1-16, 3-6, and 3-7.

230. The conjugate according to claim 229, wherein the Aβ fragment is selected from the group consisting of Aβ1-5, 1-7, 1-9, and 1-12.

231. The conjugate according to claim 227, wherein the Aβ fragment is from the C-terminal half of Aβ.

232. The conjugate according to claim 231, wherein the Aβ fragment is from the group consisting of Aβ33-42, 35-40, and 35-42.

233. The conjugate according to claim 227, wherein the Aβ fragment is from the internal portion of Aβ.

234. The conjugate according to claim 233, wherein the Aβ fragment is selected from the group consisting of Aβ13-28, 15-24, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, and 25-35.

235. The conjugate according to claim 227, wherein the Aβ fragment is selected from the group consisting of Aβ1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-11, 1-12, 1-16, 1-28

123

3-6, 3-7, 13-28, 15-24, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 25-35, 33-42, 35-40, and 35-42.

236. The conjugate according to claim 227, wherein the peptide immunogen further comprises at least one additional copy of the Aβ fragment.

237. The conjugate according to claim 228, wherein the peptide immunogen further comprises at least one additional copy of the N-terminal fragment of Aβ.

238. The conjugate according to claim 237, wherein the peptide immunogen comprises from N-terminus to C-terminus, a plurality of additional copies of the N-terminal fragment of Aβ.

239. The conjugate according to claim 238, wherein the peptide immunogen is (Aβ1-7)3.

240. The conjugate according to claim 238, wherein the peptide immunogen is (Aβ1-7)5.

241. The conjugate according to claim 227, wherein the peptide immunogen further comprises at least one additional copy of a different Aβ fragment.

242. The conjugate according to claim 236, wherein the Aβ peptide immunogen is a fragment of Aβ selected from the group consisting of Aβ 7-11, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40 and 35-42.

243. The conjugate according to claim 227, 228, 235, or 236, wherein the peptide immunogen is linked at its C-terminus to the N-terminus of a carrier molecule to form a heterologous peptide.

244. The conjugate according to claim 227, 228, 235, or 236, wherein the peptide immunogen is linked at its N-terminus to the C-terminus of a carrier molecule to form a heterologous peptide.

245. The conjugate according to claim 227, 228, 235, or 236, wherein the peptide immunogen comprises from N-terminus to C-terminus, a first carrier molecule linked at its C-terminus to the N-terminus of the Aβ fragment linked at its C-terminus to the N-terminus of a second carrier molecule to form a heterologous peptide.

246. The conjugate of claim 243, further comprising at least one additional copy of the carrier molecule.

247. The conjugate of claim 243, further comprising at least one additional copy of the carrier molecule.

248. The conjugate of claim 243, further comprising at least one copy of a different carrier molecule.

249. The conjugate of claim 244, further comprising at least one additional copy of the carrier molecule.

250. The conjugate of claim 244, further comprising at least one copy of a different carrier molecule.

251. The conjugate of claim 245, wherein the first carrier and the second carrier are the same carrier molecule.

252. The conjugate of claim 245, wherein the first carrier and the second carrier are different carrier molecules.

253. The conjugate according to claim 243, wherein the carrier molecule is selected from the group consisting of a T-cell epitope, a B-cell epitope and combinations thereof.

254. The conjugate according to claim 244, wherein the carrier molecule is selected from the group consisting of a T-cell epitope, a B-cell epitope and combinations thereof.

255. The conjugate according to claim 244, wherein the carrier molecule is selected from the group consisting of a T-cell epitope, a B-cell epitope and combinations thereof.

256. The conjugate according to claim 245, wherein the carrier molecule is selected from the group consisting of a T-cell epitope, a B-cell epitope and combinations thereof.

257. The conjugate according to claim 227, wherein the peptide immunogen is further comprised of one or more molecules of the Aβ fragment are linked together in a multiple antigenic peptide (MAP) configuration.

258. The conjugate according to claim 257, wherein the one or more Aβ fragments are selected from the group consisting of Aβ1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-11, 1-12, 1-16, 1-28 3-6, 3-7, 13-28, 15-24, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 25-35, 33-42, 35-40, and 35-42.

259. The conjugate according to claim 257, wherein the peptide immunogen is Aβ1-7 and the MAP configuration is a MAP4 configuration.

260. The conjugate according to claim 257, wherein the peptide immunogen is (Aβ1-7)3 and the MAP configuration is a MAP4 configuration

261. The conjugate according to claim 257, wherein the peptide immunogen is (Aβ1-7)5 and the MAP configuration is a MAP4 configuration.

262. An immunogenic composition, comprising a conjugate of a peptide immunogen with a protein/polypeptide carrier generated by the method of claim 79, together with one or more pharmaceutically acceptable excipients, diluents, and /or adjuvants.

263. The immunogenic composition according to claim 262, wherein the carrier is selected from the group consisting of human serum albumin, keyhole limpet hemocyanin (KLH), immunoglobulin molecules, thyroglobulin, ovalbumin, influenza hemagglutinin, PADRE polypeptide, malaria circumsporozite (CS) protein, hepatitis B surface antigen (HBSAg19-28), Heat Shock Protein (HSP) 65, Mycobacterium tuberculosis, cholera toxin, cholera toxin mutants with reduced toxicity, diphtheria toxin, CRM197 protein that is cross-reactive with diphtheria toxin, recombinant Streptococcal C5a peptidase, Streptococcus pyogenes ORF1224, Streptococcus pyogenes ORF1664, Streptococcus pyogenes ORF2452, Streptococcus pneumoniae pneumolysin, pneumolysin mutants with reduced toxicity, Chlamydia pneumoniae ORF T367, Chlamydia pneumoniae ORF T858, Tetanus toxoid, HIV gp120 T1, components recognizing microbial surface adhesive matrix molecules (MSCRAMMS), growth factors, hormones, cytokines and chemokines.

264. The immunogenic composition according to claim 262, wherein the carrier contains a T-cell epitope.

265. The immunogenic conjugate according to claim 264 wherein the carrier is a bacterial toxoid.

266. The immunogenic composition according to claim 264, wherein the carrier is influenza hemagglutinin.

267. The immunogenic composition according to claim 264, wherein the carrier is PADRE polypeptide.

268. The immunogenic composition according to claim 264, wherein the carrier is malaria circumsporozite (CS) protein.

269. The immunogenic composition according to claim 264, wherein the carrier is Hepatitis B surface antigen (HSBAg19-28).

270. The immunogenic composition according to claim 264, wherein the carrier is heat shock protein 65 (HSP 65).

271. The immunogenic composition according to claim 264, wherein the carrier is a polypeptide from Mycobacterium tuberculosis (BCG).

272. The immunogenic composition according to claim 264, wherein the bacterial toxoid is tetanus toxoid.

273. The immunogenic composition according to claim 264, wherein the bacterial toxoid is CRM 197.

274. The immunogenic composition according to claim 264, wherein the carrier is Streptococcal rC5a peptidase.

275. The immunogenic composition according to claim 264, wherein the carrier is Streptococcus pyogenes ORF1224.

276. The immunogenic composition according to claim 264, wherein the carrier is Streptococcus pyogenes ORF1664.

277. The immunogenic composition according to claim 264, wherein the carrier is Streptococcus pyogenes ORF2452.

278. The immunogenic composition according to claim 264, wherein the carrier is Chlamydia pneumoniae ORF T367.

279. The immunogenic composition according to claim 264, wherein the carrier is Chlamydia pneumoniae ORF T858.

280. The immunogenic composition according to claim 262, wherein the carrier is a growth factor or a hormone, which stimulates or enhances immune response.

281. The immunogenic composition according to claim 280, wherein the growth factor or hormone is selected from a group consisting of IL-1, IL-2, γ-interferon, IL-10, GM-CSF, MIP-1α, MIP-1β, and RANTES.

282. The method according to claim 1, wherein the peptide immunogen is an Aβ fragment.

283. The method according to claim 282, wherein the Aβ fragment is from the N-terminal half of Aβ.

284. The method according to claim 283, wherein the Aβ fragment is selected from the group consisting of Aβ1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-9, 1-10, 1-11, 1-12, 1-16, 3-6, and 3-7.

285. The method according to claim 284, wherein the Aβ fragment is selected from the group consisting of Aβ1-5, 1-7, 1-9, and 1-12.

286. The method according to claim 282, wherein the Aβ fragment is from the C-terminal half of Aβ.

287. The method according to claim 286, wherein the Aβ fragment is from the group consisting of Aβ33-42, 35-40, and 35-42.

288. The method according to claim 282, wherein the Aβ fragment is from the internal portion of Aβ.

289. The method according to claim 288, wherein the Aβ fragment is selected from the group consisting of Aβ13-28, 15-24, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, and 25-35.

290. The method according to claim 282, wherein the Aβ fragment is selected from the group consisting of Aβ1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-11, 1-12, 1-16, 1-28 3-6, 3-7, 13-28, 15-24, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 25-35, 33-42, 35-40, and 35-42.

291. The method according to claim 282, wherein the peptide immunogen further comprises at least one additional copy of the Aβ fragment.

292. The method according to claim 283, wherein the peptide immunogen further comprises at least one additional copy of the N-terminal fragment of Aβ.

293. The method according to claim 292, wherein the peptide immunogen comprises from N-terminus to C-terminus, a plurality of additional copies of the N-terminal fragment of Aβ.

294. The method according to claim 293, wherein the peptide immunogen is (Aβ1-7)3.

295. The method according to claim 293, wherein the peptide immunogen is (Aβ1-7)5.

296. The method according to claim 282, wherein the peptide immunogen further comprises at least one additional copy of a different Aβ fragment.

297. The method according to claim 291, wherein the Aβ peptide immunogen is a fragment of Aβ selected from the group consisting of Aβ 7-11, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40 and 35-42.

298. The method according to claim 282, 283, 290, or 291, wherein the peptide immunogen is linked at its C-terminus to the N-terminus of a carrier molecule to form a heterologous peptide.

299. The method according to claim 282, 283, 290, or 291, wherein the peptide immunogen is linked at its N-terminus to the C-terminus of a carrier molecule to form a heterologous peptide.

300. The method according to claim 282, 283, 290, or 291, wherein the peptide immunogen comprises from N-terminus to C-terminus, a first carrier molecule linked

at its C-terminus to the N-terminus of the Aβ fragment linked at its C-terminus to the N-terminus of a second carrier molecule to form a heterologous peptide.

301. The method of claim 298, further comprising at least one additional copy of the carrier molecule.

302. The method of claim 298, further comprising at least one additional copy of the carrier molecule.

303. The method of claim 298, further comprising at least one copy of a different carrier molecule.

304. The method of claim 299, further comprising at least one additional copy of the carrier molecule.

305. The method of claim 299, further comprising at least one copy of a different carrier molecule.

306. The method of claim 300, wherein the first carrier and the second carrier are the same carrier molecule.

307. The method of claim 300, wherein the first carrier and the second carrier are different carrier molecules.

308. The method according to claim 298, wherein the carrier molecule is selected from the group consisting of a T-cell epitope, a B-cell epitope and combinations thereof.

309. The method according to claim 299, wherein the carrier molecule is selected from the group consisting of a T-cell epitope, a B-cell epitope and combinations thereof.

310. The method according to claim 299, wherein the carrier molecule is selected from the group consisting of a T-cell epitope, a B-cell epitope and combinations thereof.

311. The method according to claim 300, wherein the carrier molecule is selected from the group consisting of a T-cell epitope, a B-cell epitope and combinations thereof.

312. The method according to claim 282, wherein the peptide immunogen is further comprised of one or more molecules of the Aβ fragment are linked together in a multiple antigenic peptide (MAP) configuration.

313. The method according to claim 312, wherein the one or more Aβ fragments are selected from the group consisting of Aβ1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-11, 1-12, 1-16, 1-28 3-6, 3-7, 13-28, 15-24, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 25-35, 33-42, 35-40, and 35-42.

314. The method according to claim 312, wherein the peptide immunogen is Aβ1-7 and the MAP configuration is a MAP4 configuration.

315. The method according to claim 312, wherein the peptide immunogen is (Aβ1-7)3 and the MAP configuration is a MAP4 configuration

316. The method according to claim 312, wherein the peptide immunogen is (Aβ1-7)5 and the MAP configuration is a MAP4 configuration.

317. The immunogenic composition according to claim 262, wherein one or more adjuvants are selected from the group consisting of GM-CSF, 529 SE, IL-12, aluminum phosphate, aluminum hydroxide, Mycobacterium tuberculosis, Bordetella pertussis, bacterial lipopolysaccharides, aminoalkyl glucosamine phosphate compounds, MPL™ (3-O-deacylated monophosphoryl lipid A), a polypeptide, Quil A, STIMULON™ QS-21, a pertussis toxin (PT), an E.coli heat-labile toxin (LT), IL-1 α, IL-1 β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, interferon- α, interferon- β, interferon-γ, G-CSF, TNF- α and TNF- β.

318. The immunogenic composition of claim 317, wherein the peptide immunogen is Aβ, the carrier is CRM197, and the adjuvant is 529 SE.

319. A method for inducing an immune response in a mammalian subject, which comprises administering an effective amount of the immunogenic composition of claim 262 to the subject.

131

320. The method according to claim 319, wherein the carrier is selected from the group consisting of human serum albumin, keyhole limpet hemocyanin (KLH), immunoglobulin molecules, thyroglobulin, ovalbumin, influenza hemagglutinin, PADRE polypeptide, malaria circumsporozite (CS) protein, hepatitis B surface antigen (HBSAg19-28), Heat Shock Protein (HSP) 65, Mycobacterium tuberculosis, cholera toxin, cholera toxin mutants with reduced toxicity, diphtheria toxin, CRM197 protein that is cross-reactive with diphtheria toxin, recombinant Streptococcal C5a peptidase, Streptococcus pyogenes ORF1224, Streptococcus pyogenes ORF1664, Streptococcus pyogenes ORF2452, Streptococcus pneumoniae pneumolysin, pneumolysin mutants with reduced toxicity, Chlamydia pneumoniae ORF T367, Chlamydia pneumoniae ORF T858, Tetanus toxoid, HIV gp120 T1, components recognizing microbial surface adhesive matrix molecules (MSCRAMMS), growth factors, hormones, cytokines and chemokines.

321. The method according to claim 319, wherein the carrier contains a T-cell epitope.

322. The method according to claim 321, wherein the carrier is a bacterial toxoid.

323. The method according to claim 321, wherein the bacterial toxoid is tetanus toxoid.

324. The method according to claim 321, wherein the carrier is influenza hemagglutinin.

325. The method according to claim 321, wherein the carrier is PADRE polypeptide.

326. The method according to claim 321, wherein the carrier is malaria circumsporozite (CS) protein.

327. The method according to claim 321, wherein the carrier is Hepatitis B surface antigen.

328. The method according to claim 321, wherein the carrier is heat shock protein 65 (HSP 65).

329. The method according to claim 321, wherein the carrier is a polypeptide from Mycobacterium tuberculosis (BCG).

330. The method according to claim 321, wherein the bacterial toxoid is tetanus toxoid.

331. The method according to claim 321, wherein the bacterial toxoid is CRM 197.

332. The method according to claim 321, wherein the carrier is Streptococcal rC5a peptidase.

333. The method according to claim 321, wherein the carrier is Streptococcus pyogenes ORF1224.

334. The method according to claim 321, wherein the carrier is Streptococcus pyogenes ORF1664.

335. The method according to claim 321, wherein the carrier is Streptococcus pyogenes ORF2452.

336. The method according to claim 321, wherein the carrier is Chlamydia pneumoniae ORF T367.

337. The method according to claim 321, wherein the carrier is Chlamydia pneumoniae ORF T858.

338. The method according to claim 319, wherein the carrier is a growth factor or hormone, which stimulates or enhances immune response.

339. The method according to claim 338, wherein the growth factor or hormone is selected from a group consisting of IL-1, IL-2, γ-interferon, IL-10, GM-CSF, MIP-1α, MIP-1β, and RANTES.

340. The method according to claim 262, wherein one or more adjuvants are selected from the group consisting of GM-CSF, 529SE, IL-12, aluminum phosphate, aluminum hydroxide, Mycobacterium tuberculosis, Bordetella pertussis, bacterial lipopolysaccharides, aminoalkyl glucosamine phosphate compounds, MPL™ (3-O-

deacylated monophosphoryl lipid A), a polypeptide, Quil A, STIMULON™ QS-21, a pertussis toxin (PT), an E. coli heat-labile toxin (LT), IL-1 α, IL-1 β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, interferon- α, interferon- β, interferon- γ, G-CSF, TNF- α and TNF- β.

341. The method according to claim 340, wherein the peptide immunogen is Aβ, the carrier is CRM197, and the adjuvant is 529 SE.

342. The method according to claim 1, wherein the peptide immunogen is an Aβ fragment.

343. The method according to claim 342, wherein the Aβ fragment is from the N-terminal half of Aβ.

344. The method according to claim 343, wherein the Aβ fragment is selected from the group consisting of Aβ1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-9, 1-10, 1-11, 1-12, 1-16, 3-6, and 3-7.

345. The method according to claim 344, wherein the Aβ fragment is selected from the group consisting of Aβ1-5, 1-7, 1-9, and 1-12.

346. The method according to claim 342, wherein the Aβ fragment is from the C-terminal half of Aβ.

347. The method according to claim 346, wherein the Aβ fragment is from the group consisting of Aβ33-42, 35-40, and 35-42.

348. The method according to claim 342, wherein the Aβ fragment is from the internal portion of Aβ.

349. The method according to claim 348, wherein the Aβ fragment is selected from the group consisting of Aβ13-28, 15-24, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, and 25-35.

350. The method according to claim 342, wherein the Aβ fragment is selected from the group consisting of Aβ1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-11, 1-12, 1-16, 1-28 3-6, 3-7, 13-28, 15-24, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 25-35, 33-42, 35-40, and 35-42.

351. The method according to claim 342, wherein the peptide immunogen further comprises at least one additional copy of the Aβ fragment.

352. The method according to claim 343, wherein the peptide immunogen further comprises at least one additional copy of the N-terminal fragment of Aβ.

353. The method according to claim 352, wherein the peptide immunogen comprises from N-terminus to C-terminus, a plurality of additional copies of the N-terminal fragment of Aβ.

354. The method according to claim 353, wherein the peptide immunogen is (Aβ1-7)3.

355. The method according to claim 353, wherein the peptide immunogen is (Aβ1-7)5.

356. The method according to claim 342, wherein the peptide immunogen further comprises at least one additional copy of a different Aβ fragment.

357. The method according to claim 351, wherein the Aβ peptide immunogen is a fragment of Aβ selected from the group consisting of Aβ 7-11, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40 and 35-42.

358. The method according to claim 342, 343, 350, or 351, wherein the peptide immunogen is linked at its C-terminus to the N-terminus of a carrier molecule to form a heterologous peptide.

359. The method according to claim 342, 343, 350, or 351, wherein the peptide immunogen is linked at its N-terminus to the C-terminus of a carrier molecule to form a heterologous peptide.

360. The method according to claim 342, 343, 350, or 351, wherein the peptide immunogen comprises from N-terminus to C-terminus, a first carrier molecule linked at its C-terminus to the N-terminus of the Aβ fragment linked at its C-terminus to the N-terminus of a second carrier molecule to form a heterologous peptide.

361. The method of claim 358, further comprising at least one additional copy of the carrier molecule.

362. The method of claim 358, further comprising at least one additional copy of the carrier molecule.

363. The method of claim 358, further comprising at least one copy of a different carrier molecule.

364. The method of claim 359, further comprising at least one additional copy of the carrier molecule.

365. The method of claim 359, further comprising at least one copy of a different carrier molecule.

366. The method of claim 360, wherein the first carrier and the second carrier are the same carrier molecule.

367. The method of claim 360, wherein the first carrier and the second carrier are different carrier molecules.

368. The method according to claim 358, wherein the carrier molecule is selected from the group consisting of a T-cell epitope, a B-cell epitope and combinations thereof.

369. The method according to claim 359, wherein the carrier molecule is selected from the group consisting of a T-cell epitope, a B-cell epitope and combinations thereof.

370. The method according to claim 359, wherein the carrier molecule is selected from the group consisting of a T-cell epitope, a B-cell epitope and combinations thereof.

371. The method according to claim 360, wherein the carrier molecule is selected from the group consisting of a T-cell epitope, a B-cell epitope and combinations thereof.

372. The method according to claim 342, wherein the peptide immunogen is further comprised of one or more molecules of the Aβ fragment are linked together in a multiple antigenic peptide (MAP) configuration.

373. The method according to claim 372, wherein the one or more Aβ fragments are selected from the group consisting of Aβ1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-11, 1-12, 1-16, 1-28 3-6, 3-7, 13-28, 15-24, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 25-35, 33-42, 35-40, and 35-42.

374. The method according to claim 372, wherein the peptide immunogen is Aβ1-7 and the MAP configuration is a MAP4 configuration.

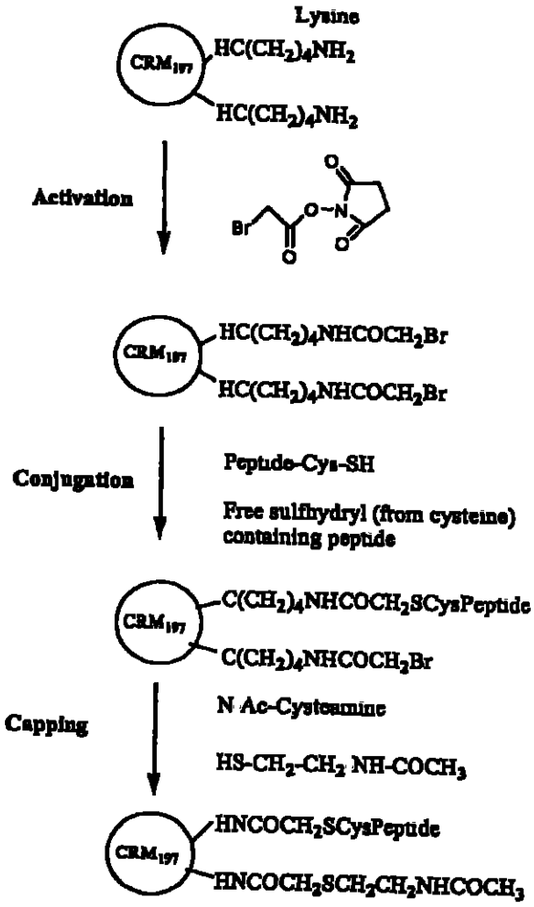
375. The method according to claim 372, wherein the peptide immunogen is (Aβ1-7)3 and the MAP configuration is a MAP4 configuration.

376. The method according to claim 372, wherein the peptide immunogen is (Aβ1-7)5 and the MAP configuration is a MAP4 configuration.

377. The use of the conjugate of any one of claims 152 or 207 in the manufacture of a medicament for use in the treatment, prophylaxis, or amelioration of an amyloidogenic disease.

378. The use of claim 377, where the disease is Alzheimer's disease.

379. The use of claim 377, wherein the disease is Down's syndrome.



Capped CRM Conjugate

Figure 1

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC http://www.sughrue.com

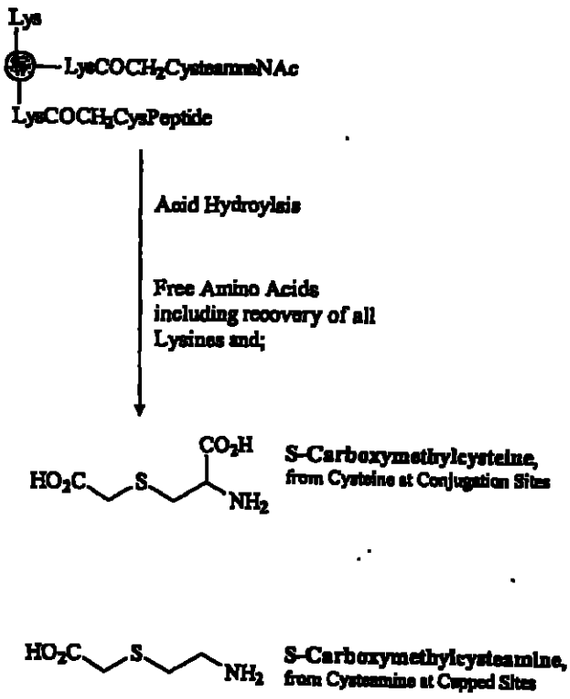


Figure 2

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

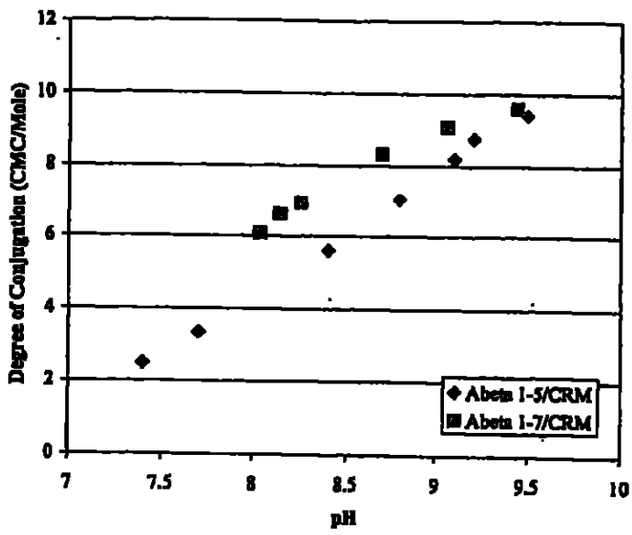


Figure 3

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

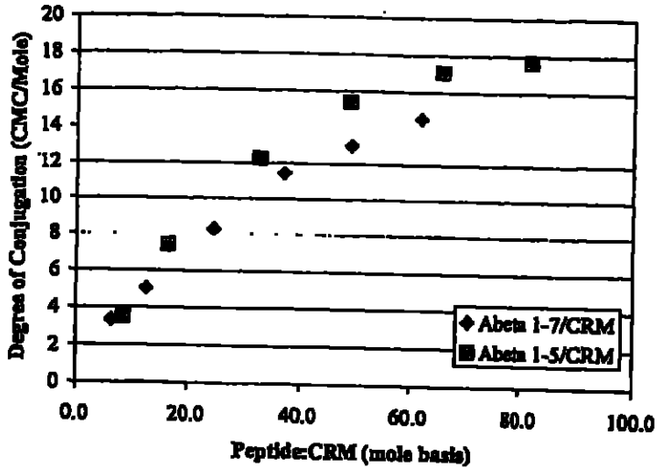


Figure 4

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

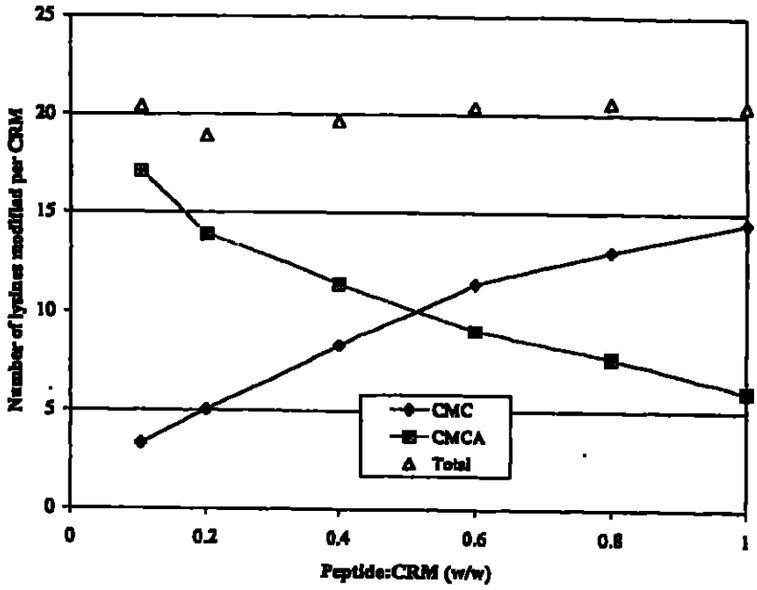


Figure 5

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

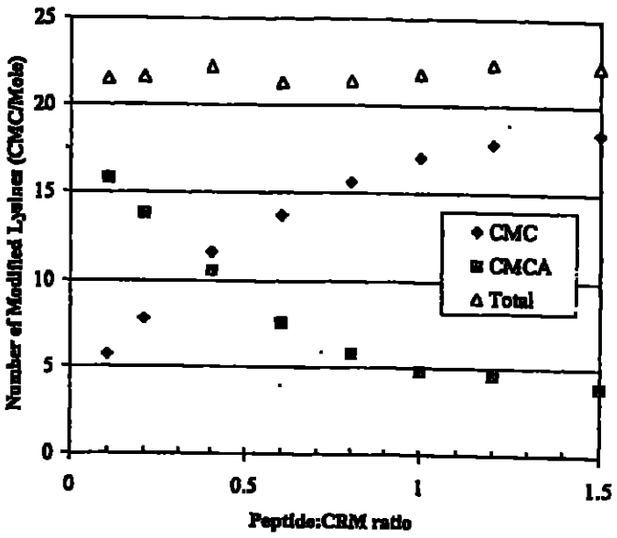


Figure 6

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

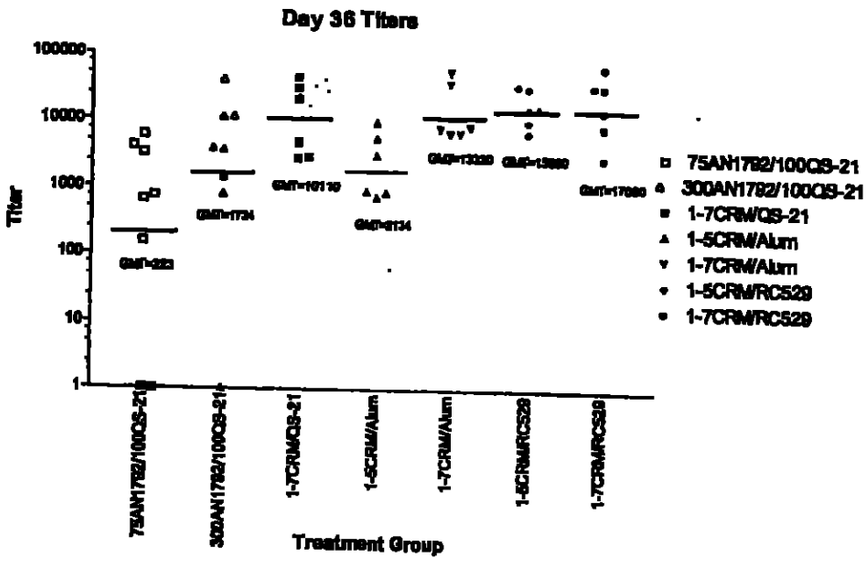


Figure 7

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

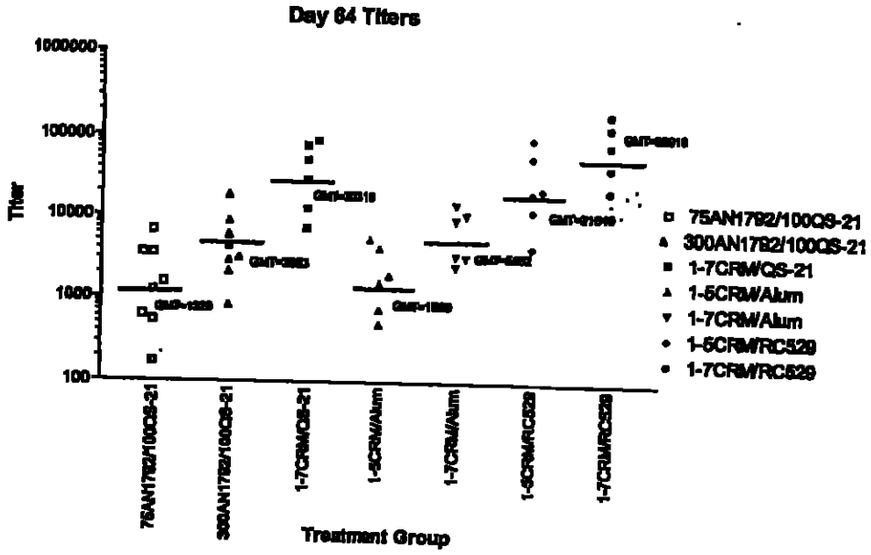


Figure 8

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

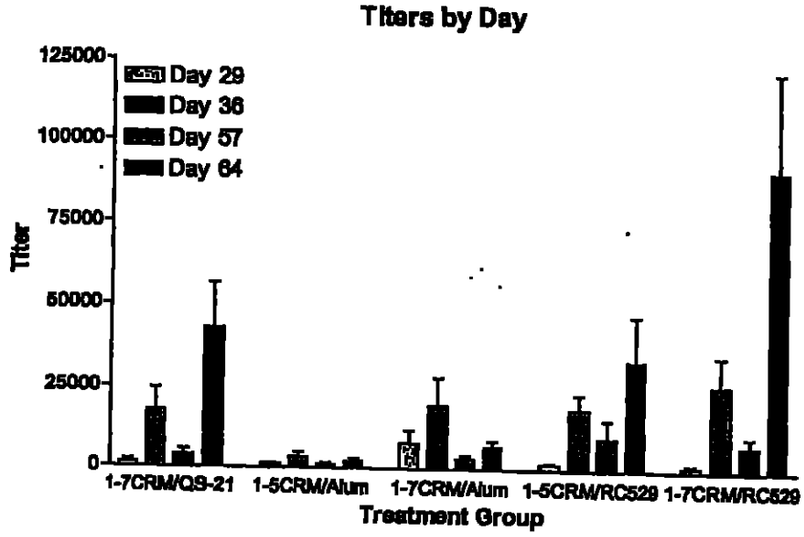


Figure 9

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

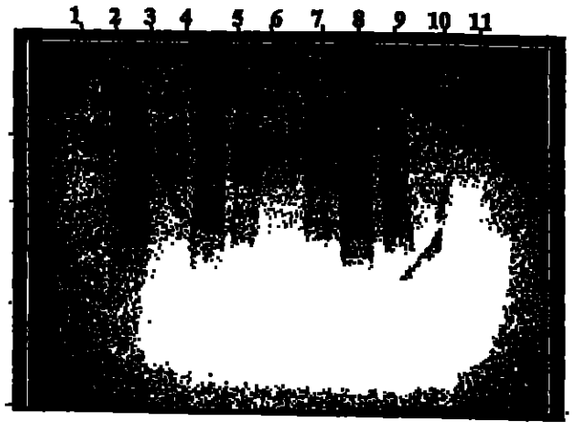


Figure 10

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

SEQUENCE LISTING

<110> Arumugham, Rasappa
Prasad, A. Krishna

<120> Methods of Producing Immunogenic Peptide Carrier Conjugates

<130> 025721-000110US

<140>
<141>

<150> US 60/530,480
<151> 2003-12-17

<160> 54

<170> PatentIn version 3.3

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

<400> 1

Asp Ala Glu Phe Arg Cys
1 5

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

<400> 2

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Cys
1 5

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

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

<400> 3

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

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

<400> 4

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

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

<400> 5

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

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

<400> 6

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Gly Ala Gly Ala Cys

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

1 5 10

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

<400> 7

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

<210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

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

Cys

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

<400> 9

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

<210> 10

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

Gly Ala Gly Ala
1

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

<400> 11

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

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

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 12

Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 13
<211> 16
<212> PRT

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

<213> Homo sapiens

<400> 13

Glu Lys Lys Ile Ala Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser Val Phe Asn Val
1 5 10 15

<210> 14
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

Phe Glu Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile
1 5 10

<210> 15
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

Asp Gln Ser Ile Gly Asp Leu Ile Ala Glu Ala Met Asp Lys Val Gly
1 5 10 15

Asn Glu Gly

<210> 16
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Gln Val His Phe Gln Pro Leu Pro Pro Ala Val Val Lys Leu
1 5 10

<210> 17
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

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

<210> 18
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
1 5 10 15

Ala Ser His Leu Glu
20

<210> 19
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr
1 5 10 15

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

<210> 20
<211> 51
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

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

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

Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Asp Ala Glu Phe
35 40 45

Arg His Asp
50

<210> 21
<211> 42
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21

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

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

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

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

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

<400> 22

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

Ile Gly Ile Thr Glu Leu
20

<210> 23
<211> 28
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp
1 5 10 15

Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu
20 25

<210> 24
<211> 43
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

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

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

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

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

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

<400> 25

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

Ile Gly Ile Thr Glu Leu
20

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

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 26

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

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Phe Arg His Asp
20

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

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(24)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 27

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

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

Ala Ala

<210> 28
<211> 34
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 28

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

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

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

His Asp

<210> 29
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 29

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

Lys Ala Ala Ala
20

<210> 30
<211> 24
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

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

Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg
20

<210> 31
<211> 24
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31

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

Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg
20

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

<400> 32

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

Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg
20

<210> 33
<211> 34
<212> PRT

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

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

Ala Thr

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

<400> 36

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

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

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

<400> 37

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

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

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

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

1 5 10 15

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

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

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

<400> 40

Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu Asn
1 5 10 15

Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln
20 25 30

Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp
35 40 45

Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly
50 55 60

Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val
65 70 75 80

Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val
85 90 95

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

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

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

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

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

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

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

Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu Phe
355 360 365

Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly His
370 375 380

Lys Thr Gln Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val Ser Trp Asn Thr
385 390 395 400

Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg Thr Gly Phe Gln Gly Glu Ser Gly His
405 410 415

Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu Asn Thr Pro Leu Pro Ile Ala Gly Val

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

420 425 430

Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr
435 440 445

His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile
450 455 460

Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro Lys Ser Pro Val Tyr Val Gly
465 470 475 480

Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val Ala Phe His Arg Ser Ser Ser
485 490 495

Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu
500 505 510

Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His Thr Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser
515 520 525

Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser
530 535

<210> 41
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41

Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly
1 5 10 15

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Arg

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

<400> 42

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

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

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

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

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

<400> 43

Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Cys
1 5

<210> 44
<211> 9
<212> PRT

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

<213> Artificial

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

<400> 44

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Cys
1 5

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

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

<400> 45

Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Cys
1 5

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

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

<400> 46

Cys Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly
1 5

<210> 47
<211> 9

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

<212> PRT
<213> Artificial

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

<400> 47

Cys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val
1 5

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

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

<400> 48

Cys Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp
1 5

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

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

<400> 49

Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Cys
1 5

<210> 50

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

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

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

<400> 50

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Cys
1 5

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

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

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> CRM 197 added via terminal cysteine

<400> 51

Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Cys
1 5

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

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

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> CRM 197 added via N-terminal cysteine

<400> 52

Cys Val Phe Phe Ala Glu Asp Val
1 5

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

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

<400> 53

Cys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp
1 5

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

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

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> CRM 197 added via N-terminal cysteine

<400> 54

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Cys Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu
1 5

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

CONJUGADOS DE PÉPTIDO INMUNOGÉNICO Aβ-VEHÍCULO Y MÉTODOS PARA SU PRODUCCIÓN

REFERENCIAS CRUZADAS A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio bajo U.S.C. 35 119(e) de la Solicitud Provisional de Patente Serie No. 60/530,481, presentada en Diciembre 17 de 2003 que se incorpora en la presente mediante la referencia en su totalidad para todo propósito.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La esencia de la inmunidad de adaptación es la capacidad de un organismo para reaccionar a la presencia de sustancias externas y para producir componentes (anticuerpos y células) capaces de interactuar específicamente con, y proteger al huésped de su invasión. Un "antígeno" o "inmunógeno" es una sustancia capaz de producir este tipo de respuesta inmune y también capaz de interactuar con las células y anticuerpos sensibilizados que se elaboran contra el mismo.

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

Las moléculas pequeñas como los péptidos cortos, aunque normalmente son capaces de interactuar con los productos de una respuesta inmune, frecuentemente no pueden ocasionar una respuesta por sí mismas. Estos inmunógenos

péptido o "haptenos" como también se denominan, son realmente antígenos incompletos, y, aunque no son capaces por sí mismos de ocasionar inmunogenicidad o de producir producción de anticuerpos, pueden hacerse inmunogénicos acoplándolos en un vehículo adecuado. Los vehículos son típicamente antígenos de proteína de peso molecular más alto que son capaces de ocasionar una respuesta inmunogénica al administrarse in vivo.

En una respuesta inmune, los anticuerpos se producen y se secretan por los linfocitos B en conjunción con las células auxiliares T (T_H). En la mayoría de los sistemas de hapteno-vehículo, las células B producen anticuerpos específicos tanto para el hapteno como para el vehículo. En estos casos, los linfocitos T tendrán dominios de enlace específicos en el vehículo, pero no reconocerán al hapteno solo. En un tipo de sinergismo, las células B y T cooperan para inducir una respuesta del anticuerpo específica al hapteno. Después de presentarse tal respuesta inmune, si el huésped se prueba subsecuentemente solo con el hapteno, comúnmente responderá produciendo anticuerpos específicos al hapteno de células de memoria formadas después de la inmunización inicial.

Los haptenos sintéticos que imitan algunas estructuras epitópicas críticas en macromoléculas más grandes, frecuentemente se encuentran conjugados a vehículos para crear una respuesta inmune a la molécula "original" más grande. Por ejemplo, los segmentos de péptido corto pueden sintetizarse de la secuencia conocida de una proteína y acoplarse a un vehículo para inducir inmunogenicidad hacia la proteína de origen. Este tipo de procedimiento sintético para la producción de inmunógenos se ha convertido en la base

de gran parte de la investigación actual en la creación de vacunas. Sin embargo, en muchas instancias, la sola creación de una respuesta de la célula B utilizando conjugados de péptido sintético-vehículo, aunque bien diseñada, no siempre garantizará una inmunidad protectora completa hacia un antígeno intacto. La respuesta inmune generada pór un epítope de péptido corto a partir de una célula más grande de partícula viral o bacterial, puede ser suficiente solo para generar memoria al nivel de la célula B. En estos casos, actualmente se acepta en general que una respuesta citotóxica de célula T es un indicador más importante de la inmunidad protectora. El diseño de inmunógenos de péptido con los sitios de enlace epitópico apropiados para el reconocimiento tanto de la célula B como de la célula T, es actualmente una de las áreas de investigación de mayor reto en la inmunología.

El procedimiento para incrementar la inmunogenicidad de moléculas pequeñas o de baja inmunogenicidad conjugando estas moléculas a moléculas "vehículo" más grandes se ha utilizado exitosamente durante décadas (ver, e.g., Goebel et al., (1939), J. Exp. Med. 69:53). Por ejemplo, se han descrito muchas composiciones inmunogénicas en las cuales se han conjugado polímeros capsulares purificados a proteínas vehículo para crear composiciones inmunogénicas más efectivas explotando este "efecto de vehículo". Schneerson et al., (1984) Infect. Immun. 45:582-591). La conjugación también ha mostrado desviar la baja respuesta del anticuerpo comúnmente observada en infantes al inmunizarse con un polisacárido libre (Anderson et al., (1985) J. Pediatr. 107: 346; Insel et al., (1986) J. Exp. Med. 158:294.

Se han generado con éxito conjugados de hapteno-vehículo utilizando diversos reactivos de reticulación/acoplamiento tales como reticuladores homobifuncionales, heterobifuncionales o de longitud cero. Muchos de tales métodos se encuentran actualmente disponibles para el acoplamiento de sacáridos, proteínas y péptidos a vehículos de péptido. La mayoría de los métodos crean enlaces amina, amida, isotiourea o disulfuro o en algunos casos tioéteres. Una desventaja en el uso de reactivos de acoplamiento, que introducen sitios reactivos a las cadenas laterales de moléculas reactivas de aminoácido en moléculas vehículo y/o hapteno, es que los sitios reactivos si no se neutralizan se encuentran libres para reaccionar con cualquier molécula no deseada ya sea in vitro (afectando por tanto adversamente la funcionalidad o estabilidad de el(los) conjugado(s)) o in vivo (estableciendo por tanto un riesgo potencial de sucesos adversos en personas o animales inmunizados con las preparaciones). Tales sitios reactivos excesivos pueden reactivarse o "taparse", a fin de inactivar estos sitios, utilizando diversas reacciones químicas conocidas, pero estas reacciones de otra manera pueden romper la funcionalidad de los conjugados. Esto puede ser particularmente problemático cuando se pretende crear un conjugado introduciendo los sitios reactivos en la molécula vehículo, dado que su mayor tamaño y más compleja estructura (en relación al hapteno) puede hacerla más vulnerable a los efectos de rompimiento del tratamiento químico. En realidad, no se conocen ejemplos de métodos en los cuales se prepare un conjugado activando primero el vehículo, después reactivando con el hapteno en una reacción de conjugación, y finalmente "tapando" los sitios reactivos restantes, mientras se

preserva la capacidad del conjugado resultante para funcionar como una composición inmunogénica que tenga las propiedades deseadas del "efecto de vehículo".

BREVE SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se dirige a métodos para producir un conjugado inmunogénico de un péptido inmunógeno que comprende el péptido Aβ o fragmentos de Aβ o análogos de los mismos con un vehículo de proteína/polipéptido, en donde el péptido Aβ o fragmentos de Aβ o análogos de los mismos se conjugan al vehículo a través de grupos funcionales derivados de residuos aminoácido del vehículo tales como residuos lisina, y en donde cualquier grupo funcional no conjugado, derivado de los residuos aminoácido se inactiva tapando para bloquearlo de la reacción con otras moléculas, incluyendo proteínas/polipéptidos preservando así la funcionalidad del vehículo, de manera que retenga la capacidad de producir las respuestas inmunes deseadas contra el inmunógeno de péptido que de otra manera no ocurrirían sin un vehículo. Además, la invención se refiere también a conjugados producidos mediante los métodos anteriores, y a composiciones inmunogénicas que contienen tales conjugados.

En una modalidad, la invención se dirige a un primer método para conjugar un inmunógeno de péptido que comprende el péptido Aβ o fragmentos de Aβ o análogos de los mismos mediante un grupo reactivo de un residuo de aminoácido del inmunógeno de péptido a un vehículo de proteína/polipéptido que tiene uno o más grupos funcionales, comprendiendo el método las etapas de: (a) derivar uno o más de los grupos funcionales del vehículo de proteína/polipéptido para generar una molécula derivada con sitios reactivos; (b) hacer reaccionar el vehículo

proteína/polipéptido derivado de la etapa (a) con un grupo reactivo de un residuo de aminoácido del inmunógeno de péptido bajo condiciones de reacción tales que el inmunógeno de péptido se conjuga al vehículo proteína/polipéptido derivado mediante los grupos funcionales; y (c) hacer reaccionar adicionalmente el conjugado con un reactivo de tapa para inactivar los grupos funcionales reactivos libres en el vehículo de proteína/polipéptido activado, preservando así la funcionalidad del vehículo de manera que retenga sus capacidades para producir las respuestas inmunes deseadas contra el inmunógeno de péptido que de otra manera no ocurrirían sin un vehículo.

En una modalidad, el vehículo de proteína/polipéptido se selecciona del grupo que consiste de albúmina de suero humano, hemocianina de lapa californiana, moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, hemaglutinina de influenza, péptido de enlace PAN-DR (polipéptido PADRE), proteína de malaria circumsporozita (CS), antígeno de superficie de hepatitis B (HB_sAg_{19-28}, Proteína de Choque Térmico (HSP) 65, Bacilo Calmette-Guerin (BCG), toxina de cólera, mutantes de toxina de cólera con toxicidad reducida, toxina de difteria, proteína CRM_{197} que es de reacción cruzada con la toxina de difteria, peptidasa Streptococal C5a recombinante, *Streptococcus pyogenes* ORF1224, *Streptococcus pyogenes* ORF1664, *Streptococcus pyogenes* ORF 2452, pneumolisina de *Streptococcus pneumoniae*, mutantes de pneumolisina con toxicidad reducida, *Chlamydia pneumoniae* ORF T367, *Chlamydia pneumoniae* ORF T858, toxoide de tétanos, VIH gp 120 T1, componentes que reconocen moléculas de matriz adhesiva de superficie microbial (MSCRAMMS), hormonas del factor de crecimiento, citocinas y quimiocinas.

En otra modalidad, el vehículo de proteína/polipéptido contiene un epítope de célula T.

Aún en otra modalidad, el vehículo de proteína/polipéptido es un toxoide bacterial tal como un toxoide de tétanos, toxina de cólera o mutante de toxina de cólera como se describió anteriormente. En una modalidad preferida, el vehículo de proteína/polipéptido es CRM_{197}.

Aún en otra modalidad, el vehículo de proteína/polipéptido puede ser una hemaglutinina de influenza, un polipéptido PADRE, una proteína de malaria CS, un antígeno de superficie de hepatitis B ($HSBAg_{19-28}$), una proteína de choque térmico 65 (HSP 65). O un polipéptido de Mycobacterium tuberculosis (BCG).

En una modalidad preferida, el vehículo de proteína/polipéptido se selecciona de peptidasa de estreptococo rC5a, Streptococcus pyogenes ORF1224, Streptococcus pyogenes ORF1664, Streptococcus pyogenes ORF 2452, pneumolisina Streptococcus pneumoniae, mutantes de pneumolisina con toxicidad reducida, Chlamydia pneumoniae ORF T367, Chlamydia pneumoniae ORF T858.

En una modalidad, el vehículo de proteína/polipéptido es un factor de crecimiento u hormona que estimula o aumenta la respuesta inmune y se selecciona del grupo que consiste de IL-1, IL-2, γ-interferon, IL-10, GM-CSF, MIP-1α, MIP-1β, y RANTES.

En un aspecto, la invención proporciona un inmunógeno de péptido que comprende el péptido Aβ o fragmentos de Aβ o análogos de los mismos que produce una respuesta inmunogénica contra ciertos epítopes dentro de Aβ. Los péptidos inmunogénicos de la invención incluyen péptidos inmunogénicos heterólogos. En algunos péptidos

inmunogénicos, un fragmento Aβ se encuentra enlazado a un vehículo para formar un péptido inmunogénico heterólogo, y después este péptido heterólogo se enlaza a un vehículo utilizando un método de la presente invención para formar un conjugado.

En otro aspecto de la invención, el inmunógeno de péptido es un polipéptido que comprende un segmento de terminación N de al menos los residuos 1.5 de Aβ, siendo el primer residuo de Aβ el residuo de terminación N del polipéptido, en donde el polipéptido se encuentra libre de un segmento de terminación C de Aβ. Aún en otro aspecto de la invención el inmunógeno de péptido es un polipéptido que comprende un segmento de terminación N de Aβ, comenzando el segmento en el residuo 1-3 de Aβ y finalizando en los residuos 7-11 de Aβ. En algunos aspectos de la invención, el inmunógeno de péptido es un agente que induce una respuesta inmunogénica contra un segmento de terminación N de Aβ, comenzando el segmento en el residuo 1-3 de Aβ y finalizando en los residuos 7-11 de Aβ sin inducir una respuesta inmunogénica contra un epítope dentro de los residuos 12-43 de Aβ43. En otro aspecto de la invención, el inmunógeno de péptido es un polipéptido heterólogo que comprende un segmento de Aβ enlazado a una secuencia heteróloga de aminoácidos que induce una respuesta de la célula auxiliar T contra la secuencia heteróloga de aminoácidos y por tanto una respuesta de la célula B contra el segmento de terminación N.

En algunos inmunógenos de péptido, el segmento de terminación N de Aβ se encuentra enlazado en su terminación C a un polipéptido heterólogo. En algunos inmunógenos de péptido, el segmento de terminación N de Aβ se encuentra enlazado en su terminación N a un polipéptido heterólogo. En

algunos inmunógenos de péptido, el segmento de terminación N de Aβ se encuentra enlazado en sus terminaciones N y C a los primero y segundo polipéptidos heterólogos. En algunos inmunógenos de péptido, el segmento de terminación N de Aβ se encuentra enlazado en su terminación N a un polipéptido heterólogo, y en su terminación C a al menos una copia adicional del segmento de terminación N. En algunos inmunógenos de péptido, el polipéptido comprende de la terminación N a la terminación C, el segmento de terminación N de Aβ, una pluralidad de copias adicionales del segmento de terminación N, y el segmento heterólogo de aminoácido.

En algunos de los inmunógenos de péptido anteriores, el polipéptido comprende además al menos una copia adicional del segmento de terminación N. En algunos de los inmunógenos de péptido anteriores, el fragmento se encuentra libre de al menos los 5 aminoácidos de terminación C en Aβ43.

En algunos aspectos de los inmunógenos de péptido anteriores, el fragmento comprende hasta 10 aminoácidos contiguos de Aβ.

En otro aspecto, la invención proporciona un inmunógeno de péptido que comprende el péptido Aβ o fragmentos de Aβ o sus análogos que emiten una respuesta inmunogénica contra ciertos epítopes dentro de Aβ que puede encontrarse en una configuración referida como configuración múltiple de péptido antigénico (MAP).

En algunos de los aspectos anteriores de la invención, el inmunógeno de péptido es la mitad de terminación N de Aβ. En algunos aspectos de la invención, el inmunógeno de péptido es un fragmento de Aβ seleccionado del grupo que consiste de Aβ 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-11,

1-12, 1-16, 3.6, y 3-7. En alguno de los aspectos anteriores de la invención, el inmunógeno de péptido es de la región interna de Aβ. En algunos aspectos de la invención, el inmunógeno de péptido es un fragmento de Aβ seleccionado del grupo que consiste de Aβ 13-28, 15-24, 17-28 y 25-35. En alguno de los aspectos anteriores de la invención, el inmunógeno de péptido es el extremo de terminación C de Aβ. En algunos aspectos de la invención, el inmunógeno de péptido es un fragmento de Aβ seleccionado del grupo que consiste de Aβ 33-42, 35-40 y 35-42. En alguno de los aspectos de la invención, el inmunógeno de péptido es un fragmento de Aβ seleccionado del grupo que consiste de Aβ 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-11, 1-12, 1-16, 1-28, 3-6, 3-7, 13-28, 15-24, 17-28, 25-35, 33-42, 35-40, y 35-42. En alguno de los aspectos de la invención, el inmunógeno de péptido es un fragmento de Aβ seleccionado del grupo que consiste de Aβ 1-5, Aβ 1-7, Aβ 1-9, y Aβ 1-12. En algunos aspectos de la invención, el inmunógeno de péptido es un fragmento de Aβ seleccionado del grupo que consiste de Aβ 1-5L, Aβ 1-7L, Aβ 1-9L, y Aβ 1-12L en donde L es un enlazador. En algunos aspectos de la invención, el inmunógeno de péptido es un fragmento de Aβ seleccionado del grupo que consiste de Aβ 1-5L-C, Aβ 1-7L-C, Aβ 1-9L-C, y Aβ 1-12L-C en donde C es un residuo cisteína de aminoácido.

En algunos aspectos de la invención el inmunógeno de péptido es un fragmento de Aβ seleccionado del grupo que consiste de Aβ 16-22, Aβ 16-23, Aβ 17-23, Aβ17-24, Aβ18-24 y Aβ 18-25. En algunos aspectos de la invención el inmunógeno de péptido es un fragmento de Aβ seleccionado del grupo que consiste de Aβ 16-22C, Aβ 16-23C, Aβ 17-23C, Aβ17-24C, Aβ18-24C y Aβ 18-25C en donde C es un residuo cisteína de

aminoácido. En otros aspectos de la invención el inmunógeno de péptido es un fragmento de Aβ seleccionado del grupo que consiste de C-Aβ 16-22, C-Aβ 16-23, C-Aβ 17-23, C-Aβ17-24, C-Aβ18-24 y C-Aβ 18-25 en donde C es un residuo cisteína de aminoácido.

En algunos de los inmunógenos de péptido anteriores, el polipéptido heterólogo se selecciona del grupo que consiste de péptidos que tienen un epítope de célula T, un epítope de célula B y sus combinaciones.

En una modalidad, el grupo funcional de una o más moléculas de aminoácido del vehículo de proteína/polipéptido o del enlazador de polipéptido opcionalmente unido se deriva utilizando un reactivo de reticulación. En otra modalidad, el reactivo de derivatización es un reactivo de reticulación de longitud cero. En otra modalidad, el reactivo de derivatización es un reactivo de reticulación homobifuncional. Aún en otra modalidad, el reactivo de derivatización es un reactivo de reticulación heterobifuncional.

En una modalidad preferida, el reactivo heterobifuncional es un reactivo que reacciona con un grupo funcional primario o ε-amina de una o más moléculas de aminoácido del vehículo de proteína/polipéptido y un grupo tiol pendiente de una o más moléculas de aminoácido del inmunógeno de péptido. En una modalidad, el reactivo heterobifuncional es N-succinimidil bromoacetato.

En otra modalidad, el grupo funcional primario o ε-amina es lisina. Aún en otra modalidad, la derivatización del grupo funcional primario o ε-amina de la lisina del vehículo de proteína/polipéptido con N-succinimidil bromoacetato da como resultado los residuos primario o ε-

amina en moléculas de lisina en el vehículo de proteína/polipéptido. En una modalidad más preferida, el grupo tiol pendiente es un residuo cisteína del inmunógeno de péptido, que puede localizarse en la terminación amino del inmunógeno de péptido, en la terminación carboxi del inmunógeno de péptido o internamente en el inmunógeno de péptido.

En otra modalidad, el grupo tiol pendiente se genera por un reactivo de tiolación tal como N-acetil homocisteinatio lactona, reactivo de Traut (2-iminotilano) SATA (N-succinimidil S-acetiltioacetato), SMPT (4-succinimidiloxicarbonil-metil-2-piridilditio tolueno), sulfo LC SPDP (Sulfo succinimidil piridil ditio propionamido hexanoato), SPDP (Succinimidil piridil ditio propionato). En una modalidad preferida, el reactivo de tapa que se utiliza para inactivar los grupos funcionales reactivos libres del vehículo activado de proteína/polipéptido se selecciona del grupo de reactivos que consiste de cisteamina, N-acetilcisteamina, y etanolamina.

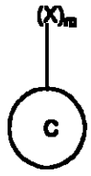
En una modalidad particularmente preferida, el reactivo de tapa que se utiliza para inactivar los grupos funcionales reactivos libres del vehículo activado de proteína/polipéptido se selecciona del grupo de reactivos que consiste de hidróxido de sodio, carbonato de sodio, bicarbonato de amonio y amoniaco.

En una modalidad, el grupo reactivo del residuo de aminoácido del inmunógeno de péptido es un grupo sulfhidrilo libre.

En otra modalidad, uno o más de los grupos funcionales se encuentra en un enlazador, que se une opcionalmente al vehículo de proteína/polipéptido. En una

modalidad preferida, el enlazador es un enlazador de péptido. En una modalidad más preferida, el enlazador de péptido es polilisina.

En otra modalidad, la invención se dirige a un segundo método para conjugar un inmunógeno de péptido que comprende el péptido Aβ o fragmentos de Aβ o sus análogos con un vehículo de proteína/polipéptido que tiene la estructura:



en donde,

C es un vehículo de proteína/polipéptido y X es un grupo funcional derivable de un residuo de aminoácido en el vehículo de proteína/polipéptido u opcionalmente de un residuo de aminoácido de un enlazador de péptido covalentemente unido al vehículo de proteína/polipéptido, y en donde m es un entero mayor que 0, pero menor o igual a 85, comprendiendo el método las etapas de:

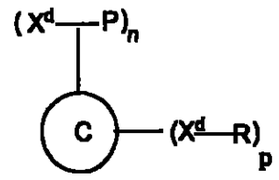
(a) derivar uno o más de los grupos funcionales del vehículo de proteína/polipéptido o de la molécula enlazadora unida opcionalmente para generar una molécula derivada con sitios reactivos;

(b) hacer reaccionar el vehículo proteína/polipéptido derivado de la etapa (a) con un grupo reactivo de un residuo de aminoácido del inmunógeno de péptido para formar un conjugado de inmunógeno de péptido-vehículo de proteína/polipéptido; y

(c) hacer reaccionar adicionalmente dicho conjugado con un reactivo de tapa para inactivar los grupos funcionales reactivos libres en el vehículo de proteína/polipéptido

185

activado, de manera que los grupos funcionales no son libres de reaccionar con otras moléculas, incluyendo proteínas/polipéptidos preservando así la funcionalidad del vehículo, de manera que retenga su capacidad para producir las respuestas inmunes deseadas contra el inmunógeno de péptido que de otra manera no ocurrirían sin un vehículo a fin de generar un conjugado tapado de inmunógeno de péptido-vehículo de proteína/polipéptido que tiene la fórmula:



en donde,

C es un vehículo de proteína/polipéptido y X^d es un grupo funcional derivado de un residuo de aminoácido del vehículo de proteína/polipéptido u opcionalmente de un residuo de aminoácido de un enlazador de péptido covalentemente unido al vehículo de proteína/polipéptido, y en donde,

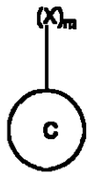
P es la molécula de inmunógeno de péptido covalentemente unida al grupo funcional derivado en el residuo de aminoácido en el vehículo de proteína u opcionalmente de un residuo de aminoácido de un enlazador de péptido covalentemente unido a un vehículo de proteína/polipéptido, R es una molécula de tapa covalentemente unida al grupo funcional derivado en un residuo de aminoácido en el vehículo de proteína/polipéptido u opcionalmente de un residuo de aminoácido de un enlazador de péptido covalentemente unido a un vehículo de proteína/polipéptido, n es un entero mayor que 0, pero menor o igual a 85, y p es un entero mayor que 0, pero menor que

186

85.

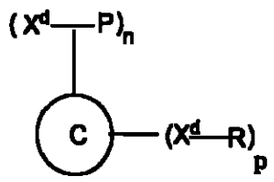
Las modalidades detalladas para el primer método antes descrito también son aplicables a los conjugados recientemente descritos preparados mediante el segundo método.

En una modalidad, la invención se dirige a un inmunógeno de péptido que comprende conjugados de inmunógeno de péptido que comprende el péptido Aβ o fragmentos de Aβ o sus análogos/polipéptido vehículo en donde el vehículo de proteína/polipéptido tiene la fórmula:



en donde,

C es un vehículo de proteína/polipéptido y X es un grupo funcional derivable de un residuo de aminoácido en el vehículo de proteína/polipéptido u opcionalmente de un residuo de aminoácido de un enlazador de péptido covalentemente unido al vehículo de proteína/polipéptido, y en donde m es un entero mayor que 0, pero menor o igual a 85, y en donde el conjugado tapado de inmunógeno de péptido-vehículo de proteína/polipéptido tiene la fórmula:



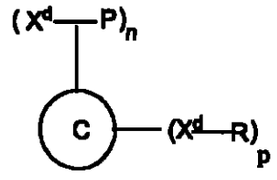
en donde,

C es un vehículo de proteína/polipéptido y X^d es un grupo funcional derivado de un residuo de aminoácido del vehículo de proteína/polipéptido u opcionalmente de un

residuo de aminoácido de un enlazador de péptido covalentemente unido al vehículo de proteína/polipéptido, en donde, P es la molécula de inmunógeno de péptido covalentemente unida al grupo funcional derivado del residuo de aminoácido del vehículo de proteína u opcionalmente de un residuo de aminoácido de un enlazador de péptido covalentemente unido a un vehículo de proteína/polipéptido, R es una molécula de tapa covalentemente unida al grupo funcional derivado de un residuo de aminoácido del vehículo de proteína/polipéptido u opcionalmente de un residuo de aminoácido de un enlazador de péptido covalentemente unido a un vehículo de proteína/polipéptido, preservando así la funcionalidad del vehículo, de manera que retenga la capacidad de producir las respuestas inmunes deseadas contra el inmunógeno de péptido que de otra manera no ocurrirían sin un vehículo, n es un entero mayor que 0, pero menor o igual a 85, y p es un entero mayor que 0, pero menor que 85.

Las modalidades detalladas para el primero y segundo métodos antes descritos también son aplicables a los conjugados recientemente descritos.

En otra modalidad, la invención se dirige a un inmunógeno de péptido que comprende conjugados de inmunógeno de péptido que comprende el péptido Aβ o fragmentos de Aβ o sus análogos/polipéptido vehículo generados de acuerdo con el segundo método de la invención y que tienen la fórmula:



en donde,

C es un vehículo de proteína/polipéptido y X^d es un

grupo funcional derivado de un residuo de aminoácido del vehículo de proteína/polipéptido u opcionalmente de un residuo de aminoácido de un enlazador de péptido covalentemente unido al vehículo de proteína/polipéptido, en donde, P es la molécula de inmunógeno de péptido covalentemente unida al grupo funcional derivado del residuo de aminoácido del vehículo de proteína u opcionalmente de un residuo de aminoácido de un enlazador de péptido covalentemente unido a un vehículo de proteína/polipéptido, R es una molécula de tapa covalentemente unida al grupo funcional derivado de un residuo de aminoácido del vehículo de proteína/polipéptido u opcionalmente de un residuo de aminoácido de un enlazador de péptido covalentemente unido a un vehículo de proteína/polipéptido, preservando así la funcionalidad del vehículo, de manera que retenga la capacidad de producir las respuestas inmunes deseadas contra el inmunógeno de péptido que de otra manera no ocurrirían sin un vehículo, n es un entero mayor que 0, pero menor o igual a 85, y p es un entero mayor que 0, pero menor que 85.

Las modalidades detalladas para el segundo método antes descrito también son aplicables a los conjugados generados por el segundo método, como recién se describió.

En otra modalidad, la invención se dirige a composiciones inmunogénicas que comprenden un conjugado de un inmunógeno de péptido con un vehículo de proteína/polipéptido generado mediante el segundo método de la invención, conjuntamente con uno o más excipientes, diluyentes y adyuvantes farmacéuticamente aceptables.

Las modalidades detalladas para el segundo método y para los conjugados generados por el mismo antes descrito también son aplicables a composiciones inmunogénicas que

contienen esos conjugados, como recién se describió.

En otra modalidad, la invención se dirige a un método para inducir una respuesta inmune en un sujeto mamífero, que comprende administrar una cantidad efectiva de una composición inmunogénica de la presente invención al sujeto.

Las modalidades detalladas aplicables a la composición inmunogénica que contiene los conjugados de la presente invención también son aplicables a la modalidad de la invención dirigida al método de uso de estas composiciones inmunogénicas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1: Esquema de flujo que ilustra la química del proceso utilizada para la conjugación de fragmentos de péptido Aβ a vehículo de proteína/polipéptido CRM_{197} para formar el conjugado Aβ/CRM_{197}.

Figura 2: Esquema de flujo que ilustra la química de hidrólisis utilizada para la determinación cuantitativa de S-carboximetilcisteína y S-carboximetilcisteamina como una evaluación del grado de conjugación de los conjugados de inmunógeno de péptido-vehículo de proteína/polipéptido tales como el conjugado Aβ/CRM_{197}.

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

Figura 4: Esta figura ilustra la dependencia de la conjugación del péptido Aβ/CRM al péptido: relación de CRM.

Figura 5: Verificación del proceso de tapa para la conjugación de Aβ-7/CRM. El pH de la reacción fue de 9.15. El tiempo de reacción con el péptido fue de 16 horas, el tapa con N-acetilcisteamina fue de 8 horas.

Figura 6: Conjugación y tapa con diversos péptidos:

190

relaciones de CRM con el péptido. El pH de la reacción fue de 9.0. El tiempo de reacción con el péptido fue de 16 horas, el tapa con N-acetilcisteamina e de 8 horas.

Figura 7: Titulaciones del día 36 del suero de primate después de la inmunización de primates con conjugados de péptido Aβ con diversos adyuvantes.

Figura 8: Titulaciones del día 64 del suero de primate después de la inmunización de primates con conjugados de péptido Aβ con diversos adyuvantes.

Figura 9: Titulaciones de primates por día y grupo de tratamiento. Se inmunizaron primates con conjugados de Aβ 1-7 o Aβ 1-5 CRM_{197} con alum o RC529 como adyuvantes y se midieron titulaciones de anticuerpos anti Aβ en el día 29, 36, 57 y 54.

Figura 10: Se caracterizaron conjugados de péptido-proteína utilizando inmunoanálisis Western SDS-PAGE con un gel premoldeado de tris-tricina. Las rutas son: marcador (ruta 1); L-28375 24/01 (ruta 2); L-28375 24/02 (ruta 3); L-28375 24/03 (ruta 4); L-28375 24/04 (ruta 5); L-28375 24/05 (ruta 6); L-28375 24/06 (ruta 7); L-28375 24/07 (ruta 8); L-28375 24/08 (ruta 9); L-28375 24/09 (Mock) (ruta 10); y, $BrAcCRM_{197}$ (ruta 11).

BREVE DESCRIPCIÓN DE SECUENCIAS

SEQ ID NO:	Secuencia	Descripción
1	DAEFR-C	Aβ 1-5-C
2	DAEFRHD-C	Aβ 1-7-C
3	DAEFRHDSG-C	Aβ 1-9-C
4	DAEFRHDSGYEV-C	Aβ 1-12-C
5	DAEFR-GAGA-C	Aβ 1-5-L-C
6	DAEFRHD-GAGA-C	Aβ 1-7-L-C
7	DAEFRHDSG-GAGA-C	Aβ 1-9-L-C
8	DAEFRHDSGYEV-GAGA-C	Aβ 1-12-L-C

9	VEYGSDHRFEAD-C	Aβ 12-1-C
10	GAGA	Péptido enlazador
11	PKYVKQNTLKLAT	Hemaglutinina de influenza: $HA_{307-319}$
12	AKXVAAWTLKAAA	Péptido PAN-DR (péptido PADRE)
13	EKKIAKMEKASSVFNV	CS de malaria: epítope T3
14	FELLTRILTI	Antígeno de superficie de hepatitis B: HB_sAg_{19-28}
15	DQSIGDLIAEAMDKVGNEG	Proteína de choque térmico 65: $hsp65_{153-171}$
16	QVHFQPLPPAVVKL	Bacilo Calmette-Guerin (BCG)
17	QYIKANSKFIGITEL	Toxoide de tétanos: $TT_{830-844}$
18	FNNFTVSKWLRVPKVSASHLE	Toxoide de tétanos: $TT_{947-967}$
19	KQIINMWQEVGKAMY	VIH gp 120 T1
20	DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL-C-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-SAEFRHD	$Aβ_{1-7}/TT_{830-844}/C/TT_{947-967}/Aβ_{1-7}$
21	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA	$Aβ_{1-42}$
22	DAEFRHDQYIKANSKFIGITEL	AN90549: $Aβ_{1-7}/TT_{830-844}$ (utilizado en una configuración MAAP4)
23	DAEFRHDFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE	AN90550: $Aβ_{1-7}/TT_{947-967}$ (utilizado en una configuración MAP4)
24	DAEFRHD-QYIKANSKFIGITELFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE	AN90542: $Aβ_{1-7}/TT_{947-967}$ (utilizado en una

		configuración lineal)
25	EFRHDSG-QYIKANSKFIGITEL	AN90576: $A\beta_{3-9}/TT_{830-844}$ (utilizado en una configuración MAP4)
26	AKXVAAWTLKAAA-DAEFRHD	AN90562: $A\beta_{1-7}$/PADRE
27	DAEFRHD-DAEFRHDD-AEFRHDAKXVAAWTLKAAA	AN90543: $A\beta_{1-7}$ x 3/PADRE
28	AKXVAAWTLKAAA-DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD	PADRE/ $A\beta_{1-7}$ x 3
29	DAEFRHD-AKXVAAWTLKAAA	$A\beta_{1-7}$ x 3/PADRE
30	DAEFRHD-ISQAVHAAAAAHAEINEAGR	$A\beta_{1-7}$/fragmento de albúmina
31	FRHDSGY-ISQAVHAAAHAEINEAGR	$A\beta_{4-10}$/fragmento de albúmina
32	EFRHDSG-ISQAVHAAAHAEINEAGR	$A\beta_{3-9}$/fragmento de albúmina
33	PKYVKQNTLKLAT-DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD	$HA_{307-319}$/ $A\beta_{1-7}$ x 3
34	DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT-DAEFRHD	$A\beta_{1-7}/HA_{307-319}/A\beta_{1-7}$
35	DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT	$A\beta_{1-7}$ x $3/HA_{307-319}$
36	DAEFRHD-DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT	$A\beta_{1-7}$ x $2/HA_{307-319}$
37	DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT-EKKIAKMEKASSVFNV-QYIKANSFIGITEL-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-DAEFRHD	$A\beta_{1-7}/HA_{307-319}$/Malaria CS/$TT_{830-844}/TT_{947-967}$/ $A\beta_{1-7}$
38	DEAFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL-C-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE	$A\beta_{1-7}$ x $3/TT_{830-844}$/C/$TT_{947-967}$/
39	DARFRHD-QYIKANSKFIGITEL-C-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE	$A\beta_{1-7}/TT_{830-844}$/C/$TT_{947-967}$/
40	GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTKPGYVDSIQLGIQKPKSGTQGNYDDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNEPLSGKAGGVVKVTYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGLRGQDAMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSLSCINLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPIKNKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPEL	$CRM\beta_{1-97}$

193

	SELKTVTGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNL EKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIA LSSLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYNFVESIINLFQVV HNSYNRPAYSPGKTQPFLHDGYAVSWNTVEDSIIRTG FQGESGHDIKITAENTPLPIAGVLLPTIPGKLDVNKS KTHISVNGRKIRMRCRAIDDGVTFCRPKSPVYVGNGV HANLHVAFHRSSSEKIHSNEISSDSIGVLGYQKTDHT KVNSKLSLFFEIKS	
41	ISQAVHAAAHAEINEAGR	Fragmento de albúmina
42	DAEFGHDSGFEVRHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVG GVVIA	A(1-42) murino
43	VFFAEDVG-C	A(18-25-C
44	LVFFAEDV-C	A(17-24-C
45	KLVFFAED-C	A(16-23-C
46	C-VFFAEDVG	C-A(18-25
47	C-LVFFAEDV	C-A(17-24
48	C-KLVFFAED	C-A(16-23
49	VFFAEDV-C	A(18-24-C
50	LVFFAED-C	A(17-23-C
51	KLVFFAE-C	A(16-22-C
52	C-VFFAEDV	C- $A\beta_{18-24}$
53	C-LVFFAED	C- $A\beta_{17-23}$
54	C-KLVFFAE	C- $A\beta_{16-22}$

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención se dirige a métodos para generar conjugados de inmunógeno de péptido-vehículo en donde los grupos funcionales activos sin reaccionar en el vehículo que se generan durante la activación se desactivan utilizando reactivos de tapa tales como N-acetilcisteamina a fin de evitar que se reactiven adicionalmente. la presente invención se dirige también a conjugados tapados de vehículo-inmunógeno de péptido generados por esos métodos y a composición inmunogénicas que comprenden dichos conjugados.

El procedimiento para incrementar la

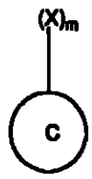
inmunogenicidad de moléculas pequeñas o de baja inmunogenicidad, tales como sacáridos, a través de la conjugación, se ha utilizado con éxito durante décadas (ver, e.g., Goebel et al., (1939) J. Exp. Med. 69:53), y muchas composiciones inmunogénicas se han descrito en las cuales los polímeros capsulares purificados se han conjugado a proteínas vehículo para crear composiciones inmunogénicas más efectivas explotando este "efecto de vehículo". Por ejemplo, Schneerson et al., (J. Exp. Med. 152:361-376, 1980), describe conjugados de Haemophilus inflenzae b polisacárido proteína que confieren inmunidad a enfermedades ocasionados por ese microorganismo. Los conjugados de PRP (poliribosilribitol fosfato, un polímero capsular de H. influenzae b) han mostrado ser más efectivos que las composiciones inmunogénicas en base al polisacárido solo (Chu et al., (1983) Infect. Immun. 40:245; Schneerson et al., (1984), Infect. Immun. 45:582-591). También la conjugación ha mostrado desviar la baja respuesta del anticuerpo comúnmente observada en infantes al inmunizarse con un polisacárido libre (Anderson et al., (1985) J. Pediatr. 107:346; Insel et al., (1986) J. Exp. Med. 158:294).

Una ventaja adicional del uso como vehículo de proteína de una toxina bacterial o toxoide contra el cual la inmunización de rutina de humanos (e.g., tétanos o difteria) es una práctica estándar, es que se induce una inmunidad deseada a la toxina o toxoide conjuntamente con inmunidad contra los patógenos asociados con el polímero capsular.

También se utilizan los conjugados antigénicos de determinante/hapteno-vehículo para producir anticuerpos monoclonales altamente específicos que reconocen epítopes químicos discretos en el hapteno acoplado. Los monoclonales

resultantes se utilizan frecuentemente para investigar la estructura epitópica entre proteínas nativas. En muchos casos, los determinantes/haptenos antigénicos utilizados para generar estos monoclonales son segmentos de péptido pequeño que representan sitios antigénicos cruciales en la superficie de proteínas más grandes. Los criterios para utilizar un vehículo exitoso en la generación de un conjugado antigénico de determinante/hapteno-vehículo son el potencial para la inmunogenicidad, la presencia de grupos funcionales adecuados para la conjugación con un determinante/hapteno antigénico, las propiedades de solubilidad razonables incluso después de la derivatización y la carencia de toxicidad in vivo.

Estos criterios se cumplen por los conjugados generados mediante los métodos de la presente invención. Los conjugados pueden ser cualquier conjugado estable de inmunógeno de péptido-vehículo generado utilizando el proceso de conjugación descrito en la presente. Los conjugados se generan utilizando un proceso de la presente invención en donde un vehículo de proteína/polipéptido que tiene la siguiente estructura:

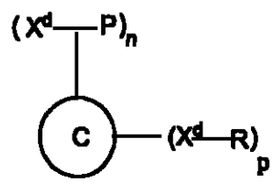


se encuentra unido covalentemente a un vehículo de proteína/polipéptido,

en donde,

C es un vehículo de proteína/polipéptido y X es un grupo funcional derivable de un residuo de aminoácido en el vehículo de proteína/polipéptido u opcionalmente de un residuo de aminoácido de un enlazador de péptido

covalentemente unido al vehículo de proteína/polipéptido, y en donde m es un entero mayor que 0, pero menor o igual a 85, se encuentra covalentemente unido a un inmunógeno de péptido y en donde el conjugado de inmunógeno de péptido-vehículo de proteína/polipéptido que tiene la siguiente fórmula, se representa por la siguiente fórmula:



en donde,

C es un vehículo de proteína/polipéptido y X^d es un grupo funcional derivado de un residuo de aminoácido del vehículo de proteína/polipéptido u opcionalmente de un residuo de aminoácido de un enlazador de péptido covalentemente unido al vehículo de proteína/polipéptido, P es un inmunógeno de péptido covalentemente unido al grupo funcional derivado del residuo de aminoácido del vehículo de proteína u opcionalmente de un residuo de aminoácido de un enlazador de péptido covalentemente unido a un vehículo de proteína/polipéptido, R es una molécula de tapa covalentemente unida al grupo funcional derivado de un residuo de aminoácido del vehículo de proteína/polipéptido u opcionalmente de un residuo de aminoácido de un enlazador de péptido covalentemente unido a un vehículo de proteína/polipéptido, preservando así la funcionalidad del vehículo, de manera que retenga la capacidad de producir las respuestas inmunes deseadas contra el inmunógeno de péptido que de otra manera no ocurrirían sin un vehículo, n es un entero mayor que 0, pero menor o igual a 85, y p es un entero mayor que 0, pero menor que 85.

197

Selección de vehículos

Algunos inmunógenos de péptido contienen el epítope apropiado para inducir una respuesta inmune, pero son demasiado pequeños para ser inmunogénicos. En esta situación, los inmunógenos de péptido se encuentran enlazados a un vehículo adecuado para ayudar a producir una respuesta inmune. En la representación esquemática anterior del conjugado de inmunógenos de péptido-vehículo generados mediante un proceso de la presente invención, C es un vehículo de proteína/polipéptido al cual los inmunógenos de péptido se conjugan directamente a través de grupos funcionales derivados en residuos aminoácido en el vehículo por sí mismos o indirectamente a través de grupos funcionales derivados en enlazadores de péptido covalentemente unidos a los vehículos. Los vehículos de proteína/polipéptido adecuados incluyen, pero no se limitan a, albúmina (incluyendo albúmina de suero humano), hemocianina de lapa californiana, moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovalbúmina, MSCRAMMS, toxoide de tétanos, o un toxoide de otras bacterias patógenas que tiene toxicidad reducida, incluyendo mutantes, tales como difteria, E. coli cólera, o H. pylori, o un derivados de toxina atenuados. Un vehículo tal es la proteína CRM_{197} (SEQ ID NO: 40) que es de reacción cruzada con la toxina de difteria.

Otros vehículos incluyen epítopes de célula T que se enlazan a múltiples alelos MHC, e.g., al menos 75% de todos los alelos MHC humanos. Tales vehículos se conocen algunas veces en la técnica como "epítopes universales de célula T". Los vehículos ejemplares con epítopes universales de célula T incluyen:

Hemaglutinina de influenza: $HA_{307-319}$ PKYVKQNTLKLAT

198

	(SEQ ID NO. 11)
Péptido PAN-DR (péptido PADRE	AKXVAAWTLKAAA
	(SEQ ID NO. 12)
CS malaria: epítope T3	EKKIAKMEKASSVFNV
	(SEQ ID NO. 13)
Antígeno de superficie de hepatitis B:	FELLTRILTI
HB_sAg_{19-28}	(SEQ ID NO. 14)
Proteína de choque térmico 65:	QSIGDLIAEAMDKVGNEG
$Hsp65_{153-171}$	(SEQ ID NO. 15)
Bacilo Calmette-Guerin (BCG)	QVHFQPLPPAVVKL
	(SEQ ID NO. 16)
Toxoide de tétanos: $TT_{830-844}$	QYIKANSKFIGITEL
	(SEQ ID NO. 17)
Toxoide de tétanos: $TT_{947-967}$	NNFTVSFWLRVPKVSASHLE
	(SEQ ID NO. 18)
VIH glp120 T1:	KQIINMWQEVGKAMY
	(SEQ ID NO. 19)
CRM_{197}	Ver Breve Descripción de las Secuencias
	(SEQ ID NO. 40)
Fragmento de albúmina	ISQAVHAAHAEINEAGR
	(SEQ ID NO. 41)

Otros vehículos para estimular o aumentar una respuesta inmune y a los cuales puede conjugarse un inmunógeno de péptido o un hapteno incluyen citocinas tales como IL-1, IL-1α y péptidos β, IL-2, γINF, IL-10, GM-CSF, y quimiocinas, tales como MIP 1α y β y RANTES. Los péptidos inmunogénicos también pueden enlazarse a vehículos de proteínas/péptido que aumentan el transporte a través de tejidos, como se describe en O'Mahony, WO 97/17163 y WO 97/17614, que se incorpora en la presente mediante referencia

en su totalidad para todo propósito.

Vehículos adicionales incluyen peptidasa de estreptococo C5a, Streptococcus pyogenes ORF1224, 1664, y 2452, Chlamydia pneumoniae ORFs T367 y T 858, pneumolisina de Streptococcus pneumonia, mutantes de pneumolisina con toxicidad reducida, factores de crecimiento y hormonas.

En una modalidad preferida de la presente invención, la proteína vehículo es CRM_{197}, un mutante no tóxico de la toxina de difteria con un cambio aminoácido en su secuencia primaria. La glicina presente en la posición de aminoácido 52 de la molécula se reemplaza con un ácido glutámico debido a un solo cambio de codón de ácido nucleico. Debido a este cambio, la proteína carece de actividad de ADP-ribosil transferasa y se convierte en no tóxica. Tiene un peso molecular de 58,408 Da. El CRM_{197} se produce en grandes cantidades mediante expresión recombinante de acuerdo con la Patente de E.U. No. 5,614,382, que se incorpora en la presente mediante la referencia. Las conjugaciones de sacáridos así como de péptidos a CRM_{197} se llevan a cabo enlazando a través de grupos ε-amino de residuos lisina. Se ha establecido a través de diversos productos comerciales que CRM_{197} es un vehículo excelente y seguro para epítopes de célula B.

Péptidos Inmunogénicos

Como se utiliza en la presente, el término "péptido inmunógeno" o "hapteno" es cualquier proteína o estructura de subunidad/fragmento/análogo derivado del mismo que puede emitir, facilitar o inducirse para producir una respuesta inmune al administrarse a un mamífero. En particular, el término se utiliza para referirse a un polipéptido antigénico determinante de cualquier fuente (bacteria, virus o

eucarioto), que pueda acoplarse a un vehículo utilizando un método descrito en la presente. Tales determinantes de inmunógeno de polipéptido/antagónico pueden ser de origen celular viral, bacterial o eucariótico.

Los inmunógenos de péptido pueden conjugarse a un vehículo para su uso como un inmunoterapéutico en la prevención, tratamiento, profilaxis o mejora de diversas enfermedades humanas. Tales inmunógenos de péptido incluyen aquellos derivados de un péptido Aβ de 39-43 aminoácidos, preferentemente 42 aminoácidos, que es el componente principal de placas características de la enfermedad de Alzheimer (AD) (ver U.S. 4,666,829; Glenner & Wong (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 120: 1131, Hardy (1984) TINS 20: 1131; Hardy (1977) TINS 20: 154), aquellos derivados de péptidos amiloide de amilin, un material polipéptido producido por células isleta pancreáticas que se ha implicado en diabetes tipo II, péptidos derivados de productos de gen de lipoproteína de baja densidad, que se han implicado en arteroesclerosis y péptidos antigénicos derivados de citocinas inflamatorias y factores de crecimiento tales como interleucina 6 (IL-6), factor α de necrosis de tumor (TNFα) y GDF-8. Tales inmunógenos de péptido eucarióticos pueden incluir ya sea célula T (CTL) o epítope de célula B, también conocido como proteína β amiloide, o péptido A4.

El Aβ también conocido como péptido β amiloide, o péptido A4 (ver U.S. 4,666,829; Glenner & Wong Biochem. Biophys. Res. Commun. 120: 1131, (1984)) es un péptido de 39-43 aminoácidos, que es el componente principal de las placas características de la enfermedad de Alzheimer. El Aβ es generado mediante el procesamiento de una proteína APP más grande por dos enzimas, llamadas secretasas β y γ (ver,

201

Hardy, TINS 20, 154 (1997)). Las mutaciones conocidas en APP asociada con la enfermedad de Alzheimer se presentan próximas al sitio de secretada β o γ, o dentro de Aβ. Por ejemplo, la posición 717 se encuentra próxima al sitio de separación de γ-secretasa de APP en su procesamiento a Aβ, y las posiciones 670/671 se encuentran próximas al sitio de separación de β-secretasa. Se cree que las mutaciones ocasionan AD interactuando con las reacciones de división mediante las cuales se forma el Aβ a fin de incrementar la cantidad de la forma de aminoácido 42/43 del Aβ generado.

El Aβ tiene la inusual propiedad de que puede arreglar y activar cascadas de complemento tanto clásicas como alternas. En particular, se enlaza a Clq y finalmente a C3bi. Esta asociación facilita el enlace a macrófagos conduciendo a la activación de células B. Además, el C3bi se rompe posteriormente y después se enlaza a CR2 en células B de manera dependiente de la célula T conduciendo a un incremento de 10,000 veces en la activación de estas células. Este mecanismo ocasiona que el Aβ genere una respuesta inmune en exceso a la de otros antígenos.

El Aβ tiene diversas formas de origen natural. Las formas humanas de Aβ se refieren como Aβ39, Aβ40, Aβ41, Aβ42 y Aβ43. Las secuencias de estos péptidos y su relación con el precursor de APP se ilustran por la Figura 1 de Hardy et al., TINS 20, 155-158 (1997). Por ejemplo, el Aβ42 tiene la secuencia:

H_2N-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-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Ile-Ala-OH (SEQ ID NO. 21).

Aβ41, Aβ40 y Aβ39 difieren de Aβ42 por la omisión de Ala-Ala-

Ile, y Ala-Ile-Val respectivamente, del extremo de terminación C. Aβ43 difiere de Aβ42 por la presencia de un residuo treonina en la terminación C.

Los inmunógenos de péptido que son fragmentos de Aβ son ventajosos en relación con la molécula intacta para uso en los presentes métodos por diversas razones. Primero, debido a que solo ciertos epítopes dentro de Aβ inducen una respuesta inmunogénica útil para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, una dosis igual de masa de un fragmento que contiene tales epítopes proporciona una mayor concentración molar de los epítopes inmunogénicos útiles que una dosis de Aβ intacto. Segundo, ciertos inmunógenos de péptido de Aβ generan una respuesta inmunogénica contra depósitos amiloide sin generar una respuesta inmunogénica significativa contra la proteína APP de la cual se deriva el Aβ. tercero, los inmunógenos de péptido de Aβ son más simples de fabricar que el Aβ intacto, debido a su menor tamaño. Cuarto, los inmunógenos de péptido de Aβ no se agregan de la misma manera que el Aβ intacto, simplificando la preparación de conjugados con vehículos.

Algunos inmunógenos de péptido de Aβ tienen una secuencia de al menos 2, 3, 5, 6, 10 o 20 aminoácidos contiguos de un péptido natural. Algunos inmunógenos de péptido no tienen más de 10, 9, 8, 7, 5 o 3 residuos contiguos de Aβ. En una modalidad preferida, los inmunógenos de péptido de la mitad de terminación N de Aβ se utilizan para preparar conjugados. Los inmunógenos de péptido preferidos incluyen Aβ 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-11, 3-7, 1-3 y 1-4. La designación de Aβ 1-5, por ejemplo, indica un fragmento de terminación N que incluye residuos 1-5 de Aβ. Se prefieren los fragmentos de Aβ que comienzan en la

terminación N y finalizan en un residuo dentro de los residuos 7-11 de Aβ. el fragmento Aβ 1-12 puede utilizarse también pero es menos preferido. En algunos métodos, el fragmento es un fragmento de terminación N diferente de Aβ 1-10. Otros fragmentos preferidos incluyen Aβ 13-28, 15-24, 25-35, 35-40, 35-42 y otros fragmentos internos y fragmentos de terminación C.

Algunos péptidos Aβ de la invención son péptidos inmunogénicos que al administrarse a un paciente humano o animal, generan anticuerpos que se enlazan específicamente a uno o más epítopes entre los residuos 16 y 25 de Aβ. Los fragmentos preferidos incluyen Aβ 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, y 18-25. Los anticuerpos que se enlazan específicamente a epítopes entre los residuos 16 y 25 se enlazan a Aβ solubles sin enlazarse a placas de Aβ. Estos tipos de anticuerpo pueden enlazarse específicamente a Aβ soluble en la circulación de un paciente o modelo animal sin enlazarse específicamente a placas de depósitos Aβ en el cerebro del paciente o modelo. El enlace específico de anticuerpos a Aβ soluble inhibe el Aβ de incorporarse en placas inhibiendo de este modo el desarrollo de las placas en un paciente o inhibiendo un incremento adicional en el tamaño o frecuencia de las placas si tales placas ya se han desarrollado antes de administrar el tratamiento.

Preferentemente, el fragmento de Aβ administrado carece de un epítope que generaría una respuesta de la célula T al fragmento. Generalmente, los epítopes de célula T son más grandes que los 10 aminoácidos contiguos. En consecuencia, los fragmentos de Aβ preferidos son del tamaño de 5-10 o preferentemente de 7-10 aminoácidos contiguos o de mayor preferencia 7 aminoácidos contiguos, i.e., de una

longitud suficiente para generar una respuesta del anticuerpo sin generar una respuesta de la célula T. Se prefiere la ausencia de epítopes de célula T debido a que estos epítopes no son necesarios para la actividad inmunogénica de fragmentos, y pueden ocasionar una respuesta inflamatoria no deseada en un subconjunto de pacientes (Anderson et al., (2002) J. Immunol. 168, 3697-3701; Senior (2002) Lancet Neurol. 1,3).

Se prefiere el fragmento Aβ 15-25 y los subfragmentos de sus 7-8 aminoácidos contiguos debido a que estos péptidos generan consistentemente una alta respuesta inmunogénica al péptido Aβ. Estos fragmentos incluyen Aβ 16-22, Aβ 16-23, Aβ 16-24, Aβ 17-23, Aβ 17-24, Aβ 18-24, y Aβ 18-25. Los subfragmentos Aβ 15-25 particularmente preferidos son de 7 aminoácidos contiguos de longitud. La designación Aβ 15-21, por ejemplo, indica un fragmento que incluye los residuos 15-20 de Aβ y carece de otros residuos de Aβ, y preferentemente 7-10 aminoácidos contiguos. Estos fragmentos pueden generar una respuesta al anticuerpo que incluye anticuerpos específicos de extremo.

Los inmunógenos de péptido de Aβ requieren de exploración para la actividad para despejar o prevenir los depósitos amiloide (ver WO 00/72880, que se incorpora en la presente en su totalidad para todo propósito). La administración de fragmentos de terminación N de Aβ induce la producción de anticuerpos que reconocen depósitos Aβ in vivo e in viro. En algunos métodos se utilizan fragmentos que carecen de al menos uno y algunas veces de al menos 5 o 10 aminoácidos de terminación C presentes en formas de origen natural de Aβ. por ejemplo, un fragmento que carece de 5 aminoácidos del extremo de terminación C de Aβ43 incluye los

primeros 38 aminoácidos del extremo de terminación N de Aβ.

A menos que se indique de otra manera, la referencia a Aβ incluye las secuencias de aminoácidos naturales humanas antes indicadas así como análogos incluyendo alélicos, especies y variantes inducidas. Los análogos típicamente difieren de los péptidos de origen natural en una, dos o algunas posiciones, frecuentemente en virtud de las sustituciones conservadoras. Los análogos típicamente exhiben al menos 80 o 90% de identidad de secuencia con los péptidos naturales. Algunos análogos incluyen también aminoácidos naturales o modificaciones de aminoácidos de terminación N o C en una, dos o algunas posiciones. Por ejemplo, el residuo natural de ácido aspártico en la posición 1 y/o 7 de Aβ puede reemplazarse con ácido iso aspártico.

Ejemplos de aminoácidos no naturales son aminoácidos D, alfa, alfa disustituidos, aminoácidos N-alquilo, ácido láctico, 4-hidroxiprolina, gama-carboxiglutamato, epsilon-N,N,N-trimetilisina, epsilon-N-acetilisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, omega-N-metilarginina, β-alanina, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, tiroxina, ácido gama-amino butírico, homoserina, citrulina, y ácido isoaspártico. Los péptidos inmunogénicos incluyen análogos de Aβ y sus fragmentos. Algunos agentes terapéuticos de la invención son péptidos all-D, e.g., Aβ all-D, fragmento Aβ all-D, o análogos de Aβ all-D o todo el fragmento Aβ all-D. Los fragmentos y análogos pueden explorarse para eficacia profiláctica o terapéutica en modelos de animal transgénico en comparación con controles no tratados o placebos como se describe en la

WO 00/72880.

Los inmunógenos de péptido incluyen también polipéptidos más largos que incluyen, por ejemplo, un inmunogénico de péptido Aβ, conjuntamente con otros aminoácidos. Por ejemplo, los péptidos inmunogénicos preferidos incluyen proteínas de fusión que comprenden un segmento de Aβ enlazado a una secuencia heteróloga de aminoácido que induce una respuesta de la célula T auxiliar contra la secuencia heteróloga de aminoácidos y en consecuencia una respuesta de la célula B contra el segmento Aβ. tales polipéptidos pueden explorarse por eficacia profiláctica o terapéutica en modelos animales en comparación con controles no tratados o placebos como se describe en la WO 00/72880.

El péptido Aβ, análogo, fragmento inmunogénico u oro polipéptido puede administrarse en forma agregada o desagregada. El Aβ desagregado o sus fragmentos significa unidades monoméricas de péptido. El Aβ desagregado o sus fragmentos son generalmente solubles, y son capaces de auto-agregarse para formar oligómeros solubles, protofibrilos y ADDLs. Los oligómeros de Aβ y sus fragmentos son comúnmente solubles y existen predominantemente como hélices alfa o rizos aleatorios. El Aβ agregado o sus fragmentos significa oligómeros de Aβ o sus fragmentos que se han asociado en disposiciones insolubles de hoja beta. El Aβ agregado o sus fragmentos también significa polímeros fibrilares. Los fibrilos son comúnmente insolubles. Algunos anticuerpos se enlazan ya sea a Aβ soluble o sus fragmentos o a Aβ agregado o sus fragmentos. Algunos anticuerpos se enlazan tanto a Aβ soluble o sus fragmentos como a Aβ agregado o sus fragmentos.

Los péptidos inmunogénicos incluyen también

multímeros de pépidos monoméricos inmunogénicos. Los péptidos inmunogénicos diferentes a los péptidos Aβ deben inducir una respuesta inmunogénica contra uno o más de los fragmentos preferidos de Aβ antes listados (e.g., Aβ 1-3, 1-7, 1-10 y 3-7).

Los péptidos inmunogénicos de la presente invención se encuentran enlazados a un vehículo utilizando un método de la presente invención para formar un conjugado. El péptido inmunogénico puede enlazarse en su terminación amino, su terminación carboxilo, o en ambas a un vehículo para formar un conjugado. Opcionalmente, pueden estar presentes múltiples repeticiones del péptido inmunogénico en el conjugado.

Un fragmento de terminación N de Aβ puede encontrarse enlazado en su terminación C a un péptido vehículo para formar un conjugado. En tales conjugados, el residuo de terminación N del fragmento de Aβ constituye el residuo de terminación N del conjugado. En consecuencia, tales conjugados son efectivos para inducir anticuerpos que se enlazan a un epítope que requiere que el residuo de terminación N de Aβ se encuentre en forma libre. Algunos péptidos inmunogénicos de la invención comprenden una pluralidad de repeticiones del segmento de terminación N de Aβ enlazado en la terminación C a una o más copias de un péptido vehículo para formar un conjugado. El fragmento de terminación N de Aβ incorporado en tales conjugados comienza algunas veces en Aβ 1-3 y finaliza en Aβ 7-11. El Aβ 1-7, 1-3, 1-4, 1-5 y 3-7 son fragmentos de terminación N preferidos de Aβ. Algunos conjugados comprenden diferentes segmentos de terminación N de Aβ en serie. Por ejemplo, un conjugado puede comprender Aβ 1-7 seguido por Aβ 1-3 enlazados a un

vehículo.

En algunos conjugados, un segmento de terminación N de Aβ se encuentra enlazado en su extremo de terminación N a un péptido vehículo. La misma variedad de segmentos de terminación N de Aβ puede utilizarse como con el enlace de terminación C. Algunos conjugados comprenden un péptido vehículo enlazado a la terminación N de un segmento de terminación N de Aβ, que a su vez se encuentra enlazado a uno o más segmentos adicionales de terminación N de Aβ en serie. Preferentemente, tales fragmentos inmunogénicos de Aβ, una vez conjugados a un vehículo apropiado, inducen una respuesta inmunogénica que se dirige específicamente al fragmento de Aβ sin dirigirse a otros fragmentos de Aβ.

Los péptidos inmunogénicos de la invención incluyen péptidos inmunogénicos heterólogos. En algunos péptidos inmunogénicos, un fragmento Aβ se encuentra enlazado a un vehículo para formar un péptido inmunogénico heterólogo. Este péptido heterólogo se encuentra enlazado a un vehículo utilizando un método de la presente invención para formar un conjugado. Algunos de estos péptidos inmunogénicos heterólogos comprenden fragmentos de Aβ enlazados a epítopes de toxoide de tétanos tales como los descritos en la US 5,196,512, EP 378,881 y EP 427,347. Opcionalmente un péptido inmunogénico puede enlazarse a una o múltiples copias de un vehículo, por ejemplo, en las terminación tanto N como C del vehículo para formar un péptido inmunogénico heterólogo. Otros de estos péptidos inmunogénicos heterólogos comprenden fragmentos de Aβ enlazados a los péptidos vehículo descritos en la US 5,736,142. Por ejemplo, un péptido inmunogénico heterólogo puede comprender Aβ 1-7 seguido por Aβ 1-3 seguido por un vehículo. Ejemplos de tales péptidos inmunogénicos

heterólogos incluyen:

Aβ 1-7/toxoide de tétanos 830-844 + 947-967 en una configuración lineal

DAEFRHD-QYIKANSKFIGITELFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO: 24)

Péptidos descritos en la US 5,736,142 (todos en configuración lineal):

PADRE/Aβ 1-7:

AKXVAAWTLKAA-DAEFRHD (SEQ ID NO: 26)

Aβ 1-7 x 3/PADRE:

DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-AKXVAAWTLKAA (SEQ ID NO: 27)

PADRE/Aβ 1-7 x 3:

AKXVAAWTLKAA-DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD (SEQ ID NO: 28)

Aβ 1-7/PADRE:

DAEFRHD-AKXVAAWTLKAAA (SEQ ID NO: 29)

Aβ 1-7/fragmento de albúmina:

DAEFRHD-ISQAVHAAHAEINEAGR (SEQ ID NO: 30)

Aβ 4-10/fragmento de albúmina:

FRHDSGY-ISQAVHAAHAEINEAGR (SEQ ID NO: 31)

Aβ 3-9/fragmento de albúmina:

EFRHDSG-SQAVHAAHAEINEAGR (SEQ ID NO: 32)

$HA_{307-319}/A\beta_{1-7}$ x 3:

PKYVKQNTLKLAT-DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD (SEQ ID NO: 33)

$A\beta_{1-7}/HA_{307-319}/A\beta_{1-7}$:

DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT-DAEFRHD (SEQ ID NO: 34)

$A\beta_{1-7}$ x $3/HA_{307-319}$:

DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT- (SEQ ID NO: 35)

$A\beta_{1-7}$ x $2/HA_{307-319}$:

DAEFRHD-DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT- (SEQ ID NO: 36)

$A\beta_{1-7}/HA_{307-319}$/malaria CS/$TT_{830-844}/TT_{947-967}/A\beta_{1-7}$

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

$A\beta_{1-7}$ x $3/TT_{830-844}/C/TT_{947-967}$

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

$A\beta_{1-7}/TT_{830-844}/C/TT_{947-967}$

DAEFRHD-QYIKANSKFIGITELCFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE- (SEQ ID NO: 39)

$A\beta_{1-7}/TT_{830-844}/C/TT_{947-967}/A\beta_{1-7}$

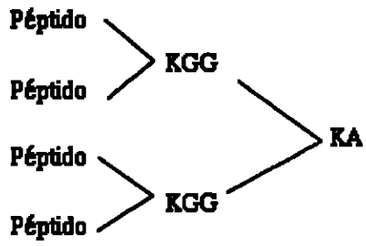
DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL-C-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-DAEFRHD (SEQ ID NO: 20)

Algunos péptidos inmunogénicos heterólogos comprenden un multímero de péptidos inmunogénicos representados por la fórmula 2^x en la cual x es un entero de 1-5. Preferentemente x es 1, 2 o 3, siendo 2 el más preferido. Cuando x es dos, tal multímero tiene cuatro péptidos inmunogénicos enlazados en una configuración preferida referida como MAP4 (ver US 5,229,490). Tales péptidos inmunogénicos se enlazan entonces a un vehículo utilizando un método de la presente invención para formar un conjugado.

Se muestra abajo la configuración MAP4, en donde se producen estructuras ramificadas iniciando la síntesis de péptido en las aminas tanto de terminación N como de cadena lateral de lisina. Dependiendo del número de veces que se incorpora lisina en la secuencia y se le permite la ramificación, la estructura resultante se encontrará presente el terminaciones N múltiples. En este ejemplo, cuatro terminaciones N idénticas se han producido en el núcleo

211

ramificado que contiene lisina. Tal multiplicidad mejora grandemente la respuesta de células B cognado.



Ejemplos de tales péptidos inmunogénicos heterólogos incluyen:

Aβ 1-7/Toxoide de tétanos 830-844 en una configuración MAP4:

DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO: 22)

Aβ 1-7/Toxoide de tétanos 947-967 en una configuración MAP4:

DEAFRHD-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO: 23)

Aβ 3-9/Toxoide de tétanos 830-844 en una configuración MAP4:

EFRHDSG-QYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO: 25)

DAEFRHD-QYIANSKFIGITEL en una resina de 2 ramificaciones



El péptido Aβ, análogo, fragmento activo u otro polipéptido puede administrarse en una forma asociada o multimérica o en forma disociada. Los agentes terapéuticos incluyen también multímeros de agentes monoméricos inmunogénicos. Los agentes diferentes a los péptidos Aβ deben inducir una respuesta inmunogénica contra uno o más de los fragmentos preferidos de Aβ antes listados (e.g., 1-10, 1-7, 1-3 y 3-7) y también pueden conjugarse a un vehículo utilizando un método de la presente invención. Preferentemente, tales agentes una vez conjugados a un vehículo apropiado, inducen una respuesta inmunogénica específicamente dirigida a uno de estos fragmentos sin

dirigirse a otros fragmentos de Aβ. Para facilitar la conjugación de un inmunógeno de péptido con un vehículo, pueden agregarse aminoácidos adicionales a las terminaciones de las determinantes antigénicas. También pueden utilizarse residuos adicionales para modificar las propiedades físicas o químicas del inmunógeno de péptido. Pueden introducirse aminoácidos tales como tirosina, cisteína, lisina, ácido glutámico o aspártico o lo similar, en la terminación C o N del inmunógeno de péptido. Adicionalmente, pueden introducirse también enlazadores de péptido que contienen aminoácidos tales como glicina y alanina. Además, las determinantes antigénicas pueden diferir de la secuencia natural siendo modificadas por acilación terminal del grupo NH_2, e.g., mediante alcanoilo (C1-C20) o acetilación de tioglicolilo, amidación de terminación carboxi, e.g., amoniaco, metilamina etc. En algunas instancias, estas modificaciones pueden proporcionar sitios para enlazarse a un soporte u otra molécula.

Los inmunógenos de péptido utilizados para generar los conjugados de la presente invención utilizando un proceso descrito en la presente, pueden combinarse a través de enlace para formar polímeros (multímeros), o pueden formularse en una composición sin enlace, como una mezcla. Cuando un péptido se enlaza a un péptido idéntico, formando por tanto un homopolímero, se presenta una pluralidad de unidades epitópicas de repetición. Por ejemplo, se utiliza tecnología múltiple de péptido antígeno (MAP) para construir polímeros que contienen péptidos CTL y/o de anticuerpo y péptidos. Un "epítope CTL" es uno derivado de regiones epitópicas seleccionadas de antígenos objetivo potenciales. Cuando los péptidos difieren, e.g., un cóctel que representa diferentes

subtipos virales, diferentes epítopes dentro de un subtipo, diferentes especificidades de restricción de HLA, o péptidos que contienen epítopes T auxiliares, se proporcionan heteropolímeros con unidades de repetición. Además de los enlaces covalente, también se contemplan enlaces no covalente capaces de formar enlaces intermoleculares e intraestructurales.

Tales inmunógenos de péptido y sus análogos se sintetizan mediante síntesis de péptido de fase sólida o expresión recombinante, o se obtienen de fuentes naturales. Los sintetizadores de péptido automáticos se encuentran comercialmente disponibles de numerosos proveedores, tales como Applied Biosystems, Foster City, California.

La expresión recombinante puede encontrarse en bacterias (tales como E. coli), levadura, células de insecto o células de mamífero. Los procedimientos para expresión recombinante se describen por Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, NY, 2ª edición, 1989). Algunos péptidos inmunogénicos también se encuentran disponibles comercialmente (e.g., American Peptides Company, Inc., Sunnyvale, CA, y California Peptide Research, Inc., Napa, CA).

También pueden explorarse bibliotecas aleatorias de péptidos u otros compuestos para adecuabilidad como inmunógeno de péptido. Pueden producirse bibliotecas combinatorias para muchos tipos de compuestos que pueden sintetizarse de una manera por etapas. Tales compuestos incluyen polipéptidos, miméticos de giro beta, hormonas, glicinas oligoméricas N sustituidas, y oligocarbamatos y lo similar. Pueden construirse grandes bibliotecas combinatorias mediante el método de bibliotecas sintéticas

codificadas (ESL) descrito en la WO 95/12608, WO 93/06121, WO 94/08051, WO 95/35503 y WO 95/30642 (cada una de las cuales se incorpora en la presente mediante la referencia para todo propósito). También pueden generarse bibliotecas de péptido mediante métodos de imagen fago (ver, e.g., Devlin, WO 91/18980).

Derivatización y Conjugación de un Péptido Inmunogénico a un Vehículo de Proteína

El sitio de unión de un inmunógeno de péptido a un vehículo de proteína/polipéptido, y la naturaleza del agente de reticulación utilizado para unir un inmunógeno de péptido al vehículo son importantes para la especificidad del anticuerpo resultante generado contra el mismo. Para un reconocimiento apropiado, el inmunógeno de péptido debe acoplarse al vehículo con la orientación apropiada. Para que el anticuerpo reconozca subsecuentemente los inmunógenos de péptido libres sin un vehículo, el conjugado de inmunógeno de péptido-vehículo de proteína/polipéptido debe presentar los inmunógenos de péptido de una forma expuesta y accesible. La orientación óptima se logra frecuentemente dirigiendo la reacción de reticulación a sitios específicos en los inmunógenos de péptido. Puede lograrse esto con un inmunógeno de péptido uniendo un residuo de terminación cisteína durante la síntesis del péptido. Esto proporciona un grupo sulfhidrilo en un extremo del péptido para conjugación al vehículo. La reticulación a través de este grupo proporciona la unión del inmunógeno de péptido solo en un extremo, asegurando así una orientación consistente.

En una conjugación de inmunógeno de péptido-vehículo, la meta es no mantener el estado original o la estabilidad del vehículo, sino presentar el hapteno de la

mejor manera posible para el sistema inmune. Al alcanzar esta meta, la selección de la química de conjugación puede controlar la titulación, afinidad y especificidad resultante de los anticuerpos generados contra el hapteno. Puede ser importante en algunos casos seleccionar un agente de reticulación que contiene un brazo separador suficientemente largo para presentar el antígeno de una manera irrestricta. También puede ser importante controlar la densidad del inmunógeno de péptido en la superficie del vehículo. Una sustitución del inmunógeno de péptido demasiado baja puede dar como resultado poca o ninguna respuesta. Una densidad demasiado alta del inmunógeno de péptido puede ocasionar la supresión inmunológica y la disminución de la respuesta. Además, el reticulador en sí puede generar una respuesta inmune no deseada. Estos problemas necesitan tomarse en consideración para seleccionar no solo los reactivos de reticulación apropiados, sino las relaciones apropiadas de vehículo de proteína/polipéptido e inmunógeno de péptido.

Son posibles una variedad de métodos para unir los vehículos de proteína/péptido a los inmunógenos de péptido. Son posibles las interacciones iónicas a través de las terminaciones o a través del grupo ε-amino de lisina. También es posible el enlace de hidrógeno entre los grupos laterales de los residuos y el inmunógeno de péptido. Finalmente, las interacciones de conformación entre los vehículos de proteína/péptido y el péptido inmunogénico pueden dar lugar a una unión estable.

Se han generado con éxito conjugados de inmunógenos de péptido-vehículo utilizando diversos reactivos de reticulación tales como enlazadores de longitud cero, homobifuncionales o heterobifuncionales. Los sistemas de

reactivo más pequeños disponibles para bioconjugación son los llamados reticuladores de longitud cero. Estos compuestos median la conjugación de dos moléculas formando un enlace que contiene átomos no adicionales. De este modo, un átomo de una molécula es un separador. En muchos esquemas de conjugación, el complejo final se enlaza conjuntamente en virtud de los componentes químicos que agregan estructuras externas a las sustancias reticuladas. En algunas aplicaciones, la presencia de estos enlazadores de intervención puede ser dañina para el uso pretendido. Por ejemplo, en la preparación de conjugados de inmunógeno de péptido-vehículo el complejo se forma con la intención de generar una respuesta inmune al hapteno unido. Ocasionalmente, una porción de los anticuerpos producidos mediante esta respuesta tendrá especificidad para el agente de reticulación utilizado en el procedimiento de conjugación. Los agentes de reticulación de longitud cero eliminan el potencial para este tipo de reactividad cruzada mediando un enlace directo entre dos sustancias.

Los reactivos homobifincionales, que fueron los primeros reactivos de reticulación utilizados para modificación y conjugación de macromoléculas, consistieron de compuestos birreactivos conteniendo el mismo grupo funcional en ambos extremos (Hartman y Wold, 1966). Estos reactivos podrían enlazar una proteína a otra reactivándose covalentemente con los mismos grupos comunes en ambas moléculas. De este modo, las ε-aminas de lisina o las aminas de terminación N de una proteína podrían reticularse a los mismos grupos funcionales en una segunda proteína simplemente mezclando las dos entre sí en presencia del reactivo homobifuncional.

Los reactivos de conjugación heterobifuncionales contienen dos grupos reactivos diferentes que pueden acoplarse a dos diferentes objetivos funcionales en proteínas y otras macromoléculas. Por ejemplo, una parte de un reticulador puede contener un grupo reactivo a amina, mientras que otra porción puede consistir de un grupo reactivo a sulfhidrilo. El resultado es la capacidad de dirigir la reacción de reticulación a partes seleccionadas de moléculas objetivo, almacenando por tanto un mejor control sobre el proceso de conjugación.

Los reactivos heterobifuncionales se utilizan para reticular proteínas y otras moléculas en un proceso de dos o tres etapas que limita el grado de polimerización frecuentemente obtenido al utilizar reticuladores homobifuncionales.

Muchos métodos se encuentran disponibles actualmente para acoplar inmunógenos de péptido a vehículos de proteína/polipéptido utilizando reticuladores de longitud cero, homobifuncionales o heterobifuncionales. La mayoría de los métodos crean enlaces amina, amida, uretano, isotiourea o disulfuro, o en algunos casos tioéteres. El método más general para acoplar proteínas o péptidos a péptidos utiliza reactivos bifuncionales de reticulación. Estos son pequeñas moléculas separadoras que tienen grupos activos en cada extremo. Las moléculas separadoras tienen grupos activos idénticos o diferentes en cada extremo. Las funcionalidades activas más comunes, grupos de acoplamiento y enlaces formados son:

1- Aldehído - amino amina secundaria

2- Maleimido - sulfhidrilo (tioéter

3. Succinimido - amino (amida

4. Imidato ésteres - amino (- amida

5. Fenil azidas - amino (fenil amina

6. Acil haluro - sulfhidrilo (tioéter

7. Piridildisulfuros - sulfhidrilo (disulfuro

8. Isotiocianato -amino (isotiourea

La reactividad de una proteína vehículo dada, en términos de su capacidad para modificarse mediante un agente de reticulación de manera que pueda conjugarse a un inmunógeno de péptido, se determina por su composición de aminoácido y la ubicación de secuencia de los aminoácidos individuales en la estructura tridimensional de la molécula, así como por la composición de aminoácido del inmunógeno de péptido.

En el caso de los enlazadores ("L") entre los vehículos de proteína/péptido y otros péptidos (e.g., vehículos de proteína/péptido y el inmunógeno de péptido), los separadores se seleccionan típicamente de Ala, Gly, u otros separadores neutrales de aminoácidos no polares o aminoácidos neutrales polares. En ciertas modalidades el separador neutral es Ala. Se entenderá que el separador opcionalmente presente no necesita encontrarse comprendido de los mismos residuos y por los mismos residuos y de este modo puede ser un hetero- u homo-oligómero. Los separadores ejemplares incluyen homo-oligómeros de Ala. Cuando se encuentra presente, el separador será comúnmente de uno o dos residuos, más comúnmente de tres a seis residuos. En oras modalidades el vehículo de proteína/polipéptido se conjuga a un inmunógeno de péptido, preferentemente con el vehículo de proteína/polipéptido colocado en la terminación amino. El péptido puede unirse por un enlazador neutral, tal como Ala-Ala-Ala o lo similar, y preferentemente contiene además un

residuo lípido tal como ácido palmítico o lo similar que se encuentra unido a grupos amino alfa y epsilon de un residuo Lys ((PAM)2Lys), que se encuentra unido a la terminación amino del conjugado de péptido, típicamente a través de un enlace Ser-Ser o lo similar.

En algunos aspectos de la invención, el péptido es un fragmento Aβ seleccionado del grupo que consiste de Aβ 1-5-L, Aβ 1-7-L, Aβ 1-9-L, y Aβ 1-12-L. En algunos aspectos de la invención el enlazador es GAGA (SEQ ID NO: 10).

Para facilitar la conjugación de un inmunógeno de péptido con un vehículo, pueden agregarse aminoácidos adicionales a las terminaciones de las determinantes antigénicas. Los residuos adicionales también pueden utilizarse para modificar las propiedades físicas o químicas del inmunógeno de péptido. Pueden introducirse aminoácidos tales como tirosina, cisteína, lisina, ácido glutámico o aspártico, o lo similar en la terminación C o N del inmunógeno de péptido. Adicionalmente, también pueden utilizarse enlazadores de péptido que contienen aminoácidos tales como glicina y alanina. Además, las determinantes antigénicas pueden diferir de la secuencia natural siendo modificadas por acilación del grupo NH_2, e.g., mediante acetilación de alcanoil (C1-C20) o tioglicolilo, amidación de terminación carboxi, e.g., amonio, metilamina, etc. en algunas instancias, estas modificaciones pueden proporcionar sitios para enlazarse a un soporte u otra molécula.

En algunos aspectos de la invención, el inmunógeno de péptido es un fragmento Aβ seleccionado del grupo que consiste de Aβ 1-5-C, Aβ 1-7-C, Aβ 1-9-C, y Aβ 1-12-C, en donde C es un residuo de aminoácido cisteína. En algunos aspectos de la invención, el inmunógeno de péptido es un

fragmento Aβ seleccionado del grupo que consiste de Aβ 1-5-L-C, Aβ 1-7-L-C, Aβ 1-9-L-C, y Aβ 1-12-L-C.

El inmunógeno de péptido se encuentra enlazado al vehículo de proteína/péptido ya sea directamente o a través de un enlazador ya sea en la terminación amino o carboxi del inmunógeno de péptido. La terminación amino ya sea del inmunógeno de péptido o del vehículo de proteína/péptido puede acilarse. Adicionalmente, el conjugado de inmunógeno de péptido/vehículo de proteína/péptido puede encontrarse enlazado a ciertos lípidos de alcanoílo (C1-C20) a través de uno o más residuos de enlace tales como Gly, Gly-Gly, Ser, Ser-Ser, como se describió anteriormente. Otros residuos de lípido útiles incluyen colesterol, ácidos grasos y lo similar.

Los inmunógenos de péptido pueden encontrarse enlazados a un vehículo mediante reticulación química. Las técnicas para el enlace de un inmunógeno a un vehículo incluyen la formación de enlaces disulfuro utilizando N-succinimidil-3-(2-piridil-tio)propionato (SPDP) (Carlsson, J. et al., (1978) Biochem. J. 173:723), y succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC) (si el péptido carece de un grupo sulfihidrilo, éste puede proveerse por la adición de un residuo cisteína al hapteno). Estos reactivos crean un enlace disulfuro entre ellos 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. Una variedad de tales agentes formadores de disulfuro/amida se describen en Immuno. Rev. 62-85 (1982). Otros agentes bifuncionales de acoplamiento forman un enlace tioéter en lugar de uno disulfuro. Los agentes formadores de tioéter incluyen éster reactivo de

221

ácido 6-maleimidocaproico, ácido 2-bromoacético, y ácido 2-yodoacético, ácido 4-(N-maleimido-metil)ciclohexano-1-carboxílico. Los grupos carboxilo pueden activarse combinándolos con succinimida o ácido 1-hidroxil-2-nitro-4-sulfónico, sal de sodio.

Más frecuentemente, los residuos lisina son los residuos aminoácido más abundantes encontrados en proteínas vehículo, y estos residuos se modifican utilizando reactivos de reticulación para generar sitios nucleofílicos que entonces se acoplan a un hapteno. Este acoplamiento se logra a través de cualquiera de las cadenas laterales hidrófilas en las moléculas de hapteno que son químicamente activas. Estas incluyen el grupo guanidilo de arginina, los grupos (-carboxilo de glutamato y ácido aspártico, el grupo sulfhidrilo de cisteína, y el grupo ε-amino de lisina, para nombrar algunos. La modificación de proteínas a fin de que puedan ahora acoplarse a otros residuos se logra utilizando reactivos de reticulación, que reaccionan con cualquiera de las cadenas laterales en el vehículo de proteína o las moléculas de hapteno.

En un aspecto de la presente invención, la proteína vehículo con o sin una molécula enlazadora se funcionaliza (derivatiza) con un reactivo que introduce sitios reactivos en la molécula de proteína vehículo que son dóciles para modificación posterior para introducir grupos nucleofílicos. En una modalidad, el vehículo se hace reaccionar con un reactivo de haloacetilación, que preferentemente reacciona con una cantidad de grupos funcionales en residuos de aminoácido de proteínas tales como el grupo sulfhidrilo de cisteína, el grupo primario de ε-amina del residuo lisina, la terminación α de α-aminas, el tioéter de metionina y ambos

nitrógenos de imidazoilo de cadena lateral de histidina (Gurd, 1967). En una modalidad preferida, los grupos primarios de ε-amina en residuos lisina de la proteína vehículo se derivatizan con b N-hidroxisuccinimidil bromoacetato para generar un vehículo bromoacetilado. La conjugación del inmunógeno de péptido y el vehículo de proteína activado se llevó a cabo agregando lentamente el vehículo activado a la solución que contiene el inmunógeno de péptido.

Utilizando el proceso de esta invención, los inmunógenos de péptido tratados en la sección B anterior, pueden conjugarse a cualquiera de los vehículos tratados en la sección A anterior. Los conjugados que resultan del proceso de esta invención se utilizan como inmunógenos para la generación de anticuerpos contra Aβ para su uso en inmunoterapia pasiva/activa. Además, el Aβ o un fragmento Aβ enlazado a un vehículo puede administrarse a un animal de laboratorio en la producción de anticuerpos monoclonales para Aβ.

En un aspecto de la invención, el conjugado es un conjugado seleccionado del grupo que consiste de Aβ 1-7-CRM_{197}(Aβ 1-7 x 3)-CRM_{197} y (Aβ 1-7 x 5)-CRM_{197}. En un aspecto de la invención, el conjugado es un conjugado seleccionado del grupo que consiste de CRM_{197}-Aβ 1-5, CRM_{197}-Aβ 1-7, CRM_{197}-Aβ 1-9, y CRM_{197}-Aβ 1-12. En otro aspecto de la invención, el conjugado es un conjugado seleccionado del grupo que consiste de Aβ 1-5-C-CRM_{197}, Aβ 1-7-C-CRM_{197}, Aβ 1-9-C-CRM_{197}, y Aβ 1-12-C-CRM_{197}, Aβ 16-23-C-CRM_{197}, Aβ 17-24-C-CRM_{197}, Aβ 18-25-C-CRM_{197}, CRM_{197}-C-Aβ 18-25, CRM_{197}-C-Aβ 16-23, CRM_{197}-C-Aβ 17-24, CRM_{197}-C-Aβ 18-25, Aβ 16-22-C-CRM_{197}, Aβ 17-23-C-CRM_{197}, Aβ 18-24-C-CRM_{197}, CRM_{197}-C-Aβ 16-22, CRM_{197}-C-Aβ 17-23, y CRM_{197}-C-Aβ

223.

18-24, Aβ 1-9-C-CRM_{197}, y Aβ 1-12-C-CRM_{197}. Aún en orto aspecto de la invención, el conjugado es un conjugado seleccionado del grupo que consiste de Aβ 1-5-L-C-CRM_{197}, Aβ 1-7-L-C-CRM_{197}, Aβ 1-9-L-C-CRM_{197}, y Aβ 1-12-L-C-CRM_{197}.

Tapado

Una desventaja del uso de reactivos de acoplamiento que introducen sitios reactivos en las cadenas laterales de moléculas de aminoácido reactivas en moléculas vehículo y/o de hapteno, es que los sitios reactivos si no se neutralizan se encuentran libres de reaccionar con cualquier molécula no deseada ya sea in vitro o in vivo. En el proceso de la presente invención, el tapa de grupos funcionales sin reaccionar se logra mediante la reacción de los conjugados con grupos reactivos pendientes con reactivos que desactivan/tapan los grupos reactivos. Los reactivos de desactivación/tapa ejemplares para su uso con el proceso de conjugación de la presente invención incluyen cisteamina, N-acetilcisteamina y etanolamina. Alternativamente, el tapa se logra mediante reacción con amoniaco o bicarbonato de amonio, de los cuales cualquiera convierte los grupos haloacetilo en grupos aminoacetilo. El tapa se logra también a un pH alcalino (9.0-9.8) utilizando hidróxido de sodio o carbonato de sodio, que convierte los grupos haloacetilo en grupos hidroxiacetilo. Una ventaja potencial de convertir los grupos haloacetilo en grupos hidroxiacetilo, opuesto a la reacción con derivados de cisteamina, etanolamina, etc., es la introducción de funcionalidades químicas de un tamaño relativamente más pequeño, mediante la reacción con amoniaco o hidróxido/carbonato. Los grupos funcionales tapados resultantes, e.g., aminoacetilo o hidroxiacetilo, proporcionan una perturbación relativamente menor en la

224

porción del vehículo de proteína del conjugado. La proteína de inmunógeno de péptido-vehículo tapada se purifica según sea necesario utilizando métodos conocidos, tales como cromatografía (filtración de gel, intercambio de ion, interacción hidrófoba o afinidad), diálisis, ultrafiltración-diafiltración, precipitación selectiva utilizando sulfato de amonio o alcohol y lo similar.

Conjugados y Composiciones Inmunogénicas

Los conjugados tapados de inmunógeno de péptido-proteína vehículo se administran en una composición inmunogénica a mamíferos, particularmente humanos, para propósitos profilácticos y/o terapéuticos. Los conjugados de la presente invención se utilizan para producir y/o aumentar respuestas inmunes contra inmunógenos. Por ejemplo, los conjugados de CTL-vehículo se utilizan para tratar y/o prevenir la infección viral, enfermedades amiloidogénicas, cáncer etc. Alternativamente, también se utilizan los conjugados de inmunógeno de polipéptido-vehículo que inducen respuestas de anticuerpo.

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

En aplicaciones terapéuticas, la composición inmunogénica de la presente invención se administra a un paciente en una cantidad suficiente para producir una respuesta CTL efectiva o una respuesta humoral a la placa amiloide, y para curar, o al menos detener parcialmente el

progreso de la enfermedad, los síntomas y/o complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como "dosis terapéuticamente efectiva". Las cantidades efectivas para este uso dependerán en parte de la composición del péptido, la manera de administración, la etapa y severidad de la enfermedad tratada, el peso y estado general de salud del paciente, y el juicio del médico que prescribe.

Las cantidades terapéuticamente efectivas de las composiciones inmunogénicas de la presente invención fluctúan generalmente para la inmunización inicial para administración terapéutica o profiláctica, de aproximadamente 0.1 µg hasta aproximadamente 10,000 µg de péptido para un paciente de 70 kg, comúnmente de aproximadamente 0.1 hasta aproximadamente 800 µg, preferentemente entre aproximadamente 0.2 hasta aproximadamente 5000 µg y de mayor preferencia entre 0.1 hasta aproximadamente 1,000 µg. Estas dosis son seguidas por dosis de refuerzo de desde aproximadamente 0.1 µg hasta aproximadamente 1000 µg de péptido conforme a un régimen de refuerzo durante semanas o meses dependiendo de la respuesta del paciente y la condición midiendo las respuestas inmunes específicas.

Además, la presente invención se utiliza profilácticamente para prevenir y/o aminorar una enfermedad amiloidógena. Las cantidades efectivas se describieron anteriormente. Adicionalmente, el de experiencia ordinaria en la técnica también sabrá cómo ajustar o modificar los tratamientos profilácticos, según sea apropiado, por ejemplo reforzando y ajustando las dosis y los regímenes de dosis.

La administración terapéutica puede iniciar al primer signo de la enfermedad. Esto es seguido por dosis de refuerzo hasta detener o revertir el progreso de la

enfermedad o hasta que los síntomas se abaten sustancialmente durante un período posterior.

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

Puede utilizarse una variedad de diluyentes, excipientes y amortiguadores, e.g., agua, agua amortiguada, salina de fosfato amortiguada, glicina al 0.3%, ácido hialurónico, y lo similar. Estas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización

convencionales muy conocidas, o pueden filtrarse estériles. Las soluciones acuosas resultantes pueden empacarse para su uso como tales o liofilizarse, siendo combinada la preparación liofilizada con una solución estéril previo a la administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptable según se requiera para aproximar las condiciones fisiológicas, tales como agentes amortiguadores, agentes de ajuste de tonicidad, agentes humectantes y lo similar, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina, etc.

Para composiciones sólidas, pueden utilizarse vehículos sólidos convencionales no tóxicos. Estos pueden incluir, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, estearato de magnesio, sacarina de sodio, talco, celulosa, glucosa, sucrosa, carbonato de magnesio, y lo similar. Para administración oral, una composición no tóxica farmacéuticamente aceptable se forma incorporando cualquiera de los excipientes normalmente empleados, tales como aquellos vehículos previamente listados, y generalmente 10.95% del ingrediente activo, es decir, uno o más conjugados de la invención y más preferentemente a una concentración de 25-75%.

La concentración de las composiciones inmunogénicas de la presente invención en las formulaciones farmacéuticas puede variar ampliamente, i.e., de menos de aproximadamente 0.1&, comúnmente a o a al menos aproximadamente 2% hasta tanto como 20% a 50% o más por peso, y se seleccionará principalmente por volúmenes de fluido, viscosidades, etc. de acuerdo con el modo particular de administración

seleccionado.

Los conjugados de la presente invención pueden administrarse también a través de liposomas, que sirven para dirigir los conjugados a un tejido particular, tal como el tejido linfoide, o dirigir selectivamente a células infectadas, así como para incrementar la vida media de la composición de péptido. Los liposomas incluyen emulsiones, espumas, micelos, monocapas insolubles, cristales líquidos, dispersiones de fosfolípido, capas laminares, y lo similar. En estas preparaciones, la composición que va a suministrarse se incorpora como parte de un liposoma, solo o en conjunción con una molécula, que se enlaza a, por ejemplo, un receptor que prevalece entre células linfoide. Estas moléculas incluirían anticuerpos monoclonales, que se enlazan al antígeno CD45, o con otras composiciones terapéuticas o inmunogénicas. De este modo, los liposomas llenos con la composición deseada de la presente invención pueden dirigirse al sitio de las células linfoide en donde los liposomas suministran entonces las composiciones de péptido terapéuticas/inmunogénicas seleccionadas. Los liposomas para uso en la invención se forman de lípidos estándar formadores de vesícula, que generalmente incluyen fosfolípidos de carga neutra o negativa y un esterol, tal como colesterol. La selección de lípidos se guía generalmente considerando el tamaño del liposoma, la labilidad al ácido y la estabilidad de los liposomas en la corriente sanguínea. Se encuentran disponibles una variedad de métodos para preparar liposomas como se describe en e.g., Szoka et al., Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467 (1980), Patentes de E.U. Nos. 4,235,871, 4,501,728, 4.837,028 y 5,019,369 incorporadas en la presente por la referencia.

Para administración en aerosol, las composiciones de la presente invención se suministran preferentemente en forma finamente dividida conjuntamente con un surfactante y propulsor. Los porcentajes típicos de la composición son de 0.01-20% por peso, preferentemente de 1-10%. El surfactante, por supuesto, debe ser no iónico, y preferentemente soluble en el propulsor. Representativos de tales agentes son los ésteres o ésteres parciales de ácidos grasos que contienen de 6 a 22 átomos de carbono, tales como los ácidos caproico, octanoico, láurico, palmítico, esteárico, linoleico, linolénico, olestérico y oleico con un alcohol alifático polihídrico o su anhídrido cíclico. Pueden emplearse ésteres mezclados, tales como glicéridos mezclados o natural. El surfactante puede constituir 0.1-20% por peso de la composición, preferentemente 0.25-5%. El balance de la composición es ordinariamente propulsor. También puede incluirse un vehículo, si se desea, como con lecitina para suministro intranasal.

Los conjugados de la presente invención pueden administrarse opcionalmente en combinación con otros agentes que son al menos parcialmente efectivos en el tratamiento y/o disminución de una enfermedad amiloide y/o sus síntomas. En el caso del Alzheimer y el síndrome de Down, en los cuales los depósitos se presentan en el cerebro, los conjugados de la invención pueden administrarse en conjunción con otros agentes que incrementan el paso de los agentes de la invención a través de la barrera sanguínea cerebral.

La composición inmunogénica comprende típicamente un adyuvante. Un adyuvante es una sustancia que aumenta la respuesta inmune al administrarse en conjunción con un inmunógeno o antígeno. Una cantidad de citocinas o

linfosinas han mostrado tener actividad de modulación inmune, y por tanto pueden utilizarse como adyuvantes, incluyendo pero sin limitarse a las interleucinas 1-α, 1-β, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 (ver, e.g., Patente de E.U. No. 5,723,127), 13, 14, 15, 16, 17 y 18 (y sus formas mutantes), los interferones-α, β y γ, el factor de estimulación de colonia de granulocito-macrófago (ver, e.g., Patente de E.U. No. 5,078,996), factor de estimulación de colonia de macrófago, factor de estimulación de colonia de granulocito, GSF, y el factor de necrosis de tumor α y β. Aún otros adyuvantes útiles en esta invención incluyen una quimiosina, incluyendo sin limitación, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, y RANTES. También pueden ser útiles como adyuvantes las moléculas de adhesión, tales como selectina, e.g., L-selectina, P-selectina, y E-selectina. Aún otros adyuvantes útiles incluyen sin limitación, una molécula similar a mucina, e.g., CD34, GlyCAM-1 y MadCAM-1, un miembro de la familia integrina tal como LFA-1, VLA-1, Mac-1 y p150.95, un miembro de la superfamilia de inmunoglobulina tal como PECAM, ICAMs, e.g., ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-3, CD2 y LFA-3, moléculas co-estimuladoras tales como CD40 y CD40L, factores de crecimiento incluyendo el factor de crecimiento vascular, factor de crecimiento de nervios, factor de crecimiento de fibroblasto, factor de crecimiento epidérmico, B7.2, PDGF, BL-1, y factor de crecimiento endotelial vascular, moléculas receptoras incluyendo Fas, receptor TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2 y DR6. Aún otra molécula adyuvante incluye Caspase (ICE). Ver también las Publicaciones de Patente Internacional Nos. WO98/17799 y WO99/43839 que se incorporan en la presente por la referencia en su totalidad para todo

propósito.

Los adyuvantes adecuados utilizados para mejorar la respuesta inmune incluyen, sin limitación, MPL™ (lípido A de monofosforilo 3-O-deacilado; Corixa, Hamilton, MT), que se describe en la Patente de E.U. NO. 4,912,094, que se incorpora en la presente mediante la referencia para todo propósito. También son adecuados para su uso como adyuvantes los análogos A de lípido sintético o los compuestos de aminoalquil glucosamina (AGP), o sus derivados o análogos que se encuentran disponibles de Corixa (Hamilton, MT) y que se describen en la Patente de E.U. No. 6,113,918, que se incorpora en la presente mediante la referencia. Tal AGP es 2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecancilamino]etil-2-deoxi-4-O-fosfono-3-O-[(S)-3-tetradecanoioxitetradecanoil]-2-[(R)-3-tetradecanoiloxi-tetradecanoil-amino]-b-D-glicopiranosida conocida como 529 (también conocida como RC529; Corixa). Este adyuvante 529 se formula como una forma acuosa (529 AF) o como una emulsión estable (529 SE).

Aún otros adyuvantes incluyen emulsiones de aceite mineral y agua, sales de calcio tales como fosfato de calcio, sales de aluminio (alum), tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, etc., Amphigen, Avridine, L121/escualeno, ácidos D-lactida-polilactida/gilcosida plurónicos, polioles, muramil dipéptido, Bordatella, saponinas, tales como Stimulon™ QS-21 (Antigenics, Framingham, MA), descrita en la Patente de E.U. No. 5,057,540, que se incorpora en la presente mediante la referencia, y partículas generadas de la misma tales como ISCOMS (complejos inmunoestimuladores), Mycobacterium tuberculosis, lipopolisacáridos bacteriales, polinucleótidos sintéticos tales como oligonucleótidos que contienen un

motivo CpG (Patente de E.U. No. 6,207,646, que se incorpora en la presente mediante la referencia), una toxina pertusis (Pt), o una toxina termolábil de E. coli (LT), particularmente LT-K63, LT-R72, PT-K9/G129; ver, e.g., Publicaciones de Patente Internacional Nos. WO 93/13302 y WO 92/19265, que se incorporan en la presente por la referencia para todo propósito.

También son útiles como adyuvantes las toxinas de cólera y sus mutantes incluyendo aquellos descritos en la Solicitud de Patente Internacional publicada No. WO 00/18434 (en donde el ácido glutámico en la posición de aminoácido 29 se reemplaza por otro aminoácidos (diferente al ácido aspártico, preferentemente una histidina). Similares toxinas CT o mutantes se describen en la Solicitud de Patente Internacional publicada No. WO 02/098368 (en donde la isoleucina en la posición de aminoácido 16 se reemplaza por otro aminoácido, ya sea solo o en combinación con el reemplazo de la serina en la posición de aminoácido 68 por otro aminoácido; y/o en donde la valina en la posición de aminoácido 72 se reemplaza por otro aminoácido), otras toxinas CT se describen en la Solicitud de Patente Internacional publicada No. WO 02/098369 (en donde la arginina en la posición de aminoácido 25 se reemplaza por otro aminoácido; y/o un aminoácido se inserta en la posición de aminoácido 49; y/o dos aminoácidos se insertan en la posición de aminoácido 35 y 36).

Debe entenderse que la referencia a lo largo de esta especificación a cualquier teoría para explicar los resultados descritos no limita el alcance de la invención. Independiente del método mediante el cual funciona la invención, los resultados y ventajas descritos en la presente

pueden lograrse por referencia a los siguientes ejemplos de la invención.

Será aparente para el de experiencia ordinaria en la técnica que pueden hacerse muchos cambios y modificaciones a la misma sin apartarse de la esencia o alcance de las reivindicaciones anexas. Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente mencionadas en esta especificación se incorporan por la referencia en su totalidad para todo propósito de la misma manera que se indicaría específica e individualmente que cada publicación patente, o solicitud de patente individual, se incorpora por la referencia.

EJEMPLO 1

Conjugación de CRM_{197} al Péptido Aβ

La conjugación de haptenos/péptidos antigénicos se llevó a cabo reactivando el vehículo CRM_{197} activado, que tiene treinta y nueve residuos lisina, a un hapteno/péptido antigénico que tiene un grupo tiol pendiente utilizando el método descrito abajo (Figura 1). Todos los péptidos Aβ contenían un residuo cisteína en la terminación carboxi para facilitar la conjugación de estos péptidos a través del grupo cisteinil sulfhidrilo a la proteína vehículo. Estos péptidos se produjeron mediante síntesis de fase sólida.

I. Activación

Se bromoacetilaron grupos amino libres de CRM_{197} mediante reacción con un exceso de ácido bromoacético de N-hidroxisuccinimida éster (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (Bernatowicz y Matsueda, 1986). A una solución helada de CRM_{197} (-15 mg), se agregó 10% (v/v) 1.0 M de $NaHCO_3$, (pH 8.4). Se disolvió ácido bromoacético de N-succinimida éster, igual en peso al CRM_{197} utilizado en 200 µl de dimetilformamida (DMF), agregado lentamente al CRM_{197} y se

mezcló suavemente a temperatura ambiente en la oscuridad durante 1 hora. La proteína bromoacetilada (activada) resultante se purificó pasándola a través de una columna de desalinización (P6-DG) utilizando PBS/1 mM EDTA (pH 7.0) como eluyente. Después de la purificación, las fracciones correspondientes al CRM_{197} activado se vaciaron y la concentración de proteína se estimó por análisis de proteína BCA. Los grupos amino de proteína, tanto antes como después del tratamiento con ácido bromoacético de N-succinimida éster, se reactivaron con ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBSA) que sirvió como indicador de bromoacetilación (Means et al., 1972).

II. Conjugación

Previo a la conjugación, los péptidos se reactivaron con 5,5'-ditio-bis(2-ácido nitrobenzoico) (reactivo de Ellman) para verificar el contenido de grupos libres de SH (entre 62-88% reducidos). Para los primeros cuatro péptidos Aβ (aminoácidos 1-7 sin enlazador, aminoácidos 1-12 con enlazador GAGA (SEQ ID NO: 19), aminoácidos 1-9 con enlazador GAGA (SEQ ID NO: 10), y aminoácidos 1-7 con enlazador GAGA (SEQ ID NO: 10), aproximadamente 8.0-10.0 mg de péptido se disolvieron en agua destilada estéril a una concentración aproximada de 20 mg/ml. El péptido se agregó lentamente a CRM_{197} frío activado en una relación de 1:1 (peso/peso) y el pH se ajustó a aproximadamente 7.0-7.2 con la adición de 20.36 µl de 1N de NaOH. El material resultante se mezcló suavemente durante la noche a 4°C en la oscuridad seguido por diálisis en la oscuridad contra dos cambios IL de PBS, pH 7.2. Para los siguientes cuatro péptidos Aβ (aminoácidos 1-5 sin enlazador, aminoácidos 1-9 sin enlazador, aminoácidos 1-12 sin

enlazador, y aminoácidos 1-5 con enlazador), se utilizó una reacción con reactivo de Ellman para verificar los grupos libres de SH. El CRM_{197} se bromoacetiló, se purificó, y se reactivó con TNBSA como se describió previamente. El pH de cada péptido se ajustó a 7.0 con la adición de 0.1 M de $NaPO_4$ (pH 8.5) a 2.2x el volumen del péptido disuelto. El péptido se agregó lentamente a CRM_{197} frío activado en una relación de 1:1 y se dejó hacer reaccionar durante la noche a 4°C en la oscuridad. El material resultante se dializó. Se conjugó un péptido final de control (1-12 mer en orientación inversa) a CRM_{197} como se describió anteriormente con la siguiente modificación. En lugar de ajustar el pH del péptido a 7.0, el pH del CRM_{197} activado se ajustó a aproximadamente 7.5 con la adición de 20% (v/v) 0.5 M de $NaPO_4$ (pH 8.0). Cada conjugado después de la diálisis, se transfirió en un tubo estéril de polipropileno de 15 ml, envuelto en hoja de aluminio, y se almacenó a 4°C. La activación de los residuos amino reactivos en el vehículo se verificó después subsecuentemente utilizando espectrometría de masa.

Conjugado	Péptido Inmunogénico
Aβ 1-5-C-CRM_{197}	DEAFR-C (SEQ ID NO: 1)
Aβ 1-7-C-CRM_{197}	DAEFRHD-C (SEQ ID NO: 2)
Aβ 1-9-C-CRM_{197}	DAEFRHD-C (SEQ ID NO: 3)
Aβ 1-12-C-CRM_{197}	DAEFRHDSGYEV-C (SEQ ID NO: 4)
Aβ 1-5-C-CRM_{197}	DAEFR-GAGA-C (SEQ ID NO: 5)
Aβ 1-7-C-CRM_{197}	DAEFRHD-GAGA-C (SEQ ID NO: 6)
Aβ 1-9-C-CRM_{197}	DAEFRHDSG-GAGA-C (SEQ ID NO: 7)
Aβ 1-12-C-CRM_{197}	DAEFRHDSGYEV-GAGA-C (SEQ ID NO: 8)
Aβ 12-1-C-CRM_{197}	VEYGSDHRFEAD-C (SEQ ID NO: 9)
(-VE CONTROL)	

L = enlazador (GAGA) (SEQ ID NO: 10)

EJEMPLO 2

Preparación de Conjugado de Péptido Aβ-CRM_{197} y Purificación mediante Bromoacetilación por Ultrafiltración de CRM_{197}

Se reactivó el CRM_{197} (100 mg) en 0.01 M de amortiguador de fosfato de sodio, NaCl al 0.9%, pH 7.0, con ácido bromoacético de N-hidroxisuccinimida éster (disuelto a 20 mg/ml en DMSO) a una relación por peso de 1:1 bajo una atmósfera de argón. La reacción se tituló según fue necesario para mantener el pH a 7.0. La mezcla se agitó en la oscuridad durante 1.5 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró a 1.2 µm en el depósito de retención de un sistema UF/DF (Millipore Labscale TFF, Billerica, MA). La purificación se realizó utilizando una membrana de 10K o 30K UF mediante diafiltración (30 veces) contra 0.01 M de amortiguador de fosfato de sodio/NaCl al 0.9%, pH 7.0. El CRM_{197} bromoacetilado se filtró pasándolo por un filtro de 0.2 µm. El grado de bromoacetilación se determinó reactivando el CRM_{197} activado con cisteína, seguido por un análisis de aminoácido y cuantificación de la carboximetilcisteína (CMC) resultante.

Conjugación del Péptido Aβ y el CRM_{197} Bromoacetilado y Tapa con N-acetilcisteamina

El CRM_{197} bromoacetilado (50 mg) se transfirió a un matraz de reacción. A la solución agitada, mantenida a 2-8°C se agregó 1M de carbonato/bicarbonato de sodio. Se llevó a cabo la titulación para lograr un pH objetivo de 9.0, bajo atmósfera de argón. Por separado, se pesaron 50 mg del péptido Aβ y se disolvieron en agua para inyección (WFI) a 20 mg/ml. A esta solución se agregó 1M de carbonato/bicarbonato de sodio hasta lograr un pH de 9.0. La solución de péptido se agregó a la solución de CRM_{197} bromoacetilado y la mezcla

se agitó a 2-8°C durante 14-18 horas. Los grupos bromoacetilo restantes se taparon con un exceso molar de 20 veces de N-acetilcisteamina durante 3-6 horas a 2-8°C.

La mezcla de reacción se filtró a través de un filtro de 1.2 µm en el depósito de retención de un sistema UF/DF (Millipore XL), y el conjugado se purificó a temperatura ambiente mediante diafiltración 30 veces en una membrana MWCO de 10K o 30K (Millipore) mediante diafiltración contra 0.01 M de amortiguador de fosfato de sodio/NaCl al 0.9%, pH 7.0. El retenido se colectó y se filtró a 0.2 µm y se analizó para contenido de proteína (análisis colorimétrico Lowry o Micro-BCA), mediante SDS-PAGE, mediante análisis de aminoácido y para inmunogenicidad en ratones.

EJEMPLO 3

Conversión por Tapa de los Grupos Bromoacetilo Sin reaccionar en Grupos Aminoacetilo

El CRM_{197} bromoacetilado (50 mg) preparado como se describió anteriormente en el Ejemplo 2, se transfirió a un matraz de reacción. A la solución agitada, mantenida a 2-8°C se agregó 1M de carbonato/bicarbonato de sodio. Se llevó a cabo la titulación para lograr un pH objetivo de 9.0, bajo atmósfera de argón. Por separado, se pesaron 50 mg del péptido Aβ y se disolvieron en WFI a 20 mg/ml. A esta solución se agregó 1M de carbonato/bicarbonato de sodio hasta lograr un pH de 9.0. La solución de péptido se agregó a la solución de CRM_{197} bromoacetilado y la mezcla se agitó a 2-8°C durante 14-18 horas. Los grupos bromoacetilo restantes se taparon utilizando solución de bicarbonato de amonio al 8% durante 4 horas a 2-8°C.

La mezcla de reacción se filtró a 1.2 µm en el depósito de retención de un sistema UF/DF (Millipore XL), y

el conjugado se purificó a temperatura ambiente mediante diafiltración 30 veces en una membrana MWCO de 10K o 30K mediante diafiltración contra 0.01 M de amortiguador de fosfato de sodio/NaCl al 0.9%, pH 7.0. El retenido se colectó y se filtró a 0.2 µm y se analizó para contenido de proteína (análisis colorimétrico Lowry o Micro-BCA), mediante SDS-PAGE, y para inmunogenicidad en ratones.

EJEMPLO 4

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

La hidrólisis ácida de los conjugados de proteína-péptido generado utilizando química de activación de bromoacetilo dio como resultado la formación de S-carboximetilcisteína estable al ácido (CMC) de las cisteínas en los sitios conjugados y la formación de S-carboximetilcisteamina estable al ácido (CMCA) de la cisteamina en los sitios tapados (Figura 2). Todas las lisinas conjugadas y tapadas se convirtieron de nuevo a lisina y se detectaron como tales. Todos los otros aminoácidos se hidrolizaron de nuevo en aminoácidos libres excepto por triptofán y cisteína que se destruyeron por las condiciones de hidrólisis. Asparagina y glutamina se convirtieron en ácido aspártico y ácido glutámico respectivamente.

Las muestras conjugadas se diluyeron con agua desionizada hasta una concentración total de proteína de menos que 1 mg/ml. Dos alícuotas de 10 microgramos de cada conjugado se secaron y se resuspendieron en 100 µl de 6N de HCl [Pierce], 5 µl de fenol fundido [Sigma-Aldrich], y 1 µl

de 2-mercaptoetanol [Sigma-Aldrich]. Las muestras se incubaron entonces bajo vacío (100 mT) a 110°C durante 22 horas. Los hidrolisatos resultantes se secaron, se resuspendieron en 250 µl de amortiguador Beckman de muestra de citrato de sodio Na-S (pH 2.2) [Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA], y se filtraron utilizando filtros Whatman de punta de jeringa de nilón de 0.1 µm y jeringas de 1 ml.

Cada muestra se cargó entonces en un rizo de muestra analizador de aminoácido Beckman 6300 y se colocó en el analizador. Los aminoácidos de cada muestra hidrolizada y de control se separaron utilizando cromatografía de intercambio de ion seguida por reacción con solución Beckman Ninhydrin NinRX a 135°C. Los aminoácidos derivados se detectaron entonces en el rango visible a 570 nm y a 440 nm (ver Tabla 1). Un conjunto estándar de aminoácidos [Pierce Amino Acid Standard H] conteniendo 500 picomoles de cada aminoácido se corrió conjuntamente con las muestras y controles para cada conjunto de análisis. Se agregó S-carboximetilcisteína [Sigma-Aldrich] al estándar.

Tabla 1

Tiempos de Retención para Aminoácidos Utilizando Programa de Gradiente 1 en el Analizador de Aminoácidos Beckman 6300

Tiempo de retención	Aminoácido		Longitud de onda utilizada para detección
8.3	Carboximetilcisteína	CMC	570
9.6	Ácido aspártico & asparagina	Asx	570
11.3	Treonina	Thr	570
12.2	Serina	Ser	570
15.8	Ácido glutámico & glutamina	Glx	570 & 440
18.5	Prolina	Pro	440

21.8	Glicina	Gly	570
23.3	Alanina	Ala	570
29.0	Valina	Val	570
32.8	Metionina	Met	570
35.5	Isoleucina	Ile	570
36.8	Leucina	Leu	570
40.5	Tirosina	Tyr	570
42.3	Fenilalanina	Phe	570
45.4	Carboximetilcisteamina	CMCA	570
48.8	Histidina	His	570
53.6	Lisina	Lys	570
70.8	Arginina	Arg	570

Las áreas de cada pico estándar se utilizaron como equivalencia cuantitativa para evaluación proporcional de cada muestra. La prolina se determinó de 440 nm y se convirtió en una equivalencia en 570 nm utilizando ácido glutámico, el aminoácido más cercano.

Cada uno de estos valores de picomol se convirtió en una relación molar de los residuos aminoácido utilizando una comparación de picomoles de lisina para el valor teórico de lisina presente en la proteína. Se seleccionó lisina para esta evaluación en base a su unión covalente a cisteína y cisteamina y la hidrólisis similar esperada. Los números de moles resultantes de los aminoácidos se compararon entonces con la composición de aminoácido de la proteína y se reportaron conjuntamente con los valores para CMC y CMCA. El valor CMC se utilizó directamente para evaluación del grado de conjugación y el valor de CMCA se utilizó directamente para evaluación del grado de tapado.

EJEMPLO 5

Caracterización y Optimización de Conjugados de Péptido Aβ-

CRM_{197}

Para verificar la conjugación, todos los conjugados de péptido-CRM_{197} se analizaron mediante análisis de aminoácido y espectrometría de masa de ionización de desorbción láser asistida por matriz- tiempo de vuelo (MALDI-TOF). Para cada conjugado, se determinaron los moles de péptido conjugados a cada mol de CRM_{197} mediante análisis de aminoácido (número de residuos de S-carboximetilcisteína) y espectrometría de masa MALDI-TOF. Los valores determinados por cada método fueron generalmente acordes.

I- Cromatografía de exclusión de tamaño:

Las muestras concentradas de lote se retiraron del almacenamiento y se dejaron calentar a temperatura ambiente. La muestra de conjugado de péptido Aβ se mezcló suavemente para asegurar una preparación homogénea. La muestra de conjugado de péptido Aβ se giró en una micro-centrífuga Eppendorf para retirar cualquier particulado. El sobrenadante se retiró para cromatografía TosoHaas TSK-Gel G3000SW (TosoHaas, Stuttgart, Alemania). Se conectó una columna TosoHaas TSK-Gel G3000SW a un sistema HPLC y el límite de presión se estableció a 1.4 Mpa. La columna se equilibró con al menos 30 ml de PBS (10 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, pH 7.2 ± 0.1) a una relación de flujo de 0.75 ml/min. La muestra de conjugado de péptido Aβ se cargó sobre la columna TosoHaas TSK-Gel G3000SW utilizando los siguientes parámetros:

Concentración de muestra de conjugado de péptido Aβ: 1.5 ± 1.0 mg/ml

Relación de flujo: 0.75 ml/min

Volumen de muestra: 0.1 ml

Tiempo de curso: 30 minutos

La absorbencia se monitoreó a 280 nm y 210 nm. Para almacenamiento a largo plazo, la columna TosoHaas TSK-Gel G3000SW se equilibró con al menos 50 ml de etanol al 20% a una relación de flujo de 0.5-1.0 ml/min.

II. PAGE (Electroforesis de Gel de Poliacrilamida):

El CRM_{197} activado (bromoacetilado) y los conjugados de péptido Aβ-CRM_{197} se examinaron mediante geles SDS utilizando electroforesis NuPAGE Bis-Tris (Novex, Frankfurt, Alemania) con un pH neutro, un sistema de pre-moldeado de mini-gel de poliacrilamida y amortiguador de curso NuPAGE MES SDS. Se mezcló un alícuota de 8 ug de cada CRM activado o conjugado con amortiguador de reducción de muestra y se calentó a 100°C durante 5 minutos. Los conjugados y los estándares de peso molecular (MW) (Invitrogen, Carlsbad, CA) se cargaron en un gel NuPage al 10% (peso/v, acrilamida) (Novex) en base a un sistema amortiguado de Bis-Tris-HCl y se corrieron en MES SDS Running Buffer-PAGE (Laemmli). Después de SDS-PAGE el gel se coloreó con Pierce Gel Code Blue (Pierce, Rockford, IL). El conjugado de péptido Aβ-CRM_{197} se representó por una banda mayor de aproximadamente 66 kDa, por arriba de la banda del CRM natural y una banda de dímero de aproximadamente 120 kDa, conjuntamente con bandas de multímero menores (datos no mostrados).

III. Análisis de Espectrometría de Masa MALDI-TOF de Conjugados de Péptido-CRM_{197}

Se utilizó la espectrometría de masa para una aproximación inmediata del grado de conjugación. Los alícuotas adecuados de muestras de CRM_{197} activado y conjugado se analizaron mediante espectrometría de masa MALDI-TOF utilizando ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxi-cinámico (ácido sinapínico) como matriz. Se encontró que el peso molecular

del CRM_{197} activado determinado por la espectrometría de masa MALDI-TOF (Finnigan MAT Lasermat 2000 Mass Spectometer, Ringoes, NY) se encuentra centrado a alrededor de 60.5 kDa y para conjugados varía de 65 kDa a 74 kDa dependiendo del grado de conjugación (datos no mostrados). Se encontró que hasta 22 de las lisinas (-50%) en CRM_{197} se modificaron a una relación de 1:1.

IV. Experimentos de Optimización

El grado de activación de la conjugación es una función de la relación de reactivo-proteína, la temperatura de reacción y el pH de la reacción del amortiguador de reacción. Se dan abajo algunos ejemplos para ilustrar las condiciones óptimas de conjugación llevadas a cabo para identificar las condiciones óptimas de pH a fin de tener parámetros reproducibles del control del proveso para reacciones de conjugación. Los resultados (figura 3) mostraron que la reacción de conjugación a Aβ 5 mer (DAEFRC) (SEQ ID NO: 1) así como a Aβ 7 mer (DAEFRHDC) (SEQ ID NO: 2) dependen del pH y producen un mayor grado de modificación/conjugación cuando aumenta el pH de la condición de reacción. Utilizando la sal de TFA de péptidos de 5 mer y 7 mer, se evaluó el grado de conjugación a un pH de 9.0 con cantidades variables de carga de péptido (Figura 4). Es evidente a partir de estos resultados que los conjugados de péptido con un número definido de copias de péptido por molécula de CRM pueden generarse variando la relación de péptido/CRM activado durante el proceso de conjugación. Se llevaron a cabo experimentos similares utilizando sal de acetato del péptido Aβ de 7 mer.

Para la conjugación de Aβ 1-7/CRM, el proceso de tapa se evaluó comparando los moles de CMCA por CRM con los

moles de CMC por CRM. Dado que el total del CMC y CMCA fue constante para cada péptido, relación de CRM probada, se presumió que el proceso de tapa se encontraba completo (Figura 5). La modificación total en el conjugado permaneció entre 19 y 21, en comparación con el número de lisinas bromoacetiladas (Figura 5). Estos experimentos se efectuaron con TFA como el contraión para el péptido. La conjugación de Aβ 1-7/CRM se repitió utilizando la sal de acetato del péptido en lugar de la sal de TFA, y estos datos se muestran en la Figura 5 y 6. El proceso de tapa pareció completarse, permaneciendo el total del CMC y del CMCA para cada punto entre 20 y 22. Las condiciones para la reacción de conjugación de Aβ-CRM se han optimizado a un pH de 9.0 siendo controlado el grado de conjugación por el péptido a la relación de CRM en la reacción. Al variar la relación de 0.1 a 1.5, el grado de conjugación puede variar (Figura 6).

El grado de activación y conjugación es una función de la relación de reactivo-proteína, la temperatura de la reacción y el pH del amortiguador de reacción. El grado de modificación (conjugación) para cada conjugado se calculó sustrayendo el valor de masa del CRM_{197} activado del valor de masa de cada conjugado y dividiendo por la masa del péptido utilizado para preparar el conjugado. El grado de modificación (Conjugación) para todos los conjugados se describe en la Tabla 2.

El grado de conjugación también se comparó con los valores determinados por la cantidad estimada de residuos de S-carboximetilcisteína formados por mol de CRM_{197} (mostrados también en la Tabla 2).

Tabla 2

Grado de Modificación: Comparación de datos de MALDI-T F y

AAA

Muestra	Da (de Espectrometría de Masa)	Grado de conjugación (de Espectrometría de Masa)	Grado de conjugación (de Análisis de CMC-Aminoácido
CRM_{197}	58,408	---	---
BrAc-CRM	60,752	19	---
Aβ 1-7/CRM	74,463	14	15
Aβ 1-7/CRM	72,375	12	14
Aβ 1-5/CRM	75,425	20	21
Aβ 1-5/CRM	71,690	15	18

EJEMPLO 6

Estudios de Inmunogenicidad de Conjugados de Péptido Aβ

Se utilizaron péptidos que se extienden a los residuos de terminación N 1-5, 1-7, 1-9, y 1-12 de Aβ (con y sin la secuencia de enlace GAGAC) y el péptido que corresponde a la terminación N de Aβ en la secuencia inversa del aminoácido doce al aminoácido uno (1-12 mer en secuencia inversa), cada uno conjugado a CRM_{197}, se utilizaron para inmunizar ratones conjuntamente con un péptido Aβ de 1-12 mer en una formulación con STIMULON™ QS-21. Cada grupo de ratones se inmunizó subcutáneamente con una dosis ya sea de 30 µg o 5 µg de una de las muestras formuladas con 20 µg del adyuvante STIMULON™ QS-21, al inicio del estudio (semana 0) y subsecuentemente en las semanas 3 y 6. El protocolo de estudio se ilustra en la Tabla 3.

Como se muestra en la Tabla 3, los péptidos que se extienden en residuos de terminación N 1-5, 1-7, 1-9 y 1-12 de Aβ (con y sin la secuencia de enlace GAGAC) y el péptido que corresponde a la terminación N de Aβ en la secuencia inversa del aminoácido doce al aminoácido uno (1-12 mer en secuencia inversa), conjugados a CRM_{197}, se utilizaron para

inmunizar ratones conjuntamente con un péptido Aβ de 12 mer en una formulación con QS-21. Cada grupo de ratones se vacunó subcutáneamente con una dosis ya sea de 30 µg o 5 µg de una de las muestras formuladas con 20 µg del adyuvante QS-21, al inicio del estudio (semana 0) y subsecuentemente en las semanas 3 y 6. Se utilizaron ratones Swiss Webster para el estudio entero con 5 ratones en cada grupo. Volumen de inyección = 100 µl; B = Sangrado; V = vacunado; E = exsanguinado.

Se midieron las titulaciones anti Aβ mediante ELISA contra Aβ y CRM_{197} como se describe abajo. Brevemente, se recubrieron placas Costar de 96 pozos (# 3591) durante la noche a temperatura ambiente con 2 µg/ml de Aβ 1-42 en un amortiguador estéril de carbonato/bicarbonato, pH 9.6. Las placas se vaciaron y se bloquearon durante dos horas a temperatura ambiente con 200 µl/pozo de BSA al 0.05% en 1X de PBS/0.05% Tween 20. Las placas bloqueadas se vaciaron y se lavaron con un lavador de placas conteniendo TBS, amortiguador de lavado Brij al 0.1% (sin azida). Todo el antisuero primario se diluyó serialmente con BSA al 0.05% en 1X PBS conteniendo Tween 20/0.02% azida y 100 µl de cada dilución se transfirieron entonces a los pozos de placa apropiados y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. Las placas se vaciaron/lavaron entonces como se describió anteriormente. Se diluyó anticuerpo secundario de cabra anti-ratón IgG conjugado con fosfatasa alcalina de Southern Biotech (ciudad, estado) a 1:1000 con BSA al 0.05% en PBS conteniendo Tween al 0.05% 20/0.02% azida y 100 µl se agregaron a cada pozo y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas se vaciaron/lavaron entonces como se describió anteriormente y finalmente se incubaron a

temperatura ambiente durante 1 hora con 100 µl/pozo de una solución de 1 mg/ml de substrato de p-nitrofenil fosfato preparado en dietanolamina/$MgCl_2$, pH 9.8. El revelado de color se detuvo con la adición de 50 µl/pozo de 3 N de NaOH. Las placas se leyeron a 405 nM con una referencia de 690 nM. Las titulaciones de punto final se calcularon a un O.D. de 0.1 AU.

248

Tabla 3

Protocolo de Estudio de Inmunización de Ratón

Código del Grupo	Descripción	Dosis (µg)	Wk 0	Wk 3	Wk6	Wk8	Wk 13	Wk 16
AE488	CRM/1-7 w/o enlazador	30	B V	B,V	B V	B	B	E
AE489	CRM/1-12 con enlazador	30	B V	B V	B V	B	B	E
AE490	CRM/1-9 con enlazador	30	B,V	B V	B,V	B	B	E
AE491	CRM/1-7 con enlazador	30	B,V	B V	B,V	B	B	E
AE492	CRM/1-5 w/o enlazador	30	B,V	B V	B,V	B	B	E
AE493	CRM/1-9 w/o enlazador	30	B V	B,V	B,V	B	B	E
AE494	CRM/1-12 w/o enlazador	30	B V	B,V	B,V	B	B	E

248

249

AE495	CRM/1-5 con enlazador	30	B V	B,V	B V	B	B	E
AE496	CRM/1-7 w/o enlazador	5	B V	B V	B V	B	B	E
AE497	CRM/1-12 con enlazador	5	B V	B V	B V	B	B	E
AE498	CRM/1-9 con enlazador	5	B V	B,V	B V	B	B	E
AE499	CRM/1-7 con enlazador	5	B V	B,V	B V	B	B	E
AE500	CRM/1-5 w/o enlazador	5	B V	B V	B V	B	B	E
AE501	CRM/1-9 w/o enlazador	5	B V	B,V	B V	B	B	E

249

250

Tabla 3

Protocolo de Estudio de Inmunización de Ratón-Continuación

Código del Grupo	Descripción	Dosis (µg)	Wk 0	Wk 3	Wk6	Wk8	Wk 13	Wk 16
AE502	CRM/1-12 w/o enlazador	5	B,V	B V	B V	B	B	E
AE503	CRM/1-5 con enlazador	5	B V	B V	B,V	B	B	E
AE504	CRM_{197} C1-6151	30	B V	B,V	B,V	B	B	E
AE505	CRM_{197} C1-6151	5	B V	B V	B,V	B	B	E
AE506	CRM/12-1mer	30	B,V	B,V	B V	B	B	E
AE507	CRM/12-1mer	5	B V	B,V	B V	B	B	E
AE508	péptido 1-12mer	30	B,V	B V	B,V	B	B	E
AE509	péptido 1-12mer	5	B V	B V	B,V	B	B	E
AE510	Ab	30	B,V	B,V	B V	B	B	E
AE511	Ab	5	B V	B V	B V	B	B	E

250

ELISA del CRM_{197}

Se recubrieron placas Greiner de 96 pozos (# 650011) a 37°C durante 90 minutos con 5.0 µg/ml (100 µl/pozo) de CRM_{197} en amortiguador estéril de carbonato/bicarbonato, pH 9.6. Las placas se vaciaron y se lavaron con un lavador de placas conteniendo 1X TBS, amortiguador de lavado Brij al 0.1%. Todo el antisuero primario se diluyó serialmente con 1X PBS conteniendo Tween al 0.3% 20/EDTA y 100 µl de cada dilución se transfirieron entonces a los pozos de placa apropiados y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Las placas se vaciaron/lavaron entonces como se describió anteriormente. Se diluyó anticuerpo secundario de cabra anti-ratón IgG conjugado con fosfatasa alcalina de Southern Biotech a 1:1000 con 1X PBS conteniendo Tween al 0.05% 20/0.02% azida y 100 µl se agregaron a cada pozo y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Las placas se vaciaron/lavaron entonces como se describió anteriormente y finalmente se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora con 100 µl/pozo de una solución de 1 mg/ml de substrato de p-nitrofenil fosfato preparado en dietanolamina/$MgCl_2$, pH 9.8. El revelado se detuvo con la adición de 50 µl/pozo de 3 N de NaOH. Las placas se leyeron a 405 nM con una referencia de 690 nM. Las titulaciones de punto final se calcularon a un O.D. de 0.1 AU.

Las Tablas 4-6 ilustran las titulaciones ELSA de

252

punto final contra Aβ. después de la inmunización primaria, todos los ocho conjugados (excluyendo el control negativo) indujeron respuestas inmunes anti Aβ IgG. Sin embargo, la dosis de 30 µg, pero no la dosis de 5 µg, de Aβ dio una respuesta positiva en la semana 3 después de la inmunización primaria. Entre todos los conjugados, parece que el péptido Aβ 1-7 conjugado sin enlazador emitió una respuesta tan buena o mejor que otros conjugados estudiados. A una dosis de 5 µg, el Aβ 1-5 C funcionó mejor en las semanas 8-16. El Aβ 1-7 C fue mejor a una dosis de 30 µg. el análisis de las titulaciones de anticuerpo después de la segunda y tercera inmunización con una dosis ya sea de 5 o 30 µg, indican que la máxima respuesta inmune a Aβ para la mayoría de los conjugados se observó después de la segunda inmunización. Al menos en ratones, la tercera inmunización no pareció aumentar la respuesta inmune. Sin embargo, el péptido Aβ necesitó tres inmunizaciones con la dosis de 30 µg para alcanzar la máxima respuesta contra el péptido (Tabla 5). En términos de disminución del anticuerpo durante un extenso período de tiempo, el nivel de anticuerpo de los grupos inmunizados con conjugados se redujo por 2 a 3 veces en comparación con el más alto nivel dentro de ese grupo. Se analizaron muestras individuales de las semanas 6 y 8 para calcular los GMTs contra Aβ para cada uno de los grupos (Tabla 6) para observar si algún grupo de conjugados fue sustancialmente mejor que

los otros. El análisis estadístico de las titulaciones en la semana 6 de los conjugados de Aβ 1.5 C, Aβ 1-7 C y Aβ 1-9 C, indicó que el conjugado de Aβ 1-7 indujo una titulación significativamente mayor. también es evidente a partir de este experimento que la secuencia de enlace GAGAC no contribuyó a aumentar la respuesta inmune al péptido.

254

Tabla 4

Grupo		Semana 3	Semana 6	Semana 8	Semana 13	Semana 16
1-5C	<100	14 960	687 691	882 012	625,208	771,828
1-7C	<100	51,253	1,280 181	860 463	520 060	571,043
1-9C	<100	18,615	1,008,872	622 325	348 967	380,755
1-12C	<100	615	132,009	390 624	166 162	184,170
1-5LC	<100	4,999	458,075	454 631	237 573	220,091
1-7LC	<100	17,693	849,170	842 402	446 089	400,536
1-9LC	<100	18,544	1,465,115	1 180 347	571 127	579,477
1-12LC	<100	12,664	908,360	598 867	368 101	316,075
CRM_{197}	<100	<100	<100	<100	<100	<100
1-42	<100	<100	<100	<100	<100	<100
1-12	<100	<100	<100	<100	<100	<100
12-1C	<100	<100	<100	<100	<100	<100

Tabla 4 Semanas 0, 3 6 8 13 y 16 títulos de punto final ELISA contra Aβ que utiliza antisuero desde 5 µg de dosis de la longitudes que varían de los intervalos de los conjugados de péptido de la N-terminal del péptido Amiloide Aβ, Ref Elan policlonal hiperinmune #592=3,073,307 Punto final en O D 0 1 de ratones AU Swiss Webster inmunizados SC-N con 5 µg de los antígenos anteriores formulados con 20 µg de STIMULON™ QS-21 en las semanas 0, 3 y 6

254

255

Tabla 5

Grupo	Semana 0	Semana 3	Semana 6	Semana 8	Semana 13	Semana 16
1-5C	<100	18,150	590 355	332,832	204,645	176 159
1-7C	<100	100,672	1 840 741	647,470	592 638	779 072
1-9C	<100	18,520	1 184 696	713,494	363 459	327 065
1-12C	<100	7,837	1 325 725	1,126,389	681 268	577 604
1-5LC	<100	16,347	469 191	184,077	177 358	164 680
1-7LC	<100	47,866	971 229	462,200	463 466	529 726
1-9LC	<100	59,002	921 544	787,273	405 023	500 468
1-12LC	<100	27 348	697 150	483,320	284 800	397,816
CRM_{197}	<100	<100	<100	<100	<100	<100
1-42	<100	160	3 327	109 718	48,646	27 901
1-12	<100	<100	<100	<100	<100	<100
12-1C	<100	<100	<100	<100	<100	<100

Tabla 5 Semanas 0, 3, 6, 8 13 y 16 títulos de punto final ELISA contra Aβ que utiliza antisuero desde 30 µg de dosis de la longitudes que varían de los intervalos de los conjugados de péptido de la N-terminal del péptido Amiloide Aβ Ref Elan policlonal hiperinmune #592=3,073,307 Punto final en O D 0 1 de ratones AU Swiss Webster inmunizados SC-N con 30 µg de los antígenos anteriores formulados con 20 µg de STIMULON™ QS-21 en las semanas 0, 3 y 6

25C

Tabla 6

Grupo	Semana 6	Semana 8
1-5C	237,668[a]	161,671[b]
1-7C	1,866,702[a]	881,146[b]
1-9C	963,323[a]	595,414[b]
1-12C	940,260	955,470
1-5LC	395,553	141,084
1-7LC	516,921	394,521
1-9LC	826,773	562,458
1-12LC	544,768	376,952
1-42	365	4,565

Tabla 6. Semanas 6 y 8 punto final de ELISA GMTs contra Aβ utilizando antisuero de 30 µg por dosis de conjugados de péptido que se extienden a longitudes variables de la terminación N de amiloide-Aβ. Ref: Elan Hyperimmune Polyclonal #592 = 3,073,307. Punto final a O.D. 0.1 AU. Se inmunizaron ratones Swiss Webster SC-N con 30 µg de los antígenos anteriores formulados con 20 µg de STIMULON™ QS-21 en las semanas 0, 3 y 6

a. El análisis estadístico de las titulaciones de la semana 6 de 1-5C, 1-7C, y 1-9C utilizando Tukek-Kramer muestra una diferencia estadística entre 1-5C vs 1-7C solo, mientras que el análisis utilizando prueba Student's T muestra una diferencia estadística entre 1-5C vs 1-7C y 1-5C

vs 1-9C.

b. El análisis estadístico de las titulaciones de la semana 8 de 1-5C, 1-7C, y 1-9C no muestra una diferencia estadística entre los tres grupos. Sin embargo, ahí parece haber una tendencia que puede indicar una diferencia entre 1-5C vs 1-7C.

Coloración PDAPP de Tejido Cerebral de Ratón

El análisis de coloración PDAPP de tejido cerebral proporciona una indicación de la funcionalidad de los conjugados de péptido Aβ y/o antisuero Aβ 1-42. Las muestras de suero de grupos de ratones individuales se analizaron por separado para su capacidad de reconocer placas de tejido cerebral de ratón PDAPP que contienen péptido amiloide. Los resultados se muestran en la Tabla 7A y 7B. Con la excepción del antisuero de conjugado de Aβ 5 mer, hubo una respuesta en relación a la dosis para reconocer las placas. Independientemente del enlazador, 30 µg de antisuero inducido por conjugado tuvieron mejores patrones de reactividad en comparación con la del antisuero de conjugado de Aβ 5 mer. Sin embargo, con el antisuero de conjugado de Aβ 5 mer, parece haber una reactividad similar o mejor para el grupo de 5 µg. Comparando todos estos resultados, se concluye que los conjugados producidos de Aβ 1-5 mer a Aβ 1-9 mer son suficientes para producir placas que reconocen la respuesta inmune en ratones y la presencia de enlazador no es esencial.

Las siguientes conclusiones pueden tomarse de este estudio: (a) Todos los conjugados de péptido indujeron antisuero de alta titulación contra la proteína vehículo CRM_{197} a niveles iguales o ligeramente mas altos en comparación con el control CRM_{197} no conjugado (no mostrado). (b) Los conjugados con el enlazador GAGAC no aumentaron la inmunogenicidad o funcionalidad en comparación con conjugados sin el enlazador. (c) Los datos de inmunogenicidad y la coloración PDAPP de tejido cerebral (una indicación inicial del anticuerpo funcional) muestran que los conjugados de Aβ 1-5 mer y Aβ 1.7 mer parecieron ser los inmunógenos preferidos para desarrollo posterior.

Tabla 7A. Coloración PDAPP de tejido cerebral de ratón

Dosis de 5 µg					
Sin enlazador			Con enlazador		
Vacuna	Animal#	Coloración PDAPP	Vacuna	Animal#	Coloración PDAPP
CRM/Aβ 1.5	1	+(no difuso)	CRM/Aβ 1.5	1	-
	2	++/+++		2	-
	3	++/+++		3	±
	4	++		4	±
	5	++		5	±
CRM/Aβ 1.7	1	++	CRM/Aβ 1.7	1	+
	2	++		2	++
	3	++		3	++
	4	++		4	+
	5	++		5	++
CRM/Aβ 1.9	1	+	CRM/Aβ 1.9	1	++
	2	+/++		2	++
	3	±		3	+
	4	±		4	+

159

	5	±		5	+
CRM/Aβ 1.12	1	-	CRM/Aβ 1.12	1	+
	2	?		2	+
	3	±		3	++
	4	-		4	-
	5	±		5	±
CRM/Aβ 12-1	1	-	Aβ 42	1	-
mer	2	-		2	-
	3	±		3	-
	4	-		4	-
	5	±		5	-

Todo el antisuero se diluyó 1:1000 para el procedimiento de coloración.

Tabla 7A. Coloración PDAPP de tejido cerebral de ratón

Dosis de 3 µg					
Sin enlazador			Con enlazador		
Vacuna	Animal#	Coloración PDAPP	Vacuna	Animal#	Coloración PDAPP
CRM/Aβ 1.5	1	-	CRM/Aβ 1.5	1	+
	2	+/++		2	-
	3	-		3	-
	4	±		4	±
	5	++		5	-
CRM/Aβ 1.7	1	+/++	CRM/Aβ 1.7	1	+
	2	++		2	±/+
	3	++		3	+/++
	4	++		4	±/+
	5	++/+++		5	+/++
CRM/Aβ 1.9	1	++/+++	CRM/Aβ 1.9	1	+/++
	2	++		2	++
	3	++		3	++
	4	+		4	±
	5	+		5	+/++

CRM/Aβ 1.12	1	-	CRM/Aβ 1.12	1	+/++
	2	+/++		2	+
	3	+/++		3	-
	4	±		4	+/++
	5	±		5	+
CRM/Aβ 12-1 mer	1	-	Aβ 42	1	±
	2	-		2	-
	3	-		3	-
	4	-		4	-
	5	-		5	-

Todo el antisuero se diluyó 1:1000 para el procedimiento de coloración.

EJEMPLO 7

Estudios de Inmunogenicidad en Monos

Grupos de 6 monos recibieron 30 µg de conjugado 7 mer (conjugado total) con adyuvante ya sea STIMULON™ QS-21, alum o formulación RC529 SE en los días 0, 29, y 58. Los grupos adicionales incluidos fueron 30 µg de conjugado 5 mer ya sea con alum ($Al(OH_3)$) o RC529 SE, y 75 y 300 µg de Aβ con STIMULON™ QS-21 como controles positivos. Los controles positivos fueron inmunizados cada dos semanas. En el día 36 y 64 se determinaron las titulaciones de anticuerpo anti-Aβ (Figuras 7-9). En el día 36, los conjugados 7mer/CRM con STIMULON™ QS-21, Alum y RC529 SE emitieron titulaciones GMT de 10110, 13330 y 17090 respectivamente (Figura 7). En contraste, el Aβ 1-42 más STIMULON™ QS-21, emitió GMTs de 223 y 1734 a niveles de dosis de 75 y 300 µg, respectivamente.

El conjugado Aβ 5 mer emitió una titulación de 2134 con alum y 15980 con RC529 SE. En el día 64, i.e., después de 3 dosis de conjugados ya sea con STIMULON™ QS-21 o RC-529 SE indujeron titulaciones sustancialmente mayores que posterior a la segunda dosis (GMTs 69910 para 7mer/RC-529 SE; 21640 para Aβ 5mer/RC-529 SE y 30310 para Aβ 7mer/STIMULON™ QS-21) (Figura 8). Los conjugados con alum emitieron titulaciones reducidas posterior a la tercera inmunización en comparación con las posteriores a la segunda inmunización. Parece que el conjugado Aβ 7mer emitió una mejor respuesta en comparación con el conjugado Aβ 5 mer. En monos, el conjugado Aβ 7 mer con adyuvante RC-529 SE o STIMULON™ QS-21 emitió la respuesta más alta (Figura 9). La respuesta al conjugado Aβ 7 mer con alum fue moderada y similar a la de 300 µg de Aβ 1-42 con STIMULON™ QS-21.

Pueden tomarse diversas conclusiones del presente ejemplo. Primero, ambos conjugados son muy inmunogénicos en especies de primate. Segundo, la presencia de adyuvantes en la formulación de inmunización influye significativamente la respuesta inmune. Tercero, excepto por el adyuvante de aluminio, RC-529 SE y STIMULON™ QS-21 aumentan la respuesta inmune después de cada dosis de inmunización al menos hasta tres dosis (Figuras 9). El conjugado Aβ 7 mer total indujo una mayor respuesta inmune en presencia de 529, seguido por STIMULON™ QS-21 (ver Figura 9).

EJEMPLO 8

Preparación de Múltiples Conjugados de Péptido Antigénico (MAP) y sus Estudios de Inmunogenicidad

Se encuentran disponibles diversos métodos para generar múltiples sitios antigénicos en los vehículos. En los ejemplos previos, cada sitio antigénico se conjuga por separado al vehículo mediante conjugación definida y químicas de tapado. En este ejemplo, se construyen múltiples sitios antigénicos mediante síntesis de fase sólida o repeticiones en serie de Aβ 1-7 mer. Alternativamente, estas repeticiones en serie pueden acoplarse con epítopes de célula T con o sin enlace a través de un núcleo lisina como se describe en todas partes. Estos múltiples péptidos antigénicos se sintetizaron con un residuo cisteinil adicional para conjugación a la proteína vehículo. SE sintetizaron los péptidos conteniendo una unidad de repetición (1-7), tres unidades de repetición $(1-7)_3$ y cinco unidades de repetición $(1-7)_5$ con un residuo cisteinil adicional en el extremo carboxilo. Estos péptidos se unieron covalentemente a CRM bromoacetilado durante la noche a través de sus residuos cisteína de terminación C. La reacción se llevó a cabo a un pH 9.0-9.2 con relaciones de péptido:CRM agregadas como se señaló en la Tabla 8. Los grupos bromoacetilo que no reaccionaron con el péptido, se taparon con N-acetilcisteamina. Estos lotes representan conjugados que contienen una sola copia, tres copias en serie

y cinco copias en serie del péptido Aβ 1-7 conjugado a CRM, respectivamente. La Tabla 8 señala brevemente las propiedades de las muestras.

Tabla 8

Múltiples Muestras de Conjugado de Péptido Antigénico (MAP)

Conjugado	Péptido:CRM (peso/peso)	pH de la reacción
$Ab(1-7)_1$/CRM	0.37	8.99
$Ab(1-7)_3$/CRM	1.02	8.95
$Ab(1-7)_5$/CRM	1.67	9.17

La carga del péptido (el número promedio de péptidos Aβ 1-7 por vehículo) y los números de tapa (Tabla 9) son los números de aminoácidos únicos (CMC u CMCA) por vehículo como se determinó por el análisis de aminoácido. Los valores CMC y CMCA se refirieron a lisina.

Tabla 9

Grado de Conjugación Y tapa de Cada Conjugado

Conjugado	Carga de péptido (CMC)	Tapa (CMCA)
$Ab(1-7)_1$/CRM	12.5	11.7
$Ab(1-7)_3$/CRM	10.4	15.2
$Ab(1-7)_5$/CRM	9.8	15.9

Se inmunizaron ratones Swiss Webster (10 por grupo) subcutáneamente con 1 o 0.1 µg de péptido conjugado de Aβ/CRM. La mitad de los ratones se inmunizaron con la

composición formulada con 100 µg del adyuvante $Al(OH)_3$, y la mitad se inmunizaron sin adyuvante. Las inmunizaciones se programaron en las semanas 0 y 3. Se programaron sangrados para las semanas 0, 3 y 6. Las muestras de suero se analizaron para su respuesta de anticuerpo contra el péptido Aβ 1-42 mer. Los resultados se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10

Titulaciones de Punto final Anti-Aβ para Múltiples Conjugados de Péptido Antigénico (MAP)

Código de Grupo	Descripción de Muestra	Adyuvante	Depósito Semana 0	GMT Semana 3	GMT Semana 6
AG332	1 µg $Aβ(1-7)_1$/CRM	$Al(OH)_3$	<100	18,096	100,279
AG333	1 µg $Aβ(1-7)_3$/CRM	$Al(OH)_3$	<100	44,911	420,235
AG334	1 µg $Aβ(1-7)_5$/CRM	$Al(OH)_3$	<100	27,032	394,488
AG335	0.1 µg $Aβ(1-7)_1$/CRM	$Al(OH)_3$	<100	19,350	66,834
AG336	0.1 µg $Aβ(1-7)_3$/CRM	$Al(OH)_3$	<100	13,307	208,272
AG337	0.1 µg $Aβ(1-7)_5$/CRM	$Al(OH)_3$	<100	1,196	22,665
AG338	1 µg $Aβ(1-7)_1$/CRM	Ninguno	<100	5,273	370,980
AG339	1 µg $Aβ(1-7)_3$/CRM	Ninguno	<100	9,299	541.093
AG340	1 µg $Aβ(1-7)_5$/CRM	Ninguno	<100	3,100	185,272
AG341	0.1 µg $Aβ(1-7)_1$/CRM	Ninguno	<100	340	25,839
AG342	0.1 µg $Aβ(1-7)_3$/CRM	Ninguno	<100	128	5,553
AG343	0.1 µg $Aβ(1-7)_5$/CRM	Ninguno	<100	668	2,098

Todos los conjugados indujeron titulación del

anticuerpo anti-Aβ 1-42 después de la inmunización primaria y los niveles aumentaron sustancialmente después de la dosis de refuerzo. En ausencia del adyuvante de aluminio, las diferencias en la respuesta a la dosis fueron evidentes en los sangrados tanto de la semana 3 como de la semana 6. La dosis más alta emitió alta titulación de respuesta anticuerpo. El adyuvante de aluminio emitió una respuesta de anticuerpo sustancialmente mayor en la semana 3 en ambos niveles de dosis (0.1 y 1 µg) en comparación con los grupos sin adyuvante. Después de la inmunización secundaria, los conjugados dados a una dosis de 1 µg emitieron un incremento de 5 a 10 veces en los niveles de anticuerpo. A este nivel de dosis los conjugados de péptido con 3 y 5 repeticiones indujeron más alta respuesta de anticuerpo que un conjugado conteniendo una sola repetición. También se determinaron las titulaciones del vehículo CRM y estas se listan en la Tabla 11.

Tabla 11

Titulaciones de Punto final Anti-CRM para Múltiples Conjugados de Péptido Antigénico (MAP)

Código de Grupo	Descripción de Muestra	Adyuvante	Depósito Semana 0	GMT Semana 3	GMT Semana 6
AG332	1 µg Aβ(1-7)$_1$/CRM	Al(OH)$_3$	<50	10,531	114,602
AG333	1 µg Aβ(1-7)$_3$/CRM	Al(OH)$_3$	<50	4,274	83,065
AG334	1 µg Aβ(1-7)$_5$/CRM	Al(OH)$_3$	<50	1,680	49,320

AG335	0.1 µg Aβ(1-7)$_1$/CRM	Al(OH)$_3$	<50	1,114	13,231
AG336	0.1 µg Aβ(1-7)$_3$/CRM	Al(OH)$_3$	<50	197	1,484
AG337	0.1 µg Aβ(1-7)$_5$/CRM	Al(OH)$_3$	<50	65	222
AG338	1 µg Aβ(1-7)$_1$/CRM	Ninguno	<50	35	309
AG339	1 µg Aβ(1-7)$_3$/CRM	Ninguno	<50	29	1,085
AG340	1 µg Aβ(1-7)$_5$/CRM	Ninguno	<50	29	542
AG341	0.1 µg Aβ(1-7)$_1$/CRM	Ninguno	<50	25	55
AG342	0.1 µg Aβ(1-7)$_3$/CRM	Ninguno	<50	25	34
AG343	0.1 µg Aβ(1-7)$_5$/CRM	Ninguno	<50	29	ND

Los animales se inmunizaron en las semanas 0 y 3 y se sangraron en las semanas 0, 3 y 6. Adyuvante: 100 µg Al(OH)$_3$ o ninguno. ND = no determinado.

Los datos en la Tabla 11 indican que los grupos sin adyuvante indujeron niveles muy bajos de respuesta de anticuerpo anti-CRM a niveles de dosis tanto de 1 µg como de 0.1 µg incluso después de dos inmunizaciones. Sin embargo, los conjugados con adyuvante de hidróxido de aluminio indujeron niveles sustanciales de respuesta de anticuerpo anti-CRM a una dosis de 1 µg y una respuesta mucho más baja a una dosis de 0.1 µg. en presencia del adyuvante, las titulaciones CRM fueron más altas para el conjugado de una sola repetición, intermedias para el conjugado de tres repeticiones, y más bajas para el conjugados de cinco repeticiones. Esto se espera, dado que la dosis de CRM por dosis de péptido es más baja para Aβ (1-7)$_5$/CRM, y más alta

para Aβ $(1-7)_1$/CRM. Las diferencias fueron significativas solo estadísticamente en la semana 6 para la dosis de 0.1 µg.

El objetivo de la presente invención es producir una alta titulación de la respuesta inmunogénica contra el hapteno antigénico y no necesariamente contra la proteína vehículo. Bajo ciertas circunstancias, es deseable producir una óptima respuesta inmune contra la determinante antigénica de hapteno con poca o ninguna respuesta inmune contra la proteína vehículo. Para tales aplicaciones, los conjugados con repeticiones en serie de múltiples determinantes antigénicas con formulación sin adyuvante cubrirán las necesidades.

EJEMPLO 9

Preparación de Conjugados de Péptido Aβ con Diversas Proteínas Vehículo y sus Inmunogenicidades

Este ejemplo compara la inmunogenicidad de conjugados utilizando ser diferentes proteínas vehículo. La sal de acetato de Aβ 1-7 se agregó a vehículos bromoacetilados en una relación de 1:1 por peso a un pH 9. Todos los conjugados excepto Aβ 1-7/rC5ap se taparon con N-acetilcisteamina. Todos los vehículos alternativos son proteínas bacteriales recombinantes, incluyendo CRM /toxoide de difteria), peptidasa C5a recombinante (rC5ap; clonada de Streptococcus galactiae, incluye mutaciones D130A y S512A), ORFs 1224, 1664, 2452 (todos clonados de Streptococcus

pyogenes), y T367, T858 (cada uno clonado de Chlamydia pneumoniae). En la Tabla 12 se encuentra un resumen de los vehículos utilizados. El grado de conjugación y tapa de cada conjugado Aβ 1-7 a estos vehículos se presenta en la Tabla 13.

Este estudio mostró que el conjugado de peptidasa C5a recombinante indujo mayores titulaciones contra Aβ que la mayoría de los otros vehículos analizados, incluyendo CRM. Esta diferencia fue estadísticamente significativa para las titulaciones de la semana 6 de grupos que recibieron hidróxido de aluminio. Además, el conjugado Aβ 1-7/1858 fue significativamente más inmunogénico que la mayoría de otros conjugados en ausencia de adyuvante. El único conjugado que tuvo un bajo desempeño en relación al conjugado de control CRM fue Aβ 1-7/T367, un conjugado que tampoco reaccionó con anticuerpo monoclonal específico para Aβ mediante inmunoanálisis Western. Este estudio confirma que otros numerosos vehículos pueden utilizarse con éxito para inmunizar contra el péptido Aβ.

Tabla 12

Lista de Propiedades de Vehículos y Conjugado

PROTEÍNA VEHÍCULO	**MW del vehículo (Da)**	**# de lisinas**
CRM	58,408	39
RC5ap	108,560	85

269

ORF1224	30,950	18
ORF1664	31,270	38
ORF2452	31,790	29
T367	49,700	29
T858	37,190	23

Tabla 13

Grado de Conjugación y Tapa de Cada Conjugado

CONJUGADO	Carga de péptido (CMC)	Tapa (CMCA)
Aβ 1-7/rC5ap	25.9	-
Aβ 1-7/ORF1224	12.8	5.7
Aβ 1-7/ORF1664	13.4	10.8
Aβ 1-7/ORF2452	12.03	10.5
Aβ 1-7/T367	13.2	8.2
Aβ 1-7/T858	5.2	1.7

Resultados de conjugación: Carga de péptido (el número promedio de péptidos Aβ 1-7 por vehículo) y número de tapado, son los números de aminoácidos únicos (CMC o CMCA) por vehículo determinado por análisis de aminoácido. Los valores CMC y CMCA se refirieron a lisina.

Resultados de Inmunización

La titulación media geométrica para cada grupo en este estudio se lista en la Tabla 14. En la semana 3, sin importar la presencia de adyuvante, el Aβ 1-7/rC5ap indujo titulaciones significativamente más altas anti- Aβ que los

conjugados correspondientes preparados con Streptococcus pyogenes ORFs 1224, 1664, 2452, o Chlamydia pneumoniae ORFs T367 y T858. En la semana 3 en ausencia de adyuvante, el Aβ 1-7/rC5ap también fue más inmunogénico que todos los otros conjugados excepto Aβ 1-7/T858. El conjugado T858 sin $AL(OH)_3$ indujo más altas titulaciones que los conjugados de ORF1224, ORF1664, ORF2452 y CRM sin adyuvante. El único conjugado que fue significativamente menos inmunogénico que Aβ 1-7/CRM fue Aβ 1-7/T367 ($p<0.00002$). el vehículo T367 tuvo un bajo desempeño con o sin adyuvante en ambas semanas 3 y 6. En la semana 6, el conjugado rC5ap con hidróxido de aluminio fue más inmunogénico ($p<0.04$) que todos los otros conjugados excepto Aβ 1-7/ORF2452. En ausencia de adyuvante, tanto Aβ 1-7/eC5ap como Aβ 1-7/T858 indujeron titulaciones significativamente más altas que los conjugados de ORF1224, ORF1664 o T367. El Aβ 1-7/CRM sin hidróxido de aluminio indujo titulaciones más altas que ya sea Aβ 1-7/ORF1664 o Aβ 1-7/T367.

Tabla 14

Titulaciones de Punto final de Anti- Aβ 1-42

CÓDIGO DE GRUPO	DESCRIPCIÓN DE MUESTRA	ADYUVANTE	DEPÓSITO SEMANA 0	GMT SEMANA 3	GMT SEMANA 6
AG344	5 µg Aβ(1-7)/CRM	$Al(OH)_3$	<100	21,404	54,157
AG345	5 µg Aβ(1-7)/rC5ap	$Al(OH)_3$	<100	61,967	402,972
AG346	5 µg Aβ(1-7)/ORF1224	$Al(OH)_3$	<100	10,711	30,084
AG347	5 µg Aβ(1-7)/ORF1664	$Al(OH)_3$	<100	7,188	43,226

271

AG348	5 µg Aβ(1-7)/ORF2452	$Al(OH)_3$	<100	11,437	109,091
AG349	5 µg Aβ(1-7)/T367	$Al(OH)_3$	<100	321	5,139
AG350	5 µg Aβ(1-7)/T858	$Al(OH)_3$	<100	16,656	33,328
AG351	5 µg Aβ(1-7)/CRM	Ninguno	<100	2,615	119,488
AG352	5 µg Aβ(1-7)/rC5ap	Ninguno	<100	11,858	279,113
AG353	5 µg Aβ(1-7)/ORF1224	Ninguno	<100	1,674	18,719
AG354	5 µg Aβ(1-7)/ORF1664	Ninguno	<100	119	9,832
AG355	5 µg Aβ(1-7)/ORF2452	Ninguno	<100	2,493	76,038
AG356	5 µg Aβ(1-7)/T367	Ninguno	<100	50	620
AG357	5 µg Aβ(1-7)/T858	Ninguno	<100	28,820	275,202

Los animales se inmunizaron en las semanas 0 y 3 y se sangraron en las semanas 0, 3 y 6. La dosis se basa en la cantidad total de conjugado. Adyuvante: 100 µg $Al(OH)_3$ o ninguno.

EJEMPLO 10

Preparación de Conjugados Adicionales de Péptido Aβ-Proteína

I. Activación

Se disolvió CRM_{197} congelado (8 ml, 59.84 mg, a 7.48 mg/ml) en 0.1 M de amortiguador de borato (pH 9, 3.968 ml) para conducir la concentración a 5 mg/ml. La solución se enfrió en un baño de hielo a 0.5°C. Se disolvió N-hidroxisuccinimida (59.9 mg) (Aldrich-Sigma) en DMF (100 µl) (Aldrich-Sigma) y se agregó por goteo a la solución de CRM_{197}. A la adición de ácido bromoacético de N-hidroxisuccinimida, se observó un precipitado. Cuando se verificó el pH,

272

disminuyó a un pH 6. El pH de la mezcla de reacción se regresó a un pH 9 agregando más 0.1 M amortiguador de borato. La mezcla de reacción se agitó entonces a 4°C durante 1 hora con agitación suave. La mezcla se purificó y se concentró utilizando concentración centrífuga centriprep YM-10 y se repurificó en Sephadex G-25 utilizando 10 mM de borato como eluyente. Las fracciones positivas al reactivo Bradford se depositaron y se concentraron utilizando centriprep YM-10. Se determinó el grado de bromoacetilación mediante análisis Bradford (lineal). Se encontró que la concentración fue de 5.36 mg/ml (produjo 30 mg). La concentración final se ajustó entonces para ser 5 mg/ml y se almacenó en el congelador en sucrosa al 5% hasta su uso posterior.

II. Conjugación

Para cada conjugación se utilizó CRM_{197} bromoacetilado congelado. Los péptidos se disolvieron en amortiguador de borato (2.5 mg en 125 ml de 0.1 M de amortiguador de borato). Se observó una ligera insolubilidad con los péptidos Aβ KLVFFAEDC (SEQ ID NO: 45), CLVFFAEDV (SEQ ID NO: 47), CKLVFFAED (SEQ ID NO: 48), y LVFFAEDC (SEQ ID NO: 50). El CRM_{197} bromoacetilado se trató con las soluciones/suspensiones de péptido. La relación de péptido y proteína en la mezcla fue de 1:2. Se observó turbiedad en las mezclas de conjugado con los péptidos KLVFFAEDC (SEQ ID NO: 45), CLVFFAEDV (SEQ ID NO: 47), CKLVFFAED (SEQ ID NO:

48), y péptidos KLVFFAEDC (SEQ ID NO: 45). Las mezclas se verificaron entonces para el pH (pH 9) y se incubaron a 4°C durante la noche con agitación lenta. Las concentraciones finales de las mezclas se prepararon a 3 mg/ml antes de la incubación. La turbiedad de las mezclas de conjugado con los péptidos CLVFFAEDV (SEQ ID NO: 47), y LVFFAEDC (SEQ ID NO: 50) desaparecieron después de la incubación. Sin embargo, KLVFFAEDC (SEQ ID NO: 45), y CKLVFFAED (SEQ ID NO: 48) fueron aún ligeramente turbias. El conjugado de proteína falsa soluble también se preparó con cisteamina a una relación de 1:1 (peso/peso). Se obtuvieron péptidos sintetizados de BIOSOURCE con una pureza de aproximadamente 95%.

Octámeros

LVFFAEDVC (SEQ ID NO: 44)

KLVFFAEDC (SEQ ID NO: 45)

VFAAFAEDVGC (SEQ ID NO: 43)

CLVFFAEDV (SEQ ID NO: 47)

CKLVFFAED (SEQ ID NO: 48)

CVFFAEDVG (SEQ ID NO: 46)

Heptámeros

VFFAEDVC (SEQ ID NO: 49)

LVFFAEDC (SEQ ID NO: 50).

III. Tapa de Grupos Lisina sin reaccionar en Proteína:

Las lisinas no reactivadas se taparon con N-acetilcisteamina (CMCA: Aldrich-Sigma) a una relación de 1/1

(peso/peso) durante 4 horas a 4°C mientras se reposó en la oscuridad. Los péptidos sin reaccionar y los reactivos de tapa se retiraron de los conjugados mediante diálisis utilizando un casete Slide-A-Lyzer (M_w corte 10,000) (Pierce) contra amortiguador PBS (2 l) durante la noche (13 horas). El intercambio de amortiguador y la diálisis se efectuaron dos veces (2 x 14 horas). Se observó una ligera insolubilidad en los conjugados con péptidos KLVFFAEDC (SEQ ID NO: 45) y CKLVFFAED (SEQ ID NO: 48). Todos los conjugados se almacenaron en el refrigerador a 4°C en un preservativo.

IV. Caracterización del Vehículo Proteína:

Se utilizó MALDI-TOF MS para determinar la masa del CRM_{197} bromoacetilado y la masa del conjugado falso de N-acetilcisteamina-CRM_{197}.

En base a las masas de CRM_{197} y CRM_{197} bromoacetilado se modificaron 11 residuos de lisina.

(59941.46-58590.29)/122 = 11

en donde, el Mw de CRM_{197} es 58624.29

el Mw de CRM_{197} bromoacetilado es 59941.46

el Mw de bromoacetato es 122.

El grado de bromoacetilación fue de más de 28%. (El número total de lisinas en CRM_{197} fue de 39). De estos 11 residuos de lisina modificados, 10 se acoplaron con cisteamina. La eficiencia de acoplamiento fue de 90%.

(61143-59941)/119 = 10

en donde el Mw del CRM_{197} bromoacetilado es 59941.46

el Mw del conjugado falso es 61143

el Mw de N-acetilcisetamina es 119

(10/11) x 100 = 90

V. Caracterización de los Conjugados de Péptido-Proteína mediante Inmunoanálisis Western SDS-PAGE con Gel de Pre moldeado de Tris-Tricina:

Los conjugados de proteína-péptido se analizaron mediante inmunoanálisis Western. Las rutas son: marcador (ruta 1); L-28375 24/01 (ruta 2); L-28375 24/02 (ruta 3); L.28375 24/03 (ruta 4); L-28375 24/04 (ruta 5); L-28375 24/05 (ruta 6); L-28375 24/06 (ruta 7); L.28375 24/07 (ruta 8); L-28375 24/08 (ruta 9); L-28375 24/09 (Falso) (Ruta 10); y $BrAcCRM_{197}$ (ruta 11). Se utilizó un anticuerpo monoclonal específico del péptido de ratones (248-6H9-806 Aβ 17-28) como el anticuerpo primario (antisuero) (se encontró que una dilución de 1:3000 fue la mejor). El IgG de cabra anti-ratón (H + L)-HPR fue el anticuerpo secundario (dilución 1:1000). Se observó que todos los conjugados fueron reconocidos por el anticuerpo primario, excepto el conjugado falso y el CRM_{197} activado. (Ver Figura 10).

Concentración de Proteína

Las concentraciones de proteína de las muestras de conjugado se determinaron mediante el análisis Pierce BCA. (Ver Tabla 15).

276

Análisis de Aminoácido

El análisis de aminoácido se llevó a cabo para determinar el grado de conjugación. El grado de conjugación se calculó en base a los residuos CMCA (carboximetilcisteamina) encontrados en los conjugados. Se utilizó CMCA para tapar los sitios activados sin reaccionar después de la conjugación con los péptidos (Ver Tabla 15).

Tabla 15

Grado de Conjugación de Péptidos con $BrAcCRM_{197}$

Conjugado Crudo	Secuencia de Péptido (SEQ ID NO)	Concentración Final (mg/ml)	Grado de Conjugación (en base a CMCA)
L-28375 24/01	LVFFAEDVC (SEQ ID NO: 44)	1.67	8/10
L-28375 24/02	KLVFFAEDC (SEQ ID NO: 45)	0.82	5/10
L-28375 24/03	VFAAFAEDVGC (SEQ ID NO: 43)	1.43	8/10
L-28375 24/04	C-LVFFAEDV (SEQ ID NO: 47)	1.04	9/10
L-28375 24/05	C-KLVFFAED (SEQ ID NO: 48)	0.78	1/10
L-28375 24/06	C-VFFAEDVG (SEQ ID NO: 46)	0.97	9/10
L-28375 24/07	CVFFAED VFFAEDVC (SEQ ID NO: 49)	1.00	7/10
L-28375 24/08	LVFFAEDC (SEQ ID NO: 50)	9.00	8/10
L-28375 24/09		1.89	10/11

Todos los análisis colorimétricos se llevaron a cabo utilizando espectrofotómetro de microplaca y SOGTmax Pro.

EJEMPLO 11

Estudios Inmunogénicos de Conjugados de Péptido Aβ en Ratones Swiss Webster

Se inmunizaron ratones Swiss Webster criados, con VFAAFAEDVGC (SEQ ID NO: 43), LVFFAEDVC (SEQ ID NO: 44), KLVFFAEDC (SEQ ID NO: 45), C-VFFAEDVG (SEQ ID NO: 46), C-LVFFAEDV (SEQ ID NO: 47), C-KLVFFAED (SEQ ID NO: 48), VFFAEDVC (SEQ ID NO: 49), LVFFAEDC (SEQ ID NO: 50) cada una conjugada a CRM_{197} o con Aβ 1-7 CRM_{197} todas formuladas con el adyuvante RC 529 SE. Nueve grupos de 10 animales por grupo se inmunizaron subcutáneamente con uno de los conjugados de péptido Aβ al inicio del estudio (semana 0) y subsecuentemente en la semana 4. El suero se colectó previo a, pero en los mismos días que la inmunización.

Estudios inmunogénicos de Conjugados de Péptido Aβ en Ratones Balb/c criados

Se inmunizaron ratones criados Balb/c como en el párrafo precedente, pero también se reforzaron con conjugado y adyuvante en la semana 12.

Resultados

El suero de ambos estudios se colectó para análisis de titulación de anticuerpo IgG específico del péptido $Aβ_{13-28}$. El suero de ratones Balb/c también se colectó para análisis un día antes del refuerzo de la semana 12, y una semana después. Se evaluaron células de bazo de animales utilizados en el Ejemplo 11 por su potencial para responder a la estimulación in viro con un depósito sobrepuesto de péptidos extendidos $Aβ_{1-42}$, de longitud total $Aβ_{1-42}$, CRM_{197} o activadores

policlonales. El análisis se comprende de lectura Ellispot para interleucinas 4 y 5, e interferón-gama. Al completarse, los conjugados de péptido Aβ se evalúan como se describió anteriormente y como se describe en el Ejemplo 6.

EJEMPLO 12

Estudios Inmunogénicos de Conjugados de Péptido Aβ en Ratones PSAPP

Se inmunizaron ratones PSAPP, con VFAAFAEDVGC (SEQ ID NO: 43), LVFFAEDVC (SEQ ID NO: 44), KLVFFAEDC (SEQ ID NO: 45), C-VFFAEDVG (SEQ ID NO: 46), C-LVFFAEDV (SEQ ID NO: 47), C-KLVFFAED (SEQ ID NO: 48), VFFAEDVC (SEQ ID NO: 49), LVFFAEDC (SEQ ID NO: 50). El ratón PSAPP, un ratón doblemente transgénico (PSAPP) que sobreexpresa transgenes APP y PSI, se describe en Holcomb et al., (1998) Nature Medicine 4:97-11.

Estudios Inmunogénicos de Conjugados de Péptido Aβ en Ratones PDAPP

Se inmunizaron ratones PDAPP, con VFAAFAEDVGC (SEQ ID NO: 43), LVFFAEDVC (SEQ ID NO: 44), KLVFFAEDC (SEQ ID NO: 45), C-VFFAEDVG (SEQ ID NO: 46), C-LVFFAEDV (SEQ ID NO: 47), C-KLVFFAED (SEQ ID NO: 48), VFFAEDVC (SEQ ID NO: 49), LVFFAEDC (SEQ ID NO: 50). El ratón PDAPP, expresa una forma mutante de APP humana (APP^{V71F}) y desarrolla la enfermedad de Alzheimer a una temprana edad (Bard et al., (2000) Nature Medicine 6:916-919; Masliah E. et al., (1996) J. Neurosci.

279.

15:16(18):5795-811).

Resultados

El suero de ambos estudios se colectó para análisis de titulación de anticuerpo IgG específico del péptido $A\beta_{13-28}$. Al completarse, los conjugados de péptido Aβ se evalúan como se describió anteriormente y como se describe en los Ejemplos 6 y 11, así como en el análisis de condicionamiento de temor contextual (CFC).

El condicionamiento de temor contextual es una forma común de aprendizaje que es excepcionalmente confiable y rápidamente adquirido en la mayoría de los animales, por ejemplo, mamíferos. Los animales de prueba aprenden a temer un estímulo y/o ambiente neutral previamente debido a su asociación con una experiencia de aversión. (ver e.g., Fanselow, Anim, Learn. Behav. 18:264-270 (1990); Wehner et al., Nature Genet. 17:331-334, (1997); Caldarone et al., Nature Genet. 17:335-337 (1997)).

El condicionamiento de temor contextual es especialmente útil para determinar la función cognitiva o disfunción, e.g., como resultado de enfermedad o trastorno, tal como una enfermedad o trastorno neurodegenerativo, una enfermedad o trastorno relacionado con Aβ, una enfermedad o trastorno amiloidogénico, la presencia de una función cognitiva que efectúa una alteración genética desfavorable (e.g., mutación genética, rompimiento de gen, o genotipo no

deseado), y/o la eficacia de un agente, e.g., un agente de conjugado Aβ, en la capacidad cognitiva. En consecuencia, el análisis CFC proporciona un método para probar y/o validar independientemente el efecto terapéutico de agentes para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno cognitivo, y en particular, una enfermedad o trastorno que afecta una o más regiones del cerebro, e.g., el hipocampo, subiculum, corteza cingulada, corteza prefrontal, corteza perirrinal, corteza sensorial y lóbulo temporal medio.

Típicamente, el análisis de CFC se lleva a cabo utilizando cámaras estándar para animal y el empleo de entrenamiento que comprende un choque suave (e.g., 0.35 mA choque en el pie) conjuntamente con una auditoría (e.g., un período de 85 db de ruido blanco), clave olfatoria (e.g., extracto de almendras y limón), de tacto (e.g., textura del piso de la jaula), y/o visual (ráfaga de luz). La respuesta a la experiencia de aversión (choque) es típicamente de congelamiento (ausencia de movimiento excepto por la respiración) pero también puede incluir parpadeo, o cambio en el reflejo de la membrana de nicitación, dependiendo del animal de prueba seleccionado. La respuesta de aversión se caracteriza comúnmente en el primer día de entrenamiento para determinar una línea base para temor incondicional, con resultados de aversión en los subsecuentes días de prueba, e.g., congelación en presencia del contexto y/o clave pero en

ausencia de la experiencia de aversión, caracterizados como temor condicionado de contexto y clave, respectivamente. Para confiabilidad mejorada, los animales de prueba se prueban típicamente por separado por técnicos independientes y se marcan al paso del tiempo. Los detalles experimentales adicionales pueden encontrarse en la técnica, por ejemplo, en Crawley, JN, What's Wrong with my Mouse; Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice, Wiley-Liss, NY (2000).

Los animales de prueba ejemplares (e.g., animales modelo) incluyen animales (e.g., roedores o primates no humanos) que exhiben síntomas prominentes o patología característica de un trastorno amiloidogénico tal como de Alzheimer. Los modelos animales pueden crearse criando selectivamente o pueden fabricarse genéticamente utilizando técnicas transgénicas muy conocidas en la técnica, de manera que una alteración genética objetivo (e.g., una mutación genética, rompimiento del gen) en un gen asociado con el trastorno de demencia, conduce a la expresión aberrante o función del gen objetivo. Por ejemplo, se encuentran disponibles diversas especies de ratón transgénico que sobreexpresan APP y desarrollan patología de placa amiloide y/o desarrollan déficits cognitivos característicos de la enfermedad de Alzheimer (ver, por ejemplo, Games et al., supra, Johnson-Wood et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA

94:1550 (1997); Masliah E. y Rockenstein E. (2000) J. Neural Transm. Suppl. 59:175-83).

Alternativamente, el modelo animal puede crearse utilizando compuestos químicos (e.g., neurotoxinas, anestésicos) o técnicas quirúrgicas (e.g., ablación esterotácticas, axotomización, transección, aspiración) que abladen o de otra manera interfiere con la función normal de una región cerebral anatómica (e.g., hipocampo, amígdalas, corteza perorinal, núcleo septal medio, coeruleus locus, cuerpos mamalarios) o neuronas específicas (e.g., neuronas serotonérgicas, colinérgicas, o dopaminérgicas) asociadas con síntomas característicos o patología del trastorno amiloidogénico. En ciertas modalidades preferidas, el modelo animal exhibe un prominente déficit cognitivo asociado con aprendizaje o memoria además de la patología neurodegenerativa asociada con un trastorno amiloidogénico. Más preferentemente, el déficit cognitivo empeora progresivamente con el aumento de la edad, de manera que el progreso de la enfermedad en el modelo animal se iguala al progreso de la enfermedad en un sujeto que sufre del trastorno amiloidogénico.

El acondicionamiento de temor contextual y otros análisis in vivo para probar la funcionalidad de los conjugados descritos en la presente pueden llevarse a cabo utilizando ratones tipo silvestre o ratones que tienen cierta

alteración genética que conduce a daño en la memoria o modelos de ratón de enfermedad neurodegenerativa, e.g., enfermedad de Alzheimer, incluyendo modelos de ratón que despliegan niveles elevados de Aβ soluble en el fluido cerebroespinal (CSF) o plasma. Por ejemplo, los modelos animales para la enfermedad de Alzheimer incluyen ratones transgénico que sobreexpresan la mutación "Swedish" de proteína precursora amiloide humana (hAPPswe; Tg2576) que muestran déficits de memoria dependientes de la edad y placas (Hsiao et al., (1996) Science 274:99-102). La funcionalidad in vivo de los conjugados descritos en la presente también puede probarse utilizando el ratón mutante PS-1, descrito en Duff et al., (1996) Nature 383, 710-713. Otros modelos transgénicos genéticamente alterados de enfermedad de Alzheimer se describen en Masliah E. y Rockenstein E. (2000) J. Neural Transm. Suppl. 59: 175-83.

En varios aspectos, los métodos de la invención comprenden la administración de un conjugado Aβ capaz de mejorar el conocimiento en un sujeto en donde el conjugado Aβ se ha identificado al utilizar un análisis adecuadamente predictivo de la eficacia inmunoterapéutica en el sujeto. En modalidades ejemplares, el análisis es un análisis de modelo animal basado, al menos en parte, en la comparación del conocimiento como se determina a partir del estudio de condicionamiento de temor contextual de una animal después de

la administración de un reactivo de prueba inmunológica al animal, en comparación con un control adecuado. El análisis CFC evalúa los cambios en cognición de un animal (típicamente un ratón o rata) al tratarse con un compuesto potencial terapéutico. En ciertas modalidades, el cambio en cognición evaluado es una mejora en el estado de daño a la memoria o reversión del déficit de memoria. En consecuencia, el análisis CFC proporciona un método directo para determinar el efecto terapéutico de agentes para prevenir o tratar enfermedad cognitiva, y en particular, una enfermedad o trastorno que afecta una o más regiones del cerebro, e.g., el hipocampo, subiculum, corteza cingulada, corteza prefrontal, corteza pririnal, corteza sensorial, y lóbulo temporal medio. Tales análisis CFC se tratan en la Solicitud de Patente copendiente de E.U. Serie No. 60/XXX,XXX titulada "Contextual Fear Conditioning for Predicting Immunotherapeutic Efficacy" (conteniendo la minuta del abogado No. ELN-058-1), presentada en Diciembre 15 de 2004, y la Solicitud de Patente Serie No. 60/XXX,XXX titulada "Contextual Fear Conditioning for Predicting Immunotherapeutic Efficacy" (conteniendo la minuta del abogado No. ELN-058-2), cuyos contenidos se incorporan en la presente por la referencia.

BIBLIOGRAFÍA

Bernatowicz, M.S., y Matsueda, G.R., (1986) Analytical Biochemistry 155:95-102.

Kniskern, P.J., y Marburg, S. (1994) Development and Clinical Uses of Haemophilus b Conjugate Vaccines: Conjugation: Design, Chemistry, and Analysis, Ellis R.W., y Granoff, D.M. Eds.; Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 37-70

Arrizon V., Biechler, R., Cummings, J., y Harbaugh, J. (1991) High-Perormance Liquid Chromatography of Péptide and Proteins: Separation, Analysis, and Conformation, Mant, C.T., and Hodges R.S., Eds., CRC Press; Boca Ratón, FL, 859-863.

Carlsson, J. et al., (1978) Biochem J. 173:723.

Means, G.E., Cangdon, W.I., y Bender, M.I. (1972) Biochemistry 11: 3564-3574.

Glenner & Wong (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 120:1131

Hardy (1984) Trends in Neurosciences 20: 1131.

Hardy (977) Trends in Neurosciences 20:154. .

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

Goebel et al., (1939) J. Exp. Med. 69:53.

Schneerson et al., (1980) J. Exp. Med. 152; 361-376

Chu et al., (1983) Infect. Immun. 40:245.

Schneerson et al., (1984) Infect. Immun. 45: 582-591.

Anderson et al., (1985), J. Pediatr. 107:346

Insel et al., (1986) J. Exp. Med. 158: 294

Patente de E.U. No. 4,673,574 Jun, 1987 Anderson

Patente de E.U. No. 4,902,506 Feb., 1990 Anderson

et al

Patente de E.U. No. 5,192m540 Mar., 1993 Kuo et al.

Patente de E.U. No. 5,306,492 Apr., 1994 Porro

Patente de E.U. No. 5,360,897 Nov., 1994 Anderson et al.

Patente de E.U. No. 5,785,973 Jul., 1998 Bixler et al.

Patente de E.U. No. 6,361,777 Mar, 2002 Hoogerhout

Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (C.S.H. P. Press, NY 2d ed., 1989)

Bernatowicz M.S. y Matsueda, G.R. (1986) Analytical Biochemistry 155, 95-102,

Kniskern, P.J., y Marbug, S. (1994) Development and Clinical Uses of Haemophilus b Conjugate Vaccines: Conjugation: Design, Chemistry, e Analysis Ellis, R.W. y Granoff, D.M., Eds; Marcel Dekker, Inc: Nre York, NY 37-70

Arrizon, V. Biehler, R., Cummings J., y Harbaugh, J. (1991) High Performance Liquid Chomatography of Peptide and Proteins: Separation, Analysis, and Conformation Mant, C.T. y Hodges, R.S. Eds: CRC Press: Boca Ratón, FL, 859-863.

287.

REIVINDICACIONES:

1. Un método para conjugar un péptido inmunógeno que comprende el péptido Aβ o fragmentos de Aβ o análogos de este por vía de un grupo reactivo de un residuo de aminoácido del péptido inmunógeno para un vehículo de proteína/polipéptido que tiene uno o más grupos funcionales, el método comprende las etapas de:

   (a) Derivar uno o más de los grupos funcionales del vehículo de proteína/polipéptido u opcionalmente a un ligador de polipéptido adherido al vehículo de proteína/polipéptido para generar un vehículo derivado que reactiva sitios;

   (b) Hacer reaccionar el vehículo de proteína/polipéptido derivado de la etapa (a) con un grupo reactivo de un aminoácido del péptido inmunógeno que comprende el péptido Aβ o fragmentos de Aβ o análogos de estos bajo condiciones de reacción tales que el péptido inmunógeno de conjuga al vehículo de proteína/polipéptido derivado por vía de al menos uno de lo sitios reactivos, formando por lo tanto un conjugado;

   (c) Hacer reaccionar adicionalmente el conjugado con un reactivo de taponamiento para inactivar sin combinación, sitios reactivos que no han reaccionado en el vehículo de proteína (polipéptido derivado, por lo cual el conjugado elicita un inmune deseado contra el péptido Aβ.

2. El método de la reivindicación 1, en donde el vehículo se selecciona del grupo que consiste de albúmina de suero humano, hemocianina de lapa de ojo de cerradura (KLH), moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina,

ovalbumina, hemaglutinina influenza, polipéptido PADRE, proteína circumsporozito malaria (CS), antígeno de superficie de hepatitis B (HBSAg 19-28), Proteína de Choque de térmico (HSP) 65, Mycobacterium tuberculosis, toxina del cólera, mutantes de toxina de cólera con toxicidad reducida, toxina de difteria, proteína CRM197 que es reactiva cruzada con toxina difteria, peptidasa Streptococcal C5a recombinante, Streptococcus Pyogenes ORF1224, Streptococcus Pyogenes ORF2452, Streptococcus pneumoniae neumolisina, mutantes de neumolisina con toxicidad reducida, Chlamydia pneumoniae ORFT367, Chlamydia pneumoniae ORF T858, toxoide de tétano, HIV gp 120 T1, componentes de reconocimiento de moléculas de matriz adhesiva de superficie microbial (MSCRAMMS), factores de crecimiento, hormonas, citoquinas y quimioquinas.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el vehículo contiene un epítopo de célula T.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 3 donde el vehículo es un toxoide bacterial.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el vehículo es hemaglutinina influenza.

6. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el vehículo es un polipéptido PADRE.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el vehículo es proteína malaria circumsporozito (CS).

8. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el vehículo es antígeno de superficie de Hepatitis B (HBSAg 19-28).

9. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el vehículo es una proteína de choque de térmico 65 (HSP 65).

10. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el vehículo es polipéptido de Mycobacterium tuberculosis (BCG).

11. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el vehículo es toxoide de tétano.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el toxoide bacterial es CRM197.

13. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el vehículo es una peptidasa Streptococcal C5a recombinante.

14. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el vehículo es Streptococcus Pyogenes ORF 1224.

15. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el vehículo es Streptococcus Pyogenes ORF 1664.

16. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el vehículo es Streptococcus Pyogenes ORF 2452.

17. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el vehículo es Chlamydia pneumoniae ORS T367.

18. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el vehículo Chlamydia pneumoniae ORF T858.

19. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el vehículo es un factor de crecimiento u hormona, que estimula o mejora la respuesta inmune.

20. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el factor de crecimiento u hormona se selecciona del grupo que consiste de IL-1, IL-2, γ-interferón, IL-10, GM-CSF-MIP-1α, MIP-1β, y RANTES.

21. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el péptido inmunógeno es un fragmento Aβ.

22. El método de acuerdo con la reivindicación 21, en donde el fragmento Aβ es de la mitad N-terminal de Aβ.

23. El método de acuerdo con la reivindicación 22, en donde el fragmento Aβ se selecciona del grupo que consiste de Aβ 1-3,1-4,1-5,1-6,1-7,1-9,1-10,1-11,1-12,1-16,1-36 y 3-7.

24 El método de acuerdo con la reivindicación 23, en donde el fragmento de Aβ se selecciona del grupo que consiste de Aβ 1-5,1-7,1-9, y 1-12.

25. El método de acuerdo con la reivindicación 21, en donde el fragmento de Aβ es de la mitad C-terminal de Aβ.

291

26. El método de acuerdo con la reivindicación 25, en donde el fragmento de Aβ se selecciona del grupo que consiste de Aβ33-42,35-40 y 35-42.

27. El método de acuerdo con la reivindicación 21, en donde el fragmento de Aβ es de la porción interna de Aβ.

28. El método de acuerdo con la reivindicación 27, en donde el fragmento de Aβ se selecciona del grupo que consiste de Aβ 13-28,15-24,16-22,16-23,17-23,17-24,18-24,18-25,17-28 y 25-35.

29. El método de acuerdo con la reivindicación 21, en donde el fragmento de Aβ se selecciona del grupo que consiste de Aβ1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-11, 1-12, 1-16, 1-28, 3-6, 3-7, 13-28, 15-24, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 25-35, 33-42, 35-40 y 35-42.

30. El método de acuerdo con la reivindicación 21, en donde el péptido inmunógeno comprende adicionalmente al menos una copia adicional del fragmento Aβ.

31. El método de acuerdo con la reivindicación 22, en donde el péptido inmunógeno comprende adicionalmente al menos una copia adicional del fragmento N-terminal de Aβ.

32. El método de acuerdo con la reivindicación 31, en donde el péptido inmunógeno comprende desde el N-terminal al C-terminal, una pluralidad de copias adicionales del fragmento N-terminal Aβ.

33. El método de acuerdo con la reivindicación 32, en donde el péptido inmunógeno es (Aβ1-7)3.

34. El método de acuerdo con la reivindicación 32, en donde el péptido inmunógeno es (Aβ1-7)5.

35. El método de acuerdo con la reivindicación 21, en donde el péptido inmunógeno comprende adicionalmente al menos una copia adicional de un fragmento Aβ diferente.

36. El método de acuerdo con la reivindicación 30, en donde el péptido inmunógeno Aβ es un fragmento de Aβ seleccionado del grupo que consiste de Aβ 7-11, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40 y 35-42.

37. El método de acuerdo con la reivindicación 21,22, 29 o 30, en donde el péptido inmunógeno se enlaza en su C-terminal al N-terminal de una molécula de vehículo para formar un péptido heterólogo.

38. El método de acuerdo con la reivindicación 21,22, 29 o 30, en donde el péptido inmunógeno se enlaza a su N-terminal al C-terminal de una molécula de vehículo para formar un péptido heterólogo.

39. El método de acuerdo con la reivindicación 21,22, 29 o 30, en donde el péptido inmunógeno se enlaza a su N-terminal a C-terminal, una primer molécula de vehículo ligada a su C-terminal al N-terminal del fragmento Aβ ligado a su C-terminal al N-terminal de una segunda molécula de vehículo para formar péptido heterólogo.

40 El método de la reivindicación 37, que comprende adicionalmente al menos una copia adicional de la molécula de vehículo.

293.

41 El método de la reivindicación 37, que comprende adicionalmente al menos una copia adicional de la molécula de vehículo.

42 El método de la reivindicación 37, que comprende adicionalmente al menos una copia adicional de la molécula de vehículo diferente.

43 El método de la reivindicación 38, que comprende adicionalmente al menos una copia adicional de la molécula de vehículo.

44 El método de la reivindicación 38, que comprende adicionalmente al menos una copia adicional de la molécula de vehículo diferente.

45 El método de la reivindicación 39, en donde el primer vehículo y el segundo vehículo son la misma molécula de vehículo.

46. El método de la reivindicación 39, en donde el primer vehículo y el segundo vehículo son moléculas de vehículos diferentes.

47. El método de la reivindicación 37, en donde la molécula de vehículo se selecciona del grupo que consiste de un epítopo de célula T, un epítopo de célula B y combinaciones de estos.

48. El método de la reivindicación 38, en donde la molécula de vehículo se selecciona del grupo que consiste de un epítopo de célula T, un epítopo de célula B y combinaciones de estos.

49. El método de la reivindicación 38, en donde la molécula de vehículo se selecciona del grupo que consiste de un epítopo de célula T, un epítopo de célula B y combinaciones de estos.

50. El método de acuerdo con la reivindicación 39, en donde la molécula de vehículo se selecciona del grupo que consiste en un epítopo de célula T, un epítopo de célula B y el método de estos.

51 El método de acuerdo con la reivindicación 21, en donde el péptido inmunógeno esta comprendido adicionalmente de una o más moléculas del fragmento Aβ y se ligan juntos en una configuración de péptido antigénico múltiple (MAP).

52. El método de acuerdo con la reivindicación 51, en donde uno o más de los fragmentos Aβ se seleccionan del grupo que consiste de Aβ 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-11, 1-12, 1-16, 1-28, 3-6, 3-7, 13-28, 15-24, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 25-35, 33-42, 35-40 y 35-42

53. El método de acuerdo con la reivindicación 51, en donde el péptido inmunógeno es Aβ1-7 y la configuración MAP es una configuración MAP4.

54. El método de acuerdo con la reivindicación 51, en donde el péptido inmunógeno es (Aβ1-7) 3 y la configuración MAP es una configuración MAP4.

55. El método de acuerdo la reivindicación 51, en donde el péptido inmunógeno es (Aβ-7) 5 y la configuración MAP es una configuración MAP4

295.

56. El método de acuerdo con al reivindicación 1, en donde el grupo funcional de una o más moléculas de aminoácidos del vehículo de proteína/polipéptido o del ligador opcionalmente adherido se deriva utilizando un reactivo de reticulación

57. El método de la reivindicación 56, en donde el agente de derivación es un reactivo de reticulación de longitud 0

58. El método de la reivindicación 56, en donde el reactivo de derivación es un agente de reticulación homobifuncional.

59. El método de la reivindicación 56, en donde el reactivo de derivación es un reactivo de reticulación heterobifuncional.

60. El método de la reivindicación 56, en donde el vehículo de proteína/polipéptido se hace reaccionar con un reactivo de haloacetilación.

61. El método de acuerdo con la reivindicación 59, en donde el reactivo heterobifuncional es un reactivo que reacciona con un grupo funcional ε-amina o primaria de uno o más residuos de aminoácido del vehículo de proteína/polipéptido y un grupo tiol pendiente de uno o más residuos de aminoácidos de péptido inmunógeno.

62. El método de la reivindicación 61, en donde el reactivo heterobifuncional es bromoacetato de N-succinimidilo, propinado de N-succinimidilo-3-(2-piridil-tio) (SPDP) y 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC).

63. El método de la reivindicación 62, en donde el grupo funcional ε-amino es lisina.

64. El método de acuerdo con la reivindicación 61, en donde el grupo tiol pendiente es un residuo cisteína del péptido inmunógeno.

65. El método de acuerdo con la reivindicación 64, en donde residuo cisteína se localiza en el terminal amino del péptido inmunógeno.

66. El método de acuerdo con la reivindicación 64, en donde el residuo cisteína se localiza en el terminal carboxi del péptido inmunógeno.

67. El método de acuerdo con la reivindicación 64, en donde el residuo cisteína se localiza internamente en el péptido inmunógeno.

68. El método de acuerdo con la reivindicación 64, en donde el grupo tiol pendiente se genera por un reactivo de tiolatación.

69. El método de acuerdo con la reivindicación 68, en donde el reactivo de tiolatación es lactona homocisteinotio N-acetilo.

70. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el reactivo de taponamiento que se utiliza para inactivar el reactivo sin combinación, los grupos funcionales en el vehículo de proteínas/polipéptidos activados se selecciona del grupo de reactivos que consiste en cisteamina, N-cisteamina, y etanolamina.

71. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el reactivo de taponamiento que se utiliza para inactivar el reactivo sin combinación, los

grupos funcionales en el vehículo de proteína/polipéptido activado se selecciona del grupo de reactivo que consiste de hidróxido de sodio, carbonato de sodio, bicarbonato de amonio y amonio.

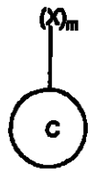
72. El método de la reivindicación 1, en donde el grupo reactivo del residuo aminoácido del péptido inmunógeno es un grupo sulfhidrilo.

73 El método de la reivindicación 1, en donde uno o más de los grupos funcionales están sobre un ligador, que se une opcionalmente al vehículo proteína/polipéptido.

74. El método de la reivindicación 72, en donde el ligador es un ligador de péptido.

75. El método de la reivindicación 73, en donde péptido y ligador es polilisina.

76. Un método para conjugar un péptido inmunógeno que comprende el péptido Aβ o los fragmentos de Aβ o análogos de estos para un vehículo de proteínas/polipéptidos que tiene la estructura.



En donde,

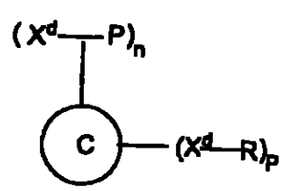
C es un vehículo de proteínas/polipéptidos y X es un grupo funcional derivable de un residuo aminoácido del vehículo de proteínas/polipéptidos o opcionalmente de un residuo de aminoácido de un ligador de péptido unido covalentemente al vehículo de

proteínas/polipéptido, y en donde M es un entero diferente de 0, pero menor que o igual a 85, el método comprende las etapas de:

(a) derivar uno o más de los grupos funcionales del vehículo de proteína/polipéptido o de la molécula de ligador opcionalmente unida para generar una molécula derivada con sitios reactivos;

(b) hacer reaccionar el vehículo de proteína/polipéptido derivado de la etapa (a) con un grupo reactivo de un residuo de aminoácidos del péptido inmunógeno que comprende el péptido Aβ o los fragmentos de Aβ o análogos de estos para formar péptidos de inmunógeno acoplados covalentemente de conjugado de vehículo de proteínas/polipéptido;

(c) hacer reaccionar adicionalmente dicho conjugado con un reactivo de taponamiento para inactivar los grupos funcionales reactivos sin combinación sobre el vehículo de proteína/polipéptido activado, tal como los grupos taponados no están en combinación para reaccionar con otras moléculas, preservando por lo tanto la funcionalidad del vehículo, de tal forma que este retiene su capacidad para elicitar las respuestas inmunes deseadas contra el péptido inmunógeno que pudiera de otra forma no ocurrir sin un vehículo, de tal forma que genera un péptido inmunógeno taponado-vehículo de proteína/polipéptido conjugado que tiene la fórmula:



En donde

C es el vehículo de proteína/polipéptido y Xd es un grupo funcional derivado de un residuo de aminoácido el vehículo de proteína/polipéptido u opcionalmente de un residuo de aminoácido de un péptido ligador unido covalentemente al vehículo de proteínas/covalentemente al vehículo de proteína/polipéptido en donde,

P es una molécula de péptido inmunógeno que comprende el péptido Aβ o fragmentos de Aβ o análogos de estos unidos covalentemente al grupo funcional derivado del residuo de aminoácido del vehículo de proteína u opcionalmente de un residuo de aminoácido de un ligador de péptido unido covalentemente a un vehículo de proteínas/polipéptido,

R es una molécula de taponamiento unida covalentemente al grupo funcional del residuo de aminoácido del vehículo de proteína/polipéptido u opcionalmente de un residuo de aminoácido de un péptido ligador unido covalentemente a un vehículo de proteína/polipéptido,

n es un entero diferente de 0, pero menor que o igual a 85, y

p es un entero mayor que 0, pero menor que 85.

77. El método de la reivindicación 76, en done el vehículo se selecciona de un grupo que consiste en albúmina de suero. en donde el vehículo se selecciona del grupo que consiste de albúmina de suero humano, lapa de ojo de cerradura (KLH), moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovalbumina, hemaglutinina influenza, polipéptido PADRE, proteína circumsporozito malaria (CS), antígeno de superficie de hepatitis B (HBSAg 19-28), Proteína de Choque de térmico (HSP) 65, Mycobacterium tuberculosis, toxina del cólera, mutantes de toxina de cólera con toxicidad reducida, toxina de difteria, proteína CRM197 que es

300.

reactiva cruzada con toxina difteria, peptidasa Streptococcal C5a recombinante, Streptococcus Pyogenes ORF1224, Streptococcus Pyogenes ORF2452, Streptococcus pneumoniae neumolisina, mutantes de neumolisina con toxicidad reducida, Chlamydia pneumoniae ORFT367, Chlamydia pneumoniae ORF T858, toxoide de tétano, HIV gp 120 T1, componentes de reconocimiento de moléculas de matriz adhesiva de superficie microbial (MSCRAMMS), factores de crecimiento, hormonas, citoquinas y quimioquinas.

78. El método de acuerdo con la reivindicación 77, en donde el vehículo contiene un epítopo de célula T

79. El método de acuerdo con la reivindicación 78, en donde el vehículo es un toxoide bacterial.

80. El método de acuerdo con la reivindicación 79, en donde el vehículo es hemaglutinina influenza.

81. El método de acuerdo con la reivindicación 78, en donde el vehículo es polipéptido PADRE.

82. El método de acuerdo con la reivindicación 78, en donde el vehículo es proteína malaria circumsporozito (CS).

83. El método de acuerdo con la reivindicación 78, en donde el vehículo es antígeno de superficie de hepatitis B (HSBAg19-28).

84. El método de acuerdo con la reivindicación 78, en donde el vehículo es proteína de choque de térmico 65 (HSP 65).

85. El método de acuerdo con la reivindicación 78, en donde el vehículo es un polipéptido de Mycobacterium tuberculosis (BCG).

86 El método de acuerdo con la reivindicación 78, en donde el vehículo es toxoide de tétano.

87 El método de acuerdo con la reivindicación 78, en donde el toxoide bacterial es CRM 197.

88. El método de acuerdo con la reivindicación 78, en donde el vehículo es peptidasa Streptococal rC5a.

89 El método de acuerdo con la reivindicación 78, en donde el vehículo es Streptococcus pyogenes ORF1224.

90. El método de acuerdo con la reivindicación 78, en donde el vehículo es Streptococcus Pyogenes ORF1664.

91. El método de acuerdo con la reivindicación 78, en donde el vehículo es Streptococcus Pyogenes ORF2452.

92. El método de acuerdo con la reivindicación 78, en donde el vehículo es Chlamydia pneumoniae ORF T367.

93. El método de acuerdo con la reivindicación 78, en donde el vehículo es Chlamydia pneumoniae ORF T858.

94 El método de acuerdo con la reivindicación 76, en donde el vehículo es una hormona o factor de crecimiento, que estimula o mejora la respuesta inmune.

95 El método de acuerdo con la reivindicación 94, en donde la hormona o factor de crecimiento se selecciona del grupo que consiste de IL-1, IL-2, γ-interferón, IL-10, GM-CSF, MIP-1α, MIP-1β y RANTES.

96. El método de acuerdo con la reivindicación 76, en donde el péptido inmunógeno es un fragmento Aβ.

97. El método de acuerdo con la reivindicación 96, en donde el fragmento Aβ es la mitad N-terminal de Aβ.

98. El método de acuerdo con la reivindicación 97, en donde el fragmento Aβ se selecciona del grupo que consiste de Aβ 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-9, 1-10, 1-11, 1-12, 1-16, 3-6 y 3-7.

99. El método de acuerdo con la reivindicación 98, en donde el fragmento Aβ se selecciona del grupo que consiste de Aβ 1-5, 1-7, 1-9 y 1-12.

100. El método de acuerdo con la reivindicación 96, en donde el fragmento Aβ es de la mitad C-terminal de Aβ.

101. El método de acuerdo con la reivindicación 100, en donde el fragmento Aβ es del grupo que consiste de Aβ 33-42, 35-40 y 35-42.

102. El método de acuerdo con la reivindicación 96, en donde el fragmento Aβ es la porción interna de AB.

103. El método de acuerdo con la reivindicación 102, en donde el fragmento Aβ se selecciona del grupo que consiste de Aβ 13-28, 15-24, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, y 25-35.

104. El método de acuerdo con la reivindicación 96, en donde el fragmento Aβ se selecciona del grupo que consiste de Aβ1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-11, 1-12, 1-16,1-28- 3-6, 3-7, 13-28, 15-24, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 25-35, 33-42, 35-40, y 35-42.

105. El método de acuerdo con la reivindicación 96, en donde el péptido inmunógeno comprende adicionalmente al menos una copia adicional del fragmento Aβ.

106. El método de acuerdo con la reivindicación 97, en donde el péptido inmunógeno comprende adicionalmente al menos una copia adicional del fragmento N-terminal de Aβ.

107. El método de acuerdo con la reivindicación 106, en donde el péptido inmunógeno comprende desde el N-terminal al C-terminal, una pluralidad de copias adicionales del fragmento N-terminal de Aβ.

108. El método de acuerdo con la reivindicación 107, en donde el péptido inmunógeno es (Aβ1-7)3.

109. El método de acuerdo con la reivindicación 107, en donde el péptido inmunógeno es (Aβ1-7)5.

110. El método de acuerdo con la reivindicación 96, en donde el péptido inmunógeno comprende adicionalmente al menos una copia adicional de un fragmento Aβ diferente.

111. El método de acuerdo con la reivindicación 105, en donde el péptido inmunógeno Aβ es un fragmento de Aβ seleccionado del grupo que consiste de Aβ 7-11, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40 y 35-42.

112. El método de acuerdo con la reivindicación 96, 97,104 o 105, donde el péptido inmunógeno se enlaza a su C-terminal al N-terminal de una molécula de vehículo para formar un péptido heterólogo.

113. El método de acuerdo con la reivindicación 96, 97, 104 o 105, en donde el péptido inmunógeno se enlaza a su N-terminal al C-terminal de una molécula de vehículo para formar un péptido heterólogo.

114. El método de acuerdo con la reivindicación 96, 97, 104 o 105, en donde el péptido inmunógeno comprende desde N-terminal al C-terminal, una primer molécula de vehículo ligada a su C-terminal al N-terminal del fragmento Aβ ligado a su C-terminal al N-terminal de una segunda molécula de vehículo para formar un péptido heterólogo.

115 El método de la reivindicación 112, que comprende adicionalmente al menos una copia adicional de una molécula de vehículo.

116. El método de la reivindicación 112, que comprende adicionalmente al menos una copia adicional de la molécula de vehículo.

117. El método de la reivindicación 112, que comprende adicionalmente al menos una copia adicional de una molécula de vehículo diferente.

118. El método de la reivindicación 113, que comprende adicionalmente al menos una copia adicional de una molécula de vehículo.

119. El método de la reivindicación 113, que comprende adicionalmente al menos una copia adicional de una molécula de vehículo diferente.

120. El método de la reivindicación 114, en donde el primer vehículo y segundo vehículo son la misma molécula de vehículo.

121. El método de la reivindicación 114, en donde el primer vehículo y segundo vehículo son moléculas de vehículos diferentes.

122. El método de la reivindicación 112, en donde la molécula de vehículo se selecciona del grupo que consiste de un epítopo de célula T, un epítopo de célula B y combinaciones de estos.

123. El método de la reivindicación 113, en donde la molécula de vehículo se selecciona del grupo que consiste de un epítopo de célula T, célula B y combinaciones de estos.

124. El método de la reivindicación 113, en donde la molécula de vehículo se selecciona del grupo que consiste de un epítopo de célula T, célula B y combinaciones de estos.

125. El método de la reivindicación 114, en donde la molécula de vehículo se selecciona del grupo que consiste de un epítopo de célula T, célula B y combinaciones de estos.

126. El método de acuerdo con la reivindicación 96, en donde el péptido inmunógeno comprende adicionalmente una o más moléculas del fragmento Aβ que se ligan juntos en una configuración de péptido antigénico múltiple (MAP).

127. El método de la reivindicación 126, en donde uno o más de los fragmentos Aβ se seleccionan del grupo que consiste de Aβ 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-11, 1-12, 1-16,1-28- 3-6, 3-7, 13-28, 15-24, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 25-35, 33-42, 35-115 y 35-42.

128. El método de acuerdo con la reivindicación 126, en donde el péptido inmunógeno es Aβ1-7 y la configuración MAP es una configuración MAP4.

129. El método de acuerdo con la reivindicación 126, en donde el péptido inmunógeno es (Aβ1-7)3 y la configuración MAP es una configuración MAP4.

130. El método de acuerdo con la reivindicación 126, en donde el péptido inmunógeno es (Aβ1-7)5 y la configuración MAP es una configuración MAP4.

131. El método de acuerdo con la reivindicación 76, en donde el grupo funcional de una o más moléculas de aminoácido del vehículo

proteína/polipéptido o del ligador de polipéptido adherido se deriva opcionalmente utilizando un reactivo de reticulación.

132. El método de la reivindicación 131, en donde el reactivo de derivación es una agente de reticulación de longitud cero.

133. El método de la reivindicación 131, en donde el reactivo de derivación es una reactivo de reticulación homobifuncional.

134. El método de la reivindicación 131, en donde el reactivo de derivación es una reactivo de reticulación heterobifuncional.

135. El método de la reivindicación 131, en donde el vehículo proteína/polipéptido se hace reaccionar con un agente de haloacetilación.

136. El método de la reivindicación 135, en donde el reactivo heterobifuncional es un reactivo que reacciona con un grupo primario o un grupo ϵ–amina funcional de uno o más residuos de aminoácido del vehículo proteína/polipéptido y un grupo tiol pendiente de uno o más de aminoácido del péptido inmunógeno.

137. El método de la reivindicación 136, en donde el reactivo heterobifuncional es bromoacetato de M-N-succinimidilo.

138. El método de la reivindicación 136, en donde el grupo prima primario o un grupo ϵ–amino funcional es lisina.

139. El método de la reivindicación 138, en donde la derivación del grupo primario o grupo ϵ–amino funcional del residuo aminoácido lisina del vehículo proteína/polipéptido con bromoacetato de N-succinimidilo resulta la bromoacetilación de los residuos primarios o residuos ϵ–amina o residuos lisina en el vehículo proteína/polipéptido.

140. El método de la reivindicación 136, en donde el grupo tiol pendiente es un residuo cisteína del péptido inmunógeno.

141. El método de la reivindicación 140, en donde el residuo cisteína se localiza en el terminal amino del péptido inmunógeno.

142. El método de la reivindicación 140, en donde el residuo cisteína se localiza en el terminal carboxi del péptido inmunógeno.

143. El método de acuerdo con la reivindicación 140, en donde el residuo cisteína se localiza internamente en el péptido inmunógeno.

144. El método de acuerdo con la reivindicación 76, en donde el grupo tiol pendiente se genera por un reactivo de tiolatación.

145. El método de acuerdo con la reivindicación 144, en donde el reactivo de tiolatación es lactona homocisteinotio N-acetilo.

146. El método de acuerdo con la reivindicación 76, en donde el reactivo de taponamiento que se utiliza para inactivar el reactivo libre, los grupos funcionales del vehículo proteína/polipéptido activados se seleccionan del grupo de reactivo que consiste de cisteamina, N-acetilcisteamina, y etanolamina.

147. El método de acuerdo con la reivindicación 76, en donde el reactivo de taponamiento que se utiliza para inactivar el reactivo sin combinación los grupos funcionales en el vehículo de proteína/polipéptido activado se seleccionan del grupo de reactivo que consiste de hidróxido de sodio, carbonato de sodio, bicarbonato de amonio y amonio.

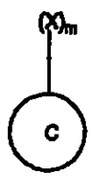
148. El método de la reivindicación 76, en donde el grupo reactivo del residuo aminoácido del péptido inmunógeno es un grupo sulfhidrilo sin combinación.

149. El método de la reivindicación 76, en donde uno o más de los grupos funcionales están sobre un ligador adherido opcionalmente al vehículo de proteína/polipéptido.

150 El método de la reivindicación 149, en donde el ligador es un péptido ligador.

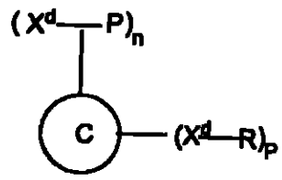
151. El método de la reivindicación 150, en donde el péptido ligador es polilisina.

152. Una composición que comprende un vehículo de péptido inmunógeno-proteína/polipéptido conjugado en donde el vehículo proteína/polipéptido tiene la fórmula:



en donde,

C es un vehículo de proteína/polipéptido y X es un grupo funcional derivable del residuo aminoácido en el vehículo proteína/polipéptido u opcionalmente de un residuo aminoácido de un péptido ligador unido covalentemente al vehículo proteína/polipéptido, y en donde m es un entero mayor que 0, pero menor que o igual a 85, y en donde el vehículo péptido inmunógeno-proteína/polipéptido conjugado tiene la fórmula:



en donde,

C es el vehículo proteína/polipéptido y Xd es un grupo funcional derivado de un residuo de aminoácido del vehículo proteína/polipéptido u opcionalmente de un residuo aminoácido de un péptido ligador unido covalentemente al vehículo proteína/polipéptido y, en donde, P es un péptido inmunógeno que comprende el péptido Aβ o fragmentos de Aβ o análogos de estos unidos covalentemente al grupo funcional derivado del residuo de aminoácido del vehículo de proteína u opcionalmente del un residuo de aminoácido de un péptido ligador unido covalentemente a un vehículo de proteína/polipéptido, R es una molécula de taponamiento unida covalentemente al grupo funcional derivado de un residuo de aminoácido del vehículo proteína/polipéptido u opcionalmente de un residuo aminoácido de un péptido ligador unido covalentemente a un vehículo proteína/polipéptido, preservando por lo tanto la funcionalidad del vehículo de tal forma que este retiene su capacidad para elicitar las respuestas inmunes deseadas contra el péptido inmunógeno que comprende el péptido Aβ o fragmentos de Aβ o análogos de estos que pudieran de otra forma no ocurrir sin un vehículo, n es un entero mayor

que 0, pero menor que o igual a 85, y p es un entero mayor que 0, pero menor que 85.

153. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 150, en donde el vehículo se selecciona del grupo que consiste de albúmina de suero, hemocianina de lapa de cerradura (KLH, moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovalbumina, hemaglutinina influenza, polipéptido PADRE, proteína circumsporozito de malaria (CS), antígeno de superficie de hepatitis B (HBSAg19-28), proteína de choque de comida (HSP) 65, Mycobacterium tuberculosis, toxina de cólera, mutantes de toxina de cólera con toxicidad reducida, toxina difteria, proteína CMR 197 que es reactiva cruzada con toxina difteria, peptidasa Streptococcal C5a recombinante, Streptococcus Pyogenes, ORF1224, Streptococcus Pyogenes ORF1664, Streptococcus Pyogenes ORF2452, Streptococcus pneumoniae neumolisina, mutantes de neumolisina con toxicidad reducida, Chlamydia pneumoniae ORFT367, Chlamydia pneumoniae ORFT858, toxoide de Tétano, HIV gp120 T1, componentes que reconocen las moléculas de matriz adhesiva de superficie microbial (MSCRAMMS), factores de crecimiento, hormonas, citoquinas y quimioquinas.

154. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 150, en donde el vehículo contiene un epítopo de célula T.

155. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 154, en donde el vehículo es un toxoide bacterial.

156. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 154, en donde el vehículo es hemaglutinina influenza.

157. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 154, en donde el vehículo es polipéptido PADRE.

158. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 154, en donde el vehículo es proteína circumsporozito de malaria (CS).

159. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 154, en donde el vehículo es antígeno de superficie de hepatitis B (HBSAg19-28).

160. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 154, en donde el vehículo es proteína 65 de choque al calor (HSP 65).

161. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 154, en donde el vehículo es un polipéptido de Mycobacterium tuberculosis (BCG).

162. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 154, en donde el vehículo es toxoide de tétano.

163. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 154, en donde el toxoide bacterial es CMR 197.

164. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 154, en donde el vehículo es peptidasa Streptococcal rC5a.

165. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 154, en donde el vehículo es Streptococcus Pyogenes ORF1224.

166. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 154, en donde el vehículo es Streptococcus Pyogenes ORF1664.

167. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 154, en donde el vehículo es Streptococcus Pyogenes ORF2452.

168. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 154, en donde el vehículo es Chlamydia pneumoniae ORF T367.

169. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 154, en donde el vehículo es Chlamydia pneumoniae ORF t858.

170. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 150, en donde el vehículo es una hormona o factor de crecimiento, que estimula o mejora la respuesta inmune.

171. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 170, en donde la hormona o factor de crecimiento se selecciona de un grupo que consiste de IL-1, IL-2, γ-interferón, IL-10, GM-CSF, MIP-1α, MIP-1β, y RANTES.

172. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 152, en donde el péptido inmunógeno es un fragmento Aβ.

173. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 172, en donde el fragmento Aβ es de la mitad N-terminal de Aβ.

174. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 173, en donde el fragmento Aβ se selecciona del grupo que consiste de Aβ1-3,1-4,1-5,1-6,1-7,1-8,1-9,1-10,1-11,1-12,1-16,3-6, y 3-7.

175. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 174, en donde el fragmento Aβ se selecciona del grupo que consiste de Aβ-5,1-7,1-9, y 1-12.

176. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 172, en donde el fragmento de Aβ es de la mitad C-terminal de Aβ.

177. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 176, en donde el fragmento Aβ es del grupo que consiste de Aβ33-42,35-40, y 35-42.

178. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 172, en donde en donde el fragmento Aβ es de la porción interna de Aβ.

179. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 178, en donde el fragmento Aβ se selecciona del grupo que consiste de Aβ13-28,15-24,16-22,16-23,17-23,17-24,18-24,18-25,17-28, y 25-35.

180. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 172, en donde el fragmento Aβ se selecciona del grupo que consiste de Aβ1-3,1-4,1-5,1-6,1-7,1-10,1-11,1-12,1-16,1-28,3-6,3-7,13-28,15-24,16-22,16-23,17-23,17-24,18-24,18-25,17-28,25-35,33-42,35-40, y 35-42.

181. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 172, en donde el péptido inmunógeno comprende adicionalmente al menos una copia adicional del fragmento Aβ.

182. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 173, en donde el péptido inmunógeno comprende adicionalmente al menos una copia adicional del fragmento N-terminal de Aβ.

183. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 182, en donde péptido inmunógeno comprende del N-terminal al C-terminal, una pluralidad de copias adicionales del fragmento N-terminal de Aβ.

184. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 183, en donde el péptido inmunógeno es (Aβ1-7)3.

185. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 183, en donde el péptido inmunógeno es (Aβ1-7)5.

186. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 172, en donde el péptido inmunógeno comprende adicionalmente al menos una copia adicional de un fragmento Aβ diferente.

187. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 181, en donde el péptido inmunógeno Aβ es un fragmento de Aβ seleccionado del grupo que consiste de Aβ 7-11,17-28,1-28,25-35,35-40 y 35-42.

188. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 172, 173, 180, o 181, en donde el péptido inmunógeno se enlaza a su C-terminal al N-terminal a una molécula de vehículo para formar un péptido heterólogo.

189. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 172, 173, 180, o 181, en donde el péptido inmunógeno se enlaza a su N-terminal al C-terminal de una molécula de vehículo para formar un péptido heterólogo.

190. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 172, 173, 180, o 181, en donde el péptido inmunógeno comprende desde N-terminal al C-terminal, una primer molécula de vehículo ligada a su C-terminal al N-terminal del fragmento Aβ ligado a su C-terminal al N-terminal a una segunda molécula de vehículo para formar un péptido heterólogo.

191. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 188, que comprende adicionalmente al menos una copia adicional de la molécula de vehículo.

192. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 188, que comprende adicionalmente al menos una copia adicional de la molécula de vehículo.

193. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 188, que comprende adicionalmente al menos una copia de una molécula de vehículo diferente.

194. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 189, que comprende adicionalmente al menos una copia adicional de la molécula de vehículo.

195. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 189, que comprende adicionalmente al menos una copia de una molécula de vehículo diferente.

196. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 190, en donde el primer vehículo y el segundo vehículo son la misma molécula de vehículo.

197. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 190 en donde el primer vehículo y el segundo vehículo son moléculas de vehículo diferentes.

198. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 188, en donde la molécula de vehículo se selecciona del grupo que consiste de un epítopo de célula T, un epítopo de célula B y combinaciones de estos.

199. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 189, en donde la molécula de vehículo se selecciona del grupo que consiste de un epítopo de célula T, un epítopo de célula B y combinaciones de estos.

200. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 189, en donde la molécula de vehículo se selecciona del grupo que consiste de un epítopo de célula T, un epítopo de célula B y combinaciones de estos.

201. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 190, en donde la molécula de vehículo se selecciona del grupo que consiste de un epítopo de célula T, un epítopo de célula B y combinaciones de estos.

202. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 172, en donde el péptido inmunógeno comprende adicionalmente uno o más moléculas del

fragmento Aβ que se ligan juntos en una configuración de péptido antihigiénico múltiple (MAP).

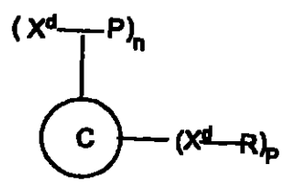
203. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 202, en donde uno o más de los fragmentos Aβ se seleccionan de los grupos que consisten de Aβ1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-11, 1-12, 1-16, 1-28, 3-6, 3-7, 13-28, 15-24, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 25-35, 33-42, 35-40, y 35-42.

204. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 202, en donde el péptido inmunógeno es Aβ1-7 y la configuración MAP es una configuración MAP4.

205. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 202, en donde el péptido inmunógeno es (Aβ1-7)3 y la configuración MAP es una configuración MAP4.

206. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 202, en donde el péptido inmunógeno es (Aβ1-7)5 y la configuración MAP es una configuración MAP4.

207. Un vehículo de péptido inmunógeno-proteína/polipéptido conjugado generado de acuerdo con el método de la reivindicación 75 y que tiene la fórmula:



En donde

C es el vehículo de proteína/polipéptido y Xd es un grupo funcional derivado de un residuo aminoácido del vehículo proteína/polipéptido u opcionalmente de un residuo aminoácido de un péptido ligador unido covalentemente al vehículo de proteínas/polipéptido, y, P es una molécula de péptido inmunógeno que comprende el péptido Aβ, los fragmentos Aβ o análogos de estos unidos covalentemente al grupo funcional derivado del residuo aminoácido del vehículo de proteína u opcionalmente de un residuo aminoácido de un péptido ligador unido covalentemente a un vehículo de proteínas/polipéptido, R es una molécula de taponamiento unida covalentemente al grupo funcional derivado un residuo aminoácido del vehículo proteína/polipéptido u opcionalmente de un residuo aminoácido de un péptido ligador unido covalentemente a un vehículo de proteínas/polipéptido, que preserva la funcionalidad del vehículo, de tal forma que este retiene su capacidad para elicitar la respuesta inmune deseada contra el péptido inmunógeno que podría de otra forma no ocurrir sin un vehículo, N es un entero mayor que 0, pero menor o igual a 85 y, P es un entero mayor que 0 pero menor que 85.

208. El conjugado de acuerdo can la reivindicación 207 en donde el vehículo se selecciona de un grupo que consiste de albúmina de suero humano, hemocianina de lapa de ojo de cerradura (KLH), moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovalbumina, hemaglutinina influenza, polipéptido PADRE, proteína circumsporozito malaria (CS), antígeno de superficie de hepatitis B (HBSAg19-28), proteína de choque de térmico (HSP)65, Mycobacterium tuberculosis, mutantes de toxina de cólera con toxicidad reducida, toxina de difteria, proteína CMR 197 que es reactiva

cruzada con toxina de difteria, peptidasa Streptococal C5a recombinante, Streptococcus Pyogenes ORF1224, Streptococcus Pyogenes ORF1664, Streptococcus Pyogenes ORF 2452, pneumolisina Streptococcus neumonía, mutantes de pneumolisina con toxicidad reducida, Chlamydia pneumoniae de ORF T367, Chlamydia pneumoniae de ORF T858, toxoide de tétano, HIV gp120 T1, componentes de reconocimiento de moléculas de matriz adhesiva de superficie microbial (MSCRAMMS), factores de crecimiento, hormonas, citoquinas y quimioquinas.

209. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 207, en donde el vehículo contiene un epítopo de célula T.

210. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 209, en donde el vehículo es un toxoide bacterial.

211. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 209, en donde el vehículo es hemaglutinina influenza.

212. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 209, en donde el vehículo es un polipéptido PADRE.

213. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 209, en donde el vehículo es proteína malaria circumsporozito (CS).

214. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 220, en donde el vehículo es antígeno de superficie de hepatitis B (HSBAg19-28).

215. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 209, en donde el vehículo es proteína de choque al calor 65 (HSP 65).

216. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 209, en donde el vehículo es un polipéptido de Mycobacterium tuberculosis (BCG).

217. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 209, en donde el vehículo es toxoide de tétano.

218. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 209, en donde el toxoide bacterial es CRM 197.

219. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 209, en donde el vehículo es peptidasa Streptococal rC5a.

220. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 209, en donde el vehículo es Streptococcus Pyogenes ORF1224.

221. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 209, en donde el vehículo es Streptococcus Pyogenes ORF1664.

222. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 209, en donde el vehículo es Streptococcus Pyogenes ORF2452.

223. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 209, en donde el vehículo es Chlamydia pneumoniae ORF T367.

224. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 209, en donde el vehículo es Chlamydia pneumoniae ORF T858.

225. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 209, en donde el vehículo es un factor de crecimiento u hormona, que estimula o mejora la respuesta inmune.

226. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 225, en donde el factor de crecimiento u hormona se selecciona del grupo que consiste de IL- 1, IL -2, γ-interferón, IL -10, GM-CSF, MIP- 1α, MIP- 1β, y RANTES.

227. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 207, en donde el péptido inmunógeno es un fragmento Aβ.

228. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 207, en donde fragmento Aβ es de la mitad N-terminal de Aβ.

229. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 228, en donde el fragmento Aβ se selecciona del grupo que consiste de Aβ1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-9, 1-10, 1-11, 1-12, 1-16, 3-6 y 3-7.

230. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 229, en donde el fragmento Aβ se selecciona del grupo que consiste de Aβ 1-5, 1-7, 1-9 y 1-12.

231. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 227, en donde el fragmento Aβ es de la mitad C-terminal de Aβ.

232. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 231, en donde el fragmento Aβ es del grupo que consiste de Aβ 33-42, 35-40 y 35-42.

233. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 227, donde el fragmento Aβ es de la porción interna Aβ.

234. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 233, en donde el fragmento Aβ se selecciona del grupo que consiste de Aβ 13-28, 15-24, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28 y 25-35.

235. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 227, en donde el fragmento Aβ se selecciona del grupo que consiste de Aβ 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-11, 1-12, 1-16, 1-28 3-6,3-7,13-28,15-24,16-22,16-223,17-23,17-24,18-24,18-25,17-28,25-35,33-42,35-40, y 35-42.

236. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 227, en donde el péptido inmunógeno comprende adicionalmente al menos una copia adicional de fragmento Aβ.

237. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 228, en donde el péptido inmunógeno comprende adicionalmente al menos una copia adicional del fragmento N-terminal de Aβ.

238. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 2237, en donde el péptido inmunógeno comprende desde el N-terminal al C-terminal, una pluralidad de copias adicionales del fragmento N-terminal de Aβ.

239. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 238, en donde el péptido inmunógeno es (Aβ1-7)3.

240. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 238, en donde el péptido inmunógeno es (Aβ1-7)5.

241. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 227, en donde el péptido inmunógeno comprende adicionalmente al menos una copia adicional de un fragmento Aβ diferente.

242. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 236, en donde el péptido inmunógeno Aβ es un fragmento de Aβ seleccionado del grupo que consiste de Aβ7-11,17-28,1-28,25-35,35-40 y 35-42.

243. El conjugado de acuerdo con las reivindicaciones 227, 228, 235, o 236, en donde el péptido inmunógeno se enlaza a su C-terminal al N-terminal de una molécula de vehículo para formar un péptido heterólogo.

244. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 227, 228, 235, o 236, en donde el péptido inmunógeno se enlaza a su N-terminal al C-terminal de una molécula de vehículo para formar un péptido heterólogo.

245. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 227, 228, 235, o 236, en donde el péptido inmunógeno comprende desde el N-terminal al C-terminal una primer molécula de vehículo ligada a su C-terminal al N-terminal del fragmento Aβ ligado a su C-terminal al N-terminal de una segunda molécula de vehículo para formar un péptido heterólogo.

246. El conjugado de la reivindicación 243, que comprende adicionalmente al menos una copia adicional de la molécula de vehículo.

247. El conjugado de la reivindicación 243, que comprende adicionalmente al menos una copia adicional de la molécula de vehículo.

248. El conjugado de la reivindicación 243, que comprende adicionalmente al menos una copia de una molécula de vehículo diferente.

249. El conjugado de la reivindicación 244, que comprende adicionalmente al menos una copia adicional de la molécula de vehículo.

250. El conjugado de la reivindicación 244, que comprende adicionalmente al menos una copia de una molécula de vehículo diferente.

251. El conjugado de la reivindicación 245, en donde el primer vehículo y el segundo vehículo son la misma molécula de vehículo.

252. El conjugado de la reivindicación 245, en donde el primer vehículo y el segundo vehículo son moléculas de vehículos diferentes.

253. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 243, en donde la molécula de vehículo se selecciona del grupo que consiste de un epítopo de célula T, un epítopo de célula B y combinaciones de estos.

254. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 244, en donde la molécula de vehículo se selecciona del grupo que consiste de un epítopo de célula T, un epítopo de célula B y combinaciones de estos.

255. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 244, en donde la molécula de vehículo se selecciona del grupo que consiste de un epítopo de célula T un epítopo de célula B y combinaciones de estos.

256. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 245, en donde la molécula de vehículo se selecciona del grupo que consiste de un epítopo de célula T, un epítopo de célula B y combinaciones de estos.

257. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 227, en donde el péptido inmunógeno comprende adicionalmente uno o más moléculas del fragmento Aβ que se unen juntas en una configuración de péptido antigénico múltiple (MAP).

258. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 257, en donde uno o más fragmentos Aβ se seleccionan del grupo que consiste de Aβ1-3.1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-11, 1-12, 1-16, 1-28, 3-6, 3-7, 13-28, 15-24, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 25-35, 33-42, 35-40, y 35-42.

259. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 257, en donde el péptido inmunógeno es Aβ1-7, y la configuración de MAP es una configuración MAP4.

260. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 257, en donde el péptido inmunógeno es (Aβ1-7)3 y la configuración MAP es una configuración MAP4.

261. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 257, en donde el péptido inmunógeno es (Aβ1-7)5 y la configuración MPA es una configuración MPA4.

262. Una composición inmunogénica, que comprende un conjugado de un péptido inmunógeno con un vehículo de proteína/polipéptido generado

por el método de la reivindicación 79, junto uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, diluyentes, y/o adyuvantes.

263. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 262, en donde el vehículo se selecciona del grupo que consiste de albúmina de suero humano, hemocianina de lapa de ojo de cerradura (KLH), moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovalbumina, hemaglutinina influenza, polipéptido PADRE, proteína circumsporozito de malaria (CS), antígeno de superficie de hepatitis B (HBSAg19-28), proteína de choque de térmico (HSP) 65, Mycobacterium tuberculosis, toxina del cólera, mutantes de toxina de cólera con toxicidad reducida, toxina de difteria, proteína CRM197 que es reactiva cruzada con toxina difteria, peptidasa Streptococcal C5a, Streptococcus Pyogenes ORF1224, Streptococcus Pyogenes ORF1664, Streptococcus Pyogenes ORF2452, pneumolisina de Streptococcus pneumoniae, mutantes de pneumolisina con toxicidad reducida, Chlamydia pneumoniae ORF T367, Chlamydia pneumoniae PRF T858, toxoide de Tétano, HIV gp120 T1, componentes de reconocimiento de moléculas de matriz adhesiva de superficie microbial (MSCRAMMS), factores de crecimiento, hormonas, citoquinas y quimioquinas.

264. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 262, en donde el vehículo contiene un epítopo de célula T.

265. El conjugado inmunogénico de acuerdo con la reivindicación 264 en donde el vehículo es un toxoide bacterial.

266. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 264, en donde el vehículo es hemaglutinina influenza.

267. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 264, en donde el vehículo es polipéptido PADRE.

268. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 264, en donde el vehículo es proteína circumsporozito de malaria (CS).

269. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 264, en donde el vehículo es antígeno de superficie de hepatitis B (HSBAg19-28).

270. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 264, en donde el vehículo es una proteína de choque de térmico 65 (HSP 65).

271. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 264, en donde el vehículo es un polipéptido de Mycobacterium Tuberculosis (BCG).

272. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 264, en donde el toxoide bacterial es toxoide de Tétanos.

273. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 264, en donde el toxoide bacterial es CRM 197.

274. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 264, en donde el vehículo es peptidasa Streptococcal rC5a.

275. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 264, en donde el vehículo es Streptococcus Pyogenes ORF1224.

276. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 264, en donde el vehículo es Streptococcus Pyogenes ORF1664.

277. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 264, en donde el vehículo es Streptococcus Pyogenes ORF2452.

278. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 264, en donde el vehículo es Chlamydia pneumoniae ORF T367.

279. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 264, en donde el vehículo es Chlamydia pneumoniae ORF T858.

280. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 262, en donde el vehículo es un factor de crecimiento o una hormona, que estimula o mejora la respuesta inmune.

281. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 280, en donde el factor de crecimiento u hormona se selecciona de un grupo que consiste Il-1, IL-2, γ-interferón, IL-10, GM-CSF, MIP-1α, MIP-1β, y RANTES.

282. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el péptido inmunógeno es un fragmento Aβ.

283. El método de acuerdo con la reivindicación 282, en donde el fragmento Aβ es de la mitad N-terminal de Aβ.

284. El método de acuerdo con la reivindicación 283 en donde el fragmento Aβ se selecciona a partir del grupo que consiste de Aβ1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-9, 1-10, 1-11, 1-12, 1-16, 3-6, y 3-7.

285. El método de acuerdo con la reivindicación 284, en donde el fragmento Aβ se selecciona del grupo que consiste de Aβ1-5,1-7,1-9, y 1-12.

286. El método de acuerdo con la reivindicación 282, en donde el fragmento Aβ es de la mitad C-terminal de Aβ.

287. El método de acuerdo con la reivindicación 286, en donde el fragmento Aβ es del grupo que consiste de Aβ33-42, 35-40, y 35-42.

288. El método de acuerdo con la reivindicación 282, en donde el fragmento Aβ es de la porción interna de Aβ.

289. El método de acuerdo con la reivindicación 288, en donde el fragmento Aβ se selecciona del grupo que consiste de Aβ13-28, 15-24, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, y 25-35.

290. El método de acuerdo con la reivindicación 282, en donde el fragmento Aβ se selecciona del grupo que consiste de Aβ 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-11, 1-12, 1-16, 1-28- 3-6, 3-7, 13-28, 15-24, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 25-35, 33-42, 35-40, y 35-42.

291. El método de acuerdo con la reivindicación 282, en donde el péptido inmunógeno comprende adicionalmente al menos una copia adicional del fragmento Aβ.

292. El método de acuerdo con la reivindicación 283, en donde el péptido inmunógeno comprende adicionalmente al menos una copia adicional del fragmento N-terminal Aβ.

293. El método de acuerdo con la reivindicación 292, en donde el péptido inmunógeno comprende desde el N-terminal al C-terminal, una pluralidad de copias adicionales del fragmento N-terminal Aβ.

294. El método de acuerdo con la reivindicación 293, en donde el péptido inmunógeno es (Aβ1-7)3.

295. El método de acuerdo con la reivindicación 293, en donde el péptido inmunógeno es (Aβ1-7)5.

296. El método de acuerdo con la reivindicación 282, en donde el péptido inmunógeno comprende adicionalmente al menos una copia adicional de un fragmento Aβ diferente.

297. El método de acuerdo con la reivindicación 291, en donde el péptido inmunógeno Aβ es un fragmento de Aβ seleccionado del grupo que consiste de Aβ 7-11, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40 y 35-42.

298. El método de acuerdo con la reivindicación 282, 283, 290 o 291 en donde el péptido inmunógeno se enlaza a su C-terminal al N-terminal de una molécula de vehículo para formar un péptido heterólogo.

299. El método de acuerdo con la reivindicación 282, 283, 290 o 291 en donde el péptido inmunógeno se enlaza a su N-terminal al C-terminal de una molécula de vehículo para formar un péptido heterólogo.

300. El método de acuerdo con la reivindicación 282, 283, 290 o 291 en donde el péptido inmunógeno comprende desde el N-terminal al C-terminal, una primer molécula de vehículo ligada a su C-terminal para el N-terminal del fragmento Aβ ligado en su C-terminal al N-terminal de una segunda molécula de vehículo para formar un péptido heterólogo.

301. El método de acuerdo con la reivindicación 298, que comprende adicionalmente al menos una copia adicional de una molécula de vehículo.

302. El método de acuerdo con la reivindicación 298, que comprende adicionalmente al menos una copia adicional de una molécula de vehículo.

303. El método de acuerdo con la reivindicación 298, que comprende adicionalmente al menos una copia adicional de una molécula de vehículo diferente.

304. El método de la reivindicación 299, que comprende adicionalmente al menos una copia adicional de una molécula de vehículo.

305. El método de la reivindicación 299, que comprende adicionalmente al menos una copia adicional de una molécula de vehículo diferente.

306. El método de la reivindicación 300, en donde el primer vehículo y el segundo vehículo son la misma molécula de vehículo.

307. El método de la reivindicación 300, en donde el primer vehículo y el segundo vehículo son moléculas de vehículos diferentes.

308. El método de acuerdo con la reivindicación 298, en donde la molécula de vehículo se selecciona del grupo que consiste de un epítopo de célula T, un epítopo de célula B y combinaciones de estos.

309. El método de acuerdo con la reivindicación 299, en donde la molécula de vehículo se selecciona del grupo que consiste de un epítopo de célula T, un epítopo de célula B y combinaciones de estos.

310. El método de acuerdo con la reivindicación 298, en donde la molécula de vehículo se selecciona del grupo que consiste de un epítopo de célula T, un epítopo de célula B y combinaciones de estos.

311. El método de acuerdo con la reivindicación 300, en donde la molécula de vehículo se selecciona del grupo que consiste de un epítopo de célula T, un epítopo de célula B y combinaciones de estos.

312. El método de acuerdo con la reivindicación 282, en donde el péptido inmunógeno comprende adicionalmente uno o más moléculas del fragmento Aβ y se ligan juntos en una configuración de péptido antigénico múltiple (MAP).

313. El método de acuerdo con la reivindicación 312, en donde uno o más fragmentos Aβ se seleccionan del grupo que consiste de Aβ 1-3, 1-4,

1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-11, 1-12, 1-16, 1-28- 3-6, 3-7, 13-28, 15-24, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 25-35, 33-42, 35-40, y 35-42.

314. El método de acuerdo con la reivindicación 312, en donde el péptido inmunógeno es Aβ1-7 y la configuración MAP es una configuración MAP4.

315. El método de acuerdo con la reivindicación 312, en donde el péptido inmunógeno es (Aβ1-7)3 y la configuración MAP es una configuración MAP4.

316. El método de acuerdo con la reivindicación 312, en donde el péptido inmunógeno es (Aβ1-7)5 y la configuración MAP es una configuración MAP4.

317. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 262, en donde uno o más adyuvantes se seleccionan del grupo que consiste de GM-CSF, 529 SE, IL-12, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, Mycobacterium tuberculosis, Bordetella pertussis, lipopolisacáridos bacteriales, compuestos de fosfato glucosalina animoalquilo, MPL™ (lípido A monofosforil 3-O-desacilado), un polipéptido, Quil A, STIMULON™ QS-21, una toxina pertussis (PT), una toxina lábil al calor E.coli (LT), IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, interferón -α, interferón – β, interferón-γ, G-CSF, TNF-α y TNF-β.

318. La composición inmunogénica de la reivindicación 317, en donde el péptido inmunógeno es Aβ el vehículo es CRM197, y el adyuvante es 529 SE.

319. Un método para inducir una respuesta inmune en un sujeto mamífero, que comprende administrar una cantidad efectiva de la composición inmunogénica de la reivindicación 262 al sujeto.

320 El método de acuerdo con la reivindicación 319, en donde el vehículo se selecciona del grupo que consiste de albúmina de suero humano, hemocianina de lapa de ojo de cerradura (KLH), moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovalbumina, hemaglutinina influenza, polipéptido PADRE, proteína circumsporozito de malaria (CS), antígeno de superficie de hepatitis B (HBSAg 19-28), Proteína de Choque (HSP) 65, Mycobacterium tuberculosis, toxina de cólera, mutantes de toxina de cólera con toxicidad reducida, toxina de difteria, proteína CRM197 que es reactiva cruzada con toxina difteria, peptidasa Streptococal C5a recombinante, Streptococcus Pyogenes ORF1224, Streptococcus Pyogenes ORF1664, Streptococcus Pyogenes ORF2452, Streptococcus pneumoniae neumolisina, mutantes de neumolisina con toxicidad reducida, Chlamydia pneumoniae ORF T367, Chlamydia pneumoniae ORF T858, toxoide de tétano, HIV gp 120 T1, componentes que reconocen moléculas de matriz adhesiva de superficie microbial (MSCRAMMS), factores de crecimiento, hormonas, citoquinas y quimioquinas.

321. El método de acuerdo con la reivindicación 319, en donde el vehículo contiene un epítopo de célula T.

322. El método de la reivindicación 321, en donde el vehículo es un toxoide bacterial.

323. El método de acuerdo con la reivindicación 321, en donde el toxoide bacterial es toxoide de tétano.

324. El método de acuerdo con la reivindicación 321, en donde vehículo es hemaglutinina influenza.

325. El método de acuerdo con la reivindicación 321, en donde el vehículo es polipéptido PADRE.

326. El método de acuerdo con la reivindicación 321, en donde el vehículo es proteína circumsporozito de malaria (CS).

327. El método de acuerdo con la reivindicación 321, en donde el vehículo es antígeno de superficie de hepatitis B.

328. El método de acuerdo con la reivindicación 321, en donde el vehículo es Proteína de choque de térmico 65 (HSP 65).

229. El método de acuerdo con la reivindicación 321, en donde el vehículo es un polipéptido de Mycobacterium tuberculosis (BCG).

330. El método de acuerdo con la reivindicación 321, en donde el toxoide bacterial es toxoide de tétano.

331. El método de acuerdo con la reivindicación 321, en donde el toxoide bacterial es CRM 197.

332. El método de acuerdo con la reivindicación 321, en donde el vehículo es peptidasa Rc5a estreptococo.

333. El método de acuerdo con la reivindicación 321, en donde el vehículo es Streptococcus Pyogenes ORF1224.

334. El método de acuerdo con la reivindicación 321, en donde el vehículo es Streptococcus Pyogenes ORF1664.

335. El método de acuerdo con la reivindicación 321, en donde el vehículo es Streptococcus Pyogenes ORF2454.

336. El método de acuerdo con la reivindicación 321, en donde el vehículo es Chlamydia pneumoniae ORF T 367.

337. El método de acuerdo con la reivindicación 321, en donde el vehículo es Chlamydia pneumoniae ORF T858.

338. El método de acuerdo con la reivindicación 319, en donde el vehículo es un factor de crecimiento u hormona que estimula o mejora la respuesta inmune.

339. El método de acuerdo con la reivindicación 338, en donde el factor de crecimiento u hormona se selecciona de un grupo que consiste de IL-1, IL-2, γ-interferón, IL-10, GM CSF, MIP-1α, MIP-1β y RANTES.

340. El método de acuerdo con la reivindicación 262, en donde uno o más adyuvantes se seleccionan del grupo que consiste de GM-CSF, 529SE,

IL-12, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, Mycobacterium tuberculosis, Bordetella pertussis, lipopolisacáridos bacteriales, compuesto de fosfato de glucosaMina aminoalquilo, MPL™ (lípido A monofosforilo 3-O desacilado), un polipéptido, Quil A, STIMULON™ QS-21, una toxina pertussis (PT), una toxina lábil el calor E.coli (LT), IL-1 α, IL-1 β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, interferón-α, interferón-β, interferón-γ, G-CSF, TNF-β.

341. El método de acuerdo con la reivindicación 340, en donde el péptido inmunógeno es Aβ, el vehículo es CRM197, y el ayudante es 529 SE.

342. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el péptido inmunógeno es un fragmento Aβ.

343. El método de acuerdo con la reivindicación 342, en donde el fragmento Aβ es de la mitad N-terminal de Aβ.

344. El método de acuerdo con la reivindicación 343, en donde el fragmento Aβ se selecciona del grupo que consiste de Aβ1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-9, 1-10, 1-11,1-12, 1-16, 3-6, y 3-7.

345. El método de acuerdo con la reivindicación 344, en donde el fragmento Aβ se selecciona del grupo que consiste de Aβ1-5, 1-7, 1-9, 1-12.

346. El método de acuerdo con la reivindicación 342, en donde el fragmento Aβ es de la mitad C-terminal de Aβ.

347. El método de acuerdo con la reivindicación 346, en donde el fragmento Aβ es del grupo que consiste de Aβ33-42, 35-40, y 35-42.

348. El método de acuerdo con la reivindicación 342, en donde el fragmento Aβ es de la porción interna de Aβ.

349. El método de acuerdo con la reivindicación 348, en donde el fragmento Aβ se selecciona del grupo que consiste de Aβ13-28, 15-24, 16-24, 15-24, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, y 25-35.

350. El método de acuerdo con la reivindicación 342, en donde el fragmento Aβ se selecciona del grupo que consiste de Aβ1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-11, 1-12, 1-16, 1-28, 3-6, 3-7, 13-28, 15-24, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 25-35, 33-42, 35-40, y 35-42.

351. El método de acuerdo con la reivindicación 342, en donde el péptido inmunógeno comprende adicionalmente al menos una copia adicional del fragmento Aβ.

352. El método de acuerdo con la reivindicación 343, en donde el péptido inmunógeno comprende adicionalmente al menos una copia adicional del fragmento N-terminal de Aβ.

353. El método de acuerdo con la reivindicación 352, en donde el péptido inmunógeno comprende desde el N-terminal al C-terminal, una pluralidad de copias adicionales del fragmento N-terminal de Aβ.

354. El método de acuerdo con la reivindicación 353, en donde el péptido inmunógeno es (Aβ1-7)3.

355. El método de acuerdo con la reivindicación 353, en donde el péptido inmunógeno es (Aβ1-7)5.

356. El método de acuerdo con la reivindicación 342, en donde el péptido inmunógeno comprende adicionalmente al menos una copia de un fragmento Aβ diferente.

357. El método de acuerdo con la reivindicación 351, en donde el péptido inmunógeno de Aβ es un fragmento seleccionado del grupo que consiste de Aβ7-11, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40, y 35-42.

358. El método de acuerdo con la reivindicación 342, 343, 350, o 351, en donde el péptido inmunógeno se enlaza a su C-terminal al N-terminal de una molécula de vehículo para formar un péptido heterólogo

359. El método de acuerdo con la reivindicación 342, 343, 350, o 351, en donde el péptido inmunógeno se enlaza a su N-terminal al C-terminal de una molécula de vehículo para formar un péptido heterólogo.

360. El método de acuerdo con la reivindicación 342, 343, 350, o 351, en donde el péptido inmunógeno que comprende desde el N-terminal al C-terminal, una primer molécula de vehículo ligada en su C-terminal al N-terminal de fragmento Aβ ligado en su C-terminal al N-terminal de una segunda molécula de vehículo para formar u péptido heterólogo.

361. El método de la reivindicación 358, que comprende adicionalmente al menos una copia adicional de la molécula de vehículo.

362. El método de la reivindicación 358, que comprende adicionalmente al menos una copia adicional de la molécula de vehículo.

363. El método de la reivindicación 358, que comprende adicionalmente al menos una copia adicional de una molécula de vehículo diferente.

364. El método de la reivindicación 359, que comprende adicionalmente al menos una copia adicional de la molécula de vehículo.

365. El método de la reivindicación 359, que comprende adicionalmente al menos una copia de una molécula de vehículo diferente.

366. El método de la reivindicación 360, en donde el primer vehículo y el segundo vehículo son la misma molécula de vehículo.

367. El método de la reivindicación 360, en donde el primer vehículo. Y el segundo vehículo son moléculas de vehículo diferentes.

368. El método de acuerdo con la reivindicación 358, en donde la molécula de vehículo se selecciona del grupo que consiste de un epítopo de célula T, un epítopo de célula B y combinaciones de estos.

369. El método de la reivindicación 359, en donde la molécula de vehículo se selecciona del grupo que consiste de un epítopo de célula T, un epítopo de célula B y combinaciones de estos.

342

370. El método de la reivindicación 359, en donde la molécula de vehículo se selecciona del grupo que consiste de un epítopo de célula T, un epítopo de célula B y combinaciones de estos.

371. El método de la reivindicación 360, en donde la molécula de vehículo se selecciona del grupo que consiste de un epítopo de célula T, un epítopo de célula B y combinaciones de estos.

372. El método de acuerdo con la reivindicación 342, en donde el péptido inmunógeno comprende adicionalmente uno o más moléculas del fragmento Aβ que se unen juntas en una configuración de péptido antigénico múltiple (MAP).

373. El método de acuerdo con la reivindicación 372, en donde uno o más fragmentos Aβ se seleccionan del grupo que consiste de Aβ1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-11, 1-12, 1-16, 1-28, 3-6, 3-7, 13-28, 15-24, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 25-35, 33-42, 35-40, y 35-42.

374. El método de acuerdo con la reivindicación 372, en donde el péptido inmunógeno es Aβ1-7 y la configuración MAP es una configuración MAP4.

375. El método de acuerdo con la reivindicación 372, en donde el péptido inmunógeno es (Aβ1-7)3 y la configuración MAP es una configuración MAP4.

376. El método de acuerdo con la reivindicación 372, en donde el péptido inmunógeno es (Aβ1-7)5 y la configuración MAP es una configuración MAP4.

377. El uso del conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 152 o 207 en la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento, profilaxis, o mejoramiento de una enfermedad amiloidogénica.

378. El uso de la reivindicación 377, en donde la enfermedad es la enfermedad de Alzheimer.

379. El uso de la reivindicación 377, en donde la enfermedad es el síndrome de Down.

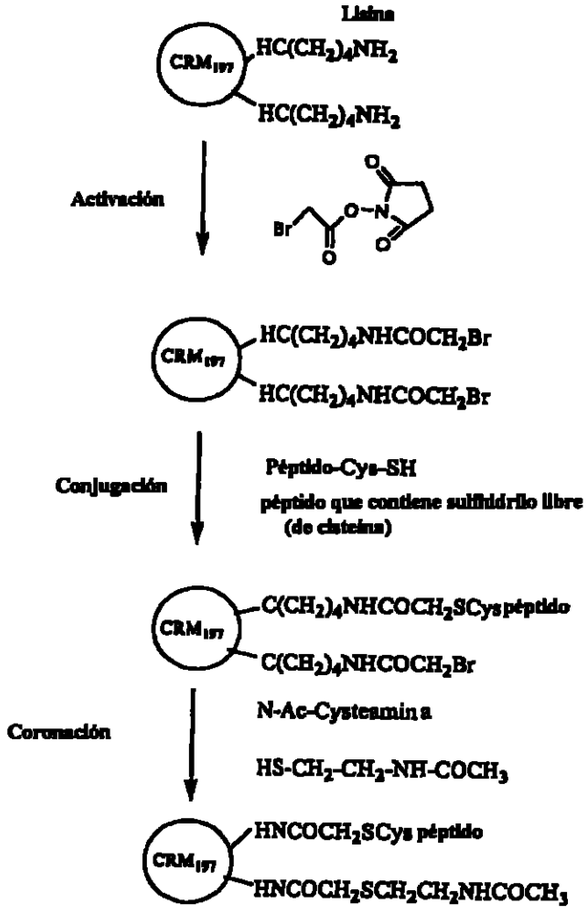

Lisina
CRM197
HC(CH2)4NH2
HC(CH2)4NH2
Activación
Br
O
O-N
O
O
CRM197
HC(CH2)4NHCOCH2Br
HC(CH2)4NHCOCH2Br
Conjugación
Péptido-Cys-SH
péptido que contiene sulfhidrilo libre
(de cisteína)
CRM197
C(CH2)4NHCOCH2SCys péptido
C(CH2)4NHCOCH2Br
Coronación
N-Ac-Cysteamina
HS-CH2-CH2-NH-COCH3
CRM197
HNCOCH2SCys péptido
HNCOCH2SCH2CH2NHCOCH3

Fig 1

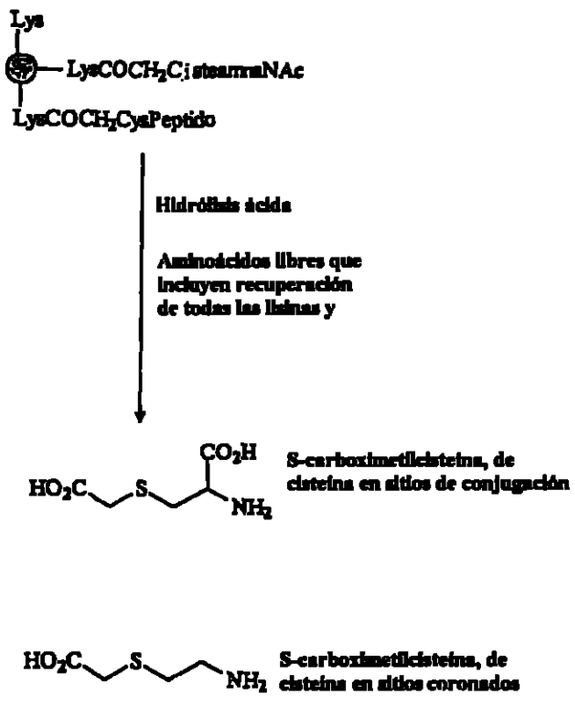

Lys
LysCOCH2CisteamnaNAc
LysCOCH2CysPeptido
Hidrólisis ácida
Aminoácidos libres que incluyen recuperación de todas las lisinas y
HO2C
S
CO2H
NH2
S-carboximetilcisteina, de cisteina en sitios de conjugación
HO2C
S
NH2
S-carboximetilcisteina, de cisteina en sitios coronados

Fig 2

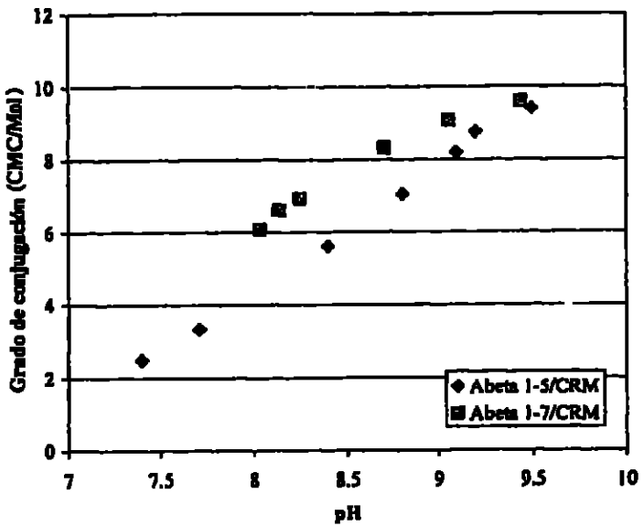

Grado de conjugación (CMC/Mol)
12
10
8
6
4
2
0
7
7.5
8
8.5
9
9.5
10
pH
Abeta 1-5/CRM
Abeta 1-7/CRM

Fig 3

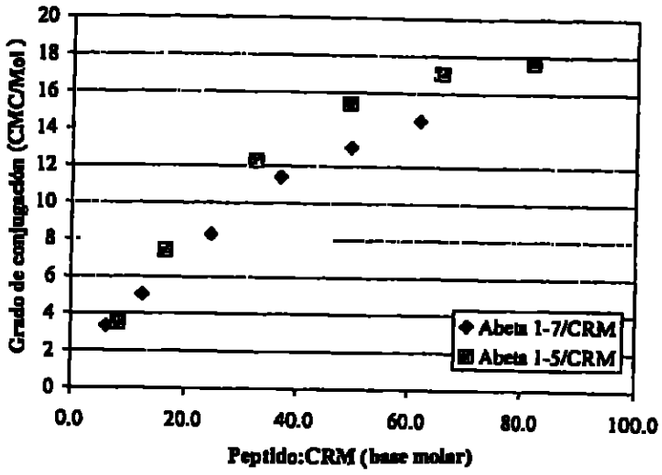

Grado de conjugación (CMC/Mol)
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
0.0
20.0
40.0
60.0
80.0
100.0
Peptido:CRM (base molar)
Abeta 1-7/CRM
Abeta 1-5/CRM

Fig 4

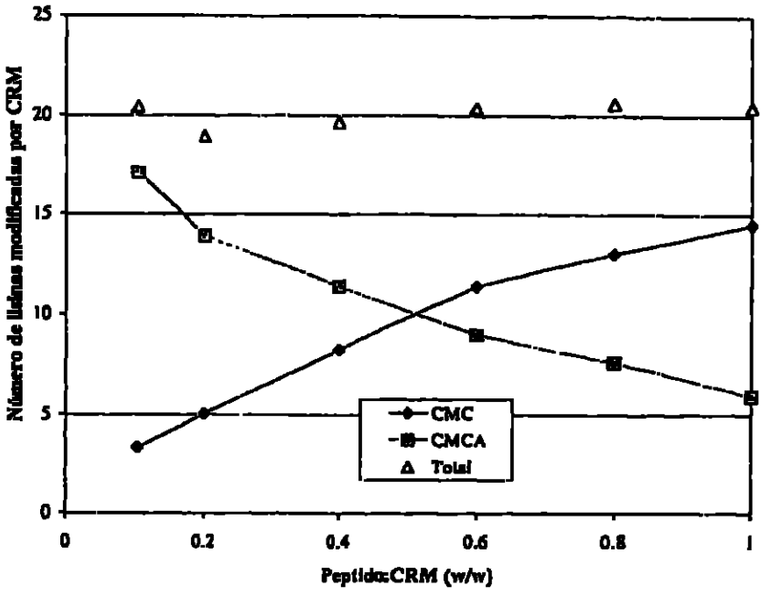

Número de lisinas modificadas por CRM
25
20
15
10
5
0
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
Peptido:CRM (w/w)
CMC
CMCA
Total

Fig 5

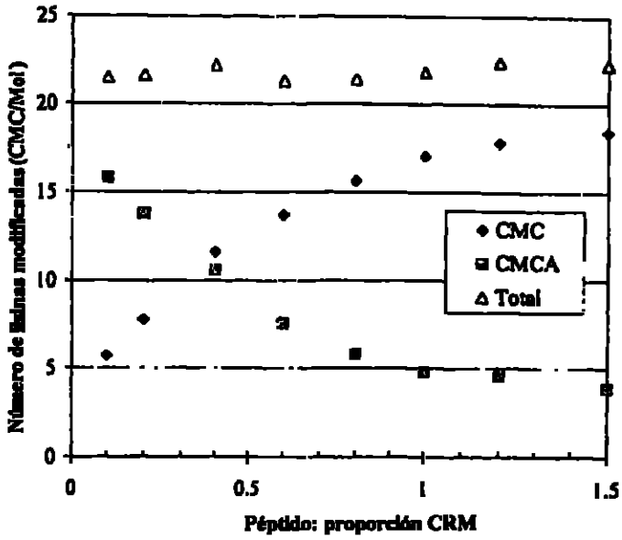

25
20
15
10
5
0
0
0.5
1
1.5
Número de lisinas modificadas (CMC/Mol)
Péptido: proporción CRM
CMC
CMCA
Total

Fig 6

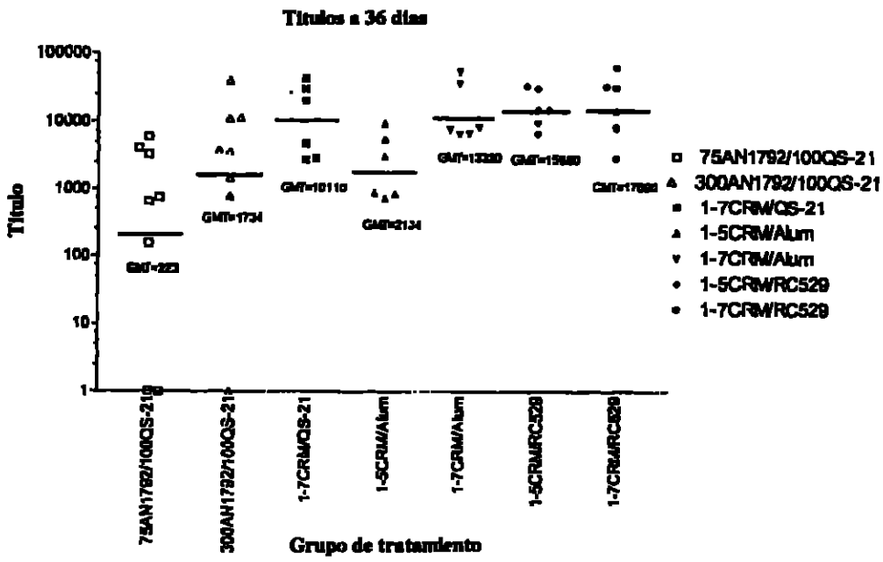

Títulos a 36 días
Título
100000
10000
1000
100
10
1
GMT=223
GMT=1734
GMT=10110
GMT=2134
GMT=13220
GMT=15680
GMT=17682
75AN1792/100QS-21
300AN1792/100QS-21
1-7CRM/QS-21
1-5CRM/Alum
1-7CRM/Alum
1-5CRM/RC529
1-7CRM/RC529
Grupo de tratamiento

Fig 7

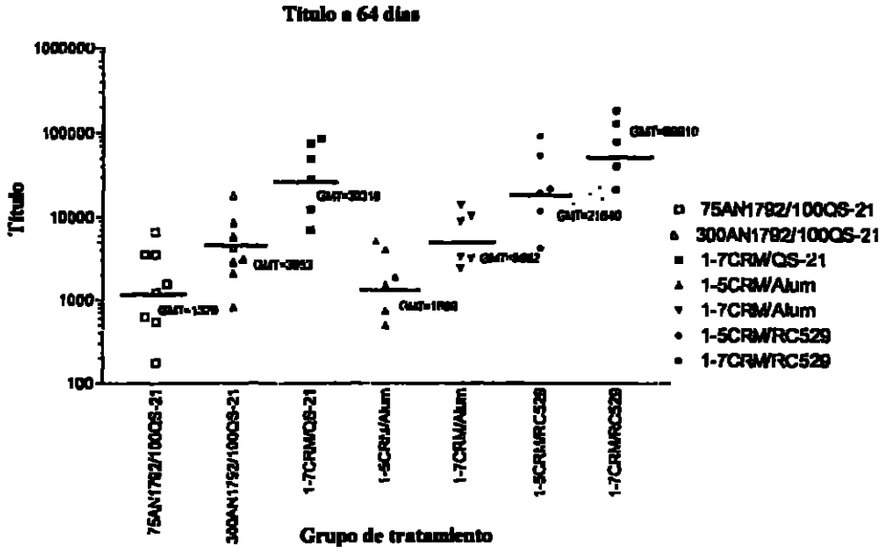

Título a 64 días
Título
1000000
100000
10000
1000
100
GMT=13579
GMT=39213
GMT=21640
75AN1792/100QS-21
300AN1792/100QS-21
1-7CRM/QS-21
1-5CRM/Alum
1-7CRM/Alum
1-5CRM/RC529
1-7CRM/RC529
Grupo de tratamiento

Fig 8

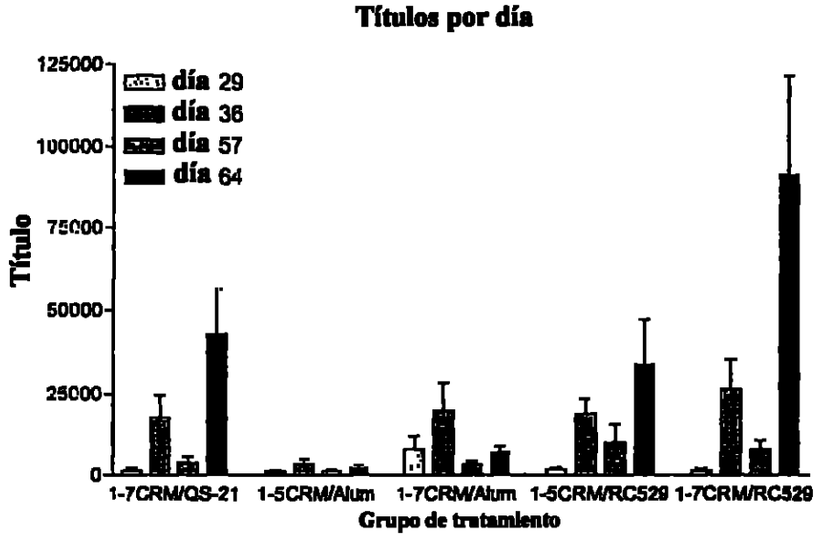

Títulos por día
125000
100000
75000
50000
25000
0
Título
día 29
día 36
día 57
día 64
1-7CRM/QS-21
1-5CRM/Alum
1-7CRM/Alum
1-5CRM/RC529
1-7CRM/RC529
Grupo de tratamiento

Fig 9



Fig 10

SEQUENCE LISTING

<110> Arumugham, Rasappa
Prasad, A. Krishna

<120> Methods of Producing Immunogenic Peptide Carrier Conjugates

<130> 025721-000110US

<140>
<141>

<150> US 60/530,480
<151> 2003-12-17

<160> 54

<170> PatentIn version 3.3

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

<400> 1

Asp Ala Glu Phe Arg Cys
1 5

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

<400> 2

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Cys
1 5

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

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

<400> 3

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

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

<400> 4

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

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

<400> 5

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

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

<400> 6

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Gly Ala Gly Ala Cys

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

1 5 10

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

<400> 7

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

<210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

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

Cys

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

<400> 9

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

<210> 10

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

Gly Ala Gly Ala
1

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

<400> 11

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

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

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 12

Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 13
<211> 16
<212> PRT

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

<213> Homo sapiens

<400> 13

Glu Lys Lys Ile Ala Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser Val Phe Asn Val
1 5 10 15

<210> 14
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

Phe Glu Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile
1 5 10

<210> 15
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

Asp Gln Ser Ile Gly Asp Leu Ile Ala Glu Ala Met Asp Lys Val Gly
1 5 10 15

Asn Glu Gly

<210> 16
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Gln Val His Phe Gln Pro Leu Pro Pro Ala Val Val Lys Leu
1 5 10

<210> 17
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

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

<210> 18
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
1 5 10 15

Ala Ser His Leu Glu
20

<210> 19
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr
1 5 10 15

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

<210> 20
<211> 51
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

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

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

Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Asp Ala Glu Phe
35 40 45

Arg His Asp
50

<210> 21
<211> 42
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21

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

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

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

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

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

<400> 22

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

Ile Gly Ile Thr Glu Leu
20

<210> 23
<211> 28
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp
1 5 10 15

Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu
20 25

<210> 24
<211> 43
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

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

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

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

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

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

<400> 25

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

Ile Gly Ile Thr Glu Leu
20

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

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 26

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

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Phe Arg His Asp
20

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

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(24)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 27

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

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

Ala Ala

<210> 28
<211> 34
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 28

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

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

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

His Asp

<210> 29
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 29

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

Lys Ala Ala Ala
20

<210> 30
<211> 24
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

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

Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg
20

<210> 31
<211> 24
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31

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

Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg
20

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

<400> 32

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

Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg
20

<210> 33
<211> 34
<212> PRT

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

<213> Homo sapiens

<400> 33

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

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

His Asp

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

<400> 34

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

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

<210> 35
<211> 34
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35

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

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

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

Ala Thr

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

<400> 36

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

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

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

<400> 37

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

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

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

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

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

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

<210> 38
<211> 58
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38

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

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

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

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

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

<400> 39

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

1 5 10 15

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

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

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

<400> 40

Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu Asn
1 5 10 15

Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln
20 25 30

Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp
35 40 45

Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly
50 55 60

Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val
65 70 75 80

Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val
85 90 95

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

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

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

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

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

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

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

Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu Phe
355 360 365

Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly His
370 375 380

Lys Thr Gln Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val Ser Trp Asn Thr
385 390 395 400

Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg Thr Gly Phe Gln Gly Glu Ser Gly His
405 410 415

Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu Asn Thr Pro Leu Pro Ile Ala Gly Val

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

420 425 430

Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr
435 440 445

His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile
450 455 460

Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro Lys Ser Pro Val Tyr Val Gly
465 470 475 480

Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val Ala Phe His Arg Ser Ser Ser
485 490 495

Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu
500 505 510

Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His Thr Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser
515 520 525

Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser
530 535

<210> 41
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41

Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly
1 5 10 15

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Arg

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

<400> 42

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

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

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

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

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

<400> 43

Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Cys
1 5

<210> 44
<211> 9
<212> PRT

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

<213> Artificial

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

<400> 44

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Cys
1 5

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

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

<400> 45

Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Cys
1 5

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

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

<400> 46

Cys Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly
1 5

<210> 47
<211> 9

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

<212> PRT
<213> Artificial

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

<400> 47

Cys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val
1 5

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

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

<400> 48

Cys Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp
1 5

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

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

<400> 49

Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Cys
1 5

<210> 50

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

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

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

<400> 50

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Cys
1 5

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

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

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> CRM 197 added via terminal cysteine

<400> 51

Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Cys
1 5

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

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

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> CRM 197 added via N-terminal cysteine

<400> 52

Cys Val Phe Phe Ala Glu Asp Val
1 5

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

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

<400> 53

Cys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp
1 5

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

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

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> CRM 197 added via N-terminal cysteine

<400> 54

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Cys Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu
1 5

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 15270C-1-1PC	FOR FURTHER ACTION	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/US04/44093	International filing date (day/month/year) 17 December 2004 (17.12.2004)	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 17 December 2003 (17.12.2003)
Applicant ELAN PHARMACEUTICALS, INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 3 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the Report
   a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:
      ☒ the international application in the language in which it was filed.
      ☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))
   b. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.
2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)
3. ☐ Unity of invention is lacking (See Box No. III)
4. With regard to the title,
   ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
   ☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,
   ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
   ☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.
6. With regard to the drawings,
   a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. 2
      ☒ as suggested by the applicant.
      ☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.
      ☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.
   b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US04/44093

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) C07K 1/00
US CL 530/402
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S. 530/402, 403

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Please See Continuation Sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2003/0139035 A1 (SHANNON) 17 July 2003 (17.07.2003), see page 22, paragraph [0282].	1-379
Y	US 2003/0207828 A1 (ISHIWATA ET AL.) 06 November 2003 (06.11.2003), see page 9, paragraph [0168].	1-379
Y	US 2003/0092145 A1 (JIRA ET AL.) 15 May 2003 (15.05.2003), see pages 12-13, paragraph [0101].	1-397
Y P	US 6,962,984 B2 (ISHIWATA ET AL.) 08 November 2005 (08.11.2005), see column 16, lines 14-22.	1-397
Y	US 5,866,129 (CHANG ET AL.) 02 February 1999 (02.02.1999), see column 5, lines 41-50 and column 6, lines 25-32.	1-379
Y	US 5,245,015 (FUNG ET AL.) 14 September 1993 (14.09.1993), see column 4-5, for example.	1-379

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
16 March 2006 (16.03.2006)	06 APR 2006
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201	Authorized officer B. Dell Chinn Telephone No. (571) 272-1600

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US04/44093

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
STN USPATFULL PCTFULL MEDLINE BIOSIS
search terms: immunogen, conjugate, antigen, albumin, ovalbumin, padre, hth, epitope

382

CF 500422

JDL

Sent to - foreign + Rothschild 4/21/06 BMS

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:
[redacted]
TOWNSEND AND TOWNSEND AND CREW LLP
TWO EMBARCADERO CENTER, 8TH FLOOR
SAN FRANCISCO, CA 94111-3834

15270C-000110PC

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Applicant's or agent's file reference 15270C-1-1PC	Date of mailing (day/month/year) 06 APR 2006 FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below
International application No. PCT/US04/44093	International filing date (day/month/year) 17 December 2004 (17.12.2004)
Applicant ELAN PHARMACEUTICALS, INC.	

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

   Filing of amendments and statement under Article 19:
   The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the international application (see Rule 46):

   When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the international search report. 6/6/06

   Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 338.82.70.

   For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.

3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

   ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.

   ☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

   Shortly after the expiration of 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication. 4/11/06

   The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

   Within 19 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices. 6/10/06

   In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months. 8/11/06

   See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Offices by Offices, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the ISA/ US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201	Authorized officer B. Dell Chinn Telephone No. (571) 272-1600

Form PCT/ISA/220 (January 2004) (See notes on accompanying sheet)

Docketed ____ Undocketed
____ Transferred ____ Noted
____ Not Docketed
____ Abandoned
Action: ext Response to Ltr. Dtd 4/6/06
Due: 4/6/06, 7/6/06
By:
Townsend and Townsend and Crew LLP

Extracto de P. Fol. 383

383

FORMATO DE DIGITALIZACIÓN
RELACION DE ANEXOS

Royal Technologies S.A.

Item		Expediente No	06059320	No de Folio
			No de unidades	√
1	CD			
2	DVD			
3	REVISTA			
4	LIBRO			
5	PERIODICO			
6	DISQUETES			
7	SOBRE DE MANILA			
8	SOBRE BLANCO TAMAÑO CARTA			
9	SOBRE BLANCO TAMAÑO OFICIO			
10	OTROS: X			

Observaciones:

un sobre blanco q1 contiene arte final

385
384

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-059320- -00000-0000
Fec: 2006-06-15 18:02:09 Dep: 2020 NUEGREACIONES
Tra: 11 PATENTEYII
Cla: 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 386

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 44,162
FECHA : JUNIO 12 DE 2006

C O N S I G N A C I O N

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	55274900	12/06/2006	26,485,000.00

C O N C E P T O

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
		TOTAL : $	463,000.00

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

Cobo 15412-891-001-1