



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

06-128318

54. TÍTULO

Composiciones y métodos para el
tratamiento de trastornos neurológicos

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

A61K 3902

71. SOLICITANTE

1. ID Biomedical Corporation of Quebec
2. the Brigham and women's Hospital, Inc

DOMICILIO

1. Canada, 21 USA.

74. APODERADO

Dña. María Rodríguez D'Almeida

22. BOGOTÁ, D. C.,

D.C. 21/06.

55.

FORMULARIO ÚNICO 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: 1. ID BIOMEDICAL CORPORATION OF QUEBEC 2. THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, Inc. Dirección: 1. 525 Cartier Boulevard West, Laval, Québec H7V 3S8 Canadá 2. 75 Francis Street Boston, Massachusetts 02115 USA Nacionalidad o domicilio: 1. Québec, Canadá 2. Boston, MA, USA Lugar de constitución: 1. Québec, Canadá 2. Boston, MA, USA		IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT: ☐ C.E. ☐ OTRO ☐ Cual _____ NÚMERO _____
	Teléfono: _____ Fax: _____ E. Mail: _____		
3) REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN Dirección: Carrera 11 N°. 86-53 Piso 6 Bogotá D.C. Teléfono: 6181088 Fax: 6350824 E. Mail: info@clarkemodet.com.co		IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT: ☐ C.E. ☐ OTRO ☐ NÚMERO: 41.654.882 TP: 20824 CSJ
4) INVENTOR (ES) (72)	Nombre: 1. FRENKEL, Dan; 2. MARON, Ruth; 3. BURT, David; 4. WEINER, Howard, L. Dirección: 1. 30 Gardner Road, Apartment 1G Brookline, Massachusetts, 02445 USA; 2. 74 Salisbury Road, Brookline, MA 02146 USA; 3. 330 Newton Road, Dollard des Omeaux, Québec, Canadá; 4. 72 Colbourne Crescent Brookline, Massachusetts 02445 USA Nacionalidad o Domicilio: 1 y 2 Israelitas; 3. Canadiense, 4. Estadounidense		
5) PCT (86)			
Solicitud Internacional No. PCT/US2005/022922		Fecha: Junio 27, 2005	
Publicación Internacional No. WO2006/0044749 A2		Fecha: Enero 12, 2006	
6) Título (54) COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE TRASTORNOS NEUROLÓGICOS			
7) Clasificación Internacional: A61K 39/02 (2006.01)			
8) PRIORIDAD	33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	SI ☒ NO ☐ Estados Unidos	Junio 25, 2004	60/582,999
9) Comprobante de pago N°. 06-88,958 Fecha: Nov. 17, 2006			
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta pagina			

9

p 885 32

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-128318-00000-0000
Rec: 2006-12-21 16:16:31 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTERYII
Ere: 378 FASENACIONAL
Sri 411 DE PRESENTACION
FABRIL 1.20

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 000176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 88,950
FECHA : NOVIEMBRE 17 DE 2006

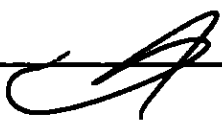
***** CONSIGNACION *****

SITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE RODET Y CO. COLOMBIA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	50107111	17/11/2006	11,422,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRANITES 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. _____

10)

ANEXOS

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud

☐

Comprobante de pago por reivindicación de prioridad

☐

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona Jurídica

☐

Poderes, si fuera el caso

☐

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante

☐

Declaraciones

☒

Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos).

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos)

☐

Copia 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 12 x 12 y 6 x 6 cm

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☒

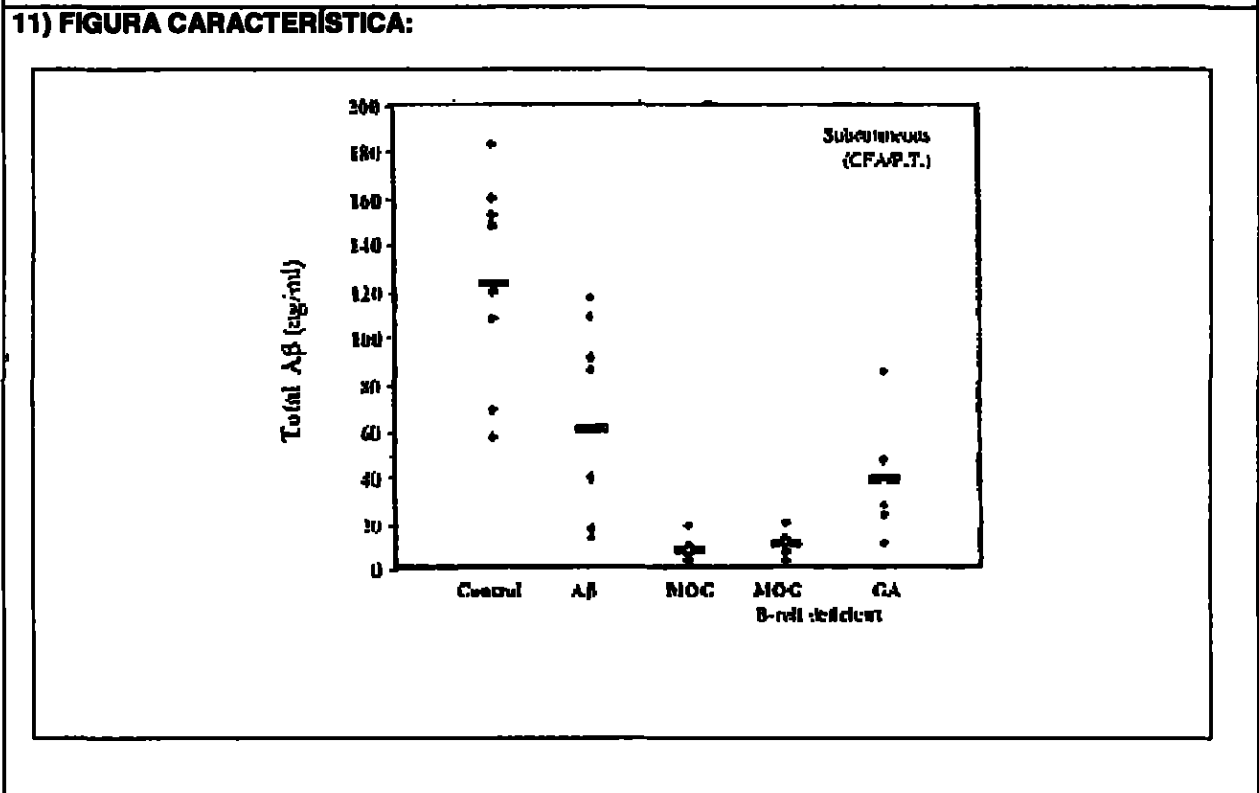
Otros:

1. Reporte internacional de búsqueda

2. Opinión escrita

3. Corrección nombre y dirección de uno de los solicitantes

4. Corrección y dirección de dos de los inventores



12) Solicitud concesión de la patente,

NOMBRE: DILIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

FIRMA:

C.C. 41.654.882 de Bogota TP 20824 CSJ

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta pagina

5

From the INTERNATIONAL BUREAU

4

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
TRANSMITTAL OF COPY OF INTERNATIONAL
APPLICATION AS PUBLISHED OR REPUBLISHED

To:

MCPHERSON, Scott, E.
Townsend and Townsend And Crew LLP
12730 High Bluff Drive
Suite 400
San Diego, CA 92130
ETATS-UNIS D'AMERIQUEDate of mailing (day/month/year)
12 January 2006 (12.01.2006)Applicant's or agent's file reference
021989000810 PC

IMPORTANT NOTICE

International application No.
PCT/US2005/022922International filing date (day/month/year)
27 June 2005 (27.06.2005)Priority date (day/month/year)
25 June 2004 (25.06.2004)

Applicant

ID BIOMEDICAL CORPORATION OF QUEBEC et al

The International Bureau transmits herewith the following documents:

copy of the international application as published by the International Bureau on 12 January 2006 (12.01.2006) under
No. WO 2006/004749copy of international application as republished by the International Bureau on under
No. WOFor an explanation as to the reason for this republication of the international application, reference is made to INID codes (15), (48)
or (88) (as the case may be) on the front page of the attached document.The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.+41 22 740 14 35

Authorized officer

Simin Baharlou

Facsimile No.+41 22 338 71 30

DOCKETED BY _____

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
12 January 2006 (12.01.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/004749-A2

(51) International Patent Classification:
A61K 39/02 (2006.01)

Howard, L. [US/US]; 114 Somerset Road, Brookline, MA 02445 (US).

(21) International Application Number:
PCT/US2005/022922

(74) Agents: MCPHERSON, Scott, E. et al.; Townsend and Townsend And Crew LLP, 12730 High Bluff Drive, Suite 400, San Diego, CA 92130 (US).

(22) International Filing Date: 27 June 2005 (27.06.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60582999 25 June 2004 (25.06.2004), US

(71) Applicants (for all designated States except US): ID BIOMEDICAL CORPORATION OF QUEBEC [CA/CA]; 525 Cartier Boulevard West, Laval, Québec H7V 3S8 (CA). BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL [US/US]; Center For Neurologic Diseases, Harvard Medical School, 75 Francis Street, Boston, MA 02115 (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, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

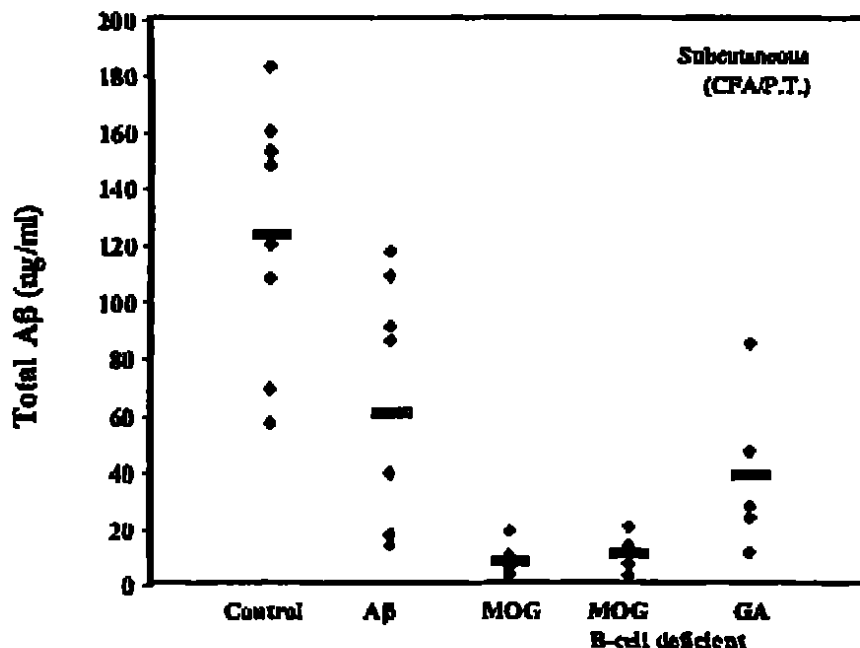
(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GI, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, 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).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): FRENKEL, Dan [IL/US]; 123 Sutherland Road, Brighton, MA 02135 (US). MARON, Ruth [IL/US]; 74 Salisbury Road, Brookline, MA 02146 (US). BURT, David [CA/CA]; 330 Newton Road, Dollard des Ormeaux, Québec (CA). WEINER,

[Continued on next page]

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATING NEUROLOGICAL DISORDERS



(57) Abstract: Compositions useful for treating neurological disorders including neurodegenerative disorders associated with deleterious protein aggregation, aberrant protein folding, such as brain amyloidogenic diseases, and/or neurodegenerative autoimmune disorders are described. Methods of using said compositions also are described. In particular, methods to treat a neurodegenerative disorder such as Alzheimer's disease and a neurodegenerative autoimmune disorder such as Multiple Sclerosis are contemplated utilizing protoosomes and/or Glatiramer Acetate, wherein the GA is in a submicron emulsion or a nanoemulsion.

represent the fourth most common medical cause of death in the United States. AD has been observed in all races and ethnic groups worldwide and presents a major present and future public health problem. The disease is currently estimated to affect about four million individuals in the United States alone. AD is at present incurable. The administration of certain therapies has been used to treat symptoms of AD in humans. However, no treatment that effectively prevents AD or reverses its symptoms or course in humans is currently known.

The brains of individuals with AD exhibit characteristic lesions, termed senile plaques, and neurofibrillary tangles. Senile plaques characteristic of AD are most frequently localized extracellularly while neurofibrillary tangles are most frequently localized intracellularly. Large numbers of these lesions are generally found in patients with AD in several areas of the human brain important for memory and cognitive function. Smaller numbers of these lesions in a more restricted anatomical distribution are sometimes found in the brains of aged humans who do not have clinical AD. The principal chemical constituent of the senile plaques and vascular amyloid deposits (amyloid angiopathy) characteristic of AD is a protein designated amyloid- β peptide ($A\beta$), which may also be referred to as β AP, $A\beta$ P or β /A4. Extracellular plaques containing $A\beta$ may be dense or diffuse. Dense plaques are often referred to as fibrillar plaques. $A\beta$ was first purified and a partial amino acid sequence reported in Glenner and Wong (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 120:885-890. The isolation procedure and the sequence data for the first 28 amino acids are described in U.S. Pat. No. 4,666,829. Forms of $A\beta$ having amino acids beyond number 40 were first reported by Kang et al. (1987) Nature 325:733-736.

Neuropathologically, AD is characterized, to varying degrees, by four major lesions: a) intraneuronal, cytoplasmic deposits of neurofibrillary tangles (NFT), b) parenchymal amyloid deposits called neuritic plaques, c) cerebrovascular $A\beta$ amyloidosis (e.g., amyloid angiopathy), and d) synaptic and neuronal loss. One of the key events in AD is the deposition of amyloid (e.g., $A\beta$ peptide) as insoluble fibrous masses (amyloidogenesis) resulting in extracellular neuritic plaques and deposits around the walls of cerebral blood vessels. The major constituent of the neuritic plaques and cerebral amyloid angiopathy is $A\beta$, although these deposits also may contain other proteins such as glycosaminoglycans and apolipoproteins.

G

Solomon, B. et al. (1997) PNAS 94(8):4109-12 showed that monoclonal antibody against the N-termini of A β can bind to and disaggregate preexisting assemblies of A β -peptide and/or prevent fibril aggregation *in vitro* and prevent toxicity to neuronal cell cultures. Schenk, D. et al., Nature 400(6740):173-177 (1999) demonstrated that

5 immunization with amyloid- β attenuated Alzheimer's disease-like pathology in PDAPP transgenic mice serving as an animal model for amyloid- β deposition and Alzheimer's disease-like neuropathologies. They reported that immunization of young animals prior to the onset of Alzheimer's disease-type neuropathologies essentially prevented the development of β -amyloid plaque formation, neuritic dystrophy and astrogliosis, whereas

10 treatment in older animals after the onset of Alzheimer's disease-type neuropathologies was observed to reduce the extent and progression of these neuropathologies. This effect is mediated by antibodies, since peripherally administered antibodies against A β have been shown to reduce brain parenchymal amyloid burden (Bard F. et al., (2000) Nat. Med. 6(8):916-9). In addition, intranasal immunization with freshly solubilized A β 1-40 reduces

15 cerebral amyloid burden (Weiner, H.L. et al., (2000) Ann. Neuro. 48(4):567-79). Two studies, performed by Morgan, D. et al., (2000) Nature 408(6815):982-5; and Janus, C. et al., (2000) Nature 408(6815):979-82, using animal model systems demonstrated that a vaccination-induced reduction in brain amyloid deposits resulted in cognitive improvements. Additional studies have addressed various aspects of the same topic,

20 including Dodart et al., (2002) Nat. Neuroscience 5(5):452-7, and Kotilinek, L.A. et al., (2002) J. Neuroscience 22(15):6331-5. Although A β vaccination has shown some success in various studies using animal models of AD, human clinical studies immunizing with A β 1-40/42 peptides formulated in an adjuvant (QS21) were terminated because of deleterious and/or an unacceptably high occurrence of side effects such as meningoencephalitis. Thus,

25 there is a need for therapeutically acceptable modalities for the treatment and/or prevention of AD and related neurodegenerative disorders associated with protein aggregation.

Autoimmune diseases are characterized by an abnormal immune response directed to self or autologous tissues. Based on the type of immune response (or immune reaction) involved, autoimmune diseases in mammals can generally be classified into one of two

30 different types: cell-mediated (i.e., T-cell-mediated) or antibody-mediated disorders. Multiple Sclerosis (MS) is a T-cell mediated autoimmune disease (Trapp et al. New Eng. J. Med. 338(5):278 (1998)). More than 1,000,000 young adults worldwide between the ages of thirty and forty have MS. MS is the most common disease of the central nervous system

and is the most common cause of neurological disability in young adults.

Pathophysiologically, circulating autoreactive T cells mediate much of the central nervous system destruction seen in MS patients (Rudick et al. New Eng. J. Med. 337:1604(1997)).

In MS, T-cells react with myelin basic protein (MBP) which is a component of myelin in the central nervous system. The demonstration that activated T-cells specific for MBP can be isolated from MS patients supports the proposition that MS is an autoimmune disease wherein T-cells destroy the self or autologous neural tissue (Allegretta et al. Science: 247: 778 (1990)).

MS is currently treated with certain anti-inflammatory and immunosuppressive agents, such agents include: (i) corticosteroids, which have both immunomodulatory and immunosuppressive effects; (ii) interferon- β ; (iii) glatiramer acetate (GA); (iv) azathioprine, a purine analog which depresses both cell-mediated and humoral immunity; (v) intravenous immune globulin; (vi) methotrexate, which inhibits dihydrofolate reductase and depresses cell-mediated and humoral immunity; (vii) cyclophosphamide, an alkylating agent which has cytotoxic and immunosuppressive effects; and (viii) cyclosporine, which has potent immunosuppressive effects by inhibiting T cell activation. Despite treatment with such anti-inflammatory or immunosuppressive drugs, more than 50% of the patients with MS steadily deteriorate as a result of focal destruction of the spinal cord, cerebellum, and cerebral cortex.

Many of the drugs currently used to treat MS have limited long-term efficacy, in part, because they have significant cytotoxic effects. For example, prolonged treatment with cyclophosphamide can lead to alopecia, nausea, vomiting, hemorrhagic cystitis, leukopenia, myocarditis, infertility, and pulmonary interstitial fibrosis. Treatment with immunosuppressive agents can eventually induce "global" immunosuppression in the treated patient, which greatly increase the risk of infection. Patients subjected to prolonged global immunosuppression have an increased risk of developing severe medical complications from treatment, such as malignancies, kidney failure and diabetes.

An alternative approach to the treatment of MS is the use of intravenous or oral administration of MBP to modulate the T-cell immune response that may be associated therewith. Intravenous administration of MBP or fragments thereof containing immunodominant epitopes of MBP suppresses the immune system by causing clonal anergy, or T-cell unresponsiveness, which deactivates T-cells specific for MBP. The end-result is that MBP-specific T cells no longer proliferate in response to MBP. The inability of the T-cell to proliferate results in a decrease in T-cell mediated destruction of neural

tissues.

An immunochemical analog of MBP used in treating MS is glatiramer acetate (GA), or copolymer-1 (COP-1) (U.S. Pat. No. 3,849,550; PCT Application WO/95/31990). GA, in its commercially available form, is a mixture of random synthetic polypeptides composed of L-alanine, L-glutamic acid, L-lysine and L-tyrosine in a molar ratio of 6.0:1.9:4.7:1.0. It was first synthesized as an immunochemical mimic of MBP. For example, certain monoclonal antibodies to GA cross-react with MBP (Teitelbaum et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9258 (1991)). Also, GA has been found to induce T suppressor cells specific for MBP (Lando et al. J. Immunol. 123:2156 (1979)). Experiments in mice indicate that GA also specifically inhibits MBP-specific T cells that are involved in the destruction of central nervous system tissue in Experimental Allergic Encephalomyelitis (EAE) (Teitelbaum et al. Proc. Natl. Acad. USA 85:9724 (1995)).

Administration of GA may: (i) increase the percentage of NK cells; (ii) reduce serum IL-2 receptors; (iii) suppress TNF- α ; and (iv) increase TGF- β and IL-4 (Ariel et al. Multiple Sclerosis 3(5), S053 (1997)).

Although patients with MS have been relatively successfully treated with parenterally administered GA (Bornstein et al. Transactions American Neurological Association, 348 (1987)), the current treatment regime and overall effects could be improved.

Citation of the above documents is not intended as an admission that any of the foregoing is pertinent prior art. All statements as to the date or representation as to the contents of these documents is based on the information available to the applicant and does not constitute any admission as to the correctness of the dates or contents of these documents.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides methods and compositions for treating neurological diseases or disorders in mammals in need of such treatment. Said neurological diseases or disorders can be associated with a systemic or localized deposition of protein or proteinaceous material (e.g., amyloidosis), deleterious protein aggregation (protein misfolding) and/or neurodegenerative autoimmunity. Particular interest is in the amyloid forming diseases such as Alzheimer's disease and/or other brain amylogenic diseases including prion-related diseases, Huntington disease, Parkinson's disease and cerebral amyloid angiopathy (CAA) (Revesz, T. et al. (2003) J. Neuropathol. Exp. Neurol.

62(9):885-98). The treatment of said amyloid related diseases can include preventing new amyloid plaque (deposition) formation, maintaining current amyloid plaque levels, and/or decreasing the amount of existing amyloid plaque or total brain amyloid protein (including A β that may not be deposited into plaques) as measured by determining total amyloid load (soluble and non-soluble A β) or the amount of fibrillar A β -amyloid load. Said neurological diseases or disorders can be associated with a cell-mediated autoimmune disease such as Multiple Sclerosis. The treatment of said autoimmune disorders can include preventing the formation of autoreactive T cells, maintaining current autoreactive T cell concentrations, and/or decreasing the concentration of autoreactive T cells.

The present invention claims and utilizes various formulations of a proteasome based composition, and/or a GA composition, optionally in a submicron emulsion, or a nanoemulsion, as therapeutics for treating neurological diseases or disorders in mammals including A β plaque related diseases or disorders, and cell-mediated autoimmune diseases or disorders.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1: Effect of subcutaneous immunization on total A β levels in the brain. To quantify amyloid burden, the right hemisphere was extracted in 5.0 M guanidinium-chloride (pH 8) for 3 hours at room temperature. Dilutions were used to measure levels of A β 40 and A β 42 by sandwich enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA).

Figure 2: Effect of nasal immunization on total A β total levels in the brain. Total A β concentration levels of A β 40 and A β 42 from individual mice following nasal treatment measured by sandwich enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA).

Figure 3: Activation of CD11b+ cells lead to clearance of A β fibril in parenterally and nasally treated mice. (A) Staining of A β fibril in hippocampal region with thioflavin-S (Magnificationx10) or co-staining for total A β with anti A β antibody (R1288) and anti-CD11b (microglia/macrophage) Magnification x40) following subcutaneous immunization. (B) Co-staining anti A β antibody (R1288) and anti-CD11b (microglia/macrophage) (in hippocampal region Magnification x40) following nasal immunization.

Figure 4: Immunohistology of brain sections following MOG subcutaneous immunization and nasal glatiramer acetate vaccination. Serial sections of the

hippocampus region from untreated, or immunized mice 50 days post immunization were labeled using anti CD11b, CD3, IFN- γ and TGF- β antibodies (magnification x20, insert figure magnification x60).

Figure 5: Reduction in astrogliosis following nasal administration of GA+IVX-908. Well-defined hippocampal regions (Bregma -1.44mm), were selected for quantification of activated astrocytes using GFAP staining. The level of astrocyte activation was expressed as a percentage per mm² hippocampal region; p=0.039 GA+IVX-908 vs. control; p=0.02 vs. EAE (MOG).

Figure 6: Neuropathology in brain sections following MOG subcutaneous immunization and nasal glatiramer acetate vaccination. Serial sections of the cortex from untreated, or treated mice 50 days post immunization were labeled using markers of neurotoxicity: SMI32, TUNEL, and iNOS (original magnification x20). Arrows identify labeling for markers studied. Labeling for markers of neurotoxicity was observed in EAE animals, but not in GA-IVX-908 treated animals.

Figure 7: Blood brain barrier integrity in hippocampus section following MOG subcutaneous immunization and nasal glatiramer acetate vaccination. Serial sections of the cortex from untreated, or treated mice 50 days post immunization were labeled using marker of plasma staining -fibrinogen. Labeling for markers of fibrinogen was observed in EAE animals, but not in GA-IVX-908 treated animals. (Magnification x20, small figure magnification x40).

Figure 8: Neuropathology in olfactory sections following MOG subcutaneous immunization and nasal glatiramer acetate vaccination. Serial sections of the cortex from untreated, or treated mice 50 days post immunization were labeled using markers of fibril amyloid: ThS, microglia activation CD11b, BBB integrity, Fibrinogen. (Magnification x20)

Figure 9: Staining for CD68+ cells in the CNS in untreated, MOG immunized and GA+IVX-908 treated mice. Arrows identify CD68+ cells which infiltrate the CNS in EAE, but remain localized to choroids plexus in GA+IVX-908 treated mice. No staining was observed in untreated mice. Sections are taken from the cerebellum (Magnification x20).

MODES OF PRACTICING THE INVENTION

The term "neurological disease" refers to a disease or disorder, which involves the neuronal cells of the nervous system. Specifically included are: prion diseases (e.g., Creutzfeldt-Jakob disease); pathologies of the developing brain (e.g., congenital defects in amino acid metabolism, such as argininosuccinicaciduria, cystathioninuria, histidinemia, homocystinuria, hyperammonemia, phenylketonuria, tyrosinemia, and fragile X syndrome); pathologies of the mature brain (e.g., neurofibromatosis, Huntington's disease, depression, amyotrophic lateral sclerosis, Multiple Sclerosis); conditions that strike in adulthood (e.g., Alzheimer's disease, Creutzfeldt-Jakob disease, Lewy body disease, Parkinson's disease, Pick's disease); and other pathologies of the brain (e.g., brain mishaps, brain injury, coma, infections by various agents, dietary deficiencies, stroke, multiple infarct dementia, and cardiovascular accidents).

The preferred diseases or disorders of the current invention are those diseases affecting the mature brain, such as Multiple Sclerosis, and those which typically strike in adulthood, such as Alzheimer's disease.

The term "Alzheimer's disease", abbreviated herein as "AD" refers to a neurodegenerative disease of the central nervous system. Broadly speaking, the disease falls into two categories: late onset, which occurs in old age (typically above 65 years) and early onset, which develops well before the senile period, e.g., between 35 and 60 years. In both types of the disease, the pathology is similar, but the abnormalities tend to be more severe and widespread in cases beginning at an earlier age. AD is characterized by the accumulation of extracellularly localized brain amyloid (e.g., A β peptide), amyloid plaques (which may be further distinguished as dense or diffuse) and intracellularly localized neurofibrillary tangles concentrated in certain vulnerable regions of the brain such as the hippocampus and cortex. AD is a progressive disease resulting in senile dementia. Amyloid plaques are areas of disorganized neurofibrillary fibers which may be associated with neutrophils up to 150 nm across with extracellular amyloid-beta (A β) deposits at the center, visible by microscopic analysis of sections of brain tissue. Neurofibrillary tangles are intracellular deposits of tau protein (often hyperphosphorylated) consisting of two filaments twisted about each other in pairs. AD is associated with the abnormal accumulation of A β peptide resulting from altered proteolytic processing of amyloid

9

precursor protein (APP). Abnormal accumulation of A β has been correlated with a variety of mutations, such as autosomal dominant APP mutations and mutations in genes encoding proteins referred to as presenilin 1 (PS1) and presenilin 2 (PS2), which subsequently influence the proteolytic activity of γ (gamma), or β (beta) secretase, causing increased levels of, for example, A β 1-42; whereas, the proteolytic activity of α (alpha) secretase is presumably associated with the normal processing of APP. Various types of plaques are found in AD, including, but not limited to neuritic plaques associated with abnormal dystrophic neurites. Also characteristic of the disease is the presence of an inflammatory response in the CNS, including activated microglia and astrocytes. The accumulation of aggregates of dysfunctional protein (e.g., A β and prion protein) associated with neurological disorders are thought to cause or contribute to or otherwise influence the development of certain neurological disorders (Ingelsson, M. and Hyman B.T. (2002) *Annals of Med.* 34:259-271). Neurodegenerative disorders associated with deleterious protein aggregation include Alzheimer's disease, Pick's disease, Parkinson's disease, prion disease, Huntington and motor neuron disorders. (Shastri, *Neurochemistry International*, 2002, 43:1-7).

The term "amyloid" refers to the extracellular (e.g., A β , prion diseases, and multiple myeloma light chain disease) or intracellular (e.g., neurofibrillary tangles of tau protein in AD and alpha-synuclein in Parkinson's disease) deposition of protein aggregates (Trojanowski J.Q. and Mathson M.P. (2003) *Neuromolecular Medicine* 4:1-5). Amyloid deposition can be found in the brain of AD and Down's Syndrome patients as well as in arteries, arterioles, capillaries and veins of the central nervous system. Amyloid deposits can be recognized by the ability to bind dyes such as Congo red and thioflavin S, and form fibrils, including a cross β -pleated sheet confirmation.

The term "amyloidosis" refers to a large heterogeneous group of disorders characterized by aberrant insoluble deposits of normally soluble proteins, which may be misfolded proteins, including protein aggregates.

In addition to Alzheimer's disease (AD), early onset Alzheimer's disease, late onset Alzheimer's disease, and presymptomatic Alzheimer's disease, other diseases characterized by amyloid deposits are, for example, Serum Amyloid A (SAA) amyloidosis, hereditary Icelandic syndrome, multiple myeloma, prion diseases and the like, or other brain amylogenic diseases (Revesz, T. et al. (2003) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 62(9):885-98), may be treated according to compositions and methods set forth herein. The most common

prion diseases in animals are scrapie of sheep and goats and bovine spongiform encephalopathy (BSE) of cattle (Wilesmith and Wells(1991) Curr. Top. Microbiol. Immunol. 172:22-38). Four prion diseases have been identified in humans: (i) kuru, (ii) Creutzfeldt-Jakob disease (CJD), (iii) Gerstmann-Stroussler-Sheinker disease (GSS), and
5 (iv) fatal familial insomnia (FFI) (Gajdusek, D.C. (1977) Science 197(4307):943-60 and Medori, R. et al., (1992) N. Engl. J. Med. 326(7):444-9).

The principal constituent of the senile plaques is the A β peptide. The A β peptide is an internal fragment of 39-43 amino acids of precursor protein APP. Several mutations within the APP protein have been correlated with the presence of Alzheimer's disease (See,
10 e.g., Goate, A. et al., (1991) Nature 349(6311):704-6, Murrell, M. et al., (1991) Science 254(5028):97-9, Mullan, M. et al., (1992) Nat. Genet. 1(5):345-7).

The term " β -amyloid precursor protein" (APP) as used herein is defined as a polypeptide that is encoded by a gene of the same name localized in humans on the long arm of chromosome 21 and that includes A β within its carboxyl third. APP is a
15 glycosylated, single-membrane-spanning protein expressed in a wide variety of cells in many mammalian tissues.

APP mutations are thought to influence the development of Alzheimer's disease by increased or altered proteolytic processing of APP to A β , particularly processing of APP to increased amounts of the long form of A β (i.e., A β 1-42 and A β 1-43). Mutations in other
20 genes, such as the presenilin genes, PS1 and PS2, are thought indirectly to affect proteolytic processing of APP to generate increased amounts of long form A β (see Hardy, J. (1997) Trends Neurosci. 20(4):154-9). These observations indicate that A β , and particularly its long form, is a causative element in Alzheimer's disease.

The term "APP fragments" as used herein refers to fragments of APP other than
25 those which consist solely of A β or A β fragments. That is, APP fragments will include amino acid sequences of APP in addition to those which form intact A β or a fragment of A β .

The terms " β -amyloid peptide" is synonymous with " β -amyloid peptide", " β AP", " β A", and "A β ". All of these terms refer to a plaque forming peptide derived from
30 fragments of amyloid precursor protein.

As used herein, the definition of the terms fibrillar A β and total A β are as follows. "Fibrillar" A β is A β peptide contained in extracellular amyloid deposits which may also be referred to as A β plaques or plaques; in some cases, A β plaques may be further distinguished as diffuse or dense. "Total" amyloid load or total A β load is the sum of soluble and non-soluble (e.g., fibrillar) A β peptide, most of which is presumed to be extracellular. It is appreciated that there is a dynamic relationship between soluble and non-soluble A β , where, extracellular non-fibrillar A β may represent a source of A β which may become fibrillar amyloid.

As used herein, the term Experimental Allergic Encephalomyelitis (EAE) is the primary animal model for MS. EAE can readily be induced in small mammals by immunization with MBP in an appropriate adjuvant or by passive transfer of CD4⁺, MBP-reactive T-cells (Alvord Jr, E. C., et al. eds. in Experimental Allergic Encephalomyelitis a Useful Model for Multiple Sclerosis, A. R. Liss, N.Y., 1984; Makhtarian et al. Nature 309: 356 (1984); Ben-Nun et al. J. Immunol. 129:303 (1982)). The T-cells that induce EAE in both mice and rats recognize peptides corresponding to immunodominant regions of MBP presented by antigen-presenting cells on class II Major Histocompatibility Complex (MHC) molecules.

According to one aspect of the present invention there is provided a method of treating a neurological disease or disorder in a mammal. The method of this aspect of the present invention may be made effective by administering a therapeutically effective amount of GA and a proteosome based composition to a subject in need thereof. A further aspect of the present invention is wherein said neurological disease or disorder is a amyloid plaque-forming disease or disorder. The most prominent neurological diseases or disorders treated with GA and a proteosome based composition according to one aspect of the present invention is Alzheimer's disease and Multiple Sclerosis. In addition to a therapeutic composition of the GA combined with a proteosome for treatment of the aforementioned neurological disease or disorders, further embodiments include, but are not limited to, using the following therapeutic compositions for treatment: a proteosome based composition without a GA composition, GA in a submicron emulsion composition, or GA in a nanoemulsion composition. The previous embodiments would also include any pharmaceutically acceptable diluent, excipient, stabilizer or carrier.

A yet further aspect of the present invention is wherein the treatment of said neurological disease or disorder in a mammal comprises administering a therapeutically effective amount of GA and a proteosome based composition which elicits an antibody independent response in said mammal.

5 A further embodiment of the present invention consists of a method for treating an amyloid disease, which may be Alzheimer's disease. The treatment of amyloid disease may be carried out by, for example, preventing an increase in fibrillar amyloid load, preventing an increase in total amyloid load, maintaining the current fibrillar and/or total amyloid load, or decreasing the fibrillar and/or total amyloid load in the brain.. As it is
10 known that amyloid proteins may reside throughout the body, embodiments of the present invention are not limited to brain amyloid. Furthermore, although the present invention specifically discusses β -amyloid, other amyloid classes such as serum amyloid A (SAA), prion disease, hereditary Icelandic syndrome, Huntington disease, Parkinsonism, Down's Syndrome and cerebral amyloid angiopathy are considered within the current invention.
15 According to the aforementioned amyloid diseases, treatment may be accomplished by administering one of the following therapeutic compositions: a therapeutically effective amount of GA and a proteosome based composition, a proteosome based composition without a GA composition, GA in a submicron emulsion, and/or GA in a nanoemulsion. The previous embodiments would also include any pharmaceutically acceptable diluent,
20 excipient, stabilizer or carrier.

GLATIRAMER ACETATE

An immunochemical analog of MBP that is effective in treating multiple sclerosis (MS) is glatiramer acetate (GA), or copolymer-1 (Cop-1) (U.S. Pat. No. 3,849,550; PCT Application WO/95/31990). GA, in its commercially available form, is a mixture of
25 random synthetic polypeptides composed of L-alanine, L-glutamic acid, L-lysine and L-tyrosine in a molar ratio of 6.0:1.9:4.7:1.0. It was first synthesized as an immunochemical mimic of MBP. For example, certain monoclonal antibodies to GA cross-react with MBP (Teitelbaum et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9258 (1991)). Also, GA has been found to induce T suppressor cells specific for MBP (Lando et al. J. Immunol. 123:2156 (1979)).
30 Experiments in mice indicate that GA also specifically inhibits MBP-specific T cells that are involved in the destruction of central nervous system tissue in EAE (Teitelbaum et al. Proc. Natl. Acad. USA 85:9724 (1995); and Angelov, D.N. et al. PNAS 100(8):4790-4795

(2003)), indicate that GA can be used to treat amyotrophic lateral sclerosis, where induction of a well-regulated autoimmune response appears to influence survival in the presence of an anti-self T-cell response, which may be enhanced by administration of GA.

GA, according to the present invention, may be prepared by methods known in the art. For example, GA may be prepared by the process disclosed in U.S. Pat. No. 3,849,550, wherein the N-carboxyanhydrides of tyrosine, alanine, γ -benzyl glutamate and ϵ -N-trifluoro-acetyllysine are polymerized at ambient temperature in anhydrous dioxane with diethylamine as an inhibitor. The deblocking of the γ -carboxyl group of the glutamic acids is carried out with hydrogen bromide in glacial acetic acid and is followed by the removal of the trifluoroacetyl groups from the lysine residues by 1M piperidine. The resulting mixture of polypeptides consists essentially of polymers of alanine, glutamic acid, lysine, and tyrosine, in a molar ratio of about 6:2:5:1.

GA is also available commercially from Teva Pharmaceuticals, Kfar-Saba, Israel.

GA may be prepared for use according to the instant invention in any of the forms which maintain its therapeutic utility. These include mixtures of peptides having various molecular weight ranges. GA having a desired molecular weight range can be obtained by methods known in the art. Such methods include gel filtration high pressure liquid chromatography of GA to remove high molecular weight species as disclosed in WO 95/31990. In one embodiment, the GA has about 75% of its polymer species within the molecular weight range of about 2 KDa to about 20 KDa. In another embodiment, GA has an average molecular weight from about 4 KDa to 9 KDa. It is understood that GA may be subjected to enzymatic or other degradation in order to comprise polymer species of a length different from, or otherwise modified, from conventional GA according to the known methods.

25 GA AND PROTEOSOMES

GA formulated with proteosomes (e.g., IVX-908 or Protollin) may be administered by, for example, injection or intranasally. When delivered by injection, such delivery may be as one injection (combined simultaneous administration). Alternatively, delivery of a GA composition and a proteosome based composition may be delivered separately, accomplished by injection at a plurality of sites which may occur simultaneously or at temporally distinct times and where one site is presented only with a GA composition (*i.e.*,

no proteosomes) and, at a second site only a proteosome based composition is administered (i.e., no GA). It is also contemplated that GA may be administered by injection while at the same or different time a proteosome based composition is administered, for example, intranasally. Thus, in one embodiment of the instant invention, a GA composition is delivered by injection and separately, a proteosome based composition is delivered intranasally.

GA peptides of the instant invention may also be prepared to contain a hydrophobic anchor sequence moiety which would be expected to enhance non-covalent association with proteosomes. The production and manufacture of proteosome-amphiphilic determinant vaccines designed for either parenteral or especially for mucosal administration including, gastro-intestinal administration to induce both systemic and mucosal antibody responses is discussed in U.S. Pat No. 6,476,201. An amphiphilic determinant is a molecule having hydrophobic and hydrophilic regions which, when appropriately formulated with proteosomes, align with the proteosomes to form a complex which elicits an immunologic response in a subject. Typical amphiphilic determinants include glycolipids, liposaccharides (including detoxified lipopolysaccharides), lipopeptides, transmembrane domains, envelope or toxoided proteins, or proteins or peptides with intrinsic hydrophobic amino acid anchors.

EMULSION COMPOSITIONS

GA can be administered in or formulated with a submicron emulsion or nanoemulsion as described in US Patent 5,961,970 or 5,716,637, respectively. The composition comprises an oil-in-water submicron emulsion with about 0.5 to about 50% of an oil, about 0.1 to about 10% of an emulsifier, about 0.05 to about 5% of a nonionic surfactant, and about 0.00001 to about 1.0% of GA as an aqueous continuous phase. The submicron emulsion has a mean droplet size in the range of between about 0.03 and about 0.5 μm , and preferably 0.05 and 0.2 μm .

The nanoemulsion approach provides vaccine compositions containing nanoemulsions of particles having a lipid core, surrounded by at least one phospholipid bilayer. The particles have a mean diameter in the range of about 10 to about 250 nm, as determined on a weight basis, and the GA is incorporated therein, either intrinsically prior to the homogenization process or extrinsically thereafter. The particles are typically suspended in an aqueous continuous phase and each lipid particle comprises a lipid core,

wherein the lipid is a solid or liquid crystal in bulk at a temperature of about 25°C or higher. Usually the amount of GA entrapped is about 0.001 to about 5%. Alternatively, the GA can be formulated with a proteosome and/or the nanoemulsion can further comprise a bioadhesive or mucoadhesive macromolecule.

5 PROPOSED MECHANISM

The invention also includes, for example, a method for inhibiting or reducing the level of an amyloid- β peptide (soluble and/or non-soluble), fragment or derivative thereof, which comprises immunizing a mammal with GA formulated with a proteosome based composition, or a proteosome based composition without GA, wherein the reduction or
10 inhibition of the peptide, fragment or derivative thereof occurs without the generation of antibodies, as demonstrated herein using B-cell deficient (μ MT) mice, which are incapable of eliciting an antibody response. Although not wishing to be bound by theory, preferably, the inhibition or reduction of amyloid (e.g., A β peptide) is via an activation of immune cells such as brain localized microglia, or neutrophils and/or macrophages which may be found
15 in the brain or peripherally, wherein the activation of these cells is independent of any antibody or antigen-specific mechanism. It is most preferred that the reduction or inhibition occurs without causing Experimental Allergic Encephalomyelitis (EAE) in the mammal (including meningoencephalitis).

The reduction of amyloid load (e.g., A β comprising fibrillar plaques plus non-
20 fibrillar A β that may not be deposited into plaques) relates to the reduction of amyloid deposition and/or A β plaque formation and thereby the treatment of AD and related diseases or amyloidogenic diseases or disorders. Although the various aspects of the invention should not be limited to any particular theory or mechanism, it is believed that activated microglia co-localize with amyloid plaques and the activation of microglial cells is
25 dependent upon the presence of amyloid deposition, which deposition primes the endogenous microglial cells for activation. Thus, activated microglial cells participate in clearing amyloid (e.g., A β plaque) deposits. Additional information on the possible mechanisms for AD is found in Schenk, D. (2002) Nature 3:824-828. Deposition of A β and formation of amyloid plaques appears to be accompanied by a complex inflammatory
30 and neurotoxic cascade. Therefore, it is thought that an anti-inflammatory mechanism of treatment may be beneficial. Such anti-inflammatory processes are often consistent with expression of anti-inflammatory IL-4/IL-10 (Th2) and TGF- β (Th3) immune responses.

Consequently it is a surprising and unexpected finding that the instant formulations comprising proteosome based compositions and GA stimulate a non-antibody mediated immune response that causes the reduction of A β -amyloid containing plaques, as it has previously been proposed that proteosomes are more often associated with the stimulation of a Th1 type immune (cytokine) response associated with a pro-inflammatory immune response and would be appositive to and distinct from a Th2 immune response.

Nevertheless, augmentation of microglial phagocytosis by the Th1-type cytokine INF-gamma (75% above untreated), might also suggest a feedback mechanism for accelerated clearance of the inflammatory infiltrate in the CNS (Cha, A. et. al. (2001) GLIA 33(1):87-95). Furthermore, INF-gamma by itself can also lead to the transcriptional inhibition of the beta-amyloid precursor protein (Ringheem G. E. et al. Biochem Biophys Res Commun (1996) 224(1):246-51).

PROTEOSOME BASED COMPOSITIONS

The subject of US Patents 6,476,201 and 5,961,970 describes how in order for multivalent subunit vaccines to stimulate optimal immune responses to each of the components, the proper components should be appropriately associated and each be available to the immune system so that they may be efficiently recognized and processed by cells of the immune system. Such recognition and processing may include uptake by membranous cells (M-cells) located within, for example, the nasal epithelia and subsequent delivery to underlying cells of the host immune system. Prime examples of such non-covalently complexed vaccines include proteosome based vaccines which can consist of *Neisserial* outer membrane proteins non-covalently complexed to a wide variety of antigens including peptides, lipopeptides, transmembrane or toxoided proteins, polysaccharides or lipopolysaccharides (LPS) (for further review see the following references; US Patent 5,726,292, Immunogenicity and Efficacy of Oral or Intranasal *Shigella flexneri* 2a and *Shigella sonnei* Proteosome-Lipopolysaccharide Vaccines in Animal Models; Infect. Immun. 61:2390; Mallett, C. P., T. L. Hale, R. Kaminski, T. Larsen, N. Orr, D. Cohen, and G. H. Lowell. (1995)); Intranasal or intragastric immunization with proteosome-Shigella lipopolysaccharide vaccines protect against lethal pneumonia in a murine model of shigellosis (Infect. Immun. 63:2382-2386; Lowell G H, Kaminski R W, Grate S et al. (1996)); Intranasal and intramuscular proteosome-staphylococcal enterotoxin B (SEB) toxoid vaccines: immunogenicity and efficacy against lethal SEB intoxication in mice (Infec. Immun. 64:1706-1713; Lowell, G. H. (1990)); Proteosomes, Hydrophobic Anchors,

Iscoms and Liposomes for Improved Presentation of Peptide and Protein Vaccines, (in New Generation Vaccines: G. C. Woodrow and M. M. Levine, eds. (Marcel Dekker, NY) Chapter 12 (pp. 141-160)); and Proteosome-lipopeptide vaccines: enhancement of immunogenicity for malaria CS peptides; (Lowell, G. H., W. R. Ballou, L. F. Smith, R. A. Wirtz, W. D. Zollinger and W. T. Hockmeyer (1988) Science 240:800)).

Proteosome based compositions as used herein refers to preparations of outer membrane proteins (OMPs, also known as porins) from Gram-negative bacteria, such as *Neisseria* species (see, e.g., Lowell et al., J. Exp. Med. 167:658, 1988; Lowell et al., Science 240:800, 1988; Lynch et al., Biophys. J. 45:104, 1984; Lowell, in "New Generation Vaccines" 2nd ed., Marcel Dekker, Inc., New York, Basil, Hong Kong, pages 193, 1997; U.S. Patent No. 5,726,292; U.S. Patent No. 4,707,543), which are useful as a carrier or an adjuvant for immunogens, such as bacterial or viral antigens. Proteosomes prepared as described above also contain an endogenous lipopolysaccharide (LPS) originating from the bacteria used to produce the OMP porins (e.g., *Neisseria* species). Any preparation method that results in the outer membrane protein component in vesicular or vesicle-like form, including multi-molecular membranous structures or molten globular-like OMP compositions of one or more OMPs, is included within the definition of proteosome.

"Liposaccharide" as used herein refers to native or modified lipopolysaccharide or lipooligosaccharide (collectively, also referred to as "LPS") derived from Gram-negative bacteria such as *Shigella flexneri* or *Plesiomonas shigelloides*, or other Gram-negative bacteria (including *Alcaligenes*, *Bacteroides*, *Bordetella*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Chlamydia*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Ehrlichia*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Francisella*, *Fusobacterium*, *Gardnerella*, *Hemophilus*, *Helicobacter*, *Klebsiella*, *Legionella*, *Moraxella*, *Morganella*, *Neisseria*, *Pasteurella*, *Proteus*, *Providencia*, other *Plesiomonas*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Pseudomonas*, *Rickettsia*, *Salmonella*, *Serratia*, other *Shigella*, *Spirillum*, *Veillonella*, *Vibrio*, or *Yersinia* species). It should be noted that LPS as used herein may be non-detoxified or detoxified.

In other embodiments exogenous LPS isolated from the same or different bacteria from which a proteosome was prepared may be mixed therewith; one such proteosome based composition is referred to herein as IVX-908 (may also be referred to as Protollin). In other words, proteosomes of the IVX-908 type are preparations of OMPs admixed with at least one kind of liposaccharide to provide an OMP-LPS composition (which can function

as an immunostimulatory composition). Thus, the OMP-LPS (IVX-908) adjuvant can be comprised of two of the basic components (1) an outer membrane protein preparation of proteosomes prepared from Gram-negative bacteria, such as *Neisseria meningitides*, and (2) a preparation of one or more liposaccharides. It is also contemplated that components of IVX-908 may be or include lipids, glycolipids, glycoproteins, small molecules, or the like.

Proteosome based compositions as disclosed herein may include one or more components which, at least in part, function as an adjuvant possessing the capacity to stimulate a host immune system. It is appreciated that such proteosome components may include an outer membrane protein (OMP) component (fusion protein or fragment thereof) of gram negative bacteria as well as a lipopolysaccharide (LPS) component of a same or different gram negative bacteria. Such components may function as, for example, ligands which stimulate a host immune response by interacting with certain receptors (e.g., Toll-like receptors) produced by one or more host cells of a vaccine recipient.

Without wishing to be bound by theory, one or more components of vaccine formulations disclosed herein may interact with Toll-like receptors (TLRs) associated with an innate and/or adaptive immune response of a vaccine recipient. There are at least 10 TLRs (see Takeda et. al., Annu Rev Immunology (2003) 21:335-76). One or more ligands which interact with and subsequently activate certain TLRs have been identified, with the exception of TLR8 and TLR10. Outer membrane proteins of *Neisseria meningitides*, for example OMP 2 (also referred to as Por B), interacts with TLR2, while LPS of most but not all gram negative bacteria interacts with TLR4. Accordingly, one mechanism by which vaccine formulations described herein may contribute to a biological affect includes activation of one or both of TLR2 and TLR4. However, in another aspect of the instant invention, it is equally possible that activation of other TLRs (other than TLR2 and TLR4) may serve a similar function or further enhance the qualitative and/or quantitative profile of cytokines expressed, and which may be associated with a host Th1/Th2 immune response.

The qualitative and/or quantitative activation of one or more TLRs is expected to elicit or influence a relative stimulation (balanced or imbalanced) of a Th1 and/or Th2 immune response, with or without concomitant humoral antibody response.

Ligands interacting with TLRs other than TLR2 and TLR4 may also be used in vaccine compositions described herein. Such vaccine components may, alone or in combination, be used to influence the development of a host immune response sufficient to

14

treat or protect from amylogenic disease, as set forth herein. Such TLRs and associated ligands include, but are not limited to, those presented in List 1.

List 1

TLR family	Ligands (example of possible source)
TLR1	Soluble factors (<i>Neisseria meningitides</i>) Tri-acyl lipopeptides (bacteria, mycobacteria)
TLR2	Lipoproteins and lipopeptides Porins (<i>Neisseria</i>) Atypical LPS (<i>Leptospira interrogans</i>) Atypical LPS (<i>Porphyromonas gingivalis</i>) Peptidoglycan (Gram-positive bacteria) Lipoteichoic acid (Gram-positive bacteria) HSP70 (host) Glycolipids (<i>Treponema maltophilum</i>)
TLR3	Double-stranded RNA (e.g., viral)
TLR4	LPS (Gram-negative bacteria) Taxol (plant) HSP60 (host) HSP70 (host) HSP60 (<i>Chlamydia pneumoniae</i>) Fibrinogen (host)
TLR5	Flagellin (bacteria)

TLR6	Di-acyl lipopeptides (mycoplasma)
TLR7	Imidazoquinoline (synthetic compounds) Loxoribine (synthetic compounds) Bropirimine (synthetic compounds)
TLR8	Ligand yet to be identified
TLR9	CpG DNA (bacteria)
TLR10	Ligand yet to be identified

Any one or combination of the identified TLRs (List 1) may be activated by any one or combination of TLR ligand components of a vaccine formulation contemplated herein. It is further appreciated that stimulation of any one or multiplicity of TLRs may be accomplished using any one or a multiplicity of TLR ligands at concentrations suitable with the route of administration (e.g., intranasal, injection etc.).

Therefore, according to the instant invention, it is understood that a vaccine formulation may include any one or more TLR ligand(s), including recombinant ligands (fusion proteins or fragments thereof) combined with an antigenic vaccine component, or optionally including CD14 receptor, with or without exogenous addition of a lipopolysaccharide component.

In one aspect of the instant invention only the TLR binding portion of any one or more TLR ligands may be isolated by, for example, recombinant DNA technologies and formulated with or without GA as a therapeutic treatment and/or prophylactic prevention of Alzheimer's Disease or similar disease or disorder. Such a polypeptide may also be prepared by one or another synthetic procedures well known to those of skill in the art. Not wishing to be bound by theory, one such isolated binding domain may be isolated from a portion of *Neisseria meningitidis* outer membrane protein referred to as Porin B which is suspected of binding to TLR2. Other such polypeptide ligand binding domains of TLRs may also be used in similar fashion alone or in one or another combination. Such a formulation may be used with or without the necessity of administering a Proteasome-GA

formulation, or may be used subsequent to administration of a Proteosome-GA formulation. In addition, it is appreciated that a variant (e.g., conservative amino acid substitution) of such a TLR binding portion of a TLR ligand may be used to activate a TLR as long as the variant maintains the ability to bind (and activate) the TLR. In still a further aspect of the instant invention, such a TLR binding portion of a TLR ligand may be reiterated one or more times using recombinant DNA technologies to prepare a polypeptide containing multiple copies of such binding portion, or even multivalent (i.e., hybrid) polypeptides comprising multiple binding domains of the same or different TLR ligands.

In certain proteosome based compositions, one or more of the component parts of the vaccine formulation need not be non-covalently complexed but rather may be mixed with the proteosome composition (e.g., IVX-908, Protollin). Proteosome based compositions termed Projuvant contain only small amounts of endogenous LPS (or lipooligosaccharide (LOS)) while IVX-908/protollin proteosome based compositions contain additional exogenous LPS which may be from the same or different gram negative bacterial species as the OMP components or may be a mixture of LPS derived from more than one gram negative bacteria.

In one embodiment, the final liposaccharide content by weight as a percentage of the total proteosome protein can range from about 1% to about 500%, more preferably in a range from about 20% to about 200%, or in a range from about 30% to about 150% or in a range of about 10% to about 100%. A preferred embodiment of the instant invention is the immunostimulatory composition wherein the proteosome based component is prepared from *Neisseria meningitides* and the final liposaccharide content is between 50% to 150% of the total proteosome protein by weight. The final LPS content may represent the combination of endogenous LPS (e.g., LOS) plus exogenously added LPS (or LOS). In another embodiment, proteosome based compositions (e.g., Projuvant) are prepared with endogenous lipooligosaccharide (LOS) content from *Neisseria* ranging from about 0.5% up to about 5% of total OMP. Another embodiment of the instant invention provides proteosomes with endogenous liposaccharide in a range from about 12% to about 25%, and in a preferred embodiment between about 15% and about 20% of total OMP. The instant invention also provides a composition containing liposaccharide derived from any Gram-negative bacterial species, which may be from the same Gram-negative bacterial species that is the source of proteosomes or from a different bacterial species.

U.S. Patent 6,476,201 relates to the production and manufacture of proteosome-amphiphilic determinant vaccines designed for either parenteral or mucosal administration to induce both systemic (serum) and mucosal (including respiratory and intestinal) antibody responses. Mucosal administration is preferred, and includes, but is not limited to, respiratory (e.g. including intranasal, intrapharyngeal and intrapulmonary), gastro-intestinal (e.g. including oral or rectal) or topical (e.g. conjunctival or otic) administration. An amphiphilic determinant is a molecule having hydrophobic and hydrophilic regions which, when appropriately formulated with proteosomes, align with the proteosomes to form a complex which elicits an immunologic response in a subject. Typical amphiphilic determinants include glycolipids, liposaccharides (including detoxified lipopolysaccharides), lipopeptides, transmembrane, envelope or toxoided proteins, or proteins or peptides with intrinsic hydrophobic amino acid anchors. These determinant materials can be obtained from gram negative bacteria including *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Hemophilus*, *Brucella*, *Shigella* and *Neisseria*. More specifically, the proteosome vaccines in which meningococcal outer membrane protein proteosome preparations (prepared from any strain of *N. meningitides* or *N. gonorrhea* or other *Neisserial* species) are non-covalently complexed to native or detoxified *Shigella* or *Neisserial* lipopolysaccharides or lipooligosaccharides to form vaccines are designed to protect against diseases caused by gram negative organisms that contain any of the component parts of the complex including *Meningococci* or *Shigellae*. More specifically, the proteosome vaccines contain LPS that induce antibody responses that recognize type-specific somatic polysaccharide O-antigens of *Shigella* lipopolysaccharides and thereby confer homologous protection against shigellosis. The lipopolysaccharides, when complexed to proteosomes, induce anti-*shigella* protective immune responses. The proteosome vaccines are prepared and purified from either *Shigella sonnei* or *Plesiomonas shigelloides* for immunity against *Shigella sonnei* disease, from *Shigella flexneri* 2a for immunity to *Shigella flexneri* 2a disease, and so forth, using LPS derived from homologous or antigenically cross-reacting organisms to confer homologous immunity against shigellosis caused by *S. flexneri* 2a (or 3a etc.), *S. boydii*, *S. sonnei* etc. Further, US Patent 6,476,201 describes the administration of proteosome-*Shigella* vaccines that are multivalent in that two independently made proteosome vaccines using *shigella* LPS antigen derived from *S. flexneri* 2a (for *S. flexneri* 2a disease) and from *P. shigelloides* or *S. sonnei* (for *S. sonnei* disease) are administered together thereby inducing antibodies that recognize the two organisms and thereby conferring protection against the two types of diseases.

Furthermore, a proteosome-*Shigella* LPS vaccine, in which proteosomes from group B type 2b meningococci are complexed to *P. shigelloides* LPS using hollow fiber diafiltration technology to produce a vaccine administered by mucosal respiratory and/or gastrointestinal routes and to induce antibodies that recognize the somatic O-antigen LPS of *S. sonnei*, are thereby used to protect against shigellosis.

An exemplary but non-limiting proteosome based composition of the present invention is proteosome based mucosal adjuvant IVX-908 (Protollin) which is a non-covalent formulation of *Neisseria meningitides* outer membrane proteins (proteosomes) and exogenously added LPS prepared from *Shigella flexneri*.

10 FORMULATION AND ADMINISTRATION

Hereinafter, the phrases "physiologically acceptable carrier" and "pharmaceutically acceptable carrier" which may be interchangeably used refer to a carrier or a diluent that does not cause significant irritation to an organism and does not abrogate the biological activity and properties of the administered compound.

15 Herein the term "excipient" refers to an inert substance added to a pharmaceutical composition to further facilitate administration of an active ingredient. Examples, without limitation, of excipients include calcium carbonate, calcium phosphate, various sugars and types of starch, cellulose derivatives, gelatin, vegetable oils and polyethylene glycols.

Techniques for formulation and administration of drugs may be found in
20 "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, Pa., latest edition.

Suitable routes of administration may, for example, include oral, rectal, transmucosal, transnasal, intestinal or parenteral delivery, including intramuscular, subcutaneous and intramedullary injections as well as intrathecal, direct intraventricular, intravenous, intraperitoneal, intranasal, or intraocular injections, but the preferred route of
25 administration for proteosomes is intranasally.

GA formulations comprising proteosome based compositions, or in submicron emulsions or nanoemulsions can be administered parenterally, orally, intranasally, or topically, or, as indicated herein, in any combination thereof. Although in certain embodiments it is preferable to administer them parenterally or mucosally.

Dual or multiple routes of administration are also included herein. Dual routes of administration may include, for example, proteosome based preparations prepared and administered intranasally but separately from GA which may be administered by injection at the same time or at a time different from intranasal administration of proteosomes.

5 Proteosome (Projuvant) or proteosome:LPS (i.e., IVX-908) compositions (in the absence of GA) may also be administered by injection simultaneously with GA or at a different time. For injection, the active ingredients of the invention may be formulated in a physiologically acceptable carrier, preferably in physiologically compatible buffers such as Hank's solution, Ringer's solution, or physiological salt buffer. For transdermal and possibly transmucosal
10 administration, penetrants appropriate to the barrier to be permeated may be used in the formulation. Such penetrants are generally known in the art.

For oral administration, the compounds can be formulated readily by combining the active compounds with pharmaceutically acceptable carriers well known in the art. Such carriers enable the compounds of the invention to be formulated as tablets, pills, dragees,
15 capsules, liquids, gels, syrups, slurries, suspensions, and the like, for oral ingestion by a patient. Pharmacological preparations for oral use can be made using a solid excipient, optionally grinding the resulting mixture, and processing the mixture of granules, after adding suitable auxiliaries if desired, to obtain tablets or dragee cores. Suitable excipients are, in particular, fillers such as sugars, including lactose, sucrose, mannitol, or sorbitol;
20 cellulose preparations such as, for example, maize starch, wheat starch, rice starch, potato starch, gelatin, gum tragacanth, methyl cellulose, hydroxypropylmethyl-cellulose, sodium carbomethylcellulose; and/or physiologically acceptable polymers such as polyvinylpyrrolidone (PVP). If desired, disintegrating agents may be added, such as cross-linked polyvinyl pyrrolidone, agar, or alginic acid or a salt thereof such as sodium alginate.

25 For nasal administration, the active ingredients for use according to the present invention may be conveniently delivered in the form of, for example, an aerosol spray presentation from a pressurized pack or a nebulizer with the use of a suitable propellant, e.g., dichlorodifluoromethane, trichlorofluoromethane, dichloro-tetrafluoroethane or carbon dioxide. In the case of a pressurized aerosol, the dosage unit may be determined by
30 providing a valve to deliver a metered amount. Capsules and cartridges, made of gelatin for example, for use in a dispenser may be formulated to contain a powder mix of the compound and a suitable powder base such as lactose or starch.

17

The preparations described herein may be formulated for parenteral administration, e.g., by bolus injection or continuous infusion. Formulations for injection may be presented in unit dosage form, e.g., in ampoules or in multidose containers with optionally, an added preservative. The compositions may be suspensions, solutions or emulsions in oily or aqueous vehicles, and may contain formulatory agents such as suspending, stabilizing and/or dispersing agents.

The pharmaceutical compositions of the present invention can be administered for prophylactic and/or therapeutic treatment of diseases related to the production of and/or deposits of amyloid (e.g., A β) anywhere in the subject's body, but especially in the brain. In therapeutic applications, the pharmaceutical compositions are administered to a mammal already suffering from the disease and in need of treatment. The pharmaceutical compositions will be administered in an amount sufficient to inhibit or reduce further deposition of A β into plaque and/or clear already formed plaque and/or to stimulate removal of already existing A β aggregates, and/or stimulate a reduction in A β that may not be contained in plaques. An amount adequate to accomplish this is defined as a "therapeutically effective dose or amount."

For prophylactic applications, the pharmaceutical compositions of the present invention are administered to a mammalian subject susceptible to an amyloid related disease (e.g., A β related Alzheimer's disease), but not already suffering from such disease. Such mammalian subjects may be identified by genetic screening and clinical analysis, as described in the medical literature (e.g. Goate (1991) Nature 349:704-706). The pharmaceutical compositions will be able to inhibit, prevent or reduce amyloid deposition of, for example, A β into plaque at a symptomatically early stage, preferably preventing even the initial stages of the β -amyloid related disease. The amount of the compound required for such prophylactic treatment, referred to as a prophylactically-effective dosage, may, but not necessarily, be generally the same as described above for therapeutic treatment.

For purposes of this specification and the accompanying claims the terms "patient", "subject" and "recipient" are used interchangeably. They include humans and other mammals (e.g., cow and other bovine) which are the object of either prophylactic, experimental, or therapeutic treatment.

As used herein the term "treating" includes substantially inhibiting, slowing or reversing the progression of a disease, substantially ameliorating clinical symptoms of a

disease or substantially preventing the appearance of clinical symptoms of a disease, in a statistically significant manner.

Depending on the severity and responsiveness of the condition to be treated, dosing can be of a single or a plurality of administrations at one or a plurality of sites or delivery means, with the course of treatment lasting from several days to several weeks or until cure is effected or a statistically significant diminution of the disease state is achieved. The amount of a treatment to be administered will, of course, be dependent on the subject being treated, the severity of the affliction, the manner of administration, the judgment of the prescribing physician, etc. Methods for calculating statistical significance are known in the relevant art.

"Treatment" of MS is intended to include both treatment to prevent or delay the onset of any manifestation, clinical or subclinical, e.g., histological, symptoms thereof of Multiple Sclerosis, as well as the therapeutic suppression or alleviation of symptoms after their manifestation by abating autoimmune attack and preventing or slowing down autoimmune tissue destruction. "Abatement", "suppression" or "reduction" of autoimmune attack or reaction encompasses partial reduction or amelioration of one or more symptoms of the attack or reaction. A "substantially" increased suppressive effect (or abatement or reduction) of the "autoimmune reaction" means a significant decrease in one or more markers or histological or clinical indicators of MS. Non-limiting examples are a reduction by at least 1 unit in limb paralysis score.

GA is generally administered to treat MS in a dose of 0.01 mg to 1000 mg/day. In one embodiment a dosage in the range of 0.5-50 mg is employed. However, according to one aspect of the instant invention it is anticipated that the use of one or more adjuvants set forth herein (or combination thereof) may be formulated with a composition comprising GA whereby lower or higher doses or frequency of administration of GA may be permitted and that it is not necessary that the dose of GA be effective by itself.

Establishing the effective dosage range as well as the optimum amount is well within the skill in the art in light of the information given in this section. For example, dosages for mammals, and human dosages in particular are optimized by beginning with a relatively low dose of GA (e.g., 1 mg/day), progressively increasing it (e.g., logarithmically) and measuring a biological reaction to the treatment; for example, (i) measuring induction of regulatory cells (CD4⁺ and/or CD8⁺) (Chen, Y. et al., Science, 255: 1237 (1994)); (ii) measuring reduction in class II surface markers on circulating T-cells; (iii)

18

measuring the number of TGF- β expressing cells or the relative amount of detectable TGF- β ; (iv) assessing the number and activation of immune attack T-cells in the blood (e.g., by limiting dilution analysis and ability to proliferate); or, (v) by scoring the disease severity, according to well-known scoring methods (e.g., by measuring the number of attacks, joint swelling, grip strength, stiffness, visual acuity, ability to reduce or discontinue medication). An effective dosage is any dose that causes at least a statistically or clinically significant attenuation in one of these markers and preferably one that attenuates at least one symptom characteristic of MS during the dosing study.

Assessment of the disease severity in MS can be accomplished according to well-known methods depending on the type of disease. Such methods include without limitation: severity and number of attacks over a period of time; progressive accumulation of disability (which can be measured, e.g., on the Expanded Disability Status Scale); number and extent of lesions in the brain (as revealed, e.g., by magnetic resonance imaging); and frequency of autoreactive T-cells.

Having now generally described the invention, the same will be more readily understood through reference to the following examples which are provided by way of illustration, and are not intended to be limiting of the present invention, unless specified.

EXAMPLES

Amyloid precursor protein (APP) transgenic mice were immunized with myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) peptide (amino acids 35-55) in complete Freund's adjuvant (CFA) with subsequent administration (injection) of pertussis toxin (PT) to determine their susceptibility to Experimental Allergic Encephalomyelitis (EAE) compared to their non-transgenic littermates. As controls, animals were immunized with bovine serum albumin (BSA) or human β -amyloid peptide ($A\beta$ amino acids 1-40). EAE developed to an identical degree in APP transgenic animals (Mucke et al., Ann NY Acad Sci (777) 82-88 (1996)) and their non-transgenic littermates, and no EAE was observed in animals immunized with $A\beta$ 1-40 or with BSA. However, when the brains were examined neuropathologically, there was less staining for $A\beta$ in animals that developed EAE. By quantifying the amount of staining for $A\beta$ fibril in the hippocampus using thioflavin S, a 92% reduction in the MOG-immunized mice was found vs. controls ($p=0.001$) and a 73% reduction compared to mice immunized with $A\beta$ 1-40 ($p=0.03$) (See Table 1, Fig 1). By quantifying total brain $A\beta$ content by ELISA, a 94% reduction in $A\beta$ in MOG-immunized

animal was determined as compared to control groups ($p<0.001$) and an 86% reduction when compared to A β 1-40 immunized mice ($p=0.03$) (See Table 1, Fig 1).

In order to determine whether the effect was unique to MOG-induced EAE, EAE was induced with proteolipid protein (PLP) peptide (amino acids 139-151) in CFA. A 76% reduction of staining for A β fibrils was found and a 70% reduction in A β levels in animals with PLP induced EAE ($p<0.02$) (See Table 2, Fig 3A). In order to induce EAE with PLP, Tg2576 mice as described by Hsiao, K. et al., Science 274 (5284):99-102 (1996) were utilized, which are on a B6/SJL background. Similar results were found with Tg2576 mice and J20 immunized mice described by Mucke et al., Ann NY Acad Sci (777) 82-88 (1996), to induce MOG-EAE (See Table 1). These results demonstrate that the observation was not related to the antigen used for EAE induced or the animal model of AD studied, nor the genetic background of the animal, nor the gender (50% male/female). No changes were observed in animals immunized with BSA in CFA. Of note, there was no difference in the total A β (amyloid) load in J20 mice greater than 13 months in age when compared to Tg2576 mice greater than 16 months of age.

In previous studies of immune approaches for the treatment of the mouse model of AD in which animals were immunized with A β peptide formulated in CFA, anti-aggregating β amyloid antibodies have been shown to have a role both *in vitro* by Solomon, B. et al, Proc Natl Acad Sci 94:4109-12 (1997), and *in vivo* by Weiner, H. L. et al., Ann Neurol 48, 567-79 (2000), and Schenk, D. et al., Nature 400, 173-7 (1999), in reducing amyloid load, and their activity has been linked to a specific epitope in the N-terminal region of A β (Frenkel, D. et al., Neuroimmunol 88, 85-90 (1998), and Frenkel, D. et al., Proc Natl Acad Sci U S A 97, 11455-9 (2000)). Antibody levels were measured against A β in animals immunized with MOG or PLP to determine if there was cross reactivity with A β and A β antibody titers as compared to those from animals immunized with A β . As shown in Tables 1 and 2, anti-A β antibodies in animals immunized with MOG or PLP were not detected. To definitively establish that antibodies were not playing a role, 16-month-old J20 mice bred to μ MT B-cell deficient mice were immunized with MOG 35-55 in CFA followed by administration of Pertussis toxin. As shown in Table 1 and Figure 1, μ MT B-cell deficient APP+ mice, had a 90% reduction in amyloid compared to control as measured by either ThS staining ($p<0.001$) or by ELISA for total brain amyloid ($p<0.001$). These

results indicate that the reduction of A β following MOG immunization occurred by an antibody independent mechanism.

Previous studies have suggested that activated microglia may play an important role in clearing A β in vivo (Schenk, D. et al., *Nature* 400, 173-7 (1999), Rogers, J. et al., *Glia* 40, 260-9 (2002), Mitrasinovic, O.M. et al., *Neurobiol Aging* 24, 807-15 (2003), Webster, S.D. et al., *Exp Neurol* 161, 127-38 (2000), Bacskai, B.J. et al., *J Neurosci* 22, 7873-8 (2002), Nicoll, J.A. et al., *Nat Med* 9, 448-52 (2003), Akiyama, H. & McGeer, P.L., *Nat Med* 10, 117-8; author reply 118-9 (2004)). Activated microglia (or microglia-like cells) may be further distinguished based upon being brain derived or originating from outside the brain, i.e., peripherally, such as neutrophils and macrophages. Procedures to distinguish brain derived microglia from peripheral neutrophils and macrophages are known in the art. To investigate the potential role of microglia activation in A β clearance, the brains of APP tg mice immunized (by foot pad injection or intranasally) with MOG/CFA were stained with CD11b, a marker of activated microglia. As shown in Figures 3A and 4 and Table 4 immunostaining of the hippocampus of APP tg MOG-immunized mice revealed increased numbers of activated microglia (349 ± 34.3 cells/hippocampus region) which co-localized with amyloid plaques (Table 4). Only minimal staining was observed in control animals immunized with BSA/CFA (76 ± 17 cells/hippocampus region) (Table 4). Intermediate levels of microglia activation were observed in animals immunized with A β /CFA (106 ± 27 cells/hippocampus region). Furthermore, increased levels of microglia activation were also observed in μ MT B-cell deficient mice ($p < 0.001$), and animals immunized with PLP ($p < 0.001$) (Fig. 3A, Table 4).

According to the first series of experiments described just above, administration of MOG/PLP plus CFA (followed by administration of pertussis toxin) was associated with a reduction of A β but was coincident with unwanted EAE. In these experiments pertussis toxin is used to open the blood-brain barrier for delivery of CFA formulated compounds into the brain. Therefore, in order to evaluate whether the reduction in A β was directly related to the induction in EAE and since MOG, PLP and GA have been studied in relation to MS related EAE, the effects of immunization of APP mice with glatiramer acetate (GA), which is a random amino acid copolymer of alanine, lysine, glutamic acid, and tyrosine that is effective in suppression of EAE and is an approved and widely used treatment for

relapsing forms of MS (Teitelbaum, D. et al., J. Neural Transm Suppl 49, 85-91 (1997)) were evaluated.

Although as initially performed, administration of certain antigen/adjuvant mixtures provided herein is followed by an administration (injection) of pertussis toxin; it is fully appreciated that certain other compositions described herein may be administered without administration of pertussis toxin. Indeed, proteosome based compositions such as IVX-908 with or without GA are administered without the administration of pertussis toxin. In fact, pertussis toxin was not used at any time for the nasal delivery of any proteosome based composition described herein.

Mice were thus immunized (by foot pad injection) with 100 µg GA in CFA and immediately thereafter and at 48 hours received an i.p. injection of 150 ng of pertussis toxin. Fifty days post immunization, mice were sacrificed. Glatiramer acetate immunization led to a 92% reduction in amyloid fibril in the hippocampus region vs. untreated controls ($p<0.01$) and a 70% reduction of total amyloid load ($p<0.01$) (See Table 1, Fig 1). There was no clinical EAE in animals immunized with GA/CFA plus pertussis toxin.

As CFA cannot be administered to human subjects, the effect of nasal vaccination with glatiramer acetate in a mouse model of AD with adjuvants other than CFA was investigated; animals were treated with nasally administered glatiramer acetate alone or together with a mucosal adjuvant. A proteosome based mucosal adjuvant IVX-908 (Protollin) comprised of a non-covalent formulation of *Neisseria meningitidis* outer membrane proteins (proteosomes) and LPS from *Shigella flexneri*, which has been used both in humans (Fries, L.F., et al., Infect Immun 69:4545-53 (2001)) and mice (Plante, M. et al., Vaccine 20, 218-25 (2001)), was prepared. Mice received multiple treatments of the proteosome adjuvant the first week and then were boosted on a weekly basis for the next five weeks after which neuropathologic analysis was performed. As controls, animals were nasally treated with IVX-908+BSA, IVX-908 alone or GA alone. Unexpectedly, nasal administration of GA formulated with IVX-908 resulted in an 84% reduction of thioflavin-positive fibrillar amyloid in the hippocampus ($p<0.001$ vs. control) and reduction of 70% compared to IVX-908 alone ($p<0.01$) (Table 3). In terms of total brain A β levels, a 73% reduction was observed following nasal administration of glatiramer acetate in IVX-908 ($p<0.001$ vs. control) and a 45% reduction using IVX-908 alone ($p<0.002$) (Table 3, Figure

VP

2). In addition, activated microglia were detected surrounding the amyloid plaques in treated animals. Nasal administration of GA alone did not affect A β fibrils though there was a slight reduction of total A β levels in the brain ($p=0.044$ vs. control). Nasal administration of BSA+IVX-908 or IVX-908 alone resulted in a 50% reduction of total amyloid load ($p=0.02$ vs. control) although there was no effect on fibrillar A β staining. As opposed to injection with CFA, nasal administration of IVX-908 alone or as formulations with GA or BSA did not induce EAE in any animal in these experiments.

No microglial activation in APP non-transgenic mice was found in any of the immunization protocols: parenterally with CFA/PT plus GA, nasally with IVX-908 plus GA (See Fig 3B), or nasally with IVX-908 alone. These results suggest that the activation of microglia following administration (immunization) with GA formulated with IVX-908 or IVX-908 alone may be dependent on the presence of amyloid deposition which may serve to prime endogenous microglia for activation.

Although there is no known cross-reactivity between GA and A β and we did not observe anti-A β antibodies in either GA treated or EAE animals, it is possible that immunization with GA+IVX-908 could have resulted in priming of A β reactive T cells. We measured T cell proliferative responses and cytokine production (IL-2, IFN- γ , IL-6) after 7 weeks of weekly treatment with GA+IVX-908 (at which time the experiment was terminated) by stimulating splenic T cells with A β (1-40). We found no priming of A β reactive T cells as measured by proliferation: Counts per minute to A β for untreated = 3315 ± 1682 cpm; for GA+IVX-908 = 4516 ± 1412 cpm (background counts were 100-300). Stimulation index (GA+IVX-908/untreated) = 1.37; a minimal stimulation index of greater than 2.5 is considered positive. Furthermore, we did not find secretion of IL-2, IFN- γ , IL-6 above background in these cultures. This lack of T cell response to A β is consistent with our not detecting anti-A β antibodies as T cell help is required for production of antibodies. Similarly, we did not find priming to A β in EAE animals.

To examine the effect of GA+IVX-908 treatment on other brain sites besides the hippocampus, we investigated the olfactory bulb and the cerebellum. We stained the olfactory bulb for A β , CD11b and fibrinogen and obtained similar results as those observed in the hippocampus (Figure 8). Following nasal administration of GA+IVX-908 we found an increased number of activated microglia as compared to control. The activation also

occurred in animals with EAE, but was associated with leakage in the blood brain barrier (BBB) as measured by staining for fibrinogen.

When we examined the cerebellum, we did not find increased activation of microglial staining in GA+IVX-908 treated animals suggesting that the increased activation is restricted to areas with A β deposition. Furthermore, no activation of microglia was observed anywhere in the brains of non-transgenic littermates following GA+IVX-908 which further demonstrates that the increased activation is restricted to areas with A β deposition (see Figure 3b).

To better understand the mechanism of the clearance we observed, we stained for CD68 expression, which is highly expressed on activated macrophages from the periphery as opposed to brain microglia. As shown in Figure 9, we obtained higher staining for CD68 in animals with EAE as compared to those treated with GA+IVX-908. This pattern of staining shows the migration of macrophages from the choroids plexus to the surrounding brain parenchyma including the cerebellum and cortex. In GA+IVX-908 treatment, there is increased expression of CD68 primarily in the choroids plexus space. This suggests that the CD11b+ cells responsible for clearance of A β in animals with EAE migrate to the CNS from the periphery and are associated with neuronal toxicity whereas the CD11b+ cells in GA+IVX-908 treated animals are primarily endogenous microglial cells and are associated with clearance of A β without evidence of direct toxicity. As further support for this interpretation, we found that there is increased expression of CD68+ cells in the cerebellum of animals with EAE but not in GA+IVX-908 or untreated animals (not shown). Moreover, activated CD11b+ cells following GA+IVX-908 treatment were only found in regions where there was accumulation of amyloid.

As shown in Table 4 and Figure 4, the reduction of A β fibrils in the hippocampus was strongly correlated with increased numbers of both activated microglial cells, as shown by CD11b staining, ($r=-0.7$ CD11b vs. A β fibrils), and IFN- γ vs. A β fibrils). There was a strong correlation between CD11b cells and IFN- γ cells we observed increased numbers of microglia immunoreactive for macrophage colony-stimulating factor receptor (M-CSFR) in treated animals as compared to control ($p<0.02$) (Table 4). We observed a reduction in TGF- β and the percentage of A β fibril in the hippocampus region ($r=0.91$). No significant changes were observed in IL-10 immunoreactive cells between control and GA+IVX-908 treated animals though animals with EAE had less IL-10 than controls.

21

The following experiments were performed in order to evaluate whether treatment with GA plus IVX-908 induces neuronal cell toxicity or other potential negative effects: i) determine the level of GFAP, a measure of astrocytosis (toxicity) consistent with neuronal cell damage; ii) measure the expression level of SMI32, a marker for the phosphorylation of neurofilaments and known to increase with neuronal cell damage; iii) conduct a TUNEL assay as a means of measuring apoptotic cell death; iv) and determine the level of iNOS, an enzyme shown to be up-regulated under conditions of neuronal cell stress.

Results from the GFAP assay show that astrocytosis occurred in control untreated animals (area of activated astrocytes in hippocampus as measured by GFAP+ cells) (Figure 5). Astrocytosis was reduced in GA+IVX-908 given nasally (3.1%; $p=0.039$ vs. control). In contrast, there was no reduction in astrocytosis in EAE animals. These results indicate that clearance of A β as a consequence of treatment with GA+IVX-908 is less toxic (associated with less astrocytosis) than that observed in animals with EAE even though EAE is also associated with a reduction in A β deposits.

Results from experiments measuring SMI32 (Figure 6) show that SMI32 positive cells having an abnormal ovoid morphology are associated with neuritic plaques in untreated control animals. Animals with EAE show an increase in the number of SMI32 positive cells with an abnormal ovoid morphology throughout the brain (in association with inflammation) including the cerebellum (although no neuritic plaques were observed). In contrast, animals treated with GA+IVX-908 show a reduction in the number of SMI32 positive cells (with an abnormal ovoid morphology) associated with neuritic plaques. These experiments suggest that GA+IVX-908 treatment is not associated with toxicity as measured by SMI32.

Results from experiments measuring apoptotic cell death using a standard TUNEL assay (Figure 6) show no TUNEL staining in control animals and increased TUNEL staining in the cortex of EAE animals. No TUNEL staining was observed in GA+IVX-908 treated animals. In addition, assays measuring iNOS indicate that iNOS is up-regulated in mice with EAE but not in animals treated with GA+IVX-908. No damage to vascular structures was detected in either GA-IVX-908 treated or EAE animals.

Collectively, these data indicate that even though there was clearance of A β in animals with EAE as well as in animals treated with GA +IVX-908, the latter was not associated with neuronal cell toxicity (Table 4 and Figure 6).

However, although activation of microglia following immunization with IVX-908 alone appears to require the presence of A β deposits, such immunization did not result in removal of such A β deposits (by activated microglia), but rather there was a preferential reduction in the amount of total amyloid burden. Such results may suggest the possibility that there are two populations of microglia which may be activated, or, as an alternative possibility, that microglia may be activated to different degrees, partially or fully, where fully activated microglia are capable of removing pre-existing A β plaques, and partially activated microglia participate in sequestration of soluble A β peptide. In consideration of the notion that soluble A β aggregates into insoluble A β plaques, such treatment with IVX-908 alone may slow or prevent continued formation of A β plaques, having benefit to a disease bearing subject.

Table 4 and Figure 3B, demonstrate that the reduction of A β fibrils in the hippocampus was correlated with an increased number both of activated microglial cells (as shown by CD11b+ immunohistochemical staining) and of IFN- γ secreting cells. In addition, there were increased numbers of macrophage colony-stimulating factor receptor (M-CSFR) positive microglia. It has been reported that increased expression of M-CSFR on mouse and human microglia accelerate phagocytosis of aggregated amyloid both through macrophage scavenger receptors and by increasing microglial expression of FcR gamma receptors (Mitrasinovic, O.M. & Murphy, G.M., Jr., *Neurobiol Aging* 24, 807-15 (2003)). However, clearance of amyloid in the μ MT B-cell deficient mice also had increased staining for M-CSFR, therefore the observed effects are via a non-Fc-mediated mechanism (Bacsikai, B.J. et al., *J Neurosci* 22, 7873-8 (2002)). In association with increases in IFN- γ , a reduction in TGF- β expression was observed, suggesting that TGF- β somehow modulates the ability of soluble A β to aggregate into plaques, and it is further believed that TGF- β is associated with increased amyloid deposition (Wyss-Coray, T. et al., *Nature* 389, 603-6 (1997)). The decrease in TGF- β also may facilitate amyloid clearance. No significant changes were observed in IL-10 expression. Microglial activation might be associated with increased numbers of T cells, which may have played a role in promoting microglial activation as there was a correlation between numbers of T cells and numbers of IFN- γ secreting cells.

In order to confirm that the CD11b+ cells detected in these experiments were activated macrophages or microglia and not neutrophils, samples were incubated with a

22

monoclonal antibody recognizing F4/80, a cell surface structure that can be detected on the surface of activated macrophages and microglia but not on neutrophils (polymorphonuclear leukocytes). The expression of F4/80 increases with maturation of macrophages and microglia. The results of these experiments indicate that all CD11b+ cells detected in these experiments also stained positive for F4/80 (not shown), thereby indicating that these CD11b+ cells were activated macrophages or microglia, not neutrophils. In addition, the CD11b+ cells that co-localized with A β plaques by H&E staining (Figure 4) have a mononuclear morphology and not the polymorphonuclear morphology characteristic of neutrophils.

In yet another series of experiments it was shown that microglia cell activation following nasal administration of GA + IVX-908 correlated with an increase in the number of T cells, as determined by CD3 staining. These results suggest a possible role for T cells in promoting microglia cell activation, as there was a correlation between the number of T cells and the number of IFN- γ secreting cells detected $r=0.88$ (Table 4). Additionally, it has been reported that TGF- β may either increase or reduce A β fibril formation in APP tg-mouse Wyss-Coray, T. et al *Nature* 389, 603-6 (1997); Wyss-Coray et al. *Nat. Med.* 7:612-8 (2001). In the experiments reported here, a reduction in TGF- β expression was observed in MOG ($p<0.001$) and GA+IVX-908 ($p<0.001$) treated mice compared to control (Table 4); there was a strong correlation in the reduction TGF- β and the percentage of A β fibrils in the hippocampus region ($r=0.95$). No significant changes were observed in IL-10-immunoreactive cells (not shown).

A decrease in the level of total brain A β was found when IVX-908 alone was given nasally (Table 3) ($p=0.02$ vs. untreated), but unlike IVX-908 formulated with GA, there was no effect of IVX-908 alone on clearance of thioflavin positive A β fibrils. IVX-908 is a proteosome based adjuvant composed of *N. meningitides* outer membrane proteins (OMPs) and exogenously added lipopolysaccharide (LPS). *Neisseria meningitidis* OMP 2 (porin B) and LPS/LOS are known to interact with TLRs displayed on the surface of certain cell types concerning the innate and/or adoptive immune system. It is possible that such interactions are required, at least in part, for the observed activity of IVX-908 and/or GA formulated with IVX-908, as set forth herein. The effect observed with IVX-908 may be related to reports that direct injection of LPS into the hippocampus can cause a reduction of non-fibril A β load but not fibril A β deposits (DiCarlo, G. et al., *Neurobiol Aging* 22, 1007-12

(2001)). However, it must be noted that the route of administration in these experiments, direct injection into the brain, is dramatically distinct from the nasal route of administration for delivery of proteosome based formulations described herein. Contrastingly, other reports indicate that although LPS (inflammation) given intraperitoneally may stimulate the activation of microglial cells, an increase in total amyloid was also observed, LPS-induced neuroinflammation increases the intracellular accumulation of amyloid precursor protein and A β peptide (Sheng et al., *Neurobiology of Disease* 14:133-145 (2003), and references cited therein). Furthermore, it is appreciated that direct injection of LPS is expected to be toxic.

In experiments discussed above, CD11b⁺ cells were shown to be activated microglia or macrophages but not neutrophils by the absence of F4/80 signal. However, in order to determine if these CD11b⁺ cells could be further distinguished as an activated microglia as opposed to an activated macrophage, samples were evaluated for the presence of CD68, a cell marker that is highly expressed on activated macrophages from the periphery but is not highly expressed on the surface of microglia cells originating from the brain. As shown in figures 8 and 9, we obtained higher staining for CD68 (macrophage are CD11b⁺ and CD68⁺) in EAE animals compared to samples derived from animals treated with GA+IVX-908; indicating that these CD11b⁺ CD68⁺ cells are macrophages which have migrated into the brain parenchyma, including the cerebellum and cortex, from the periphery (subarachnoid space). In contrast, following GA-IVX-908 treatment, there is an increase in CD68 expressing macrophage, but these cells remain primarily localized to the subarachnoid space. The results from these experiments suggest that the CD11b⁺ cells implicated in the clearance of A β in EAE animals migrate into the CNS from the periphery and are associated with neuronal toxicity; whereas, the CD11b⁺ cells detected following GA-IVX-908 treatment are primarily endogenous microglia cells and are associated with clearance of A β without evidence of direct toxicity. To further support this interpretation, we found that there is increased expression of CD68⁺ cells in the cerebellum of EAE animals but not in GA-IVX-908 treated or untreated animals (data not shown). Moreover, the activated CD11b⁺ cells following GA-IVX-908 treatment were only found in regions where there was an accumulation of amyloid.

We also found increased levels of A β in the serum of animals administered GA+IVX-908 as compared to untreated animals, suggesting that GA+IVX-908 leads to clearance of A β from the brain regions and that this A β may then be found in the periphery.

23

However, such a redistribution of A β was not observed in animals having EAE, which, as described above, may relate to the source of activated CD11b+ cells. In addition, the number of CD11b+ CD68+ activated macrophage lining brain capillaries and the choroid plexus was increased in animals administered GA-IVX-908 compared to untreated animals (Figure 9). These findings are consistent with the elevated levels of A β detected in serum samples obtained from GA-IVX-908 treated animals, and a concomitant decrease in amyloid angiopathy in GA-IVX-908 treated animals in association with CD11b+ cells (Figure 8).

Unexpectedly, it appears the final common pathway of amyloid (e.g., A β plaque) clearance may be via activated microglia. In EAE, IFN- γ Th1 type myelin reactive T cells are apparently activated in the periphery by immunization with MOG or PLP plus CFA and these T cells migrate to the brain where they release IFN- γ (a Th1 cytokine) and activate microglia. As a consequence, encephalomyelitis and paralysis of animals is caused by the damage to myelin and underlying axons. Immunization with BSA/CFA in the periphery does not lead to A β clearance, as BSA specific Th1 type cells do not accumulate in the brain. Peripheral immunization with glatiramer acetate in CFA induces GA specific T cells that accumulate in the brain due to the cross reactivity of GA with MBP. The cells are able to secrete IFN- γ and thus activate microglia, but are unable to cause EAE because of altered affinity for MBP and the concomitant secretion of anti-inflammatory cytokines.

We have demonstrated clearance of A β in association with microglia activation. It should be pointed out that microglial activation can have both positive and negative effects (Monsonogo, A., and Weiner, H.L., Immunotherapeutic approaches to Alzheimer's disease, Science 302:834-838 (2003)). Microglia represent a natural mechanism by which protein aggregates and debris can be removed from the brain and there are reports that microglial activation following A β immunization or stroke may lead to A β clearance (see Nicoll, J.A., et al., Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report, Nat Med., 9:448-452 (2003); Akiyama, H., and McGeer, P.L., Specificity of mechanisms for plaque removal after A beta immunotherapy for Alzheimer Disease, Nat Med., 10:117-118; author reply 118-119 (2004); and Wyss-Coray, T., et al., Prominent neurodegeneration and increased plaque formation in complement-inhibited Alzheimer's mice., Proc Natl Acad Sci., 99:10837-10842 (2002)). In animal studies, Wyss-Coray and colleagues demonstrated that there is prominent neurodegeneration and increased

plaque formation in the complement-inhibited AD mouse model, in which microglia were significantly less activated than in wild type AD mice at the same age. This supports the concept that activated microglia have a beneficial role in decreasing amyloid load without major neurotoxicity in the AD mouse model.

5 Nasal administration of IVX-908 alone leads to reduction of amyloid as it is able to activate microglia, though not as efficiently as IVX-908 compositions formulated with GA which, in addition, may activate T cells. No microglia activation was observed with GA given peripherally with CFA or intranasally with IVX-908 in non-transgenic animals. It has been reported that A β deposition leads to slight activation of microglia surrounding
10 A β plaque and it appears that this activation is required in order for microglia to be further activated by IVX-908 plus GA. It is possible that slight activation of microglia is associated with the expression of IFN- γ or toll-like receptors which prime microglia for further activation (Sasaki, A. et al., *Virchows Arch.*, 441(4):358-67 (2002)).

These findings have relevance to potential mechanisms for plaque removal observed
15 in humans following immunization with A β 1-42 in a Th1 type adjuvant (QS21), Nicoll, J.A. et al., *Nat Med* 9, 448-52 (2003) reported autopsy findings from an AD patient vaccinated with A β 1-42 given parenterally with adjuvant QS21 which resulted in widespread meningoencephalitis, infiltration of the brain by macrophages, and a reduction of amyloid deposits in the neocortex. Akiyama and McGeer reported a similar reduction of
20 senile plaques in a cortical area affected by incomplete ischemia in a case of AD and suggest that their findings and those reported by Nicoll, et al may be related to phagocytosis of amyloid by highly reactive microglia in an antibody dependent manner. Furthermore, by using TUNEL staining (a marker for apoptotic cells) or NeUN immunostaining (a marker for viability of neurons) no evidence of toxicity was observed in GA plus IVX-908 or IVX-
25 908 alone immunization compared to untreated mice.

A novel immune therapeutic approach for the treatment of Alzheimer's disease is provided herein that is antibody independent and is mediated by activated microglia. By combining a drug used to treat multiple sclerosis with a nasal adjuvant (IVX-908); microglia appear to be activated to clear A β -fibril plaques and reduce total amyloid burden
30 using two compositions (GA and proteosome based adjuvants) that previously have been used in humans for other indications with no toxicity. Given that studies in animals have demonstrated that reduction of A β plaque is associated with cognitive improvement, nasal

vaccination with IVX-908 formulated with GA is an effective therapy for patients with Alzheimer's disease.

Table 1. Effect of subcutaneous immunization on total and fibrillar A β in the brains of J20 APP transgenic mice.

5

	Mice per group	EAE score	Anti-A β Antibody*	Total brain A β (ng/ml)	% Area of thioflavin positive A β plaques (hippocampus)
Control**	8	0	0	125.6 $\pm$ 15.9	2.6 $\pm$ 0.4
A β	8	0	0.75	60.8 $\pm$ 16 ^a	0.83 $\pm$ 0.3 ^a
MOG	10	2.5 $\pm$ 0.8	0	8.4 $\pm$ 2.1 ^b	0.22 $\pm$ 0.1 ^b
MOG B-deficient	6	2.7 $\pm$ 0.4	0	11.4 $\pm$ 2.7 ^b	0.27 $\pm$ 0.04 ^b
GA	5	0	0	39.1 $\pm$ 12.8 ^c	0.26 $\pm$ 0.1 ^d

* Results are presented as level of OD at titer of 1:500 IgG.

** Control combines untreated (n=5) and BSA/CFA treated (n=3) animals as there was no difference between these groups. For total brain A β : untreated=126.7 $\pm$ 19.5; BSA/CFA 123.7 $\pm$ 33.2. For % area of thioflavin positive A β plaques: untreated: 2.8 $\pm$ 0.5; BSA/CFA =2.2 $\pm$ 0.9.

^a p<0.05 vs. control.

^b p<0.001 vs. control; p<0.05 vs. A β .

^c p<0.01 vs. control.

^d p<0.01 vs. control; p=0.05 vs. A β .

10

15

Table 2. Effect of PLP immunization on total and fibrillar Aβ in the brains of Tg2576 APP transgenic mice.

	Mice per group	EAE score	Anti-Aβ Antibody*	Total brain Aβ (ng/ml)	% Area of thioflavin positive Aβ plaques (hippocampus)
Control	5	0	0	133.1 ± 32.7	2.67 ± 0.4
PLP	5	1.7 ± 0.7	0	47.7 ± 18.4 ^a	0.68 ± 0.2 ^b

5 *The results are presented as level of OD 450 at titer of 1:500 IgG.
 ^ap<0.02 vs. control (untreated mice).
 ^bp<0.002 vs. control.

10 **Table 3. Effect of nasal immunization on a total and fibrillar Aβ in the brains of J20 APP transgenic mice.**

	Mice per group	EAE score	Anti-Aβ Antibody*	Total brain Aβ (ng/ml)	% Area of thioflavin S positive Aβ plaques (hippocampus)
Control*	8	0	0	125.6 ± 15.9	2.6 ± 0.4
GA	4	0	0	97.6 ± 15.5	2.06 ± 0.8
IVX-908	7	0	0	63.5 ± 7.7 ^a	1.5 ± 0.2
GA+IVX-908	8	0	0	38.7 ± 6.8 ^b	0.48 ± 0.09 ^c

Footnote

15 * Results are presented as level of OD 450 at titer of 1:50 IgG.
 ^ap<0.02 vs. control, p<0.02 vs. GA.
 ^bp<0.001 vs. control and GA, p<0.04 vs. IVX-908.
 ^cp<0.001 vs. control, p<0.002 vs. GA, p<0.002 vs. IVX-908.

25

Table 4. Immunohistochemistry of hippocampus in immunized animals*

	<u>Number of cells per hippocampal region*</u>				
	CD11b ^a	CD3 ^b	M-CSFR ^c	IFN- γ ^d	TGF- β ^e
Control	76 $\pm$ 17	5 $\pm$ 3	11 $\pm$ 4	7 $\pm$ 3	73 $\pm$ 12
Subcutaneous (CFA/P.T.)					
Aβ	106 $\pm$ 27	10 $\pm$ 2	34 $\pm$ 11	9 $\pm$ 2	41 $\pm$ 5
MOG	349 $\pm$ 34.3 ^{iv}	142 $\pm$ 19 ^{iv}	79 $\pm$ 5 ⁱ	109 $\pm$ 7 ^{iv}	20 $\pm$ 5 ⁱⁱⁱ
MOG B-deficient	462 $\pm$ 23 ^{iv}	195 $\pm$ 12 ^{iv}	77 $\pm$ 6 ⁱ	119 $\pm$ 18 ^{iv}	22 $\pm$ 8 ⁱⁱ
GA	227 $\pm$ 61 ⁱ	61 $\pm$ 12 ⁱ	57 $\pm$ 8	85 $\pm$ 11 ^{iv}	31 $\pm$ 7
NASAL					
GA	136 $\pm$ 12	35 $\pm$ 19	30 $\pm$ 9	53 $\pm$ 3 ⁱ	77 $\pm$ 10
IVX-908	406 $\pm$ 16 ^{iv}	55 $\pm$ 9 ⁱ	81 $\pm$ 16 ⁱ	92 $\pm$ 4 ^{iv}	40 $\pm$ 11
GA+	451 $\pm$ 48 ^{iv}	67 $\pm$ 9 ⁱⁱ	119 $\pm$ 30 ^{iv}	81 $\pm$ 10 ⁱⁱⁱ	14 $\pm$ 2 ^{iv}
IVX-908 ^g					

Table 4 footnote:

- 5 * Data represents quantification of three sections for each treatment and six sections for the control (3 untreated + 3 BSA/CFA treated as table 1).
- ^a $r = -0.7$ CD11b vs. % Area of A β fibril.
- ^b $r = -0.65$ CD3 vs. % Area of A β fibril; $r = 0.74$ CD3 vs. CD11b.
- ^c $r = -0.7$ M-CSFR vs. % Area of A β fibril; $r = 0.92$ M-CSFR vs. CD11b.
- 10 ^d $r = -0.8$ IFN- γ vs. % Area of A β fibril; $r = 0.9$ IFN- γ vs. CD11b; $r = 0.85$ IFN- γ vs. CD3.
- ^e $r = 0.91$ TGF- β vs. % Area of A β fibril; $r = -0.77$ TGF- β vs. CD11b; $r = -0.6$ TGF- β vs. CD3.
- ^f $r = 0.67$ IL-10 vs. % Area of A β fibril; $r = -0.4$ IL-10 vs. CD11b.
- ^g $p = 0.0007$ CD11b vs. GA; $p < 0.05$ IFN- γ vs. GA; $p = 0.0011$ TGF- β vs. GA.
- 15 ⁱ $p < 0.05$ vs. control.

ⁱⁱ $p < 0.02$ vs. control.

ⁱⁱⁱ $p < 0.001$ vs. control.

^{iv} $p < 0.001$ vs. control.

26
26

MATERIALS AND METHODS

Mice. (B6XD2)F1 (average age 14 months) or (B6XSJL)F1 APP⁺ (WT or μ MT) (average 16 months) APP transgenic mice were housed and used in a pathogen-free facility at the Brigham and Women's Hospital in accordance with all applicable guidelines.

Materials. IVX-908 (Protollin) is a non-covalent formulation of *Neisseria meningitidis* outer membrane proteins (proteosomes) and LPS from *Shigella flexneri* that has been safely tested in humans, and was obtained from ID Biomedical, Montreal, Canada. Glatiramer acetate (Copaxone[®]) is a random amino acid copolymer of alanine, lysine, glutamic acid and tyrosine that is an approved and widely used treatment for relapsing forms of MS, and was obtained from the Brigham and Women's Hospital pharmacy. MOG (35-55) and PLP (139-151) were synthesized at the Center for Neurologic Diseases, Brigham and Women's Hospital.

Induction and clinical evaluation of EAE in APP⁺ mice. (B6D2)F1 or (B6XSJL)F1 APP⁺ (WT or B-cell deficient μ MT) and non-tg littermates were immunized in the hind footpads with 100 μ g MOG(35-55), PLP 139-151 or 100 μ g β -amyloid peptide (1-40) in CFA. Immediately thereafter and again 48 hours later mice received an i.p. injection containing 150 ng of pertussis toxin in 0.2 ml PBS. Animals were monitored for symptoms of EAE beginning 7 days after immunization and scored as follows: 0, no disease; 1, tail paralysis; 2, hind limb weakness; 3, hind limb paralysis; 4, hind limb plus forelimb paralysis; and 5, moribund.

Nasal vaccination. Glatiramer acetate: 25 μ g was given on days 1, 2, 4 and 5 the first week followed by a weekly boost for six weeks. IVX-908: 1 μ g/mouse was given on days 1 and 5 the first week followed by a weekly boost for six weeks. BSA+IVX-908: 25 μ g of BSA plus 1 μ g IVX-908 were given on days 1 and 5 the first week, and 25 μ g of BSA alone was given on days 2 and 4, followed by six weekly boosts of the combination of BSA+IVX-908. GA+IVX-908: 25 μ g of GA plus 1 μ g IVX-908 were given on days 1 and 5 the first week, and 25 μ g of GA alone was given on days 2 and 4, followed by six weekly boosts of the combination of GA+IVX-908.

Amyloid quantification. To quantify amyloid burden, the right hemisphere was extracted in 5.0 M guanidinium-chloride (pH 8) for 3 hours at room temperature. Dilutions were used to measure levels of insoluble (amyloid-associated) A β 40 and A β 42 by sandwich enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). To measure A β fibrils, the left hemisphere

was fixed in 4% Brain O/N followed by 4.5% sucrose for 4 hours then 20% Sucrose for O/N at 4°C. Brains were frozen in the presence of OCT paraformaldehyde, cut to 14- μ m longitudinal sections used for immunohistological staining and amyloid fibril quantification. Well-defined hippocampal regions (Bregma -1.34), were selected for quantification of the amount of amyloid fibril in plaques using thioflavin-S staining. Images (magnification x20) from these sections were collected from a 3CCD color video camera and analyzed with appropriate software (NIH; Imaging Research). The amount of amyloid fibril was expressed as a percentage per mm² hippocampal region as measured by the software.

Immunohistology. The staining was performed utilizing the following markers: T-cells (CD3; BD Biosciences:553057), microglia/macrophages (CD11b; Serotec:MCA74G), (C-MFR; Cymbus Biotech:21080096), IFN- γ (Pharmingen: 559065), IL-10 (Pharmingen:559063) and TGF- β (RD:AB-20-PB). Anti-amyloid antibodies (R1282) were a gift of Dennis Seloke. Brain sections were further subject to Haematoxylin staining. Sections were evaluated in a blinded manner, and controls included use of isotype-matched mAbs as previously described. For each treatment the quantification was done from the hippocampal region of three different brain sections (the same region, Bregma -1.34, that were used for ThS staining). The results are expressed as the mean of the labeled cells for each marker.

Neuropathology. To examine for neurotoxicity the left hemisphere was fixed in 4% paraformaldehyde overnight followed by 4.5% sucrose for 4 hours then 20% sucrose for overnight at 4°C. Brains were frozed in the presence of OCT paraformaldehyde, cut to 14- μ m longitudinal sections and used for immunohistological staining. We stained for four markers used for neuronal stress and blood brain barrier integrity: GFAP (Sigma;G9269), SMI32 (Serotec), TUNEL (Roche 1 684 817), iNOS (CHEMICON:AB5382), and Fibrinogen (Dako: A0080). Astrocytosis is expressed as a percentage per mm² of the hippocampal region covered by astrocytes. Staining for iNOS, SMI32 and Fibrinogen was done as previously described (29). Staining for Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) was carried out according to manufacturer's (Roche 1 684 817) recommendations. H&E staining was carried out to identify the morphology of cells counted. The staining was performed on two consecutive sections per animal and four animals per group in a blinded fashion using Imaging Research software from the NIH in an unbiased stereological approach. Staining per group from the primary motor cortex (Bregma lateral 1.44 mm) is show in Figure 6.

Data analysis. All continuous and ordinal data are expressed as mean $\pm$ sem. Data comparisons were carried out using Student's t-test when two groups were compared, or one-ANOVA analysis when three or more groups were analyzed. Values of p less than 0.05 were considered statistically significant; r values were calculated using an Excel statistical program.

All references cited herein, including patents, patent applications, and publications, are hereby incorporated by reference in their entireties, whether previously specifically incorporated or not.

Having now fully described this invention, it will be appreciated by those skilled in the art that the same can be performed within a wide range of equivalent parameters, concentrations, and conditions without departing from the spirit and scope of the invention and without undue experimentation.

While this invention has been described in connection with specific embodiments thereof, it will be understood that it is capable of further modifications. This application is intended to cover any variations, uses, or adaptations of the invention following, in general, the principles of the invention and including such departures from the present disclosure as come within known or customary practice within the art to which the invention pertains and as may be applied to the essential features hereinbefore set forth.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method of treating a neurological disease or disorder in a mammal, which method comprises administering to said mammal in need of such treatment a therapeutically effective amount of a proteosome based composition.
2. The method of claim 1 further comprising administering a therapeutically effective amount of glatiramer acetate either in the same or in a separate formulation with said proteosome based composition.
3. The method of claim 1, wherein said neurological disease or disorder comprises deleterious protein aggregation.
4. The method claim 1, wherein said neurological disease or disorder is Multiple Sclerosis.
5. The method of claim 3 wherein said neurological disease or disorder is selected from the group consisting of early onset Alzheimer's disease, late onset Alzheimer's disease, presymptomatic Alzheimer's disease, Serum Amyloid A (SAA) amyloidosis, prion disease, hereditary Icelandic syndrome, senility and multiple myeloma.
6. The method of claim 3, wherein treating said neurological disease or disorder results in a reduction in soluble or insoluble amyloid beta peptide, and wherein said insoluble amyloid beta peptide comprises fibrillar amyloid beta peptide.
7. The method of claim 6 wherein said amyloid beta peptide is insoluble.
8. The method of claim 1 wherein said neurological disease or disorder is an amyloid disease.
9. The method of claim 8 wherein said amyloid disease is Alzheimer's disease.

10. The method of claim 9 wherein said treating the amyloid disease comprises preventing an increased amyloid load, maintaining the current amyloid load, or decreasing the amyloid load in the brain.
11. The method of claim 10 wherein said amyloid is a β -amyloid.
12. The method of claim 10 wherein said amyloid load includes total amyloid load and fibrillar load.
13. The method of claim 1, wherein the proteosome based composition is selected from the group consisting of a proteosome based adjuvant containing an endogenous lipopolysaccharide and a proteosome based adjuvant containing an exogenous lipopolysaccharide.
14. The method of claim 13, wherein said proteosome and said lipopolysaccharide are obtained from the same bacterial genus.
15. The method of claim 13, wherein said proteosome and said lipopolysaccharide are obtained from different bacterial genres.
16. The method of claim 13, wherein said proteosome is from *Neisseria meningitides*, and said lipopolysaccharide is from *Shigella flexneri*.
17. The method of claim 1 further comprising a pharmaceutically acceptable diluent, excipient, stabilizer or carrier.
18. A method for treating a neurological disease or disorder in a mammal, which method comprises administering to said mammal in need of such treatment a therapeutically effective amount of Glatiramer Acetate in a sub-micron emulsion or nanoemulsion.
19. The method claim 18, wherein said neurological disease or disorder is a cell-mediated autoimmune disease or disorder.

20. The method of claim 19, wherein said cell-mediated autoimmune disease or disorder is Multiple Sclerosis.
21. A composition comprising Glatiramer Acetate in a sub-micron or nanoemulsion.
22. A composition comprising Glatiramer Acetate and a proteosome based composition.
23. A method for treating a neurological disease or disorder in a mammal in need of such treatment comprising administering a therapeutically effective amount of a composition which elicits an antibody independent response in said mammal;
wherein said composition comprises any of the following;
a proteosome based composition;
a proteosome based composition in conjunction with or formulated with a Glatiramer Acetate composition;
a Glatiramer Acetate composition formulated with a sub-micron emulsion; or
a Glatiramer Acetate composition formulated with a nanoemulsion.

29

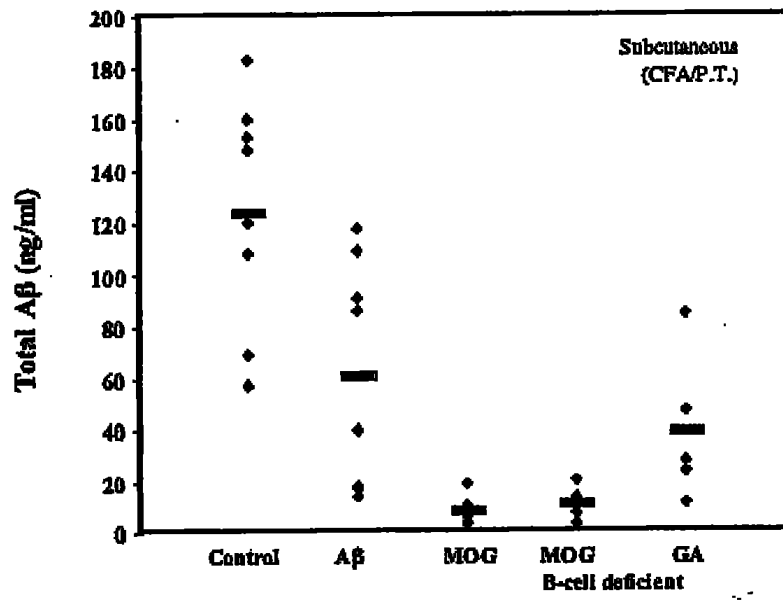
Figur 1

29

PCT/US2005/022922

1/9

WO 2006/001749



48

Figure 2

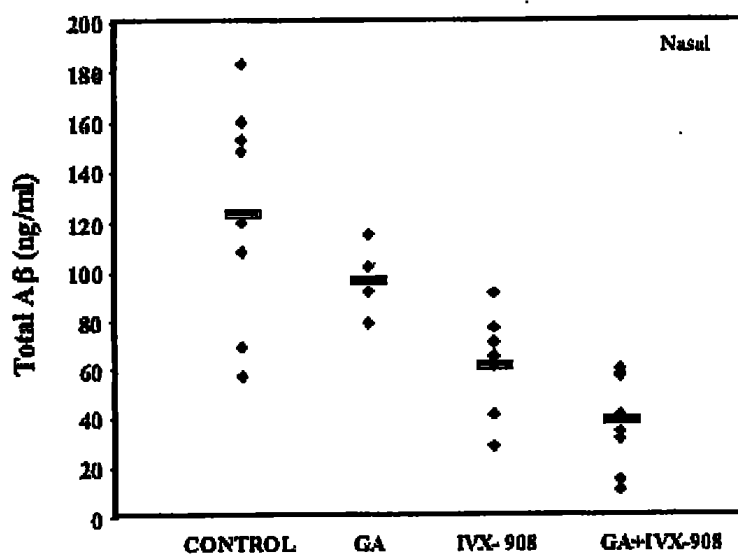


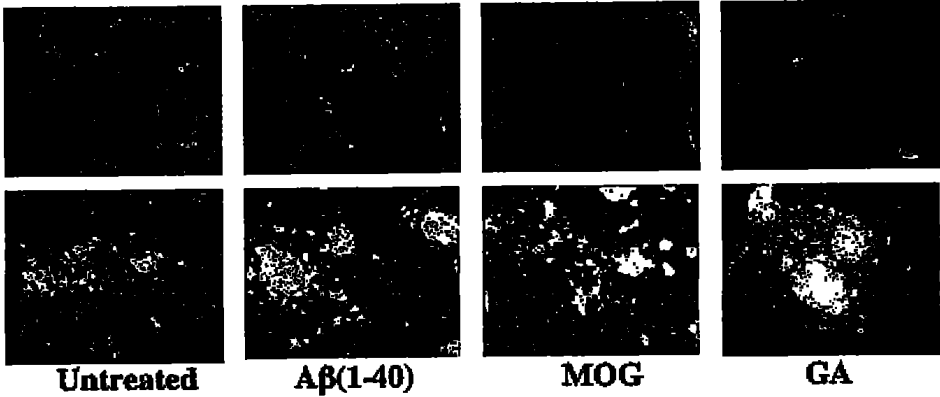
Figure 3

A Subcutaneous (CFA/P.T.)

Amyloid Fibril (Thioflavin-S)

Total Amyloid (green)
Activated microglia (red)

Co-localization of amyloid/microglia (yellow)

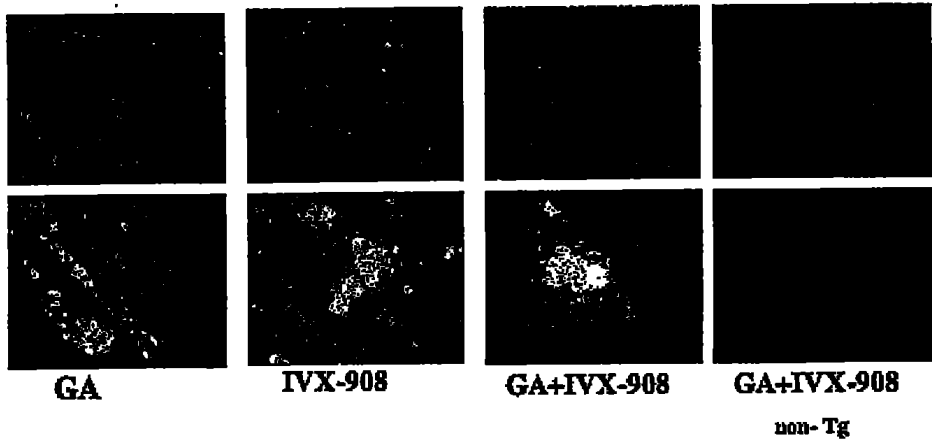


B Nasal

Amyloid Fibril (Thioflavin-S)

Total Amyloid (green)
Activated microglia (red)

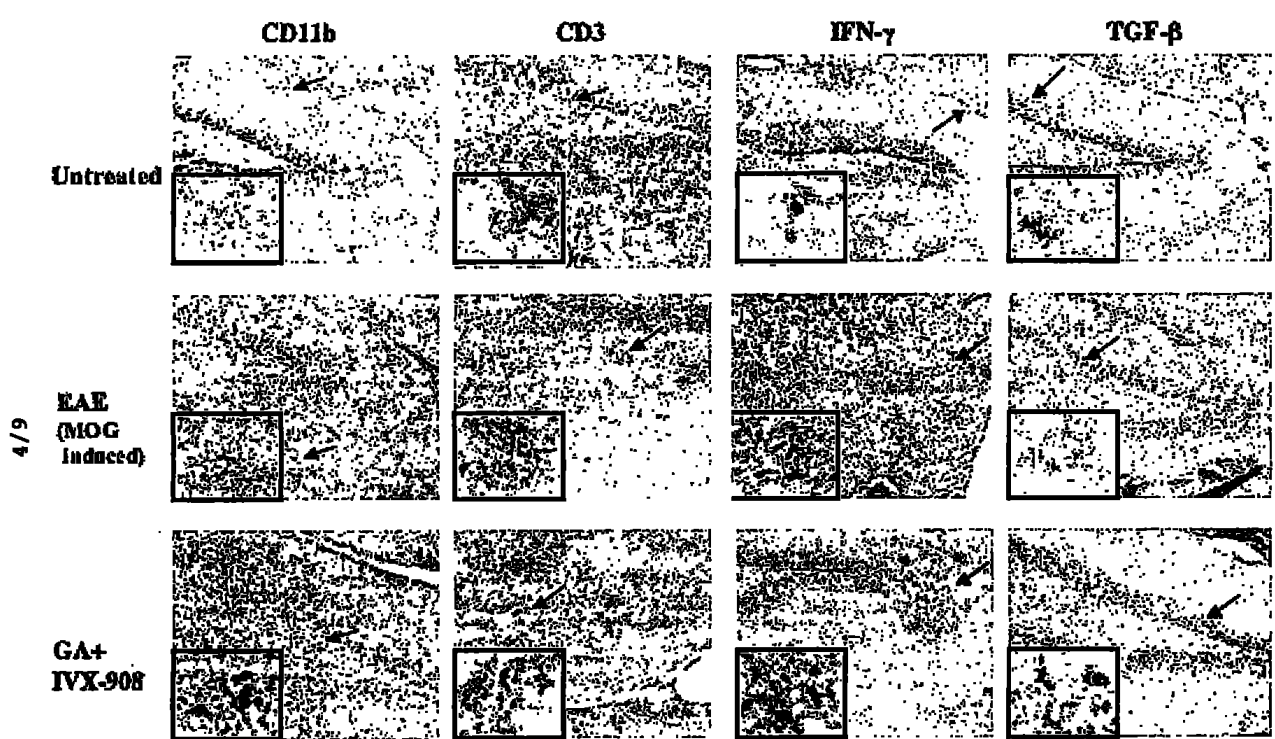
Co-localization of amyloid/microglia (yellow)



32

32

Figure 4

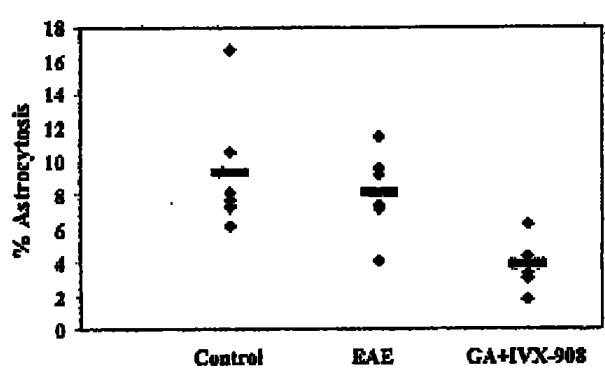


PCT/US2005/022922

WO 2006/001749

Figure 5

5/9



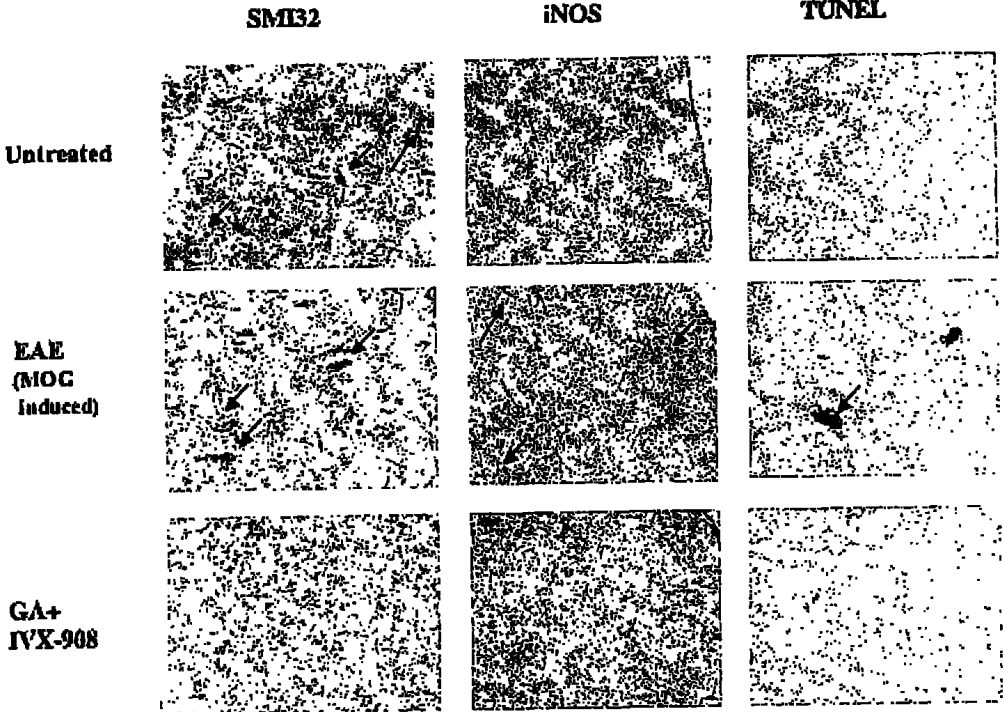
24

Figure 6

PCT/US2005/022922

6/9

WO 2006/011749



Handwritten mark

PCT/US2005/022922

7/9

WO 2006/061749

Figure 7

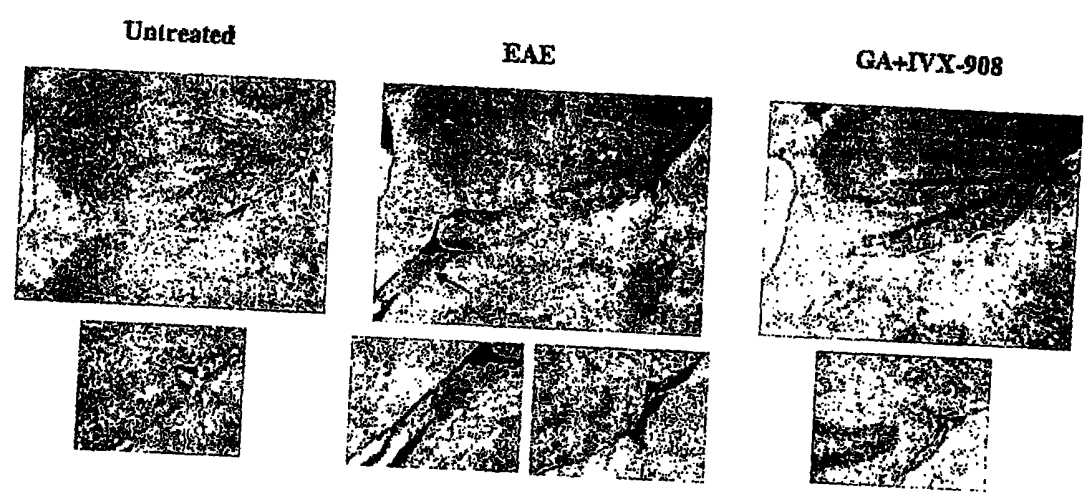
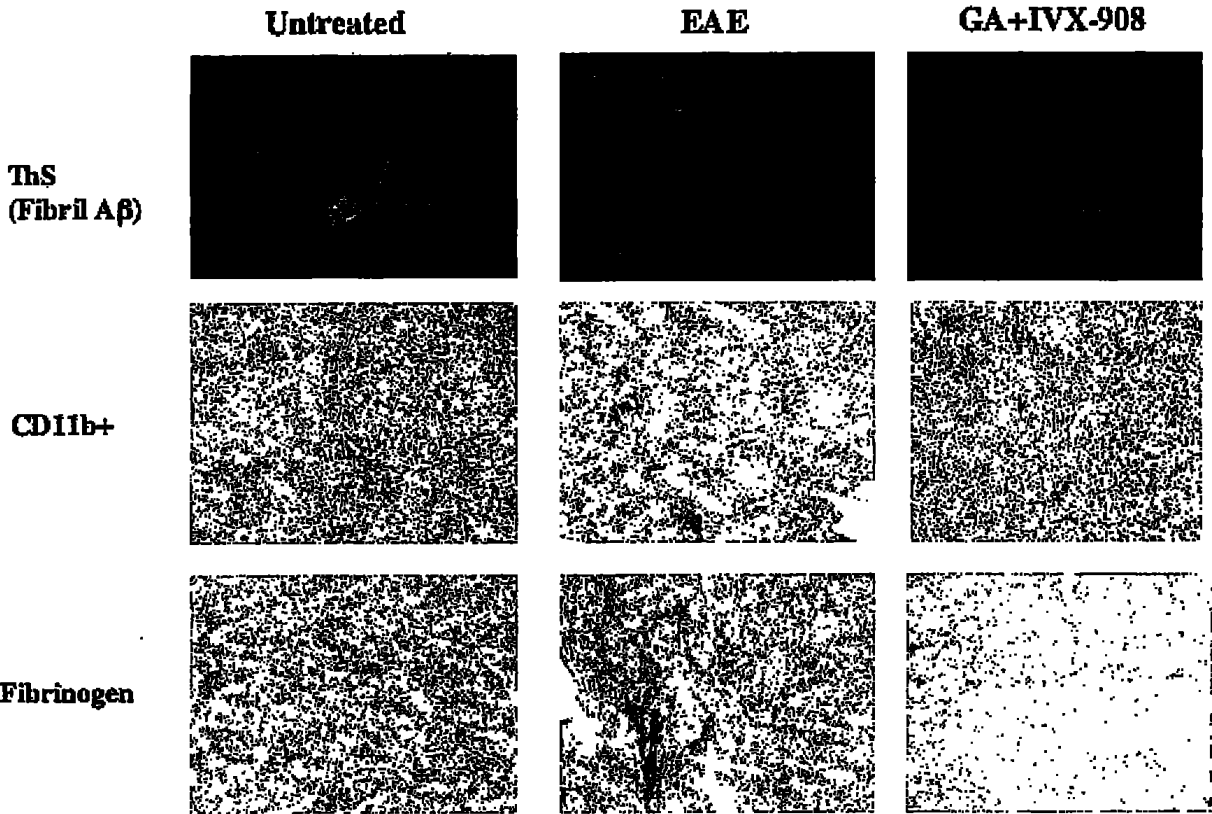


Figure 8

PCT/US2015/022922

8/9

WO 2006/001749

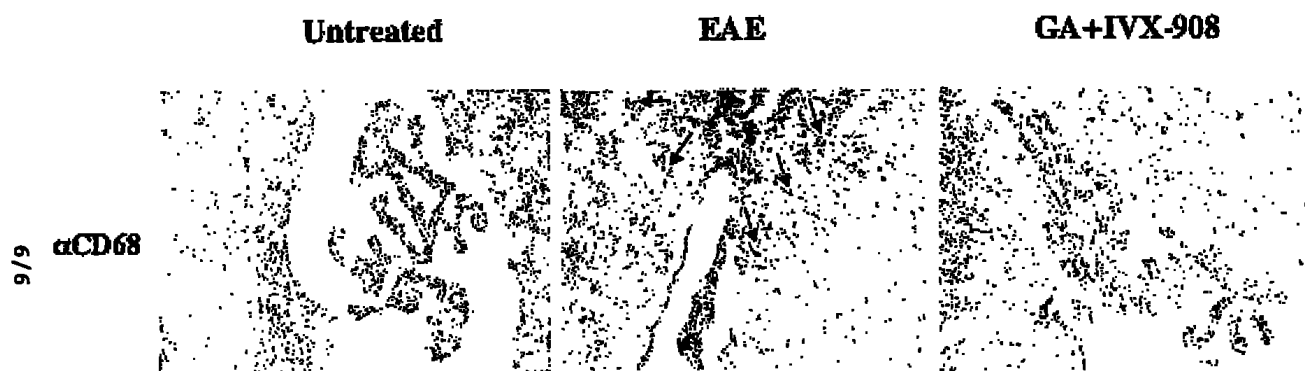


23

37

Figure 9

PCT/US2005/022922



WO 2006/004749

COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE
TRASTORNOS NEUROLÓGICOS

DECLARACIÓN EN CUANTO A DERECHOS A INVENCIONES HECHAS

5 **BAJO INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO FEDERALMENTE**
PATROCINADOS

78

Esta invención fue hecha con apoyo del gobierno, bajo una
concesión otorgada por el Department of Health and Human Services. El
10 gobierno tiene ciertos derechos en esta invención.

REFERENCIA RECÍPROCA A LA SOLICITUD RELACIONADA

Esta solicitud reclama el beneficio de prioridad de la solicitud de
15 patente provisional de E.U.A. 60/582,999, presentada en julio 25 de 2004, la
cual se incorpora de esta manera en su totalidad en la presente como
referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

20

Se describen composiciones útiles para el tratamiento de
trastornos neurológicos, que incluyen trastornos neurodegenerativos
asociados con agregación deletérea de proteínas, plegamiento aberrante de

proteínas y/o trastornos autoinmunes neurodegenerativos, tales como enfermedades amiloidóticas del cerebro. Se describen también métodos de uso de dichas composiciones.

5

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las enfermedades neurológicas se caracterizan en general por la pérdida de neuronas de una o más regiones del sistema nervioso central. Ejemplos de enfermedades neurológicas incluyen enfermedad de Alzheimer, neurofibromatosis, enfermedad de Huntington, depresión, esclerosis lateral, amiotrófica, esclerosis múltiple, apoplejía, enfermedad de Parkinson y demencia por infartos múltiples. Son complejas en origen y progresión, y han demostrado ser algunos de los tipos de enfermedad más difíciles de tratar. De hecho, para algunas enfermedades neurológicas, no existen fármacos disponibles que provean beneficio terapéutico significativo. La dificultad en la provisión de la terapia es de todas la más trágica, dados los efectos devastadores que estas enfermedades tienen sobre sus víctimas.

La enfermedad de Alzheimer (AD), es un trastorno degenerativo del cerebro caracterizado clínicamente por pérdida progresiva de memoria, cognición, razonamiento, juicio y estabilidad emocional, que lleva gradualmente a deterioro mental profundo y finalmente a la muerte. La AD es una causa muy común de falla mental progresiva (demencia) en humanos en edad madura, y se cree representa la cuarta causa médica más común de

20

muerte en los Estados Unidos. La AD se ha observado en todas las razas y los grupos étnicos de todo el mundo, y presenta un problema de salud pública presente y futuro importante. Se estima actualmente que la enfermedad afecta a aproximadamente cuatro millones de individuos tan sólo en los Estados Unidos. La AD es en la actualidad incurable. La administración de ciertas terapias se ha usado para tratar los síntomas de la AD en humanos. Sin embargo, no se conoce actualmente tratamiento alguno que prevenga efectivamente la AD, o revierta sus síntomas o curso en humanos.

Los cerebros de los individuos con AD exhiben lesiones características, denominadas placas seniles, y marañas neurofibrilares. Las placas seniles características de la AD se localizan con más frecuencia extracelularmente, mientras que las marañas neurofibrilares se localizan con más frecuencia intracelularmente. Grandes números de estas lesiones se encuentran en general en pacientes con AD en varias áreas del cerebro humano importantes para la función cognoscitiva y de memoria. Números más pequeños de estas lesiones en una distribución anatómica más restringida se encuentran a veces en los cerebros de humanos en edad madura, quienes no tienen AD clínica. El constituyente químico principal de las placas seniles y los depósitos de amiloide vasculares (angiopatía amiloide) característico de la AD, es una proteína designada como péptido amiloide- β ($A\beta$), que puede ser referido también como β AP, $A\beta$ P o β /A4. Las placas extracelulares que contienen $A\beta$ pueden ser densas o difusas. Las placas densas son referidas con frecuencia como placas fibrilares. El péptido $A\beta$ fue purificado primero, y

una secuencia de aminoácidos parcial reportada, en Glenner y Wong (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 120: 885-890. El procedimiento de aislamiento y los datos de secuencia para los primeros 28 aminoácidos, se describen en la patente de E.U.A. No. 4,666,829. Formas de A β que tienen
5 aminoácidos más allá del número 40, fueron reportadas primero por Kang *et al.* (1987) Nature 325: 733-736.

Neuropatológicamente, la AD se caracteriza, a grados variables, por cuatro lesiones principales: a) intraneuronal, depósitos citoplásmicos de marañas neurofibrilares (NFT), b) depósitos de amiloide parenquimáticos,
10 denominados placas neuríticas, c) amiloidosis A β cerebrovascular (por ejemplo, angiopatía amiloide), y d) pérdida sináptica y neuronal. Uno de los eventos clave en la AD, es la deposición del péptido amiloide (por ejemplo, péptido A β) como masas fibrosas insolubles (amiloidogénesis) que resultan en placas neuríticas extracelulares y depósitos alrededor de las paredes de los
15 vasos sanguíneos cerebrales. El constituyente principal de las placas neuríticas y la angiopatía amiloide cerebral es A β , aunque estos depósitos pueden contener también otras proteínas tales como glucosaminoglucanos y apolipoproteínas.

Solomon, B. *et al.* (1997) PNAS 94(8): 4109-12 mostraron que
20 anticuerpos monoclonales contra los extremos N de A β pueden unirse a, y desagregar, ensambles preexistentes de péptido A β , y/o prevenir la agregación de fibrillas *in vitro* y prevenir la toxicidad hacia cultivos de células neuronales. Schenk, D. *et al.*, Nature 400(6740): 173-177 (1999) demostraron

y2

que la inmunización con patología tipo enfermedad de Alzheimer atenuada por amiloide- β en ratones transgénicos PDAPP, sirve como un modelo animal para deposición de amiloide- β y neuropatologías tipo enfermedad de Alzheimer. Reportaron que la inmunización de animales jóvenes antes del inicio de neuropatologías tipo enfermedad de Alzheimer, previno esencialmente el desarrollo de la formación de placas de amiloide- β , distrofia neurítica y astrogliosis, mientras que se observó que el tratamiento en animales más maduros después del inicio de neuropatologías tipo enfermedad de Alzheimer, reduce la extensión y progresión de estas neuropatologías. Este efecto es mediado por anticuerpos, puesto que se ha mostrado que anticuerpos administrados periféricamente contra A β reducen la carga de amiloide en el parénquima del cerebro (Bard F. *et al.*, (2000) Nat. Med. 6(8): 916-9). Además, la inmunización intranasal con A β 1-40 recién solubilizado, reduce la carga de amiloide cerebral (Weiner, H. L. *et al.*, (2000) Ann. Neuro. 48(4): 567-79). Dos estudios, realizados por Morgan, D. *et al.*, (2000) Nature 408(6815): 982-5; y Janus, C. *et al.*, (2000) Nature 408(6815): 979-82, usando sistemas de modelos animales, demostraron que una reducción inducida por la vacunación en los depósitos de amiloide del cerebro, resultó en mejoras cognitivas. Otros estudios han consignado varios aspectos del mismo tópico, incluyendo Dodart *et al.*, (2002) Nat. Neuroscience 5(5): 452-7 y Kotilinek, L. A. *et al.*, (2002) J. Neuroscience 22(15): 6331-5. Aunque la vacunación con A β ha mostrado cierto éxito en varios estudios usando modelos de AD en animales, los estudios clínicos en humanos inmunizando

4/3

con péptidos A β 1-40/42 formulados en un adyuvante (QD21) fueron concluidos, debido a la ocurrencia deletérea y/o inaceptablemente alta de efectos secundarios tales como meningoencefalitis. De esta manera, existe la necesidad de modalidades terapéuticamente aceptables para el tratamiento y/o prevención de AD, y trastornos neurodegenerativos relacionados asociados con la agregación de proteínas.

Las enfermedades autoinmunes se caracterizan por una respuesta inmune anormal dirigida hacia tejidos propios o autólogos. Con base en el tipo de respuesta inmune (o reacción inmune) involucrada, las enfermedades autoinmunes en mamíferos pueden clasificarse en general en uno de dos tipos diferentes: trastornos mediados por células (es decir, mediados por células T) o mediados por anticuerpos. La esclerosis múltiple (MS) es una enfermedad autoinmune mediada por células T (Trapp *et al.* New Eng. J. Med. 338(5): 278 (1998)). Más de un millón de adultos jóvenes de todo el mundo entre treinta y cuarenta años de edad, tienen MS. La MS es la enfermedad más común del sistema nervioso central, y es la causa más común de incapacidad neurológica en adultos jóvenes. Fisiopatológicamente, las células T autorreactivas circulantes median gran parte de la destrucción del sistema nervioso central observada en pacientes con MS (Rudick *et al.* New Eng. J. Med. 337: 1604 (1997)).

En la MS, las células T reaccionan con la proteína básica de mielina (MBP), que es un componente de la mielina en el sistema nervioso central. La demostración de que células T activadas específicas de la MBP

44

pueden aislarse de pacientes con MS, apoya la propuesta de que la MS es una enfermedad autoinmune, en donde las células T destruyen el tejido neural propio o autólogo (Allegretta *et al.* Science: 247: 778 (1990)).

La MS se trata comúnmente con ciertos agentes antiinflamatorios e inmunosupresores, y dichos agentes incluyen: (i) corticosteroides, los cuales tienen efectos inmunomoduladores e inmunosupresores; (ii) interferón- β ; (iii) acetato de glatiramer (GA); (iv) azatioprina, un análogo de purina que deprime la inmunidad humoral y mediada por células; (v) globulina inmune intravenosa; (vi) metotrexato, que inhibe la dihidrofolato reductasa y deprime la inmunidad humoral y mediada por células; (vii) ciclofosfamida, un agente alquilante que tiene efectos citotóxicos e inmunosupresores; y (viii) ciclosporina, que tiene efectos inmunosupresores potentes inhibiendo la activación de células T. A pesar del tratamiento con dichos fármacos antiinflamatorios o inmunosupresores, más de 50% de los pacientes con MS se deterioran fácilmente como resultado de la destrucción focal de la médula espinal, cerebelo y corteza cerebral.

Muchos de los fármacos usados comúnmente para tratar la MS tienen eficacia limitada a largo plazo, debido en parte a que tienen efectos citotóxicos significativos. Por ejemplo, el tratamiento prolongado con ciclofosfamida puede llevar a alopecia, náusea, vómito, cistitis hemorrágica, leucopenia, miocarditis, infertilidad y fibrosis intersticial pulmonar. El tratamiento con agentes inmunosupresores puede inducir finalmente inmunosupresión "global" en el paciente tratado, que aumenta ampliamente el

45

riesgo de infección. Los pacientes sometidos a inmunosupresión global prolongada, tienen un riesgo incrementado de desarrollo de complicaciones médicas severas del tratamiento, tales como malignidades, disfunción renal y diabetes.

5 Un procedimiento alternativo para el tratamiento de MS, es el uso de administración intravenosa u oral de MBP para modular la respuesta inmune de células T que puede asociarse con la misma. La administración intravenosa de MBP o fragmentos de la misma que contengan epítopes inmunodominantes de MBP suprime el sistema inmune, causando anergia
10 clonal o insensibilidad de células T, que desactiva a células T específicas para MBP. El resultado final es que las células T específicas de MBP dejan de proliferar en respuesta a la MBP. La incapacidad de las células T para proliferar, resulta en una disminución en la destrucción de tejidos neurales mediada por células T.

15 Un análogo inmunoquímico de la MBP usado en el tratamiento de MS, es el acetato de glatiramer (GA), o copolímero-1 (COP-1) (patente de E.U.A. No. 3,849,550; solicitud del PCT WO/95/31990). El GA, en su forma disponible comercialmente, es una mezcla de polipéptidos sintéticos aleatorios formados de L-alanina, ácido L-glutámico, L-lisina y L-tirosina a una relación
20 molar de 6.0:1.9:4.7:1.0. Fue sintetizado primero como un mimético inmunoquímico de la MBP. Por ejemplo, ciertos anticuerpos monoclonales para GA, reaccionan en forma cruzada con la MBP (Teitelbaum *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 9258 (1991)). Además, se ha encontrado que el GA

46

induce células T supresoras específicas de MBP (Lando *et al.* J. Immunol. 123: 2156 (1979)). Experimentos en ratones indican que el GA inhibe también específicamente células T específicas de MBP que están implicadas en la destrucción de tejido del sistema nervioso central en encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) (Teitelbaum *et al.* Proc. Natl. Acad. USA 85: 9724 (1995)).

La administración de GA puede: (i) incrementar el porcentaje de células NK; (ii) reducir receptores de IL-12 en suero, (iii) suprimir al FNT- α , y (iv) incrementar los niveles del TGF- β y la IL-4 (Ariel *et al.*, Multiple Sclerosis 3(5), S053 (1997)).

Aunque los pacientes con MS se han tratado relativamente con éxito con GA administrado parenteralmente (Bornstein *et al.* Transactions American Neurological Association, 348 (1987)), puede mejorarse el régimen de tratamiento actual, así como los efectos generales.

No se pretende que la cita de los documentos anteriores, sea una admisión de que lo anterior sea técnica anterior pertinente. Todas las declaraciones en cuanto a la fecha o a la representación en cuanto a los contenidos de estos documentos, se basan en la información disponible para el solicitante, y no constituyen admisión alguna en cuanto a la exactitud de las fechas o los contenidos de estos documentos.

20

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

La presente invención provee métodos y composiciones para el

47

tratamiento de enfermedades o trastornos neurológicos en mamíferos que necesitan de dicho tratamiento. Dichas enfermedades o trastornos neurológicos pueden asociarse con una deposición sistémica o localizada de material proteínico o proteináceo (por ejemplo, amiloidosis), agregación

5 deletérea de proteínas (mal plegamiento de proteínas) y/o autoinmunidad neurodegenerativa. El interés particular está en las enfermedades de formación de amiloide, tales como la enfermedad de Alzheimer y/u otras enfermedades amilogénicas del cerebro, que incluyen enfermedades relacionadas con priones, enfermedad de Huntington, enfermedad de

10 Parkinson y angiopatía amiloide cerebral (CAA) (Revesz, T. *et al.* (2003) J. Neuropathol. Exp. Neurol. 62(9): 885-98). El tratamiento de dichas enfermedades relacionadas con placas de amiloide, puede incluir la prevención de la formación (deposición) de nuevas placas de amiloide, manteniendo los niveles actuales de placas de amiloide, y/o disminuyendo la

15 cantidad de placas de amiloide existentes o proteínas amiloides totales del cerebro (incluyendo A β que puede no depositarse en placas), según se mide determinando la carga total de amiloide (A β soluble y no soluble) o la cantidad de carga de amiloide-A β fibrilar. Dichas enfermedades o trastornos neurológicos pueden asociarse con una enfermedad autoinmune mediada por

20 células, tal como la esclerosis múltiple. El tratamiento de dichos trastornos autoinmunes puede incluir la prevención de la formación de células T autorreactivas, manteniendo concentraciones actuales de células T autorreactivas, y/o disminuyendo la concentración de células T autorreactivas.

48

La presente invención reclama y usa varias formulaciones de una composición basada en proteosomas, y/o una composición de GA, opcionalmente en una emulsión en submicras, o una nanoemulsión, como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades o trastornos 5 neurológicos en mamíferos, incluyendo enfermedades o trastornos relacionados con placas de A β , y enfermedades o trastornos autoinmunes mediados por células.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

10

Figura 1: Efecto de la inmunización subcutánea sobre los niveles totales de A β en el cerebro. Para cuantificar la carga de amiloide, se extrajo el hemisferio derecho en cloruro de guanidinio a 5.0 M (pH 8) por 3 horas a temperatura ambiente. Se usaron diluciones para medir los niveles de A β 40 y 15 A β 42 por medio de prueba de inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) en sándwich.

Figura 2: Efecto de la inmunización nasal sobre los niveles totales de A β en el cerebro. Se midieron los niveles de la concentración total de A β de A β 40 y A β 42 de ratones individuales después de tratamiento nasal, 20 por medio de prueba de inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) en sándwich.

Figura 3: La activación de células CD11b+ lleva a depuración de fibrillas de A β en ratones tratados parenteralmente y nasalmente. (A) Tinción

ua
44

de fibrillas de A β en la región hipocámpica con tioflavina-S (aumento de 10X), o co-tinción para A β total con anticuerpo anti-A β (R1288) y anti-CD11b (microglia/macrófagos), aumento de 40x, después de inmunización subcutánea. (B) Co-tinción de anticuerpo anti-A β (R1288) y anti-CD11b (microglia/macrófagos) (en la región hipocámpica, aumento de 40x), después de inmunización nasal.

Figura 4: Inmunohistología de secciones del cerebro después de inmunización subcutánea con MOG y vacunación nasal con acetato de glatiramer. Se marcaron secciones sucesivas de la región del hipocampo de ratones no tratados o inmunizados 50 días post-inmunización usando anticuerpos anti-CD11b, CD3, IFN- γ y TGF- β (aumento de 20x, inserción de la figura, aumento de 60x).

Figura 5: Reducción en astrocitosis después de la administración nasal de GA+IVX-908. Se seleccionaron regiones hipocámpicas bien definidas (Bregma-1.44 mm) para cuantificación de astrocitos activados, usando tinción con GFAP. El nivel de activación de los astrocitos se expresó como un porcentaje de la región hipocámpica por mm²; $p = 0.039$ GA+IVX-908 contra control; $p = 0.02$ contra EAE (MOG).

Figura 6: Neuropatología en secciones del cerebro después de inmunización subcutánea con MOG y vacunación nasal con acetato de glatiramer. Se marcaron secciones sucesivas de la corteza cerebral de ratones no tratados o tratados 50 días post-inmunización, usando marcadores de neurotoxicidad: SM132, TUNEL e iNOS (aumento original de 20x). Las

flechas identifican la marcación para los marcadores estudiados. Se observó la marcación para los marcadores de neurotoxicidad en animales con EAE, pero no en animales tratados con GA-IVX-908.

Figura 7: Integridad de la barrera hemoencefálica en sección de hipocampo después de inmunización subcutánea con MOG y vacunación nasal con acetato de glatiramer. Se marcaron secciones sucesivas de la corteza cerebral de ratones no tratados o tratados 50 días post-inmunización, usando marcador de tinción del plasma - fibrinógeno. Se observó la marcación para los marcadores de fibrinógeno en animales con EAE, pero no en animales tratados con GA-IVX-908 (aumento de 20x, figura pequeña, aumento de 40x).

Figura 8: Neuropatología en secciones olfatorias después de inmunización subcutánea con MOG y vacunación nasal con acetato de glatiramer. Se marcaron secciones sucesivas de la corteza cerebral de ratones no tratados o tratados 50 días post-inmunización, usando marcadores de fibrillas de amiloide: ThS, activación de microglia CD11b, integridad de BBB, fibrinógeno (aumento de 20x).

Figura 9: Tinción para células CD68+ en el SNC, en ratones no tratados, inmunizados con MOG y tratados con GA+IVX-908. Las flechas identifican células CD68+ que se infiltran en el SNC en EAE, pero que continúan estando localizadas hacia el plexo coroideo en ratones tratados con GA+IVX-908. No se observó tinción en ratones no tratados. Las secciones se toman del cerebelo (aumento de 20x).

M DALIDADES PREFERIDAS DE LA INVENC I N

El término "enfermedad neurológica" se refiere a una enfermedad o trastorno, que implica las células neuronales del sistema nervioso. Se incluyen específicamente: enfermedades causadas por priones (por ejemplo, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob); patologías del cerebro en desarrollo (por ejemplo, defectos congénitos en el metabolismo de aminoácidos, tales como argininosuccinicaciduria, cistationinuria, histidinemia, homocistinuria, hiperamonemia, fenilcetonuria, tirosinemia y síndrome del cromosoma X frágil); patologías del cerebro maduro (por ejemplo, neurofibromatosis, enfermedad de Huntington, depresión, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple); condiciones que atacan en la edad adulta (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad del cuerpo de Lewy, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pick); y otras patologías del cerebro (por ejemplo, accidentes cerebrales, lesión cerebral, coma, infecciones por varios agentes, deficiencias dietéticas, apoplejía, demencia por infartos múltiples y accidentes cardiovasculares).

Las enfermedades o trastornos preferidos de la presente invención, son aquellas enfermedades que afectan al cerebro maduro, tal como la esclerosis múltiple, y aquellas que atacan típicamente en la edad adulta, tal como la enfermedad de Alzheimer.

El término "enfermedad de Alzheimer", abreviada en la presente como "AD", se refiere a una enfermedad neurodegenerativa del sistema

52

nervioso central. Hablando en términos generales, la enfermedad se sitúa en dos categorías: de inicio tardío, que ocurre en la edad madura (típicamente arriba de los 65 años de edad), y de inicio temprano, que se desarrolla bien antes del período senil, por ejemplo, entre los 35 y 60 años de edad. En

5 ambos tipos de la enfermedad la patología es similar, pero las anomalías tienden a ser más severas y generalizadas en casos que comienzan en una edad más temprana. La AD se caracteriza por la acumulación de péptido amiloide (por ejemplo, péptido A β) en el cerebro, localizado extracelularmente, placas de amiloide (las cuales pueden distinguirse además como densas o

10 difusas), y marañas neurofibrilares localizadas intracelularmente concentradas en ciertas regiones vulnerables del cerebro, tales como el hipocampo y la corteza. La AD es una enfermedad progresiva que resulta en demencia senil. Las placas de amiloide son áreas de fibras neurofibrilares desorganizadas que pueden asociarse con neutrófilos hasta 150 mm a través con depósitos de

15 amiloide-beta (A β) extracelulares en el centro, visibles por análisis microscópico de secciones de tejido del cerebro. Las marañas neurofibrilares son depósitos intracelulares de proteína tau (con frecuencia hiperfosforilada) que consiste de dos filamentos enrollados uno alrededor del otro en pares. La AD se asocia con la acumulación anormal de péptido A β , que resulta de

20 procesamiento proteolítico alterado de proteína precursora amiloide (APP). La acumulación anormal de A β se ha correlacionado con una variedad de mutaciones, tales como mutaciones de la APP dominantes autosómicas, y mutaciones en genes que codifican para proteínas referidas como presenilina

53

1 (PS1) y presenilina 2 (PS2), las cuales influyen subsiguientemente sobre la actividad proteolítica de γ (gamma) o β (beta) secretasa, causando niveles incrementados, por ejemplo, de A β 1-42; mientras que la actividad proteolítica de α (alfa) secretasa se asocia presumiblemente con el procesamiento normal de la APP. Varios tipos de placas se encuentran en la AD e incluyen, pero no están limitadas a, placas neuríticas asociadas con neuritis distrófica anormal. También característica de la enfermedad, es la presencia de una respuesta inflamatoria en el SNC, que incluye astrocitos y microglia activada. Se piensa que la acumulación de agregados de proteína disfuncional (por ejemplo, A β y proteína de priones) asociada con trastornos neurológicos, causa el desarrollo de ciertos trastornos neurológicos, contribuye a los mismos, o de otra manera influye sobre los mismos (Ingelsson, M. y Hyman B. T. (2002) *Annals of Med.* 34: 259-271). Trastornos neurodegenerativos asociados con la agregación deletérea de proteínas, incluyen enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Pick, enfermedad de Parkinson, enfermedad causada por priones, enfermedad de Huntington y trastornos de neuronas motoras (Shastri, *Neurochemistry International*, 2002, 43: 1-7).

El término "amiloide" se refiere a la deposición extracelular (por ejemplo, A β , enfermedades causadas por priones y enfermedad de la cadena ligera en mieloma múltiple) o intracelular (por ejemplo, marañas neurofibrilares de proteína tau en AD y alfa-sinucleína en enfermedad de Parkinson), de agregados de proteínas (Trojanowski J. Q. y Mathson M. P. (2003) *Neuromolecular Medicine* 4: 1-5). Puede encontrarse deposición de amiloide

en el cerebro de pacientes con síndrome de Down y AD, así como en arterias, arteriolas, capilares y venas del sistema nervioso central. Pueden reconocerse depósitos de amiloide por la capacidad para unir colorantes tales como rojo Congo y tioflavina S, y formar fibrillas, incluyendo una conformación de lámina β -plegada transversal.

El término "amiloidosis" se refiere a un gran grupo heterogéneo de trastornos caracterizados por depósitos insolubles aberrantes de proteínas normalmente solubles, las cuales pueden ser proteínas mal plegadas, incluyendo agregados de proteínas.

Además de la enfermedad de Alzheimer (AD), enfermedad de Alzheimer de inicio temprano, enfermedad de Alzheimer de inicio tardío y enfermedad de Alzheimer presintomática, otras enfermedades caracterizadas por depósitos de amiloide son, por ejemplo, amiloidosis por amiloide A en suero (SAA), síndrome islándico hereditario, mieloma múltiple, enfermedades causadas por priones, y similares, u otras enfermedad amilogénicas del cerebro (Revesz, T. *et al.* (2003) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 62(9): 885-98), las cuales pueden tratarse de acuerdo a las composiciones y los métodos que se exponen en la presente. Las enfermedades causadas por priones más comunes en animales, son scrapie de ovejas y cabras, y encefalopatía espongiforme bovina (BSE) del ganado (Wilesmith y Wells (1991) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 172: 22-38). Se han identificado cuatro enfermedades causadas por priones en humanos: (i) kuru, (ii) enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), (iii) enfermedad de Gerstmann-Straussler-Sheinker (GSS), y (iv)

55

insomnio familiar fatal (FFI) (Gajdusek, D. C. (1977) *Science* 197(4307): 943-60 y Medori, R. *et al.* (1992) *N. Engl. J. Med.* 326(7): 444-9).

El constituyente principal de las placas seniles es el péptido A β .

El péptido A β es un fragmento interno de 39 a 43 aminoácidos de la proteína precursora APP. Varias mutaciones dentro de la proteína APP se han correlacionado con la presencia de la enfermedad de Alzheimer (véase, por ejemplo, Goate, A. *et al.* (1991) *Nature* 349(6311): 704-6, Murrell, M. *et al.* (1991) *Science* 254(5028): 97-9, Mullan, M. *et al.* (1992) *Nat. Genet.* 1(5): 345-7).

El término "proteína precursora β -amiloide" (APP), como se usa en la presente, se define como un polipéptido que es codificado por un gen del mismo nombre localizado en humanos en el brazo largo del cromosoma 21, y que incluye A β dentro de su tercer carboxilo. La APP es una proteína individual glucosilada que abarca la membrana, expresada en una amplia variedad de células en muchos tejidos de mamíferos.

Se piensa que mutaciones de la APP influyen sobre el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer por procesamiento proteolítico incrementado o alterado de la APP a A β , en particular procesamiento de la APP a cantidades incrementadas de la forma larga de A β (es decir, A β 1-42 y A β 1-43). Se piensa que mutaciones en otros genes, tales como los genes de presenilina, PS1 y PS2, afectan indirectamente el procesamiento proteolítico de la APP para generar cantidades incrementadas de la forma larga de A β (véase Hardy, J. (1997) *Trends Neurosci.* 20(4): 154-9). Estas observaciones indican que A β , y

en particular su forma larga, es un elemento causal en la enfermedad de Alzheimer.

El término "fragmentos de APP", como se usa en la presente, se refiere a fragmentos de APP diferentes de aquellos que consisten solamente de A β o fragmentos de A β . Es decir, los fragmentos de APP incluirán 5 secuencias de aminoácidos de APP además de aquellos que forman A β intacto, o un fragmento de A β .

El término "péptido beta-amiloide" es sinónimo de "péptido β -amiloide", " β AP", " β A" y "A β ". Todos estos términos se refieren a un péptido 10 formador de placas derivado de fragmentos de proteína precursora amiloide.

Como se usa en la presente, la definición de los términos A β fibrilar y A β total, es la siguiente: A β "fibrilar" es péptido A β contenido en depósitos de amiloide extracelulares que pueden ser referidos también como placas o plagas de A β . En algunos casos, las placas de A β pueden 15 distinguirse además como difusas o densas. La carga "total" de amiloide o carga total de A β , es la suma del péptido A β soluble y no soluble (por ejemplo, fibrilar), la mayor parte del cual se presume es extracelular. Se aprecia que existe una relación dinámica entre el A β soluble y no soluble, en donde el A β no fibrilar extracelular puede representar una fuente de A β , que puede llegar a 20 ser amiloide fibrilar.

Como se usa en la presente, el término encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), es el modelo animal primario para MS. Puede inducirse fácilmente EAE en pequeños mamíferos por inmunización con MBP en un

adyuvante adecuado, o por transferencia pasiva de células T CD4⁺ reactivas a MBP (Alvord Jr, E. C, *et al.* eds., en *Experimental Allergic Encephalomyelitis a Useful Model for Multiple Sclerosis*, A. R. Liss, N.Y., 1984; Makhtarian *et al.* *Nature* 309: 356 (1984); Ben-Nun *et al.* *J. Immunol.* 129: 303 (1982)). Las
5 células T que inducen EAE en ratones y ratas, reconocen péptidos que corresponden a regiones inmunodominantes de MBP presentadas por células que presentan antígeno en moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II.

De conformidad con un aspecto de la presente invención, se
10 provee un método para el tratamiento de una enfermedad o trastorno neurológico en un mamífero. El método de este aspecto de la presente invención puede hacerse efectivo, administrando una cantidad terapéuticamente efectiva de GA y una composición basada en proteosomas a un sujeto que necesita del mismo. Otro aspecto de la presente invención, es
15 en donde dicha enfermedad o trastorno neurológico es una enfermedad o trastorno que forma placas de amiloide. Las enfermedades o los trastornos neurológicos más prominentes tratados con GA y una composición basada en proteosomas de conformidad con un aspecto de la presente invención, son enfermedad de Alzheimer y esclerosis múltiple. Además de una composición
20 terapéutica de GA combinado con un proteosoma para el tratamiento de las enfermedades o los trastornos neurológicos mencionados anteriormente, otras modalidades incluyen, pero no están limitadas a, el uso de las siguientes composiciones terapéuticas para tratamiento: una composición basada en

proteosomas sin una composición de GA, GA en una composición en emulsión en submicras, o GA en una composición en nanoemulsión. Las modalidades anteriores incluirían también cualquier diluyente, excipiente, estabilizador o vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 Otro aspecto de la presente invención, es en donde el tratamiento de dicha enfermedad o trastorno neurológico en un mamífero, comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de GA y una composición basada en proteosomas, que induce una respuesta independiente de anticuerpos en dicho mamífero.

10 Otra modalidad de la presente invención consiste de un método para el tratamiento de una enfermedad amiloide, la cual puede ser enfermedad de Alzheimer. El tratamiento de la enfermedad amiloide puede llevarse a cabo, por ejemplo, previniendo un incremento en la carga de amiloide fibrilar, previniendo un incremento en la carga total de amiloide, 15 manteniendo la carga total de amiloide y/o fibrilar actual, o disminuyendo la carga total de amiloide y/o fibrilar en el cerebro. Puesto que se sabe que las proteínas amiloidales pueden residir por todo el cuerpo, las modalidades de la presente invención no se limitan a las proteínas amiloides del cerebro. Además, aunque la presente invención discute específicamente la clase β - 20 amiloide, otras clases amiloides tales como amiloide A en suero (SAA), enfermedad causada por priones, síndrome islándico hereditario, enfermedad de Huntington, parkinsonismo, síndrome de Down y angiopatía amiloide cerebral, se consideran dentro de la presente invención. De conformidad con

las enfermedades amiloidales mencionadas anteriormente, el tratamiento puede lograrse administrando una de las siguientes composiciones terapéuticas: una cantidad terapéuticamente efectiva de GA y una composición basada en proteosomas, una composición basada en proteosomas sin una composición de GA, GA en una emulsión en submicras, y/o GA en una nanoemulsión. Las modalidades anteriores incluirían también cualquier diluyente, excipiente, estabilizador o vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 Acetato de glatiramer

Un análogo inmunoquímico de la MBP que es efectivo en el tratamiento de la esclerosis múltiple (MS), es el acetato de glatiramer (GA), o copolímero-1 (COP-1) (patente de E.U.A. No. 3,849,550; solicitud del PCT WO/95/31990). El GA, en su forma disponible comercialmente, es una mezcla de polipéptidos sintéticos aleatorios formados de L-alanina, ácido L-glutámico, L-lisina y L-tirosina a una relación molar de 6.0:1.9:4.7:1.0. Fue sintetizado primero como un mimético inmunoquímico de la MBP. Por ejemplo, ciertos anticuerpos monoclonales para GA, reaccionan en forma cruzada con la MBP (Teitelbaum *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 9258 (1991)). Además, se ha encontrado que el GA induce células T supresoras específicas de MBP (Lando *et al.* J. Immunol. 123: 2156 (1979)). Experimentos en ratones indican que el GA inhibe también específicamente células T específicas de MBP que están implicadas en la destrucción de tejido del sistema nervioso central en

encefalomielitis alérgica experimental (EAE) (Teitelbaum *et al.* Proc. Natl. Acad. USA 85: 9724 (1995)); y Angelov, D. N. *et al.* PNAS 100(8): 4790-4795 (2003)), e indican que el GA puede usarse para tratar la esclerosis lateral amiotrófica, en donde la inducción de una respuesta autoinmune bien regulada
5 parece influir sobre la supervivencia en presencia de una respuesta anti-células T propia, la cual puede mejorarse por medio de la administración de GA.

El GA de conformidad con la presente invención, puede prepararse por medio de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el GA
10 puede prepararse por el procedimiento descrito en la patente de E.U.A. No. 3,849,550, en donde los N-carboxianhídridos de tirosina, alanina, glutamato de γ -bencilo y ϵ -N-trifluoro-acetil lisina, son polimerizados a temperatura ambiente en dioxano anhidro con dietilamina como un inhibidor. El desbloqueo del grupo γ -carboxilo de los ácidos glutámicos se lleva a cabo con bromuro de
15 hidrógeno en ácido acético glacial, y va seguido de la remoción de los grupos trifluoroacetilo de los residuos de lisina por piperidina a 1M. La mezcla de polipéptidos resultante consiste esencialmente de polímeros de alanina, ácido glutámico, lisina y tirosina, a una relación molar de aproximadamente 6:2:5:1.

El GA está también disponible comercialmente de Teva
20 Pharmaceuticals, Kfar-Saba, Israel.

El GA puede prepararse para su uso de conformidad con la presente invención, en cualquiera de las formas que mantengan su utilidad terapéutica. Estas incluyen mezclas de péptidos que tienen varias escalas de

61

peso molecular. Puede obtenerse GA que tenga una escala de peso molecular deseada, por métodos conocidos en la técnica. Dichos métodos incluyen cromatografía de líquidos de alta presión y filtración en gel de GA para remover especies de alto peso molecular, como se describe en el

5 documento WO 95/31990. En una modalidad, el GA tiene aproximadamente 75% de su especie de polímero dentro de la escala de peso molecular de aproximadamente 2 KDa a aproximadamente 20 KDa. En otra modalidad, el GA tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 4 KDa a 9 KDa. Se entiende que el GA puede someterse a degradación enzimática o de otro

10 tipo para comprender especies de polímero de una longitud diferente del GA convencional, o de otra manera modificada del mismo, de acuerdo a los métodos conocidos.

GA y proteosomas

15 Puede administrarse GA formulado con proteosomas (por ejemplo, IVX-908 o Protollin), por ejemplo, por inyección o intranasalmente. Cuando se suministra por inyección, dicho suministro puede ser como una inyección (administración simultánea combinada). En forma alternativa, el suministro de una composición de GA y una composición basada en

20 proteosomas puede llevarse a cabo por separado, puede lograrse por inyección en una pluralidad de sitios que pueden ocurrir simultáneamente o en momentos temporalmente distintos, y en donde un sitio sea presentado sólo con una composición de GA (es decir, sin proteosomas), y en un segundo sitio

62

sólo se administra una composición basada en proteosomas (es decir, sin GA). Se contempla también que el GA pueda administrarse por inyección, mientras que al mismo tiempo o un tiempo diferente, una composición basada en proteosomas se administre, por ejemplo, intranasalmente. De esta manera, en una modalidad de la presente invención, una composición de GA se suministra por inyección y por separado, una composición basada en proteosomas se suministra intranasalmente.

Pueden prepararse también péptidos de GA de la presente invención que contengan una porción de secuencia de ancla hidrofóbica que se esperaría mejor la asociación no covalente con proteosomas. La producción y fabricación de vacunas de determinante anafilico de proteosomas diseñadas para administración parenteral o especialmente para administración en mucosas, que incluye administración gastrointestinal para inducir respuestas de anticuerpos sistémicas y en mucosas, se discuten en la patente de E.U.A. No. 6,476,201. Un determinante anafilico es una molécula que tiene regiones hidrofóbicas e hidrofílicas que, cuando se formula adecuadamente con proteosomas, se alinea con los proteosomas para formar un complejo que induce una respuesta inmunológica en un sujeto. Determinantes anafilicos típicos incluyen glucolípidos, liposacáridos (que incluyen lipopolisacáridos destoxificados), lipopéptidos, dominios de transmembrana, proteínas de membrana o con toxoides, o proteínas o péptidos con anclas intrínsecas de aminoácidos hidrofóbicos.

Composiciones en emulsión

El GA puede administrarse en una emulsión en submicras o nanoemulsión, o puede formularse con la misma, como se describe en las patentes de E.U.A. 5,961,970 ó 5,716,637, respectivamente. La composición
5 comprende una emulsión en submicras de aceite en agua con aproximadamente 0.5 a aproximadamente 50% de un aceite, aproximadamente 0.1 a aproximadamente 10% de un emulsionante, aproximadamente 0.05 a aproximadamente 5% de un agente tensioactivo no iónico, y aproximadamente 0.00001 a aproximadamente 1.0% de GA como
10 una fase continua acuosa. La emulsión en submicras tiene un tamaño de gota medio en la escala entre aproximadamente 0.03 y aproximadamente 0.5 μm , y de preferencia entre 0.05 y 0.2 μm .

El procedimiento de nanoemulsiones provee composiciones de vacuna que contienen nanoemulsiones de partículas que tienen un núcleo de
15 lípidos, rodeado por cuando menos una bicapa de fosfolípidos. Las partículas tienen un diámetro medio en la escala de aproximadamente 10 a aproximadamente 250 nm, según se determina sobre una base en peso, y el GA es incorporado en la misma, ya sea intrínsecamente antes del procedimiento de homogenización, o extrínsecamente después. Las partículas
20 se suspenden típicamente en una fase continua acuosa, y cada partícula de lípido comprende un núcleo de lípidos, en donde el lípido es un sólido o cristal líquido en volumen a una temperatura de aproximadamente 25°C o mayor. Usualmente, la cantidad de GA atrapado es de aproximadamente 0.001 a

aproximadamente 5%. En forma alternativa, el GA puede formularse con un proteosoma, y/o la nanoemulsión puede comprender además una macromolécula de bioadhesivo o mucoadhesivo.

5 **Mecanismo propuesto**

La invención incluye también, por ejemplo, un método para la inhibición o reducción del nivel de un péptido amiloide- β (soluble y/o no soluble), fragmento o derivado del mismo, el cual comprende inmunizar a un mamífero con GA formulado con una composición basada en proteosomas, o
10 una composición basada en proteosomas sin GA, en donde la reducción o inhibición del péptido, fragmento o derivado del mismo, ocurre sin la generación de anticuerpos, según se demuestra en la presente usando ratones deficientes en células B (μ MT), los cuales son incapaces de inducir una respuesta de anticuerpos. Aunque sin desear que sea limitado por la
15 teoría, de preferencia, la inhibición o reducción del péptido amiloide (por ejemplo, péptido A β), es por medio de una activación de células inmunes, tales como la microglia localizada en el cerebro, o neutrófilos y/o macrófagos que pueden encontrarse en el cerebro o periféricamente, en donde la activación de estas células es independiente de cualquier mecanismo
20 específico de antígenos o anticuerpos. Se prefiere más que la reducción o inhibición ocurra sin que se cause encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) en el mamífero (incluyendo meningoencefalitis).

La reducción de la carga de amiloide (por ejemplo, placas

65

fibrilares que comprenden A β más A β no fibrilar que puede no depositarse en las placas), se refiere a la reducción de la deposición de amiloide y/o formación de placas de A β , y de esta manera al tratamiento de la AD y enfermedades relacionadas o enfermedades o trastornos amiloidogénicos.

- 5 Aunque los varios aspectos de la invención no deben limitarse a alguna teoría o mecanismo particular, se piensa que la microglia activada se co-localiza con las placas de amiloide, y que la activación de las células de la microglia es independiente de la presencia de la deposición de amiloide, cuya deposición
- 10 ceba a las células de la microglia endógenas para activación. De esta manera, las células de la microglia activadas participan en la depuración de depósitos de amiloide (por ejemplo, placas de A β). Más información sobre los mecanismos posibles para la AD, se encuentra en Schenk, D. (2002) Nature
- 15 3: 824-828. La deposición de placas de A β y la formación de placas de amiloide, parecen lograrse por medio de una cascada inflamatoria y neurotóxica compleja. Por lo tanto, se piensa que un mecanismo de tratamiento antiinflamatorio puede ser benéfico. Dichos procedimientos antiinflamatorios son con frecuencia consistentes con la expresión de
- 20 respuestas inmunes antiinflamatorias de IL-4/IL-10 (Th2) y TGF- β (Th3). En consecuencia, es un hallazgo sorprendente e inesperado que las presentes formulaciones que comprenden composiciones basadas en proteosomas y GA estimulan una respuesta inmune no mediada por anticuerpos, que causa la reducción de placas que contienen A β -amiloide, ya que se ha propuesto previamente que los proteosomas están asociados con más frecuencia con la

66

estimulación de una respuesta inmune tipo Th1 (citocinas) asociada con una respuesta inmune proinflamatoria, y estaría en aposición a una respuesta inmune Th2, y sería distinta de la misma. Sin embargo, el aumento de la fagocitosis de la microglia por la citocina tipo Th1 INF-gamma (75% anterior
5 no tratada), podría sugerir también un mecanismo de retroalimentación para la depuración acelerada del infiltrado inflamatorio en el SNC (Cha, A. *et al.* (2001) GLIA 33(1): 87-95). Además, el INF-gamma puede llevar por sí mismo también a la inhibición por transcripción de la proteína precursora beta-amiloide (Ringheim G. E. *et al.* Biochem Biophys Res Commun (1996)
10 224(1): 246-51).

Composiciones basadas en proteosomas

La materia de las patentes de E.U.A. 6,476,201 y 5,961,970, describe cómo para que vacunas de subunidades multivalentes estimulen
15 respuestas inmunes óptimas para cada uno de los componentes, los componentes adecuados deben estar adecuadamente asociados, y cada uno debe estar disponible para el sistema inmune, de modo que puedan ser eficientemente reconocidos y procesados por las células del sistema inmune. Dicho reconocimiento y procesamiento puede incluir captación por células
20 membranosas (células M) localizadas, por ejemplo, dentro de los epitelios nasales, y el suministro subsiguiente hacia células subyacentes del sistema inmune del hospedero. Ejemplos primarios de dichas vacunas no covalentemente combinadas, incluyen vacunas basadas en proteosomas que

pueden consistir de proteínas de la membrana exterior de *Neisseria* no covalentemente combinadas con una amplia variedad de antígenos que incluyen péptidos, lipopéptidos, proteínas de transmembrana o con toxoides, polisacáridos o lipopolisacáridos (LPS) (para una mayor revisión, véase las

5 siguientes referencias: patente de E.U.A. 5,726,292, Immunogenicity and Efficacy of Oral or Intranasal *Shigella flexneri* 2a and *Shigella sonnei* Proteosome-Lipopolysaccharide Vaccines in Animal Models; Infect. Immun. 61: 2390; Mallett, C. P., T. L. Hale, R. Kaminski, T. Larsen, N. Orr, D. Cohen y G. H. Lowell. (1995)); Intranasal or intragastric immunization with proteosome-

10 *Shigella* lipopolysaccharide vaccines protect against lethal pneumonia in a murine model of shigellosis (Infect. Immun. 63: 2382-2386; Lowell G H, Kaminski R W, Grate S *et al.* (1996)); Intranasal and intramuscular proteosome-staphylococcal enterotoxin B (SEB) toxoid vaccines: immunogenicity and efficacy against lethal SEB intoxication in mice (Infec.

15 Immun. 64: 1706-1713; Lowell, G. H. (1990)); Proteosomes, Hydrophobic Anchors, Iscoms and Liposomes for Improved Presentation of Peptide and Protein Vaccines (en New Generation Vaccines: G. C. Woodrow y M. M. Levine, eds. (Marcel Dekker, NY) capítulo 12 (pp. 141-160)); y Proteosome-lipopeptide vaccines: enhancement of immunogenicity for malaria CS

20 peptides; (Lowell, G. H., W. R. Ballou, L. F. Smith, R. A. Wirtz, W. D. Zollinger y W. T. Hockmeyer (1988) Science 240: 800)).

Las composiciones basadas en proteosomas, como se usan en la presente, se refieren a preparaciones de proteínas de la membrana exterior

68

(OMPs, conocidas también como porinas) de bacterias Gram-negativas, tales como especies de *Neisseria* (véase, por ejemplo, Lowell *et al.*, J. Exp. Med. 167: 658, 1988; Lowell *et al.*, Science 240: 800, 1988; Lynch *et al.*, Biophys. J. 45: 104, 1984; Lowell, en "New Generation Vaccines" 2a ed., Marcel Dekker, Inc., New York, Basil, Hong Kong, págs. 193, 1997; patente de E.U.A. No. 5,726,292; patente de E.U.A. No. 4,707,543), las cuales son útiles como un vehículo o un adyuvante para inmunógenos, tales como antígenos bacterianos o virales. Los proteosomas preparados como se describió anteriormente, contienen también un lipopolisacárido (LPS) endógeno que se origina de las bacterias usadas para producir las porinas OMP (por ejemplo, especies de *Neisseria*). Cualquier método de preparación que resulte en el componente de proteína de la membrana exterior en forma vesicular o tipo vesícula, incluyendo estructuras membranosas multimoleculares o composiciones de OMP de tipo globular fundidas de una o más OMPs, se incluye dentro de la definición de proteosoma.

El término "liposacárido", como se usa en la presente, se refiere a lipopolisacárido o lipooligosacárido nativo o modificado (en conjunto, referidos también como "LPS") derivado de bacterias Gram-negativas, tales como *Shigella flexneri* o *Plesiomonas shigelloides*, u otras bacterias Gram-negativas (incluyendo *Alcaligenes*, *Bacteroides*, *Bordetella*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Chlamydia*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Ehrlichia*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Francisella*, *Fusobacterium*, *Gardnerella*, *Haemophilus*, *Helicobacter*, *Klebsiella*, *Legionella*, *Moraxella*, *Morganella*, *Neisseria*,

Pasteurella, *Proteus*, *Providencia*, otras especies de *Plesiomonas*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Pseudomonas*, *Rickettsia*, *Salmonella* y *Serratia*, y otras especies de *Shigella*, *Spirillum*, *Veillonella*, *Vibrio* o *Yersinia*). Debe notarse que el LPS, como se usa en la presente, puede ser no destoxificado o

5 destoxificado.

En otras modalidades, el LPS exógeno aislado de las mismas bacterias o diferentes bacterias de las cuales se preparó un proteosoma, puede mezclarse con las mismas; una de dichas composiciones basadas en proteosomas, es referida en la presente como IVX-908 (la cual puede ser

10 referida también como Protollin). En otras palabras, los proteosomas del tipo IVX-908, son preparaciones de OMPs mezcladas con por lo menos un tipo de liposacárido, que proveen una composición de OMP-LPS (la cual puede funcionar como una composición inmunoestimuladora). De esta manera, el adyuvante de OMP-LPS (IVX-908) puede comprender dos de los

15 componentes básicos: (1) una preparación de proteína de membrana exterior de proteosomas preparados de bacterias Gram-negativas, tal como *Neisseria meningitidis*, y (2) una preparación de uno o más liposacáridos. Se contempla también que componentes de IVX-908 puedan ser o incluir lípidos, glucolípidos, glucoproteínas, pequeñas moléculas, o similares.

20 Las composiciones basadas en proteosomas como se describen en la presente, pueden incluir uno o más componentes los cuales, por lo menos en parte, funcionan como un adyuvante que posee la capacidad para estimular el sistema inmune de un hospedero. Se aprecia que dichos

20

componentes de proteosomas pueden incluir un componente de proteína de membrana exterior (OMP) (proteína de fusión o fragmento de la misma) de bacterias Gram-negativas, así como un componente de lipopolisacárido (LPS) de la misma bacteria Gram-negativa o de una bacteria Gram-negativa diferente. Dichos componentes pueden funcionar, por ejemplo, como ligandos que estimulan la respuesta inmune de un hospedero, interactuando con ciertos receptores (por ejemplo, receptores tipo Toll) producidos por una o más células hospederas de quien recibe la vacuna.

Sin que se desee que sea limitado por la teoría, uno o más componentes de las formulaciones de vacuna descritas en la presente, pueden interactuar con receptores tipo Toll (TLRs) asociados con una respuesta inmune innata y/o adaptativa de de quien recibe la vacuna. Existen por lo menos 10 TLRs (véase Takeda *et. al.*, Annu Rev Immunology (2003) 21: 335-76). Se han identificado uno o más ligandos que interactúan con ciertos TLRs, y activan subsiguientemente a los mismos, salvo TLR8 y TLR10. Proteínas de la membrana exterior de *Neisseria meningitidis*, por ejemplo, OMP2 (referida también como Por B), interactúan con TLR2, mientras que el LPS de la mayoría de las bacterias Gram-negativas, pero no todas, interactúa con TLR4. Por consiguiente, un mecanismo por el cual las formulaciones de vacuna descritas en la presente pueden contribuir a un efecto biológico, incluye la activación de uno de TLR2 y TLR4, o ambos. Sin embargo, en otro aspecto de la presente invención, es igualmente posible que la activación de otros TLRs (a excepción de TLR2 y TLR4) pueda cumplir una función similar,

71

o mejore además el perfil cualitativo y/o cuantitativo de citocinas expresadas, y que pueda estar asociada con una respuesta inmune Th1/Th2 del hospedero.

Se espera que la activación cualitativa y/o cuantitativa de uno o más TLRs, induzca o afecte una estimulación relativa (balanceada o no balanceada) de una respuesta inmune Th1 y/o Th2, con o sin respuesta humoral de anticuerpos concomitante.

Pueden usarse también ligandos que interactúen con TLRs diferentes de TLR2 y TLR4, en las composiciones de vacuna descritas en la presente. Dichos componentes de vacuna pueden usarse solos o en combinación, para influir sobre el desarrollo de una respuesta inmune del hospedero suficiente para tratar la enfermedad amilogénica o brindar protección ante la misma, como se expone en la presente. Dichos TLRs y ligandos asociados incluyen, pero no están limitados a, los presentados en la lista 1.

72

Lista 1

	Familia de TLR	Ligandos (ejemplo de fuente posible)
	TLR1	Factores solubles (<i>Neisseria meningitidis</i>) Lipopéptidos de tri-acilo (bacterias, micobacterias)
5	TLR2	Lipoproteínas y lipopéptidos Porinas (<i>Neisseria</i>) LPS atípico (<i>Leptospira interrogans</i>) LPS atípico (<i>Porphyromonas gingivalis</i>) Peptidoglucano (bacterias Gram-positivas) Acido lipoteicoico (bacterias Gram-positivas) HSP70 (hospedero) Glucolípidos (<i>Treponema maltophilum</i>)
	TLR3	ARN de doble cadena (por ejemplo, viral)
10	TLR4	LPS (bacterias Gram-negativas) Taxol (planta) HSP60 (hospedero) HSP70 (hospedero) HSP60 (<i>Chlamydia pneumoniae</i>) Fibrinógeno (hospedero)
	TLR5	Flagelina (bacterias)
	TLR6	Lipopéptidos de di-acilo (micoplasma)
	TLR7	Imidazoquinolina (compuestos sintéticos) Loxorribina (compuestos sintéticos) Bropirimina (compuestos sintéticos)
15	TLR8	Ligando aún no identificado
	TLR9	ADN de CpG (bacterias)
	TLR10	Ligando aún no identificado

Cualquiera de los TLRs identificados, o una combinación de los mismos (lista 1), puede ser activado por cualquiera de los componentes del
ligando de TLR, o una combinación de los mismos, de una formulación de
vacuna contemplada en la presente. Se aprecia además que la estimulación
de cualquiera de los TLRs, o una multiplicidad de los mismos, puede lograrse
usando cualquiera de los ligandos de TLR, o una multiplicidad de los mismos,

a concentraciones adecuadas con la vía de administración (por ejemplo, intranasal, por inyección, etc.).

Por lo tanto, de conformidad con la presente invención, se entiende que una formulación de vacuna puede incluir cualquiera de uno o
5 más ligandos de TLR, incluyendo ligandos recombinantes (proteínas de fusión o fragmentos de las mismas), combinados con un componente de vacuna antigénico, u opcionalmente incluyendo un receptor de CD14, con o sin la adición exógena de un componente de lipopolisacárido.

En un aspecto de la presente invención, sólo la porción de unión
10 a TLR de cualquiera de uno o más ligandos de TLR puede asociarse, por ejemplo, por medio de tecnologías de ADN recombinante, y puede formularse con o sin GA como un tratamiento terapéutico y/o prevención profiláctica de la enfermedad de Alzheimer o enfermedad o trastorno similar. Dicho polipéptido puede prepararse también por medio de uno o más procedimientos de síntesis
15 bien conocidos por los expertos en la técnica. Sin que se desee que sea limitado por la teoría, dicho dominio de unión aislado puede aislarse de una porción de proteína de la membrana exterior de *Neisseria meningitidis* referida como porina B que se sospecha se une a TLR2. Dichos otros dominios de unión a ligando del polipéptido de TLRs, pueden usarse también en forma
20 similar solos o en una u otra combinación. Dicha formulación puede usarse con o sin la necesidad de administrar una formulación de proteosoma-GA, o puede usarse después de la administración de una formulación de proteosoma-GA. Además, se aprecia que una variante (por ejemplo,

sustitución conservativa de aminoácidos) de dicha porción de unión a TLR de un ligando de TLR, puede usarse para activar un TLR, en tanto la variante mantenga la capacidad de unir (y activar) el TLR. En otro aspecto de la presente invención, dicha porción de unión a TLR de un ligando de TLR, puede ser reiterada una o más veces usando tecnologías de ADN recombinante para preparar un polipéptido que contenga copias múltiples de dicha porción de unión, o incluso polipéptidos multivalentes (es decir, híbridos) que comprendan dominios de unión múltiples de los mismos ligandos de TLR o diferentes ligandos de TLR.

En ciertas composiciones basadas en proteosomas, una o más de las partes componentes de la formulación de vacuna no necesitan combinarse no covalentemente, sino más bien pueden mezclarse con la composición de proteosomas (por ejemplo, IVX-908, Protollin). Las composiciones basadas en proteosomas denominadas Projuvant contienen sólo pequeñas cantidades de LPS (o lipooligosacárido (LOS)) endógeno, mientras que las composiciones basadas en proteosomas IVX-908/Protollin contienen LPS exógeno adicional, el cual puede ser de la misma especie de bacteria Gram-negativa o una especie de bacteria Gram-negativa diferente como los componentes de OMP, o puede ser una mezcla de LPS derivado de más de una bacteria Gram-negativa.

En una modalidad, el contenido final de liposacárido en peso como un porcentaje de la proteína total del proteosoma puede variar de aproximadamente 1% a aproximadamente 500%, más preferiblemente en una

75

escala de aproximadamente 20% a aproximadamente 200%, o en una escala de aproximadamente 30% a aproximadamente 150%, o en una escala de aproximadamente 10% a aproximadamente 100%. Una modalidad preferida de la presente invención, es la composición inmunoestimuladora en donde el

5 componente basado en proteosomas se prepara de *Neisseria meningitidis*, y el contenido final de liposacárido está entre 50% y 150% de la proteína total del proteosoma en peso. El contenido final de LPS puede representar la combinación de LPS endógeno (por ejemplo, LOS) más LPS (o LOS) añadido exógenamente. En otra modalidad, se preparan composiciones basadas en

10 proteosomas (por ejemplo Projuvant) con contenido de lipooligosacárido (LOS) endógeno de *Neisseria*, que varía de aproximadamente 0.5% hasta aproximadamente 5% de la OMP total. Otra modalidad de la presente invención provee proteosomas con liposacárido endógeno en una escala de aproximadamente 12% a aproximadamente 25%, y en una modalidad

15 preferida, entre aproximadamente 15% y aproximadamente 20% de la OMP total. La presente invención provee también una composición que contiene liposacárido derivado de cualquier especie de bacteria Gram-negativa, el cual puede ser de la misma especie de bacteria Gram-negativa que la fuente de proteosomas, o de una especie bacteriana diferente.

20 La patente de E.U.A. No. 6,476,201 se refiere a la producción y fabricación de vacunas de determinante anfilíco de proteosomas diseñadas para administración parenteral o en mucosas, para inducir respuestas de anticuerpos sistémica (suero) y en mucosas (incluyendo mucosa respiratoria e

intestinal). Se prefiere la administración en mucosas e incluye, pero no está limitada a, administración respiratoria (incluyendo, por ejemplo, intranasal, intrafaríngea e intrapulmonar), gastrointestinal (por ejemplo, incluyendo oral o rectal) o tópica (por ejemplo, conjuntival u ótica). Un determinante anfifílico es

5 una molécula que tiene regiones hidrofóbicas e hidrofílicas que, cuando se formula adecuadamente con proteosomas, se alinea con los proteosomas para formar un complejo que induce una respuesta inmunológica en un sujeto.

Determinantes anfifílicos típicos incluyen glucolípidos, liposacáridos (incluyendo lipopolisacáridos destoxificados), lipopéptidos, proteínas de

10 transmembrana, de membrana o con toxoides, o proteínas o péptidos con anclas de aminoácidos hidrofóbicos intrínsecas. Estos materiales determinantes pueden obtenerse de bacterias Gram-negativas que incluyen *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Brucella*, *Shigella* y *Neisseria*. Más específicamente, las vacunas de proteosomas en las cuales

15 preparaciones de proteosomas de proteína de membrana exterior meningocócicas (preparadas de cualquier cepa de *N. meningitidis* o *N. gonorrhea* u otra especie de *Neisseria*) son combinadas no covalentemente con lipooligosacáridos o lipopolisacáridos de *Shigella* o *Neisseria* nativos o destoxificados para formar vacunas, se diseñan para brindar protección contra

20 enfermedades causadas por organismos Gram-negativos que contienen cualquiera de las partes componentes del complejo, incluyendo *Meningococcus* o *Shigella*. Más específicamente, las vacunas de proteosomas contienen LPS que induce respuestas de anticuerpos que reconocen

77

antígenos O de polisacáridos somáticos específicos de tipo de lipopolisacáridos de *Shigella*, y confieren de esta manera protección homóloga contra la shigelosis. Los lipopolisacáridos, cuando se combinan con proteosomas, inducen respuestas inmunes protectoras anti-*Shigella*. Las

5 vacunas de proteosomas se preparan y se purifican de *Shigella sonnei* o *Plesiomonas shigelloides* para inmunidad contra enfermedades por *Shigella sonnei*, de *Shigella flexneri* 2a para inmunidad a enfermedades por *Shigella flexneri* 2a, etc., usando LPS derivado de organismos homólogos o que reaccionan antigénicamente en forma cruzada, para conferir inmunidad

10 homóloga contra la shigelosis causada por *S. flexneri* 2a (o 3a, etc.), *S. boydii*, *S. sonnei*, etc. Además, la patente de E.U.A. No. 6,476,201 describe la administración de vacunas de proteosoma-*Shigella* que son multivalentes, porque dos vacunas de proteosomas obtenidas independientemente usando antígeno de LPS de *Shigella* derivado de *S. flexneri* 2a (para enfermedades

15 por *S. flexneri* 2a) y de *P. shigelloides* o *S. sonnei* (para enfermedades por *S. sonnei*), se administran en conjunto, induciendo de esta manera anticuerpos que reconocen a los dos organismos, confiriendo de esta manera protección contra los dos tipos de enfermedades. Además, una vacuna de LPS de proteosoma-*Shigella*, en la cual proteosomas de meningococos tipo 2b del

20 grupo B se combinan con LPS de *P. shigelloides* usando tecnología de diafiltración de fibras huecas para producir una vacuna administrada por las mucosas respiratoria y/o gastrointestinal, y para inducir anticuerpos que reconocen al LPS del antígeno O somático de *S. sonnei*, se usan de esta

78

manera para brindar protección contra la shigelosis.

Un ejemplo no limitativo de composición basada en proteosomas de la presente invención, es el adyuvante IVX-908 de mucosas basado en proteosomas (Protollin), que es una formulación no covalente de proteínas de la membrana exterior (proteosomas) de *Neisseria meningitidis*, y LPS añadido exógenamente preparado de *Shigella flexneri*.

Formulación y administración

En lo sucesivo, las frases "vehículo fisiológicamente aceptable" y "vehículo farmacéuticamente aceptable", pueden usarse reciprocamente para referirse a un vehículo o un diluyente que no causa irritación significativa a un organismo, y no suprime la actividad biológica y las propiedades del compuesto administrado.

En la presente, el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica que facilita aún más la administración de un ingrediente activo. Ejemplos de excipientes incluyen, sin limitación, carbonato de calcio, fosfato de calcio, varios azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

Técnicas para la formulación y administración de fármacos, pueden encontrarse en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, Pa., última edición.

Vías de administración adecuadas pueden incluir, por ejemplo, suministro oral, rectal, transmucoso, transnasal, intestinal o parenteral,

79

incluyendo inyecciones intramuscular, subcutánea e intramedular, así como inyecciones intratecal, intraventricular directa, intravenosa, intraperitoneal, intranasal o intraocular, pero la vía de administración preferida para los proteosomas, es intranasalmente.

- 5 Las formulaciones de GA que comprenden composiciones basadas en proteosomas, o en emulsiones en submicras o nanoemulsiones, pueden administrarse parenteralmente, oralmente, intranasalmente o tópicamente o, como se indica en la presente, en cualquier combinación de las mismas. Sin embargo, en ciertas modalidades, se prefiere administrarlas
- 10 parenteralmente o a través de mucosas.

Vías de administración doble o múltiple, se incluyen también en la presente. Las vías de administración doble pueden incluir, por ejemplo, preparaciones basadas en proteosomas preparadas y administradas intranasalmente, pero por separado del GA, el cual puede administrarse por

15 inyección al mismo tiempo o en un tiempo diferente de la administración intranasal de proteosomas. Pueden administrarse también composiciones de proteosomas (Projuvant) o proteosoma: LPS (es decir, IVX-908) (en ausencia de GA) por inyección, simultáneamente con GA o en un tiempo diferente. Para inyección, los ingredientes activos de la invención pueden formularse en un

20 vehículo fisiológicamente aceptable, de preferencia en reguladores de pH fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hank, solución de Ringer o regulador de pH de solución salina fisiológica. Para administración transdérmica y posiblemente a través de mucosas, pueden usarse

penetrantes adecuados para que la barrera sea permeada en la formulación.

Dichos penetrantes se conocen en general en la técnica.

Para administración oral, los compuestos pueden formularse fácilmente combinando los compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Dichos vehículos permiten que los compuestos de la invención sean formulados como tabletas, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones acuosas espesas, suspensiones, y similares, para ingestión oral por un paciente. Pueden obtenerse preparaciones farmacológicas para uso oral usando un excipiente sólido, moliendo opcionalmente la mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, después de la adición de auxiliares adecuados si se desea, para obtener núcleos de grageas o tabletas. Excipientes adecuados son, en particular, llenadores tales como azúcares, que incluyen lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de papa, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio; y/o polímeros fisiológicamente aceptables, tales como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden añadirse agentes de desintegración tales como polivinilpirrolidona entrelazada, agar o ácido algínico, o una sal de los mismos, tal como alginato de sodio.

Para administración nasal, los ingredientes activos para su uso de conformidad con la presente invención pueden suministrarse convenientemente en la forma, por ejemplo, de una presentación de rocío en

aerosol, a partir de un empaque presurizado o un nebulizador con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, dicloro-tetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse
5 proveyendo una válvula que suministre una cantidad medida. Pueden formularse cápsulas y cartuchos, hechos de gelatina, por ejemplo, para su uso en un dispensador, que contenga una mezcla de polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Las preparaciones descritas en la presente pueden formularse
10 para administración parenteral, por ejemplo, por inyección de bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampolletas o en contenedores de dosis múltiples con opcionalmente, un conservador añadido. Las composiciones pueden ser suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o
15 acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de enfermedades relacionadas con la producción de péptido amiloide (por
20 ejemplo, A β), y/o depósitos del mismo, en cualquier parte en el cuerpo del sujeto, pero especialmente en el cerebro. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones farmacéuticas se administran a un mamífero que sufre ya la enfermedad o que necesita de tratamiento. Las composiciones farmacéuticas

se administrarán en una cantidad suficiente para inhibir o reducir más la deposición de A β en placas, y/o para depurar placas ya formadas y/o para estimular la remoción de agregados de A β ya existentes, y/o estimular una reducción en A β que pueda no estar contenido en placas. Una cantidad
5 adecuada para lograr esto, se define como una "dosis o cantidad terapéuticamente efectiva".

Para aplicaciones profilácticas, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran a un sujeto mamífero susceptible a una enfermedad relacionada con amiloide (por ejemplo, enfermedad de
10 Alzheimer relacionada con A β), pero que no sufre ya de dicha enfermedad. Dichos sujetos mamíferos pueden identificarse por selección genética y análisis clínico, como se describe en la literatura médica (véase, por ejemplo, Goate (1991) Nature 349: 704-706). Las composiciones farmacéuticas serán capaces de inhibir, prevenir o reducir la deposición de amiloide, por ejemplo,
15 de A β en placas en una etapa sintomáticamente temprana, de preferencia previniendo incluso las etapas iniciales de la enfermedad relacionada con β -amiloide. La cantidad del compuesto que se requiere para dicho tratamiento profiláctico, referida como una dosificación profilácticamente efectiva puede ser en general, pero no necesariamente la misma, como se describió
20 anteriormente para tratamiento terapéutico.

Para los propósitos de esta especificación y las reivindicaciones acompañantes, los términos "paciente", "sujeto" y "receptor" se usan recíprocamente. Incluyen humanos y otros mamíferos (por ejemplo, vaca y

otros bovinos), los cuales son el objeto de tratamiento profiláctico, experimental o terapéutico.

Como se usa en la presente, el término "tratamiento" incluye inhibir, retardar o revertir sustancialmente la progresión de una enfermedad, mejorando sustancialmente los síntomas clínicos de una enfermedad, o previniendo sustancialmente la aparición de síntomas clínicos de la enfermedad, en una forma estadísticamente significativa.

Dependiendo de la severidad y capacidad de respuesta de la condición que se va a tratar, la dosificación puede ser de una administración individual o una pluralidad de administraciones, en un sitio o una pluralidad de sitios o medios de suministro, con el curso de tratamiento durando de varios días a varias semanas o hasta que se efectúe la cura, o se logre una disminución estadísticamente significativa del estado de enfermedad. La cantidad de un tratamiento que se va a administrar dependerá, de hecho, del sujeto que se esté tratando, la severidad de la enfermedad, el modo de administración, el juicio del médico que prescribe, etc. Métodos para el cálculo de la significancia estadística, se conocen en la técnica relevante.

Se pretende que el "tratamiento" de la MS incluya tratamiento para prevenir o retardar el inicio de cualquier manifestación, clínica o subclínica, por ejemplo, síntomas histológicos de la misma, de esclerosis múltiple, así como la supresión terapéutica o el alivio de síntomas después de su manifestación, abatiendo el ataque autoinmune y previniendo o retardando la destrucción del tejido autoinmune. La "disminución", "supresión" o

"reducción" del ataque o reacción autoinmune, abarca reducción parcial o mejora de uno o más síntomas del ataque o reacción. Un efecto supresor "sustancialmente" incrementado (o disminución o reducción) de la "reacción autoinmune", significa una disminución significativa en uno o más marcadores o indicadores histológicos o clínicos de MS. Ejemplos no limitativos, son una reducción por cuando menos 1 unidad en la puntuación de parálisis de extremidades.

El GA se administra en general para tratar la MS en una dosis de 0.01 mg a 1000 mg/día. En una modalidad, se usa una dosificación en la escala de 0.5 a 50 mg. Sin embargo, de conformidad con un aspecto de la presente invención, se anticipa que el uso de uno o más adyuvantes expuestos en la presente (o combinación de los mismos) puede formularse con una composición que comprenda GA, según el cual pueden permitirse dosis o frecuencia de administración mayores o menores de GA, y que no es necesario que la dosis de GA sea efectiva por sí misma.

El establecimiento de la escala de dosificación efectiva, así como la cantidad óptima, están bien dentro de la aptitud en la técnica a la luz de la información dada en esta sección. Por ejemplo, dosificaciones para mamíferos, y dosificaciones para humanos en particular, son optimizadas comenzando con una dosis relativamente baja de GA (por ejemplo, 1 mg/día), incrementándola progresivamente (por ejemplo, logarítmicamente), y midiendo una reacción biológica al tratamiento; por ejemplo, (i) midiendo la inducción de células reguladoras (CD4⁺ y/o CD8⁺) (Chen, Y. *et al.*, Science, 255: 1237

85

(1994)); (ii) midiendo la reducción en marcadores de superficie clase II en células T circulantes; (iii) midiendo el número de células que expresan TGF- β , o la cantidad relativa de TGF- β detectable; (iv) evaluando el número y la activación de células T de ataque inmune en la sangre (por ejemplo, limitando el análisis de la dilución y la capacidad para proliferar); o (v) evaluando la severidad de la enfermedad, de acuerdo a métodos de evaluación bien conocidos (por ejemplo, midiendo el número de ataques, hinchamiento de articulaciones, fuerza de asimiento, rigidez, agudeza visual, capacidad para reducir o discontinuar la medicación). Una dosificación efectiva, es cualquier dosis que cause por lo menos una atenuación estadísticamente o clínicamente significativa en uno de estos marcadores, y de preferencia una que atenúe por lo menos un síntoma característico de MS durante el estudio de dosificación.

La evaluación de la severidad de la enfermedad en MS puede lograrse de acuerdo a métodos bien conocidos, dependiendo del tipo de enfermedad. Dichos métodos incluyen, sin limitación, la severidad y el número de ataques durante un periodo; la acumulación progresiva de incapacidad (la cual puede medirse, por ejemplo, en la escala de estado de incapacidad expandida); el número y el grado de lesiones en el cerebro (según se revela, por ejemplo, por formación de imágenes de resonancia magnética); y la frecuencia de células T autorreactivas.

Habiendo descrito ahora generalmente la invención, la misma se entenderá más fácilmente haciendo referencia a los siguientes ejemplos, los

86

cuales se proveen a manera de ilustración y no se pretende que sean limitativos de la presente invención, a menos que se especifique de otra manera.

5

EJEMPLOS

Se inmunizó a ratones transgénicos para proteína precursora amiloide (APP), con péptido de glucoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG) (aminoácidos 35-55) en adyuvante completo de Freund (CFA) con administración (inyección) subsiguiente de toxina de pertussis (PT), para determinar su susceptibilidad a la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) en comparación con crías de la misma camada no transgénicas. Como controles, se inmunizó a los animales con albúmina de suero de bovino (BSA) o péptido β -amiloide de humano (aminoácidos 1 a 40 de A β). Se desarrolló EAE a un grado idéntico en animales transgénicos para APP (Mucke *et al.*, Ann NY Acad Sci (777) 82-88 (1996)) y las crías de la misma camada no transgénicas, y no se observó EAE en animales los inmunizados con A β 1-40 o con BSA. Sin embargo, cuando los cerebros se examinaron neuropatológicamente, hubo menos tinción para A β en los animales que desarrollaron EAE. Por medio de la cuantificación de la cantidad de tinción para fibrillas de A β en el hipocampo usando tioflavina S, se encontró una reducción de 92% en los ratones inmunizados con MOG contra los controles ($p = 0.001$), y una reducción de 73% en comparación con ratones

inmunizados con A β 1-40 ($p = 0.03$) (véase cuadro 1, figura 1). Por medio de la cuantificación del contenido total de A β en el cerebro por medio de ELISA, se determinó una reducción de 94% en A β en animales inmunizados con MOG, en comparación con grupos control ($p < 0.001$), y una reducción de 86% cuando se compararon con ratones inmunizados con A β 1-40 ($p = 0.03$) (véase cuadro 1, figura 1).

Para determinar si el efecto fue único para la EAE inducida por MOG, se indujo EAE con péptido de proteína de proteolípidos (PLP) (aminoácidos 139 a 151) en CFA. Se encontró una reducción de 76% de tinción para las fibrillas de A β , y una reducción de 70% en los niveles de A β en animales con EAE inducida por PLP ($p < 0.02$) (véase cuadro 2, figura 3A). Para inducir EAE con PLP, se usaron ratones Tg2576 como es descrito por Hsiao, K. *et al*, Science 274 (5284): 99-102 (1996), los cuales están en una base de B6/SJL. Se encontraron resultados similares con ratones Tg2576 y ratones J20 inmunizados, como es descrito por Mucke *et al.*, Ann NY Acad Sci (777) 82-88 (1996), para inducir EAE por MOG (véase cuadro 1). Estos resultados demuestran que la observación no se relacionó con el antígeno usado para la EAE inducida o el modelo estudiado de AD en animales, ni la base genética del animal, ni el género (50% de machos/hembras). No se observaron cambios en los animales inmunizados con BSA en CFA. Notable, no hubo diferencia alguna en la carga total de A β (carga de amiloide) en ratones J20 de más de 13 meses, en comparación con ratones Tg2576 de más de 16 meses.

En estudios previos de procedimientos inmunes para el tratamiento del modelo de AD en ratones en el cual se inmunizó a los animales con péptido A β formulado en CFA, Solomon, B. *et al.*, Proc Natl Acad Sci 94: 4109-12 (1997), han mostrado que anticuerpos anti-agregación β -amiloide tienen una función *in vitro*, y Weiner, H. L. *et al.*, Ann Neurol 48, 567-79 (2000) y Schenk, D. *et al.*, Nature 400, 173-7 (1999) *in vivo*, en la reducción de la carga de amiloide, y su actividad se ha vinculado a un epítipo específico en la región N-terminal de A β (Frenkel, D. *et al.*, Neuroimmunol 88, 85-90 (1998) y Frenkel, D. *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 97, 11455-9 (2000)).

Se midieron los niveles de anticuerpos contra A β en animales inmunizados con MOG o PLP, para determinar si había reactividad cruzada con A β y títulos de anticuerpo de A β , en comparación con aquellos animales inmunizados con A β . Como se muestra en los cuadros 1 y 2, no se detectaron anticuerpos anti-A β en animales inmunizados con MOG o PLP. Para establecer definitivamente que los anticuerpos no estaban desempeñando función alguna, se inmunizó con MOG 35-55 en CFA a ratones J20 de 16 meses procreados para ratones deficientes en células B μ MT, seguida de administración de toxina de pertussis. Como se muestra en el cuadro 1 y en la figura 1, los ratones APP+ deficientes en células B μ MT tuvieron una reducción de 90% en amiloide en comparación con el control, medida por tinción con ThS ($p < 0.001$) o por ELISA para amiloide total del cerebro ($p < 0.001$). Estos resultados indican que la reducción de A β después de la inmunización con MOG, ocurrió por medio de un mecanismo independiente de anticuerpos.

Estudios previos han sugerido que la microglia activada puede desempeñar una función importante en la depuración de A β *in vivo* (Schenk, D. *et al.*, Nature 400, 173-7 (1999), Rogers, J. *et al.*, Glia 40, 260-9 (2002), Mitrasinovic, O. M. *et al.*, Neurobiol Aging 24, 807-15 (2003), Webster, S. D. *et al.*, Exp Neurol 161, 127-38 (2000), Bacskai, B. J. *et al.*, J Neurosci 22, 7873-8 (2002), Nicoll, J. A. *et al.*, Nat Med 9, 448-52 (2003), Akiyama, H. y McGeer, P. L., Nat Med 10, 117-8; respuesta del autor 118-9 (2004)). La microglia (o células tipo microglia) activadas, pueden distinguirse además con base en si se derivan del cerebro o se originan fuera del cerebro, es decir, periféricamente, tales como los neutrófilos y los macrófagos. Procedimientos para distinguir la microglia derivada del cerebro de neutrófilos y macrófagos periféricos, se conocen en la técnica. Para investigar la función potencial de la activación de la microglia en la depuración de A β , los cerebros de ratones APP tg inmunizados (por inyección en el cojinete de la pata o intranasalmente) con MOG/CFA, fueron teñidos con CD11b, un marcador de la microglia activada. Como se muestra en las figuras 3A y 4 y en el cuadro 4, la inmunotinción del hipocampo de ratones APP tg inmunizados con MOG reveló números incrementados de microglia activada (349 ± 34.3 células/región del hipocampo), la cual se co-localizó con placas de amiloide (cuadro 4). Sólo se observó tinción mínima en animales control inmunizados con BSA/CFA (76 ± 17 células/región del hipocampo) (cuadro 4). Se observaron niveles intermedios de activación de la microglia, en animales inmunizados con A β /CFA (106 ± 27 células/región del hipocampo). Además, se observaron

también niveles incrementados de activación de la microglia en ratones μ MT deficientes en células B ($p < 0.001$) y en animales inmunizados con PLP ($p < 0.001$) (figura 3A, cuadro 4).

De acuerdo a la primera serie de experimentos descritos anteriormente, la administración de MOG/PLP más CFA (seguida de administración de toxina de pertussis) se asoció con una reducción de $A\beta$, pero fue coincidente con EAE no deseada. En estos experimentos, se usa toxina de pertussis para abrir la barrera hemoencefálica para el suministro de compuestos formulados con CFA en el cerebro. Por lo tanto, para evaluar si la reducción en $A\beta$ se relacionó directamente con la inducción de EAE, y puesto que MOG, PLP y GA se han estudiado en relación a EAE relacionada con MS, se evaluaron los efectos de la inmunización de ratones APP con acetato de glatiramer (GA), que es un copolímero aleatorio de los aminoácidos alanina, lisina, ácido glutámico y tirosina que es efectivo en la supresión de la EAE, y es un tratamiento aprobado y ampliamente usado para formas recurrentes de MS (Teitelbaum, D. *et al.*, J. Neural Transm Supl. 49, 85-91 (1997)).

Aunque como se hizo inicialmente, la administración de ciertas mezclas de antígeno/adyuvante provistas en la presente va seguida de una administración (inyección) de toxina de pertussis, y se aprecia enteramente que algunas otras composiciones descritas en la presente pueden administrarse sin la administración de dicha toxina. Por supuesto, composiciones basadas en proteosomas tales como IVX-908 con o sin GA, se administran sin la administración de la toxina de pertussis. De hecho, la toxina

91

de pertussis no se uso en momento alguno para el suministro nasal de alguna de las composiciones basadas en proteosomas descntas en la presente

Se inmunizo de esta manera a los ratones (por inyeccion en el cojinete de la pata) con 100 µg de GA en CFA e inmediatamente despues, y a 5 48 horas recibieron una inyeccion intrapertoneal de 150 ng de toxina de pertussis Cincuenta dias post-inmunizacion, se sacrifico a los ratones La inmunizacion con acetato de glatiramer llevo a una reduccion de 92% en las fibrillas de amiloide en la region del hipocampo contra controles no tratados ($p < 0.01$), y a una reduccion de 70% en la carga total de amiloide ($p < 0.01$) 10 (vease cuadro 1, figura 1) No hubo EAE clinica en animales inmunizados con GA/CFA mas toxina de pertussis

Puesto que el CFA no puede administrarse a sujetos humanos, se investigo el efecto de la vacunacion nasal con acetato de glatiramer en un modelo de AD en ratones con adyuvantes diferentes de CFA, se trato a los 15 animales con acetato de glatiramer administrado nasalmente solo o en conjunto con un adyuvante para mucosas Se preparo un adyuvante para mucosas basado en proteosomas, IVX-908 (Protollin), formado de una formulacion no covalente de proteinas de la membrana exterior (proteosomas) de *Neisseria meningitidis* y LPS de *Shigella flexner*, la cual se ha usado tanto 20 en humanos (Fries, L F , *et al* , Infect Immun 69 4545-53 (2001)) como en ratones (Plante, M *et al* , Vaccine 20, 218-25 (2001)) Los ratones recibieron tratamientos multiples del adyuvante de proteosomas la primera semana, y entonces recibieron un refuerzo sobre una base semanal para las siguientes

q2

cinco semanas, despues de lo cual se realizo analisis neuropatologico Como controles, se trato nasalmente a los animales con IVX-908+BSA, IVX-908 solo o GA solo Inesperadamente, la administracion nasal de GA formulado con IVX-908 resulto en una reduccion de 84% en el amiloide fibrilar positivo para tioflavina en el hipocampo ($p < 0.001$ contra control), y una reduccion de 70% en comparacion con IVX-908 solo ($p < 0.01$) (cuadro 3) En terminos de los niveles totales de A β en el cerebro, se observo una reduccion de 73% despues de la administracion nasal de acetato de glatiramer en IVX-908 ($p < 0.001$ contra control), y una reduccion de 45% usando IVX-908 solo ($p < 0.002$) (cuadro 3, figura 2) Ademias, se detecto microglia activada en torno a las placas de amiloide en los animales tratados La administracion nasal de GA solo no afecto a las fibrillas de A β , aunque hubo una ligera reduccion en los niveles totales de A β en el cerebro ($p = 0.044$ contra control) La administracion nasal de BSA+IVX-908 o IVX-908 solo resulto en una reduccion de 50% de la carga total de amiloide ($p = 0.02$ contra control), aunque no hubo efecto alguno sobre la tincion de A β fibrilar Opuestamente a la inyeccion con CFA, la administracion nasal de IVX-908 solo o como formulaciones con GA o BSA, no indujo EAE en animal alguno en estos experimentos

No se encontro activacion de la microglia en ratones no transgenicos para APP en ninguno de los protocolos de inmunizacion parenteralmente con CFA/PT mas GA, nasalmente con IVX-908 mas GA (vease figura 3B), o nasalmente con IVX-908 solo Estos resultados sugieren

93

que la activacion de la microglia despues de la administracion (inmunizacion) con GA formulado con IVX-908 o IVX-908 solo, puede depender de la presencia de la deposicion de amiloide que puede servir para cebar la microglia endogena para activacion

5 Aunque no existe reactividad cruzada conocida entre GA y A β , y los presentes inventores no observaron anticuerpos anti-A β en los animales tratados con GA o con EAE, es posible que la inmunizacion con GA+IVX-908 pudiera haber resultado en el cebado de celulas T reactivas a A β . Los presentes inventores midieron las respuestas proliferativas de celulas T y la
10 produccion de citocinas (IL-2, IFN- γ , IL-6) despues de 7 semanas de tratamiento semanal con GA+IVX-908 (tiempo en el cual el experimento concluyo), estimulando celulas T esplenicas con A β 1-40. Los presentes inventores no encontraron cebado de celulas T reactivas a A β medido por medio de la proliferacion: conteos por minuto para A β para no tratados = 3315
15 $\pm$ 1682 cpm, para GA+IVX-908 = 4516 $\pm$ 1412 cpm (los conteos de base fueron de 100 a 300). Indice de estimulacion (GA+IVX-908/no tratados) = 1.37, un indice de estimulacion minimo mayor de 2.5 es considerado como positivo. Ademias, los presentes inventores no encontraron secrecion de IL-2, IFN- γ o IL-6 arriba de la base en estos cultivos. Esta falta de respuesta de las
20 celulas T a A β es consistente con la falta de deteccion por los presentes inventores de anticuerpos anti-A β , ya que se requiere la ayuda de celulas T para la produccion de anticuerpos. Asimismo, los presentes inventores no encontraron cebado para A β en animales con EAE.

94

Para examinar el efecto del tratamiento con GA+IVX-908 sobre otro sitio del cerebro además del hipocampo, los presentes inventores investigaron el bulbo olfatorio y el cerebelo. Tñeron el bulbo olfatorio para A β , CD11b y fibrinogeno, y obtuvieron resultados similares a los observados en el hipocampo (figura 8). Después de la administración nasal de GA+IVX-908, los presentes inventores encontraron un número incrementado de microglia activada en comparación con el control. La activación ocurrió también en animales con EAE, pero se asoció con fuga en la barrera hemoencefálica (BBB), medida mediante tinción para fibrinogeno.

Cuando los presentes inventores examinaron el cerebelo, no encontraron activación incrementada de tinción de la microglia en los animales tratados con GA+IVX-908, sugiriendo que la activación incrementada se restringe a las áreas con deposición de A β . Además, no se observó activación de la microglia en otras partes en los cerebros de las crías de la misma camada no transgénicas después de GA+IVX-908, lo cual demuestra además que la activación incrementada se restringe a áreas con deposición de A β (véase figura 3B).

Para entender mejor el mecanismo de depuración que los presentes inventores observaron, los presentes inventores tñeron para la expresión de CD68, que es altamente expresado en macrófagos activados de la periferia, opuestamente a la microglia del cerebro. Como se muestra en la figura 9, los presentes inventores lograron mayor tinción para CD68 en animales con EAE, en comparación con aquellos tratados con GA+IVX-908.

yes
as

Este patron de tincion muestra la migracion de macrofagos del plexo coroideo al parenquima circundante del cerebro, incluyendo el cerebelo y la corteza. En el tratamiento con GA+IVX-908, existe expresion incrementada de CD68 principalmente en el espacio del plexo coroideo. Esto sugiere que las celulas CD11b+, responsables de la depuracion de A β en animales con EAE, migran hacia el SNC desde la periferia y se asocian con toxicidad neuronal, mientras que las celulas CD11b+ en animales tratados con GA+IVX-908 son principalmente celulas de la microglia endogenas, y se asocian con la depuracion de A β sin evidencia de toxicidad directa. Como otro apoyo para esta interpretacion, los presentes inventores encontraron que existe expresion incrementada de celulas CD68+ en el cerebelo de animales con EAE, pero no en GA+IVX-908 o animales no tratados (datos no mostrados). Ademas, celulas CD11b+ activadas despues de tratamiento con GA+IVX-908, se encontraron solo en regiones en donde hubo acumulacion de amiloide.

Como se muestra en el cuadro 4 y en la figura 4, la reduccion de fibrillas de A β en el hipocampo, se correlaciono fuertemente con numeros incrementados de celulas de la microglia activadas, segun se muestra por tincion de CD11b ($r = 0.7$ CD11b contra fibrillas de A β) e IFN- γ contra fibrillas de A β). Hubo una fuerte correlacion entre celulas CD11b y celulas de IFN- γ , y los presentes inventores observaron numeros incrementados de microglia inmunorreactiva para el receptor del factor estimulador de colonias de macrofagos (M-CSFR) en los animales tratados, en comparacion con el control ($p < 0.02$) (cuadro 4). Los presentes inventores observaron una

96

reduccion en TGF- β y el porcentaje de fibrillas de A β en la region del hipocampo ($r = 0.91$) No se observaron cambios significativos en las celulas inmunorreactivas a IL-10 entre el control y los animales tratados con GA+IVX-908, aunque los animales con EAE tuvieron menos IL-10 que los controles

5 Se realizaron los siguientes experimentos para evaluar si el tratamiento con GA mas IVX-908 induce toxicidad de celulas neuronales u otros efectos negativos potenciales i) determinar el nivel de GFAP, una medida de astrocitos (toxicidad) consistente con el daño de celulas neuronales, ii) medir el nivel de expresion de SM132, un marcador para la fosforilacion de neurofilamentos, y que se sabe se incrementa con el daño a celulas neuronales, iii) realizar una prueba de TUNEL como un medio para la medicion de la muerte celular apoptotica, y iv) determinar el nivel de iNOS, una enzima que se sabe es sobreexpresada bajo condiciones de tension de celulas neuronales

15 Los resultados de la prueba de GFAP, muestran que ocurre astrocitos en los animales no tratados control (area de astrocitos activados en el hipocampo, medida por medio de celulas GFAP+) (figura 5) Se redujo la astrocitos en GA+IVX-908 administrado nasalmente (3.1%, $p = 0.039$ contra control) En contraste, no hubo reduccion en la astrocitos en animales con EAE Estos resultados indican que la depuracion de A β como una consecuencia del tratamiento con GA+IVX-908 es menos toxica (asociada con menos astrocitos), que la observada en animales con EAE, aun cuando la EAE se asocia tambien con una reduccion en los depositos de A β

97

Los resultados de experimentos que miden SM132 (figura 6), muestran que células positivas para SM132 que tienen una morfología ovoide anormal, se asocian con placas neuríticas en animales control no tratados. Los animales con EAE muestran un incremento en el número de células positivas para SM132, con una morfología ovoide anormal por todo el cerebro (en asociación con inflamación), incluyendo el cerebelo (aunque no se observaron placas neuríticas). En contraste, los animales tratados con GA+IVX-908 muestran una reducción en el número de células positivas para SM132 (con una morfología ovoide anormal) asociadas con placas neuríticas. Estos experimentos sugieren que el tratamiento con GA+IVX-908 no se asocia con toxicidad, según se mide por medio de SM132.

Los resultados de experimentos que miden la muerte celular apoptótica usando una prueba de TUNEL estándar (figura 6), no muestran tinción con TUNEL en animales control y tinción con TUNEL incrementada en la corteza de animales con EAE. No se observó tinción con TUNEL en animales tratados con GA+IVX-908. Además, pruebas que miden iNOS, indican que iNOS es sobreexpresado en ratones con EAE, pero no en animales tratados con GA+IVX-908. No se detectó daño a estructuras vasculares en animales tratados con GA+IVX-908 o con EAE.

En conjunto, estos datos indican que aun cuando hubo depuración de A β en animales con EAE, así como en animales tratados con GA+IVX-908, el último no se asoció con toxicidad de células neuronales (cuadro 4 y figura 6).

98
98

Sin embargo, aunque la activación de la microglia después de la inmunización con IVX-908 solo parece requerir la presencia de depósitos de A β , dicha inmunización no resultó en la remoción de dichos depósitos de A β (por la microglia activada), sino más bien hubo una reducción preferencial en la cantidad de la carga total de amiloide. Dichos resultados pueden sugerir la posibilidad de que existen dos poblaciones de microglia que pueden ser activadas o, como una posibilidad alternativa, que la microglia puede ser activada a grados diferentes, parcialmente o completamente, en donde la microglia completamente activada sea capaz de remover placas de A β preexistentes, y la microglia parcialmente activada participe en el secuestro del péptido A β soluble. Considerando la noción de que las placas de A β solubles se agregan en placas de A β insolubles, dicho tratamiento con IVX-908 solo puede retardar o prevenir la formación continua de placas de A β , teniendo beneficio para un sujeto que posee la enfermedad.

El cuadro 4 y la figura 3B, demuestran que la reducción de las fibrillas de A β en el hipocampo se correlaciona con un número incrementado de células activadas de la microglia (como se muestra por tinción inmunohistoquímica de células CD11b+) y de células que secretan IFN- γ . Además, hubo números incrementados de microglia positiva para el receptor del factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSFR). Se ha reportado que la expresión incrementada del M-CSFR en la microglia de ratones y humanos, acelera la fagocitosis de amiloide agregado a través de receptores depuradores de macrófagos e incrementando la expresión de receptores de

FcR gamma en la microglia (Mitrasinovic, O M y Murphy, G M, Jr, 99
Neurobiol Aging 24, 807-15 (2003)) Sin embargo, la depuracion de amiloide
en los ratones μ MT deficientes en celulas B, tuvo tambien tincion
incrementada para el M-CSFR, por lo tanto, los efectos observados son por
5 medio de un mecanismo no mediado por Fc (Bacskai, B J *et al*, J Neurosci
22, 7873-8 (2002)) En asociacion con los incrementos en IFN- γ , se observo
una reduccion en la expresion del TGF- β , sugiriendo que el TGF- β modula un
poco la capacidad del A β soluble para agregarse en placas, y se piensa
ademas que el TGF- β se asocia con la deposicion incrementada de amiloide
10 (Wyss-Coray, T *et al*, Nature 389, 603-6 (1997)) La disminucion en el TGF- β
puede facilitar tambien la depuracion de amiloide No se observaron cambios
significativos en la expresion de la IL-10 La activacion de la microglia podria
estar asociada con numeros incrementados de celulas T, la cual puede haber
desempeñado una funcion en la promocion de la activacion de la microglia, ya
15 que hubo una correlacion entre los numeros de celulas T y los numeros de
celulas que secretan IFN- γ

Para confirmar que las celulas CD11b+ detectadas en estos
expenmentos fueron macrofagos o microglia activados y no neutrofilos, se
incubaron muestras con un anticuerpo monoclonal que reconoce a F4/80, una
20 estructura de la superficie de la celula que puede detectarse sobre la
superficie de los macrofagos y la microglia activados, pero no en neutrofilos
(leucocitos polimorfonucleares) La expresion de F4/80 se incrementa con la
maduracion de los macrofagos y la microglia Los resultados de estos

100
experimentos indican que todas las células CD11b+ detectadas en estos experimentos, se tiñeron también positivamente para F4/80 (datos no mostrados), indicando de esta manera que estas células CD11b+ eran macrófagos o microglia activados, no neutrófilos. Además, las células CD11b+ que se co-localizan con placas de A β por tinción con hematoxilina y eosina (figura 4) tienen una morfología mononuclear, y no la morfología polimorfonuclear característica de los neutrófilos.

En otra serie de experimentos, se mostró que la activación de las células de la microglia después de la administración nasal de GA+IVX-908 se correlaciona con un incremento en el número de células T, según se determinó por tinción de CD3. Estos resultados sugieren una función posible para las células T en la promoción de la activación de las células de la microglia, ya que hubo una correlación entre el número de células T y el número de células que secretan IFN- γ detectadas, $r = 0.88$ (cuadro 4).

Además, se ha reportado que el TGF- β puede incrementar o reducir la formación de fibrillas de A β en ratones APP tg (Wyss-Coray, T *et al*, Nature 389, 603-6 (1997), Wyss-Coray *et al*, Nat Med 7 612-8 (2001)). En los experimentos reportados en la presente, se observó una reducción en la expresión del TGF- β en ratones tratados con MOG ($p < 0.001$) y GA+IVX-908 ($p < 0.001$), en comparación con el control (cuadro 4), hubo una fuerte correlación en la reducción del TGF- β y el porcentaje de fibrillas de A β en la región del hipocampo ($r = 0.95$). No se observaron cambios significativos en células inmunorreactivas a IL-10 (datos no mostrados).

101

Se encontro una disminucion en el nivel de A β total del cerebro cuando se administro nasalmente IVX-908 solo (cuadro 3) ($p = 0.02$ contra no tratados), pero a diferencia de IVX-908 formulado con GA, no hubo efecto de IVX-908 solo sobre la depuracion de fibrillas de A β positivas para tioflavina

5 IVX-908 es un adyuvante basado en proteosomas formado de proteinas de la membrana exterior (OMPs) de *N meningitidis* y lipopolisacarido (LPS) añadido exogenamente OMP 2 de *Neisseria meningitidis* (porina B) y LPS/LOS, son conocidos por interactuar con TLRs exhibidos sobre la superficie de ciertos tipos de celulas relacionados con el sistema inmune

10 innato y/o adoptivo. Es posible que dichas interacciones se requieran, por lo menos en parte, para la actividad observada de IVX-908 y/o GA formulado con IVX-908, como se expone en la presente. El efecto observado con IVX-908 puede relacionarse con reportes de que la inyeccion directa de LPS en el hipocampo, puede causar una reduccion en la carga de A β no de fibrillas, sino

15 de depositos de A β de fibrillas (DiCarlo, G *et al*, *Neurobiol Aging* 22, 1007-12 (2001)). Sin embargo, debe notarse que la via de administracion en estos experimentos, inyeccion directa en el cerebro, es dramaticamente distinta de la via de administracion nasal para el suministro de formulaciones basadas en proteosomas descritas en la presente. En contraste, otros reportes indican

20 que aunque el LPS (inflamacion) administrado intraperitonealmente puede estimular la activacion de celulas de la microglia, se observo tambien un incremento en el amiloide total, la neuroinflamacion inducida por LPS incrementa la acumulacion intracelular de proteina precursora amiloide y

peptido A β (vease Sheng *et al* , Neurobiology of Disease 14 133-145 (2003), y referencias citadas en la misma) Ademias, se aprecia que se espera que sea toxica la inyeccion directa de LPS

En los expernmentos discutidos anteriormente, se mostro que las

5 celulas CD11b+ son microglia o macrofagos activados, pero no neutrofilos, por la ausencia de la señal de F4/80 Sin embargo, para determinar si estas celulas CD11b+ podrian distinguirse ademas como una microglia activada opuestamente a un macrofago activado, se evaluaron muestras para la presencia de CD68, un marcador de celulas que es altamente expresado en

10 macrofagos activados de la perferia, pero que no es altamente expresado sobre la superficie de celulas de la microglia que se originan del cerebro Como se muestra en las figuras 8 y 9, los presentes inventores obtuvieron mayor tincion para CD68 (los macrofagos son CD11b+ y CD68+) en animales con EAE, en comparacion con muestras derivadas de animales tratados con

15 GA+IVX-908, indicando que estas celulas CD11b+ CD68+ son macrofagos que han migrado en el parenquima del cerebro, incluyendo el cerebelo y la corteza, desde la perferia (espacio subaracnoideo) En contraste, despues del tratamiento con GA+IVX-908, existe un incremento en macrofagos que expresan CD68, pero estas celulas continuan localizandose principalmente

20 hacia el espacio subaracnoideo Los resultados de estos experimentos sugieren que las celulas CD11b+ implicadas en la depuracion de A β en animales con EAE, migran en el SNC desde la perferia, y se asocian con toxicidad neuronal, mientras que las celulas CD11b+ detectadas despues del

103

tratamiento con GA+IVX-908 son principalmente células endógenas de la microglia, y se asocian con la depuración de A β sin evidencia de toxicidad directa. Para apoyar más esta interpretación, los presentes inventores encontraron que existe expresión incrementada de células CD68+ en el cerebelo de animales con EAE, pero no en animales tratados con GA+IVX-908, o no tratados (datos no mostrados). Además, las células CD11b+ activadas después del tratamiento con GA+IVX-908 se encontraron solo en regiones en donde hubo una acumulación de amiloide.

Los presentes inventores encontraron también niveles incrementados de A β en el suero de animales a quienes se les administró GA+IVX-908 en comparación con animales no tratados, sugiriendo que GA+IVX-908 lleva a depuración de A β de las regiones del cerebro, y que este A β puede encontrarse entonces en la periferia. Sin embargo, dicha redistribución de A β no se observó en animales que tienen EAE la cual, como se describió anteriormente, puede relacionarse con la fuente de células CD11b+ activadas. Además, el número de macrófagos activados por CD11b+ CD68+ que revisten los capilares del cerebro y el plexo coroideo, se incrementó en animales a los que se les administró GA+IVX-908 en comparación con animales no tratados (figura 9). Estos hallazgos son consistentes con los niveles elevados de A β detectados en muestras de suero obtenidas de animales tratados con GA+IVX-908, y una disminución concomitante en angiopatía amiloide en animales tratados con GA+IVX-908 en asociación con células CD11b+ (figura 8).

104

Inesperadamente, parece ser que la via comun final de depuracion de la placa de amiloide (por ejemplo, placa de A β), puede ser por medio de la microglia activada. En EAE, las celulas T reactivas a mielina tipo IFN- γ Th1, son activadas aparentemente en la periferia por inmunizacion con

5 MOG o PLP mas CFA, y estas celulas T migran hacia el cerebro, en donde liberan IFN- γ (una citocina Th1) y activan a la microglia. Como consecuencia, la encefalomielitis y la paralisis de los animales son causadas por el daño a la mielina y axones subyacentes. La inmunizacion con BSA/CFA en la periferia, no lleva a depuracion de A β , ya que celulas tipo Th1 especificas de BSA no se

10 acumulan en el cerebro. La inmunizacion periferica con acetato de glatiramer en CFA, induce celulas T especificas de GA que se acumulan en el cerebro debido a la reactividad cruzada del GA con la MBP. Estas celulas son capaces de secretar IFN- γ , y de esta manera activar a la microglia, pero son incapaces de causar EAE debido a la afinidad alterada por la MBP y la secrecion

15 concomitante de citocinas antiinflamatorias.

Los presentes inventores han demostrado depuracion de A β en asociacion con la activacion de la microglia. Debe señalarse que la activacion de la microglia puede tener efectos positivos y negativos (Monsonogo, A y Weiner, H L, Immunotherapeutic approaches to Alzheimer's disease, Science

20 302 834-838 (2003)). La microglia representa un mecanismo natural por el cual agregados y restos de proteinas pueden removerse del cerebro, y existen reportes de que la activacion de la microglia despues de inmunizacion con A β o apoplejia, puede llevar a depuracion de A β (vease Nicoll, J A, *et al*,

105

Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide a case report, Nat Med , 9 448-452 (2003), Akiyama, H y McGeer, P L , Specificity of mechanisms for plaque removal after A beta immunotherapy for Alzheimer Disease, Nat Med , 10 117-118, respuesta del autor 118-119 (2004), y Wyss-Coray, T , *et al* , Prominent neurodegeneration and increased plaque formation in complement-inhibited Alzheimer's mice, Proc Natl Acad Sci , 99 10837-10842 (2002)) En estudios en animales, Wyss-Coray y colaboradores demostraron que existe neurodegeneracion prominente y formacion incrementada de placas en el modelo de AD en ratones inhibida por el complemento, en donde la microglia fue significativamente menos activada que en ratones de tipo silvestre con AD a la misma edad Esto apoya el concepto de que la microglia activada tiene una funcion benefica en la disminucion de la carga de amiloide sin neurotoxicidad importante en el modelo de AD en ratones

La administracion nasal de IVX-908 solo lleva a la reduccion de amiloide, ya que es capaz de activar a la microglia, aunque no tan eficientemente como composiciones de IVX-908 formuladas con GA el cual, ademas, puede activar a las celulas T No se observo activacion de la microglia con GA administrado perfercamente con CFA o intranasalmente con IVX-908 en animales no transgenicos Se ha reportado que la deposicion de A β lleva a ligera activacion de la microglia en torno a la placa de A β , y parece ser que esta activacion se requiere para que la microglia sea ademas activada por IVX-908 mas GA Es posible que la ligera activacion de la

106

microglia se asocie con la expresion de receptores de IFN- γ o tipo Toll que ceban a la microglia para mas activacion (Sasaki, A *et al* , Virchows Arch , 441(4) 358-67 (2002))

Estos hallazgos tienen relevancia para mecanismos potenciales para la remocion de la placa observada en humanos despues de la inmunizacion con A β 1-42 en un adyuvante tipo Th1 (QS21) Nicoll, J A *et al* , Nat Med 9, 448-52 (2003), reportaron los hallazgos de la autopsia de un paciente con AD vacunado con A β 1-42 administrado parenteralmente con adyuvante QS21, que resulto en meningoencefalitis generalizada, infiltracion del cerebro por macrofagos, y una reduccion de depositos de amiloide en la neocorteza Akiyama y McGeer reportaron una reduccion similar de placas seniles en un area cortical afectada por isquemia incompleta en un caso de AD, y sugieren que sus hallazgos y los reportados por Nicoll *et al* , pueden relacionarse con la fagocitosis de amiloide por microglia altamente reactiva en una forma dependiente de anticuerpos. Ademas, mediante el uso de tincion con TUNEL (un marcador de celulas apoptoticas) o inmunotincion con NeUN (un marcador para viabilidad de neuronas), no se observo evidencia alguna de toxicidad en la inmunizacion con GA mas IVX-908 o IVX-908 solo, en comparacion con ratones no tratados

Un procedimiento terapeutico inmune novedoso para el tratamiento de enfermedad de Alzheimer se provee en la presente, que es independiente de anticuerpos y es mediado por la microglia activada. Mediante la combinacion de un farmaco usado para tratar esclerosis multiple

107

con un adyuvante nasal (IVX-908), la microglia parece ser activada para depurar las placas de fibrillas de Aβ y reducir la carga total de amiloide usando dos composiciones (GA y adyuvantes basados en proteosomas), que previamente se han usado en humanos para otras indicaciones sin toxicidad

5 Dado que estudios en animales ha demostrado que la reduccion de la placa de Aβ se asocia con mejora cognoscitiva, la vacunacion nasal con IVX-908 formulado con GA, es una terapia efectiva para pacientes con enfermedad de Alzheimer

10

CUADRO 1

Efecto de la inmunizacion subcutánea sobre Aβ total y fibrilar en los cerebros de ratones J20 APP transgénicos

15

	Ratones por grupo	Puntuacion de EAE	Anticuerpo anti-Aβ*	Aβ total del cerebro (ng/ml)	% de area de placas de Aβ positivas para tioflavina (hipocampo)
Control **	8	0	0	125 6±15 9	2 6±0 4
Aβ	8	0	0 75	60 8±16 ^a	0 83±0 3 ^d
MOG	10	2 5±0 8	0	8 4±2 1 ^b	0 22±0 1 ^b
Deficientes en MOG B	6	2 7±0 4	0	11 4±2 7 ^b	0 27±0 04 ^b
GA	5	0	0	39 1±12 8 ^c	0 26±0 1 ^d

20

* Los resultados se dan como nivel de DO a titulo de 1 500 de IgG

** El control combina animales no tratados (n = 5) y tratados con

5

- ^a $p < 0.05$ contra control
- ^b $p < 0.001$ contra control, $p < 0.05$ contra A β
- ^c $p < 0.01$ contra control
- ^d $p < 0.01$ contra control, $p = 0.05$ contra A β

Efecto de la inmunización con PLP sobre A β total y fibrilar en los cerebros de ratones Tg2576 APP transgenicos

*Los resultados se dan como nivel de DO 450 a título de 1 500 de IgG

^b p<0.002 contra control

^b p<0.002 contra control

109

CUADRO 3

**Efecto de la inmunizacion nasal sobre Aβ total y fibrilar en los cerebros
de ratones J20 APP transgénicos**

	Ratones por grupo	Puntuacion de EAE	Anticuerpo anti-Aβ*	Aβ total del cerebro (ng/ml)	% de area de placas de Aβ positivas para tioflavina (hipo- campo)
Control*	8	0	0	125 6±15 9	2 6±0 4
GA	4	0	0	97 6±15 5	2 06±0 8
IVX-908	7	0	0	63 5±7 7 ^a	1 5±0 2
GA-IVX- 908	8	0	0	38 7±6 8 ^b	0 48±0 09 ^c

Nota de pie de pagina

* Los resultados se dan como nivel de DO 450 a titulo de 1 50 de IgG

^a p<0 02 contra control, p<0 02 contra GA

^b p<0 001 contra control y GA, p<0 04 contra IVX-908

^c p<0 001 contra control, p<0 002 contra GA, p<0 002 contra IVX-908

110

CUADR 4**Inmunohistoquímica del hipocampo en animales inmunizados***

5	Numero de celulas por region del hipocampo*					
	CD11b ^a	CD3 ^b	M-CSFR ^c	IFN- γ ^d	TGF- β ^e	
10	Control	76 $\pm$ 17	5 $\pm$ 3	11 $\pm$ 4	7 $\pm$ 3	73 $\pm$ 12
	Via subcutanea (CFA/P T)					
	A β	106 $\pm$ 27	10 $\pm$ 2	34 $\pm$ 11	9 $\pm$ 2	41 $\pm$ 5
	MOG	349 $\pm$ 34 3 ^{IV}	142 $\pm$ 19 ^{IV}	79 $\pm$ 5 ^I	109 $\pm$ 7 ^{IV}	20 $\pm$ 5 ^{III}
	GA deficiente en MOG B	462 $\pm$ 23 ^{IV}	195 $\pm$ 12 ^{IV}	77 $\pm$ 6 ^I	119 $\pm$ 18 ^{IV}	22 $\pm$ 8 ^{II}
		227 $\pm$ 61 ^I	61 $\pm$ 12 ^I	57 $\pm$ 8	85 $\pm$ 11 ^{IV}	31 $\pm$ 7
	NASAL					
	GA	136 $\pm$ 12	35 $\pm$ 19	30 $\pm$ 9	53 $\pm$ 3 ^I	77 $\pm$ 10
	IVX-908	406 $\pm$ 16 ^{IV}	55 $\pm$ 9 ^I	81 $\pm$ 16 ^I	92 $\pm$ 4 ^{IV}	40 $\pm$ 11
	GA+ IVX-908 ^a	451 $\pm$ 48 ^{IV}	67 $\pm$ 9 ^I	119 $\pm$ 30 ^{IV}	81 $\pm$ 10 ^{III}	14 $\pm$ 2 ^{IV}

15 Nota de pie de pagina del cuadro 4

*Los datos representan la cuantificacion de tres secciones para cada tratamiento, y seis secciones para el control (3 tratados + 3 tratados con BSA/CFA como en el cuadro 1)

^a r = -0.7 CD11b contra % de area de fibrillas de A β

20 ^b r = -0.65 CD3 contra % de area de fibrillas de A β , r = 0.74 CD3 contra CD11b

^c r = -0.7 M-CSFR contra % de area de fibrillas de A β , r = 0.92 M-CSFR contra CD11b

^d r = -0.8 IFN- γ contra % de area de fibrillas de A β , r = 0.9 IFN- γ contra

CD11b, $r = 0.85$ IFN- γ contra CD3

^a $r = 0.91$ TGF- β contra % de area de fibrillas de A β , $r = -0.77$ TGF- β contra CD11b, $r = -0.6$ TGF- β contra CD3

^f $r = 0.67$ IL-10 contra % de area de fibrillas de A β , $r = -0.4$ IL-10 contra
5 CD11b

^g $p = 0.0007$ CD11b contra GA, $p < 0.05$ IFN- γ contra GA, $p = 0.0011$
TGF- β contra GA

ⁱ $p < 0.05$ contra control

^h $p < 0.02$ contra control

10 ⁱⁱⁱ $p < 0.001$ contra control

^{iv} $p < 0.001$ contra control

Matenales y metodos

15 Ratones Ratones transgenicos para APP (B6XD2)F1 (edad promedio de 14 meses) o (B6XSJL)F1 APP+ (WT o μ MT) (edad promedio de 16 meses), fueron alojados y usados en una instalacion libre de patogenos en el Bingham and Women's Hospital, de acuerdo con todas las normas aplicables

20 Matenales IVX-908 (Protollin) es una formulacion no covalente de proteinas de la membrana exterior (proteosomas) de *Neisseria meningitidis* y LPS de *Shigella flexneri* que se ha puesto a prueba con seguridad en humanos, y se obtuvo de ID Biomedical, Montreal, Canada. El acetato de glatiramer (Copaxone[®]) es un copolimero de aminoacidos aleatorio de

alanina, lisina, ácido glutámico y tirosina, que es un tratamiento aprobado y ampliamente usado para formas recurrentes de MS, y se obtuvo de la farmacia del Brigham and Women's Hospital. Se sintetizaron MOG (35-55) y PLP (139-151), en el Center for Neurologic Diseases, Brigham and Women's

5 Hospital

Inducción y evaluación clínica de la EAE en ratones APP⁺ (B6D2)F1 o (B6XSJL)F1 APP⁺ (WT o μ MT deficientes en células B) y crías de la misma camada sin tg, fueron inmunizados en los cojinetes de las patas traseras con 100 μ g de MOG(35-55), PLP 139-151 o 100 μ g de péptido β -amiloide (1-40) en CFA. Inmediatamente después y de nuevo 48 horas después, los ratones recibieron una inyección intraperitoneal que contenía 150 ng de toxina de pertussis en 0.2 ml de PBS. Se monitoreó a los animales para síntomas de EAE, comenzando 7 días después de la inmunización, y se evaluaron de la manera siguiente: 0, sin enfermedad; 1, parálisis de la cola; 2, debilidad de las extremidades posteriores; 3, parálisis de las extremidades posteriores; 4, parálisis de las extremidades posteriores más las extremidades anteriores; y 5, moribundo.

Vacunación nasal. Acetato de glatiramer se administraron 25 μ g en los días 1, 2, 4 y 5 la primera semana, seguido de un refuerzo semanal por seis semanas. IVX-908 se administró 1 μ g/ratón en los días 1 y 5 la primera semana, seguido de un refuerzo semanal por seis semanas. BSA+IVX-908 se administraron 25 μ g de BSA más 1 μ g de IVX-908 en los días 1 y 5 la primera semana, y se administraron 25 μ g de BSA sola en los días 2 y 4, seguido de

113

seis refuerzos semanales de la combinacion de BSA+IVX-908 GA+IVX-908 se administraron 25 µg de GA mas 1 µg de IVX-908 en los dias 1 y 5 la primera semana, y se administraron 25 µg de GA solo en los dias 2 y 4 seguido de seis refuerzos semanales de la combinacion de GA+IVX-908

- 5 Cuantificacion de amiloide Para cuantificar la carga de amiloide, se extrajo el hemisferio derecho en cloruro de guanidinio a 5.0 M (pH 8) por 3 horas a temperatura ambiente. Se usaron diluciones para medir los niveles de Aβ40 y Aβ42 insolubles (asociados con amiloide) por medio de prueba de inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) en sandwich. Para medir las
- 10 fibrillas de Aβ, el hemisferio izquierdo fue fijado en O/N de cerebro a 4%, seguido de sacarosa a 4.5% por 4 horas, y entonces de sacarosa a 20% por O/N a 4°C. Se congelaron los cerebros en presencia de OCT paraformaldehido, y se cortaron hasta secciones longitudinales de 14 µm para tincion inmunohistologica y cuantificacion de fibrillas de amiloide. Se
- 15 seleccionaron regiones bien definidas del hipocampo (Bregma -1.34) para cuantificacion de la cantidad de fibrillas de amiloide en placas, usando tincion con tioflavina S. Se colectaron imagenes (aumento de 20x) de estas secciones a partir de una videocamara de color 3CCD, y se analizaron con software adecuado (NIH, Imaging Research). La cantidad de fibrillas de
- 20 amiloide se expreso como un porcentaje por mm² de region del hipocampo, segun se midio por medio del software.

 Inmunohistologia La tincion se realizo usando los siguientes marcadores: celulas T (CD3, BD Biosciences 553057), microglia/macrofagos

114

(CD11b, Serotec MCA74G), (C-MFR, Cymbus Biotech 21080096), IFN- γ (Pharmingen 559065), IL-10 (Pharmingen 559063) y TGF- β (RD AB-20-PB)

Los anticuerpos anti-amiloide (R1282) fueron un obsequio de Dennis Seloke

Se sometieron además secciones del cerebro a tinción con hematoxilina. Se

5 evaluaron las secciones en una forma simulada, y los controles incluyeron el uso de anticuerpos monoclonales con igual isotipo como se describió previamente. Para cada tratamiento, la cuantificación se hizo de la región del hipocampo de tres diferentes secciones del cerebro (la misma región, Bregma-1.34, que se usaron para tinción con ThS). Los resultados se

10 expresan como la media de las células marcadas para cada marcador.

Neuropatología. Para examinar la neurotoxicidad, el hemisfero izquierdo fue fijado en paraformaldehído a 4% durante la noche, seguido de sacarosa a 4.5% por 4 horas, y entonces sacarosa a 20% durante la noche a 4°C. Se congelaron los cerebros en presencia de OCT paraformaldehído, y se

15 cortaron hasta secciones longitudinales de 14 μm , y se usaron para tinción inmunohistológica. Los presentes inventores realizaron la tinción para cuatro marcadores usados para tensión neuronal e integridad de la barrera hemoencefálica: GFAP (Sigma, G9269), SMI32 (Serotec), TUNEL (Roche 1684 817), iNOS (CHEMICON AB5382) y fibrinógeno (Dako A0080). La

20 astrocitosis se expresa como un porcentaje por mm^2 de la región del hipocampo cubierta por astrocitos. Se realizó tinción para iNOS, SMI32 y fibrinógeno como se describió previamente (29). Se llevó a cabo tinción para marcación de extremo mellado de dUTP mediada por

115

desoxinucleotidiltransferasa terminal (TUNEL), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Roche 1 684 817) Se llevo a cabo tincion con hematoxilina y eosina para identificar la morfologia de las celulas contadas La tincion se realizo en dos secciones consecutivas por animal y

5 cuatro animales por grupo en una forma simulada, usando el software de Imaging Research del NIH en un procedimiento estereologico imparcial La tincion por grupo de la corteza motora primaria (Bregma lateral 1 44 mm), se muestra en la figura 6

Analisis de datos Todos los datos continuos y ordinales se

10 expresan como media $\pm$ sem (error estandar de la media) Se hicieron comparaciones de datos usando la prueba t de Student cuando se compararon dos grupos, o analisis de ANOVA unidireccional cuando se analizaron tres o mas grupos Los valores de p menores de 0.05 se consideraron como estadisticamente significativos, se calcularon valores r

15 usando un programa estadistico Excel

Todas las referencias citadas en la presente, incluyendo patentes, solicitudes de patente y publicaciones, se incorporan en su totalidad en la presente como referencia, ya sea especificamente incorporadas o no previamente

20 Habiendo descrito ahora completamente esta invencion, los expertos en la tecnica apreciaran que la misma puede realizarse dentro de una amplia gama de parametros, concentraciones y condiciones equivalentes, sin que se aparten del espiritu y alcance de la invencion y sin experimentacion

indebida

Aunque esta invencion se ha descrito con relacion a modalidades especificas de la misma, se entendera que es capaz de sufrir mas modificaciones. Se pretende que esta solicitud abarque cualquier
5 variacion, uso o adaptacion de la invencion siguiendo, en general, los principios de la invencion, e incluyendo dichas desviaciones de la presente descripcion como vienen dentro de la practica conocida o acostumbrada dentro de la tecnica a la cual la invencion pertenece, y que pueda aplicarse a las caracteristicas esenciales expuestas anteriormente

117

NOVEDAD DE LA INVENCION**REVINDICACIONES**

5 1 - Un metodo para el tratamiento de una enfermedad o trastorno neurologico en un mamifero, cuyo metodo comprende administrar a dicho mamifero que necesita de dicho tratamiento, una cantidad terapeuticamente efectiva de una composicion basada en proteosomas

 2 - El metodo de conformidad con la reivindicacion 1,
10 caracterizado ademas porque comprende administrar una cantidad terapeuticamente efectiva de acetato de glatiramer, ya sea en la misma formulacion o en una formulacion separada, con dicha composicion basada en proteosomas

 3 - El metodo de conformidad con la reivindicacion 1,
15 caracterizado ademas porque dicha enfermedad o trastorno neurologico comprende agregacion deleterea de proteinas

 4 - El metodo de conformidad con la reivindicacion 1, caracterizado ademas porque dicha enfermedad o trastorno neurologico es esclerosis multiple

20 5 - El metodo de conformidad con la reivindicacion 3, caracterizado ademas porque dicha enfermedad o trastorno neurologico se selecciona del grupo que consiste de enfermedad de Alzheimer de inicio temprano, enfermedad de Alzheimer de inicio tardio, enfermedad de

Alzheimer presintomática, amiloidosis por amiloide A en suero (SAA), enfermedades causadas por priones, síndrome islandico hereditario, senilidad y mieloma múltiple

6 - El método de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado además porque el tratamiento de dicha enfermedad o trastorno neurológico resulta en una reducción en péptido amiloide beta soluble o insoluble, y en donde dicho péptido amiloide beta insoluble comprende péptido amiloide beta fibrilar

7 - El método de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado además porque dicho péptido amiloide beta es insoluble

8 - El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque dicha enfermedad o trastorno neurológico es una enfermedad amiloide

9 - El método de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado además porque dicha enfermedad amiloide es enfermedad de Alzheimer

10 - El método de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado además porque dicho tratamiento de la enfermedad amiloide comprende prevenir una carga incrementada de amiloide, mantener la carga actual de amiloide, o disminuir la carga de amiloide en el cerebro

11 - El método de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado además porque dicho amiloide es un β -amiloide

12 - El método de conformidad con la reivindicación 10,

118
110

119
H9

caracterizado ademas porque dicha carga de amiloide incluye carga total de amiloide y carga fibrilar

13 - El metodo de conformidad con la reivindicacion 1, caracterizado ademas porque la composicion basada en proteosomas se
5 selecciona del grupo que consiste de un adyuvante basado en proteosomas que contiene un lipopolisacando endogeno y un adyuvante basado en proteosomas que contiene un lipopolisacando exogeno

14 - El metodo de conformidad con la reivindicacion 13, caracterizado ademas porque dicho proteosoma y dicho lipopolisacando se
10 obtienen del mismo genero de bacterias

15 - El metodo de conformidad con la reivindicacion 13, caracterizado ademas porque dicho proteosoma y dicho lipopolisacando se obtienen de diferentes generos de bacterias

16 - El metodo de conformidad con la reivindicacion 13, caracterizado ademas porque dicho proteosoma es de *Neisseria meningitidis*,
15 y dicho lipopolisacando es de *Shigella flexneri*

17 - El metodo de conformidad con la reivindicacion 1, caracterizado ademas porque comprende un diluyente, excipiente, estabilizador o vehiculo farmaceuticamente aceptable

20 18 - Un metodo para el tratamiento de una enfermedad o trastorno neurologico en un mamifero, cuyo metodo comprende administrar a dicho mamifero que necesita de dicho tratamiento, una cantidad terapeuticamente efectiva de acetato de glatiramer en una emulsion en

120

submicras o nanoemulsion

19 - El metodo de conformidad con la reivindicacion 18, caracterizado ademas porque dicha enfermedad o trastorno neurologico es una enfermedad o trastorno autoinmune mediado por celulas

5 20 - El metodo de conformidad con la reivindicacion 19, caracterizado ademas porque dicha enfermedad o trastorno autoinmune mediado por celulas, es esclerosis multiple

21 - Una composicion que comprende acetato de glatiramer en una emulsion en submicras o nanoemulsion

10 22 - Una composicion que comprende acetato de glatiramer y una composicion basada en proteosomas

23 - Un metodo para el tratamiento de una enfermedad o trastorno neurologico en un mamifero que necesita de dicho tratamiento, que comprende administrar una cantidad terapeuticamente efectiva de una
15 composicion que induce una respuesta independiente de anticuerpos en dicho mamifero, en donde dicha composicion comprende cualquiera de lo siguiente una composicion basada en proteosomas, una composicion basada en proteosomas en conjunto con una composicion de acetato de glatiramer o formulada con la misma, una composicion de acetato de glatiramer formulada
20 con una emulsion en submicras, o una composicion de acetato de glatiramer formulada con una nanoemulsion

121

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Se describen composiciones útiles para el tratamiento de trastornos neurológicos, que incluyen trastornos neurodegenerativos asociados con la agregación deletérea de proteínas, plegamiento aberrante de proteínas, tales como enfermedades amiloidicas del cerebro, y/o trastornos autoinmunes neurodegenerativos, se describen también métodos de uso de dichas composiciones, en particular, se contemplan métodos para tratar un trastorno neurodegenerativo tal como enfermedad de Alzheimer y un trastorno autoinmune neurodegenerativo tal como esclerosis múltiple, usando proteosomas y/o acetato de glatiramer, en donde el GA está en una emulsión en submicras o una nanoemulsión

15

20

18B

P06/2265F

122

TRADUCCI N DE FIGURASFIGURA 1Total A β A β total

5 Subcutaneus Via subcutanea

B-cell deficient Deficiente en celulas B

FIGURA 2Total A β A β total

10

FIGURA 3

Subcutaneus Via subcutanea

Amyloid Fibril Fibrilla de amiloide

(Thioflavin-S) (Tioflavina S)

15 Total amyloid (green) Amiloide total (verde)

Activated microglia (red) Microglia activada (rojo)

Co-localization of amyloid/microglia (yellow) Co-localizacion de
amiloide/microglia (amarillo)

Untreated No tratados

20 Non-Tg sin Tg

FIGURA 4

Untreated No tratados

123

(MOG Induced) (Inducida por MOG)

FIGURA 5

% Astrocytosis % de astrocitosis

5

FIGURA 6

Untreated No tratados

(MOG Induced) (Inducida por MOG)

10

FIGURA 7

Untreated No tratados

FIGURA 8

Untreated No tratados

15

(Fibril A β) (Fibrilla de A β)

Fibrinogen Fibrinogeno

FIGURA 9

Untreated No tratados

20

484112 444PC ms/more

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

124

To
TOWNSEND AND TOWNSEND AND CREW LLP
Attn Mcpherson, Scott E
12730 High Bluff Drive, Suite 400
San Diego, CA 92130
UNITED STATES OF AMERICA

(SUP IDS) - 414
Apr 9, 2006

ENTERED IN DOCKET

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

WO - Demand Due (trans)
June 10, 2006

ENTERED IN DOCKET (PCT Rule 44.1)

Date of mailing
(day/month/year) 10/03/2006

Applicant's or agent's file reference
021989000810 PC

FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below

International application No
PCT/US2005/022922

International filing date
(day/month/year) 27/06/2005

Applicant
ID BIOMEDICAL CORPORATION OF QUEBEC

PCT - Volun Amend
May 10, 2006
ENTERED IN DOCKET

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 48)

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the International Search Report

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

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

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

See the Annex to Form PCT/IB/301 and for details about the applicable time limits Office by Office see the PCT Applicant's Guide Volume II National Chapters and the WIPO Internet site

Name and mailing address of the International Searching Authority



European Patent Office P B 5818 Patentlaan 2
NL 2280 HV Rijswijk
Tel (+31 70) 340-2040 Tx 31 851 epo nl
Fax (+31 70) 340 3018

Authorized officer

Christian Pozzi

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

125

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the *PCT Applicant's Guide*, a publication of WIPO.

In these Notes, Article, Rule and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions, respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report and the written opinion of the International Searching Authority, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g., the applicant wants the letter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only (see *PCT Applicant's Guide*, Annexes B1 and B2).

The attention of the applicant is drawn to the fact that amendments to the claims under Article 19 are not allowed where the International Searching Authority has declared, under Article 17(2), that no international search report would be established (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, paragraph 296).

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How?

Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Administrative Instructions, Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)).

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

NOTES TO FORM PCT/ISA/220 (continued)

126
126

The letter must indicate the differences between the claims as filed and the claims as amended. It must, in particular, indicate, in connection with each claim appearing in the international application (it being understood that identical indications concerning several claims may be grouped) whether:

- (i) the claim is unchanged
- (ii) the claim is cancelled
- (iii) the claim is new
- (iv) the claim replaces one or more claims as filed
- (v) the claim is the result of the division of a claim as filed

The following examples illustrate the manner in which amendments must be explained in the accompanying letter:

- 1 [Where originally there were 48 claims and after amendment of some claims there are 51]
Claims 1 to 29, 31, 32, 34, 35, 37 to 48 replaced by amended claims bearing the same numbers
claims 30, 33 and 36 unchanged, new claims 49 to 51 added
- 2 [Where originally there were 15 claims and after amendment of all claims there are 11]
Claims 1 to 15 replaced by amended claims 1 to 11
- 3 [Where originally there were 14 claims and the amendments consist in cancelling some claims and in adding new claims]
Claims 1 to 6 and 14 unchanged, claims 7 to 13 cancelled, new claims 15, 16 and 17 added, or
Claims 7 to 13 cancelled, new claims 15, 16 and 17 added, all other claims unchanged
- 4 [Where various kinds of amendments are made]
Claims 1, 10 unchanged, claims 11 to 13, 18 and 19 cancelled, claims 14, 15 and 16 replaced by amended
claim 14, claim 17 subdivided into amended claims 15, 16 and 17, new claims 20 and 21 added

Statement under article 19(1) (Rule 46.4)

The amendments may be accompanied by a statement explaining the amendments and indicating any impact that such amendments might have on the description and the drawings (which cannot be amended under Article 19(1)).

The statement will be published with the international application and the amended claims.

It must be in the language in which the international application is to be published.

It must be brief, not exceeding 500 words if in English or if translated into English.

It should not be confused with and does not replace the letter indicating the differences between the claims as filed and as amended. It must be filed on a separate sheet and must be identified as such by a heading, preferably by using the words "Statement under Article 19(1)".

It may not contain any disparaging comments on the international search report or the relevance of citations contained in that report. Reference to citations relevant to a given claim contained in the international search report may be made only in connection with an amendment of that claim.

Consequence if a demand for international preliminary examination has already been filed

If, at the time of filing any amendments and any accompanying statement under Article 19, a demand for international preliminary examination has already been submitted, the applicant must preferably, at the time of filing the amendments (and any statement) with the International Bureau, also file with the International Preliminary Examining Authority a copy of such amendments (and of any statement) and, where required, a translation of such amendments for the procedure before that Authority (see Rules 55.3(a) and 62.2, first sentence). For further information, see the Notes to the demand form (PCT/IPEA/401).

If a demand for international preliminary examination is made, the written opinion of the International Searching Authority will, except in certain cases where the International Preliminary Examining Authority did not act as International Searching Authority and where it has notified the International Bureau under Rule 88.1bis(b), be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority. If a demand is made, the applicant may submit to the International Preliminary Examining Authority a reply to the written opinion together, where appropriate, with amendments before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later (Rule 43bis 1(c)).

Consequence with regard to translation of the international application for entry into the national phase

The applicant's attention is drawn to the fact that, upon entry into the national phase, a translation of the claims as amended under Article 19 may have to be furnished to the designated/elected Offices, instead of, or in addition to, the translation of the claims as filed.

For further details on the requirements of each designated/elected Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 021989000810	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as where applicable item 5 below	
International application No PCT/US2005/022922	International filing date (day/month/year) 27/06/2005	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 25/06/2004
Applicant ID BIOMEDICAL CORPORATION OF QUEBEC		

This international search report has been prepared by the 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 6 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 36.2(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

p28

A CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K39/00 A61K39/02 A61K39/095 A61K39/39 A61P37/02

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)

A61K C07K A61P

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 practical search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data, SCISEARCH, BIOTECHNOLOGY ABS, CANCERLIT, WPI Data, PAJ

C DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document with indication where appropriate of the relevant passages	Relevant to claim No
Y	WO 02/072012 A (INTELLIVAX INTERNATIONAL, INC, BURT, DAVID, S, LOWELL, GEORGE, H, WHIT) 19 September 2002 (2002-09-19)	2,22,23
A	page 3, line 21 - page 4, line 17 page 5, line 13 - line 27 examples 1-15 claims 1-17,26,27,34,35,44-54	1,3-17
P,Y	JONES T ET AL "Protollin(TM) a novel adjuvant for intranasal vaccines" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC GUILDFORD, GB, vol 22, no 27-28, 9 September 2004 (2004-09-09), pages 3691-3697, XP004526949 ISSN 0264-410X 'retrieved on 2004-04-20' the whole document	2,22,23
	-/-	

☒ 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 document but 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 (see 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

14 November 2005

Date of mailing of the international search report

10.03.06

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office P B 5818 Patentlehn 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040 Tx 31 651 epo nl
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bayer, A

124

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document with indication where appropriate of the relevant passages	Relevant to claim No
Y	LOWELL G H "PROTEOSOMES FOR IMPROVED NASAL, ORAL, OR INJECTABLE VACCINES" NEW GENERATION VACCINES, 1997, pages 193-206, XP001023066 the whole document	2,22,23
Y	WO 01/52878 A (YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO LTD, MCINNIS, PATRICIA, A) 26 July 2001 (2001-07-26) page 1, line 12 - page 2, line 4 page 9, line 31 - line 18 page 11, line 27 - page 12, line 10 figures 3,4,8 page 24, line 5 - line 29 page 33, line 1 - page 36, line 24 page 40, line 1 - line 5 experiment 1 examples 2 and 3 example 3 discussion and results claims 1-6,10-13,23-25,35-37	2,22,23
Y	KIPNIS JONATHAN ET AL "Therapeutic vaccination for closed head injury " JOURNAL OF NEUROTRAUMA, vol 20, no 6, June 2003 (2003-06), pages 559-569, XP009056910 ISSN 0897-7151 the whole document	2,22,23
X,P	WEINER HOWARD L ET AL "Nasal vaccination with a proteosome-based adjuvant and glatiramer acetate clears beta-amyloid in a mouse model of Alzheimers disease in an antibody-independent fashion" NEUROLOGY, vol 64, no 6, Suppl 1, March 2005 (2005-03), page A416, XP009056918 & 57TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-ACADEMY-OF-NEUROLOGY, MIAMI BEACH, FL, USA, APRIL 09 -19, 2005 ISSN 0028-3878 the whole document	1-17,22, 23
T	FRENKEL DAN ET AL "Nasal vaccination with a proteosome-based adjuvant and glatiramer acetate clears beta-amyloid in a mouse model of Alzheimer disease " THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION SEP 2005, vol 115, no 9, September 2005 (2005-09), pages 2423-2433, XP002353832 ISSN 0021-9738 the whole document	1-17,22, 23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2005/022922

130

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

130

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons

- 1 ☒ Claims Nos
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely
Although claims 1-17, 23 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition
- 2 ☐ Claims Nos
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically
- 3 ☐ Claims Nos
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6 4(a)

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows

see additional sheet

- 1 ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant this International Search Report covers all searchable claims
- 2 ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee this Authority did not invite payment of any additional fee
- 3 ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos
- 4 ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims, it is covered by claims Nos

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows

1 claims 1-17,22 (complete), 23 (partially)

Treatment of neurological disease or disorder using
proteosome based composition

2 claims 18-21 (complete), 23 (partially)

Treatment of neurological disease or disorder using
Glatiramer acetate

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2005/022922

132/32

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02072012	A	19-09-2002	CA 2438425 A1	19-09-2002
			EP 1372706 A2	02-01-2004
			JP 2004521925 T	22-07-2004
			MX PA03008154 A	12-11-2004
WO 0152878	A	26-07-2001	AT 302020 T	15-09-2005
			AU 780188 B2	03-03-2005
			AU 3451701 A	31-07-2001
			CA 2397785 A1	26-07-2001
			CN 1427726 A	02-07-2003
			DE 60112718 D1	22-09-2005
			DK 1248643 T3	07-11-2005
			EP 1248643 A2	16-10-2002
			ES 2243450 T3	01-12-2005
			JP 2003520246 T	02-07-2003
			MX PA02007106 A	13-12-2002
			PT 1248643 T	31-10-2005
			US 2003004099 A1	02-01-2003

PATENT COOPERATION TREATY

133

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis 1)

To
see form PCT/ISA/220

Date of mailing (day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicants or agents file reference see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION See paragraph 2 below
--

International application No PCT/US2005/022922	International filing date (day/month/year) 27 06 2005	Priority date (day/month/year) 25 06 2004
---	--	--

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC A61K39/00, A61K39/02, A61K39/095, A61K39/39, A61P37/02

Applicant ID BIOMEDICAL CORPORATION OF QUEBEC
--

1 This opinion contains indications relating to the following items ☒ Box No I Basis of the opinion ☒ Box No II Priority ☒ Box No III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☒ Box No IV Lack of unity of invention ☒ Box No V Reasoned statement under Rule 43bis 1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability, citations and explanations supporting such statement ☒ Box No VI Certain documents cited ☐ Box No VII Certain defects in the international application ☐ Box No VIII Certain observations on the international application 2 FURTHER ACTION If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA"). However, this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 68 1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered. If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of three months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later. For further options, see Form PCT/ISA/220 3 For further details, see notes to Form PCT/ISA/220

Name and mailing address of the ISA  European Patent Office D 80298 Munich Tel +49 89 2369 - 0 Tx 523056 epmu d Fax +49 89 2369 - 4465	Authorized Officer Bayer, A Telephone No +49 89 2369 7103 
---	--

139

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No
PCT/US2005/022922

Box No I Basis of the opinion

- 1 With regard to the language, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item
 - ☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.3 and 23.1(b))
- 2 With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of
 - a type of material
 - ☐ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b format of material
 - ☐ in written format
 - ☐ in computer readable form
 - c time of filing/furnishing
 - ☐ contained in the international application as filed
 - ☐ filed together with the international application in computer readable form
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search
- 3 ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished
- 4 Additional comments

Box No II Priority

- 1 ☒ The validity of the priority claim has not been considered because the International Searching Authority does not have in its possession a copy of the earlier application whose priority has been claimed or, where required, a translation of that earlier application. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date (Rules 43bis 1 and 64.1) is the claimed priority date
- 2 ☐ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43bis 1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date
- 3 Additional observations, if necessary

135

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No
PCT/US2005/022922

Box No III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

- ☐ the entire international application,
- ☒ claims Nos 1-21, 23

because

- ☒ the said international application, or the said claims Nos 1-17,23 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*)

see separate sheet

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*)
- ☐ the claims, or said claims Nos are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed
- ☒ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos 18-21(*complete*), 23 (*partially*)
- ☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that

- the written form
 - ☐ has not been furnished
 - ☐ does not comply with the standard

- the computer readable form
 - ☐ has not been furnished
 - ☐ does not comply with the standard

- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions
- ☐ See separate sheet for further details

136

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No
PCT/US2005/022922

Box No IV Lack of unity of invention

- 1 ☒ In response to the invitation (Form PCT/ISA206) to pay additional fees, the applicant has
- ☐ paid additional fees
 - ☐ paid additional fees under protest
 - ☒ not paid additional fees
- 2 ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees
- 3 This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is
- ☐ complied with
 - ☒ not complied with for the following reasons
see separate sheet
- 4 Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application
- ☐ all parts
 - ☒ the parts relating to claims Nos 1-17, 22 (complete), 23 (partially)

Box No V Reasoned statement under Rule 43bis 1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability, citations and explanations supporting such statement

1 Statement

Novelty (N)	Yes	Claims	1-17, 22, 23
	No	Claims	
Inventive step (IS)	Yes	Claims	1, 3-17
	No	Claims	2, 22, 23
Industrial applicability (IA)	Yes	Claims	22
	No	Claims	

2 Citations and explanations

see separate sheet

137

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No
PCT/US2005/022922

Box No. VI Certain documents cited

- 1 Certain published documents (Rules 43bis 1 and 70 10)
 and /or
- 2 Non-written disclosures (Rules 43bis 1 and 70 9)
 see form 210

138

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

international application No

PCT/US2005/022922

Additional remarks to item III

- 1 The international search report has been drawn up in respect to only part of the claims of the international application as filed. Since only claims searched will be the subject of the international preliminary examination (Rule 66 1(e) PCT), this written opinion is based on claims 1-17, 22 (complete) and 23 (partially), i.e. invention one as indicated below.
- 2 Claims 1-17 and 23 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67 1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(I) PCT).

Additional remarks to item IV

This Authority considers that there are two inventions covered by the claims indicated as follows:

- 1) Method of treating a neurological disease or disorder in a mammal comprising the use of a proteosome based composition
- 2) Method of treating a neurological disease or disorder in a mammal comprising the use of glatiramer acetate

The reason for which the indicated inventions are not so linked as to form a single general inventive concept (Rule 13 1 PCT) is as follows:

The problem of the present application to be solved is the provision of compositions for treating neurological diseases and disorders. There are two alternative solutions to said problem provided in the present application, namely:

- a) the use of a proteosome based composition
- and
- b) the use of Glatiramer Acetate

139

The only identifiable technical feature that these two inventions have in common (Rule 13.2 PCT) is that they relate to compositions for the treatment of neurological disorders or diseases. The said feature, however, does not provide a unifying concept as it is known from the prior art. WO0152878 (D4), for example, discloses the use of glatiramer acetate (= Cop-1) in vaccines for the treatment of neurological disorders.

Thus, in view of the prior art, the problem underlying the present application can be formulated as the provision of further compositions for treating neurological diseases and disorders. Both inventions listed above, represent an independent solution concerning the foregoing problem of the underlying application.

Since no other technical feature can be distinguished which, in the light of the prior art, could be regarded as special technical feature common to the above solutions, there is no single inventive concept underlying a unique invention and consequently there is lack of unity.

Additional remarks to item V

1 Reference is made to the following documents

- D1 WO 02/072012 A (INTELLIVAX INTERNATIONAL, INC, BURT, DAVID, S, LOWELL, GEORGE, H, WHIT) 19 September 2002 (2002-09-19)
- D2 JONES T ET AL "Protollin(TM) a novel adjuvant for intranasal vaccines" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC GUILDFORD, GB, vol 22, no 27-28, 9 September 2004 (2004-09-09), pages 3691-3697, XP004526949 ISSN 0264-410X [retrieved on 2004-04-20]
- D3 LOWELL G H "PROTEOSOMES FOR IMPROVED NASAL, ORAL, OR INJECTABLE VACCINES" NEW GENERATION VACCINES, 1997, pages 193-206, XP001023066
- D4 WO 01/52878 A (YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO LTD, MCINNIS, PATRICIA, A) 26 July 2001 (2001-07-26)
- D5 KIPNIS JONATHAN ET AL "Therapeutic vaccination for closed head injury" JOURNAL OF NEUROTRAUMA, vol 20, no 6, June 2003 (2003-06), pages 559-569, XP009056910 ISSN 0897-7151

- 2 The present application does not meet the requirements of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 2, 22 and 23 does not involve an inventive step in the sense of Article 33(3) PCT

D4 as closest prior art describes pharmaceutical compositions comprising Cop-1 (= glatiramer acetate) and an adjuvant for immunizations (see, e.g. page 40 lines 1-5, examples), wherein in the examples Freund's adjuvant is used. D4 does not disclose the use of a proteosome based compositions, the underlying problem of claim 22 is thus considered as the provision of an alternative adjuvant, the solution being proteosome based compositions. However, the person skilled in the art, aware of the fact that Freund's adjuvant is forbidden in human vaccination, would have to consider the use of alternative adjuvants for Cop-1 compositions. With the knowledge of the disclosure of documents D1-D3, all referring to the advantages and versatile uses of proteosomes like protollin as adjuvant in vaccines, the skilled person would be highly motivated to combine both D4 and any of D1-D3 to arrive in an obvious manner to the subject matter of claims 2, 22 and 23.

- 3 With respect to claims 1 and 3-17, the present application meets the criteria of Article 33(1) PCT. In the prior art there is neither teaching or indication that proteosome itself will be effective as vaccine nor that it could be used for treating neurological diseases or disorders. The prior art documents D1-D3 all teach the use of proteosome as adjuvant in vaccines or immunotherapeutics without mentioning neurological diseases or disorders. Thus, claims 1 and 3-17 are considered as novel and inventive.
- 4 For the assessment of the present claims 1-17 and 23 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

141

PATENT COOPERATION TREATY

Int'l Appln No PCT/US2005/022922

Int'l Filing Date 27 June 2005

Applicant(s) ID Biomedical Corporation of Quebec et al

Title COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATING
NEUROLOGICAL DISORDERS

Docket No 484112 414PC

Transmittal Date 10 November 2006

Via Facsimile Only (011 41 22 338 82 70)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

REQUEST TO CORRECT NAME OF APPLICANT

Dear Sir or Madam

Applicants respectfully request that the name for the applicant Brigham and Women's Hospital be corrected as indicated below and that the notice confirming the recordation be provided to the Applicants' Agent of Record via Form PCT/IB/306 Attached is a copy of the Power of Attorney executed in our favor evidencing our authority to act on behalf of the applicant

THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, Inc
75 Francis Street
Boston, Massachusetts 02115
United States of America

Respectfully submitted,
Seed Intellectual Property Law Group PLLC



Mae Joanne Rosok
U S PTO Registration No 48,903

MJR mla

Seed Intellectual Property Law Group PLLC
701 Fifth Avenue, Suite 6300
Seattle, Washington 98104-7092 U S A
Facsimile (206) 682 6031

862995_1.DOC

PCT

GENERAL POWER OF ATTORNEY

(for several international applications filed under the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Rule 90.5)

142

The undersigned person(s)

(Family name followed by given name for a legal entity full official designation The address must include postal code and name of country)

The BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, Inc.

~~Center for Biomedical Research~~

~~Harvard Medical School~~

75 Francis Street

Boston Massachusetts 02115

United States of America

hereby appoint(s) the following person as

☒ agent

☐ common representative

Name and address

(Family name followed by given name for a legal entity full official designation The address must include postal code and name of country)

ROSOK Mae Joanne

(See Attachment A for Additional Seed Agents)

Seed Intellectual Property Law Group PLLC

701 Fifth Avenue Suite 6300

Seattle Washington 98104-7092

United States of America

to represent the undersigned before

☒ all the competent International Authorities

☐ the International Searching Authority only

☐ the International Preliminary Examining Authority only

in connection with any and all international applications filed by the undersigned with the following Office

the United States Patent and Trademark Office

as receiving Office

and to make or receive payments on behalf of the undersigned

Signature(s) (when there are several persons each of them must sign next to each signature indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs if such capacity is not obvious from reading this power)

Name
Title

Vandana Desai Yajnik

VANDANA DESAI YAJNIK, Ph D
Associate Director
Corporate Sponsored
Research and Licensing

Date

1/23/05

Attachment A

142
143

Attorney Name **USPTO Reg. No.**

Abramonte, Frank	38,066
Armentrout, Raymond W	45,866
Bennett, Harold H , II	52,404
Bierman, Ellen M	38,079
Boller, Timothy I	47,435
Carlson, David V	31,153
Christiansen, William T	44,614
Costanza, Kevin S	37,801
de Guzman, Dennis M	41,702
Enfield, David L	51,017
Ferron, William O , Jr	30,633
Grieger, John C	51,755
Han, Hai	54,150
Hermanns, Karl R	33,507
Hundley, Jeffrey E	42,676
Iannucci, Robert	33,514
Kasoff Larry	54,209
Kitzan Handfield, Melanie	57,397
Laherty, Carol D	51,909
Lin, Qing	53,937
Linford, Lorraine	35,939
Rosenman, Stephen J	43,058
Rosok, Mac J	48,903
Roth, Carol J	32,783
Sharkey, Richard G	32,629
Tarleton, E Russell	31,800
Urvater, Julie A	50,461
Vershavc, Richard C	55,907
Wagner, Emily W	50,922
White, James A D	43,985

PCT

GENERAL POWER OF ATTORNEY

(for several international applications filed under the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Rule 90.5)

1.44 145

I be undersigned person(s)

(Family name followed by given name for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

FRENKEL, Dan
123 Sutherland Road — 30 Gardner Rd AP 16
Brighton Massachusetts 02135 — Brookline, MA, 02445
United States of America

I hereby appoint(s) the following person as



agent



common representative

Name and address

(Family name followed by given name for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

ROSOK Mae Joanne
(See Attachment A for Additional Seed Agents)
Seed Intellectual Property Law Group PLLC
701 Fifth Avenue Suite 6300
Seattle Washington 98104-7092
United States of America

to represent the undersigned before



all the competent International Authorities



the International Searching Authority only



the International Preliminary Examining Authority only

in connection with any and all international applications filed by the undersigned with the following Office

the United States Patent and Trademark Office

as receiving Office

and to make or receive payments on behalf of the undersigned

Signature(s) (where there are several persons each of them must sign; next to each signature indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs if such capacity is not obvious from reading this power)

Dan Frenkel
Dan Frenkel

Date 11/29/05

Attachment A

145146

Attorney Name **USPTO Reg. No.**

Abramonte, Frank	38 066
Armentrout, Raymond W	45,866
Bennett, Harold II , II	52,404
Bierman, Ellen M	38,079
Boller, Timothy L	47,435
Carlson, David V	31,153
Christiansen, William I	44 614
Costanza, Kevin S	37,801
de Guzman, Dennis M	41 702
Enfield, David L	51,017
Ferron, William O , Jr	30,633
Grieger, John C	51,755
Han, Hai	54,150
Hermanns, Karl R	33,507
Hundley, Jeffrey E	42,676
Iannucci, Robert	33,514
Kasoff, Larry	54,209
Kitzan Handfield, Melanie	57 397
Laherty, Carol D	51,909
Lin, Qing	53,937
Linford, Lorraine	35,939
Rosenman, Stephen J	43 058
Rosok, Mae J	48,903
Roth, Carol J	32,783
Sharkey, Richard G	32,629
Tarleton, E Russell	31,800
Urvater, Julie A	50,461
Vershave, Richard C	55,907
Wagner, Emily W	50,922
White, James A D	43,985

PCT

GENERAL POWER OF ATTORNEY

(for several international applications filed under the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Rule 90.5)

146 147

The undersigned person(s)
(Family name followed by given name for a legal entity full official designation The address must include postal code and name of country)

WEINER Howard L
44 Somerset Street 72 Colbourne Crescent
Brookline Massachusetts 02445
United States of America

hereby appoint(s) the following person as



agent



common representative

Name and address

(Family name followed by given name for a legal entity full official designation The address must include postal code and name of country)

ROSOK Mae Joanne
(See Attachment A for Additional Seed Agents)
Seed Intellectual Property Law Group PLLC
701 Fifth Avenue Suite 6300
Seattle, Washington 98104
United States of America

to represent the undersigned before:



all the competent International Authorities



the International Searching Authority only



the International Preliminary Examining Authority only

in connection with any and all international applications filed by the undersigned with the following Office

the United States Patent and Trademark Office as receiving Office
and to make or receive payments on behalf of the undersigned

Signature(s) (where there are several persons each of them must sign next to each signature indicate the name of the person signing, and the capacity in which the person signs if such capacity is not obvious from reading this power)

Howard L. Weiner

Date

11/28/05

Attachment A

147 148

Attorney Name **USPTO Reg. No.**

Abramonte, Frank	38 066
Armentrout, Raymond W	45,866
Bennett, Harold H , II	52 404
Bierman, Ellen M	38,079
Boller, Timothy L	47,435
Carlson, David V	31,153
Christiansen, William T	44,614
Costanza, Kevin S	37,801
de Guzman, Dennis M	41,702
Enfield, David L	51,017
Ferron, William O , Jr	30,633
Grieger, John C	51,755
Han, Hai	54,150
Hermanns, Karl R	33,507
Hundley, Jeffrey E	42,676
Iannucci, Robert	33,514
Kasoff, Larry	54,209
Kitzan Handfield, Melanie	57,397
Laherty, Carol D	51,909
Lin, Qing	53,937
Linford, Lorraine	35,939
Rosenman, Stephen J	43,058
Rosok, Mae J	48,903
Roth, Carol J	32,783
Sharkey, Richard G	32,629
Tarleton, E Russell	31,800
Urvater, Julie A	50,461
Vershave, Richard C	55,907
Wagner, Emily W	50,922
White, James A D	43,985

RECEIVED

DEC 13 2005

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT SEED INTELLECTUAL PROPERTY
LAW GROUP PLLCNOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

To

MCPHERSON, Scott, E
Townsend and Townsend And Crew LLP
12730 High Bluff Drive
Suite 400
San Diego, CA 92130
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

Date of mailing (day/month/year) 02 November 2005 (02 11 2005)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 021989000810 PC - 1	
International application No PCT/US2005/022922	International filing date (day/month/year) 27 June 2005 (27 06 2005)
International publication date (day/month/year)	Priority date (day/month/year) 25 June 2004 (25 06 2004)
Applicant ID BIOMEDICAL CORPORATION OF QUEBEC et al	

1 By means of this Form which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17 1(a) or (b).

2 (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17 1(a) or (b). Where under Rule 17 1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17 1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity upon entry into the national phase to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

3 (If applicable) An asterisk (*) appearing next to a date of receipt in the right-hand column denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17 1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17 1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17 1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17 1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document Rule 17 1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date

Priority application No.

Country or regional Office
or PCT receiving OfficeDate of receipt
of priority document

25 June 2004 (25 06 2004)

60/562 899

US

14 October 2005 (14 10 2005)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20 Switzerland

Authorized officer

ALI SOLEIMAN

Facsimile No +41 22 338 82 70

Facsimile No (41-22) 338 71 30 DOCKETED BY 

Telephone No +41 22 338 8554



150

Expediente No		06728318	No de Folo
Item		No de unidades	
1	CD		
2	DVD		
3	REVISTA		
4	LIBRO		
5	PERIODICO		
6	DISQUETES		
7	SOBRE DE MANILA	1	
8	SOBRE BLANCO TAMAÑO CARTA		
9	SOBRE BLANCO TAMAÑO OFICIO		
10	OTROS		

Observaciones

contiene 2 figuras



130
151

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION

[4 ✓]

MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicacion de que se solicita la concesion de una patente [4 ✓]
- ◆ Datos de identificacion del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [4 ✓]
- ◆ Descripción de la invención [4 ✓]
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes [4 ✓]
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [1 ✓]

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicacion de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representacion grafica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Firma Responsable

Fecha

21 DIC. 2008

Carrera 13 No 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador 3 82 08 40
Fax 350 52 20
E-mail info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogota, D C , Colombia

149

**FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL**

Rad 06-128318-0000-0000

Fecha 2006-12-21 15:15:31 PM 21/12/2006
Trá 11 Industria y Comercio
Ene 376 FASE NACIONAL

1) SOLICITUD DE.			
☒ Patente de invencion		☐ Patente de Modelo de Utilidad	
☒ Capítulo I		☐ Capítulo II	
2) SOLICITANTE (71)	Nombre: 1 ID BIOMEDICAL CORPORATION OF QUEBEC 2 THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, Inc. Dirección 1 525 Cartier Boulevard West, Laval, Québec H7V 3S8 Canadá 2 75 Francis Street Boston, Massachusetts 02115 USA Nacionalidad o domicilio 1. Quebec, Canadá 2 Boston, MA, USA Lugar de constitución 1 Québec, Canadá 2 Boston, MA, USA		IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT ☒ C.E. ☐ OTRO ☐ Cual _____ NÚMERO _____
	Teléfono _____ Fax _____ E Mail _____		
3) REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D ALEMAN Dirección Carrera 11 N° 86-53 Piso 6 Bogota D C Telefono 6181088 Fax 6350824 E Mail info@clarkemodet.com.co		IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ OTRO ☐ NÚMERO. 41 654 882 TP: 20824 CSJ
	4) INVENTOR (ES) (72) Nombre 1 FRENKEL, Dan; 2 MARON, Ruth; 3 BURT, David; 4. WEINER, Howard, L. Dirección: 1 30 Gardner Road, Apartment 1G Brookline, Massachusetts, 02445 USA; 2. 74 Salisbury Road, Brookline, MA 02146 USA; 3. 330 Newton Road, Dollard des Omeaux, Québec, Canadá; 4. 72 Colbourne Crescent Brookline, Massachusetts 02445 USA Nacionalidad o Domicilio 1 y 2 Israelitas, 3 Canadiense, 4. Estadounidense		
5) PCT (86) Solicitud Internacional No PCT/US2005/022922 Fecha Junio 27, 2005 Publicacion Internacional No WO2006/0044749 A2 Fecha Enero 12, 2006			
6) Título (54) COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE TRASTORNOS NEUROLÓGICOS			
7) Clasificación Internacional A61K 39/02 (2006.01)			
8) PRIORIDAD		33) País de Origen	(32) Fecha
SI ☒ NO ☐		Estados Unidos	Junio 25, 2004
		(31) Número de Solicitud	
		60/582,999	
9) Comprobante de pag N° 06-88,958 Fecha: Nov. 17, 2006			

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario

Carra 13 No. 27-00 Pisos 5 y 10
Ver reverso de esta página
Commutador 334 12 21

Fax 281 31 25

Santa Fe de Bogotá, D C, Colombia

NOVEDAD DE LA INVENCION

153/H

REVINDICACIONES

- 5 1 - Un metodo para el tratamiento de una enfermedad o trastorno
neurologico en un mamifero, cuyo metodo comprende administrar a dicho
mamifero que necesita de dicho tratamiento, una cantidad terapeuticamente
efectiva de una composicion basada en proteosomas
- 10 2 - El metodo de conformidad con la reivindicacion 1,
caracterizado ademas porque comprende administrar una cantidad
terapeuticamente efectiva de acetato de glatiramer, ya sea en la misma
formulacion o en una formulacion separada, con dicha composicion basada en
proteosomas
- 15 3 - El metodo de conformidad con la reivindicacion 1
caracterizado ademas porque dicha enfermedad o trastorno neurologico
comprende agregacion deleterea de proteinas
- 4 - El metodo de conformidad con la reivindicacion 1,
caracterizado ademas porque dicha enfermedad o trastorno neurologico es
esclerosis multiple
- 20 5 - El metodo de conformidad con la reivindicacion 3,
caracterizado ademas porque dicha enfermedad o trastorno neurologico se
selecciona del grupo que consiste de enfermedad de Alzheimer de inicio
temprano, enfermedad de Alzheimer de inicio tardio, enfermedad de

151
154

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
RODRIGUEZ DILIA MARIA

REFERENCIA	Radicación No	06 128318
	Solicitud internacional	PCT/US2005/022922
	Fecha inicio fase nacional	25/01/2007
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No	

870

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que

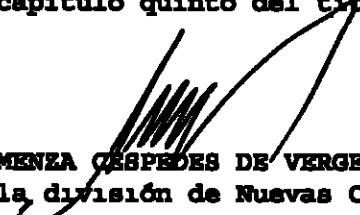
1 La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante (Art 26-k) Decisión 486

2 La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica

3 Debe aclarar el nombre del solicitante, por cuanto la publicación internacional difiere del petitorio presentado en fase nacional

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No 10 de 2001.


ALIX CARMONA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 26 ENE 2007
adpa10