



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA



CSA825379

Organización y
Digitalización CSA Ltda

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

08-54157

EXPEDIENTE N°

TÍTULO "VACUNA TERAPEUTICA"

1. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61K 39/00

1. SOLICITANTE AC IMMUNE SA

DOMICILIO LAUSANNE, SUIZA

4. REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. 53.215

2. BOGOTÁ, D.C.

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-054157-00000-0000

Fecha: 2008-05-28 15:51:14 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTE/II Eje: 378 FASENACIONAL
Act. 411 PRESENTACION Folios: 180

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

12 Julio 2008

1 SOLICITUD DE: ☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad			
☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.			
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: AC IMMUNE SA Dirección: EPFL-PSE Building B, CH-1015 Lausanne, Suiza. Nacionalidad o Domicilio: Lausanne, Suiza. Lugar de Constitución: Teléfono: 3264270 Fax: 6069701 E-mail: jllico@lloredacamacho.com		IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____
	Nombre: ALICIA LLOREDA RICAURTE Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5°, Bogotá, Colombia Teléfono: 3264270 Fax: 6069701 E-mail: jllico@lloredacamacho.com		C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número <u>39.690.713</u> TP <u>53.215</u>
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: ALICIA LLOREDA RICAURTE Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5°, Bogotá, Colombia Teléfono: 3264270 Fax: 6069701 E-mail: jllico@lloredacamacho.com		
4 INVENTOR(ES) (72)	Nombre: PFEIFER, Andrea y NICOLAU, Claude. Dirección: Route de Fenil 16A, CH-1806 St-Légier y 166 Greenwood Street, Newton, MA 02459. Nacionalidad o Domicilio: Suiza y Estados Unidos de América.		
5 PCT (86) Solicitud Internacional No. <u>PCT/EP2006/011861</u> Fecha: <u>08/12/06</u> Publicación Internacional No. <u>WO 2007/068411 A3</u> Fecha: <u>21/06/07</u>			
6 Título (54) "VACUNA TERAPÉUTICA"			
7 Clasificación Internacional (51) A61K 39/00			
8 Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	EP	12/12/05	05027091.7
	EP	02/05/06	06009098.2
9 Comprobante de Pago N . 08-33,093 Fecha: <u>24 de Abril de 2008</u>			

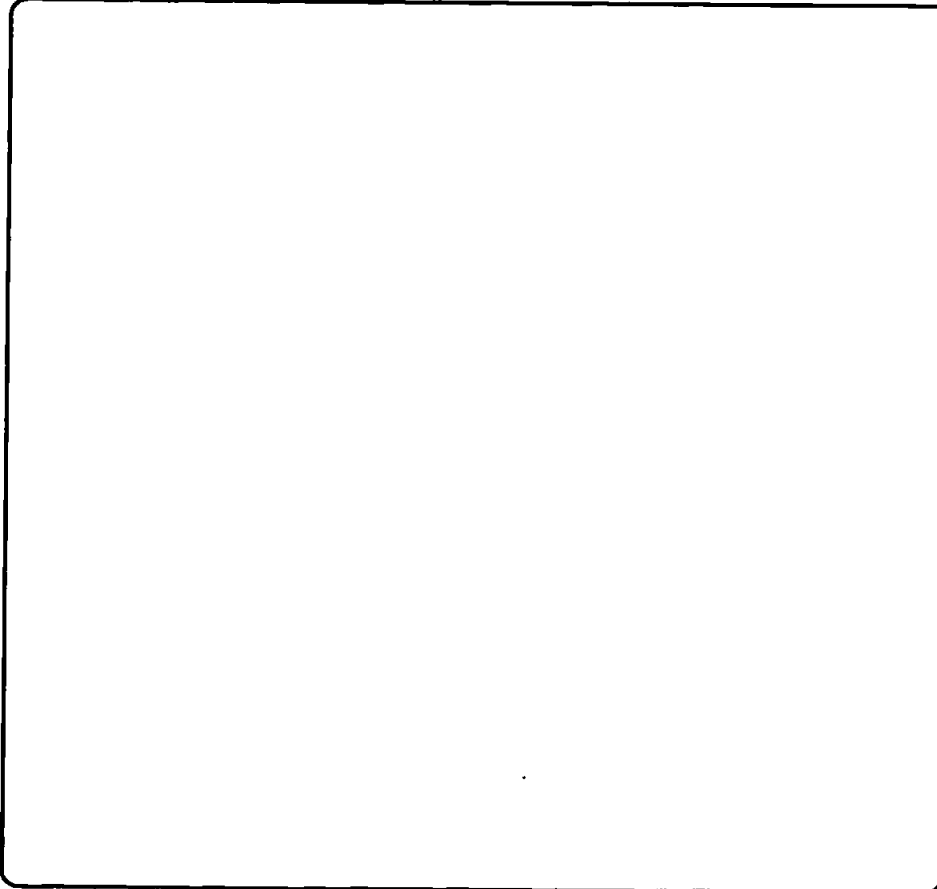
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Documento de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional 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.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: reporte de búsqueda internacional con su traducción, documentos anexos al reporte de búsqueda internacional, publicación con su traducción, documento de indicaciones relacionadas con microorganismos depositados u otro material biológico con su traducción y listado de secuencias.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

C.C. 39.690.713

T.P. 53.215

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-054157- -00000-0000

Fecha: 2008-05-28 15:51:14 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 180

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 33.093
FECHA : ABRIL 24 DE 2008

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754397	773640	24/04/2008	5,991,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
		TOTAL :	501,000.00

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

(21) N° de solicitud:				(51) Int Cl: A61K 39/00	
(22) Fecha de solicitud: 28-05-08				(71) Solicitante(s): AC IMMUNE SA	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País	(72) Inventor(es): PFEIFER, Andrea y NICOLAU, Claude.	
	05027091.7	12-12-05	EP		
	06009098.2	02-05-06	EP	(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 12-07-08				(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT				Fecha: 21-06-07	
Fecha de presentación de la solicitud: 08-12-06				N° publicación: WO 2007/068411 A3	
No. de solicitud: PCT/EP2006/011861					
(54) Título: VACUNA TERAPÉUTICA					

Resumen - Reivindicación(es):

Reivindicación número 49.-

Una composición de vacuna que comprende un péptido antigénico inmunogénico para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada a amiloide, en donde el antígeno peptídico β -amiloide es un antígeno peptídico palmitoilado A β ₁₋₁₅ modificado por residuos palmitoilos adosados covalentemente, particularmente entre 2 y 4, más particularmente 4 residuos, en cada extremo del péptido reconstituido en un liposoma.

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2006/011861

Casilla II Observaciones donde ciertas reivindicaciones fueron inescrutables (Continuación del ítem 2 de la primera hoja)

Este Reporte de Búsqueda Internacional no ha sido establecido respecto a ciertas reivindicaciones bajo el Artículo 17(2)(a) por las siguientes razones:

1. ☒ Reivindicaciones Nos.:

porque se relacionan con un asunto que no es necesario que esta Autoridad busque, a saber:
Aunque las reivindicaciones 79-102 están dirigidas a un método de tratamiento del cuerpo humano/animal, la búsqueda ha sido llevada a cabo y basada en los efectos alegados del compuesto/composición.

2. ☐ Reivindicaciones Nos.:

porque se relacionan con partes de la Solicitud Internacional que no cumplen con los requisitos prescritos hasta tal grado que no se puede llevar a cabo una búsqueda internacional significativa, específicamente:

3. ☐ Reivindicaciones Nos.:

porque son reivindicaciones dependientes y no están diseñadas de acuerdo con la segunda y tercera oración de la Regla 6.4(a).

Casilla III Observaciones donde falta unidad de invención (Continuación del ítem 3 de la primera hoja)

Esta Autoridad de Búsqueda Internacional encontró invenciones múltiples en esta solicitud internacional, así:

ver hoja adicional

1. ☐ Puesto que todos los derechos de búsqueda adicionales requeridos fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre todas las reivindicaciones investigables.

2. ☐ Puesto que todas las reivindicaciones investigables pudieron investigarse sin esfuerzo que justifique derechos adicionales, esta Autoridad no solicitó pago de derechos adicionales.

3. ☐ Puesto que sólo algunos de los derechos de búsqueda adicionales fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre únicamente aquellas reivindicaciones para las cuales se pagaron derechos, específicamente las reivindicaciones Nos.:

4. ☒ El solicitante no pagó oportunamente los derechos de búsqueda adicionales requeridos. Por consiguiente, este informe de búsqueda internacional se restringe a la primera invención mencionada en las reivindicaciones; está cubierto por las reivindicaciones Nos.:

ver anexo

Comentario sobre Protesta ☐ Las tarifas adicionales de búsqueda estaban acompañadas por la protesta del solicitante.

☐ Ninguna protesta acompañaba el pago de tarifas adicionales de búsqueda.

INFORMACIÓN ADICIONAL CONTINUACIÓN DE PCT/ISA/210

Esta Autoridad de Búsqueda Internacional encontró múltiple (grupos de) invenciones en esta solicitud internacional, como sigue:

1. Reivindicaciones: 1-63, 78-84, 86, 100, 102, 108-110, y parcialmente 85, 87-99, 101, 107

Un fragmento bcta péptidico antigénico que consiste de una porción sencilla o repetitiva de 13 a 15 aminoácidos de la parte N-terminal del péptido A-beta; composición de vacuna que comprende el mismo para el tratamiento y prevención de enfermedades amiloide-asociadas

2. Reivindicaciones: 64-66 y parcialmente 70-77, 85, 87-99, 101, 103-107

Composición que comprende un antígeno péptidico A-beta y un inhibidor del sistema complemento para el tratamiento de una enfermedad amiloide-asociada

3. Reivindicaciones: 67-69 y parcialmente 70-77, 85, 87-99, 101, 103-107

Composición que comprende un antígeno péptidico A-beta y un compuesto que dispara y aumenta la liberación regulada de oxígeno a los tejidos para el tratamiento de una enfermedad amiloide-asociada

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2006/011861

A. CLASIFICACION DE MATERIA OBJETO

INV. A61K39/00 A61P25/28 C07K16/18

Según la Clasificación de Patente Internacional (IPC) o según la clasificación nacional y la IPC

B. CAMPOS BUSCADOS

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de símbolos de clasificación)

A61K A61P C07K

Documentación buscada fuera de documentación mínima hasta donde dichos documentos se incluyan en los campos buscados

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, donde sea práctico, buscar términos usados)

EPO-Internacional, WPI Dato, BIOSIS

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	US 2002/156036 A1 (YVES CLAUDE NICOLAU) 24 de Octubre de 2002 (2002-10-24) página 1, párrafo 11 página 2, párrafo 13 – párrafo 18 página 5, párrafo 63 – página 6, párrafo 67; ejemplos 9-17 ----- -----	1-63, 78-102, 107-110

☒ En el recuadro C se enumeran más documentos.	☒ En el anexo se enumeran miembros de la familia de patentes.
* Categorías especiales de documentos citados: 'A' documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera de relevancia particular 'E' documento anterior pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional 'L' documento que puede arrojar dudas sobre reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra citación u otra razón especial (según se especifica) 'O' documento que se refiere a una revelación oral, uso, exhibición u otros medios 'P' documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada	'T' documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta la invención 'X' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo 'Y' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o más documentos, siendo dicha combinación obvia para una persona experta en la técnica '&' documento miembro de la misma familia de patentes
Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional 22 de Marzo de 2007	Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional 25/06/2007
Nombre y dirección de correo de la ISA/ Oficina de Patentes Europea, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 NV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Funcionario autorizado MONTERO LOPEZ, B

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2006/011861

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	NICOLAU CLAUDE Y COL: "Una vacuna terapéutica basada en liposomas contra las placas beta amiloides en el páncreas de ratones NORBA transgénicos" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 99, no. 4, 19 de Febrero de 2002 (2002-02-19), páginas 2332-2337, XP009062068 ISSN: 0027-8424 resumen página 2332, columna a mano derecha, párrafo 3 página 2333, columna a mano izquierda, párrafo 2 - columna a mano derecha, párrafo 1; figuras 1, 2 página 2334, columna a mano derecha, párrafo 2 - página 2337, columna a mano derecha, último párrafo	1-63, 78-102, 107-110
X	BRUNO P. IMBIMBO: "Aproximaciones de inmunización beta-amiloide para la enfermedad de Alzheimer" DRUG DEVELOPMENT RESEARCH, vol. 56, 2002, páginas 150-162, XP002426086 página 157, columna a mano izquierda, párrafo 3 - columna a mano derecha, párrafo 1	1-63, 78-102, 107-110
X	WO 02/096350 A (UNITED BIOMEDICAL, INC.) 5 de Diciembre de 2002 (2002-12-05) página 13, párrafo 31 - página 15, párrafo 37 página 17, párrafo 40 - párrafo 42 página 24, párrafo 59; ejemplos	1-14, 24-48, 78-102, 110
X	US 2005/123553 A1 (ALON MONSONEGO Y COL.) 9 de Junio de 2005 (2005-06-09) página 1, párrafo 7 - párrafo 10 página 2, párrafo 12 página 2, párrafo 15 - página 3, párrafo 23	1-14, 24-48, 78-102, 107, 109, 110

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2006/011861

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría °	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
P, X	EP 1 676 859 A (PEVION BIOTECH LTD.) 5 de Julio de 2006 (2006-07-05) página 3, párrafo 12 - página 4, párrafo 20 página 5, párrafo 28 - página 6, párrafo 32 página 6, párrafo 39 - página 7, párrafo 43 página 8, párrafo 48 - página 9, párrafo 53 página 12, párrafo 79 página 13, párrafo 87 - página 14, párrafo 93 -----	1-63, 78-102, 107-110
P, X	MARCEL MAIER Y COL.: "Inmunógenos pequeños beta-amiloides reducen la carga beta-amiloide cerebral y las deficiencias de aprendizaje en modelo ratón de la enfermedad de Alzheimer en la ausencia de una respuesta inmune celular beta-amiloide específica" NEUROBIOLOGY OF DISEASE, vol. 26, no. 18, 3 de Mayo de 2006 (2006-05-03), páginas 4717-4728, XP002426087 resumen página 4718, columna a mano izquierda, párrafo 3 - columna a mano derecha, párrafo 3 página 4719, columna a mano derecha, párrafo 2 - página 4726, columna a mano derecha, párrafo 2 -----	1-14, 24-48, 78-102, 107-110

AC

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL Información sobre miembros de familia de patentes

Solicitud Internacional No.
 PCT/EP2006/011861

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
US 2002156036 A1	24-10-2002	US 2006073155 A1	06-04-2006
WO 02096350 A	05-12-2002	BR 0210010 A	25-10-2005
		CA 2448171 A1	05-12-2002
		CN 1568329 A	19-01-2005
		EP 1497313 A2	19-01-2005
		JP 2005506311 T	03-03-2005
		MX PA03010631 A	13-09-2004
		TW 252233 B	01-04-2006
		US 2004247612 A1	09-12-2004
		US 2003068325 A1	10-04-2003
		ZA 200308767 A	25-07-2005
US 2005123553 A1	09-06-2005	NINGUNO	
EP 1676859 A	05-07-2006	WO 2006069718 A1	06-07-2006

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2006/011861

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

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 79-102 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.:

see annex

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/SA/ 210

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

1. claims: 1-63, 78-84, 86, 100, 102, 108-110 and partially 85, 87-99, 101, 107

A-beta antigenic peptide fragment consisting of a single or repetitive stretch of 13-15 amino acids of the N-terminal part of the A-beta peptide; vaccine composition comprising the same for the treatment and prevention of amyloid-associated diseases

2. claims: 64-66 and partially 70-77, 85, 87-99, 101, 103-107

Composition comprising an A-beta peptide antigen and an inhibitor of the complement system for the treatment of an amyloid-associated disease

3. claims: 67-69 and partially 70-77, 85, 87-99, 101, 103-107

Composition comprising an A-beta peptide antigen and a compound which triggers an enhanced, regulated oxygen release to the tissues for the treatment of an amyloid-associated disease

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2006/011861

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K39/00 A61P25/28 C07K16/18

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 A61P C07K

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, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2002/156036 A1 (YVES CLAUDE NICOLAU) 24 October 2002 (2002-10-24) page 1, paragraph 11 page 2, paragraph 13 - paragraph 18 page 5, paragraph 63 - page 6, paragraph 67; examples 9-17 ----- -/--	1-63, 78-102, 107-110

☒ 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 (as specified)
- *O* document relating 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
- *8* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 March 2007

Date of mailing of the international search report

25/06/2007

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2260 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

MONTERO LOPEZ, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2006/011861

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NICOLAU CLAUDE ET AL: "A liposome-based therapeutic vaccine against beta-amyloid plaques on the pancreas of transgenic NORBA mice" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 99, no. 4, 19 February 2002 (2002-02-19), pages 2332-2337, XP009062068 ISSN: 0027-8424 abstract page 2332, right-hand column, paragraph 3 page 2333, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 1; figures 1,2 page 2334, right-hand column, paragraph 2 - page 2337, right-hand column, last paragraph	1-63, 78-102, 107-110
X	BRUNO P. IMBIMBO: "Beta-amyloid immunization approaches for Alzheimer's disease" DRUG DEVELOPMENT RESEARCH, vol. 56, 2002, pages 150-162, XP002426086 page 157, left-hand column, paragraph 3 - right-hand column, paragraph 1	1-63, 78-102, 107-110
X	WO 02/096350 A (UNITED BIOMEDICAL, INC.) 5 December 2002 (2002-12-05) page 13, paragraph 31 - page 15, paragraph 37 page 17, paragraph 40 - paragraph 42 page 24, paragraph 59; examples	1-14, 24-48, 78-102, 110
X	US 2005/123553 A1 (ALON MONSONEGO ET AL.) 9 June 2005 (2005-06-09) page 1, paragraph 7 - paragraph 10 page 2, paragraph 12 page 2, paragraph 15 - page 3, paragraph 23 ----- -/-	1-14, 24-48, 78-102, 107,109, 110

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2006/011861

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	EP 1 676 859 A (PEVION BIOTECH LTD.) 5 July 2006 (2006-07-05) page 3, paragraph 12 - page 4, paragraph 20 page 5, paragraph 28 - page 6, paragraph 32 page 6, paragraph 39 - page 7, paragraph 43 page 8, paragraph 48 - page 9, paragraph 53 page 12, paragraph 79 page 13, paragraph 87 - page 14, paragraph 93	1-63, 78-102, 107-110
P,X	MARCEL MAIER ET AL.: "Short amyloid-beta immunogens reduce cerebral Amyloid-beta load and learning deficits in an Alzheimer's disease mouse model in the absence of an Amyloid-beta-specific cellular immune response" NEUROBIOLOGY OF DISEASE, vol. 26, no. 18, 3 May 2006 (2006-05-03), pages 4717-4728, XP002426087 abstract page 4718, left-hand column, paragraph 3 - right-hand column, paragraph 3 page 4719, right-hand column, paragraph 2 - page 4726, right-hand column, paragraph 2	1-14, 24-48, 78-102, 107-110

16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2006/011861

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2002156036 A1	24-10-2002	US 2006073155 A1	06-04-2006
WO 02096350 A	05-12-2002	BR 0210010 A	25-10-2005
		CA 2448171 A1	05-12-2002
		CN 1568329 A	19-01-2005
		EP 1497313 A2	19-01-2005
		JP 2005506311 T	03-03-2005
		MX PA03010631 A	13-09-2004
		TW 252233 B	01-04-2006
		US 2004247612 A1	09-12-2004
		US 2003068325 A1	10-04-2003
		ZA 200308767 A	25-07-2005
US 2005123553 A1	09-06-2005	NONE	
EP 1676859 A	05-07-2006	WO 2006069718 A1	06-07-2006

15

DOCUMENTOS ANEXOS AL REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

- 1. US 2002/156036 A1**
- 2. XP009062068**
- 3. XP002426086**
- 4. WO 02/096350 A**
- 5. US 2005/123553 A1**
- 6. EP 1 676 859 A**
- 7. XP002426087**



US 20020156036A1

(19) **United States**

(12) **Patent Application Publication**

Nicolau

(10) Pub. No.: **US 2002/0156036 A1**

(43) Pub. Date: **Oct. 24, 2002**

(54) **METHODS AND COMPOSITIONS FOR DISEASES ASSOCIATED WITH AMYLOIDOSIS**

(76) Inventor: **Yves Claude Nicolau, Newton, MA (US)**

Correspondence Address:
**JOHN S. PRATT, ESQ
KILPATRICK STOCKTON, LLP
1100 PEACHTREE STREET
SUITE 2800
ATLANTA, GA 30309 (US)**

(21) Appl. No.: **09/948,049**

(22) Filed: **Sep. 6, 2001**

Related U.S. Application Data

(60) Provisional application No. 60/230,391, filed on Sep. 6, 2000. Provisional application No. 60/255,033, filed on Dec. 12, 2000.

Publication Classification

(51) Int. Cl.⁷ **A61K 48/00; A61K 9/127**
(52) U.S. Cl. **514/44; 424/450; 435/320.1**

(57) **ABSTRACT**

The present invention generally relates to the detection, treatment or prevention of disease states. Specifically, the present invention relates to the detection, treatment or prevention of amyloidosis or amyloid-associated diseases. The present invention further comprises methods and compositions comprising therapeutic vaccines, antisera and molecular constructs, comprising expression vectors and fusion proteins encoded therein.

A liposome-based therapeutic vaccine against β -amyloid plaques on the pancreas of transgenic NORBA mice

Claude Nicolau^{*†}, Ruth Greferath^{*}, Teodor Silviu Balaban^{*}, Jaime E. Lazarte[†], and Robert J. Hopkins[§]

^{*}Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, Université Louis Pasteur, 67091 Strasbourg, France; and [†]Beth Israel Deaconess Medical Center, Department of Medicine, and [§]Dana Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, MA 02116

Communicated by Robert Langer, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, November 20, 2001 (received for review August 20, 2001)

Immune tolerance to β -amyloid ($A\beta$) was broken in NORBA transgenic mice presenting $A\beta$ plaques on their pancreases. Vaccination of Black C57, BALB/c, and NORBA mice with the synthetic $A\beta_{1-16}$ sequence modified by covalently attaching two palmitoyl residues at each end of the peptide, subsequently reconstituted in liposomes-lipid A elicited titers of 1:5,000 of anti- $A\beta_{1-16}$ antibodies within 10 weeks after the first inoculation. On direct interaction, sera with antibody titers of 1:5,000 solubilized *in vitro* up to 80% of preformed $A\beta_{1-42}$ aggregates. Cryosections of pancreases of unvaccinated NORBA mice show, on staining with Thioflavin T, extensive areas of high-intensity fluorescence in the acinar cell fields. Quantitation of the average fluorescence intensity in each section indicated that: (i) whereas nonvaccinated NORBA mice develop plaques within 45–60 days after birth, vaccinated 8-week-old NORBA mice did not develop amyloid plaques on their pancreases over a period of 7 months; (ii) cryosections from pancreases of 9- and 15-month-old vaccinated NORBA mice showed less than 50% of the fluorescence shown by cryosections from unvaccinated animals of the same age. The results indicate that palmitoylated $A\beta$ peptides, reconstituted in liposomes-lipid A, are highly immunogenic, eliciting “therapeutic” antibody titers within 3 months of the first inoculation and preventing amyloid plaque formation in young animals or significantly reducing existing plaques in older transgenic mice. Possible implications for the therapy of Alzheimer’s disease are discussed.

immune tolerance | anti- $A\beta$ antibodies | lipid A | $A\beta$ -fiber solubilization

Alzheimer’s disease (AD) is a progressive degenerative disorder of insidious onset characterized by memory loss, confusion, and a variety of cognitive disabilities. The major neuropathological change in the brains of AD patients is neuronal death, particularly in regions related to memory and cognition (1). One of the major pathological features of AD is the abundant presence of amyloid plaques in the brain of affected individuals (2). Intracellular bundles of paired helical filaments, composed largely of phosphorylated tau protein, accumulate in large amounts in dying neurons (3). On the neuron surfaces, insoluble aggregates of proteinaceous debris, termed amyloid, appear in the form of neuritic plaques and vascular amyloid deposits (1). The frequency and distribution of the neurofibrillar tangles and of the neuritic plaques appear to correlate well with the extent of cognitive impairment and other characteristic symptoms of AD (3).

Amyloid plaques are formed by the β -amyloid peptide ($A\beta$), a 39- to 43-aa-long polypeptide that is mostly coiled and slightly α -helical in its benign soluble form and, on conformational transition into a mainly β -sheet secondary structure, spontaneously aggregates into insoluble deposits. $A\beta$ is a physiological metabolite of the much larger amyloid precursor protein (APP), 695–770 aa long, which undergoes sequential proteolysis (4). The peptide may remain in solution as a random coil or an α -helix (5).

A mAb, raised against the sequence $A\beta_{1-16}$ of the amyloid protein, was shown *in vitro* to have a solubilizing effect on fibrils formed by the $A\beta_{1-42}$ amyloidogenic peptide (6). The amyloid

filaments obtained were similar to those found in amyloid plaques and cerebrovascular amyloid, assembled from chemically synthesized amyloid sequences under defined experimental conditions (6).

Previous studies in our laboratory had shown that palmitoylated peptide sequences of the multidrug-resistance (MDR)1 protein, reconstituted in the bilayer of liposomes, when injected into mice elicited strong immune responses, breaking the immune tolerance to this “self” protein (7).

In the present study, we report that the palmitoylated $A\beta_{1-16}$ sequence reconstituted in liposomes-lipid A, when injected i.p. into mice, including transgenic NORBA mice, which overexpress human APP resulting in amyloid plaque deposits on their pancreases, elicited significant titers of anti-amyloid antibodies displaying therapeutic as well as prophylactic action in NORBA transgenic mice.

Materials and Methods

Chemicals. Dichloromethane from Carlo Erba (Milan) was distilled freshly from calcium hydride under nitrogen before use. Acetic anhydride, 4-dimethylaminopyridine, and dicyclohexylcarbodiimide were purchased from Sigma-Aldrich; α , ϵ -dipalmitoyllysine was synthesized according to literature methods (8); α -fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)- ϵ -palmitoyllysine [FmocLys(Pal)OH], the 4-alkoxybenzyl alcohol resin for automated solid-phase synthesis, as well as $A\beta_{1-42}$, was purchased from Bachem; chromatography solvents were HPLC grade; the goat-anti-mouse-antibody (alkaline phosphatase conjugated) and *para*-nitrophenylphosphate were obtained from Sigma-Aldrich; the murine anti-His5-IgG antibody from Qiagen (Courtaboeuf, France); and the monoclonal anti- $A\beta_{1-16}$ antibody 6C6 was a gift from Dale Schenk (Elan Pharma, San Francisco). Dimyristoylphosphatidylcholine, dimyristoylphosphatidylglycerol, and cholesterol were purchased from Avanti Polar Lipids, monophosphoryl lipid A from List Biological Laboratories (Campbell, CA), aluminum hydroxide (Alum) (Rehydrol, HPA) was a gift from Reheis.

Animals. BALB/c and C57BL/6 mice were obtained from Centre Elevage JANVIER (Le Genest Saint Isle, France); transgenic NORBA mice were a gift from Hoechst-Roussel. The mice were maintained in a facility that was tested routinely and found to be free of transmissible agents that cause disease in mice.

Instrumentation. Solid-phase synthesis of the two different tetra-palmitoyl peptides was carried out on an Applied Biosystems 431A peptide synthesizer by using Fmoc (Sheppard) chemistry.

Abbreviations: $A\beta$, β -amyloid; AD, Alzheimer’s disease; Alum, aluminum hydroxide; APP, amyloid precursor protein; Fmoc, 9-fluorenylmethoxycarbonyl ester; ThT, thioflavin T.

[†]To whom reprint requests should be addressed. E-mail: claudenicolau@carogroup.harvard.edu or nicolau@therascope.de.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

Electrospray ionization mass spectra were recorded on a Micromass BIO Q Instrument (Micromass, Manchester, U.K.). HPLC separations were effected on a Hewlett-Packard HP 1090 chromatograph equipped with a VYDAC-C18 reverse-phase column that was thermostated at 50°C and eluted with a gradient of two solvent mixtures [A, 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in water and B, 70% acetonitrile, 30% of 0.09% TFA in water]. Fourier transform-IR Spectra were recorded in potassium bromide pellets on a Perkin-Elmer 1600 spectrometer.

Synthesis of Tetrapalmitoyl-Tris-Lysine- β -Peptide and of Tetrapalmitoyl-tetakis-Lysine- β -Peptide. Two sequential ϵ -palmitoylated lysines were introduced at the peptide's C terminus. The first ϵ -palmitoylated lysine was anchored onto the 4-alkoxybenzyl alcohol resin by reacting 335 mg of resin with 388 mg of FmocLys(Pal)OH in the presence of dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (185 mg) and 4-dimethylaminopyridine (DMAP) (20 mg) in dry freshly distilled dichloromethane according to Merrifield (9). After stirring for 3 hours at room temperature, the reaction mixture was filtered and washed thoroughly 10 times with dry methylene chloride. To ensure complete reaction, the obtained resin was reacted once more with a fresh portion of FmocLys(Pal)OH in the presence of DCC and DMAP in dry methylene chloride, suspended in 45 ml of dry methylene chloride, and 5 ml of acetic anhydride was added for capping any unreacted resin. After washing with methylene chloride, the resin was dried in vacuum. The Fourier transform (FT)-IR spectrum of the product shows the expected bands for the ester linkage at $1,720\text{ cm}^{-1}$, for the NH group at $3,327\text{ cm}^{-1}$, and for the amide carbonyl group at $1,626\text{ cm}^{-1}$. All these bands are absent in the FT-IR spectrum of the starting 4-alkoxybenzyl alcohol resin. The final quantity was 302 mg with a loading of about 0.5 mmol/g. The second ϵ -palmitoylated lysine was anchored on the peptide synthesizer by using for coupling also FmocLys(Pal)OH. Subsequently, 16 cycles of conventional automated solid-phase peptide synthesis were performed, resulting in the sequence βA_{1-16} appended to the first two palmitoylated lysines. At this point, a small amount of peptide was cleaved from the resin and analyzed by electrospray mass spectrometry and HPLC, showing that, in addition to the desired lipopeptide, minor components of peptides lacking either one or two palmitoylated lysines were also present.

Two further couplings, each repeated twice, were effected with Fmoc protected ϵ -palmitoyllysine [Fmoc-Lys(Pal)-OH]. Final deprotection and cleavage from the resin afforded a mixture of lipopeptides in which the desired tetrapalmitoylpeptide, shown in Fig. 1, amounted to 35% (peaks at 1140.6, 855.4, and 685.4 Da for the +3, +4, +5 molecular ions, respectively, lead to an inferred mass of 3421.65 ± 0.39 as compared to the theoretical value of 3421.05 Da). As the other components lacked palmitoylated lysines, their insertion into liposomes was less probable, so that a purification at this stage could be performed.

Preparation of the Antigen. Liposomes with lipid A and Alum were used as adjuvants to prepare the anti-amyloid vaccine (7). Dimyristoylphosphatidylcholine, dimyristoylphosphatidylglycerol, and cholesterol were mixed in the molar ratios of 0.9:0.1:0.7. Monophosphoryl lipid A, a strong immunomodulator, was added at a concentration of 40 mg per mmol of phospholipids. The palmitoylated peptides were added at a molar ratio peptide to phospholipids of 1:100. Solvents were evaporated, and the resultant film was hydrated with sterile PBS (pH 7.3) to a final phospholipid concentration of 4 mmol and was further homogenized. The liposome suspension was mixed with sterile Alum 15 min before injection (9:1 vol/vol).

Immunization Protocol. Three groups of animals were immunized: (i) eight BALB/c mice were immunized by six i.p. inoculations at 2-week intervals with 200 μl of the palmitoylated peptide-liposome-lipid A/Alum suspension. Six additional mice were

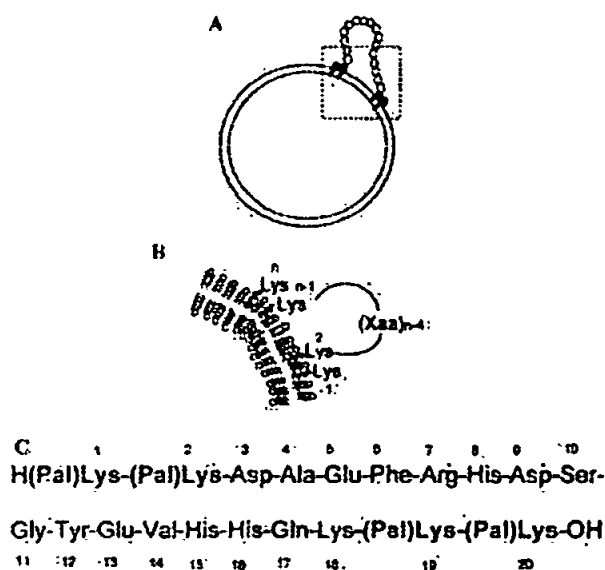


Fig. 1. Reconstitution of $\text{A}\beta_{1-16}$ in the liposome bilayer. (A) Liposome with anchored $\text{A}\beta_{1-16}$. (B) Magnification of the boxed region in the upper part. (C) Two palmitoylated lysine residues (in the sequence shown with bold characters) are covalently attached at each end of the $\text{A}\beta_{1-16}$ sequence.

injected with PBS and Alum or with phospholipids and Alum (three animals each); (ii) in a group of 12 C57BL/6-mice, three received liposomes-lipid A and palmitoylated $\text{A}\beta_{1-16}$, three received liposomes-lipid A mixed with the scrambled sequence $\text{A}\beta_{42-1}$, and six were injected with lipids only or left untreated (each three animals); (iii) the final group consisting of 19 NORBA transgenic mice of different ages, constitutively presenting $\text{A}\beta$ plaques on the pancreas, were immunized by using the protocol described. Four animals were left untreated as controls. Blood was collected from the tail vein 4 days after injection. The collected blood (10–30 μl) was diluted immediately with 10 μl of PBS and 5 μl of heparin. The samples were centrifuged, and the serum was tested for anti- $\text{A}\beta_{1-42}$ antibodies by ELISA.

ELISA. Microtiter plates were coated with 50 μl of $\text{A}\beta_{1-42}$ solution (1 mg of $\text{A}\beta_{1-42}$ /5 ml PBS) and left overnight at 4°C. Wells were blocked with 200 μl of BSA/PBS (0.5% BSA) for 2 hours at 37°C and washed with 200 μl of PBS/0.005% Triton X-100. Dilutions of sera (1:10–1:100,000) were incubated for 90 min at 37°C. The plates were washed twice with 200 μl of PBS/0.005% Triton X-100 before 50 μl of a goat-anti-mouse antibody (alkaline phosphatase conjugated) was added in a 1:30,000 dilution. After 90 min at 37°C, the wells were washed as described. One hundred microliters of the paranitrophenyl phosphate substrate (1 tablet in 5 ml of deionized water) was added, and optical absorption was measured at 405 nm in an ELISA reader 20–60 min later (10).

Disaggregation Assay. Reaction tubes containing 30 μg of $\text{A}\beta_{1-42}$ /10 μl of PBS, pH 7.3, were incubated for 1 week at 37°C. Aggregation was measured by the thioflavin T (ThT)-binding assay in which the dye's fluorescence emission intensity reflects the degree of $\text{A}\beta$ fibrillar aggregation. Disaggregation was followed after addition of various undiluted sera of immunized mice to the preformed fibers (10 μl each). The reaction mixtures were incubated for 2 days at 37°C. The Ab, 6C6, and an irrelevant control antibody (mouse IgG, anti-His₅) were used at a final concentration of 0.4–3.5 mg/ml. Fluorescence (excitation: 450 nm; emission: 482 nm) was measured after addition of 1 ml of ThT (3 μM in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0) (4).

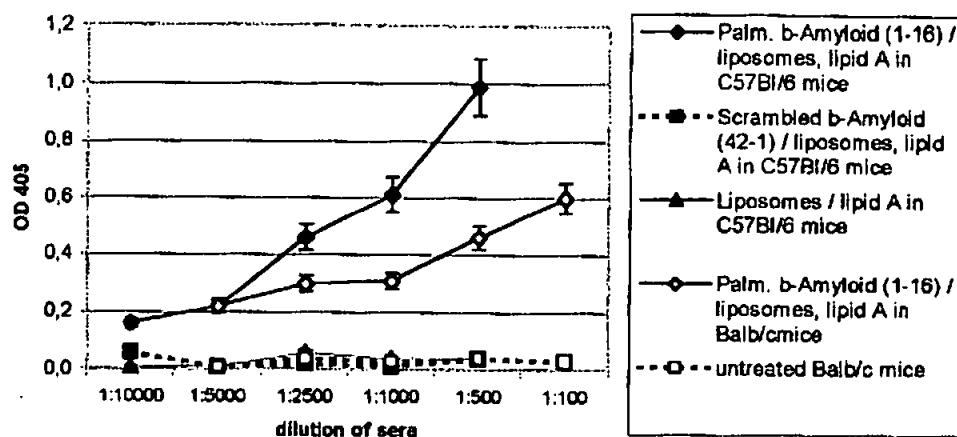


Fig. 2. Antibody response in mice to different antigens reconstituted in liposomes-lipid + Alum, 6 weeks after the first inoculation. Three groups of animals were immunized: (i) eight BALB/c mice were immunized by six i.p. inoculations at 2-week intervals with 200 μ l of the palmitoylated peptide-liposome-lipid A/Alum suspension. Six additional mice were injected with PBS and Alum or with phospholipids and Alum (three animals each). (ii) In a group of 12 C57BL/6-mice, three received liposomes-lipid A and palmitoylated $A\beta_{1-16}$, three received liposomes-lipid A mixed with the scrambled sequence $A\beta_{42-1}$, and six were injected with lipids only or left untreated (each three animals). Four animals were left untreated as controls. Blood was collected from the tail vein 4 days after injection. The collected blood (10–30 μ l) was diluted immediately with 10 μ l of PBS and 5 μ l of heparin. The samples were centrifuged, and the serum was tested for anti- $A\beta_{1-42}$ antibodies by ELISA (see Materials and Methods). (●) Means of sera from 12 C57BL/6 mice; (○) means of sera from 8 BALB/c mice; (▲, □, ■) means of sera from three animals each and SDs are shown.

Histochemistry

Quantitative Fluorescence Analysis. Vaccinated and nonvaccinated NORBA mice of different age having received seven immuni-

zations were killed 7 months after the first inoculation, and their pancreases were collected and preserved in formalin. The formalin-preserved pancreas pieces were soaked in sucrose solution to prepare them for cryosectioning. The sections obtained were analyzed by ThT staining (11) to detect $A\beta$ on the surface of the pancreas. Washed sections were stained with a 1% ThT aqueous solution for 3 min. To remove excess fluorochrome from the background, sections were rinsed with water and incubated in 1% acetic acid for 20 min. Sections were washed with water extensively before analysis by fluorescence microscopy. Thin sections stained with ThT were analyzed with a Nikon Labophot Microscope by using a 100-watt mercury source and a Lucifer Yellow Filter Set (Chroma Technology, Brattleboro, VT). Images were captured with a Cool Snap Pro Digital Capture kit (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) by using a $\times 40$ objective and an exposure time of 600 msec. Images were analyzed with IMAGE PRO PLUS v. 4.1 (Media Cybernetics). Three sections were used per treatment group, and treatments were unknown to the analyst. A uniform threshold setting of 567,000 pixels per image was maintained for all groups. Measurements included the total area of the fluorescent region and the mean intensity within the region. The person conducting these studies did not know the history of the cryosections analyzed.

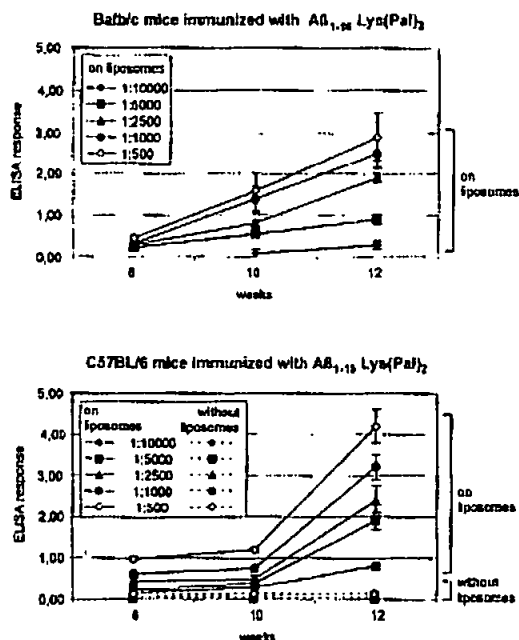


Fig. 3. Time dependence of anti- $A\beta_{1-16}$ antibody titers in animals vaccinated with the liposomal, palmitoylated $A\beta_{1-16}$ antigen. Antibody response was assayed by ELISA. Mikrotiter plates were coated with 50 μ l of $A\beta_{1-42}$ solution (1 mg of $A\beta_{1-42}$ /5 ml of PBS) and left overnight at 4°C. Wells were blocked with 200 μ l of BSA/PBS (0.5% BSA) for 2 hours at 37°C and washed with 200 μ l of PBS/0.005% Triton X-100. Dilutions of sera (1:10–1:100,000) were incubated for 90 min at 37°C. The plates were washed twice with 200 μ l of PBS/0.005% Triton X-100 before 50 μ l of a goat-anti-mouse antibody (alkaline phosphatase conjugated) was added in a 1:30,000 dilution. After 90 min at 37°C, the wells were washed as described. One hundred microliters of the paranitrophenyl phosphate substrate (one tablet in 5 ml of deionized water) was added, and optical absorption was measured at 405 nm in an ELISA reader 20–60 min later (8). Means of sera from 8 BALB/c mice and means of sera from 12 C57BL/6 mice and SDs are shown.

Results

To anchor a synthetic peptide of desired sequence in the liposome bilayer, thus enhancing its immunogenicity, we used lysines that are acylated at the ϵ -amino group with a fatty acid residue capable of insertion in the liposomal bilayer. Palmitoyl residues (16 carbon atoms) have proven to have the appropriate length for the stable insertion into the lipid bilayer (7). Two such palmitoyl residues at each end of the peptide make it sufficiently hydrophobic so that insertion is thermodynamically favored, a stable supramolecular assembly being formed, as shown in Fig. 1.

A significant immune response was observed in the liposomes/ $A\beta_{1-16}$ vaccinated BALB/c mice after the third inoculation. The titers of the elicited anti $A\beta_{1-42}$ antibodies were around 1:5,000 10 weeks after the first inoculation. Control animals receiving phospholipids/Alum or Alum alone had negligible titers to $A\beta_{1-42}$. Sera of C57BL/6 mice having received palmitoylated $A\beta_{1-16}$ reached titers up to 1:10,000 against

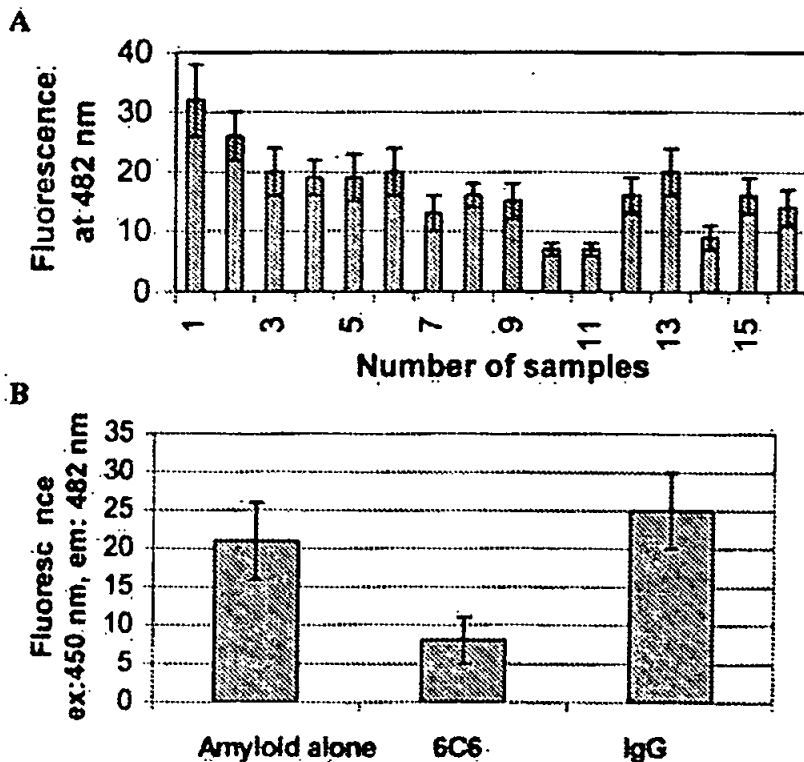


Fig. 4. Disaggregation of $A\beta_{1-42}$ fibers by sera of immunized C57BL/6 mice. (A) ThT fluorescence emission intensity correlates with the amount of fibrillar amyloid present in solution. $A\beta$ fiber formation during 7 days at 37°C in PBS, pH = 7.1. Antisera were added after 7 days and incubated for 24 h. Bar no. 1, serum of a nonvaccinated animal; bars nos. 2–15, sera of vaccinated animals. (B) Anti- $A\beta_{1-16}$ mAb 6C6 and irrelevant IgG were incubated at a final concentration of 30 μ g/20 μ l with $A\beta_{1-42}$ aggregates for 24 h. Average of three measurements with three different serum samples.

$A\beta_{1-42}$. No antibodies against $A\beta_{1-42}$ were found in sera from mice having received scrambled $A\beta_{42-1}$ or lipids only.

Figs. 2 and 3 *a* and *b* show the evolutions of the anti-amyloid antibody titers in time, first after three inoculations with a variety of antigens and then after six inoculations by using only the palmitoylated peptide in liposomes.

Disaggregation of $A\beta_{1-42}$ Fibrils. Because the mAb 6C6 raised against $A\beta_{1-16}$ was shown to solubilize $A\beta$ fibers *in vitro*, the antisera of the vaccinated mice showing titers of at least 1:5,000 were tested for their capacity to solubilize preformed $A\beta_{1-42}$ fibers. A disaggregation assay of $A\beta_{1-42}$ aggregates was performed as described by Solomon *et al.* (6). A significant solubilization of $A\beta_{1-42}$ fibers by 15 different antisera was observed with an incubation time of 2 days (Fig. 4A). The sera induced disaggregation at an extent up to 80%, exceeding the solubilization of $A\beta_{1-42}$ fibers by the Elan mAb (6C6, 60–70%) (Fig. 4B) used in comparison. The irrelevant IgG had no significant effect on disaggregation of the $A\beta_{1-42}$ fibrils (Fig. 4B).

Histochemistry Studies. Pancreases of vaccinated and nonvaccinated NORBA mice were collected for histology studies. Thin sections were analyzed by ThT staining to assess the $A\beta$ burden on the pancreas. Fig. 4A shows the fluorescence of thioflavin-stained pancreatic tissue of a 2-month-old $A\beta$ negative animal (3.1) that had been vaccinated 7 weeks after birth. There is diffuse weak background fluorescence, and the acinar cells are dark. By contrast, a ThT-stained pancreas section of 14-month-old animals (4.4, 4.2; Fig. 5A) with fully developed $A\beta$ plaques shows intense fluorescence throughout the acinar cell fields. There were also very bright fluorescent areas suggesting larger blood vessels. Tissues of animals 6.1 and 7.1 show the fluorescence of a ThT-stained section of the pancreas of 9- and 15-month-old mice, with fully developed $A\beta$ plaques 7 months after vaccination. There are some focal (patchy) areas of fluorescence among acinar cells but predominantly many patches of nonfluorescent acinar cells. It appears from these images that the vaccination either had disintegrated $A\beta$ plaques in animals having already developed such plaques or had prevented their

deposition on the pancreas when young transgenic animals were vaccinated before plaque formation.

With individual variations, this is the pattern observed throughout the experiment performed on 19 NORBA mice. Quantitative evaluation of the average fluorescence intensity in each section stained with ThT by using the luminosity analysis software described indicated that pancreas sections from 9- and 15-month-old vaccinated NORBA mice showed less than 50% the fluorescence of unvaccinated animals of similar age (Fig. 5B).

Discussion

The palmitoylated $A\beta_{1-16}$ sequence reconstituted in liposomes containing lipid A and Alum injected i.p. to mice proved to be a strong antigen capable of eliciting a significant immune response. These results extend earlier observations made with the murine multidrug-resistance (MDR)1 sequences (7) by using also palmitoylated peptides reconstituted in liposomes–lipid A.

Antibody titers of 1:5,000–1:10,000 were detected about 12 weeks after the first inoculation and subsequent boostings at 2-week intervals. Schenk *et al.* (12) obtained similar titers of anti- $A\beta_{1-42}$ antibodies over an 11-month period, when the antigen used was the $A\beta_{1-42}$ sequence emulsified with the complete and subsequently incomplete Freund adjuvant. The titers of anti-amyloid antibodies in mice inoculated with the palmitoylated $A\beta_{1-16}$ sequence reconstituted in liposomes/lipid A were measured by ELISA by using $A\beta_{1-42}$ as antigen. The antibodies proved effective in solubilizing *in vitro* $A\beta$ fibers (Fig. 4). As can be seen in Fig. 4A, all sera from immunized mice solubilized $A\beta$ fibers, albeit with different efficacies. Their activity was comparable with that of the most efficient anti-amyloid mAb reported, 6C6 (6). Mouse sera containing irrelevant IgGs had no solubilizing effect on the $A\beta$ fibers *in vitro*. This observation may be significant for the mechanism of action of these antibodies *in vivo*, because the amyloid fibers assembled in solution under the condition described are similar to those found in amyloid plaques (6).

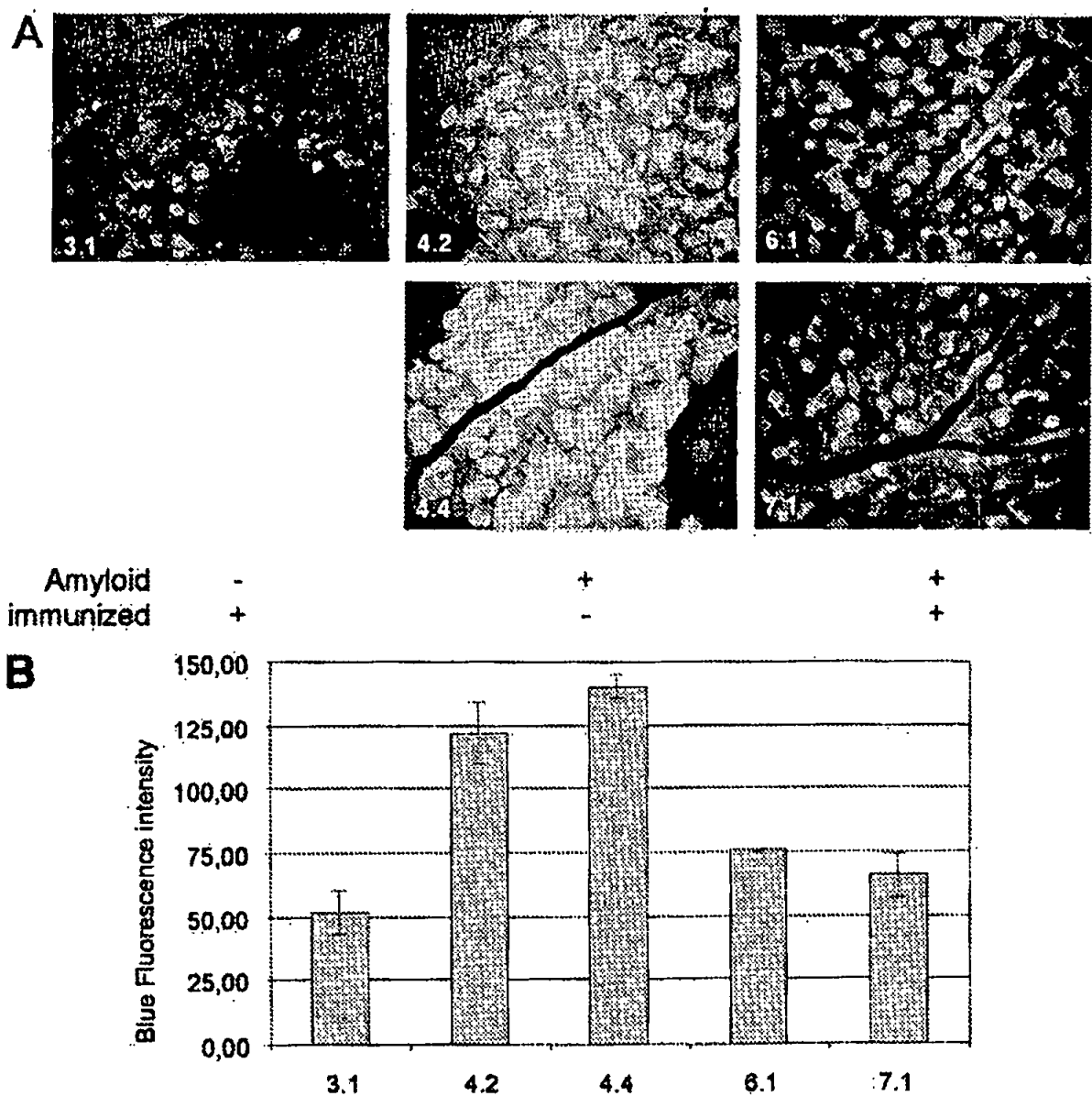


Fig. 5. Histological study and quantitation of A β in thin sections of pancreases from vaccinated and unvaccinated NORBA transgenic mice, stained with ThT. (A) (3.1) 9-month-old mouse vaccinated 7 weeks after birth, without A β plaques; (4.4, 4.2) 14-month-old mice with fully developed A β plaques, unvaccinated; (9- and 15-month-old mice with fully developed A β plaques, vaccinated). (B) Quantitation of fluorescence in images in A. Three sections were used per treatment group, and treatments were unknown to the analyst. Washed sections were stained with a 1% ThT aqueous solution for 3 min. To remove excess fluorochrome from the background, sections were rinsed with water and incubated in 1% acetic acid for 20 min. Sections were washed with water extensively before analysis by fluorescence microscopy. Thin sections stained with ThT were analyzed with a Nikon Labophot Microscope by using a 100-watt mercury source and a Lucifer Yellow Filter Set (Chroma Technology). Images were captured with a Cool Snap Pro Digital Capture Kit (Media Cybernetics) by using a $\times 40$ objective and an exposure time of 600 msec. Images were analyzed with IMAGE PRO PLUS v. 4.1 (Media Cybernetics). A uniform threshold setting of 567,000 pixels per image was maintained for all groups. Measurements included the total area of the fluorescent region and the mean intensity within the region.

Deposition of amyloid plaques was observed in pancreas of transgenic NORBA mice (13). Study of the A β production, accumulation, and recycling in the pancreas of transgenic NORBA mice indicated that A β deposits are formed in four types of pancreatic cells: acinar cells, macrophages infiltrating stroma, epithelial cells of pancreatic ducts, and blood monocytes/macrophages in the lumen of pancreatic cells. All these types of cells produce fibrillar amyloids. Amyloid production in acinar pancreatic cells starts in mice younger than 45 days, progresses in 2- to 7-month-old mice, and plateaus in the second year of life (14).

Schenk *et al.* (12) reported that immunization with A β_{1-42} with complete or/and incomplete Freund adjuvant reduced the

development of AD-like pathology in PDAPP mice. In 18-month-old PDAPP mice, reduction of neuritic plaque burden was between 50 and 60% on vaccination (12), although the burden was relatively low in absolute terms. The pancreas burden in the 16- and 17-month-old NORBA mice was very high (Fig. 4A), so that its reduction by 50% appears to be significant and correlates well with the *in vitro* solubilization of the pre-formed A β_{1-42} fibers by the antisera (Fig. 4A).

Recently, Janus *et al.* (15) and Morgan *et al.* (16) indicated that, by using the Schenk immunization technique (12), reduction of behavioral impairment was observed in transgenic (Tg) CNRD8 mice and of memory loss in Tg 2576 APP Tg mice, confirming the

involvement of A β in memory loss. However, as Morgan *et al.* (16) point out, prevention of memory loss by vaccination occurs in the presence of still substantial A β deposits.

Breaking the immune tolerance to A β by using palmitoylated A β ₁₋₁₆ peptide reconstituted in liposomes appears to be quite efficient, as "therapeutic titers" are obtained rapidly, only 12 weeks after the first inoculation. Moreover, the amount of plaque removal/solubilization is high after immunization with this system: in the 9- and 15-month-old mice, the reduction of plaque burden is $\approx$ 50% compared with controls. Moreover, liposomes of the composition used in this work have been used in for a number of clinical studies (17-19).

An extensive pathology study carried out with the vaccinated mice did not find any autoimmune lesions in lung, kidney, liver, adrenals, and pancreas of the NORBA mice 7 months after vaccination. The absence of the blood-brain barrier hurdle to be crossed by the antibodies to reach the pancreatic plaques in the NORBA mice may reduce the value of our animal model, though.

The mechanism by which the elicited antibodies reduce the plaque burden in all of the transgenic mice used until now is not yet clearly understood. In an *ex vivo* assay, Bard *et al.* (20) showed that antibodies against A β ₁₋₄₂ triggered microglial cells to clear plaques through F γ receptor-mediated phagocytosis and subsequent peptide degradation.

Recently, DeMattos *et al.* (21) showed that a mAb directed against the central domain of A β was able to bind and completely sequester plasma A β . They postulated that the presence of this mAb in the peripheral compartment alters the transport and dynamic equilibrium of A β between brain and plasma, favoring

the peripheral clearing and catabolism instead of deposition within the brain.

Finally, our own *in vitro* data (Fig. 4A) suggest that direct interaction of anti-A β antibodies with A β aggregates induces extensive solubilization of the latter. It appears thus that three mechanisms may be implicated in plaque destruction by anti-A β antibodies: (i) opsonization of the plaques and their subsequent destruction by microglia/macrophages, (ii) alteration of the transport and dynamic equilibrium of A β between brain and plasma, and (iii) direct interaction of the anti-amyloid antibodies with the plaques.

On the basis of available data, it is difficult to select which is the principal mechanism, but all three mechanisms might be involved.

The results described herein suggest a possible therapeutic and a prophylactic role for vaccination with a chemically modified A β fragment reconstituted in liposomes.

We thank Pascal Eberling (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, France) for the solid-phase peptide syntheses, Dr. Vincent Ball (Laboratoire de Spectrométrie de Masse, Université Louis Pasteur, Strasbourg, France) for the electrospray-MS spectra, and Professor Jean-Marie Lehn (for support and laboratory facilities. We thank Dr. D. Schenk (Eli Lilly Pharmaceuticals, South San Francisco, CA) for generously supplying the mAb 6C6. It is a pleasure to thank Prof. J. M. Vetter (Institut de Pathologie, Université Louis Pasteur, Strasbourg, France) for his help with the pathology studies. This work was funded by Grant No. RP 98084 (to C.N.) from the Ministère de l'Éducation Nationale et la Recherche Scientifique, Groupement d'Intérêt Public Hoechst Marion Roussel (Paris).

1. Soto, C. (1999) *Mol. Med. Today* 5, 343-350.
2. Selkoe, D. J. (1995) *Trends Neurochem. Sci.* 16, 403-409.
3. Terry, R. D. (1994) *Prog. Brain Res.* 101, 383-390.
4. Baumeister, R. D. & Eimer, S. (1998) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 37, 2978-2982.
5. Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Esch, P., Lee, M., Dovey, H., Davis, D., Schlossmacher, M., Whaley, J., Swindlehurst, C., *et al.* (1992) *Nature (London)* 359, 325-327.
6. Solomon, B., Koppel, R., Frankel, D. & Hanan-Aharon, E. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 109-112.
7. Tosi, P. F., Radu, D. & Nicolau, C. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212, 494-500.
8. Lapidot, Y., Rappoport, S. & Wolman, Y. (1967) *J. Lipid Res.* 8, 142-145.
9. Lu, G., Mojsov, S., Tam, J. P. & Merrifield, R. B. (1981) *J. Org. Chem.* 46, 3433-3436.
10. Fränkel, D., Katz, O. & Solomon, B. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 11455-11459.
11. Vassar, P. S. & Culling, C. F. A. (1959) *Arch. Pathol.* 68, 487-489.
12. Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T. H. K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Kholodenko, D., Lee, M., *et al.* (1999) *Nature (London)* 400, 173-177.
13. Shoji, M., Kawarabayashi, T., Sato, M., Sasaki, A., Matsubara, E., Iizuka, T., Hagiya, Y. & Hirai, S. (1996) *Gerontology* 42, Suppl. 1, 48-56.
14. Wegiel, J., Wisniewski, H. M., Muzylak, M., Tarnawski, M., Badmajew, E., Nowakowski, J., Wang, K. C., Shoji, M., Mondadori, C. & Giovanni, A. (2000) *Amlyoid* 7, 95-104.
15. Janus, C., Pearson, J., McLaurin, J., Mathews, P. M., Jiang, Y., Schmidt, S. D., Christii, M. A., Horne, P., Heslin, D., French, J., *et al.* (2000) *Nature (London)* 408, 979-982.
16. Morgan, D., Diamond, D. M., Gottschall, P. E., Ugen, K. E., Dickey, C., Hard, J., Duff, K., Jantzen, P., DiCarlo, G., Wilcock, D., *et al.* (2000) *Nature (London)* 408, 982-985.
17. Fries, L. F., Gordon, D. M., Richards, R. L., Egan, J. E., Hollingdale, M. R., Gross, M., Silverman, C. & Alving, C. R. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 358-362.
18. Harris, D. T., Maryas, G. R., Gomella, L. G., Talor, E., Winship, M. D., Spitzer, L. E. & Mastrangelo, M. J. (1999) *Semin. Oncol.* 26, 439-447.
19. Heppner, D. G., Gordon, D. M., Gross, M., Welde, B., Leitner, W., Krzyeh, U., Schneider, I., Wirtz, R. A., Richards, R. L., Trofa, A., *et al.* (1996) *J. Infect. Dis.* 174, 361-366.
20. Bard, F., Cannon, C., Barbour, R., Burke, R. L., Games, D., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., *et al.* (2000) *Nat. Med.* 6, 916-919.
21. DeMattos, R., Bales, K. R., Cumins, D. J., Dobart, J.-C., Paul, S. M. & Holtzman, D. M. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 8850-8855.

β -Amyloid Immunization Approaches for Alzheimer's Disease

Bruno P. Imbimbo*

Research & Development Department, Chiesi Farmaceutici, Parma, Italy

Strategy, Management and Health Policy				
Venture Capital Enabling Technology	Preclinical Research	Preclinical Development Toxicology, Formulation Drug Delivery, Pharmacokinetics	Clinical Development Phases I-III Regulatory, Quality, Manufacturing	Postmarketing Phase IV

ABSTRACT Alzheimer's disease (AD) represents the third leading cause of death in the U.S. and the leading cause of dementia in the elderly population. Until recently, there was little hope of efficiently combating this devastating disease. The deposition of β -amyloid (A β) is the major pathological hallmark of AD brains. Genetic, biochemical, and pharmacological evidence support the hypothesis that A β plays a key role in the development of the disease. Thus, in the last 5 years a number of pharmacological strategies have been developed to interfere with the A β cascade. The most revolutionary of these approaches was proposed in 1999 by scientists at Elan Pharmaceuticals, which immunized against A β transgenic mice with spontaneously developing A β pathology. The immunization was achieved by subcutaneous injections of a preaggregated form of the synthetic human 42-amino acid A β emulsified with Freund's adjuvant, an immune stimulant. The vaccination caused a near complete inhibition of A β plaque formation in younger animals and a marked reduction of the A β burden in older animals. The effects on A β plaques were accompanied by a reduction of A β -associated astrogliosis and neuritic dystrophy. These results were later confirmed by other groups with similar vaccination protocols, which also demonstrated that the A β immunization of transgenic animals normalize or reduce the cognitive impairment associated with A β pathology. Interestingly, effective removal of brain A β plaques was also obtained by peripherally administering A β antibodies. The mechanism with which the vaccine increases A β clearance is not fully understood. Centrally, the vaccine appears to activate A β phagocytosis by microglial monocytes. Peripherally, serum A β antibodies bind and sequester A β , thus altering its equilibrium between CNS and plasma. The dramatic results obtained in animal models of AD raised unprecedented hopes for both a preventive and a curative intervention for this devastating disorder. A vaccine preparation for human use (AN-1792) composed of preaggregated human A β 42 peptide and a highly purified saponin derivative (QS-21) was developed by Elan Pharmaceuticals and Wyeth Ayerst and tested in AD patients. Unfortunately, a Phase IIa study aimed at evaluating the safety and immunological activity of AN-1792 in 360 AD patients was discontinued because 15 subjects receiving the vaccine developed serious signs of CNS inflammation. Both central activation of cytotoxic T cells and autoimmune reactions were proposed as potential mechanisms of toxicity. Other therapeutic A β vaccination strategies are being pursued, including immunoconjugates and monoclonal antibodies. The future of these and other A β immunization approaches depend on a clear understanding of the mechanism of A β clearance and additional insight into the role of inflammation in the AD brain. Drug Dev. Res. 56:150-162, 2002. © 2002 Wiley-Liss, Inc.

Key words: Alzheimer's disease; β -amyloid; immunization; vaccination; AN-1792

INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is a growing health problem in developed countries. In 1999, this disorder accounted for approximately 170,000 deaths in the United States, placing it in third place (7.1% of total

*Correspondence to: Bruno P. Imbimbo, Research & Development Department, Chiesi Farmaceutici, Via Palermo 26/A, 43100 Parma, Italy.

E-mail: b.imbimbo@chiesigroup.com

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.com)
DOI:10.1002/ddr.10070

deaths) as cause of death [Ewbank, 1999]. The yearly cost of AD in the United States is estimated to be \$100 billion [Schumock, 1998]. The cost of treating each patient is estimated to be \$195,000, with a significant amount of this cost being attributed to loss of productivity of the patient and caregiver and to costs sustained by the family. The average annual cost for the care of patients with mild, moderate, or severe forms of the disorder are approximately \$19,000, \$31,000, and \$37,000, respectively. The availability of drugs capable of slowing the development of the disease lead to an estimated yearly savings of approximately \$25,000 per patient in medical assistance costs alone [Leon et al., 1998].

From an anatomic point of view, AD is characterized by an atrophy of the cerebral cortex and by a massive loss of cortical neurons and cholinergic projections made by the nucleus basalis towards the cortex. From a histopathologic point of view, there is a diffuse presence of extracellular and perivascular neuritic plaques and intracellular neurofibrillary tangles in the cerebral parenchyma.

The consistent loss of cholinergic markers (choline acetyltransferase, acetylcholinesterase, and pre-synaptic muscarinic receptors) in the AD brain has prompted the development of acetylcholinesterase inhibitors with the aim of increasing acetylcholine levels in the brain. This approach has been consistently shown to produce symptomatic effects but has not had a significant impact on the natural history of the disorder [Davies, 1999]. For this reason, in recent years research has focused on understanding the mechanism behind the formation of the characteristic lesions found in the brain of AD patients: neuritic plaques and neurofibrillary tangles.

β -AMYLOID HYPOTHESIS OF ALZHEIMER'S DISEASE

Neuritic plaques are composed mainly of aggregates of a protein with 39–43 amino acid residues known as β -amyloid (A β). The A β protein is a metabolic product of a complex transmembrane glycoprotein known as amyloid precursor protein (APP). The initial step of the metabolic pathway of APP involves the α -secretase enzyme that cleaves out APP within the A β sequence, allowing for the release of its transmembrane fragment. This metabolic pathway is not amyloidogenic because it precludes the formation of A β and leads to the release of APP α , which appears to exert neuroprotective activity. The amyloidogenic metabolic pathway, that leads to the formation of A β , is due to the enzyme β -secretase that releases APP β plus a 12-kDa protein fragment, which in turn is cleaved by the γ -secretase enzyme giving way to soluble A β .

There are several variants of the A β protein, derived by proteolytic cleavage from APP, that differ

only in terms of the C-terminal domain: A β 39, A β 40, A β 42, and A β 43. The 40 and 42 amino acid forms are found predominantly in the extracellular neuritic plaques, while the 39-residue peptide is the predominant component found in cerebrovascular deposits. The primary structure of the peptide is characterized by the presence of some hydrophobic amino acids. Its secondary structure may assume both an α -helical and β -sheet conformation. Although the two secondary structures are approximately isoenergetic, in AD patients the protein adopts preferentially the β -sheet conformation, which is highly insoluble [Soto et al., 1994]. The tertiary structure of the A β protein includes two β -sheet monomers linked by hydrogen bonds. The deposition of A β aggregates is thus highly correlated with its secondary β -sheet structure [Soto et al., 1995]. The fibrillogenesis of the A β protein involves a two-stage polymerization process: an initial "nucleation" process followed by "polymer elongation" that gives origin to the protofibrils [Jarrett et al., 1993]. The alignment of the protofibrils generates the A β fibrils.

The correlation among A β histopathologic lesions, brain cell death, and cognitive deficiency in AD represents the so-called A β hypothesis of the disease. Much important evidence sustains this hypothesis: 1) Autopsies performed on the brain of AD patients consistently reveal A β deposits [McKhann et al., 1984]. 2) All of the dominating autosomic mutations associated with the familial early-onset forms of AD are characterized by an overproduction of A β 42 [Citron et al., 1992, 1997; Scheuner et al., 1996; Suzuki et al., 1994; Borchelt et al., 1996]. 3) The formation of A β plaques precedes the symptoms of the disease [Lippa et al., 1998] and correlates with the cognitive deficit of AD patients [Naslund et al., 2000]. 4) The clearance of A β 42 in the brain of patients appears to be reduced compared to controls [Motter et al., 1995].

An important advance in the research of AD was the development of transgenic mice carrying one or more familial mutations of APP [Games et al., 1995; Hsiao et al., 1996], for presenilin 1 [Duff et al., 1996], or for presenilin 2 [Oyama et al., 1998] or for both APP and presenilin 1 [Holcomb et al., 1998]. These transgenic animals overproduce A β and present diffuse A β deposits in the brain. The extent of A β deposits in the brain, neuritic dystrophy, and synapse loss observed in these animal models was of the same order as that observed in patients with AD. In addition, these transgenic animals show specific deficits in memory and learning [Chen et al., 2000]. Thus, these animals are extremely useful in testing new therapeutic approaches that could potentially modify the natural history of the disorder.

Currently, several therapeutic approaches are being developed based on the amyloid hypothesis of AD. One of these includes selective β -secretase [Chosh et al., 2001; Tung et al., 2002] or γ -secretase [Wolfe, 2001] inhibitors that block the metabolic generation of the A β peptide and thus the formation of A β plaques. Another approach involves the inhibition of A β aggregates with products that modify the secondary structure of the protein or that bind to specific regions of the protein itself [Dumery et al., 2001]. However, the most revolutionary approach is based on A β immunization that leads to an increase in the A β clearance from brain. This review describes the current approaches based on A β immunization.

VACCINES AS EMERGING THERAPEUTICS

The reputation of vaccination rests on a 200-year-old history of success against major infectious diseases. That success has led to the doctrine of "for each disease, a vaccine." Most successes have been obtained with prophylactic vaccines against a number of pathogenic microorganisms. These vaccines generally work when the microbe has a replicating phase during which it is susceptible to the action of neutralizing antibodies. When bacteria produce disease through exotoxins, purification and chemical or genetic inactivation of those toxins yield highly efficacious vaccines. Two achievements have been crucial to the success of vaccines: the induction of long-lasting immunological memory in individuals, and the stimulation of a herd immunity that enhances control of infectious diseases in populations.

Unlike prophylactic vaccines, which are given to healthy children and adults to prevent infectious diseases, therapeutic vaccines are of potential use in chronic diseases such as cancer, cardiovascular disorders, and neurodegenerative diseases, where efficacy or available therapies are poor. The recent advances in the fields of immunology and molecular biology have had an enormous impact on the identification of candidate therapeutic vaccines. Increased knowledge of the immune system has helped to define the mechanisms that underlie successful immunization and is now being exploited to develop improved versions of existing vaccines and new vaccines against emerging pathogens, tumors, or autoimmune diseases. An understanding of the mechanisms of action of novel immune adjuvants and the development of new vector and delivery systems will have a major impact on vaccine strategies. The use of DNA encoding antigens from pathogenic viruses, bacteria, and parasites as vaccines is a new approach that is receiving considerable attention [Ada, 2001].

The new generation of therapeutic vaccines, based on in-depth knowledge of pathologic mechanisms or genetics, holds out the promise of targeted and specific therapies. Therapeutic vaccines in development can be broadly divided into three types: 1) vaccines that boost a patient's normal immune response, overcoming pathogenic microorganisms or abnormal cellular processes; 2) vaccines that down-regulate an abnormal immune response in allergies, rheumatoid arthritis, and diabetes, for example; and 3) vaccines that induce an immune response to a specific endogenous mediator of disease, such as in atherosclerosis, hypertension, or AD. They include whole-cell, tumor-antigen, anti-idiotypic, dendritic cell-based, DNA, and live viral-vector vaccines. Two new generation vaccines have recently been launched for treatment of melanoma (M-Vax[®] and Melacine[®]). Other therapeutic vaccines are under clinical development for cancer, peptic ulcer, diabetes, hypertension, allergy and asthma, autoimmune disease, cardiovascular disease, infections, and neurodegeneration. Indeed, the development of novel therapeutic vaccines is expected to give physicians a new arsenal of products for chronic diseases.

THE ELAN VACCINE

The idea of eliciting an immune response to exogenous administered A β peptide in humans was originally described in a 1990 US patent by a physician and an experimental immunologist [Kline and McMichael, 1991]. They proposed to parenterally administer low amounts (up to 10 μ g/day) of A β peptide to slow the development of amyloid plaques. They described three AD patients who were treated for 3–5 months and showed dramatic improvements on "objective tests." Much later, in 1997, Schenk and colleagues at Athena Neurosciences (later acquired by Elan Pharmaceuticals) protected the same idea but proposed higher doses and the use of immune adjuvants [Schenk, 1998]. In this patent the inventors did not describe studies in humans but provided huge amounts of data from animal experiments, including histological results in transgenic mice. Part of these data were later reported in a famous article published in *Nature* in 1999 [Schenk et al., 1999]. In this pioneering work, Schenk et al. demonstrated that immunization with human synthetic A β 42 in transgenic mice (PDAPP) harboring a mutant version of human APP₇₇₀ (V717F) produced high serum antibody titers against A β 42 (1:10,000) and inhibited the formation of amyloid plaques and associated histopathologic lesions. The A β 42 peptide was used in a preaggregated form obtained after an overnight incubation at 37°C. Doses of 100 μ g of the peptide were emulsified with complete

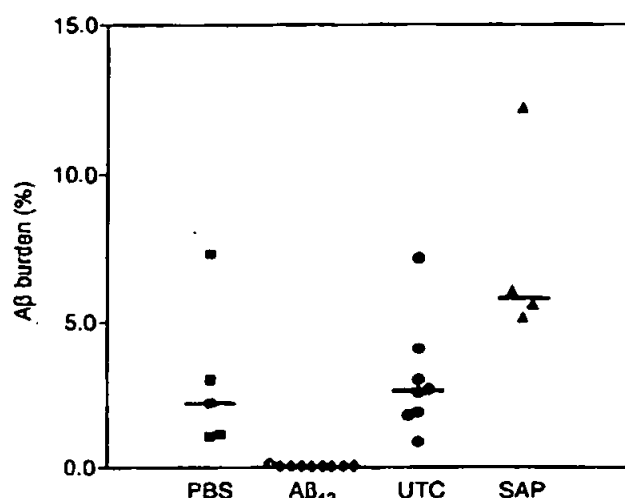


Fig. 1. Hippocampal β -amyloid burden in transgenic mice of 13 months of age and immunized at 6 weeks. PBS = phosphate-buffered saline, $A\beta_{42}$ = β -amyloid1-42, UTC = untreated controls, SAP = serum amyloid-P. Symbols indicate individual values while horizontal lines represent the median values.

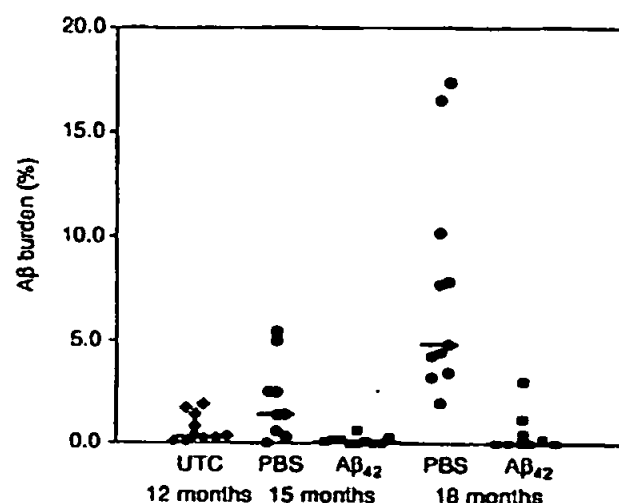


Fig. 2. Cortical β -amyloid burden in transgenic mice immunized at 11 months. UTC = untreated controls, $A\beta_{42}$ = β -amyloid1-42, PBS = phosphate-buffered saline. Symbols indicate individual values while horizontal lines represent the median values.

Freund's adjuvant for the first immunization, followed by a boost in incomplete Freund's adjuvant at 2 weeks and monthly thereafter. The immunization of young animals started at 6 weeks of age and resulted in the almost total absence of $A\beta$ deposits at 13 months of age (Fig. 1), with a significant inhibition of neuritic dystrophy (a marker of neuronal dysfunction) and of astrogliosis (a marker of cerebral inflammation). The immunization of aged animals that had already developed $A\beta$ plaques started at 11 months of age and prevented additional histopathologic lesions and even led to their partial regression at 15 or 18 months of age (Fig. 2). The residual amyloid plaques were actively metabolized by microglia cells, suggesting that the immunization may, in addition to preventing the deposit of new amyloid, lead to the elimination of already existing deposits.

These initial findings were confirmed by scientists at the Harvard Medical School [Weiner et al., 2000] who treated PDAPP mice between the ages of 5 and 12 months with human $A\beta_{40}$ synthetic peptide intranasally each week. They found significant decreases in the cerebral $A\beta$ plaque burden (-60%) and $A\beta_{42}$ levels (-52%) in mice immunized with $A\beta_{40}$ vs. controls treated with myelin basic protein or left untreated. This lower $A\beta$ burden was associated with decreased local microglial and astrocytic activation, decreased neuritic dystrophy, serum anti- $A\beta$ antibodies of the IgG1 and IgG2b classes, and mononuclear cells in the brain expressing the antiinflammatory cytokines interleukin-4, interleukin-10, and tumor growth factor- β .

Other groups, more importantly, demonstrated that the $A\beta$ immunization produced cognitive and behavioral effects in transgenic animals. A first group from the University of Toronto [Janus et al., 2000] used a transgenic mouse (TgCRND8) expressing a human APP₆₉₅ with a double mutation (K670N/M671L and V717F). These transgenic mice develop spatial learning deficits at 3 months of age (Fig. 3) that are accompanied by both increasing levels of soluble $A\beta$ and increasing numbers of $A\beta$ -containing amyloid plaques in the brain. The $A\beta$ immunization started at 6 weeks of age. Animals were tested repeatedly from 11–23 weeks of age. Vaccination reduced cognitive dysfunction at all time points (Fig. 3). $A\beta$ immunization also reduced deposition of cerebral fibrillar $A\beta$ without, however, altering total levels of $A\beta$ in the brain.

A second group, from the University of South Florida [Morgan et al., 2000], used double transgenic mice carrying both human APP₆₉₅ (K670N/M671L) and presenilin 1 (M146L) mutations. These mice develop learning deficits as amyloid accumulates. Vaccination with $A\beta$ started at 7.5 months of age. At 15.5 months of age transgenic mice developed memory deficits while $A\beta$ -vaccinated transgenic mice showed cognitive performance similar to normal nontransgenic mice (Fig. 4). A strong correlation was found between radial arm water maze task performance and the extent of compact $A\beta$ deposition in both the hippocampus and the frontal cortex of vaccinated transgenic mice. However, no beneficial behavioral effects of $A\beta$ vaccination were evident in several other tasks, either

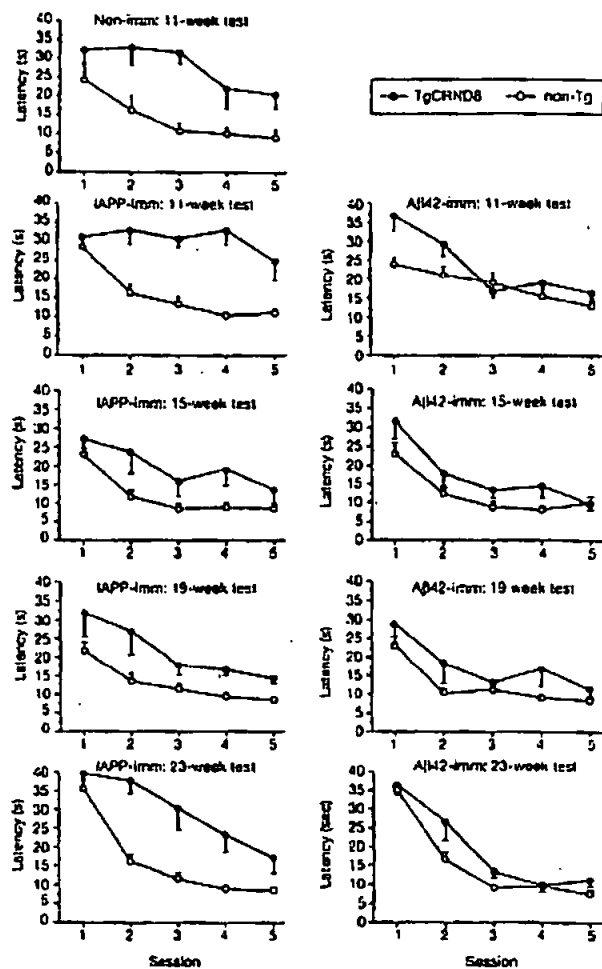


Fig. 3. Spatial-reference memory in nontransgenic (open circles) and in transgenic (closed circles) mice nonimmunized (upper panel) or immunized with β -amyloid1-42 (right panels) or islet-associated polypeptide (IAP) (left panels) and tested at 11, 15, 19, and 23 weeks of age. Immunizations started at 6 weeks of age. Vertical bars represent standard error of means.

because task impairment was present in transgenic mice prior to onset of vaccination (e.g., balance beam) or because transgenic mice exhibited no task impairment (e.g., Y-maze, open field, string agility). Thus, the behavioral protection of long-term $A\beta$ vaccinations is task-specific, with preservation of hippocampal-associated working memory tasks [Arendash et al., 2001]. Since AD patients exhibit early short-term memory deficits, presymptomatic $A\beta$ vaccination could protect them against the development of such cognitive impairments.

The histopathological and cognitive efficacy of $A\beta$ immunization depends on a number of factors, such as

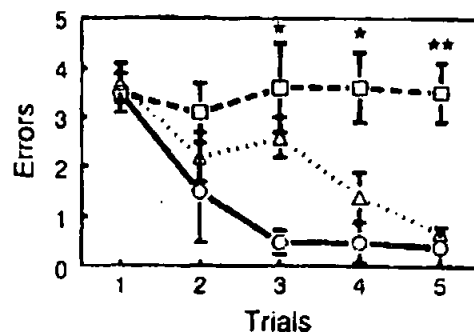


Fig. 4. Episodic-like memory in nontransgenic (circles) and in transgenic mice 15.5 months of age and immunized with β -amyloid1-42 (triangles) or keyhole limpet hemocyanin (squares) at 7.5 months.

the type and age of transgenic animals, $A\beta$ burden, number of $A\beta$ inoculations, route of administration, and type of pharmaceutical dosage form. For example, the Tg2576 transgenic mice show lower response to $A\beta$ vaccination than the PDAPP mice. Tg2576 animals carry a human APP_{695} with the double Swedish mutation (K670N/M671L), while PDAPP mice bear a human APP_{770} with the single London mutation (V717F). The $A\beta$ immunization of Tg2576 mice is effective in reducing amyloid burden in young mice but does not significantly alter amyloid burden in older animals [Das et al., 2001]. The efficacy of $A\beta$ immunization depends also on the amount of preexisting $A\beta$ deposits. Immunization of Tg2576 mice with modest amounts of $A\beta$ loads significantly reduces $A\beta_{42}$ without altering $A\beta_{40}$. In contrast, transgenic mice with significant preexisting $A\beta$ deposits, $A\beta$ immunization only minimally decreased $A\beta_{42}$ levels and has no effect on $A\beta_{40}$ levels. Thus, contrary to what is observed in PDAPP mice, $A\beta$ immunization of Tg2576 mice appears to be more effective in reducing $A\beta_{42}$ than $A\beta_{40}$ [Das et al., 2001]. The number of $A\beta$ administrations influences the effects of vaccination with $A\beta$ antibody titer increasing up to nine inoculations and reaching similar levels in transgenic and nontransgenic animals [Wilcock et al., 2001]. It has also been shown that $A\beta_{42}$ vaccination elicits significantly higher antibody responses by intraperitoneal route in comparison to the subcutaneous route. Finally, $A\beta_{42}$ peptide encapsulated in poly(lactide-co-glycolide) microspheres increases the humoral response [Brayden et al., 2001].

In December 1999, Elan's vaccine underwent clinical development. The human form of the vaccine, called AN-1792 (Betabloc[®]), included a synthetic human $A\beta_{42}$ peptide and an immune adjuvant, a

highly purified saponin derivative (QS-21) [Kensil et al., 1998]. The initial Phase Ia study was carried out in the US and evaluated the safety and tolerability of three single escalating doses of AN-1792 with a fixed adjuvant dose in AD patients. The study included eight patients per dose level with 6 weeks between dose escalations. In March 2000, a Phase Ib study started in the UK evaluated the safety and tolerability of multiple escalating doses of AN-1791 with different adjuvant doses in AD patients. The study included 15–20 patients per dose level with 2–3 month intervals for at least three doses. In these Phase I studies AN-1792 appeared to be well tolerated at the dose regimens studied. A portion of patients (25%) developed measurable anti-A β antibody titers in serum [Thattai, 2001]. In August 2001, a Phase IIa study was started in four European and 11 US sites. This double-blind placebo-controlled study involved 360 patients and was designed to measure the immune response to AN-1792 in patients with mild to moderate AD. Measures of memory, cognition, magnetic resonance imaging, and AD biomarkers were included in the study. Unfortunately, in February 2002 it was announced that 15 patients that received the vaccine developed encephalitis with signs and symptoms of CNS inflammation including fever, headache, vomiting, altered consciousness, muscle weakness, and seizures. In some patients an unspecified virus was detected in cerebrospinal fluid. These adverse events led to trial interruption and discontinuation of the vaccine. However, Elan Corporation announced that additional compounds were under advanced preclinical development and they believed that these alternative therapeutic candidates could result in an effective and safe treatment for AD.

MECHANISM OF ACTION OF β -AMYLOID IMMUNIZATION

The mechanism of action with which A β immunization determines the inhibition of the formation of A β plaques and a reduction of already-formed amyloid lesions is not fully understood. There are two major hypotheses explaining the increase of A β clearance caused by vaccination. Centrally, the vaccine activates A β phagocytosis by microglial monocytes. Peripherally, serum anti-A β antibodies appear to bind and sequester A β , thus altering its equilibrium between CNS and plasma.

More specifically, Elan scientists reported that peripheral administration of both a polyclonal immunoglobulin fraction and monoclonal antibodies (3D6 and 10D5) against A β in PDAPP transgenic mice was able to significantly reduce amyloid burden [Bard et al., 2000]. Although a minimal portion (0.1%) of the peripherally administered antibodies were able to

enter the CNS, this was sufficient to decorate plaques and induce clearance of preexisting amyloid. When examined in an *ex vivo* assay with sections of PDAPP or AD brain tissue, antibodies against A β peptide triggered microglial cells to clear plaques through Fc receptor-mediated phagocytosis and subsequent peptide degradation [Bard et al., 2000]. These results indicate that antibodies can cross the blood–brain barrier to act directly in the CNS and open a further therapeutic approach (passive immunization). Other *in vivo* studies proved that anti-A β antibodies are directly responsible for A β plaque clearance. A single direct application of the monoclonal antibody 10D5 to the cortex of transgenic PDAPP mice revealed a remarkable clearance of A β deposits within 3 days, as evidenced by multiphoton microscopy [Bacskai et al., 2001]. Other groups indirectly confirmed the hypothesis of Elan's scientists. They found an increase in CD45 expression, an indicator of microglial activation, in A β -immunized transgenic animals and a proportional decrease in the amount of compact A β plaques. Thus, they supported the hypothesis that microglia activation plays a role in the clearance of compact plaques [Wilcock et al., 2001].

The other hypothesis on the mechanism of action of A β immunization suggests that anti-A β antibodies in plasma create a peripheral sink that sequesters A β , enhancing efflux of A β from the brain. This in turn determines a decrease of free A β levels in the brain and a dissolution of preexisting A β fibrils [DeMattos et al., 2001]. Another group using surface-enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry found that, after 8 months of treatment, an increase in soluble A β 40 in brain and a decrease in A β peptides in serum of immunized animals compared with control transgenic animals. They hypothesized that in immunized animals anti-A β antibodies in the periphery sequester A β peptides, determining an enhanced A β clearance from the brain [Vehmas et al., 2001].

Peptide binding competition studies indicated that the highest humoral responses to A β immunization are generated against the N terminus of the A β peptide between amino acids 1 and 16 [Dickey et al., 2001]. Analysis of anti-A β antibody IgG isotypes reveals that the majority of these antibodies are IgG1, suggesting a T-lymphocyte helper type II cell immune response after A β 42 immunization. Lymphocyte proliferation assay experiments using A β peptides and splenocytes from vaccinated mice demonstrated that the vaccine specifically stimulates T-cell epitopes present within the A β peptide [Dickey et al., 2001; Town et al., 2001]. On the other hand, animals receiving exogenous antibodies against A β did not demonstrate a T-cell proliferative response to A β when their splenocytes

were examined in vitro, indicating that a T-cell response is not required for amyloid plaque clearance [Bard et al., 2000].

OTHER IMMUNIZATION APPROACHES

Immunization approaches other than that of Elan Pharmaceuticals are being pursued in order to stimulate clearance of brain A β plaques. They include both active and passive immunization techniques. Active immunization approaches comprise minor variations (route of administration, type of adjuvants, etc.) of the original Elan vaccine, the use modified A β fractions (epitopes), and immunogenic A β conjugates (fusion proteins). Passive immunization approaches include monoclonal antibodies or specific antibody fractions (Fabs) directed against A β or against specific A β epitopes. These approaches are briefly reviewed below based on the institution or company that originated them.

The Harvard Medical School Vaccine

It is well known that mucosal administration of antigens can induce immune responses in mucosal lymphoid tissue which then act systemically. Scientists at the Harvard Medical School hypothesized that chronic mucosal administration of A β peptide might induce an antiinflammatory process in AD brain tissue that could beneficially affect the neuropathological lesions [Weiner et al., 2000]. To test this hypothesis, they treated PDAPP mice from 5–12 months of age with human A β 40 intranasally each week. In mice receiving the 25 μ g dose, there was a 60% decrease in hippocampal A β plaque burden compared to a control group receiving no treatment or myelin basic protein. This was accompanied by a 52% decrease in brain A β 42 levels. This lower A β burden was associated with decreased local microglial and astrocytic activation, decreased neuritic dystrophy, and the development of serum anti-A β antibodies (IgG1 and IgG2b classes). Few mononuclear cells in the brain expressing the antiinflammatory cytokines (interleukin-4, interleukin-10, and tumor growth factor- β) were also detected. Further studies employing a modified *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT-R192G) as mucosal adjuvant showed a dramatic increase in A β antibody titers [Lemere 2002]. Antibodies were primarily directed towards the N-terminal 15 amino acids of A β . Preliminary experiments in the double PS/APP transgenic mice of 5 weeks of age were carried out using a combined dose regimen approach. Animals received an initial intraperitoneal injection of a mixture of synthetic A β 40 and A β 42 plus complete Freund adjuvant followed by intranasal administrations of A β peptides plus LT-R192G twice weekly for 8 weeks. A β -

immunized animals showed a 75% decrease in plaque number and 58% decrease in brain A β 42 compared to controls. A corresponding decrease in gliosis and neuritic dystrophy was also observed. Animals treated with LT-R192G alone showed no abnormal brain pathology, indicating the lack of overt inflammation due to treatment with the mucosal adjuvant. Histological examinations of kidney, spleen, and snout were normal. Serum total A β concentrations in immunized animals were 33-fold higher than those of controls. Most serum A β in immunized animals was complexed to antibodies.

These results demonstrate that chronic nasal administration of A β prevents cerebral A β deposition in transgenic mice through the induction of an immune response rather than via a mucosal lymphoid tissue-mediated antiinflammatory mechanism. The intranasal route represents an alternative method of A β vaccination in AD.

The New York University Vaccine

The group headed by Thomas Wisniewski at New York University School of Medicine believes that A β 42 immunization in humans may be unsafe because this peptide may cross the blood–brain barrier and form toxic fibrils. In addition, administration of human A β 42 in AD patients may induce autoimmunity reactions. In order to reduce these risks, this group developed antigens displaying peptide sequences homologous to A β and devoid of fibrillogenic properties. In particular, they prepared peptides by adding poly-lysine (K6) or poly-aspartate (D6) to the N- or C-terminus of A β . The rationale is that these amino acid sequences may enhance immunogenicity, increase solubility of A β peptide, and decrease its tendency to assume β -sheet conformation. One of these peptide homologs, K6-A β 1-30, contains the first 30 amino acid residues of A β with six lysine residues at the N-terminus. K6-A β 1-30 does not generate fibrils on incubation for 2 weeks and does not display toxicity in neuronal cell cultures [Sigurdsson et al., 2001]. Immunization of 10-month-old Tg2576 transgenic mice with K6-A β 1-30 produced significant antibody titers specific to the first 16 residues of A β . Complete Freund's adjuvant was used for the first injection, incomplete Freund's adjuvant for the following three injections, and phosphate-buffered saline from the fifth injection forward. After 7 months of immunization the 18-month-old mice showed an 89% and 81% reduction in cortical and hippocampal brain amyloid burden, respectively [Sigurdsson et al., 2001]. Brain levels of soluble A β 42 were reduced by 57%. Activated microglia associated with the A β plaques were absent in the immunized mice, indicating reduced inflammation in these animals. These

promising findings suggest that immunization with soluble nonfibrillogenic A β derivatives represent an alternative to preaggregated A β 42 preparations. Preliminary behavioral studies in transgenic animals appear to support the potential of this approach [Sigurdsson et al., 2002].

The Northwestern University Vaccine

Although A β fibrils are toxic in neuronal cell cultures, in AD brain they often form at a distance from sites of neuronal loss and correlate poorly with disease progression. Small oligomers and protofibrils, referred to as A β -derived diffusible ligands, also have potent neurotoxic activity [Lambert et al., 1998]. They have been shown to inhibit hippocampal long-term potentiation, a cellular model of memory, and are believed to initiate the neurodegenerative cascades of AD [Wang et al., 2002]. Since A β 42 vaccination of PS1/APP mice significantly protects animals from cognitive deficits but does not significantly decrease brain amyloid plaque burden [Morgan et al., 2001], it has been suggested that A β immunization may work by neutralizing soluble, nonfibrillar forms of A β . Thus, immunoneutralization of soluble A β -derived toxins has been thought to be a logical optimization of AD vaccination strategies [Klein et al., 2001]. Scientists at Northwestern University in Evanston have developed a vaccine against A β 42 oligomers [Lambert et al., 2001]. Rabbits were injected with A β 42 solutions containing only monomers and oligomers. Animals produced antibodies that preferentially bound to assembled forms of A β . The antibodies were found to neutralize the toxicity of soluble oligomers in cell cultures. These results support the development of passive immunization techniques of AD patients with specific antibodies raised against A β oligomers.

The Pasteur University Vaccine

Scientists at Pasteur University started their work based on the knowledge that monoclonal antibodies, raised against the sequence A β 1–16 of the amyloid protein, are able to dissolve in vitro A β 42 fibrils [Solomon et al., 1997]. They also noted that palmitoylation of specific peptide sequences of an antigen may elicit a strong immune response against the entire protein [Tosi et al., 1995]. Thus, they synthesized a derivative of the A β 1–16 peptide sequence by covalently attaching two palmitoyl residues at each end of the peptide and subsequently reconstituted it in liposomes-lipid A [Nicolau et al., 2002]. Animal studies were carried out with a model of peripheral amyloidosis employing transgenic mice (NORBA) that overexpress APP and develop amyloid plaque deposits on

their pancreas. Vaccination of animals with the bipalmitoylated derivative of A β 1–16 elicited strong antibodies titers within 10 weeks after the first inoculation. Sera containing these antibodies were able to dissolve in vitro up to 80% of preformed A β 42 aggregates. Control NORBA mice developed A β plaques in pancreas at 6–8 weeks of age. Vaccinated 8-week-old NORBA mice did not develop amyloid plaques on their pancreases over a period of 7 months. Pancreases of 9- and 15-month-old vaccinated NORBA mice showed less than 50% of A β 42 aggregates compared to control animals of the same age. Extensive histologic examinations carried out on vaccinated mice did not find any autoimmune lesions in lungs, kidney, liver, adrenals, and pancreas 7 months after vaccination. These results indicate that the bipalmitoylated A β 1–16 derivative, reconstituted in liposomes-lipid A, is highly immunogenic, elicits therapeutic antibody titers within 3 months of the first inoculation, prevents amyloid plaque formation in young animals, and significantly reduces existing plaques in older transgenic mice. The palmytoil derivative of A β raises a further possible vaccination strategy for the therapy of AD.

The Tel-Aviv University Vaccine

In 1997, Solomon and colleagues at Tel-Aviv University reported that antibodies raised against the N-terminal region of the A β peptide bind to preformed A β fibrils, leading to their disaggregation and inhibition of their neurotoxic activity [Solomon et al., 1997]. Later, using a phage-peptide library composed of filamentous phage displaying random combinatorial peptides, they identified the 3–6 amino acid sequence of N-terminal of A β (Glu-Phe-Arg-His or EFRH) as the epitope of these anti-aggregating antibodies [Frenkel et al., 1998]. Locking of this epitope by highly specific antibodies prevents A β self-aggregation and enables resolubilization of already-formed aggregates. Based on these observations, they developed an immunization procedure for the production of effective anti-aggregating A β antibodies based on filamentous phages displaying on their surface the EFRH peptide as antigen. Effective autoimmune antibodies were obtained by EFRH phage administration in guinea pigs, which exhibit A β identical to the human A β . No adjuvant was used [Frenkel et al., 2000]. Highly specific antibodies (IgG) against A β were detected after four subcutaneous injections with titers up to 1:5,000. No toxic effects caused by autoimmune response were detected at histology of liver, kidney, spleen, and lung. Antigen presence was detected 2 months after the last phage administration. Sera of EFRH-phage immunized animals exhibited a

protective effect in preventing A β -mediated neurotoxicity toward PC12 cell culture [Frenkel and Solomon, 2001]. These data suggest that immunization with EFHH-phage may represent a potential therapeutic approach for the reduction of amyloid burden in AD. Preliminary experiments in transgenic animals seem to support the immunogenetic studies [Solomon, 2002].

The Praecis Pharmaceuticals Vaccine

Praecis Pharmaceuticals is developing small peptidic ligands with subnanomolar affinity for A β as inhibitors of A β polymerization and fibril formation [Findeis et al., 2001]. Using natural peptide ligands that bind to A β plaques, they have created fusion proteins between these ligands and sequences from proteins of the immune system. These fusion proteins bind to A β plaques with high specificity and affinity. Studies in transgenic mice are ongoing to determine whether these fusion proteins are able to remove A β plaques.

The Neurochem Vaccine

In 1997, a toxin produced by *E. coli* was found to be cytotoxic to Vero cells. This toxin (verotoxin) was subsequently found to be an important virulence factor of the microorganism. Recombinant verotoxin consists of two subunit molecules, A and B. The B subunit is responsible for the cell-specific targeting and the A subunit accomplishes the selective killing of cells. Recombinant fusion proteins that link the nontoxic B subunit of verotoxin with specific A β peptide sequences are being developed by Neurochem as strong A β antigens. These fusion proteins should target A β antigens directly to dendritic cells, the cells of the immune system which direct and control antibody production and cellular immunity.

The Chiesi Vaccine

Heat shock proteins (Hsp) are released by cells in response to thermal shock and other types of injury (hypoxemia, chemical, etc.). Hsp are classified in four main categories based on their molecular weight: Hsp90 (90 kDa), Hsp70 (70 kDa), Hsp60 (60 kDa), and small Hsp (<20 kDa). The physiological role of Hsp is complex. Hsp act as an intracellular chaperone to proteins, facilitating the transfer among different compartments and modifying the secondary and tertiary structure [Beckmann et al., 1990]. An important humoral and cellular immunogenic role has also been attributed to Hsp [Mizzen, 1998]. Interestingly, an increase in Hsp expression, especially Hsp 70, has been observed in AD brain in response to β -amyloid and τ hyperphosphorylation toxicity [Perez et al., 1991; Johnson et al., 1993; Yoo et al., 1999]. It has also

been shown that the Hsp 27 expression increases in degenerative astrocytes in brain areas rich in senile plaques during the inflammatory process [Renkawek et al., 1994].

In an attempt to increase the immune response to A β , Chiesi Farmaceutici is developing fusion proteins formed by the covalent bonding of A β peptide or its fragments and Hsp of various molecular weights [Ghirardi et al., 2001]. These fusion proteins are able to induce a strong A β immune response without the need of adjuvants. A β -Hsp fusion proteins are prepared by recombinant technologies. In mice, subcutaneous injection of fusion protein A β 42-Hsp70 without the use of adjuvant induce a dose-dependent immune response. Serum A β antibody titers elicited by A β 42-Hsp70 were similar to those induced by equimolar doses of preaggregated A β 42 plus Freund adjuvant. Antigens were administered subcutaneously every 2 weeks in the first month followed by monthly injections. Preaggregated A β 42 was administered with complete Freund adjuvant at priming injection and with incomplete Freund adjuvant at the following boosts. A β 42-Hsp70 was used without the use of adjuvants. These results suggest that A β -Hsp fusion proteins may represent an effective adjuvant-free A β immunization approach.

POTENTIAL DRAWBACKS OF ANTI- β -AMYLOID VACCINES

The A β vaccination approach has opened unprecedented hopes for an effective treatment of AD. However, a number of issues both in terms of efficacy and safety may preclude its successful application in AD patients.

On the efficacy side, it has been argued that, although there is clear evidence that A β immunization in mice induces a clearance of A β plaques and improves associated cognitive disturbances, this may not be the case in AD patients [St George-Hyslop and Westaway, 1999]. The AD neuropathology is not fully mimicked by presently available transgenic animal models of the disease, such as neurofibrillary tangle pathology and neuronal loss. Thus, the beneficial effects of A β immunization observed in transgenic animals may not be observed in AD patients. In addition, in order to replicate in man the dramatic effects observed in animal models, high concentrations of anti-A β antibodies are necessary. The immune response induced by a vaccine may not be sufficient in humans. Tolerance to a self-antigen and immune downregulation associated with aging may blunt the immune response to A β . There is evidence for partial tolerance against A β in APP transgenic mice [Monsonego et al., 2001]. Phase I studies with the Elan

vaccine in AD patients showed that only 25% of patients developed a sufficient immunological response to AN-1792 [Thattai, 2001]. On the other hand, although tolerance to direct vaccination with A β 42 may limit its efficacy in humans, passive immunization strategies or A β antigens (conjugates or fusion proteins) that elicit enhanced immune responses in humans are being developed. Such strategies are likely to overcome issues regarding tolerance to A β .

On the safety side, the major concerns lie on the potential proinflammatory consequences following A β immunization. Activation of microglial inflammatory mediators that may participate in Fc receptor-mediated opsonization or scavenging of A β plaques may have detrimental effects or even lead to acceleration of neurodegeneration. There are also concerns that raising antibodies against a self-protein could lead to autoimmune disorders. Finally, recent studies suggest that A β vaccination may alter the blood-brain barrier permeability [Poduslo and Curran, 2001], thus increasing the chance for pathogenic microorganisms to reach the CNS. The recent cases of CNS inflammation observed in AD patients exposed to Elan's vaccine AN-1792 confirm these concerns.

It is likely that the adverse events observed in AD patients with AN-1792 could reflect an autoimmune inflammatory response. Immunological responses are considered to be either humoral, resulting from cloning of B-lymphocytes, or cell-mediated, resulting from cloning of T-lymphocytes. Autoimmune diseases occur when the cloned products attack host tissue. A β -specific T-cell lines contain a high percentage of CD8⁺ cytotoxic T-cells capable of lysing cells that overproduce A β [Marx et al., 1999]. An autoimmune inflammatory response could be triggered by T-lymphocyte activation after immune system stimulation with A β [Grubeck-Loebeinstein et al., 2000]. On the other hand, immunogenic A β derivatives (conjugates or fusion proteins) that use A β sequences containing the main immunogenic epitopes may be devoid of inflammatory potential. One of these A β derivatives, K6-A β 1-30, has been shown to significantly reduce, in APP transgenic mice, brain A β plaque burden and ameliorate associated cognitive deficit [Sigurdsson et al., 2002]. Ramified interleukin-1 β -positive microglia, associated with the A β plaques, were absent in the immunized mice, indicating reduced inflammation in these animals.

An alternative to the active vaccination approach is passive immunization, which is associated with a lower risk of irreversible autoimmunity. Unlike actively immunized mice, animals receiving exogenous antibodies against A β did not demonstrate a T-cell proliferative response to A β when their splenocytes

were examined *in vitro*, indicating that a T-cell response is not required for amyloid plaque clearance [Bard et al., 2000]. This approach may also be appropriate in AD patients with blunted immune response. Treatment of APP transgenic mice with monoclonal anti-A β antibodies (3D6 or 10D5) or Fab fragments of anti-A β antibodies has been shown to clear brain A β plaques in transgenic animals [Bard et al., 2000; Bacskai et al., 2001]. Similarly, peripheral administration of a monoclonal antibody (m266) directed against the central domain of A β was able to rapidly and completely sequester plasma A β and, most importantly, to reverse cognitive impairment just 24 h after antibody administration [Holtzman et al., 2002].

CONCLUSIONS

A β remains the most fascinating therapeutic target for generating agents potentially able to modify the natural history of AD. The pioneering work of Schenk and colleagues at Elan Pharmaceuticals was based on the idea of increasing A β clearance by inducing a robust humoral immune response against this neurotoxic peptide. This group immunized transgenic mice, overproducing A β and accumulating A β plaques in the brain, with a fibrillar preparation of A β 42 plus an immune adjuvant. In those animals, which developed a high anti-A β antibody titer, there was a significant reduction in plaque burden and decreased neuritic dystrophy and gliosis. Following the initial publication, a number of studies confirmed that A β immunization appears to be effective in reducing amyloid deposition both in active and passive immunization strategies. Most importantly, the A β vaccination was shown to be able to ameliorate cognitive and behavioral impairment that develops in transgenic animals. Unfortunately, an initial double-blind placebo-controlled trial of a synthetic A β 42 preparation for human use (AN-1792) in 360 AD patients was interrupted after 15 patients developed encephalitis. Hypotheses regarding the mechanism through which A β 42 immunization caused CNS inflammation include T-cell activation and/or autoimmune disease.

Other A β immunization strategies are being pursued. These include new antigens, called fusion proteins, constituted by conjugation of A β or A β fractions (epitopes) with immune carriers or adjuvants. This approach employing nonendogenous proteins should induce a robust immune response without activating autoimmune reactions. Another alternative strategy includes passive immunization with monoclonal antibodies or antibody fragments. This approach is based on the hypothesis that binding of antibodies to A β in plasma creates a peripheral sink which favors efflux of A β from the brain. This results in decreased

levels of free A β in the brain and thus alters the kinetics of deposition favoring the dissolution of preexisting fibrils. This peripheral sink hypothesis should avoid central inflammatory responses.

The revolutionary development of the first anti-Alzheimer vaccine has raised unprecedented hopes for an effective treatment of this devastating disease. However, a better understanding of the mechanism whereby A β immunization promotes A β clearance is needed in order to optimize the initial approach and render it successful in AD patients.

REFERENCES

- Ada G. 2001. Vaccines and vaccination. *N Engl J Med* 345: 1042-1053.
- Arendash GW, Gordon MN, Diamond DM, Austin LA, Hatcher JM, Jantzen P, DiCarlo C, Wilcock D, Morgan D. 2001. Behavioral assessment of Alzheimer's transgenic mice following long-term A β vaccination: task specificity and correlations between A β deposition and spatial memory. *DNA Cell Biol* 20:737-744.
- Bacskaï BJ, Kajdasz ST, Christie RH, Carter C, Games D, Seubert P, Schenk D, Hyman BT. 2001. Imaging of amyloid- β deposits in brains of living mice permits direct observation of clearance of plaques with immunotherapy. *Nat Med* 7:369-372.
- Bard F, Cannon C, Barbour R, Burke RL, Games D, Crajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Lieberburg I, Motter R, Nguyen M, Soriano F, Vasquez N, Weiss K, Welch B, Seubert P, Schenk D, Yednock T. 2000. Peripherally administered antibodies against amyloid β -peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med* 6:916-919.
- Beckmann RP, Mizzen LE, Welch WJ. 1990. Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science* 248:850-854.
- Borchelt DR, Thinakaran C, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitsky T, Prada CM, Kim G, Seckins S, Yager D, Slunt HH, Wang R, Seeger M, Levey AI, Gandy SE, Copeland NG, Jenkins NA, Price DL, Younkin SC, Sisodia SS. 1996. Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate A β 1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* 17:1005-1013.
- Brayden DJ, Templeton L, McClean S, Barbour R, Huang J, Nguyen M, Ahern D, Motter R, Johnson-Wood K, Vasquez N, Schenk D, Seubert P. 2001. Encapsulation in biodegradable micro particles enhances serum antibody response to parenterally-delivered β -amyloid in mice. *Vaccine* 19:4185-4193.
- Chen C, Chen KS, Knox J, Inglis J, Bernard A, Martin SJ, Justice A, McConlogue L, Games D, Freedman SB, Morris RG. 2000. A learning deficit related to age and β -amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature* 408:975-979.
- Citron M, Oltsersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Selkoe DJ. 1992. Mutation of the β -amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases β -protein production. *Nature* 360:672-674.
- Citron M, Westaway D, Xia W, Carlson G, Diehl T, Levesque C, Johnson-Wood K, Lee M, Seubert P, Davis A, Kholodenko D, Motter R, Sherrington R, Perry B, Yao H, Strome R, Lieberburg I, Rommens J, Kim S, Schenk D, Fraser P, St George Hyslop P, Selkoe DJ. 1997. Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid β -protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat Med* 3:67-72.
- Das P, Murphy MP, Younkin LH, Younkin SC, Golde TE. 2001. Reduced effectiveness of A β 1-42 immunization in APP transgenic mice with significant amyloid deposition. *Neurobiol Aging* 22:721-727.
- Davies P. 1998. Challenging the cholinergic hypothesis in Alzheimer disease. *JAMA* 281:1433-1434.
- DeMattos RB, Bales KR, Cummins DJ, Dodart JC, Paul SM, Holtzman DM. 2001. Peripheral anti-A β antibody alters CNS and plasma A β clearance and decreases brain A β burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 8850-8855.
- Dickey CA, Morgan DG, Kudchodkar S, Weiner DB, Bai Y, Cao C, Gordon MN, Ugen KE. 2001. Duration and specificity of humoral immune responses in mice vaccinated with the Alzheimer's disease-associated β -amyloid 1-42 peptide. *DNA Cell Biol* 20:723-729.
- Duff K, Eckman C, Zehr C, Yu X, Prada CM, Perez-tur J, Hutton M, Buee L, Harigaya Y, Yager D, Morgan D, Gordon MN, Holcomb L, Refolo L, Zenk B, Hardy J, Younkin S. 1996. Increased amyloid- β 42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature* 383:710-713.
- Dumery L, Bourdel F, Soussan Y, Fialkowsky A, Viale S, Nicolas P, Reboud-Ravaux M. 2001. β -amyloid protein aggregation: its implication in the physiopathology of Alzheimer's disease. *Pathol Biol* 49:72-85.
- Ewbank DC. 1999. Deaths attributable to Alzheimer's disease in the United States. *Am J Public Health* 89:90-92.
- Findeis MA, Lee JJ, Kelley M, Wakefield JD, Zhang MH, Chin J, Kubasek W, Moliniaux SM. 2001. Characterization of choly-leu-val-phe-phe-ala-OH as an inhibitor of amyloid β -peptide polymerization. *Amyloid* 8:231-241.
- Frenkel D, Balass M, Solomon B. 1998. N-terminal EFRH sequence of Alzheimer's β -amyloid peptide represents the epitope of its anti-aggregating antibodies. *J Neuroimmunol* 88:85-90.
- Frenkel D, Katz O, Solomon B. 2000. Immunization against Alzheimer's β -amyloid plaques via EFRH phage administration. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:11455-11459.
- Frenkel D, Kariv N, Solomon B, Frenkel D, Kariv N, Solomon B. 2001. *Vaccine* 19:2615-2619.
- Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F, et al. 1995. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice over-expressing V717F β -amyloid precursor protein. *Nature* 373:523-527.
- Ghirardi S, Armani E, Amari G, Puccini P, Imbimbo BP, Villetti G. 2001. Fusion proteins as immunization treatments of Alzheimer's disease. *PCT/EP01/12242*, October 23, 2001.
- Ghosh AK, Bilcer G, Harwood C, Kawahara R, Shin D, Hussain KA, Hong L, Loy JA, Nguyen C, Koelsch C, Ernoloff J, Tang J. 2001. Structure-based design: potent inhibitors of human brain memapsin 2 (β -secretase). *J Med Chem* 44:2865-2868.
- Grubeck-Lobenstein B, Blasko I, Marx FK, Trieb I. 2000. Immunization with β -amyloid: could T-cell activation have a harmful effect? *Trends Neurosci* 23:114.
- Holcomb L, Gordon MN, McGowan E, Yu X, Benkovic S, Jantzen P, Wright K, Sand I, Mueller R, Morgan D, Sanders S, Zehr C, O'Campo K, Hardy J, Prada CM, Eckman C, Younkin S, Hsiao K,

- Duff K. 1998. Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat Med* 4:97-100.
- Holtzman D, Bales K, Paul S, DeMattos R. Effects of a peripheral anti-Aβ antibody on plasma and CNS Aβ clearance. IPSEN Foundation Conference. Immunization against Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. Paris, March 13, 2002.
- Hsiao K, Chapin P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole C. 1996. Correlative memory deficits, Aβ elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274: 99-102.
- Janus C, Pearson J, McLaurin J, Mathews PM, Jiang Y, Schmidt SD, Chisholm MA, Horne P, Heslin D, French J, Mount HT, Nixon RA, Mercken M, Bergeron C, Fraser PE, St George-Hyslop P, Westaway D. 2000. Aβ peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature* 408:979-982.
- Jarrett JT, Lansbury PT Jr. 1993. Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* 73:1055-1058.
- Johnson G, Refolo LM, Wallace W. 1993. Heat-shocked neuronal PC12 cells reveal Alzheimer's disease-associated alterations in amyloid precursor protein and tau. *Ann NY Acad Sci* 695: 194-197.
- Kensil CR, Wu JY, Anderson CA, Wheeler DA, Amsden J. 1998. QS-21 and QS-7: purified saponin adjuvants. *Dev Biol Stand* 92: 41-47.
- Klein WL, Krafft GA, Finch CE. 2001. Targeting small Aβ oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? *Trends Neurosci* 24:219-224.
- Kline EL, McMichael J. 1991. Method and composition for treatment of central nervous systems disease states associated with abnormal amyloid β protein. WO 91/16819.
- Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL. 1998. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Aβ1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 6448-6453.
- Lambert MP, Viola KL, Chromy BA, Chang L, Morgan TE, Yu J, Venton DL, Krafft GA, Finch CE, Klein WL. 2001. Vaccination with soluble Aβ oligomers generates toxicity-neutralizing antibodies. *J Neurochem* 79:595-605.
- Lemere CA. 2002. Improvement in intranasal Aβ immunization in mice. IPSEN Foundation Conference. Immunization against Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. Paris, March 13, 2002.
- Lemere CA, Maron R, Spooner ET, Grenfell TJ, Mori C, Desai R, Hancock WW, Weiner HL, Selkoe DJ. 2000. Nasal Aβ treatment induces anti-Aβ antibody production and decreases cerebral amyloid burden in PD-APP mice. *Ann NY Acad Sci* 920:328-331.
- Leon J, Cheng CK, Neumann PJ. 1998. Alzheimer's disease care: costs and potential savings. *Health Aff* 17:206-216.
- Lim GP, Yang F, Chiu T, Chen P, Beech W, Teter B, Tran T, Ubeda O, Ashe KH, Frautschy SA, Cole GM. 2000. Ibuprofen suppresses plaque pathology and inflammation in a mouse model for Alzheimer's disease. *J Neurosci* 20:5709-5714.
- Lippa CF, Nee LE, Mori H, St George-Hyslop P. 1998. Aβ-42 deposition precedes other changes in PS-1 Alzheimer's disease. *Lancet* 352:1117-1118.
- Marx F, Blasko I, Zisterer K, Grubeck-Loebenstein B. 1999. Transfected human B cells: a new model to study the functional and immunostimulatory consequences of APP production. *Exp Gerontol* 34:783-795.
- McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. 1984. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 34:939-944.
- Mizzen L. 1998. Immune responses to stress proteins: applications to infectious disease and cancer. *Biotherapy* 10:173-189.
- Monsonogo A, Maron R, Zota V, Selkoe DJ, Weiner HL. 2001. Immune hyporesponsiveness to amyloid β-peptide in amyloid precursor protein transgenic mice: implications for the pathogenesis and treatment of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10273-10278.
- Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE, Ugen KE, Dickey C, Hardy J, Duff K, Jantzen P, DiCarlo G, Wilcock D, Connor K, Hatcher J, Hope C, Gordon M, Arendash GW. 2000. Aβ peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* 408:982-985.
- Motter R, Vigo-Pelfrey C, Kholodenko D, Barbour R, Johnson-Wood K, Galasko D, Chang L, Miller B, Clark C, Green R, et al. 1995. Reduction of β-amyloid peptide42 in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 38:643-648.
- Naslund J, Haroutunian V, Mohs R, Davis KL, Davies P, Greengard P, Buxbaum JD. 2000. Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA* 283:1571-1577.
- Nicolau C, Greferath R, Balaban TS, Lazarte JE, Hopkins RJ. 2002. A liposome-based therapeutic vaccine against β-amyloid plaques on the pancreas of transgenic NORBA mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:2332-2337.
- Oyama F, Sawamura N, Kobayashi K, Morishima-Kawashima M, Kuramochi T, Ito M, Tomita T, Maruyama K, Saido TC, Iwatsubo T, Capell A, Walter J, Grunberg J, Ueyama Y, Haass C, Ihara Y. 1998. Mutant presenilin 2 transgenic mouse: effect on an age-dependent increase of amyloid β-protein 42 in the brain. *J Neurochem* 71:313-322.
- Perez N, Sugar J, Charya S, Johnson G, Merril C, Bierer L, Perl D, Haroutunian V, Wallace W. 1991. Increased synthesis and accumulation of heat shock 70 proteins in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 11:249-254.
- Poduslo JF, Curran GL. 2001. Amyloid β peptide as a vaccine for Alzheimer's disease involves receptor-mediated transport at the blood-brain barrier. *Neuroreport* 12:3197-3200.
- Renkawek K, Bosman GJ, de Jong WW. 1994. Expression of small heat-shock protein hsp 27 in reactive gliosis in Alzheimer disease and other types of dementia. *Acta Neuropathol* 87:511-519.
- Schenk D. 1998. Prevention and treatment of amyloidogenic disease. WO 99/27944.
- Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon C, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Liao Z, Lieberburg I, Motter R, Mutter L, Soriano F, Shupp C, Vasquez N, Vandeventer C, Walker S, Wogulis M, Yednock T, Games D, Seubert P. 1999. Immunization with amyloid-β

- attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400:173-177.
- Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, Bird TD, Hardy J, Hutton M, Kukull W, Larson E, Levy-Lahad E, Viitanen M, Peskind E, Poorkaj P, Schellenberg G, Tanzi R, Wasco W, Lannfelt L, Selkoe D, Younkin S. 1996. Secreted amyloid β -protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med* 2:864-870.
- Schumock CT. 1998. Economic considerations in the treatment and management of Alzheimer's disease. *Am J Health Syst Pharm (Suppl 2):S17-S21*.
- Sigurdsson EM, Scholtzova H, Mehta PD, Frangione B, Wisniewski T. 2001. Immunization with a nontoxic/nonfibrillar amyloid- β homologous peptide reduces Alzheimer's disease-associated pathology in transgenic mice. *Am J Pathol* 159:439-447.
- Sigurdsson EM, Wisniewski T, Frangione B. 2002. Safety of potential vaccines for Alzheimer's disease. IPSEN Foundation Conference. Immunization against Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. Paris, March 13, 2002.
- Solomon B. 2002. Towards diagnosis and treatment of Alzheimer's disease. IPSEN Foundation Conference. Immunization against Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. Paris, March 13, 2002.
- Solomon B, Koppel R, Frankel D, Hanan-Aharon E. 1997. Disaggregation of Alzheimer β -amyloid by site-directed mAb. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:4109-4112.
- Soto C, Branes MC, Alvarez J, Inestrosa NC. 1994. Structural determinants of the Alzheimer's amyloid β -peptide. *J Neurochem* 63:1191-1198.
- Soto C, Castano EM, Kumar RA, Beavis RC, Frangione B. 1995. Fibrillogenesis of synthetic amyloid- β peptides is dependent on their initial secondary structure. *Neurosci Lett* 200:105-108.
- St George-Hyslop PH, Westaway DA. 1999. Alzheimer's disease. Antibody clears senile plaques. *Nature* 400:116-117.
- Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Odaka A, Otvos L Jr, Eckman C, Golde TE, Younkin SG. 1994. An increased percentage of long amyloid β protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (BAPP717) mutants. *Science* 1994; 264:1336-1340.
- Thattai U. 2001. AN-1792 (Elan). *Curr Opin Invest Drugs* 2:663-667.
- Tosi PF, Radu D, Nicolau C. 1995. Immune response against the murine mdri protein induced by vaccination with synthetic lipopeptides in liposomes. *Biochem Biophys Res Commun* 212:494-500.
- Town T, Tan J, Sansone N, Obregon D, Klein T, Mullan M. 2001. Characterization of murine immunoglobulin G antibodies against human amyloid- β 1-42. *Neurosci Lett* 307:101-104.
- Tung JS, Davis DL, Anderson JP, Walker DE, Mamo S, Jewett N, Houn RK, Sinha S, Thorsett ED, John V. 2002. Design of substrate-based inhibitors of human β -secretase. *J Med Chem* 45:258-262.
- Vehmas AK, Borchelt DR, Price DL, McCarthy D, Wills-Karp M, Peper MJ, Rudow C, Luyimbazi J, Siew LT, Troncoso JC. 2001. β -Amyloid peptide vaccination results in marked changes in serum and brain A β levels in APPsw/PS1deltaE9 mice, as detected by SELDI-TOF-based protein chip(R) technology. *DNA Cell Biol* 20:713-721.
- Wang HW, Pasternak JF, Kuo H, Ristic H, Lambert MP, Chromy B, Viola KL, Klein WL, Stine WB, Krafft GA, Trommer BL. 2002. Soluble oligomers of β -amyloid(1-42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate gyrus. *Brain Res* 924:133-140.
- Weiner HL, Leinere CA, Maron R, Spooner ET, Grenfell TJ, Mori C, Issazadeh S, Hancock WW, Selkoe DJ. 2000. Nasal administration of amyloid- β peptide decreases cerebral amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 48:567-579.
- Wilcock DM, Gordon MN, Ugen KE, Gottschall PE, DiCarlo G, Dickey C, Boyett KW, Jantzen PT, Connor KE, Melachroinou J, Hardy J, Morgan D. 2001. Number of A β inoculations in APP+PS1 transgenic mice influences antibody titers, microglial activation, and congophilic plaque levels. *DNA Cell Biol* 20:731-736.
- Wolfe MS. 2001. γ -secretase inhibitors as molecular probes of presenilin function. *J Mol Neurosci* 17:199-204.
- Yoo BC, Seidl R, Cairns N, Lubec G. 1999. Heat-shock protein 70 levels in brain of patients with Down syndrome and Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl* 57:315-322.

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
5 December 2002 (05.12.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/096350 A2

- (51) International Patent Classification⁷: A61K
- (21) International Application Number: PCT/US02/10293
- (22) International Filing Date: 2 April 2002 (02.04.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
09/865,294 25 May 2001 (25.05.2001) US
- (71) Applicant: UNITED BIOMEDICAL, INC. [US/US]; 25 Davids Drive, Hauppauge, NY 11788 (US).
- (72) Inventor: WANG, Chang, Yi; 47 Snake Hill Road, Cold Spring Harbor, NY 11724 (US).
- (74) Agent: LIN, Maria, C., H.; Morgan & Finnegan, L.L.P., 345 Park Avenue, New York, NY 10154 (US).
- (81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE (utility model), DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/096350 A2

(54) Title: IMMUNOGENIC PEPTIDE COMPOSITION FOR THE PREVENTION AND TREATMENT OF ALZHEIMER'S DISEASE

(57) Abstract: The present invention relates to a composition comprising a peptide immunogen useful for the prevention and treatment of Alzheimer's Disease. More particularly, the peptide immunogen comprises a main functional/regulatory site, an N-terminal fragment of Amyloid β (A β) peptide linked to a helper T cell epitope (Th) having multiple class II MHC binding motifs. The peptide immunogen elicit a site-directed immune response against the main functional/regulatory site of the A β peptide and generate antibodies, which are highly cross-reactive to the soluble A β_{1-42} peptide and the amyloid plaques formed in the brain of Alzheimer's Disease patients. The antibodies elicited being cross reactive to the soluble A β_{1-42} peptide, promote fibril disaggregation and inhibit fibrillar aggregation leading to immunoneutralization of the "soluble A β -derived toxins"; and being cross-reactive to the amyloid plaques, accelerate the clearance of these plaques from the brain. Thus, the composition of the invention comprising the peptide immunogen is useful for the prevention and treatment of Alzheimer's Disease.



US 20050123553A1

(19) **United States**

(12) **Patent Application Publication** (10) Pub. No.: **US 2005/0123553 A1**

Monsonogo et al.

(43) Pub. Date: **Jun. 9, 2005**

(54) **AMYLOID BETA-PEPTIDE AND METHODS OF USE**

Publication Classification

(76) Inventors: **Alon Monsonogo, Moshav Nir-Banim (IL); Howard Weiner, Brookline, MA (US); Dennis J. Selkoe, Jamaica Plain, MA (US)**

(51) Int. Cl.⁷ **G01N 33/53; G01N 33/567; A61K 39/00; C07K 14/47**

(52) U.S. Cl. **424/185.1; 514/12; 530/350; 435/7.2**

Correspondence Address:
**FISH & RICHARDSON PC
225 FRANKLIN ST
BOSTON, MA 02110 (US)**

(57) **ABSTRACT**

(21) Appl. No.: **10/903,279**

(22) Filed: **Jul. 30, 2004**

Related U.S. Application Data

(60) Provisional application No. 60/491,485, filed on Jul. 30, 2003.

Novel compositions containing an amyloid- β peptide (A β) and methods of using these compositions for treating and preventing A β protein related (e.g., an amyloid fibril) disorders such as Alzheimer's disease are described herein. Also described herein are methods for identifying a vaccine, and methods of vaccinating a patient with an A β peptide composition identified using the methods described herein.



(11)

EP 1 676 859 A1

(12)

EUROPEAN PATENT APPLICATION

(43)

Date of publication:
05.07.2006 Bulletin 2006/27

(51)

Int Cl:
C07K 14/47^(2006.01) G01N 33/68^(2006.01)
C07K 7/64^(2006.01)

(21)

Application number: 04031023.7

(22)

Date of filing: 30.12.2004

(84)

Designated Contracting States:
AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR
HU IE IS IT LI LT LU MC NL PL PT RO SE SI SK TR
Designated Extension States:
AL BA HR LV MK YU

(72)

Inventor: Zurbriggen, Rinaldo
3185 Schmitlen (CH)

(74)

Representative: Vierung, Jentschura & Partner
Centroallee 263
46047 Oberhausen (DE)

(71)

Applicant: Povlon Biotech Ltd.
3018 Bern (CH)

(54)

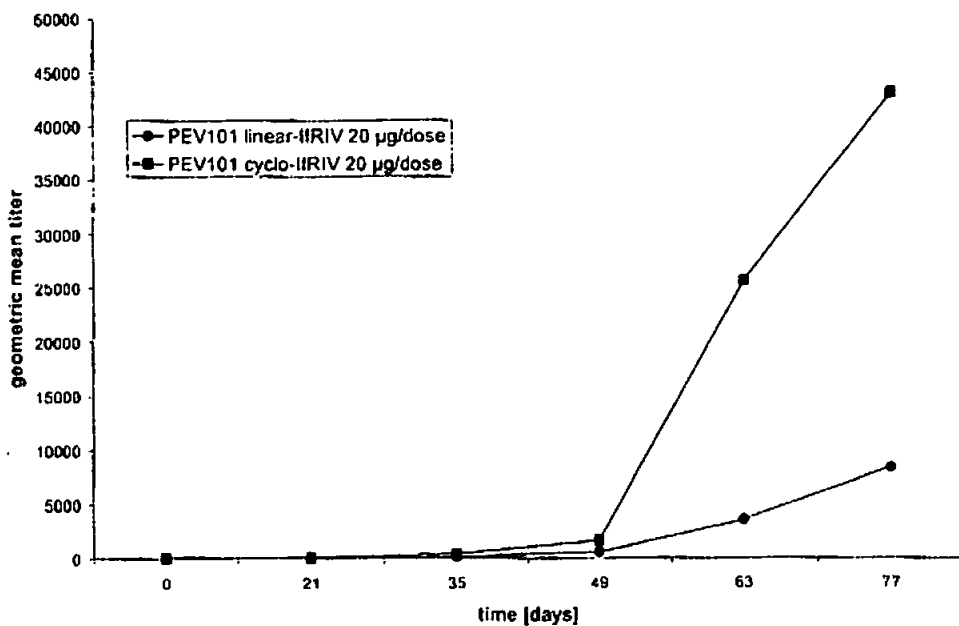
Immunogenic compositions of cyclic peptides derived from the beta-amyloid peptide

(57)

The present invention relates to methods and compositions for the elicitation of an immune response,

in particular against amyloid beta-peptides, in particular by the combinatory use of virosomes as adjuvants and a synthetic amyloid beta-peptide antigen.

Figure 1



EP 1 676 859 A1

Short Amyloid- β (A β) Immunogens Reduce Cerebral A β Load and Learning Deficits in an Alzheimer's Disease Mouse Model in the Absence of an A β -Specific Cellular Immune Response

Marcel Maier,¹ Timothy J. Seabrook,¹ Noel D. Lazo,² Liying Jiang,¹ Pritam Das,³ Christopher Janus,³ and Cynthia A. Lemere¹

¹Center for Neurological Diseases, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115, ²Department of Neurology, David Geffen School of Medicine at the University of California, Los Angeles, Los Angeles, California 90095, and ³Department of Neuroscience, Mayo Clinic Jacksonville, Jacksonville, Florida 32224

Amyloid- β (A β) immunotherapy lowers cerebral A β and improves cognition in mouse models of Alzheimer's disease (AD). A clinical trial using active immunization with A β 1–42 was suspended after ~6% of patients developed meningoencephalitis, possibly because of a T-cell reaction against A β . Nevertheless, beneficial effects were reported in antibody responders. Consequently, alternatives are required for a safer vaccine. The A β 1–15 sequence contains the antibody epitope(s) but lacks the T-cell reactive sites of full-length A β 1–42. Therefore, we tested four alternative peptide immunogens encompassing either a tandem repeat of two lysine-linked A β 1–15 sequences (2 $\times$ A β 1–15) or the A β 1–15 sequence synthesized to a cross-species active T1 T-helper-cell epitope (T1-A β 1–15) and each with the addition of a three-amino-acid RGD (Arg-Gly-Asp) motif (R-2 $\times$ A β 1–15; T1-R-A β 1–15). High anti-A β antibody titers were observed in wild-type mice after intranasal immunization with R-2 $\times$ A β 1–15 or 2 $\times$ A β 1–15 plus mutant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin LT(R192G) adjuvant. Moderate antibody levels were induced after immunization with T1-R-A β 1–15 or T1-A β 1–15 plus LT(R192G). Restimulation of splenocytes with the corresponding immunogens resulted in moderate proliferative responses, whereas proliferation was absent after restimulation with full-length A β or A β 1–15. Immunization of human amyloid precursor protein, familial AD (hAPP_{FAD}) mice with R-2 $\times$ A β 1–15 or 2 $\times$ A β 1–15 resulted in high anti-A β titers of noninflammatory T-helper 2 isotypes (IgG1 and IgG2b), a lack of splenocyte proliferation against full-length A β , significantly reduced A β plaque load, and lower cerebral A β levels. In addition, 2 $\times$ A β 1–15-immunized hAPP_{FAD} animals showed improved acquisition of memory compared with vehicle controls in a reference-memory Morris water-maze behavior test that approximately correlated with anti-A β titers. Thus, our novel immunogens show promise for future AD vaccines.

Key words: Alzheimer's disease; amyloid beta; A β peptide; immunotherapy; behavior; T-cell; intranasal

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is characterized histopathologically by accumulation of amyloid plaques and neurofibrillary tangles with amyloid- β peptide (A β) as a major component of AD-related plaques. Numerous evidence indicate that different forms of A β aggregates play an important role in AD pathogenesis

(Hardy and Selkoe, 2002; Walsh and Selkoe, 2004). This led to experimental therapeutic strategies for AD to reduce cerebral A β by generating antibodies against A β 1–42 (Schenk et al., 1999). In AD mouse models, immunization with aggregated synthetic A β 1–42 peptide reduced cerebral A β deposition, neuritic dystrophy, and gliosis in amyloid precursor protein-transgenic (APP-tg) mice (Schenk et al., 1999; Lemere et al., 2000; Weiner et al., 2000) and also improved cognition (Janus et al., 2000; Morgan et al., 2000). A clinical study in AD patients using aggregated A β 1–42 (AN1792) in combination with QS21 adjuvant was halted because of signs of meningoencephalitis in ~6% of immunized subjects (Orgogozo et al., 2003). Nevertheless, patients who generated anti-A β antibodies had reduced cerebrospinal levels of tau and showed a slower cognitive decline (Gilman et al., 2005; Masliah et al., 2005). T-cell infiltrates were present in the brains of two patients with encephalitis, suggesting a T-cell-mediated immune response as a reason for the adverse events (Nicoll et al., 2000).

Received Jan. 26, 2006; revised March 9, 2006; accepted March 20, 2006.

This work was supported by National Institutes of Health Grant AG20159 (C.A.L.). We thank Diana Li, Elena Mikhaylova, Eva Lee, and Katelyn Thomas for technical assistance, Todd Golde for the determination/confirmation of A β levels in brain homogenates, Lucy Cadenas-Freytag and John D. Clements for adjuvant LT(R192G), Dennis Selkoe for the gift of R1782 antibodies, He Shen for the use of the behavioral testing Morris water maze facility, Gulquan Chen for assistance with the statistical data analysis, and Lennart Mucke for sharing the hAPP_{FAD} (J20) transgenic mouse line.

Correspondence should be addressed to Dr. Cynthia A. Lemere, Center for Neurological Diseases, Harvard New Research Building, Room 636F, 77 Avenue Louis Pasteur, Boston, MA 02115. E-mail: clemere@rics.bwh.harvard.edu.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.0381-06.2006

Copyright © 2006 Society for Neuroscience 0270-6474/06/264717-12\$15.00/0

Active immunization induces both a humoral (antibody mediated) and cellular immune response (via T lymphocytes). In AD mouse models, peripheral injection of A β -specific antibodies (i.e., passive immunization) reduced cerebral A β levels (Bard et al., 2000; DeMattos et al., 2001) and improved cognitive function (Dodart et al., 2002) but also led to microhemorrhages in aged APP-Tg mice with abundant vascular amyloid (Pfeifer et al., 2002; Wilcock et al., 2004b; Racke et al., 2005).

The majority of anti-A β antibodies generated in mice (Lemere et al., 2000; Town et al., 2001; McLaurin et al., 2002; Cribbs et al., 2003), monkeys (Lemere et al., 2004), and humans (Lee et al., 2005) recognize an epitope located within the amino terminus of A β protein (e.g., A β 1–15). In humans (Monsonogo et al., 2003) and mice (Monsonogo et al., 2001; Cribbs et al., 2003), T-cells recognize a more C-terminal epitope (within A β 16–42). These observations have been used to design alternative immunogens, which encompass the N-terminal antibody epitope of A β but lack the more C-terminal T-cell reactive sites for immunization in AD animal models. Such shorter A β fragments have been shown to lead to an immune response when conjugated to T-helper (Th) cell epitopes (Monsonogo et al., 2001) and/or have been used on a branched peptide framework (Agadjanyan et al., 2005).

The purpose of this study was to determine the humoral and cellular immune responses in wild-type mice of four alternative A β 1–15-containing intranasal immunogens in combination with mutant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin LT(R192G), which is an excellent adjuvant for mucosal immunization (Dickinson and Clements, 1995; Lemere et al., 2002) and currently in phase I clinical trials (www.clinicaltrials.gov, NIH). In addition, we tested the ability of two immunogens to ameliorate A β pathology and one immunogen to improve behavioral deficits in human APP familial AD (hAPP_{FAD}) mice (J20 line) (Mucke et al., 2000), an AD animal model.

Materials and Methods

Peptides and CD spectroscopy. Immunogens [DAEFRHDSGYEVHHQ-KK-DAEFRHDSGYEVHHQ (2 $\times$ A β 1–15), RGD (Arg-Gly-Asp)-2 $\times$ A β 1–15 (R-2 $\times$ A β 1–15), KQINMWQAVGKAMYA-KK-DAEFRHDSGYEVHHQ (T1-A β 1–15), T1-RGD-KK-A β 1–15 (T1-R-A β 1–15) (Alpha Diagnostics, San Antonio, TX), and human A β 1–40 and A β 1–42 peptide (Dr. D. Teplow, Biopolymer Laboratory, Center for Neurologic Diseases, Boston, MA)] were dissolved directly in distilled water at 4 mg/ml. Only the A β 1–40 plus A β 1–42 peptides (A β 40/42: 3 mg/ml A β 1–40 and 1 mg/ml A β 1–42) were incubated overnight at 37°C. Circular dichroism (CD) spectra of the peptides were recorded on an Aviv model 62A DS spectropolarimeter (Aviv Associates, Lakewood, NJ) using quartz cuvettes of 0.1 cm path length. All spectra were recorded at 25°C over a wavelength range of 195–260 nm. Qualitative secondary structure assignments were done as described previously (Johnson, 1990).

Animals and treatments. Immunization experiments were performed in 6–8 week old, male B6D2F1 wild-type mice (Taconic Farms, Germantown, NY; $n = 4$ mice per group) or hAPP_{FAD} [J20 line; neuronal expression of familial-AD mutant hAPP: K670N, M671L, V717F, under the PDGF β promoter (Mucke et al., 2000)] animals on a mixed C57BL/6 and DBA2 (B6D2) background ($n = 6$ 6-month-old mice for R-2 $\times$ A β 1–15, $n = 6$ for corresponding control; $n = 6$ 4.5-month-old mice for 2 $\times$ A β 1–15, $n = 7$ for control; gender-balanced with a maximal age difference between individual animals < 1 month per treatment). All animal use was approved by the Harvard Standing Committee for Animal Use and was in compliance with all state and federal regulations. The mucosal adjuvant, mutant *E. coli* heat-labile enterotoxin LT(R192G) (gift from J. Clements, Tulane University School of Medicine, New Orleans, LA) was reconstituted with distilled water and mixed with an aliquot of the pep-

tides just before use. Peptide plus LT(R192G) intranasally immunized mice received, on the same day, two doses of 25 μ g immunogen-peptide plus 2.5 μ g LT(R192G) (in a total volume of 9 μ l) to the naris as described previously (Maier et al., 2005b).

Plasma and tissue collection. Blood plasma was collected from the tail as described previously (Maier et al., 2005b). One week after the final immunization, mice were killed by CO₂ inhalation and transcardially perfused with PBS. The brain was removed and divided sagittally. One hemisphere was fixed for 2 h in 10% buffered formalin while the other hemisphere was snap frozen in liquid nitrogen for biochemical analysis. Hemibrain, liver, kidney, and snout tissues were embedded in paraffin as described previously (Lemere et al., 2003; Maier et al., 2005b). TBS-soluble and 5 M guanidinium-soluble (i.e., TBS insoluble) brain homogenates were prepared as reported previously (Weiner et al., 2000).

Anti-A β antibody ELISA and A β ELISA. Anti-A β 40 antibodies in mouse plasma were measured as described previously with an anti-A β 40 antibody ELISA (Lemere et al., 2002). ELISAs for antibody isotypes and epitope-mapping were performed as reported previously (Maier et al., 2005b) with two differences. First, biotin-anti-mouse-IgG2a (Serotec, Raleigh, NC) was used as a secondary antibody for detection of IgG2a antibodies and, second, epitope mapping ELISA plates were coated with the same peptide (2 μ g/ml in 50 mM carbonate buffer, pH9.6) used for immunizing the mice. Briefly, for epitope-mapping, dilutions of mouse plasma (depending on concentration of antibodies between 16,000 and 256,000) were absorbed overnight with the same concentration (35 μ g/ml) of A β 1–15, A β 1–7, A β 3–9, A β 7–12, A β 11–25, A β 26–42, A β 1–42 [Center for Neurological Diseases (CND), Biopolymer Laboratory], a three-amino-acid peptide RGD (Peninsula Laboratories, San Carlos, CA), the RGD-motif containing protein fibronectin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), or the different immunogen peptides. The remaining ability of the antibodies to bind plate-bound immunogen was then measured by ELISA.

A β levels were measured in plasma using an A β ₄₀ – total ELISA as described previously (Weiner et al., 2000). A β 40 and A β 42 levels were measured in brain homogenates by ELISA as described previously (Levites et al., 2006).

Splenocyte proliferation assay and detection of cytokines. Spleens were pooled for wild-type B6D2F1 mice immunized with the same immunogen, whereas splenocytes from hAPP_{FAD} mice were isolated, cultured, and restimulated individually as described previously (Maier et al., 2005b). The same peptides used for immunization were used for restimulation. A stimulation index (SI) was calculated using the following formula: counts per minute (CPM) of well with peptide antigen/CPM with no antigen. Stimulation with concavalin A was used to ensure the viability of the cells and the average stimulation indices were similar in all groups analyzed (data not shown).

Immunohistochemistry. Ten micron paraffin sections of human AD brain, mouse brain, liver, kidney, and snouts were mounted on glass slides and immunohistochemistry was performed as reported previously (Lemere et al., 2002) using Vector Elite ABC kits (Vector Laboratories, Burlingame, CA). The following antibodies were used for neuropathological analysis: anti-CD45 (1:5000; Serotec), anti-GFAP (1:500; Dako, Carpinteria, CA), anti-CD5 (1:200; BD Pharmingen, San Jose, CA), rabbit polyclonal anti-A β R1282 (1:1000; gift from D. Selkoe, CND, Boston, MA) and anti-A β 40 and anti-A β 42 (1:500; BioSource, Camarillo CA). For quantification of immunoreactivity, acquisition of images was performed in a single session using a QICAM camera (Qimaging, Burnaby, British Columbia, Canada) mounted on an Olympus (Melville, NY) BX50 microscope, with threshold of detection held constant during analysis. The percent area occupied by immunoreactivity was calculated for 3–4 equidistant sections of hippocampus per animal. Computer-assisted image analysis was performed on images of the hippocampus using IP Lab Spectrum (Fairfax, VA) 3.1 image analyzer. Thioflavine S staining for fibrillar A β was performed by incubating slides in a 1% aqueous solution of Thioflavine S for 10 min followed by rinses in 80 and 95% ethanol, and then distilled water. The Perl's Prussian blue method was used to visualize ferric iron in hemosiderin as a measure for hemorrhages (Pfeifer et al., 2002). Mouse plasma, diluted 1:1000, 1:10,000, and 1:25,000 was used for immunohistochemistry (IHC) on formic acid-pretreated, formalin

fixed, human AD brain sections or on nonfixed, non-pretreated 10 μ m human AD brain cryosections (Racke et al., 2005).

Behavioral testing. The effect of immunization on cognition was evaluated in the spatial reference memory version of the Morris water maze (MWM). Two series of tests were administered to evaluate acquisition and learning reversal of spatial information. All MWM tests were performed in a pool 160 cm in diameter, with an escape platform submerged 1 cm under the water (11 cm in diameter). The surface of the water (20–21°C) in the pool was made opaque by the addition of small white plastic beads (Cain et al., 1997). The pool was situated in a testing room fitted with several distant spatial cues (posters on black curtain). The first test was performed over 12 d, with the escape platform located 30 cm from the wall of the pool in quadrants 1 or 3 (counter-balanced for one-half of mice in each tested group). Each mouse was given four daily 90 s training trials with intertrial intervals between 30 and 50 min. During each trial, a mouse was released into the water facing the wall of the pool from semirandomly chosen cardinal compass points (north, east, south, and west). To evaluate the development of spatial memory, all mice were given probe trials on days 2, 6, and 12 of training. During probe trials, which were administered as the first trial of the day, the escape platform was removed from the pool and the mice were allowed to search the pool uninterrupted for 60 s. The second series of reference memory MWM tests addressed the plasticity of learning reversal in the mice. We used a 5 d paradigm of six daily trials (90 s maximum) with 3 d of initial acquisition [the escape platform located in a balanced way in quadrants 2 (for one-half of the mice) or 4 (for another one-half; 50 cm from the wall), and 2 d with reversed platform location (in quadrants 4 and 2, 35 cm from the wall). Varying the distance of the platform location from the wall during each learning acquisition prevented the mice from using nonspatial, chaining strategy during navigation (Janus, 2004). Spatial memory was evaluated in 60 s probe trials administered 1 h after the last training trial on days 3 and 5.

Each reference-memory test was followed by a cued (visible platform) version of MWM (4 trials/d, 2 d) in which an escape platform was marked by a 15-cm-high red post with a yellow/black ball, and the extra-maze cues (posters) were removed from the black curtain surrounding the pool. The swim path of a mouse during each trial was recorded by a video camera suspended 2 m above the center of the pool and connected to a video tracking system (Advanced Tracker VP200; Hampton Video Systems Image, Buckingham, UK) and a personal computer running Hampton Video Systems software.

Data analysis. The scores of each mouse were averaged across four (or six for the reversal experiment) daily training trials in both cued and conventional reference-memory MWM tests. The following variables characterizing the performances of mice in the water maze were chosen for analysis: latency time (seconds) it took a mouse to reach and climb the platform, and the length of swim path (centimeters). In most cases, the latency and the path length were highly positively correlated, therefore only the path was reported. The locomotor activity of the mice was analyzed using an average swim speed (meters/second, excluding bouts of inactivity or floating) and was very similar between both groups in all tests (data not shown). The spatial memory for the platform location during probe trials was evaluated by the analysis of the dwelling time in each quadrant of the pool, and the analysis of an annulus-crossing index (ACI). The ACI represents the number of crosses over the platform site in a quadrant that contained the escape platform [target quadrant (TQ)] adjusted for crosses over platform sites in alternative quadrants (i.e., ACI equals the number of site crosses in the TQ minus an average of crosses of sites in the other three quadrants of the pool).

A factorial model ANOVA (Prism software; GraphPad, San Diego, CA) was used with the treatment as a between-subject factor, and training days as a within-subject (repeated measure) factor. A Spearman correlation was used to correlate average antibody titers developed by mice during the immunization period (week 20–30) with spatial memory indices (ACI) obtained during two probe trials applied in the series of learning-reversal tests. Based on the previously obtained results, which demonstrated a beneficial effect of immunization on learning and memory in mice (Janus et al., 2000; Morgan et al., 2000; Sigurdsson et al., 2004; Jensen et al., 2005), we adopted a directional, one-tailed test while eval-

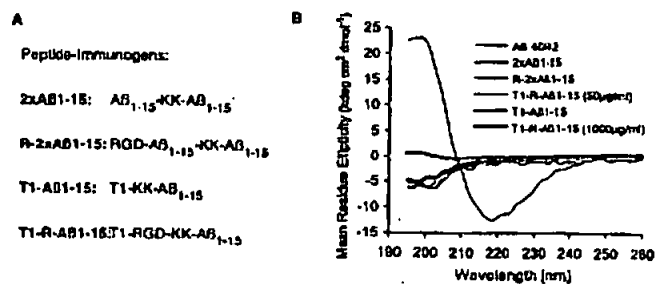


Figure 1. Design and biophysical characterization of four novel peptide immunogens containing the first 15 amino acids (A β 1–15) of full-length A β 1–42. **A**, The first two novel immunogens consist of a tandem repeat of the A β 1–15 sequence linked by two lysines with (R-2 $\times$ A β 1–15) or without (2 $\times$ A β 1–15) the addition of a three-amino-acid RGD-motif at the N terminus of the peptide. The third and fourth immunogens contain a previously characterized cross-species active T1 Th cell epitope connected by two lysines to the A β 1–15 sequence with (T1-R-A β 1–15) or without (T1-A β 1–15) the RGD motif N-terminal to the lysine linker. **B**, CD spectra of the four novel peptides and A β 40/42. A β 40/42 shows a typical β -sheet spectrum characterized by a minimum near 220 nm and a maximum near 195 nm (thin black line). The four novel immunogen-peptides exhibit spectra indicative of unstructured peptides (gray lines) that are independent of the peptide concentration, except for T1-R-A β 1–15, which shows trace amounts of helical content at 1000 μ g/ml (thick black line; minima at 208 and 222 nm, maximum at 198 nm).

uating the association between the titer levels and memory indices. A Mann–Whitney *U* (MWU) test was used for statistical analysis of ACI and percentage dwelling time values from probe trials, as well as for immunoreactive area and A β levels in hAPP_{PAD}-tg mice determined by ELISA. The critical α level was set to 0.05 for all statistical analyses. All values reported are average $\pm$ SEM.

Results

Design and biophysical characterization of four novel A β 1–15-containing peptide-immunogens

The first novel immunogen consisted of a tandem repeat of the human N-terminal A β 1–15 sequence linked by two lysines (2 $\times$ A β 1–15) (Fig. 1A) to reduce the production of antibodies against newly created epitopes created by the direct linkage of a tandem repeat (Oishi et al., 2001). R-2 $\times$ A β 1–15 peptide, the second immunogen, contained, in addition, a three-amino-acid RGD-cell attachment motif at the N terminus, which was previously shown to increase immunogenicity and replace the use of adjuvant in combination with a different immunogen (Yano et al., 2003). The third immunogen contained a previously characterized, exogenous T1 T-helper cell epitope connected by two lysines to a single A β 1–15 sequence (T1-A β 1–15). The T1 sequence is a T-cell epitope of HIVIIB gp120 (human immunodeficiency virus type IIB envelope glycoprotein 120) (Cease et al., 1987) mutated to enhance immunogenicity and is recognized at multiple major histocompatibility complex (MHC) loci in mice (Ahlers et al., 1997) and other species such as goats, nonhuman primates, and humans (Hart et al., 1990; Haynes et al., 1993; Yano et al., 2003). The fourth immunogen was T1-R-A β 1–15 and included the RGD motif N terminal to the lysine linker, which was the most efficient position according to a previous study (Yano et al., 2003).

As a first step, we determined whether 2 $\times$ A β 1–15, R-2 $\times$ A β 1–15, T1-A β 1–15, and T1-R-A β 1–15 aggregate into a β -sheet structure as has been observed for full-length A β and its C-terminal fragments. At a peptide concentration of 50 μ g/ml, all four novel immunogen peptides showed a CD spectrum typical for an unstructured peptide, whereas A β 40/42 showed a spectrum characteristic for β -sheet structures (minimum near 220 nm, maximum near 195 nm) (Fig. 1B, thin black line). T1-R-

similar at the higher concentration of 1 mg/ml, except for T1-R-A β 1–15 peptide, which showed trace amounts of helical content (minima at 208 and 222 nm, maximum at 198 nm) (Fig. 1B, thick black line). This is in agreement with previous observations, suggesting a potential for the T-cell site T1 to form amphipathic helices (Cease et al., 1987). Thus, our four novel immunogens did not form β -sheet aggregates and, consequently, are unlikely to present potential neopeptides specific for aggregated A β .

Characterization of anti-A β antibody responses in nontransgenic mice

In the first set of experiments, B6D2F1 wild-type mice were intranasally immunized once a week with 50 μ g of 2 $\times$ A β 1–15 or R-2 $\times$ A β 1–15 and 5 μ g of LT(R192G) adjuvant. Every two weeks, blood plasma was collected and anti-A β antibody levels were determined by anti-A β 40 ELISA (Fig. 2A). After 4 weeks, low levels of anti-A β antibodies could be detected in all four animals immunized with R-2 $\times$ A β 1–15 and in two of four animals immunized with 2 $\times$ A β 1–15. In the following weeks, anti-A β antibody levels for the R-2 $\times$ A β 1–15 immunogen continued to increase faster and peaked at 1884 ± 170 μ g/ml by week 8 and slightly dropped thereafter. Antibody levels for 2 $\times$ A β 1–15 reached 1002 ± 194 μ g/ml by week 8 and remained at this high level after additional treatments. Antibody levels for both immunogens were comparable after week 12 and were overall ~2–3 times higher compared with immunization with aggregated A β 40/42 (Fig. 2B). Immunization with these peptides in the absence of an adjuvant, or immunization with adjuvant alone, did not induce detectable levels of antibodies (Maier et al., 2005a).

In a second set of experiments, we compared intranasal immunization using 50 μ g T1-R-A β 1–15, T1-A β 1–15, or A β 40/42 and 5 μ g LT(R192G) in B6D2F1 mice. After six weeks, three of four animals produced low levels of antibodies increasing up to 252 ± 127 μ g/ml by week 12 with the T1-R-A β 1–15 peptide. T1-A β 1–15-immunized animals had detectable antibody levels by week 8, increasing up to 333 ± 102 μ g/ml by week 12. Overall, antibody titers induced by T1 containing-immunogens remained approximately two times lower compared with those mice immunized with full-length A β 40/42. Immunization with T1-R-A β 1–15 or T1-A β 1–15 in the absence of adjuvant induced only very low antibody levels (Fig. 2B) in a subset of animals. No anti-A β antibodies were detected in preimmune plasma from any mouse included in these studies.

Isotypic profiles and mapping of antibody epitopes

Ig isotyping of anti-A β antibodies was performed on the final bleed using isotype-specific ELISAs. IgG2b, a noninflammatory Th2 isotype Ig, was the predominant Ig isotype in all five treatment groups. In addition, lower levels of IgG1 (Th2) and IgG2a (Th1) were detected in all groups, whereas low amounts of IgA and IgM were detected in the R-2 $\times$ A β 1–15- and 2 $\times$ A β 1–15-immunized groups (for overview, see Fig. 3A, Table 1).

To determine the specificity of the A β -antibodies, three different plasma dilutions (1:1000, 1:10,000, and 1:25,000) from each of the immunized mice were used for IHC on human AD cortical brain sections. Antibodies induced by all five immunogens labeled diffuse and compacted plaques similar to the monoclonal anti-A β antibody 6E10 raised against A β 1–17 (Fig. 3D). Representative examples are shown for plasma from 2 $\times$ A β 1–15 (Fig. 3B) and T1-R-A β 1–15-immunized (Fig. 3C) animals. Overall, the highest plasma dilution able to stain plaques in IHC correlated well with the antibody titers determined by anti-A β 40 ELISA (data not shown).

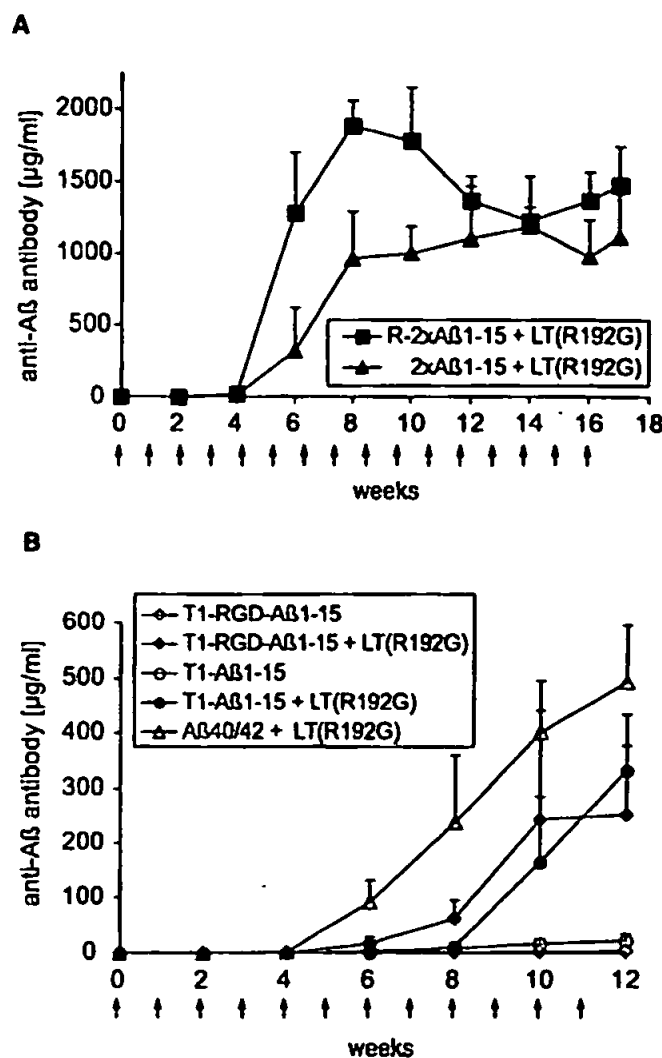


Figure 2. Plasma anti-A β antibody levels after weekly, intranasal immunization of B6D2F1 mice with 50 μ g of peptide plus 5 μ g of mutant, heat-labile enterotoxin LT(R192G) adjuvant as determined by anti-A β 40 ELISA. **A**, Immunization with 2 $\times$ A β 1–15-containing immunogens generated high serum titers of anti-A β antibodies after six weeks. R-2 $\times$ A β 1–15 plus LT(R192G)-immunized animals showed a faster increase in their antibody levels than 2 $\times$ A β 1–15 plus LT(R192G)-immunized mice but reached similar levels after 12 weeks and were ~2–3 times higher compared with immunization with A β 40/42 (**B**). **B**, Weekly immunization with T1-R-A β 1–15 or T1-A β 1–15 plus LT(R192G) led to the generation of intermediate antibody levels, which remained below the titers achieved with A β 40/42 plus LT(R192G) immunization. In the absence of adjuvants, T1-containing peptides induced only very low antibody levels. Data are mean $\pm$ SEM for each group ($n = 4$). Arrows indicate intranasal dosing schedule.

Preincubation with A β 1–15, A β 1–7, and to a lesser extent A β 3–9 inhibited binding of antibodies from 2 $\times$ A β 1–15- or R-2 $\times$ A β 1–15-immunized animals to immunogen-peptide-coated ELISA plates, indicating that the major antibody epitope is found within A β 1–7 (Fig. 3E). In T1-A β 1–15- or T1-R-A β 1–15-immunized animals, A β 1–15 reduced antibody binding similar to full-length immunogen or A β 1–42. Absorption with shorter A β 1–7 or A β 3–9 reduced the OD less compared with antibodies of 2 $\times$ A β 1–15- or R-2 $\times$ A β 1–15-immunized animals, indicating that the major antibody epitopes are found within A β 1–15 with the T1-containing immunogens. A β 1–42 had a similar absorbing effect compared with the immunogen peptides themselves, and the addition of RGD peptide or the RGD-containing protein

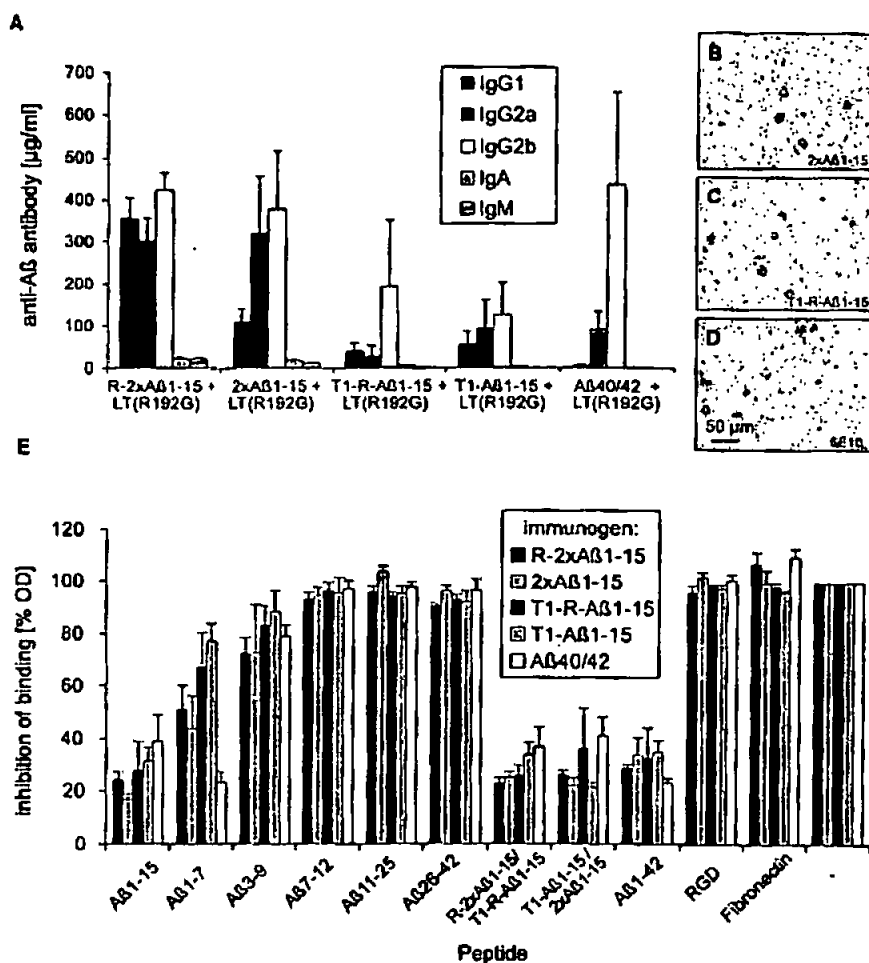


Figure 3. Immunoglobulin isotyping of plasma IgG1, IgG2a, IgG2b, IgA, and IgM anti-A β antibodies as determined by isotype-specific ELISA in the final bleed. **A**, IgG2b anti-A β antibodies were the predominant Ig isotype in all five treatment groups. In addition to IgG2b antibodies, mice immunized with R-2 $\times$ A β 1-15 or 2 $\times$ A β 1-15 produced high levels of IgG2a and IgG1, and mice immunized with T1-A β 1-15 or A β 40/42 showed intermediate levels of mainly IgG2a. Low levels of IgA and IgM antibodies were present in mice immunized with R-2 $\times$ A β 1-15 and 2 $\times$ A β 1-15. Data are mean $\pm$ SEM. **B–D**, Antibodies induced by all four novel immunogens were able to detect diffuse and compacted plaques on formalin-fixed paraffin-embedded brain tissue from AD patients similar to anti-A β antibody 6E10 (**D**). A representative example is shown for a 1:10,000 dilution of plasma from a 2 $\times$ A β 1-15- (**B**) or T1-R-A β 1-15-immunized (**C**) animal. **E**, Epitope-mapping of antibodies was performed by preincubating mouse plasma overnight with short A β peptide fragments. The remaining ability of the antibodies to bind plate-bound immunogen was then measured by ELISA. Preincubation with A β 1-15, A β 1-7, and to a lesser extent A β 3-9 inhibited binding to plate-bound immunogen, indicating that the major antibody epitope is within A β 1-15 for mice immunized with T1-A β 1-15 or T1-R-A β 1-15 and within A β 1-7 for mice immunized with 2 $\times$ A β 1-15 or R-2 $\times$ A β 1-15. The immunogen peptides or A β 1-42 reduced the OD to a similar extent compared with A β 1-15, and the addition of the RGD peptide or the RGD-containing protein fibronectin did not interfere with binding of the antibodies in the assay. This indicates that the vast majority of antibodies were directed against the A β 1-15 sequence and not against other parts of the immunogen peptides. OD levels are shown relative to no peptide control. Data are mean $\pm$ SEM ($n = 4$).

fibronectin did not interfere with binding of the antibodies to their immunogen peptide. This confirmed the specificity of the antibodies to the N-terminal A β sequence and excludes a major population of antibodies directed against other sequences of the immunogen peptides.

Strong cellular immune response against the immunogen in the absence of specific proliferation against full-length A β

To characterize the cellular immune response, splenocyte cultures were established from R-2 $\times$ A β 1-15- or 2 $\times$ A β 1-15- (Fig. 4A–D) and T1-R-A β 1-15-, T1-A β 1-15-, or A β 40/42-immunized (Fig. 4E–H) wild-type mice and stimulated with dif-

ferent concentrations of the immunogen peptides A β 40/42 or A β 1-15 (Fig. 4). Highest SIs were observed in splenocytes restimulated with their corresponding immunogen (Fig. 4A,B,E–G). A strong, cross-reactive proliferative response was also detected if splenocytes were restimulated with the corresponding immunogen containing or lacking the RGD-motif. For example, splenocytes from R-2 $\times$ A β 1-15-immunized animals showed an intermediate, cross-reactive proliferative response after restimulation with 2 $\times$ A β 1-15, and vice versa (Fig. 4A,B). To determine whether the cellular immune response was directed to A β , we restimulated splenocytes from all groups with aggregated full-length A β 40/42. This induced proliferation only in A β 40/42-immunized animals, as expected from previous studies (Seabrook et al., 2004; Maier et al., 2005b), but did not induce significant SI in other immunized groups (Fig. 4C,G). After restimulation with the highest dose of A β 40/42 (50 μ g/ml), very low proliferation was detected in splenocytes of R-2 $\times$ A β 1-15- and 2 $\times$ A β 1-15-immunized mice, but a comparable SI was also found in nontreated animals (SIs of 4.3, 5.7, and 2.1, respectively) (Fig. 4C), indicating that this may have been caused by a general stimulation by peptide aggregates. No significant responses were detected after restimulation with A β 1-15 in any group of animals (Fig. 4D,H).

High antibody titers and an immunogen-specific cellular immune response in R-2 $\times$ A β 1-15- or 2 $\times$ A β 1-15-immunized hAPP^{FAD} mice

Because R-2 $\times$ A β 1-15 and 2 $\times$ A β 1-15 immunogens induced high titers of specific anti-A β antibodies in B6D2F1 wild-type mice, we tested the ability of these peptides to induce an immune response and their efficacy to reduce cerebral A β burden in hAPP^{FAD} transgenic mice (line J20) (Mucke et al., 2000). In the first experiment, hAPP^{FAD} mice were immunized intranasally with R-2 $\times$ A β 1-15 plus LT(R192G) adjuvant weekly starting at 6

months of age, when plaque deposition was in early stages. The control group received adjuvant only. Within 6–8 weeks of treatment, R-2 $\times$ A β 1-15-immunized mice developed high antibody titers, which peaked at 1173 ± 341 μ g/ml at week 14 and decreased slightly after we switched to biweekly intranasal treatment (Fig. 5A). The main immunoglobulin isotypes in plasma from the final bleed were IgG2b and IgG1 (both noninflammatory Th2 immunoglobulins) (Fig. 5B), with proportionally less IgG2a (proinflammatory Th1) compared with levels detected in wild-type mice. Low levels of IgA and IgM were detected in mice immunized with R-2 $\times$ A β 1-15. The antibodies recognized

Table 1. Summary results of all immunization experiments

Genotype	Immunogen	Antibody titers ^a	Relative levels of Ig isot/pos ^b					Epitope ^c	Histology hippocampus (% change) ^d							Brain (% change) ^e				Plasma (% change) ^f			
			IgG1	IgG2a	IgG2b	IgA	IgM		Aβ ₁₋₄₂	Aβ ₁₋₄₀	Aβ ₁₋₃₅	Thio S	CD45	GFAP	Aβ ₁₋₄₂	Aβ ₁₋₄₀	Aβ ₁₋₃₅	Aβ ₁₋₄₀	Aβ ₁₋₄₂	Aβ ₁₋₃₅	Aβ ₁₋₄₀		
WT B6D2F1	R-2xAb1-15	1372 ± 165	+++	+++	+++	+	+	Aβ ₁₋₁₅															
	2xAb1-15	1103 ± 363	++	+++	+++	+	+	Aβ ₁₋₁₅															
	T1-RAβ1-15	252 ± 127	+	+	+++	-	-	Aβ ₁₋₁₅															
	T1-Aβ1-15	333 ± 102	+	++	+++	-	-	Aβ ₁₋₁₅															
	Aβ1-40/42	532 ± 101	-	+	+++	-	-	Aβ ₁₋₁₅															
hAPP _{sw} (J70)	R-2xAb1-15	931 ± 183	++	+	+++	++	++	Aβ ₁₋₁₅	-74°	-74°	-54°	-54°	-18	-18	-35	-36	+48°	+51°	+61°	nd	nd		
	2xAb1-15	1685 ± 483	++	+	+++	+	+	Aβ ₁₋₁₅	-73°	-70°	-6	+4	+45	+9	-34	-2	-10	-9	nd	+330°	+85°		

^aBlood week 12 (μg/ml).
^bFinal bleed: ELISA.
^cCompared with corresponding control.
^dGx: TBS-insoluble Aβ (5 nM guanidinium-schleide).
^eTBS-soluble Aβ.
^fnd, Not determined.
^gSignificant difference compared with control (P < 0.05, MWU).

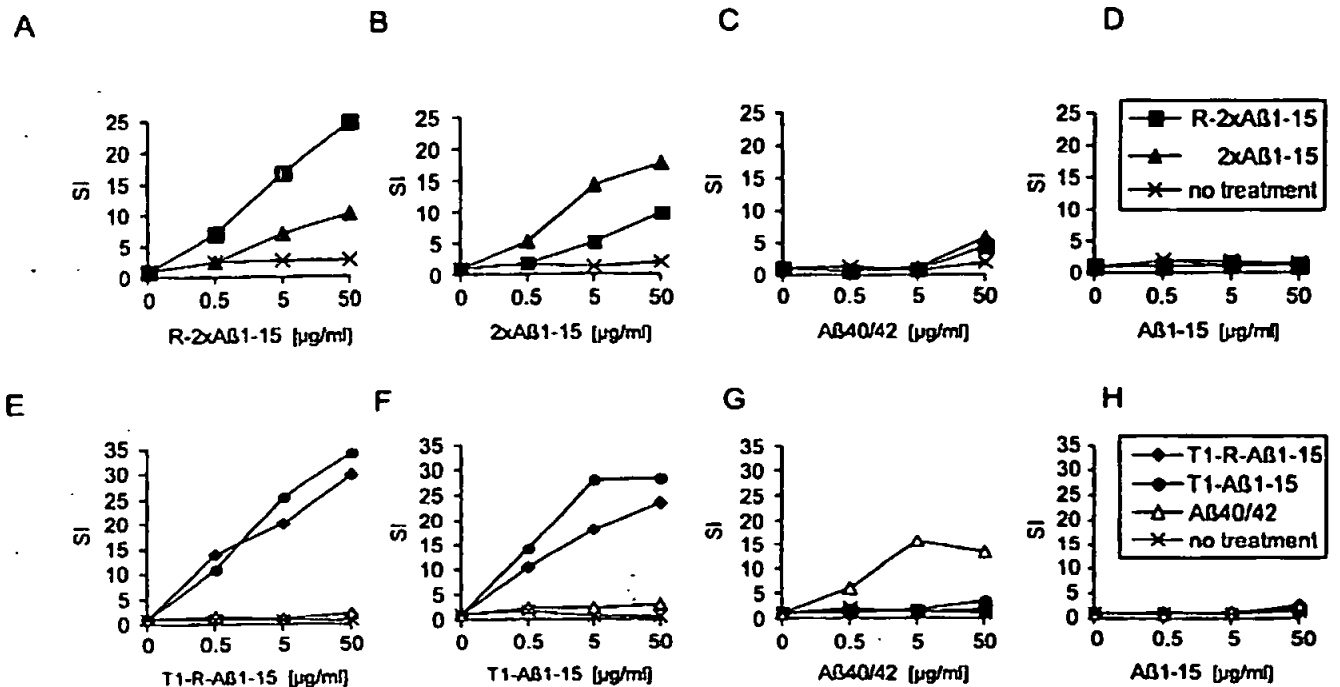


Figure 4. Splenocytes from 2xAb1-15- or 2xAb1-15- (A–D) and T1-Aβ1-15-, T1-R-Aβ1-15-, or Aβ40/42-immunized (E–H) animals were isolated and cultured as indicated in the presence of 0, 0.5, 5, or 50 μg/ml R-2xAb1-15 (A), 2xAb1-15 (B), T1-R-Aβ1-15 (E), T1-Aβ1-15 (F), Aβ40/42 (C, G), and Aβ1-15 (D, H) for 72 h, after which [³H] thymidine was added for 18 h. The CPM was determined and an SI calculated. Splenocytes isolated from immunized mice showed a high SI in response to stimulation with their immunogen peptide. In splenocyte cultures of animals immunized with the novel peptide immunogens, only very low and mainly nonspecific proliferation was observed after restimulation with the highest dose of Aβ40/42 (C, G). No proliferation was detected in response to Aβ1-15 (D, H).

B6D2F1 mice (data not shown). No antibodies were detected in plasma of control animals.

After 24 weeks of treatment, splenocytes of 12-month-old hAPP_{FAD} mice were isolated and restimulated with R-2xAb1-15, Aβ40/42, or Aβ1-15. Comparable with wild-type mice, intermediate SIs were detected after restimulation with R-2xAb1-15 (Fig. 5C), but only very low SIs were measured after restimulation with the highest concentration of aggregated full-length Aβ40/42 (Fig. 5D), with similar values for immunized and control animals, indicating a lack of cellular immune response to full-length Aβ. No significant SIs were detected for restimulation with the same concentrations of Aβ1-15, fibronectin, or RGD-motif-containing protein (SI < 2; data not shown).

In a second experiment, we started immunization at an age of 4.5 months, just before plaque deposition, with 2xAb1-15 plus LT(R192G) or adjuvant only in the control group. Antibody titers peaked after 12 weeks of immunization with an average of 1686 ± 483 μg/ml (Fig. 5A) and had Ig isotypes and antibody epitopes similar to those observed after immunization with R-2xAb1-15 (Fig. 5B). After 30 weeks of treatment, splenocytes of these 12-month-old hAPP_{FAD} mice were isolated and restimulated with 2xAb1-15, Aβ1-40, Aβ40/42, or Aβ1-15. Intermediate stimulation indices were detected after restimulation with 2xAb1-15 (Fig. 5E), whereas no specific proliferation was observed after restimulation with Aβ1-40 (Fig. 5F), aggregated Aβ40/42, or Aβ1-15 (data not shown).

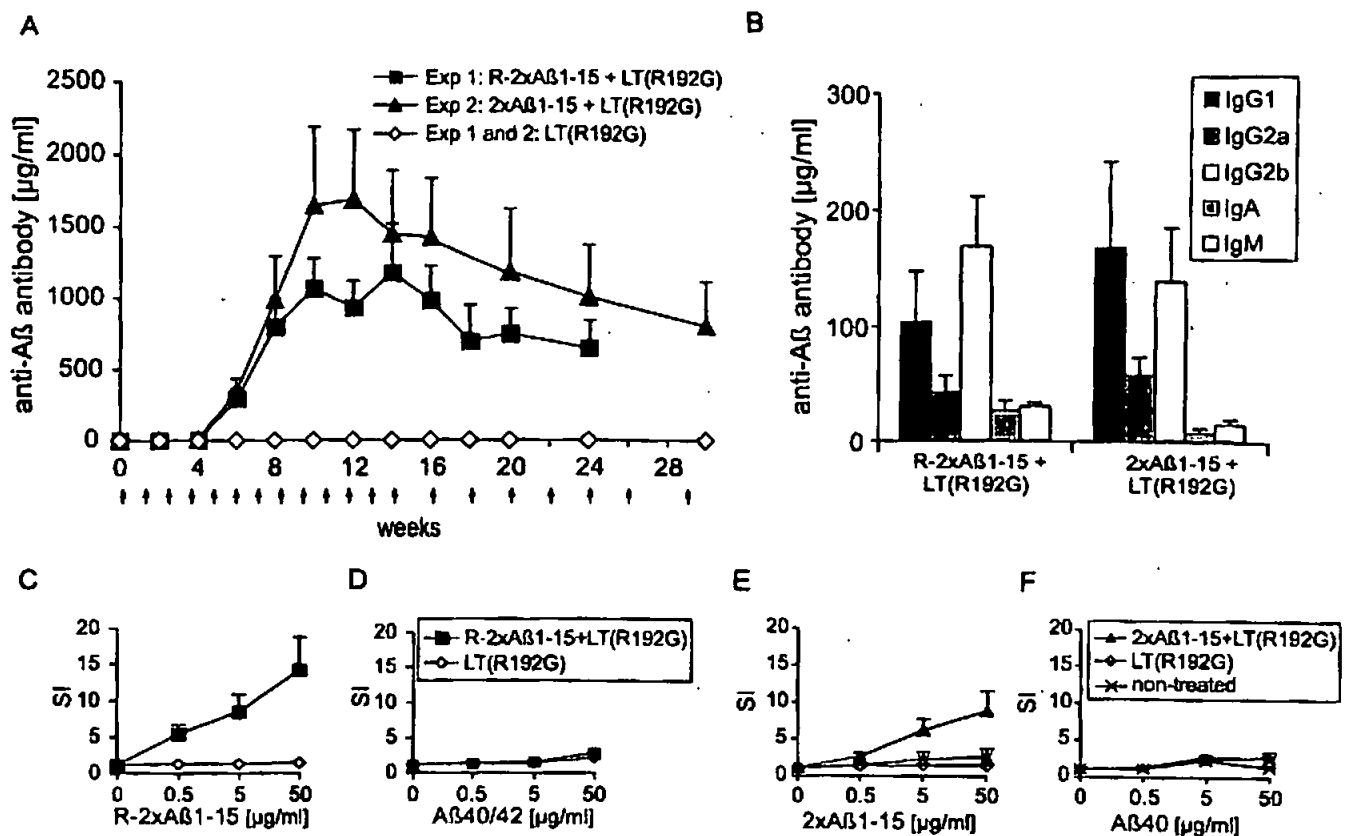


Figure 5. *A*, Immunization of hAPP_{FAD} (J20 line) animals with R-2xAb1-15 ($n = 6$) or 2xAb1-15 ($n = 6$) induced high levels of anti-A β antibodies as determined by anti-A β 40 ELISA. Levels peaked at 10–14 weeks and dropped slightly after switching to biweekly immunization after week 14. Arrows indicate the intranasal dosing schedule. *B*, IgG2b and IgG1 were the main immunoglobulin isotypes of anti-A β antibodies in the final bleed of R-2xAb1-15- and 2xAb1-15-immunized animals. Lower levels of IgA and IgM were detected after immunization with R-2xAb1-15. *C*, Splenocytes from R-2xAb1-15 (*C*, *D*) or 2xAb1-15-immunized (*E*, *F*) hAPP_{FAD} animals showed intermediate stimulation indices after restimulation with R-2xAb1-15 (*C*) and 2xAb1-15 (*E*), respectively. Very low, nonspecific proliferation was detected in splenocytes of immunized and LT(R192G)-adjuvant-treated control hAPP_{FAD} mice ($n = 6$ and $n = 7$, respectively) or nontreated B6D2F1 animals ($n = 3$) after restimulation with aggregated A β 40/42 (*D*) or with A β 1–40 (*F*). Data are represented as mean $\pm$ SEM.

Reduction of cerebral A β load after immunization of hAPP_{FAD} mice

Immunization with R-2xAb1-15 plus LT(R192G) or 2xAb1-15 plus LT(R192G) significantly ($p < 0.05$) reduced total A β plaque burden (Fig. 6*A–C*) in the hippocampus by 74 and 73%, respectively, when examined using computer-assisted image analysis. A significant reduction of 74% in A β 42-specific immunoreactivity was observed in the hippocampus after immunization with R-2xAb1-15 plus LT(R192G) ($p < 0.05$) and of 70% after immunization with 2xAb1-15 plus LT(R192G) ($p < 0.05$) (Fig. 6*D*, *E*, Table 1). A β 40-specific immunoreactivity was significantly reduced by 54% with R-2xAb1-15 plus LT(R192G) ($p < 0.05$) but not in mice receiving 2xAb1-15 plus LT(R192G). Thioflavine S-positive plaque load was significantly reduced by 54% in mice immunized with R-2xAb1-15 plus LT(R192G) ($p < 0.05$) but not in those immunized with 2xAb1-15 plus LT(R192G). GFAP, a marker for astrocytes, was reduced by 18% in R-2xAb1-15 plus LT(R192G) immunized mice versus controls ($6.6 \pm 1.0\%$ vs $8.3 \pm 1.3\%$, immunized vs control, respectively; $p > 0.05$) and was slightly increased in 2xAb1-15 plus LT(R192G) immunized mice ($9.1 \pm 1.6\%$ vs $8.2 \pm 0.6\%$; $p > 0.05$). CD45 immunoreactivity, a marker for activated microglia, was nonsignificantly reduced by 50% in R-2xAb1-15 plus LT(R192G) immunized mice compared with vehicle controls ($0.8 \pm 0.3\%$ vs $1.7 \pm 0.4\%$, respectively), whereas mice immunized with 2xAb1-15 plus LT(R192G)

showed a trend for an increase by 45% ($1.0 \pm 0.3\%$ vs $0.7 \pm 0.1\%$, immunized vs control, respectively). CD-5 positive cells, a marker for T-cells, and hemosiderin staining, a histological staining to detect microhemorrhages (Pfeifer et al., 2002), were not detected in the brain parenchyma (data not shown).

Biochemical analysis of plasma A β levels by ELISA showed a significant increase of plasma A β levels in the final bleed of the immunized animals (Fig. 6*F*, *G*). Cerebral insoluble (guanidinium buffer-soluble) A β 42 and A β 40 levels were reduced by 35% in the R-2xAb1-15 immunized group compared with the control group, but the changes did not reach significance because of variability and small group size (Fig. 6*F*). TBS-soluble A β 40 and A β 42 levels were significantly elevated by 45 and 51%, respectively ($p < 0.05$), in the R-2xAb1-15 immunized group. A nonsignificant 34% reduction of cerebral insoluble A β 42 was observed in 2xAb1-15 immunized mice compared with controls, whereas insoluble A β 40 levels were similar between the groups (Fig. 6*G*) corresponding well with A β 40 immunoreactivity on brain sections (Fig. 6*E*). TBS-soluble A β 40 and A β 42 were comparable in 2xAb1-15 immunized and control groups.

Behavioral analysis of 2xAb1-15 immunized hAPP_{FAD} mice
The effect of immunization with 2xAb1-15 plus LT(R192G) was assessed in a reference-memory version of the MWM, a hippocampus-dependent learning task (Morris et al., 1982). One

analysis because of the lack of reliable antibody detection ($\sim 2 \mu\text{g/ml}$). The body weight of mice at the end of the MWM tests was comparable in both groups (data not shown).

Immunized hAPP_{FAD} animals showed faster learning acquisition during the first four training sessions compared with adjuvant-only treated-control hAPP_{FAD} mice (Fig. 7A). However, after day 5, both groups showed comparable performances. Overall, both groups showed a significant improvement in performance over the 12 d training period ($p < 0.001/\text{d}$, a within-subject factor) with no significant interaction of treatment by day ($p > 0.2$). The results of the probe trials indicate that both cohorts did not retain a clear memory bias for the platform location 20 h after the last training session on day 2 and day 6, as evaluated by the annulus-crossing index (Fig. 7A, insert). The results of the percent of time dwelled in the target quadrant were comparable with the annulus-crossing scores (data not shown). To substantiate the results of faster learning acquisition by the immunized hAPP_{FAD} mice, we focused our attention on the learning plasticity in the tested mice.

To test plasticity of spatial memory acquisition, we subjected the same cohorts of mice to the spatial learning reversal MWM task. Consistent with the results of the first test, the 2 $\times$ A β 1–15 plus LT(R192G) immunized hAPP_{FAD} mice showed a trend of faster initial acquisition of the new platform location as compared with control hAPP_{FAD} mice (Fig. 7B). During the reversal stage, both cohorts of mice showed a comparable response to the platform displacement (Fig. 7B, d4 and d5). The results of the probe trials performed at the end of each acquisition stage showed that the immunized hAPP_{FAD} mice formed a positive memory bias in both probe trials on day d3 (initial relearning) and on day d5 (after learning reversal) (Fig. 7C). The control hAPP_{FAD} mice showed a negative ACI, which indicates that they searched for the platform in a different quadrant of the pool. The results of the quadrant dwelling time support this interpretation and indicate that these mice persevered with their search in the original, previous location of the pool (Fig. 7D). Moreover, spatial memory, as evaluated by ACI, in both probe trials of the learning reversal experiment correlated positively with antibody titers of immunized mice ($r = 0.78$, $p = 0.051$; $r = 0.62$, $p = 0.088$, respectively; $n = 6$). Although, the p values only bordered the $p = 0.05$ significance level (likely because of a small sample size), the trend of improved memory attributable to higher titer level is clear and consistent across both trials.

Discussion

We tested four novel immunogens encompassing either a tandem repeat of two lysine-linked A β 1–15 sequences (2 $\times$ A β 1–15)

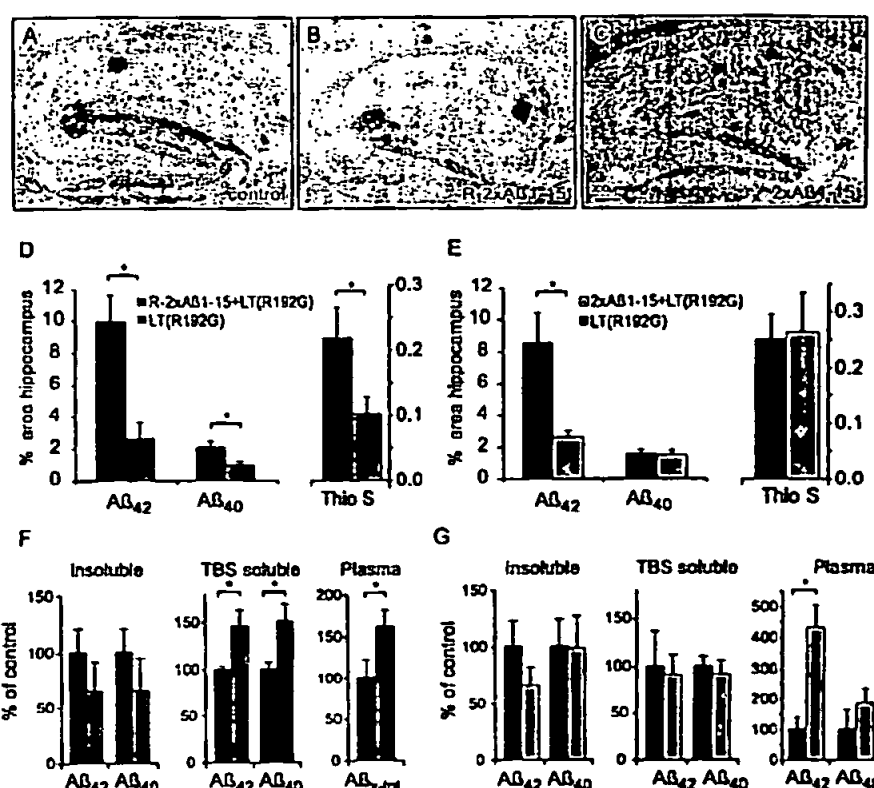


Figure 6. Neuropathological and biochemical analysis of R-2 $\times$ A β 1–15- (B, D) or 2 $\times$ A β 1–15-immunized (C, E) animals compared with their corresponding group of adjuvant-treated control hAPP_{FAD} animals (A, D, E). A–C, Sections representing the median A β plaque load are shown for each group (A–C). D, E, Quantitative image analysis of A β 42- and A β 40-specific immunoreactive and Thioflavine S-positive plaque load. A β 42-, A β 40-, and Thioflavine S-positive area was significantly reduced in the hippocampus after immunization with R-2 $\times$ A β 1–15 plus LT(R192G) (D; $p < 0.05$, MWU). 2 $\times$ A β 1–15 plus LT(R192G)-immunized mice showed a significant reduction of A β 42 specific immunoreactivity (E; $p < 0.05$, MWU) compared with vehicle treated controls. F, G, Insoluble (guanidinium-soluble) brain A β , TBS-soluble brain A β , and plasma A β levels were analyzed by capture ELISA (absolute values of controls in R-2 $\times$ A β 1–15-immunization experiment (F): Plasma A β_{42} , 0.03 ± 0.01 pmol/ml; A β 42 insoluble, 2052 ± 417 pmol/g; A β 40 insoluble, 485 ± 100 pmol/g; A β 42 TBS soluble, 1.6 ± 0.1 pmol/g; A β 40 TBS soluble, 0.3 ± 0.1 pmol/g; and in the 2 $\times$ A β 1–15-immunization experiment (G, measured in a different ELISA run): A β 40 plasma, 0.9 ± 0.6 pmol/ml; A β 42 plasma, 0.3 ± 0.1 pmol/ml; A β 42 insoluble, 3590 ± 800 pmol/g; A β 40 insoluble, 132 ± 32.5 pmol/g; A β 42 TBS soluble, 2.1 ± 0.8 pmol/g; A β 40 TBS soluble, 4.6 ± 0.5 pmol/g). Asterisk indicates a significant difference (MWU, $p < 0.05$). Data are represented as mean $\pm$ SEM.

or A β 1–15 synthesized to a cross-species active T1 T-helper cell epitope (T1-A β 1–15) and each with the addition of a three-amino-acid RGD-cell attachment motif (R-2 $\times$ A β 1–15; T1-R-A β 1–15). Intranasal immunization of B6D2F1 wild-type mice with R-2 $\times$ A β 1–15 or 2 $\times$ A β 1–15 in combination with LT(R192G) adjuvant (Dickinson and Clements, 1995) induced anti-A β antibody titers 2–3 times higher than those achieved with aggregated, full-length A β 40/42. Immunization with T1-R-A β 1–15 or T1-A β 1–15 plus LT(R192G) resulted in lower antibody levels. With all intranasal immunogens, a moderate-to-strong cellular immune response was detected against the immunogen in the absence of a cellular immune response against full-length A β . Antibody epitopes (A β 1–7 or A β 1–15), predominant immunoglobulin isotype (IgG2b), and recognition of plaques by antibodies from immunized mouse plasma on human AD brain sections were similar to antibodies induced by immunization with A β 40/42. hAPP_{FAD} mice (J20 line) immunized with R-2 $\times$ A β 1–15 or 2 $\times$ A β 1–15 also developed high antibody levels and antibody epitopes similar to wild-type mice, and showed a significant reduction of A β plaque load, significantly increased A β plasma levels, and a trend for lower insoluble cerebral A β by

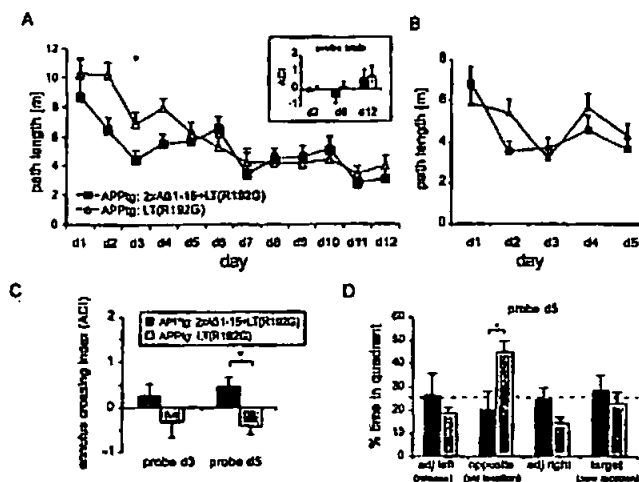


Figure 7. The effect of immunization with 2 $\times$ A β 1–15 plus LT(R192G) was assessed in a reference-memory version of the MWM. **A**, 2 $\times$ A β 1–15 plus LT(R192G)-immunized hAPP_{FAD} mice ($n = 6$) showed significantly faster learning acquisition during the first four training sessions of a 12 d test as compared with adjuvant-only-treated control hAPP_{FAD} animals ($n = 7$; $p < 0.05$; days 1 to 5). Both cohorts of mice showed comparable spatial memory as evaluated by the ACI (defined as average frequency of swims over the platform site in the target quadrant minus average of swims over sites in other quadrants of the pool) at the end of training (**C**, inset). **B**, During the learning reversal task, 2 $\times$ A β 1–15 plus LT(R192G)-immunized hAPP_{FAD} mice showed a trend of faster initial acquisition of the new platform location as compared with control hAPP_{FAD} mice during the first three training sessions ($p = 0.09$; days 1 to 3). During the reversal stage (days 4 and 5), both cohorts of mice showed a comparable response to platform displacement. **C**, ACI during probe trials administered 1 h after training on days 3 and 5 in the platform reversal task. 2 $\times$ A β 1–15 plus LT(R192G)-immunized mice (black bars) show a positive ACI for the platform location on day 3 or day 5, whereas control hAPP_{FAD} mice (gray bars) show a significantly lower and negative ACI. **D**, Quadrant dwell times of probe-trial day 5 indicate that control hAPP_{FAD} mice (gray bars) perseverated with their search in the original, previous location of the pool. Asterisks indicate significant results ($p < 0.05$). Data are represented as mean $\pm$ SEM.

ELISA. Whereas in wild-type mice the Ig isotypes for the new immunogens included IgG2b, IgG2a, and IgG1, immunized hAPP_{FAD} mice had a more Th2-biased humoral response resulting in higher titers of IgG2b and IgG1. Importantly, splenocytes from hAPP_{FAD} mice immunized with R-2 $\times$ A β 1–15 or 2 $\times$ A β 1–15 did not react to full-length A β or A β 1–15, indicating the potential for avoiding an A β -specific T-cell response. In addition, our results suggest that immunization of mice with 2 $\times$ A β 1–15 improved plasticity of acquisition of spatial information and spatial reference memory, as evaluated in the Morris water-maze test, as compared with age-matched control mice. Cognitive improvement tended to correlate with anti-A β titers in the immunized hAPP_{FAD} mice.

Previously, we demonstrated that A β 1–15 was not an effective primary immunogen, but was able to boost the immune response in WT mice after immunization with full-length A β (Leverone et al., 2003). In the present study, we show that a tandem repeat of A β 1–15 was sufficient to effectively overcome this lack of immunogenicity. According to the high SI after restimulation of splenocytes with their immunogen and absence of proliferation after addition of A β 1–15, one may speculate that this is attributable to the formation of a new, unknown T-cell epitope that is not present in a single sequence of A β 1–15. Furthermore, it may also be attributable to its larger size, leading to less degradation, and presentation of a nonself sequence using the tandem repeat.

Addition of the RGD motif to the immunogens did not substantially increase antibody titers in long-term immunizations

other immunogens (Yano et al., 2003). A consistent effect of RGD-containing immunogens is slightly higher SIs, indicative of a stronger cellular immune response (Figs. 4, 5). The fact that we did not detect a proliferative response against the RGD-peptide or the RGD-motif containing protein fibronectin in splenocyte cultures (data not shown) demonstrates that RGD did not act as a T-cell epitope. RGD is an integrin-binding and cell-attachment motif derived from cellular adhesion proteins such as fibronectin, collagen, fibrinogen, laminin, and many microbial proteins (Ruoslahti, 1988; Mecham, 1991; Ruoslahti, 1996). Therefore, the addition of RGD may increase uptake and transport through the mucous membrane by utilization of specific receptors (Ruoslahti, 1996), enhancing presentation of the antigen *in vivo*. However, splenocytes from R-2 $\times$ A β 1–15 immunized mice showed higher SI after restimulation with R-2 $\times$ A β 1–15 compared with 2 $\times$ A β 1–15, suggesting that RGD contributes to the secondary structure of the 2 $\times$ A β 1–15-containing immunogens by creating a new, slightly different T-cell epitope. Regardless of the mechanisms, RGD-containing peptides did not increase A β antibody levels but did accelerate antibody production.

Both A β 1–15 tandem repeat immunogens significantly reduced total A β plaque load and increased A β plasma levels in hAPP_{FAD} mice. In general, a more robust reduction was observed by immunohistochemical and Thioflavine S plaque labeling compared with the biochemical levels obtained by ELISA. This is likely because of the variability of A β levels between mice within each treatment group, resulting in a nonsignificant trend for reduced insoluble A β . However, reduced plaque burden corresponded with reduced TBS-insoluble A β fractions in brain homogenates. In contrast to R-2 $\times$ A β 1–15, 2 $\times$ A β 1–15 seemed to clear mainly A β 1–42 and did not alter A β 40 immunoreactivity, cerebral guanidinium-soluble A β 40 levels, or Thioflavine S-positive plaque load. These differences between the immunogens may be because of high interanimal variability of A β plaque load or differences in the age when immunization was started. Alternatively, one may speculate that different A β clearance mechanisms may be involved. Different mechanisms of A β removal by antibodies have been proposed in the past (reviewed by Citron, 2004). They may include (1) Fc receptor (FcR)-mediated activation of microglia and subsequent phagocytosis of A β (Schenk et al., 1999; Bard et al., 2000; Bard et al., 2003), (2) the direct interaction of the antibody with A β deposits or aggregates leading to their disaggregation (Frenkel et al., 2000), and (3) transport of soluble A β into the plasma with a subsequent antibody-mediated degradation ("peripheral sink hypothesis") (DeMattos et al., 2001; Lemere et al., 2003). Recently, Deane et al. (2005) showed that anti-A β IgG increases A β clearance from the brain through effects on A β transport across the blood–brain barrier mediated by neonatal FcR (FcRn) or low-density lipoprotein receptor-related protein-dependent mechanisms (Deane et al., 2005). These mechanisms may be combined with other effects such as masking the proinflammatory and vasoactive effect of A β in the cerebrovasculature (Townsend et al., 2002) by antibodies, particularly in light of recent reports regarding brain-volume changes after A β immunotherapy (Fox et al., 2005). We observed increased levels of TBS-soluble A β after immunization with R-2 $\times$ A β 1–15, suggesting that perhaps the antibodies caused disaggregation of A β , presumably in the CNS, or alternatively, prevented the aggregation of A β over the immunization period. In addition, it is possible that the IgM titers in R-2 $\times$ A β 1–15-immunized animals may have contributed to the differences seen

posed to contribute to clearance of plaques by a peripheral mechanism (Sigurdsson et al., 2004).

In the present study, we observed increased plasma A β levels in immunized animals, suggesting a shift of A β from the brain into the periphery leading to enhanced catabolism of A β as has been described previously (DeMattos et al., 2001). CD45 immunoreactivity, a marker for activated microglia, was reduced in R-2 $\times$ A β 1–15 immunized mice, whereas a slight increase was detected in 2 $\times$ A β 1–15 immunized animals. High levels of anti-A β antibodies may lead (temporarily) to activation of microglia as has been described for passive immunization (Wilcock et al., 2004a) leading to enhanced phagocytosis and degradation of cerebral A β via Fc receptor-mediated phagocytosis (Rogers et al., 2002). Although it has been reported that 0.1% of immunoglobulins cross the blood–brain barrier into the brain (Banks et al., 2002), colocalization of mouse IgG with cerebral plaques was not detected in our study, but this does not rule out the possibility that small numbers of antibodies crossed transiently into the CNS or were undetectable by our methods. It has been shown in many APP transgenic mouse models that fibrillar A β load correlates with activation of microglia (Frautschy et al., 1998; Gordon et al., 2002; Kitazawa et al., 2005). Consequently, we would expect to see relatively high levels of activated microglia in the mice immunized with 2 $\times$ A β 1–15, because their fibrillar plaque load was unchanged by immunization. In support of this effect, most activated microglia were found adjacent to or surrounding A β plaques.

Similar to our results with the tandem repeat immunogens, Bard and colleagues reported a reduction of amyloid and neuritic burden after immunization of PDAPP mice (transgenic mice carrying mutant human V717F APP under the PDGF promoter) with different N-terminal A β peptide fragments coupled to an ovalbumin T-cell epitope on a branched peptide framework (Bard et al., 2003). However, the specificity of the cellular immune response and amelioration of cognitive abilities were not addressed. Agadjanyan et al. (2005) reported that wild-type mice immunized with A β 1–15 synthesized to a universal synthetic T-cell epitope PADRE (pan human leukocyte antigen DR-binding peptide), generated high anti-A β antibody levels in the absence of a T-cell response against full-length A β . Our data regarding immunization with R-2 $\times$ A β 1–15 and 2 $\times$ A β 1–15 confirm their findings and extend them to APP-tg mice. However, in our study, B6D2F1 wild-type mice immunized with immunogens containing the T1 Th-cell epitope did not induce anti-A β antibody levels above those observed with aggregated A β 40/42. A strong cellular immune response against the immunogen was detected in the absence of splenocyte proliferation against full-length A β . Insertion of the T1 sequence at a different location (e.g., the C terminus of the immunogen) may improve antibody generation. The versatility of the T1 Th-cell epitope with different mouse MHC class II loci and different species make these immunogens an attractive candidate for additional studies in particular with other mouse strains or species. A recent publication analyzing gene expression profiles of patients from an AN-1792 immunization trial suggest reduced abilities to mount an effective immune response against A β , mainly because of the advanced age of the patients (O'Toole et al., 2005). Therefore, activation of the immune system in AD patients to mount an effective antibody response against A β and, in particular, to induce immunological memory, may require a strong universal T-cell epitope such as T1 that does not cross-react with A β T-cell epitope(s).

Cognitive evaluation of the immunization effects in our study

showed a consistent and significant but rather subtle improvement of spatial reference memory acquisition, likely attributable to the small number of animals available for the study. Cognitive improvement was accompanied by a trend for reduced insoluble A β 42, a significant reduction in A β 42 hippocampal plaque burden, and a lack of change in fibrillar plaques, indicating that removal of primarily diffuse A β led to improved cognition. Our results also suggest improved plasticity of relearning of new information after immunization of hAPP_{PAD} mice with 2 $\times$ A β 1–15, which is consistent with other studies evaluating learning and memory after A β immunization in the Morris water-maze task (Janus et al., 2000; Hartman et al., 2005), although a more pronounced effect of cognitive improvement was observed after A β immunization of younger mice (Jensen et al., 2005). The spatial memory measured in our probe trials showed a consistent trend to positively correlate with anti-A β antibody titers, additionally substantiating the notion that anti-A β antibodies have a beneficial effect on learning and memory.

Our data, together with reports from other researchers, demonstrate that immunogens containing N-terminal fragments of A β are sufficient for the production of high levels of specific antibodies. To our knowledge, our study is the first to characterize alternative immunogens that are able to induce high titers of anti-A β specific antibodies in the absence of a cellular immune response to full-length A β leading to a reduction of cerebral plaque burden and cognitive deficits in an AD animal model. We believe that these novel immunogens are promising candidates for a second-generation vaccine leading to an effective immunotherapy for AD while avoiding a potentially deleterious cellular immune response.

References

- Agadjanyan MG, Ghochikyan A, Petrushina I, Vasilevko V, Movsesyan N, Mkrtichyan M, Saing T, Cribbs DH (2005) Prototype Alzheimer's disease vaccine using the immunodominant B cell epitope from β -amyloid and promiscuous T cell epitope pan HLA DR-binding peptide. *J Immunol* 174:1580–1586.
- Ahlers JD, Takeshita T, Pendleton CD, Berzofsky JA (1997) Enhanced immunogenicity of HIV-1 vaccine construct by modification of the native peptide sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:10856–10861.
- Banks WA, Terrell B, Farr SA, Robinson SM, Nonaka N, Morley JE (2002) Passage of amyloid beta protein antibody across the blood-brain barrier in a mouse model of Alzheimer's disease. *Peptides* 23:2223–2226.
- Bard F, Cannon C, Barbour R, Burke RL, Games D, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Lieberburg I, Motter R, Nguyen M, Soriano F, Vasquez N, Weiss K, Welch B, et al. (2000) Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med* 6:916–919.
- Bard F, Barbour R, Cannon C, Carretto R, Fox M, Games D, Guido T, Hoenow K, Hu K, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee C, Lee M, Motter R, Nguyen M, Reed A, Schenk D, Tang P, Vasquez N, et al. (2003) Epitope and isotype specificities of antibodies to beta-amyloid peptide for protection against Alzheimer's disease-like neuropathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:2023–2028.
- Cain D, Beiko J, Boon F (1997) Navigation in the water maze: the role of proximal and distal visual cues, path integration, and magnetic field information. *Psychobiology* 25:286–293.
- Ceasre KB, Margalit H, Cornette JL, Putney SD, Robey WG, Ouyang C, Streicher HZ, Fischinger PJ, Gallo RC, DeLisi C, Berzofsky JA (1987) Helper T-cell antigenic site identification in the acquired immunodeficiency syndrome virus gp120 envelope protein and induction of immunity in mice to the native protein using a 16-residue synthetic peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:4249–4253.
- Citron M (2004) Strategies for disease modification in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 5:677–685.
- Cribbs D, Ghochikyan A, Vasilevko V, Tran M, Petrushina I, Sadzikava N, Babikyan D, Kesslak P, Kieber-Emmons T, Cotman C, Agadjanyan M

- (2003) Adjuvant-dependent modulation of Th1 and Th2 responses to immunization with beta-amyloid. *Int Immunol* 15:505–514.
- Deane R, Sagare A, Hamm K, Parisi M, LaRue B, Guo H, Wu Z, Holtzman DM, Zlokovic BV (2005) IgG-assisted age-dependent clearance of Alzheimer's amyloid β peptide by the blood–brain barrier neonatal Fc receptor. *J Neurosci* 25:11495–11503.
- DeMattos RB, Bales KR, Cummins DJ, Dodart JC, Paul SM, Holtzman DM (2001) Peripheral anti-A beta antibody alters CNS and plasma A beta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:8850–8855.
- Dickinson BL, Clements JD (1995) Dissociation of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin adjuvant activity from ADP-ribosyltransferase activity. *Infect Immun* 63:1617–1623.
- Dodart J-C, Bales K, Gannon K, Greene S, DeMattos R, Mathis C, DeLong C, Wu S, Wu X, Holtzman D, Paul S (2002) Immunization reverses memory deficits without reducing brain A β burden in Alzheimer's disease model. *Nat Neurosci* 5:452–457.
- Ferrer I, Boada Rovira M, Sanchez Guerra ML, Rey MJ, Costa-Jussa F (2004) Neuropathology and pathogenesis of encephalitis following amyloid-beta immunization in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 14:11–20.
- Fox NC, Black RS, Gilman S, Rossor MN, Griffith SG, Jenkins L, Koller M (2005) Effects of A β immunization (AN1792) on MRI measures of cerebral volume in Alzheimer disease. *Neurology* 64:1563–1572.
- Frautschy SA, Yang F, Irrizarry M, Hyman B, Saido TC, Hsiao K, Cole GM (1998) Microglial response to amyloid plaques in APPsw transgenic mice. *Am J Pathol* 152:307–317.
- Frenkel D, Katz O, Solomon B (2000) Immunization against Alzheimer's beta-amyloid plaques via EFRH phage administration. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:11455–11459.
- Gilman S, Koller M, Black RS, Jenkins L, Griffith SG, Fox NC, Eisner L, Kirby L, Boada Rovira M, Forette F, Orgogozo JM (2005) Clinical effects of A β immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology* 64:1553–1562.
- Gordon MN, Holcomb LA, Jantzen PT, DiCarlo G, Wilcock D, Boyett KW, Connor K, Melachrinou J, O'Callaghan JP, Morgan D (2002) Time course of the development of Alzheimer-like pathology in the doubly transgenic PS1+APP mouse. *Exp Neurol* 173:183–195.
- Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353–356.
- Hart MK, Palker TJ, Matthews TJ, Langlois AJ, Lerche NW, Martin ME, Searce RM, McDaniel C, Bolognesi DP, Haynes BP (1990) Synthetic peptides containing T and B cell epitopes from human immunodeficiency virus envelope gp120 induce anti-HIV proliferative responses and high titers of neutralizing antibodies in rhesus monkeys. *J Immunol* 145:2677–2685.
- Hartman RE, Izumi Y, Bales KR, Paul SM, Wozniak DF, Holtzman DM (2005) Treatment with an amyloid- β antibody ameliorates plaque load, learning deficits, and hippocampal long-term potentiation in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 25:6213–6220.
- Haynes BF, Arthur LO, Frost P, Matthews TJ, Langlois AJ, Palker TJ, Hart MK, Searce RM, Jones DM, McDaniel C (1993) Conversion of an immunogenic human immunodeficiency virus (HIV) envelope synthetic peptide to a tolerogen in chimpanzees by the fusogenic domain of HIV gp41 envelope protein. *J Exp Med* 177:717–727.
- Janus C (2004) Search strategies used by APP transgenic mice during navigation in the Morris water maze. *Learn Mem* 11:337–346.
- Janus C, Pearson J, McLaurin J, Mathews PM, Jiang Y, Schmidt SD, Chishti MA, Horne P, Heslin D, French J, Mount HT, Nixon RA, Mercken M, Bergeron C, Fraser PE, St George-Hyslop P, Westaway D (2000) A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature* 408:979–982.
- Jensen MT, Mottin MD, Cracchiolo JR, Leighty RE, Arendash GW (2005) Lifelong immunization with human beta-amyloid (1–42) protects Alzheimer's transgenic mice against cognitive impairment throughout aging. *Neuroscience* 130:667–684.
- Johnson Jr WC (1990) Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide. *Proteins* 7:205–214.
- Kitazawa M, Oddo S, Yamasaki TR, Green KN, LaFerla FM (2005) Lipopolysaccharide-induced inflammation exacerbates tau pathology by a cyclin-dependent kinase 5-mediated pathway in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 25:8843–8853.
- Lee M, Bard E, Johnson-Wood K, Lee C, Hu K, Griffith SG, Black RS, Schenk D, Seubert P (2005) Abeta42 immunization in Alzheimer's disease generates Abeta N-terminal antibodies. *Ann Neurol* 58:430–435.
- Lemere C, Spooner E, LaFrancois J, Malester B, Mori C, Leverone J, Matsuoka Y, DeMattos R, Holtzman D, Clements J, Selkoe DJ, Duff K (2003) Evidence for peripheral clearance of A β following chronic, active A β immunization in PSAPP mice. *Neurobiol Dis* 14:10–18.
- Lemere CA, Maron R, Spooner ET, Grenfell TJ, Mori C, Desai R, Hancock WW, Weiner HL, Selkoe DJ (2000) Nasal A beta treatment induces anti-A beta antibody production and decreases cerebral amyloid burden in PD-APP mice. *Ann NY Acad Sci* 920:328–331.
- Lemere CA, Spooner ET, Leverone JF, Mori C, Clements JD (2002) Intranasal immunotherapy for the treatment of Alzheimer's disease: *Escherichia coli* LT and LT(R192G) as mucosal adjuvants. *Neurobiol Aging* 23:991–1000.
- Lemere CA, Beierschmitt A, Iglesias M, Spooner ET, Bloom JK, Leverone JF, Zheng JB, Seabrook TJ, Louard D, Li D, Selkoe DJ, Palmour RM, Ervin FR (2004) Alzheimer's disease abeta vaccine reduces central nervous system abeta levels in a non-human primate, the Caribbean vervet. *Am J Pathol* 165:283–297.
- Leverone JF, Spooner ET, Lehman HK, Clements JD, Lemere CA (2003) Abeta1–15 is less immunogenic than Abeta1–40/42 for intranasal immunization of wild-type mice but may be effective for "boosting." *Vaccine* 21:2197–2206.
- Levites Y, Das P, Price RW, Rochette MJ, Kostura LA, McGowan EM, Murphy MP, Golde TE (2006) Anti-Abeta(42)- and anti-Abeta(40)-specific mAbs attenuate amyloid deposition in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest* 116:193–201.
- Maier M, Seabrook TJ, Lemere CA (2005a) Developing novel immunogens for an effective, safe Alzheimer's disease vaccine. *Neurodegenerative Dis* 2:267–272.
- Maier M, Seabrook TJ, Lemere CA (2005b) Modulation of the humoral and cellular immune response in Abeta immunotherapy by the adjuvants monophosphoryl lipid A (MPL), cholera toxin B subunit (CTB) and *E. coli* enterotoxin LT(R192G). *Vaccine* 23:5149–5159.
- Masliah E, Hansen L, Adame A, Crews L, Bard F, Lee C, Seubert P, Games D, Kirby L, Schenk D (2005) Abeta vaccination effects on plaque pathology in the absence of encephalitis in Alzheimer disease. *Neurology* 64:129–131.
- McLaurin J, Cecal R, Kierstead M, Tian X, Phinney A, Manea M, French J, Lamhermon M, Darabie A, Brown M, Janus C, Chishti M, Horne P, Westaway D, Fraser P, Mount H, Przybylski M, St George-Hyslop P (2002) Therapeutically effective antibodies against amyloid-beta peptide target amyloid-beta residues 4–10 and inhibit cytotoxicity and fibrillogenesis. *Nat Med* 8:1263–1269.
- Mecham RP (1991) Laminin receptors. *Annu Rev Cell Biol* 7:71–91.
- Monsonog A, Maron R, Zota V, Selkoe DJ, Weiner HL (2001) Immune hyporesponsiveness to amyloid beta-peptide in amyloid precursor protein transgenic mice: implications for the pathogenesis and treatment of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10273–10278.
- Monsonog A, Zota V, Karni A, Krieger JI, Bar-Or A, Bitan G, Budson AE, Sperling R, Selkoe DJ, Weiner HL (2003) Increased T cell reactivity to amyloid beta protein in older humans and patients with Alzheimer disease. *J Clin Invest* 112:415–422.
- Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE, Ugen KE, Dickey C, Hardy J, Duff K, Jantzen P, DiCarlo G, Wilcock D, Connor K, Hatcher J, Hope C, Gordon M, Arendash GW (2000) A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* 408:982–985.
- Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297:681–683.
- Mucke L, Masliah E, Yu G-Q, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Johnson-Wood K, McConlogue L (2000) High-level neuronal expression of A β 1–42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci* 20:4050–4058.
- Nicoll JA, Wilkinson D, Holmes C, Steart P, Markham H, Weller RO (2003) Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. *Nat Med* 9:448–452.
- Oishi Y, Onozuka A, Kato H, Shimura N, Imai S, Nishizawa T (2001) The effect of amino acid spacers on the antigenicity of dimeric peptide-inducing cross-reacting antibodies to a cell surface protein antigen of *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem* 276:11111–11118.

- Orgogozo JM, Gilman S, Dartigues JF, Laurent B, Puel M, Kirby LC, Jouanny P, Dubois B, Eisner L, Flitman S, Michel BF, Boada M, Frank A, Hock C (2003) Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. *Neurology* 61:46–54.
- O'Toole M, Janszen DB, Slonim DK, Reddy PS, Ellis DK, Legault HM, Hill AA, Whitley MZ, Mounts WM, Zuberek K, Immermann FW, Black RS, Dorner AJ (2005) Risk factors associated with beta-amyloid(1–42) immunotherapy in preimmunization gene expression patterns of blood cells. *Arch Neurol* 62:1531–1536.
- Pfeifer M, Boncristiano S, Bondolfi L, Stalder A, Deller T, Staufenbiel M, Mathews PM, Jucker M (2002) Cerebral hemorrhage after passive anti-Abeta immunotherapy. *Science* 298:1379.
- Racke MM, Boone LI, Hepburn DL, Passadainian M, Bryan MT, Ness DK, Pirooz KS, Jordan WH, Brown DD, Hoffman WP, Holtzman DM, Bales KR, Gitter BD, May PC, Paul SM, DeMattos RB (2005) Exacerbation of cerebral amyloid angiopathy-associated microhemorrhage in amyloid precursor protein transgenic mice by immunotherapy is dependent on antibody recognition of deposited forms of amyloid β . *J Neurosci* 25:629–636.
- Rogers J, Strohmeyer R, Kowolowski C, Li R (2002) Microglia and inflammatory mechanisms in the clearance of amyloid beta peptide. *Glia* 40:260–269.
- Ruoslahti E (1988) Fibronectin and its receptors. *Annu Rev Biochem* 57:375–413.
- Ruoslahti E (1996) RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:697–715.
- Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Liao Z, Lieberburg I, Motter R, Mutter L, Soriano F, Shopp G, Vasquez N, Vandevert C, et al. (1999) Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400:173–177.
- Seabrook TJ, Bloom JK, Iglesias M, Spooner ET, Walsh DM, Lemere CA (2004) Species-specific immune response to immunization with human versus rodent A beta peptide. *Neurobiol Aging* 25:1141–1151.
- Sigurdsson EM, Knudsen E, Asuni A, Filzer-Atlas C, Sage D, Quartermain D, Goni F, Frangione B, Wisniewski T (2004) An attenuated immune response is sufficient to enhance cognition in an Alzheimer's disease mouse model immunized with amyloid- β derivatives. *J Neurosci* 24:6277–6282.
- Town T, Tan J, Sansone N, Obregon D, Klein T, Mullan M (2001) Characterization of murine immunoglobulin G antibodies against human amyloid- β 1–42. *Neurosci Lett* 307:101–104.
- Townsend KP, Obregon D, Quadros A, Patel N, Volmar C, Paris D, Mullan M (2002) Proinflammatory and vasoactive effects of Abeta in the cerebrovasculature. *Ann NY Acad Sci* 977:65–76.
- Walsh DM, Selkoe DJ (2004) Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron* 44:181–193.
- Weiner HL, Lemere CA, Maron R, Spooner ET, Grenfell TJ, Mori C, Issazadeh S, Hancock WW, Selkoe DJ (2000) Nasal administration of amyloid-beta peptide decreases cerebral amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 48:567–579.
- Wilcock DM, Rojiani A, Rosenthal A, Levkowitz G, Subbarao S, Alamed J, Wilson D, Wilson N, Freeman MJ, Gordon MN, Morgan D (2004a) Passive amyloid immunotherapy clears amyloid and transiently activates microglia in a transgenic mouse model of amyloid deposition. *J Neurosci* 24:6144–6151.
- Wilcock DM, Rojiani A, Rosenthal A, Subbarao S, Freeman MJ, Gordon MN, Morgan D (2004b) Passive immunotherapy against Abeta in aged APP-transgenic mice reverses cognitive deficits and depletes parenchymal amyloid deposits in spite of increased vascular amyloid and microhemorrhage. *J Neuroinflammation* 1:24.
- Yano A, Onozuka A, Matin K, Imai S, Hanada N, Nisizawa T (2003) RGD motif enhances immunogenicity and adjuvanticity of peptide antigens following intranasal immunization. *Vaccine* 22:237–243.

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional
21 de Junio de 2007 (21.06.2007)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2007/068411 A3

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

A61K 39/00 (2006.01) C07K 16/18 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/EP2006/011861

(22) Fecha de Registro Internacional:

8 de Diciembre de 2006 (08.12.2006)

(25) Idioma de registro:

Inglés

(26) Idioma de Publicación:

Inglés

(30) Información de Prioridad:

05027091.7 12 de Diciembre de 2005 (12.12.2005) EP
06009098.2 2 de Mayo de 2006 (02.05.2006) EP

(71) Solicitante (para todos los Estados designados excepto Estados Unidos de América): AC IMMUNE S.A. [CH/CH]; EPFL-PSE Building B, CH-1015 Lausanne (CH).

(72) Inventores: c

(75) Inventores/Solicitantes (para Estados Unidos de América solamente): PFEIFER, Andrea [DE/CH]; Route de Fenil 16A, CH-1806 St-Légier (CH). NICOLAU, Claude [FR/US]; 166 Greenwood Street, Newton, MA 02459 (US).

(74) Agente: VOSSIUS & PARTNER; Siebertstrasse 4, 81675 Munich (DE).

(81) Estados Designados (a menos que sea indicado de otra manera, para cada tipo de protección nacional disponible): 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, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados Designados (a menos que sea indicado de otra manera, para cada tipo de protección regional disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, 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).

Publicada:

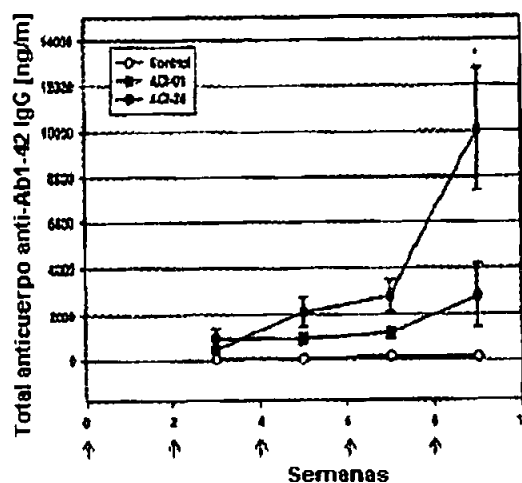
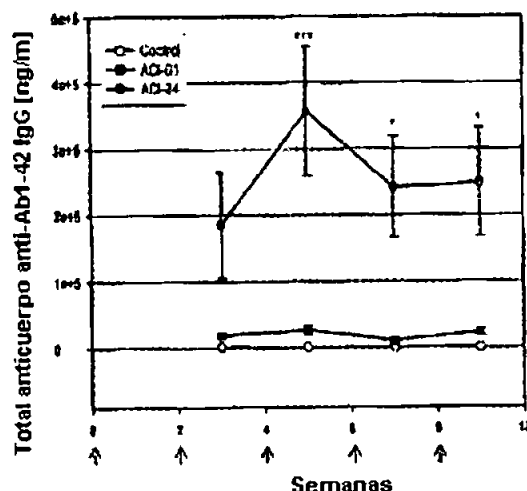
- con reporte de búsqueda internacional
- antes de la expiración del límite de tiempo para modificar las reivindicaciones y ser republicada de nuevo en el caso de recibo de modificaciones

(88) Fecha de publicación del reporte de búsqueda internacional:

23 de Agosto de 2007

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, refiérase a "Las Notas Guías sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada emisión regular de la Gaceta PCT.

(54) Título: VACUNA TERAPÉUTICA



(57) Resumen: La presente invención se refiere a métodos y composiciones para uso terapéutico y diagnóstico en el tratamiento de enfermedades y trastornos causados por o asociados con amiloide o proteínas simil amiloide incluso amiloidosis. En particular, la presente invención provee nuevos métodos y composiciones para generar una respuesta inmune altamente específica y altamente efectiva en un organismo, pero particularmente dentro de un animal, particularmente un mamífero o un humano, capaz de prevenir o aliviar amiloidosis, o los síntomas asociados con amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con formación de placa amiloide incluso amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad avanzada incluso, sin limitaciones, trastornos neurológicos tales como enfermedad de Alzheimer (AD), incluso enfermedades o condiciones caracterizados por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI).

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
21 June 2007 (21.06.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/068411 A3(51) International Patent Classification:
A61K 39/00 (2006.01) C07K 16/18 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)(21) International Application Number:
PCT/EP2006/011861(22) International Filing Date:
8 December 2006 (08.12.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
05027091.7 12 December 2005 (12.12.2005) EP
06009098.2 2 May 2006 (02.05.2006) EP

(71) Applicant (for all designated States except US): AC IMMUNE S.A. [CH/CH]; EPFL-PSE Building B, CH-1015 Lausanne (CH).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): PFEIFFER, Andrea [DE/CH]; Route de Fenil 16A, CH-1806 St-Légier (CH). NICOLAU, Claude [FR/US]; 166 Greenwood Street, Newton, MA 02459 (US).

(74) Agent: VOSSIUS & PARTNER; Siebertstrasse 4, 81675 Munich (DE).

(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, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

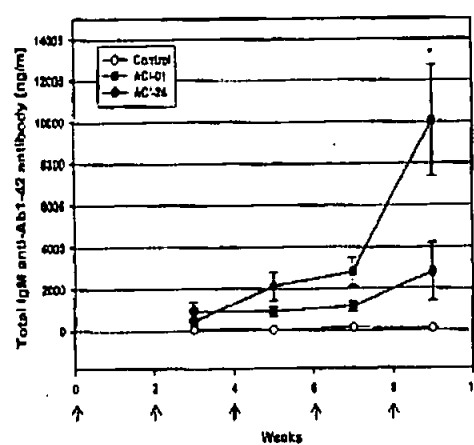
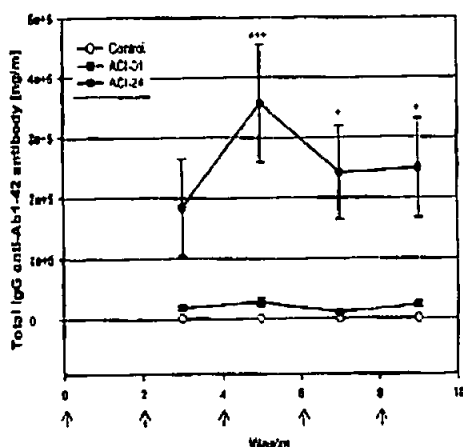
(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT,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

Published:

— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments(88) Date of publication of the international search report:
23 August 2007

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

(54) Title: THERAPEUTIC VACCINE



(57) Abstract: The present invention is related to methods and compositions for the therapeutic and diagnostic use in the treatment of diseases and disorders which are caused by or associated with amyloid or amyloid-like proteins including amyloidosis. In particular, the present invention provides methods and compositions for eliciting a highly specific and highly effective immune response in an organism, but particularly within an animal, particularly a mammal or a human, which is capable of preventing or alleviating amyloidosis, or the symptoms associated with amyloidosis, a group of diseases and disorders associated with amyloid plaque formation including secondary amyloidosis and age-related amyloidosis including, but not limited to, neurological disorders such as Alzheimer's Disease (AD), including diseases or conditions characterized by a loss of cognitive memory capacity such as, for example, mild cognitive impairment (MCI).

WO 2007/068411 A3

Referencia del archivo del solicitante WO 2007/068411 L3018 PCT BS	Solicitud internacional No. Nueva solicitud PCT/EP2006/011861
---	--

**INDICACIONES RELACIONADAS CON MICROORGANISMOS U OTRO
MATERIAL BIOLÓGICO DEPOSITADO**

(Regla PCT 13bis)

A. Las indicaciones hechas a continuación se relacionan con microorganismos u otro material biológico depositado referido en la descripción en la página <u>23</u> , línea <u>8</u>	
B. IDENTIFICACION DEL DEPOSITO Los depósitos adicionales se identifican en una hoja adicional ☐	
Nombre de la Institución depositaria DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH	
Dirección de la institución depositaria (<i>incluyendo código postal y país</i>) Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig DE	
Fecha del depósito 8 de diciembre de 2005 (08/12/2005)	Número de Acceso DSM ACC2756
C. INDICACIONES ADICIONALES (<i>dejar en blanco si no aplica</i>) Esta información continúa en una hoja adicional ☐ El solicitante hace uso de la Regla 28(4) ECP.	
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS CUALES SE HACEN LAS INDICACIONES (<i>si las indicaciones no son para todos los estados designados</i>) EP	
E. SUMINISTRO SEPARADO DE INDICACIONES (<i>dejar en blanco si no aplica</i>) Las indicaciones enumeradas a continuación serán presentadas al Buró Internacional después (<i>especificar la naturaleza general de las indicaciones, v.g., "Número de Acceso de Depósito"</i>)	

--

Para uso de la Oficina receptora solamente
☒ Esta hoja fue recibida con la solicitud internacional
Funcionario autorizado Gorge, Olivier

Para uso del buró Internacional solamente
☐ Esta hoja fue recibida por el Buró Internacional el:
Funcionario autorizado

Formulario PCT/RO/134 (julio 1998; reimpresso enero de 2004)

App ^l WO 2007/068411 file reference L3018 PCT BS	International application No. PCT/EP2006/011861 New PCT application
--	--

**INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL**

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page <u>23</u> , line <u>8</u>	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet ☐	
Name of depositary institution DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH	
Address of depositary institution (including postal code and country) Mascheroder Weg 1 b 38124 Braunschweig DE	
Date of deposit December 8, 2005 (08/12/2005)	Accession Number DSM ACC2756
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet ☐	
Applicant makes use of Rule 28(4) ECP.	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States) EP	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable) The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")	
For receiving Office use only ☒ This sheet was received with the international application Authorized officer Gorge, Olivier	For International Bureau use only ☐ This sheet was received by the International Bureau on: Authorized officer

VACUNA TERAPÉUTICA

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a métodos y composiciones para uso terapéutico y diagnóstico en el tratamiento de enfermedades y trastornos causados por o asociados con amiloide o proteínas símil amiloide incluso amiloidosis.

En particular, la presente invención provee nuevos métodos y composiciones para generar una respuesta inmune altamente específica y altamente efectiva en un organismo, pero particularmente dentro de un animal, particularmente un mamífero o un humano, capaz de prevenir o aliviar amiloidosis, o los síntomas asociados con amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con formación de placa amiloide incluso amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad avanzada incluso, sin limitaciones, trastornos neurológicos tales como enfermedad de Alzheimer (AD), incluso enfermedades o condiciones caracterizados por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI).

VACUNA TERAPÉUTICA

La presente invención se refiere a métodos y composiciones para uso terapéutico y diagnóstico en el tratamiento de enfermedades y trastornos causados por o asociados con proteínas símil amiloide tales como amiloidosis, un grupo de trastornos y anormalidades asociados con la proteína amiloide, por ejemplo la enfermedad de Alzheimer.

La amiloidosis no es una única entidad patológica, sino más bien un grupo diverso de procesos patológicos progresivos caracterizados por la presencia de depósitos de tejido extracelular de una proteína similar al almidón denominada amiloide, que se acumula en uno o más sistemas orgánicos o corporales. A medida que se acumulan los depósitos de amiloide, comienzan a interferir con la función normal del sistema orgánico o corporal. Hay al menos 15 diferentes tipos de amiloidosis. Las principales formas son amiloidosis primaria sin antecedentes conocidos, amiloidosis secundaria siguiente a alguna otra condición, y amiloidosis hereditaria.

La amiloidosis secundaria se produce en personas con infección crónica o enfermedad inflamatoria, por ejemplo tuberculosis, una infección bacteriana denominada fiebre familiar del Mediterráneo, infecciones óseas (osteomielitis), artritis reumatoidea, inflamación del intestino delgado (ileítis granulomatosa), enfermedad de Hodgkin y lepra.

En general, los depósitos de amiloide contienen tres componentes. Las fibrillas de proteína amiloide, componente de aproximadamente 90% del material amiloide, comprenden uno de varios tipos diferentes de proteínas. Estas proteínas pueden plegarse en las denominadas fibrillas de láminas "de plegamiento beta", una singular configuración de proteínas que exhibe sitios para rojo Congo que dan por resultado singulares propiedades de tinción de la proteína amiloide. Además, los depósitos de amiloide están estrechamente asociados con el componente

amiloide (AP) P (pentagonal), una glucoproteína relacionada con el amiloide P sérico normal (SAP), y con glucosaminoglucanos sulfatados (GAG), hidratos de carbono complejos del tejido conectivo.

Muchas enfermedades del envejecimiento se basan, o están asociadas con proteínas símil amiloide y se caracterizan, en parte, por la acumulación de depósitos extracelulares de amiloide o material símil amiloide que contribuye a la patogenia, además de a la progresión de la enfermedad. Estas enfermedades incluyen, sin limitaciones, trastornos neurológicos tales como enfermedad de Alzheimer (AD), incluso enfermedades o condiciones caracterizadas por pérdida de la capacidad cognitiva de la memoria tal como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), demencia por cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo Dutch); el complejo de demencia de Parkinson de Guam. Otras enfermedades basadas o asociadas con proteínas símil amiloide tales parálisis supranuclear, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes de inicio en el adulto; amiloidosis cardiaca senil; tumores endocrinos y otros, incluso degeneración macular.

Aunque la patogenia de estas enfermedades puede ser variada, sus depósitos característicos a menudo contienen muchos constituyentes moleculares compartidos. En grado significativo, esto se puede atribuir a la activación local de vías proinflamatorias para sí conducir al depósito concurrente de componentes activados re complemento, reactivos de fase aguda, inmunomoduladores, y otros mediadores de inflamación (McGeer et al., 1994).

La Enfermedad de Alzheimer (AD) es un trastorno neurológico que en principio se creyó era causado por placas amiloides, una acumulación de depósitos anormales de proteínas en el cerebro. El tipo más frecuente de amiloide hallado en el cerebro de animales afectados se compone sobre todo de fibrillas

A β . Las evidencias científicas demuestran que el aumento de la producción y la acumulación de proteína beta amiloide en placas conducen a la muerte celular, lo cual contribuye al desarrollo y la progresión de enfermedad de Alzheimer. La pérdida de células nerviosas en zonas estratégicas del cerebro, a su vez, causa reducción de los neurotransmisores y deterioro de la memoria. Las principales proteínas responsables de la formación de placas incluyen la proteína precursora de amiloide (APP) y dos presenilinas (presenilina I y presenilina II). La escisión en secuencia de la proteína precursora de amiloide (APP), que es de expresión constitutiva y es catabolizada en la mayoría de las células por las enzimas β y secretasa conducen a la liberación de un péptido A β de 39 a 43 aminoácidos. Es probable que la degradación de APP aumente su propensión a agregarse en placas. Especialmente, el fragmento A β (1-42) tiene alta propensión a la construcción de agregados debido a dos residuos de aminoácidos muy hidrofóbicos en el C terminal. En consecuencia, se cree que el fragmento A β (1-42) interviene, sobre todo, y es responsable de la iniciación de la formación de placa neurítica en la enfermedad de Alzheimer, y en consecuencia, tiene elevado potencial patológico. En consecuencia, hay necesidad de anticuerpos específicos capaces de ser dirigidos y difundir a través de la formación de placas amiloides difusas.

Los síntomas de la enfermedad de Alzheimer se manifiestan lentamente y el primer síntoma puede ser falta leve de memoria. En esta etapa, los individuos pueden olvidar eventos y actividades recientes, los nombres de personas o cosas conocidas, y puede no ser capaz de solucionar problemas de matemática simples. A medida que progresa la enfermedad, los síntomas se notan con mayor facilidad y se tornan suficientemente serios para hacer que las personas con enfermedad de Alzheimer o los miembros de su familia consulten al médico. Los síntomas de enfermedad de Alzheimer de estadio intermedio incluyen olvidar cómo hacer

tareas sencillas tales como de higiene personal, y se desarrollan problemas del habla, la comprensión, la lectura o la escritura. Los pacientes con enfermedad de Alzheimer de etapa tardía pueden estar ansiosos o agresivos, pueden perderse de su hogar y, por último, necesitan cuidado total.

Hasta el momento, la única forma definida de diagnosticar enfermedad de Alzheimer consiste en identificar placas y ovillos en el tejido cerebral en una autopsia después de la muerte del individuo. En consecuencia, los médicos solo pueden hacer un diagnóstico "posible" o "probable" de enfermedad de Alzheimer mientras la persona aun está viva. Mediante los métodos actuales, los médicos pueden diagnosticar enfermedad de Alzheimer correctamente en hasta el 90 por ciento de los casos mediante diversas herramientas, a fin de diagnosticar "probable" enfermedad de Alzheimer. Los médicos hacen preguntas sobre la salud general de la persona, problemas médicos anteriores, y los antecedentes de cualquier dificultad que tiene la persona para realizar las actividades diarias. Las pruebas de comportamiento de memoria, resolución de problemas, atención, conteo y lenguaje proveen información ulterior sobre la degeneración cognitiva, al igual que las pruebas médicas, tales como pruebas de sangre, orina o líquido cefalorraquídeo y los escaneos cerebrales.

El manejo de la enfermedad de Alzheimer consiste en tratamientos con medicación y sin medicación. Los tratamientos dirigidos a cambiar el curso subyacente de la enfermedad (retraso o reversión de la progresión) no han tenido éxito en gran medida, hasta el momento. Los medicamentos que restablecen el déficit (defecto), o la disfunción de los mensajeros químicos de las células nerviosas (neurotransmisores), tales como inhibidores de colinesterasa (ChEI), han demostrado mejorar los síntomas. También se dispone de medicamentos dirigidos a solucionar las manifestaciones psiquiátricas de la enfermedad de Alzheimer.

En la actualidad, los inhibidores de colinesterasa, por ejemplo Tacrina y Rivastagmina, son la única clase de agentes aprobados por la FDA para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Estos agentes son medicinas que restablecen el defecto o la disfunción en la neurotransmisión química del cerebro. Los ChEI impiden la degradación enzimática de los neurotransmisores, por lo que aumentan la cantidad de mensajes químicos disponibles para transmitir las señales nerviosas en el cerebro.

Para algunas personas en los estadios temprano y medio de la enfermedad, los fármacos tacrina (COGNEX®, Morris Plains, NJ), donepezilo (ARICEPT®, Tokyo, JP), rivastigmina (EXELON®, East Hanover, NJ), o galantamina (REMINIL®, New Brunswick, NJ) pueden contribuir a prevenir el empeoramiento de algunos síntomas durante un periodo limitado. Otro fármaco, memantina (NAMENDA®, Nueva York, NY), ha sido aprobado para el tratamiento de enfermedad de Alzheimer moderada a severa. Además, algunos medicamentos pueden contribuir a controlar los síntomas conductuales de la enfermedad de Alzheimer, tales como insomnio, agitación, falta de concentración, ansiedad y depresión. El tratamiento de estos síntomas a menudo mejora la calidad de vida de los pacientes y facilitan su atención por parte de quienes los cuidan. Lamentablemente, a pesar de los significativos adelantos de tratamiento que demuestran que esta clase de agentes es consistentemente mejor que un placebo, la enfermedad continúa en progreso, y el efecto promedio sobre la función mental solo ha sido moderada. Los ChEI también tienen efectos secundarios que incluyen disfunción gastrointestinal, toxicidad hepática y pérdida de peso.

Se espera que los adelantos en la comprensión de las anomalías cerebrales que ocurren en la enfermedad de Alzheimer provean el marco de nuevos objetivos de tratamiento que centren más la atención sobre la alteración del curso y el desarrollo de la enfermedad. Muchos compuestos, incluso agentes

antiinflamatorios, son investigados activamente. Los estudios clínicos que utilizan inhibidores específicos de inhibidores de ciclooxigenasa (COX-2), tales como rofecoxib y celecoxib, también están en marcha.

Otras enfermedades basadas o asociadas con la acumulación y el depósito de proteína simil amiloide son el deterioro cognitivo leve, demencia de cuerpo de Lewy (LBD), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), miositis de cuerpos de inclusión (IBM) y degeneración macular, en particular degeneración macular relacionada con la edad (AMD).

El deterioro cognitivo leve (MCI) es un término general más comúnmente definido como trastorno de memoria sutil, pero detectable. Una persona con MCI experimenta problemas de memoria mayores de los normalmente esperados con la edad, pero no muestra otros síntomas de demencia, tales como deterioro del juicio o el razonamiento. MCI es una condición que frecuentemente refleja un estadio preclínico de AD.

Se cree que el depósito de β -amiloide dentro de la corteza entorrinal (EC) juega un papel clave en el desarrollo de deterioro cognitivo leve (MCI) en ancianos. Esto coincide con la observación de que los niveles de CSF-A $A\beta(1-42)$ declinan significativamente una vez que AD se manifiesta clínicamente. En contraste con CSF- $A\beta(1-42)$, los niveles de CSF-tau están aumentados significativamente en el estadio MCI, y estos valores continúan elevados después, lo cual indica que los niveles aumentados de CSF-tau pueden contribuir a detectar sujetos con MCI con predicción de desarrollar AD.

La demencia de cuerpo de Lewy (LBD) es un trastorno neurodegenerativo que puede aparecer en personas mayores de 65 años, que generalmente causa síntomas de deterioro cognitivo (pensamiento) y cambios anormales del comportamiento. Los síntomas pueden incluir deterioro cognitivo, signos neurológicos, trastornos del sueño, y falla autónoma. El deterioro cognitivo es el

rasgo de presentación de LBD en la mayoría de los casos. Los pacientes tienen episodios recurrentes de confusión que empeoran progresivamente. La fluctuación de la capacidad cognitiva a menudo se asocia con grados variables de atención y estado de alerta. El deterioro cognitivo y las fluctuaciones de pensamiento pueden variar en minutos, horas, o días.

Los cuerpos de Lewy se forman a partir de proteínas de neurofilamentos fosforilados y no fosforilados; contienen la proteína sináptica alfa-sinucleína además de ubiquitina, que interviene en la eliminación de proteínas dañadas o anormales. Además de los cuerpos de Lewy, también pueden estar presentes neuritas de Lewy, que son cuerpos de inclusión en los procesos celulares de las células nerviosas. Las placas amiloides se pueden formar en el cerebro de los pacientes que padecen DLB, aunque tienden a ser menos que los observados en los pacientes con enfermedad de Alzheimer. Los ovillos neurofibrilares, la otra marca micropatológica de AD, no son una característica importante de DLB pero está frecuentemente presente, además de las placas amiloides.

La esclerosis lateral amiotrófica (ALS) se caracteriza por la degeneración de las neuronas motoras superiores e inferiores. En algunos pacientes con ALS se pueden presentar demencia o afasia (ALS-D). La demencia es más comúnmente una demencia frontotemporal (FTD), y muchos de estos casos tienen inclusiones positivas para ubiquitina, negativas para tau en neuronas del giro dentado y las capas superficiales de los lóbulos frontal y temporal.

La miositis de cuerpos de inclusión (IBM) es una enfermedad discapacitante que se suele encontrar en personas mayores de 50 años, en las cuales las fibras musculares desarrollan inflamación y comienzan a atrofiarse, pero en donde está respetado el cerebro y los pacientes retienen la capacidad intelectual total. Se halló que dos enzimas que intervienen en la producción de proteína beta amiloide estaban aumentadas dentro de las células musculares de

pacientes con esta enfermedad muscular progresiva más común de personas ancianas, en las cuales también está aumentado el amiloide β .

Otra enfermedad basada o asociada con la acumulación y el depósito de proteína simil amiloide es la degeneración macular.

La degeneración macular es una enfermedad ocular común que causa deterioro de la mácula, es decir la zona central de la retina (el tejido delgado como un papel de la parte posterior del ojo en donde células sensible a la luz envían señales al cerebro). La visión nítida y clara, "en línea recta" es procesada por la mácula. El daño macular da por resultado el desarrollo de puntos ciegos y visión borrosa o distorsionada. La degeneración macular relacionada con la edad (AMD) es una causa importante de deterioro visual en los Estados Unidos y en personas mayores de 65 años es la principal causa de ceguera legal en caucásicos. Aproximadamente 1,8 millones de norteamericanos de 40 años y mayores tienen AMD avanzada, y otros 7,3 millones de personas con AMD intermedia tienen sustancial riesgo de perder la visión. El gobierno estima que hacia 2020 habrá 2,9 millones de personas con AMD avanzada. Las víctimas de AMD a menudo se sorprenden y frustran al descubrir lo poco que se conoce sobre las causas y el tratamiento de esta condición causal de ceguera.

Hay dos formas de degeneración macular: degeneración macular seca y degeneración macular húmeda. La forma seca, en donde las células de la mácula lentamente comienzan a romperse, se diagnostica en el 85 por ciento de los casos de degeneración macular. Por lo general están afectados ambos ojos por AMD seca, aunque un ojo puede perder la visión mientras que el otro ojo no se ve afectado. Se forman drusen, es decir depósitos amarillos bajo la retina, que son los signos iniciales comunes de AMD seca. El riesgo de desarrollar AMD seca o AMD húmeda avanzadas aumenta a medida que aumenta la cantidad o el tamaño de estos drusen. Es posible que la AMD seca avance y acuse pérdida de la visión

sin transformarse en la forma húmeda de la enfermedad; sin embargo, también es posible que la AMD seca de estadio temprano de pronto cambie a la forma húmeda.

La forma húmeda, aunque solo es responsable del 15 por ciento de los casos, da por resultado el 90 por ciento de las cegueras, y se considera AMD avanzada (no hay estadio temprano o intermedio de AMD húmeda). La AMD húmeda siempre se ve precedida por la forma seca de la enfermedad. A medida que empeora la forma seca, algunas personas comienzan a presentar vasos sanguíneos anormales que crecen detrás de la mácula. Estos vasos son muy frágiles y filtran fluido y sangre (de allí degeneración macular "húmeda"), lo cual causa rápido daño de la mácula.

La forma seca de AMD a menudo causa inicialmente visión ligeramente borrosa. El centro de visión en particular luego puede hacerse borroso y esta región se hace más grande a medida que progresa la enfermedad. Pueden no observarse síntomas si solo está afectado un ojo. En AMD húmeda pueden aparecer líneas rectas cerosas y puede ocurrir rápida pérdida de la visión central.

El diagnóstico de degeneración macular generalmente incluye un examen de ojo dilatado, prueba de agudeza visual y un análisis de fondo de ojo mediante un procedimiento denominado fundoscopia que contribuye a diagnosticar AMD, y, si se sospecha AMD húmeda, también se puede realizar angiografía con fluoresceína. Si la AMD seca alcanza los estadios avanzados, actualmente no hay tratamiento para impedir la pérdida de visión. Sin embargo, una formulación específica con altas dosis de antioxidantes y zinc puede retrasar o impedir la progresión de AMD intermedia al estadio avanzado. Macugen® (inyección de pegaptanib sódico), fotocoagulación con láser y terapéutica fotodinámica pueden controlar el crecimiento de vasos sanguíneos anormales y el sangrado de la mácula, lo cual es de utilidad para algunas personas con AMD húmeda; sin

embargo, la visión ya perdida no se restablece mediante estas técnicas. Si la visión ya se perdió, existen ayudas para baja visión que pueden contribuir a mejorar la calidad de vida.

Uno de los primeros signos de degeneración macular relacionada con la edad (AMD) es la acumulación de depósitos extracelulares denominados drusen entre la lámina basal del epitelio pigmentado de la retina (RPE) y la membrana de Bruch (BM). Estudios recientes conducidos por Anderson et al. Han confirmado que los drusen contienen amiloide beta. (Experimental Eye Research 78 (2004) 243-256).

Las investigaciones en marcha continúan con estudios que exploran los factores ambientales, genéticos y dietarios que pueden contribuir a AMD. También se exploran nuevas estrategias de tratamiento, incluso trasplante de células de la retina, fármacos que previenen o enlentecen el progreso de la enfermedad, radioterapia, terapias génicas, un chip de computadora implantado en la retina que puede contribuir a estimular la visión y los agentes que previenen el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos por debajo de la mácula.

En consecuencia, se necesitan efectivas composiciones de vacunas terapéuticas y métodos para solucionar las complicaciones asociadas con amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con formación de placa amiloide que incluyen amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad que incluyen, sin limitaciones, trastornos neurológicos tales como enfermedad de Alzheimer (AD), incluso enfermedades o condiciones caracterizadas por pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), demencia de cuerpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo Dutch); complejo de demencia de Parkinson de Guam; además de otras enfermedades basadas sobre o asociadas con proteínas símil amiloide tales como parálisis

supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeld Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes de inicio en el adulto; amiloidosis cardiaca senil; tumores endocrinos, y otros, incluso degeneración macular. En particular se necesitan vacunas terapéuticas y composiciones especializadas y altamente efectivas que comprendan dichas vacunas capaces de contrarrestar las manifestaciones fisiológicas de las enfermedades tales como la formación de placas asociadas con la agregación de fibras de amiloide o el péptido similar amiloide.

La presente invención provee nuevos métodos y composiciones para desencadenar una respuesta inmune altamente específica y altamente efectiva en un organismo, pero particularmente dentro de un animal, particularmente un mamífero o un humano, capaz de prevenir o aliviar la amiloidosis, o los síntomas asociados con amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con formación de placa amiloide incluso amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad avanzada incluso, sin limitaciones, trastornos neurológicos tales como enfermedad de Alzheimer (AD), incluso enfermedades o condiciones caracterizados por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), demencia de cuerpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo Dutch); complejo de demencia de Parkinson de Guam; además de otras enfermedades basadas sobre o asociadas con proteínas similar amiloide tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeld Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes de inicio en el adulto; amiloidosis cardiaca senil; tumores endocrinos, y otros, incluso degeneración macular.

En particular, la presente invención provee nuevos métodos y composiciones para retener o mejorar, pero particularmente para restablecer, más

particularmente para restablecer por completo la capacidad de memoria cognitiva en un mamífero que exhibe enfermedad o condición asociada a amiloide.

En un objeto de la invención proveer una composición de vacuna terapéutica y un método para producir dicha composición para el tratamiento de enfermedades y trastornos causadas o asociadas con amiloide o proteínas similar amiloide, incluso amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con formación de placa amiloide, incluso amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad avanzada, incluso, sin limitaciones, trastornos neurológicos tales como enfermedad de Alzheimer (AD), particularmente una enfermedad o condición caracterizados por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI) que comprenden un fragmento peptídico de la parte N terminal del péptido A β , particularmente un fragmento peptídico A β que consiste en una extensión única o repetida de entre 13 y 15 residuos contiguos de aminoácidos de la parte N terminal del péptido A β , pero particularmente un fragmento peptídico A β que consiste en residuos de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en los residuos 1-15, 1-14, y 1-13 de la parte N terminal del péptido A β , más particularmente de los residuos 1-15 dados en SEQ ID NO: 1, incluso sus fragmentos funcionalmente equivalentes, pero especialmente un fragmento de péptido A β tal como el antes mencionado en la presente adosado, o incorporado o reconstituido en una partícula portadora/coadyuvante tales como, por ejemplo, un liposoma.

Esta extensión continua de 13 a 15 residuos de aminoácidos se puede obtener de los fragmentos N terminales 1-16, 1-17, 1-18 o 1-20 del péptido A β pero particularmente de los fragmentos N terminales 1-16 o 1-17 del péptido A β dados en SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 5, respectivamente y pueden ser interrumpidos por la eliminación de uno a tres residuos de aminoácidos para dar

una extensión de entre 13 y 15 residuos de aminoácidos, en donde los residuos de aminoácidos eliminados pueden ser residuos de aminoácidos adyacentes o residuos separados entre sí por al menos 1 residuo de aminoácido, pero particularmente residuos de aminoácidos que no son residuos con carga negativa, si se desea que la carga neta global de la molécula de péptido antigénica sea negativa, o residuos de aminoácidos que no tengan carga positiva, si se desea que la carga neta global de la molécula de péptido antigénica sea positiva. Esta extensión continua de 13 a 15 residuos de aminoácidos se puede repetir en la construcción antigénica de acuerdo con la invención entre 2 y 50 veces, particularmente entre 2 y 30 veces, más particularmente entre 2 y 20 veces, aun más particularmente entre 2 y 16 veces, pero especialmente entre 2 y 10 veces.

En una forma de realización específica de la invención, la extensión continua de 13 a 15 residuos de aminoácidos se usa en forma de un polímero seleccionado del grupo que consiste en un 2-mero, un 3-mero, un 4-mero, un 5-mero, un 6-mero, un 7-mero, un 8-mero, un 9-mero, un 10-mero, un 11-mero, un 12-mero, un 13-mero, un 14-mero, un 15-mero, un 16-mero, un 20-mero, un 30-mero y un 50-mero.

En otra forma de realización, la invención provee una composición de vacuna terapéutica y un método para producir dicha composición para el tratamiento de enfermedades y trastornos causados o asociados con amiloide o proteínas simil amiloide incluso amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placa amiloide, incluso amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad avanzada, incluso, sin limitaciones, trastornos neurológicos tales como enfermedad de Alzheimer (AD), particularmente una enfermedad o condición caracterizados por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI) tal como se especifica en la presente más adelante con un fragmento

peptídico A β de la parte N terminal del péptido A β , pero particularmente un fragmento peptídico A β que consiste en residuos de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10); 1-16(Δ 12), 16(Δ 13), 16(Δ 14); 1-16(Δ 15), 1-15(Δ 2), 1-15(Δ 4), 1-15(Δ 5), 1-15(Δ 6), 1-15(Δ 8), 1-15(Δ 9), 1-15(Δ 10); 1-15(Δ 12), 15(Δ 13), 15(Δ 14), más particularmente un fragmento peptídico A β que consiste en residuos de aminoácidos 1-15 dados en SEQ ID NO: 1, y 1-16(Δ 14) dados en SEQ ID NO: 3.

También se comprende en la presente invención un fragmento peptídico esencialmente idéntico a los antes mencionados fragmentos y que tenga sustancialmente la misma actividad biológica de dichos fragmentos, pero en particular un fragmento peptídico que es una variante conservativamente modificada de dichos fragmentos en cuanto a que las alteraciones dan por resultado la sustitución de uno o más aminoácido, particularmente de entre uno a 10 aminoácidos, más particularmente de entre uno a 6 aminoácidos, aún más particularmente de entre uno a 4 aminoácidos, pero especialmente de entre uno a 3 aminoácidos, con a aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservadora que proveen aminoácidos sustancialmente similares son bien conocidos en el arte y se describen en la presente más adelante. De preferencia, la sustitución conservadora de preferencia se realiza de manera tal que la carga neta global del péptido y también la distribución de la carga sobre la molécula de péptido se mantiene esencialmente igual.

En una forma de realización específica de la invención al menos uno, particularmente 2, más particularmente 3 o incluso todos los residuos de aminoácidos con carga negativa 1, 3, 7, 11 pueden ser reemplazados con un aminoácido químicamente similar con carga negativa. Particularmente, el Asp en

posición 1 y 7, respectivamente, puede ser reemplazado con un Glu y el Glu en posición 9 y 11, respectivamente, puede ser reemplazado con un Asp.

En una forma de realización específica de la invención, se proveen una composición de vacuna terapéutica y un método para producir dicha composición que comprenden un fragmento peptídico A β de la parte N terminal del péptido A β , pero particularmente un fragmento peptídico A β que consiste en residuos de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10); 1-16(Δ 12), 16(Δ 13), 16(Δ 14), 1-16(Δ 15), 1-15(Δ 2), 1-15(Δ 4), 1-15(Δ 5), 1-15(Δ 6), 1-15(Δ 8), 1-15(Δ 9), 1-15(Δ 10); 1-15(Δ 12), 15(Δ 13), 15(Δ 14), un antígeno peptídico A β _{1-16(Δ 15)}, más particularmente un antígeno peptídico A β _{1-16(Δ 14)} o A β _{1-16(Δ 13)}, aun más particularmente un antígeno peptídico A β ₁₋₁₄, específicamente un antígeno peptídico A β ₁₋₁₅, pero especialmente un fragmento peptídico A β que consiste en residuos de aminoácidos 1-15 dados en SEQ ID NO: 1, y 1-16(Δ 14) dados en SEQ ID NO: 3, para el tratamiento de enfermedades y trastornos causados por o asociados con amiloide o proteínas símil amiloide incluso amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con formación de placa amiloide, incluso amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad avanzada, incluso, sin limitaciones, trastornos neurológicos tales como enfermedad de Alzheimer (AD), particularmente una enfermedad o condición caracterizados por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI).

En una forma de realización específica la invención provee una composición de vacuna terapéutica y un método para producir una composición de vacuna terapéutica para la retención o el mejoramiento, particularmente para la completa restauración de la capacidad de memoria cognitiva de un animal, particularmente un mamífero o un humano, que padece de deterioro de la

memoria mediante un fragmento peptídico A β de la parte N terminal del péptido A β , pero particularmente un fragmento peptídico A β que consiste en residuos de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10); 1-16(Δ 12), 16(Δ 13), 16(Δ 14), 1-16(Δ 15), 1-15(Δ 2), 1-15(Δ 4), 1-15(Δ 5), 1-15(Δ 6), 1-15(Δ 8), 1-15(Δ 9), 1-15(Δ 10); 1-15(Δ 12), 15(Δ 13), 15(Δ 14), particularmente un antígeno peptídico A β _{1-16(Δ 15)}, más particularmente un antígeno peptídico A β _{1-16(Δ 14)} o A β _{1-16(Δ 13)}, aun más particularmente un antígeno peptídico A β ₁₋₁₄, específicamente un antígeno peptídico A β ₁₋₁₅, pero especialmente un fragmento peptídico A β que consiste en residuos de aminoácidos 1-15 dados en SEQ ID NO: 1, y 1-16(Δ 14) dados en SEQ ID NO: 3.

Es también un objeto de la invención proveer un método para el tratamiento de enfermedades y trastornos causados o asociados con amiloide o proteínas símil amiloide incluso amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con formación de placa amiloide incluso amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad avanzada incluso, sin limitaciones, trastornos neurológicos tales como enfermedad de Alzheimer (AD), particularmente una enfermedad o condición caracterizados por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI) al administrar a un animal, particularmente un mamífero o un humano, una composición de vacuna de acuerdo con la invención y tal como se describe en la presente.

En una forma de realización específica la invención provee un método para retener o aumentar la capacidad de memoria cognitiva pero, particularmente, para restablecer totalmente la capacidad de memoria cognitiva de un animal, particularmente un mamífero o un humano, que padece deterioro de la memoria al administrar a un animal, particularmente un mamífero o un humano, a

composición de vacuna de acuerdo con la invención y tal como se describe en la presente.

Es otro objeto de la invención proveer una composición de vacuna terapéutica y un método para producir dicha composición además de un método para el tratamiento de enfermedades y trastornos causados por o asociados con amiloide o proteínas simil amiloide incluso amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con formación de placa amiloide incluso amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad avanzada incluso, sin limitaciones, trastornos neurológicos tales como enfermedad de Alzheimer (AD), particularmente una enfermedad o condición caracterizados por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), mediante un antígeno de péptido A β de acuerdo con la invención y tal como se describió antes en la presente, pero particularmente un fragmento peptídico A β de la parte N terminal del péptido A β , pero particularmente un fragmento peptídico A β que consiste en residuos de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10); 1-16(Δ 12), 16(Δ 13), 16(Δ 14), 1-16(Δ 15), 1-15(Δ 2), 1-15(Δ 4), 1-15(Δ 5), 1-15(Δ 6), 1-15(Δ 8), 1-15(Δ 9), 1-15(Δ 10); 1-15(Δ 12), 15(Δ 13), 15(Δ 14), particularmente un antígeno peptídico A β _{1-16(Δ 15)}, más particularmente un antígeno peptídico A β _{1-16(Δ 14)} o A β _{1-16(Δ 13)}, aun más particularmente un antígeno peptídico A β ₁₋₁₄ un antígeno peptídico, específicamente un antígeno peptídico A β ₁₋₁₅ un antígeno peptídico, pero especialmente un fragmento peptídico A β que consiste en residuos de aminoácidos 1-15 dados en SEQ ID NO: 1, y 1-16(Δ 14) dados en SEQ ID NO: 3, en donde el antígeno peptídico A β se modifica de manera tal que es capaz de mantener y estabilizar una conformación definida caracterizada por una proporción equilibrada de pociões de hélice α -helicoidal y/o lámina β y/o

arrollamiento al azar y de inducir una respuesta inmune altamente específica en el animal tratado.

La composición de vacuna de acuerdo con la invención y tal como se describió antes en la presente, tras la administración a un animal, particularmente un mamífero, pero especialmente un humano, da por resultado principalmente la generación de anticuerpos de subtipos no inflamatorios Th2 tales como, por ejemplo, isotipos IgG1 y IgG2b y/o anticuerpos de la subclase de IgG independiente de células T tales como, por ejemplo, IgG3 y/o no conduce a aumento significativo de marcadores de inflamación en el cerebro, particularmente de marcadores de inflamación seleccionados del grupo que consiste en IL-1 β , IL-6, IFN- γ y TNF α .

En otra forma de realización de la invención la vacuna de acuerdo con la presente invención tal como se describió antes en la presente, tras la administración a un animal, particularmente un mamífero, pero especialmente un humano, conduce a un significativo descenso de A β 1-40 y A β 1-42 insolubles relacionados con placa en el cerebro.

En aun otra forma de realización de la invención la vacuna de acuerdo con la presente invención tal como se describió antes en la presente, tras la administración a un animal, particularmente un mamífero, pero especialmente un humano, conduce a significativa reducción del nivel de A β 1-42 soluble en el cerebro.

También se provee una vacuna de acuerdo con la invención y tal como se describió antes en la presente, que, tras la administración a un animal, particularmente un mamífero o un humano, que padece una condición asociada con amiloide caracterizada por la condición de pérdida de la capacidad de memoria cognitiva conduce a un aumento de la retención de la capacidad de memoria cognitiva.

La invención también se refiere a una vacuna de acuerdo con la presente invención y tal como se describió antes en la presente, que, tras la administración a un animal, particularmente un mamífero o un humano, que padece una condición asociada con amiloide caracterizada por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva conduce a completo restablecimiento de la capacidad de memoria cognitiva.

En particular, el antígeno peptídico $A\beta$ de acuerdo con la invención y tal como se describió antes en la presente, específicamente un fragmento peptídico $A\beta$ de la parte N terminal del péptido $A\beta$, pero particularmente un fragmento peptídico $A\beta$ que consiste en residuos de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10); 1-16(Δ 12), 16(Δ 13), 16(Δ 14), 1-16(Δ 15), 1-15(Δ 2), 1-15(Δ 4), 1-15(Δ 5), 1-15(Δ 6), 1-15(Δ 8), 1-15(Δ 9), 1-15(Δ 10); 1-15(Δ 12), 15(Δ 13), 15(Δ 14), particularmente un antígeno peptídico $A\beta_{1-16(\Delta 15)}$, más particularmente un antígeno peptídico $A\beta_{1-16(\Delta 14)}$ o $A\beta_{1-16(\Delta 13)}$, aun más particularmente un antígeno peptídico $A\beta_{1-14}$, específicamente un antígeno peptídico $A\beta_{1-15}$, pero especialmente un fragmento peptídico $A\beta$ que consiste en residuos de aminoácidos 1-15 dados en SEQ ID NO: 1, y 1-16(Δ 14) dados en SEQ ID NO: 3, se presenta adosado a, o incorporado o reconstituido en un portador tal como, por ejemplo, una vesícula, un cuerpo particulado o molécula pero, particularmente, un liposoma.

Las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden comprender liposomas formadas al reconstituir liposomas en presencia de péptidos antigénicos purificados o parcialmente purificados o modificados de acuerdo con la invención. Además, los fragmentos peptídicos se pueden reconstituir en liposomas. La presente invención también incluye fragmentos peptídicos antigénicos modificados para aumentar su antigenicidad. Por ejemplo,

se pueden adjuntar o mezclar residuos antigénicos y coadyuvantes al péptido. Los ejemplos de residuos antigénicos y coadyuvantes incluyen, sin limitaciones, derivados lipofílicos de dipéptido muramilo, polímeros de bloque no iónicos, coadyuvante de hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio, y sus mezclas.

En otra forma de realización de la invención el antígeno peptídico A β de acuerdo con la invención y tal como se describió antes en la presente, específicamente un fragmento peptídico A β de la parte N terminal del péptido A β , pero particularmente un fragmento peptídico A β que consiste en residuos de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10); 1-16(Δ 12), 16(Δ 13), 16(Δ 14), 1-16(Δ 15), 1-15(Δ 2), 1-15(Δ 4), 1-15(Δ 5), 1-15(Δ 6), 1-15(Δ 8), 1-15(Δ 9), 1-15(Δ 10); 1-15(Δ 12), 15(Δ 13), 15(Δ 14), particularmente un antígeno peptídico A β _{1-16(Δ 15)}, más particularmente un antígeno peptídico A β _{1-16(Δ 14)} o A β _{1-16(Δ 13)}, aun más particularmente un antígeno peptídico A β ₁₋₁₄, específicamente un antígeno peptídico A β ₁₋₁₅, pero especialmente un fragmento peptídico A β que consiste en residuos de aminoácidos 1-15 dados en SEQ ID NO: 1, y 1-16(Δ 14) dados en SEQ ID NO: 3, es modificado por un residuo lipofílico o hidrofóbico, que facilita la inserción en la bicapa lipídica del portador de liposoma/coadyuvante inmune, particularmente por un residuo lipofílico o hidrofóbico que actúa como ancla para el péptido en la bicapa del liposoma y tiene una dimensión que conduce a ubicar el péptido y estabilizarlo en cercanía de la superficie del liposoma.

En otra forma de realización de la invención, el residuo lipofílico o hidrofóbico es un ácido graso, un triglicérido o un fosfolípido, pero especialmente un ácido graso, un triglicérido o un fosfolípido, en donde el esqueleto carbonado de ácidos grasos tiene al menos 10 átomos de carbono. Particularmente, el residuo lipofílico o hidrofóbico es un ácido graso con un esqueleto carbonado de

al menos aproximadamente 14 átomos de carbono y hasta aproximadamente 24 átomos de carbono, en donde cada cantidad individual de átomos de carbono que está dentro de este rango también es parte de la presente invención. Más particularmente, el residuo lipofílico o hidrofóbico tiene un esqueleto carbonado de al menos 14 átomos de carbono, pero especialmente 16 átomos de carbono. Son ejemplos de residuos hidrofóbicos, pero sin limitaciones, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido mirístico, ácido láurico, ácido oleico, ácido linoleico, y ácido linolénico. En una forma específica de realización de la presente invención el residuo lipofílico o hidrofóbico es ácido palmítico.

En aun otra forma de realización de la invención el residuo hidrofóbico es ácido palmítico y la preparación de liposoma además puede contener un coadyuvante tal como, por ejemplo, lípido A, alúmina, fosfato de calcio, interleuquina 1, y/o microcápsulas polisacáridos y proteínas, pero particularmente un lípido A detoxificado, tal como monofosforil o difosforil lípido A, o alúmina.

Es otro objeto de la invención proveer una composición de vacuna terapéutica y un método para producir dicha composición que usa un péptido antigénico inmunogénico de acuerdo con la invención y tal como se describió antes en la presente, para el tratamiento de enfermedades y trastornos causados por o asociado con amiloide o proteínas símil amiloide incluso amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con formación de placa amiloide incluso amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad avanzada incluso, sin limitaciones, trastornos neurológicos tales como enfermedad de Alzheimer (AD), particularmente para la retención, el aumento o el restablecimiento de la capacidad de memoria cognitiva de un animal, particularmente un mamífero o un humano, que padece deterioro de la memoria, además de un método para el tratamiento dichas amiloidosis, en donde el antígeno peptídico β -amiloide es un antígeno peptídico palmitoilado A β de

que consiste en residuos de aminoácidos 1-15 dados en SEQ ID NO: 1, y 1-16(Δ 14) dados en SEQ ID NO: 3, de manera tal que la capacidad de memoria cognitiva del animal o humano tratado se retiene o aumenta pero, particularmente, se restablece por completo.

El péptido antigénico tal como se describió antes en la presente, pero específicamente un fragmento peptídico A β de la parte N terminal del péptido A β , pero particularmente un fragmento peptídico A β que consiste en residuos de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10); 1-16(Δ 12), 16(Δ 13), 16(Δ 14), 1-16(Δ 15), 1-15(Δ 2), 1-15(Δ 4), 1-15(Δ 5), 1-15(Δ 6), 1-15(Δ 8), 1-15(Δ 9), 1-15(Δ 10); 1-15(Δ 12), 15(Δ 13), 15(Δ 14), particularmente un antígeno peptídico A β _{1-15(Δ 15)}, más particularmente un antígeno peptídico A β _{1-16(Δ 14)} o A β _{1-16(Δ 13)}, aun más particularmente un antígeno peptídico A β ₁₋₁₄, específicamente un antígeno peptídico A β ₁₋₁₅, pero especialmente un fragmento peptídico A β que consiste en residuos de aminoácidos 1-15 dados en SEQ ID NO: 1, y 1-16(Δ 14) dados en SEQ ID NO: 3, es también parte de la presente invención.

También es parte de la invención un antígeno peptídico palmitoilado A β de acuerdo con la invención y tal como se describió antes en la presente, específicamente un fragmento peptídico palmitoilado A β de la parte N terminal del péptido A β , pero particularmente un fragmento peptídico palmitoilado A β que consiste en residuos de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10); 1-16(Δ 12), 16(Δ 13), 16(Δ 14), 1-16(Δ 15), 1-15(Δ 2), 1-15(Δ 4), 1-15(Δ 5), 1-15(Δ 6), 1-15(Δ 8), 1-15(Δ 9), 1-15(Δ 10); 1-15(Δ 12), 15(Δ 13), 15(Δ 14), particularmente un antígeno peptídico palmitoilado A β _{1-16(Δ 15)}, más particularmente un antígeno peptídico palmitoilado A β _{1-16(Δ 14)} o A β _{1-16(Δ 13)}, aun más particularmente un antígeno peptídico palmitoilado A β ₁₋₁₄, específicamente un antígeno peptídico

palmitoilado $A\beta_{1-15}$, pero especialmente un fragmento peptídico palmitoilado $A\beta$ que consiste en residuos de aminoácidos 1-15 dados en SEQ ID NO: 1, y 1-16($\Delta 14$) dados en SEQ ID NO: 3, modificado por residuos palmitoilos adosados covalentemente, particularmente entre 2 y 4 residuos palmitoilos, más particularmente 4 residuos palmitoilos, acoplados a cada terminal del antígeno peptídico a través de uno o más, pero particularmente a través de uno o dos residuos de aminoácidos adecuados tales como lisina, ácido glutámico o cisteína, o cualquier otro residuo de aminoácidos que se puede usar en forma adecuada para acoplar un residuo palmitoilos al péptido antigénico.

En una forma de realización específica de la invención, 2 o más de las moléculas de antígeno peptídico palmitoilado $A\beta$ modificado por residuos palmitoilos adosados covalentemente en cada extremo del péptido se reconstituyen en un único liposoma.

También se comprende en la presente invención un péptido antigénico que se presenta adosado, o incorporado o reconstituido en un portador tal como, por ejemplo, una vesícula, un cuerpo particulado o molécula, particularmente, a liposoma, tal como se describió antes en la presente, pero específicamente un fragmento peptídico $A\beta$ de la parte N terminal del péptido $A\beta$, pero particularmente un fragmento peptídico $A\beta$ que consiste en residuos de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16($\Delta 2$), 1-16($\Delta 4$), 1-16($\Delta 5$), 1-16($\Delta 6$), 1-16($\Delta 8$), 1-16($\Delta 9$), 1-16($\Delta 10$); 1-16($\Delta 12$), 16($\Delta 13$), 16($\Delta 14$), 1-16($\Delta 15$), 1-15($\Delta 2$), 1-15($\Delta 4$), 1-15($\Delta 5$), 1-15($\Delta 6$), 1-15($\Delta 8$), 1-15($\Delta 9$), 1-15($\Delta 10$); 1-15($\Delta 12$), 15($\Delta 13$), 15($\Delta 14$), particularmente un antígeno peptídico $A\beta_{1-16(\Delta 15)}$, más particularmente un antígeno peptídico $A\beta_{1-16(\Delta 14)}$ o $A\beta_{1-16(\Delta 13)}$, aun más particularmente un antígeno peptídico $A\beta_{1-14}$, específicamente un antígeno peptídico $A\beta_{1-15}$, pero especialmente un fragmento peptídico $A\beta$ que consiste en residuos de aminoácidos 1-15 dados en SEQ ID NO:

1, y 1-16(Δ 14) dados en SEQ ID NO: que se presenta adosado, o incorporado o reconstituido en un portador tal como, por ejemplo, una vesícula, un cuerpo particulado o molécula tal como se describió antes en la presente.

Sin pretender estar atado por ninguna hipótesis específica, es razonable suponer que la respuesta inmune inducida por la composición de vacuna terapéutica de la invención puede conducir a la estimulación en un animal o humano de células T y otras células inmunes reactivas dirigidas contra un agente inmunogénicas, pero particularmente a la generación de anticuerpos altamente específicos y altamente efectivos con la capacidad para reconocer específicamente y unir epitopos específicos provenientes de un rango de antígenos de β -amiloide, cuyo anticuerpo, tras unirse al antígeno, media y/o induce el efecto observable de retención, aumento y particularmente, restablecimiento completo de capacidad de memoria cognitiva en el animal o humano tratado.

La presente invención también provee una composición de vacuna, que, tras la administración a un animal, particularmente un mamífero o un humano, induce la generación de un anticuerpo en el animal o humano tratado que directamente y específicamente se une a fibras de β -amiloide tales como, por ejemplo, fibras que comprenden péptidos monoméricos $A\beta$ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 o 1-43, pero especialmente a fibras que comprenden péptidos monoméricos $A\beta_{1-42}$ y/o es capaz de inducir la solubilización de fibrillas o filamentos poliméricos de amiloide preformados de alto peso molecular formados por agregación de péptidos monoméricos de amiloide, particularmente péptidos monoméricos de β -amiloide tales como, por ejemplo, péptidos monoméricos $A\beta$ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 o 1-43, pero especialmente péptidos monoméricos $A\beta_{1-42}$, al dirigirse y unirse específicamente a un epitopo dentro de una región epitópica de la proteína amiloide β , particularmente una región epitópica del polipéptido $A\beta$ confinada por

los residuos de aminoácidos aa_n - aa_m donde n es un entero entre 2 y 15, particularmente entre 5 y 15, más particularmente entre 8 y 15, aun más particularmente entre 10 y 15 y m es un entero entre 3 y 17, particularmente entre 6 y 17, más particularmente entre 9 y 17, aun más particularmente entre 11 y 17, en donde n y m no pueden ser números idénticos y n siempre debe ser un número menor que m , con la diferencia entre n y $m \geq 2$.

En una forma de realización específica de la invención, el anticuerpo se une a un epitopo dentro de una región epitópica de la proteína amiloide β que comprende residuos de aminoácidos 1-10, pero particularmente residuos de aminoácidos 1-9.

Dicho anticuerpo también se une específicamente amiloides monoméricos y oligoméricos solubles, particularmente péptidos β -amiloides monoméricos y oligoméricos seleccionados del grupo que consiste en péptido $A\beta$ s 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 o 1-43, pero especialmente $A\beta_{1-42}$, e inhibe la agregación de los monómeros u oligómeros $A\beta$ en fibrillas poliméricas de alto peso molecular.

En otra forma de realización, la invención provee un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, incluso cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o sus partes funcionales, en donde el anticuerpo incorpora al menos una de las propiedades seleccionadas del grupo que consiste en inhibición de la agregación, desagregación, inducción de la transición de la conformación, reconocimiento y unión directa de un epitopo en la región 4-16, particularmente en la región 1-9, pero especialmente a una combinación de dos o más de dichas propiedades. Más específicamente, se provee un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, incluso cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o sus partes funcionales, en donde el anticuerpo muestra reactividad combinada contra la región 1-16 y 29-40, más particularmente contra la región 1-16 y 22-35 en cuanto es capaz de reconocer y unirse a ambas

regiones, las regiones 1-16 y 29-40 y las regiones 1-16 y 22-35, respectivamente, e incorpora al menos una de las propiedades antes mencionadas en la presente, es decir agregación inhibición, desagregación, inducción de transición de conformación, pero especialmente una combinación de dos o más de dichas propiedades.

Los anticuerpos inducidos por la composición de vacuna de acuerdo con la invención y que se pueden obtener de un animal inmunizado o una línea celular de hibridoma productora de dichos anticuerpos, son también parte de la invención.

En una forma de realización específica, la invención provee un anticuerpo incluso cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o sus partes funcionales, particularmente un anticuerpo monoclonal incluso cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o sus partes funcionales que se obtiene al inmunizar un animal adecuado con una composición de vacuna de acuerdo con la invención y tal como se describió antes en la presente, particularmente una composición de vacuna que comprende un antígeno peptídico $A\beta_{1-16(\Delta 15)}$, más particularmente antígeno peptídico $A\beta_{1-16(\Delta 14)}$ o $A\beta_{1-16(\Delta 13)}$, aun más particularmente antígeno peptídico $A\beta_{1-14}$, pero especialmente antígeno peptídico $A\beta_{1-15}$, en donde el anticuerpo es un anticuerpo bifuncional y tras la coincubación con péptidos de amiloide monoméricos, particularmente péptidos de amiloide β monoméricos tales como, por ejemplo, péptidos de amiloide $A\beta$ 1-38, 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 o 1-43, pero especialmente péptidos de amiloide $A\beta_{1-42}$, inhibe la agregación de los monómeros $A\beta$ en fibrillas poliméricas de alto peso molecular y además, tras la coincubación con fibrillas o filamentos de amiloide polimérico de alto peso molecular formados por agregación de péptidos de amiloide monoméricos, péptidos de amiloide β monoméricos tales como, por ejemplo, péptidos monoméricos $A\beta$ 1-38, 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 o 1-43, pero especialmente péptidos

monoméricos $A\beta_{1-42}$, es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos poliméricos preformados.

En una forma de realización específica, la invención provee un anticuerpo, particularmente un anticuerpo bifuncional, pero especialmente un anticuerpo monoclonal, particularmente a anticuerpo monoclonal bifuncional, incluso cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o sus partes funcionales, que exhiben alta especificidad a péptidos monoméricos $A\beta_{1-42}$ pero no muestra esencialmente nada o solo mínima reactividad cruzada un péptido monomérico $A\beta_{1-38}$, $A\beta_{1-39}$, $A\beta_{1-40}$, y/o $A\beta_{1-41}$, particularmente un anticuerpo, pero especialmente un anticuerpo monoclonal, incluso cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o sus partes funcionales, en donde el anticuerpo es de hasta 100 veces, particularmente 50 a 100 veces, más particularmente 80 a 100 veces, pero especialmente 100 veces más sensible a péptido amiloide $A\beta_{1-42}$ comparado con $A\beta_{1-38}$, $A\beta_{1-39}$, $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-41}$ y hasta 1000 veces, particularmente 500 a 1000 veces, más particularmente 800 a 1000 veces, pero especialmente 1000 veces más sensible a péptido amiloide $A\beta_{1-42}$ comparado con $A\beta_{1-38}$, y en consecuencia capaz de inhibir, *in vitro* e *in vivo*, la agregación de péptidos monoméricos amiloidogénicos, pero especialmente de péptido amiloide $A\beta_{1-42}$.

En otra forma de realización específica de la invención un anticuerpo, particularmente un anticuerpo bifuncional, pero especialmente un anticuerpo monoclonal, particularmente un anticuerpo monoclonal bifuncional, incluso cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o sus partes funcionales, que tiene alta sensibilidad de unión con péptido amiloide $A\beta_{1-42}$ y es capaz de detectar fibras $A\beta_{1-42}$ en una concentración de apenas al menos 0,001 μg , pero particularmente en un rango de concentración de entre 0,5 μg y 0,001 μg , más particularmente entre 0,1 μg y 0,001 μg , pero especialmente en una concentración de 0,001 μg .

En una forma de realización muy específica de la invención se provee un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, incluso cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o sus partes funcionales, en donde el anticuerpo es capaz de detectar fibras $A\beta_{1-42}$ en una concentración mínima de 0,001 μg y fibras $A\beta_{1-40}$ hasta a una concentración mínima de 0,1 μg y fibras $A\beta_{1-38}$ hasta una concentración mínima de 1 μg de cantidad de fibras.

La fijación de los anticuerpos de acuerdo con la invención y tal como se describió antes en la presente a péptidos amiloidogénicos monoméricos pero, particularmente, a la forma amiloide (1-42) conduce a una inhibición de la agregación de péptidos amiloidogénicos monoméricos en fibrillas o filamentos de alto peso molecular. Mediante la inhibición de la agregación de péptidos amiloidogénicos monoméricos los anticuerpos de acuerdo con la presente invención son capaces de prevenir o enlentecer la formación de placas amiloides, particularmente la forma amiloide (1-42), conocida por tornarse insoluble por cambio de conformación y por ser la parte principal de las placas amiloides en los cerebros de animales o humanos enfermos.

En una forma de realización específica la presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal incluso cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o sus partes funcionales en donde el anticuerpo tiene las propiedades características de un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma EJ 7H3, depositada el 8 de diciembre de 2005 como DSM ACC2756.

Más particularmente, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal, incluso cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o sus partes funcionales, producido por la línea celular de hibridoma EJ 7H3, depositada el 8 de diciembre de 2005 como DSM ACC2756.

También es un objeto de la presente invención proveer un método para prevenir, tratar o aliviar los efectos de amiloidosis, un grupo de enfermedades y

trastornos asociadas con formación de placa amiloide incluso amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad avanzada incluso, sin limitaciones, trastornos neurológicos tales como enfermedad de Alzheimer (AD), incluso enfermedades o condiciones caracterizados por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), demencia de cuerpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo Dutch); complejo de demencia de Parkinson de Guam; además de otras enfermedades basadas sobre o asociadas con proteínas símil amiloide tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes de inicio en el adulto; amiloidosis cardíaca senil; tumores endocrinos, y otros, incluso degeneración macular, pero particularmente una enfermedad o condición caracterizados por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), al administrar una construcción antigénica supramolecular de acuerdo con la presente invención, pero particularmente una composición de vacuna que comprende dicha construcción antigénica supramolecular de acuerdo con la invención a un animal, particularmente un mamífero o un humano, afectado por dicho trastorno y en consecuencia necesita dicho tratamiento.

En otra forma de realización de la presente invención se provee un método para la preparación de una composición de vacuna para inducir una respuesta inmune en un organismo, en particular un animal o humano afectado por dicho trastorno, enfermedad o condición y en consecuencia en la necesidad de dicho tratamiento, para prevenir, tratar o aliviar los efectos de amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con formación de placa amiloide incluso amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad avanzada incluso,

sin limitaciones, trastornos neurológicos tales como enfermedad de Alzheimer (AD), incluso enfermedades o condiciones caracterizados por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), demencia de cuerpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo Dutch); el complejo de demencia de Parkinson de Guam; además de otras enfermedades basadas sobre o asociadas con proteínas simil amiloide tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeld Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes de inicio en el adulto; amiloidosis cardiaca senil; tumores endocrinos, y otros, incluso degeneración macular, pero particularmente una enfermedad o condición caracterizados por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI)

En aun otra forma de realización de la presente invención se provee un método para la preparación de una composición de vacuna terapéutica para prevenir, tratar o aliviar los efectos de amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con formación de placa amiloide incluso amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad avanzada incluso, sin limitaciones, trastornos neurológicos tales como enfermedad de Alzheimer (AD), incluso enfermedades o condiciones caracterizados por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), demencia de cuerpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo Dutch); el complejo de demencia de Parkinson de Guam; además de otras enfermedades basadas sobre o asociadas con proteínas simil amiloide tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeld Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes de inicio en el

adulto; amiloidosis cardíaca senil; tumores endocrinos, y otros, incluso degeneración macular, pero particularmente una enfermedad o condición caracterizados por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), que comprenden formular un anticuerpo de acuerdo con la invención en una forma farmacéuticamente aceptable.

En una forma de realización específica, la presente invención utiliza una presentación de antígeno que da por resultado aumento de la exposición y estabilización de una conformación de antígeno de preferencia, que en última instancia conduce a una altamente específica respuesta inmune y da por resultado la generación de anticuerpos con singulares propiedades.

En una forma de realización, la presente invención provee composiciones inmunogénicas que comprenden una construcción antigénica supramolecular que comprende a antígeno peptídico β -amiloide de acuerdo con la invención y tal como se describió antes en la presente representativo de la parte N terminal del péptido β -amiloide, en donde el péptido antigénico se modifica de manera tal que es está modificado de manera tal que es capaz de mantener y estabilizar una conformación definida del antígeno, particularmente una conformación que se caracteriza por una proporción equilibrada de porciones de arrollamiento aleatorio, hélice α y lámina β . Esta conformación definida conduce a la inducción de una fuerte y altamente específica respuesta inmune tras la introducción en un animal o un humano.

En otra forma de realización de la invención la composición de vacuna de acuerdo con la invención puede comprender además un antígeno peptídico A β , particularmente el antígeno peptídico A β de la invención tal como se describió antes en la presente, un inhibidor de la activación de complemento. La invención en consecuencia se refiere a una composición de vacuna y un método para

producir dicha composición para el tratamiento de enfermedades y trastornos causados por o asociados con amiloide o proteínas simil amiloide incluso amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con formación de placa amiloide incluso amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad avanzada incluso, sin limitaciones, trastornos neurológicos tales como enfermedad de Alzheimer (AD), particularmente a enfermedad o condición caracterizados por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI) que comprenden un fragmento peptídico de la parte N terminal del péptido A β , particularmente un fragmento peptídico A β que consiste en una extensión único o repetida de entre 7 y 16 residuos de aminoácidos contiguos, especialmente de entre 13 y 16 residuos de aminoácidos contiguos, particularmente de la parte N terminal del péptido A β , pero particularmente un fragmento peptídico A β que consiste en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en residuos 1-16, 1-15, 1-14, y 1-13 de la parte N terminal del péptido A β , más particularmente de los residuos 1-15 dados en SEQ ID NO: 1, incluso sus fragmentos funcionalmente equivalentes, pero especialmente un fragmento de péptido A β tal como el antes mencionado en la presente adosado o incorporado o reconstituido en una partícula portadora/coadyuvante tales como, por ejemplo, un liposoma junto con un inhibidor del sistema del complemento, particularmente un inhibidor de la vía del complemento seleccionado del grupo que consiste en versiones solubles de proteínas reguladoras de membrana, anticuerpos humanizados contra proteínas del complemento, inhibidores de moléculas pequeñas que actúan en diversos estadios de la vía del complemento y reguladores del complemento humano expresados en animales transgénicos.

Esta extensión continua de 13 a 15 residuos de aminoácidos se puede repetir en la construcción de acuerdo con la invención entre 2 y 50 veces.

particularmente entre 2 y 30 veces, más particularmente entre 2 y 20 veces, aun más particularmente entre 2 y 16 veces, pero especialmente entre 2 y 10 veces.

En una forma de realización específica de la invención, el inhibidor de la activación del complemento que es un componente de la composición de vacuna terapéutica tal como el antes mencionado en la presente es un compuesto seleccionado del grupo que consiste en soluble receptor de complemento humano 1, proteína de complemento antihumano C5 tales como, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti C5 humanizado o un fragmento de cadena simple de un anticuerpo monoclonal humanizado, un inhibidor de C1-N esterasa y un inhibidor de C1 natural humano.

También se comprende en la presente invención una composición de vacuna de acuerdo con la invención tal como la antes mencionado en la presente, que comprende además de un fragmento peptídico A β , particularmente el fragmento de péptido A β de acuerdo con la invención, un efector alostérico de hemoglobina, por lo que los glóbulos rojos de la sangre desencadenan un descenso de la afinidad de O₂/hemoglobina, por lo que el oxígeno es liberado en forma regulada posterior a los tejidos.

En consecuencia, la invención se refiere a una composición de vacuna y un método para producir dicha composición para el tratamiento de enfermedades y trastornos causados por o asociado con amiloide o proteínas simil amiloide incluso amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con formación de placa amiloide incluso amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad avanzada incluso, sin limitaciones, trastornos neurológicos tales como enfermedad de Alzheimer (AD), particularmente una enfermedad o condición caracterizados por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI) que comprenden un fragmento peptídico de la parte N terminal del péptido A β ,

particularmente un fragmento peptídico A β que consiste en una extensión única o repetida de entre 7 y 16 residuos de aminoácidos contiguos, especialmente de entre 13 y 16 residuos de aminoácidos contiguos, particularmente de la parte N terminal del péptido A β , pero particularmente un fragmento peptídico A β que consiste en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en residuos 1-16, 1-15, 1-14, y 1-13 de la parte N terminal del péptido A β , más particularmente de residuos 1-15 dados en SEQ ID NO: 1, incluso sus fragmentos funcionalmente equivalentes, pero particularmente un fragmento de péptido A β tal como el antes mencionado en la presente que es modificado por residuos palmitoilo unidos covalentemente en cada extremo del péptido para dar entre 2 y 4, particularmente 4 residuos palmitoilo, pero especialmente un fragmento de péptido A β tal como el antes mencionado en la presente adosado o incorporado o reconstituido en una partícula portadora/coadyuvante tales como, por ejemplo, un liposoma junto con un compuesto desencadenan un descenso de la afinidad de O₂/hemoglobina, por lo que el oxígeno es liberado en forma regulada posterior a los tejidos. Esta extensión continua de 13 a 15 residuos de aminoácidos se puede repetir en la construcción de acuerdo con la invención entre 2 y 50 veces, particularmente entre 2 y 30 veces, más particularmente entre 2 y 20 veces, aun más particularmente entre 2 y 16 veces, pero especialmente entre 2 y 10 veces.

En particular, los compuestos que se pueden usar adecuadamente dentro de una composición de acuerdo con la invención son los seleccionados del grupo que consiste en un fármaco antilipemiante tal como, por ejemplo, ácido clofibrico o bezafibrato, incluso los derivados de bezafibrato LR16 y L35, derivados de urea tales como, por ejemplo, ácido [2-[4[[[arilamino]carbonil]-amino]fenoxi]-2-metilpropiónico, un efector alostérico de hemoglobina.

El compuesto modulador de la afinidad de O₂/hemoglobina también puede ser un compuesto que comprende un ligando aniónico para un sitio alostérico de

hemoglobina, en donde el ligando aniónico comprende un anillo de pirofosfato interno, opcionalmente junto con un catión no tóxico tal como, por ejemplo, Ca^{2+} y Na^+ .

Más específicamente, la invención se refiere a una composición de vacuna terapéutica de acuerdo con la invención tal como la antes mencionada en la presente, que comprende además del fragmento de péptido A β de acuerdo con la invención derivados de hexafosfato de inositol (IHP) que comprenden un anillo interno de pirofosfato, opcionalmente junto con un catión no tóxico tal como, por ejemplo, Ca^{2+} y Na^+ .

En aun otra forma de realización se provee una composición de vacuna de acuerdo con la invención y tal como la antes mencionada en la presente que comprende, además de un fragmento peptídico A β , particularmente el fragmento de péptido A β de acuerdo con la invención, una combinación de un inhibidor del sistema de activación de complemento, particularmente un inhibidor de la vía del complemento seleccionado del grupo que consiste en versiones solubles de proteínas reguladoras de membrana, anticuerpos humanizados contra proteínas de complemento, inhibidores de moléculas pequeñas que actúan en diversas etapas de la vía del complemento y reguladores de complemento humano expresados en animales transgénicos y un efector alostérico de hemoglobina que reduce la afinidad de O_2 /hemoglobina por lo que luego se libera más oxígeno a los tejidos, en forma regulada.

Así, la invención también se refiere a una composición de vacuna y un método para producir dicha composición para el tratamiento de enfermedades y trastornos causados por o asociados con amiloide o proteínas simil amiloide incluso amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con formación de placa amiloide incluso amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad avanzada incluso, sin limitaciones, trastornos



neurológicos tales como enfermedad de Alzheimer (AD), particularmente una enfermedad o condición caracterizados por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI) que comprenden un fragmento peptídico de la parte N terminal del péptido A β , particularmente un fragmento peptídico A β que consiste en una extensión único o repetida de entre 7 y 16 residuos de aminoácidos contiguos, especialmente de entre 13 y 16 residuos de aminoácidos contiguos, particularmente de la parte N terminal del péptido A β , pero particularmente un fragmento peptídico A β que consiste en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en residuos 1-16, 1-15, 1-14, y 1-13 de la parte N terminal del péptido A β , más particularmente de residuos 1-15 dados en SEQ ID NO: 1, incluso sus fragmentos funcionalmente equivalentes, particularmente un fragmento de péptido A β tal como el antes mencionado en la presente que es modificado por residuos palmitoilo unidos covalentemente en cada extremo del péptido para dar entre 2 y 4, particularmente 4 residuos palmitoilo, pero especialmente un fragmento de péptido A β tal como el antes mencionado en la presente adosado o incorporado o reconstituido en una partícula portadora/coadyuvante tal como, por ejemplo, un liposoma junto con un inhibidor del sistema del complemento, particularmente un inhibidor de la activación de complemento seleccionado del grupo que consiste en versiones solubles de proteínas reguladoras de membrana, anticuerpos humanizados contra proteínas de complemento, inhibidores de moléculas pequeñas que actúan en diversas etapas de la vía del complemento y reguladores de complemento humano expresados en animales transgénicos y a compuesto, particularmente un efector alostérico de hemoglobina, que disminuye la afinidad de O₂/hemoglobina por lo que luego se libera más oxígeno a los tejidos, en forma regulada.

Esta extensión continua de 13 a 15 residuos de aminoácidos se puede repetir en la construcción de acuerdo con la invención entre 2 y 50 veces, particularmente entre 2 y 30 veces, más particularmente entre 2 y 20 veces, aun más particularmente entre 2 y 16 veces, pero especialmente entre 2 y 10 veces.

En aun otra forma de realización, se provee un método para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada a amiloide que comprende administrar a un animal, particularmente un mamífero, pero especialmente un humano que padece dicha enfermedad o condición una composición de vacuna terapéutica de acuerdo con la invención y tal como se describió antes en la presente, particularmente una composición de vacuna que comprende un antígeno peptídico A β ₁₋₁₅, más particularmente un antígeno peptídico palmitoilado A β ₁₋₁₅.

En una forma de realización específica de la invención, la administración de dicha composición de vacuna da por resultado sobre todo la generación de anticuerpos subtipos no inflamatorios, particularmente el subtipo no inflamatorio Th2 tal como, por ejemplo, los isotipos IgG1 y IgG2b.

En otra forma de realización específica, la administración de dicha composición de vacuna da por resultado sobre todo la generación de anticuerpos de la subclase de IgG independiente de células T, particularmente del isotipo IgG3.

En aun otra forma de realización de la invención, la administración de dicha composición de vacuna no conduce a un significativo aumento de marcadores de inflamación en el cerebro, particularmente de marcadores de inflamación seleccionados del grupo que consiste en IL-1 β , IL-6, IFN- γ y TNF α .

En aun otra forma de realización de la invención, la administración de dicha composición de vacuna conduce un significativo descenso de A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂ insoluble, relacionado con placas, en el cerebro.

En aun otra forma de realización de la invención, la administración de dicha composición de vacuna conduce a una significativa reducción del nivel de A β 1-42 soluble en el cerebro.

En particular, la enfermedad o condición asociada a amiloide se seleccionada del grupo que consiste en enfermedades incluso, sin limitaciones, trastornos neurológicos tales como enfermedad de Alzheimer (AD), incluso enfermedades o condiciones caracterizados por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), demencia de cuerpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo Dutch); el complejo de demencia de Parkinson de Guam; además de otras enfermedades basadas sobre o asociadas con proteínas simil amiloide tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes de inicio en el adulto; amiloidosis cardiaca senil; tumores endocrinos, y otros, incluso degeneración macular.

Más particularmente, la enfermedad o condición asociada a amiloide es enfermedad de Alzheimer.

En aun otra forma de realización específica de la invención, se provee un método para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada a amiloide de acuerdo con la invención y tal como se describió antes en la presente, en donde la administración de dicha composición de vacuna a un animal, particularmente un mamífero o un humano, que padece una condición asociada con amiloide caracterizada por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva conduce a un aumento, particularmente al completo restablecimiento de la retención de la capacidad de memoria cognitiva.

BA

En aun otra forma de realización, se provee un método para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada a amiloide que comprende administrar a un animal, particularmente un mamífero, pero especialmente un humano que padece dicha enfermedad o condición, una composición de vacuna terapéutica que comprende una construcción antigénica de acuerdo con la invención y tal como se describió antes en la presente y un inhibidor del sistema del complemento, en donde dicha composición de vacuna es particularmente administrada de manera tal que el inhibidor de complemento y la construcción antigénica se administran en forma concomitante, intermitente o secuencial.

En una forma de realización específica, el inhibidor de complemento se administra antes de la vacunación con la construcción antigénica, particularmente dentro de una ventana temporal que comienza hasta 20 horas antes de la vacunación y que termina inmediatamente antes de la vacunación.

En otra forma de realización específica, el inhibidor de complemento se administra después de la vacunación con la construcción antigénica dentro de una ventana temporal que comienza inmediatamente después de la vacunación y termina 1 día después de la aplicación de la vacuna.

En aun otra forma de realización de la invención se provee un método para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada a amiloide que comprende usar una composición de vacuna de acuerdo con la invención y tal como se describió antes en la presente.

Estos y otros objetos, características y ventajas de la presente invención serán aparentes después de una revisión de la siguiente descripción detallada de la forma de realización descrita y las reivindicaciones adjuntas.

Los términos "polipéptido", "péptido", y "proteína", tal como se usan en la presente, son intercambiables y se definen con el significado de una biomolécula compuesta de aminoácidos ligados por un enlace peptídico.



El término "péptido," comprende cadenas de aminoácidos (generalmente L-aminoácidos) cuyos carbonos alfa están unidos mediante enlaces peptídicos formados por reacción de condensación entre el grupo carboxilo del carbono alfa de un aminoácido y el grupo amino del carbono alfa de otro aminoácido. El aminoácido terminal en un extremo de la cadena (es decir, el terminal amino) tiene un grupo amino libre, mientras que el aminoácido terminal en el otro extremo de la cadena (es decir, el terminal carboxi) tiene un grupo carboxilo libre. Como tal, el término "terminal amino" (abreviado N terminal) se refiere al grupo alfa amino libre en el aminoácido del terminal amino del péptido, o el grupo alfa amino (grupo imino cuando participa en un enlace peptídico) de un aminoácido en otra ubicación dentro del péptido. De modo similar, el término "terminal carboxi" (abreviado C terminal) se refiere al grupo carboxilo libre en el aminoácido en el terminal carboxi de un péptido, o el grupo carboxilo de un aminoácido en cualquier otra ubicación dentro del péptido.

En general, los aminoácidos que conforman un péptido se numeran en orden, comenzando en el amino terminal y aumentando en la dirección hacia el carboxi terminal del péptido. En consecuencia, cuando se dice que un aminoácido "sigue" a otro, ese aminoácido se ubica más cerca del terminal carboxi del péptido que el aminoácido precedente.

El término "residuo" se usa en la presente para referirse a un aminoácido que se incorpora a un péptido mediante un enlace amida. Como tal, el aminoácido puede ser un aminoácido natural o, a menos que esté limitado de otro modo, puede abarcar análogos conocidos de aminoácidos naturales que actúan de manera similar a los aminoácidos naturales (es decir, son aminoácido-miméticos). Además, un mimético de enlace amida incluye modificaciones del esqueleto peptídico bien conocidas por los expertos en el arte.

La frase "consiste esencialmente en" se usa en la presente para excluir cualquier elemento que sustancialmente alteraría las propiedades esenciales de los péptidos a los cuales se refiere la frase. En consecuencia, la descripción de un péptido "que consiste esencialmente en..." excluye cualquier substitución, adición o delección de aminoácido que sustancialmente alteraría la actividad biológica de dicho péptido.

Además, un experto en el arte reconocerá que, tal como se mencionó con anterioridad, substituciones, delecciones o adiciones individuales que alteren, agreguen o eliminen un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos (generalmente menos del 5%, más generalmente menos del 1%) en una secuencia codificada, son variaciones con modificaciones conservadoras en las cuales las alteraciones dan por resultado la substitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. Las tablas de substitución conservadora que proveen aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en el arte. Cada uno de los siguientes seis grupos contiene aminoácidos que son substituciones conservadoras entre sí:

- 1) Alanina (A), Serina(S), Treonina(T);
- 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E);
- 3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
- 4) Arginina (R), Lisina (K);
- 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y
- 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W).

Las frases "aislado" o "biológicamente puro" se refieren a un material que está sustancialmente o esencialmente libre de componentes que normalmente lo acompañan tal como se encuentra en su estado nativo. En consecuencia, los péptidos descritos en la presente no contienen materiales normalmente asociados con su ambiente in situ. Generalmente, los péptidos aislados inmunogénicos

descritos en la presente son al menos aproximadamente 80% puros, usualmente al menos aproximadamente 90%, y de preferencia al menos aproximadamente 95% medido por intensidad de banda en un gel teñido con plata.

La pureza y homogeneidad de una proteína se puede indicar mediante numerosos métodos bien conocidos en el arte, tales como electroforesis en gel de poliacrilamida de una muestra de proteína, seguido de visualización tras la tinción. Para ciertos fines se puede necesitar alta resolución y HPLC o utilizar medios similares de purificación.

Cuando los péptidos inmunogénicos son relativamente cortos (es decir, menos de aproximadamente 50 aminoácidos), a menudo se sintetizan mediante técnicas de síntesis química de péptido estándar.

La síntesis de fase sólida por la cual el aminoácido C terminal de la secuencia se adosa a un soporte insoluble, seguido de la adición en secuencia del resto de aminoácidos de la secuencia es un método de preferencia para la síntesis química de los péptidos inmunogénicos descritos en la presente. Las técnicas de síntesis de fase sólida son conocidas por los expertos en el arte.

Alternativamente, los péptidos inmunogénicos descritos en la presente se sintetizan mediante metodología de ácidos nucleicos recombinantes. Generalmente, esto implica crear una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el péptido, y coloca el ácido nucleico en un casete de expresión bajo el control de un promotor particular, que expresa el péptido en un huésped, aísla el péptido o polipéptido expresado y, si se requiere, renaturaliza el péptido. Las técnicas suficientes para guiar a los expertos en el arte por estos procedimientos se encuentran en la bibliografía.

Una vez expresados, los péptidos recombinantes se pueden purificar de acuerdo con procedimientos estándar, incluso precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel y similares.

Se prefieren las composiciones sustancialmente puras con aproximadamente 50% a 95% de homogeneidad, y con mayor preferencia con 80% a 95% o más homogeneidad para el uso como agentes terapéuticos.

Un experto en el arte reconocerá que después de la síntesis química, la expresión o purificación, los péptidos inmunogénicos pueden poseer una conformación sustancialmente diferente de las conformaciones nativas de los péptidos constituyentes. En este caso, a menudo es necesario desnaturalizar y reducir el péptido antiproliferativo y luego hacer que el péptido se repliegue en la conformación de preferencia. Los métodos para reducir y desnaturalizar proteínas, e inducir el repliegado son bien conocidos por los expertos en el arte.

La antigenicidad de la proteína purificada se puede confirmar, por ejemplo, al demostrar la reacción con suero inmune, o con antisuero producido contra la misma proteína.

Los términos "un", "una" y "el/la" tal como se usan en la presente se definen para significar "uno o más" e incluyen el plural a menos que el contenido sea inadecuado.

Los términos "detectar" o "detectado" tal como se usan en la presente significan usar técnicas conocidas para la detección de moléculas biológicas tales como métodos inmunoquímicos o histológicos, y se refieren a la determinación cualitativa o cuantitativa de la presencia o concentración de la biomolécula en investigación.

Por "aislado" se entiende una molécula biológica libre de al menos parte de los componentes con los cuales aparece naturalmente.

Los términos "anticuerpo" o "anticuerpos" tal como se usan en la presente son términos reconocidos en el arte y se entiende que se refieren a moléculas o fragmentos activos de moléculas que se fijan a antígenos conocidos, particularmente a moléculas de inmunoglobulina y a porciones

inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir moléculas que contienen un sitio de unión que se une inmunoespecíficamente a un antígeno. La inmunoglobulina de acuerdo con la invención puede ser de cualquier tipo (IgG, IgM, IgD, IgE, IgA e IgY) o clase (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2) o subclases de molécula de inmunoglobulina.

Por "anticuerpos" se pretende, dentro del alcance de la presente invención, incluir anticuerpos monoclonales, policlonales, quiméricos, de cadena única, biespecíficos, simianizados, humanos y humanizados, además de sus fragmentos activos. Los ejemplos de fragmentos activos de moléculas que se fijan a antígenos conocidos incluyen fragmentos Fab y F(ab')₂, incluso los productos de una biblioteca de expresión de Fab de inmunoglobulina y fragmentos fijadores de epitopo de cualquiera de los anticuerpos y fragmentos mencionados anteriormente.

Estos fragmentos activos se pueden derivar de un anticuerpo de la presente invención mediante diversas técnicas. Por ejemplo, se pueden escindir los anticuerpos monoclonales purificados con una enzima, tales como pepsina, y someterlos a filtración por gel de HPLC. La fracción adecuada que contiene fragmentos Fab luego se pueden reunir y concentrar mediante filtración por membrana y similares. Para mayor descripción de las técnicas generales para el aislamiento de fragmentos activos de anticuerpos, ver por ejemplo, Khaw, B. A. et al. J. Nucl. Med. 23:1011-1019 (1982); Rousseaux et al. Methods Enzymology, 121:663-69, Academic Press, 1986.

Un "anticuerpo humanizado" se refiere a un tipo de anticuerpo obtenido por ingeniería que tiene los CDR derivados de una inmunoglobulina de donante no humano, en donde las restantes partes de la molécula derivadas de inmunoglobulina derivan de una (o más) inmunoglobulina(s) humana(s). Además, los residuos de soporte del armazón se pueden alterara para conservar la afinidad

de unión. Los métodos para obtener "anticuerpos humanizados" son bien conocidos por los expertos en el arte (ver, por ejemplo, Queen et al., Proc. Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032 (1989), Hodgson et al., Bio/Technology, 9:421 (1991)).

Un "anticuerpo humanizado" también se puede obtener mediante nuevos enfoques de ingeniería genética que permiten la producción de anticuerpos policlonales símil-humanos madurados por afinidad en grandes animales tales como, por ejemplo, conejos

(<http://www.rctech.com/bioventures/therapeutics.php>).

El término "anticuerpo monoclonal" también es bien reconocido en el arte y se refiere a un anticuerpo producido en masa en el laboratorio a partir de un único clon y que reconoce solo un antígeno. Los anticuerpos monoclonales generalmente se obtienen al fusionar una célula B productora de anticuerpo, generalmente de vida corta, en una célula de crecimiento rápido, por ejemplo una célula cancerosa (en ocasiones denominada célula "inmortal"). La célula híbrida obtenida, o hibridoma, se multiplica con rapidez, y crea un clon que produce grandes cantidades de anticuerpo.

Por "anticuerpo funcionalmente equivalente" se entiende, dentro del alcance de la presente invención, la referencia a un anticuerpo que sustancialmente comparte al menos una propiedad funcional importante con uno de los anticuerpos mencionados anteriormente y en la presente descritos, que comprenden: especificidad de unión con la proteína amiloide β , particularmente a la proteína $A\beta_{1-42}$, y más particularmente a la región epitópica 4-16 de la proteína $A\beta_{1-42}$, inmunorreactividad *in vitro*, inhibición de agregación de los monómeros $A\beta_{1-42}$ en fibrillas poliméricas de alto peso molecular y/o desagregación de fibrillas poliméricas preformadas $A\beta_{1-42}$, y/o propiedad de ruptura de lámina β y alivio de los efectos de trastornos asociados con amiloidosis, un grupo de enfermedades y

trastornos asociados con formación de placa amiloide incluso amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad avanzada incluso, sin limitaciones, trastornos neurológicos tales como enfermedad de Alzheimer (AD), incluso enfermedades o condiciones caracterizados por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), demencia de cuerpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo Dutch); el complejo de demencia de Parkinson de Guam; además de otras enfermedades basadas sobre o asociadas con proteínas símil amiloide tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeld Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes de inicio en el adulto; amiloidosis cardíaca senil; tumores endocrinos, y otros, incluso degeneración macular, cuando se administra en forma preventiva o terapéutica. Los anticuerpos pueden ser de cualquier clase, por ejemplo IgG, IgM, o IgA, etc., o de cualquier subclase, por ejemplo IgG1, IgG2a, etc., y otras subclases antes mencionadas en la presente o conocidas en el arte. Además, se pueden producir los anticuerpos por cualquier método, por ejemplo presentación por fago, o producidos por cualquier organismo o línea celular, incluso células de bacterias, insectos, mamíferos o de otro tipo, o línea celular que produce anticuerpos con características de interés, tales como anticuerpo humanizados. Los anticuerpos también se pueden formar al combinar una porción Fab y una región Fc proveniente de diferentes especies.

El término "antígeno" se refiere a una entidad o su fragmento capaz de inducir una respuesta inmune en un organismo, particularmente un animal, más particularmente un mamífero, incluso un humano. El término incluye inmunógenos y regiones responsables de la antigenicidad o los determinantes antigénicos.

Tal como se usa en la presente, el término "soluble" significa parcialmente o completamente disuelto en una solución acuosa.

Tal como también se usa en la presente, el término "inmunogénico" se refiere a sustancias que desencadenan o mejoran la producción de anticuerpos, células T y otras células reactivas inmunes dirigidas contra un agente inmunogénico y contribuyen a una respuesta inmune en humanos o animales.

Una respuesta inmune ocurre cuando un individuo produce suficientes anticuerpos, células T y otras células reactivas inmunes contra composiciones inmunogénicas administradas de la presente invención a fin de moderar o aliviar el trastorno tratado.

El término "hibridoma" se reconoce en el arte y es comprendido por los expertos en el arte como referido a una célula producida por la fusión de una célula productora de anticuerpo y una célula inmortal, por ejemplo una célula de mieloma múltiple. Esta célula híbrida es capaz de producir una provisión continua de anticuerpo. Véase la definición anterior de "anticuerpo monoclonal" y los Ejemplos más adelante para una descripción más detallada del método de fusión.

El término "portador" tal como se usa en la presente significa una estructura en la cual se puede incorporar o asociar el péptido antigénico o la construcción supramolecular, por lo cual se presentan o exponen los péptidos antigénicos o partes del péptido al sistema inmune de un humano o animal. Cualquier partícula que se pueda usar adecuadamente en una terapéutica animal o humano tales como, por ejemplo, una vesícula, una partícula o un cuerpo particulado se puede usar como portador dentro del contexto de la presente invención.

El término "portador" también comprende métodos de provisión, en donde las composiciones de construcción antigénica supramolecular que comprenden el péptido antigénico pueden ser transportados a los sitios elegidos por los

mecanismos de provisión. Un ejemplo de dichos sistemas de provisión utiliza metales coloidales tales como oro coloidal.

Las proteínas portadoras que se pueden usar en las composiciones de construcción antigénica supramolecular de la presente invención incluyen, pero sin limitaciones, la proteína fijadora de maltosa "MBP"; la albúmina sérica bovina "BSA"; la hemocianina de lapa "KLH"; la ovalbúmina; la flagelina; la tiroglobulina; la albúmina sérica de cualquier especie; la gammaglobulina de cualquier especie; las células singénicas; las células singénicas portadoras de antígenos; y los polímeros de D y/o L aminoácidos.

En la construcción antigénica supramolecular de acuerdo con la presente invención, el liposoma puede tener una función dual en cuanto que puede ser usado como portador que comprende la construcción supramolecular tal como se describió antes en la presente y al mismo tiempo, actuar como coadyuvante para aumentar o estimular la respuesta inmune dentro del animal o humano objetivo a tratar con la vacuna terapéutica de acuerdo con la invención. También se debe entender que las composiciones de construcción antigénica supramolecular de la presente invención también pueden comprender coadyuvantes adicionales que incluyen, sin limitaciones, keyhole hemocianina de lapa (KLH), albúmina sérica bovina (BSA) y otros coadyuvantes tales como, por ejemplo, lípido A, alúmina, fosfato de calcio, interleuquina 1, y/o microcápsulas de polisacáridos y proteínas, pero particularmente un lípido A detoxificado, por ejemplo monofosforil o difosforilípido A, o alúmina, otros conservadores, diluyentes, emulsificantes, estabilizantes, y otros componentes conocidos y usados en vacunas del arte previo. Además, se puede usar cualquier sistema coadyuvante conocido en el arte en la composición de la presente invención. Dichos coadyuvantes incluyen, pero sin limitaciones, coadyuvante incompleto de Freund, coadyuvante completo de Freund, manano acetilado ligado a β -(1,4) polidisperso ("Acemanano"),

TITERMAX® (coadyuvantes de copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno de CytRx Corporation), coadyuvantes lipídicos modificados de Chiron Corporation, coadyuvantes derivados de saponina de Cambridge Biotech, *Bordetella pertussis* muertos, el lipopolisacárido (LPS) de bacterias gramnegativas, grandes aniones poliméricos tales como sulfato de dextrano, y geles inorgánicos tales como alúmina, hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio.

Además, el término "cantidad efectiva" se refiere la cantidad de composición antigénica/inmunogénica que cuando se administra a un humano o animal, desencadena una respuesta inmune. La cantidad efectiva es determinada con facilidad por un experto en el arte según procedimientos de rutina.

El término "construcción antigénica supramolecular" se refiere a una construcción antigénica de acuerdo con la presente invención y tal como se describió antes en la presente. En particular, "construcción antigénica supramolecular" se refiere a una construcción antigénica que comprende un antígeno peptídico A β de acuerdo con la invención y tal como se describió antes en la presente, específicamente un fragmento peptídico A β de la parte N terminal del péptido A β , pero particularmente un fragmento peptídico A β que consiste en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10); 1-16(Δ 12), 16(Δ 13), 16(Δ 14), 1-16(Δ 15), 1-15(Δ 2), 1-15(Δ 4), 1-15(Δ 5), 1-15(Δ 6), 1-15(Δ 8), 1-15(Δ 9), 1-15(Δ 10); 1-15(Δ 12), 15(Δ 13), 15(Δ 14), particularmente un antígeno peptídico A β _{1-16(Δ 15)}, más particularmente un antígeno peptídico A β _{1-16(Δ 14)} o A β _{1-16(Δ 13)}, aun más particularmente un antígeno peptídico A β ₁₋₁₄, específicamente un antígeno peptídico A β ₁₋₁₅, pero especialmente un fragmento peptídico A β que consiste en residuos de aminoácidos 1-15 dados en SEQ ID NO: 1, y 1-16(Δ 14) dados en SEQ ID NO: 3, en donde el un antígeno peptídico se presenta adosado o incorporado o reconstituido en un portador tal

como, por ejemplo, una vesícula, un cuerpo particulado o molécula pero, particularmente, un liposoma. Más particularmente, el péptido antigénico de acuerdo con la invención es modificado por un residuo lipofílico o hidrofóbico, que facilita la inserción en la bicapa lipídica del liposoma portador/coadyuvante inmune, particularmente mediante un residuo lipofílico o hidrofóbico incluso, sin limitaciones, un ácido graso, un triglicérido o un fosfolípido, pero especialmente un ácido graso, un triglicérido o un fosfolípido, en donde el esqueleto carbonado de ácidos grasos tiene al menos 10 átomos de carbono que actúan como ancla para el péptido en la bicapa del liposoma y tiene una dimensión que conduce a que el péptido se ubique y se estabilice muy cerca de la superficie del liposoma.

Por ejemplo, las composiciones de la construcción antigénica supramolecular de acuerdo con la invención se pueden administrar por vía parenteral, pero particularmente intraperitoneal, intravenosa, subcutánea y intramuscular en un rango de aproximadamente 1.0 µg a 10.0 mg por paciente, si bien este rango no pretende ser limitante. La cantidad real de la composición requerida para desencadenar una respuesta inmune varía para cada paciente individual según la inmunogenicidad de la composición administrada y de la respuesta inmune del individuo. En consecuencia, la cantidad específica administrada a un individuo estará determinada por experimentación de rutina y basada en la capacitación y la experiencia de los expertos en el arte.

La construcción antigénica supramolecular de acuerdo con la presente invención se puede usar para la preparación de una composición de vacuna para inducir una respuesta inmune en un organismo, en particular un animal o humano, para prevenir, tratar o aliviar los efectos de amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con formación de placa amiloide incluso amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad avanzada incluso, sin limitaciones, trastornos neurológicos tales como enfermedad de Alzheimer

(AD), incluso enfermedades o condiciones caracterizados por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), demencia de cuerpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo Dutch); el complejo de demencia de Parkinson de Guam; además de otras enfermedades basadas sobre o asociadas con proteínas simil amiloide tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeld Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes de inicio en el adulto; amiloidosis cardiaca senil; tumores endocrinos, y otros, incluso degeneración macular, pero particularmente a enfermedad o condición caracterizados por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI).

En consecuencia, es un objetivo de la presente invención proveer un método para prevenir, tratar o aliviar los efectos de amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con formación de placa amiloide, incluso amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad avanzada incluso, sin limitaciones, trastornos neurológicos tales como enfermedad de Alzheimer (AD), incluso enfermedades o condiciones caracterizados por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), demencia de cuerpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo Dutch); el complejo de demencia de Parkinson de Guam; además de otras enfermedades basadas sobre o asociadas con proteínas simil amiloide tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeld Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes de inicio en el adulto; amiloidosis cardiaca senil; tumores endocrinos, y otros, incluso degeneración macular, pero particularmente una enfermedad o condición

caracterizados por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), al administrar una construcción antigénica supramolecular de acuerdo con la presente invención, pero particularmente una composición de vacuna que comprende dicha construcción antigénica supramolecular de acuerdo con la invención a un animal, particularmente un mamífero o un humano, afectado por dicho trastorno y en consecuencia que necesita dicho tratamiento.

En otra forma de realización de la presente invención se provee un método para la preparación de una composición de vacuna para inducir una respuesta inmune en un organismo, en particular un animal o humano afectado por dicho trastorno, enfermedad o condición y en consecuencia que necesita dicho tratamiento, para prevenir, tratar o aliviar los efectos de amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con formación de placa amiloide, incluso amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad avanzada incluso, sin limitaciones, trastornos neurológicos tales como enfermedad de Alzheimer (AD), incluso enfermedades o condiciones caracterizados por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), demencia de cuerpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo Dutch); el complejo de demencia de Parkinson de Guam; además de otras enfermedades basadas sobre o asociadas con proteínas simil amiloide tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes de inicio en el adulto; amiloidosis cardiaca senil; tumores endocrinos, y otros, incluso degeneración macular, pero particularmente una enfermedad o condición caracterizadas por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI)

En aun otra forma de realización de la presente invención se provee así un método para la preparación de una composición para prevenir, tratar o aliviar los efectos de amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con formación de placa amiloide, incluso amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad avanzada incluso, sin limitaciones, trastornos neurológicos tales como enfermedad de Alzheimer (AD), incluso enfermedades o condiciones caracterizados por a pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), demencia de cuerpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo Dutch); el complejo de demencia de Parkinson de Guam; además de otras enfermedades basadas sobre o asociadas con proteínas simil amiloide tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeld Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes de inicio en el adulto; amiloidosis cardíaca senil; tumores endocrinos, y otros, incluso degeneración macular, pero particularmente una enfermedad o condición caracterizadas por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), que comprenden formular un anticuerpo de acuerdo con la invención en una forma farmacéuticamente aceptable.

En una forma de realización específica, la presente invención utiliza una presentación de antígeno que da por resultado una mayor exposición y estabilización de una conformación de antígeno de preferencia, que en última instancia conduce a una altamente específica respuesta inmune y da por resultado la generación de anticuerpos con singulares propiedades.

En una forma de realización, la presente invención provee composiciones inmunogénicas que comprenden una construcción antigénica supramolecular que comprende un antígeno peptídico β -amiloide de acuerdo con la invención y tal

como se describió antes en la presente representativa de la parte N terminal del péptido β -amiloide, en donde el péptido antigénico está modificado de manera tal que es capaz de mantener y estabilizar una conformación definida del antígeno, particularmente una conformación caracterizada por una proporción equilibrada de porciones de arrollamiento aleatorio, hélice α y lámina β . Esta conformación definida conduce a la inducción de una respuesta inmune fuerte y altamente específica tras la introducción en un animal o un humano.

Una forma de lograr la formación y la estabilización de la conformación deseada del péptido antigénico es la presentación del péptido antigénico adosado, o incorporado o reconstituido, parcialmente o totalmente, en un portador tal como, por ejemplo, una vesícula, un cuerpo particulado o molécula o cualquier otro medio que pueda servir en forma adecuada como portador/coadyuvante para el péptido antigénico. En una forma de realización específica de la invención, el péptido antigénico es adosado o incorporado o reconstituido en el portador mediante interacciones débiles tales como, por ejemplo, interacciones de van der Waals, hidrofóbicas o electrostáticas, o una combinación de dos o más de dichas interacciones, de manera tal que el péptido se presentado con una conformación específica, que se mantiene y estabiliza al restringir dicho péptido antigénico en sus libertades tridimensionales de movimiento de manera tal que se impiden o restringen severamente los cambios de conformación.

Cuando una vesícula, una partícula o un cuerpo particulado se usan como portador/coadyuvante tales como, por ejemplo, un liposoma, la composición del péptido antigénico se puede elegir de manera tal que su carga neta global es idéntica a la de la superficie del portador/coadyuvante al que se adosa el péptido. Las fuerzas de repulsión electrostática son efectivas entre la superficie con carga idéntica del portador/coadyuvante y el péptido antigénico, pero particularmente la superficie del portador con carga idéntica y los residuos de aminoácidos que

constituyen el péptido antigénico y más particularmente la superficie del portador con carga idéntica y los residuos de aminoácidos con carga idéntica comprendidos en el péptido antigénico, y pueden conducir a que el péptido antigénico adopte una conformación definida altamente específica y estabilizada que garantice una gran actividad biológica. Como consecuencia, el péptido antigénico se expone y presenta en una conformación con alta actividad biológica por permitir que el sistema inmune del organismo blanco interactúe libremente con los determinantes antigénicos contenidos en la construcción antigénica en la conformación biológicamente activa, lo cual conduce a una respuesta inmune fuerte y específica de conformación, lo cual da por resultado, por ejemplo, un elevado título de anticuerpo en el organismo blanco.

Mediante la cuidadosa coordinación de la carga neta global del péptido antigénico por una parte y del portador al cual el péptido se adosa, incorpora o reconstituye por otra parte, el péptido antigénico se presenta expuesto, o en la cercanía de la superficie del portador en una conformación inducida y estabilizada por fuerzas de repulsión electrostáticas efectivas entre la superficie del portador con carga idéntica y el péptido antigénico, pero particularmente la superficie del portador con carga idéntica y los residuos de aminoácidos que constituyen el péptido antigénico y más particularmente la superficie del portador con carga idéntica y los residuos de aminoácidos con carga idéntica comprendidos en el péptido antigénico. Esto da por resultado la presentación de la construcción antigénica de manera tal que esté libremente accesible a la maquinaria de defensa inmune del organismo blanco y en consecuencia sea capaz de inducir una respuesta inmunogénica fuerte y altamente específica tras la administración a un animal o un humano. La respuesta inmunogénica también se puede aumentar al usar un liposoma como portador, en donde el liposoma puede actuar como coadyuvante para aumentar o estimular la respuesta inmune dentro del animal o

humano blanco a tratar con la vacuna terapéutica de acuerdo con la invención. Opcionalmente, el liposoma, además, puede contener otro coadyuvante tal como, por ejemplo, lípido A, alúmina, fosfato de calcio, interleuquina 1, y/o microcápsulas de polisacáridos y proteínas, pero particularmente un lípido A detoxificado, tal como monofosforil o difosforil lípido A, o alúmina.

En una forma de realización específica de la invención se usar un péptido antigénico de acuerdo con la invención y descrito antes en la presente, particularmente un péptido antigénico cuya carga neta global sea negativa, reconstituido en un liposoma, particularmente un liposoma cuyos constituyentes sean elegidos de manera tal que la carga beta global del grupo de la cabeza del liposoma sea negativa. En particular, el liposoma se compone de constituyentes seleccionados del grupo que consiste en dimiristilfosfatidilcolina (DMPC), dimiristilfosfatidiletanolamina (DMPEA), dimiristilfosfatidilglicerol (DMPG) y colesterol y opcionalmente, también contiene monofosforil lípido A o cualquier otro coadyuvante que se puede usar en forma adecuada dentro del alcance de la presente invención tales como, por ejemplo, alúmina, fosfato de calcio, interleuquina 1, y/o microcápsulas de polisacáridos y proteínas.

En otra forma de realización específica de la invención se provee un antígeno peptídico modificado de acuerdo con la invención y tal como se describió antes en la presente unido covalentemente a una molécula de tipo anclaje capaz de insertarse en el portador/coadyuvante para así fijar el péptido al portador/coadyuvante y presentarlo sobre o cerca de la superficie de una molécula portadora/coadyuvante de manera tal que las fuerzas electrostáticas sean efectivas tal como se describió antes en la presente.

Cuando se usan liposomas como portador/coadyuvante, las construcciones de péptido antigénico generalmente tienen una cola hidrofóbica que se inserta en la membrana del liposoma a medida que se forma. Además, los péptidos

antigénicos se pueden modificar para contener una cola hidrofóbica, de manera tal que se pueda insertar en el liposoma.

La construcción antigénica supramolecular de la presente invención generalmente comprende péptidos modificados para mejorar el efecto antigénico en donde dichos péptidos pueden ser modificados por pegilación (mediante polietilenglicol o polietilenglicol modificado), o modificados por otros métodos tales como ácido palmítico tal como se describió antes en la presente, poliaminoácidos (por ejemplo, poliglicina, polihistidina), polisacáridos (por ejemplo ácido poligalacturónico, ácido poliláctico, poliglicólico, quitina, quitosano), polímeros sintéticos (poliamidas, poliuretanos, poliésteres) o copolímeros (por ejemplo poli(ácido metacrílico) y N-(2-hidroxi)propilmetacrilamida) y similares.

En una forma de realización específica de la invención, se proveen péptido antigénicos de acuerdo con la invención y tal como se describió antes en la presente, que se modifican para contener una cola hidrofóbica de manera tal que dichos péptidos se puedan insertar en el liposoma. En particular, el péptido β -amilolde puede ser modificado por un residuo lipofílico o hidrofóbico que facilite la inserción en la bicapa lipídica del portador/coadyuvante. Los residuos lipofílico o hidrofóbico de la presente invención pueden ser ácidos grasos, triglicéridos y fosfolípidos, particularmente ácidos grasos, triglicéridos y fosfolípidos, en donde el esqueleto carbonado de ácidos grasos tiene al menos 10 átomos de carbono, particularmente residuos lipofílicos con ácidos grasos con un esqueleto carbonado de al menos aproximadamente 14 átomos de carbono y hasta aproximadamente 24 átomos de carbono, más particularmente residuos hidrofóbicos con un esqueleto carbonado de al menos 14 átomos de carbono. Los ejemplos de residuos hidrofóbicos incluyen, sin limitaciones, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido mirístico, ácido láurico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico y

colesterol o DSPE. En una forma de realización específica de la invención el residuo hidrofóbico es ácido palmítico.

La palmitoilación, a la vez que provee un ancla para el péptido en la bicapa del liposoma, debido a la longitud relativamente reducida del residuo de ácido graso C_{16:0} conduce a que el péptido se presente expuesto sobre o cerca de la superficie del liposoma. En consecuencia, las células procesadoras del antígeno deberán captar todo el liposoma con el péptido.

En otra forma de realización de la invención, por ejemplo la usada en la preparación de una construcción supramolecular, en donde el terminal PEG libre está unido covalentemente a una molécula de fosfatidiletanolamina (en donde el ácido graso puede ser: mirístico, palmítico, esteárico, oleico, etc., o sus combinaciones). Esta estructura supramolecular se puede reconstituir en los liposomas que consisten en fosfolípidos y colesterol (fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, colesterol diversas relaciones molares. Se pueden usar otros fosfolípidos. Se usa lípido A en una concentración de aproximadamente 40 µg/pmol de fosfolípido.

Aun otro objeto de la presente invención consiste en proveer composiciones de vacuna que comprenden una construcción antigénica supramolecular que comprende un péptido antigénico de acuerdo con la invención y tal como se describió antes en la presente, en donde el péptido se modifica a fin de mejorar el efecto antigénico, en donde dicho péptido, particularmente un fragmento peptídico Aβ de la parte N terminal del péptido Aβ, pero particularmente un fragmento peptídico Aβ que consiste en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ2), 1-16(Δ4), 1-16(Δ5), 1-16(Δ6), 1-16(Δ8), 1-16(Δ9), 1-16(Δ10); 1-16(Δ12), 16(Δ13), 16(Δ14), 1-16(Δ15), 1-15(Δ2), 1-15(Δ4), 1-15(Δ5), 1-15(Δ6), 1-15(Δ8), 1-15(Δ9), 1-15(Δ10); 1-15(Δ12), 15(Δ13), 15(Δ14), un antígeno peptídico

$A\beta_{1-16(\Delta 15)}$, más particularmente un antígeno peptídico $A\beta_{1-16(\Delta 14)}$ o $A\beta_{1-16(\Delta 13)}$, aun más particularmente un antígeno peptídico $A\beta_{1-14}$, específicamente un antígeno peptídico $A\beta_{1-15}$, pero especialmente un fragmento peptídico $A\beta$ que consiste en residuos de aminoácidos 1-15 dados en SEQ ID NO: 1, y 1-16($\Delta 14$) dados en SEQ ID NO: 3, es modificado por pegilación (mediante polietilenglicol o polietilenglicol modificado), o es modificado por otros métodos tales como poliaminoácidos (por ejemplo poli-glicina, polihistidina), polisacáridos (por ejemplo ácido poligalacturónico, ácido poliláctico, poliglicólido, quitina, quitosano), polímeros sintéticos (poliamidas, poliuretanos, poliésteres) o copolímeros (poli(ácido metacrílico) y N-(2-hidroxi) propilmetacrilamida) y similares.

En otra forma de realización de la invención, el antígeno peptídico β -amiloide de acuerdo con la invención y tal como se describió antes en la presente es un fragmento palmitoilado de péptido $A\beta$ de la parte N terminal del péptido $A\beta$, pero particularmente un fragmento palmitoilado de péptido $A\beta$ que consiste en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16($\Delta 2$), 1-16($\Delta 4$), 1-16($\Delta 5$), 1-16($\Delta 6$), 1-16($\Delta 8$), 1-16($\Delta 9$), 1-16($\Delta 10$); 1-16($\Delta 12$), 16($\Delta 13$), 16($\Delta 14$), 1-16($\Delta 15$), 1-15($\Delta 2$), 1-15($\Delta 4$), 1-15($\Delta 5$), 1-15($\Delta 6$), 1-15($\Delta 8$), 1-15($\Delta 9$), 1-15($\Delta 10$); 1-15($\Delta 12$), 15($\Delta 13$), 15($\Delta 14$), particularmente un antígeno peptídico palmitoilado $A\beta_{1-16(\Delta 15)}$, más particularmente un antígeno peptídico palmitoilado $A\beta_{1-16(\Delta 14)}$ o $A\beta_{1-16(\Delta 13)}$, aun más particularmente un antígeno peptídico palmitoilado $A\beta_{1-14}$, específicamente un antígeno peptídico palmitoilado $A\beta_{1-15}$, pero especialmente fragmento palmitoilado de péptido $A\beta$ que consiste en residuos de aminoácidos 1-15 dados en SEQ ID NO: 1, y 1-16($\Delta 14$) dados en SEQ ID NO: 3, modificado por residuos palmitoilo adosados covalentemente en cada extremo del péptido para dar entre 2 y 4, particularmente 4 residuos, reconstituidos en un liposoma. Esta construcción antigénica palmitoilada se puede usar para el tratamiento de una amiloidosis, un grupo de

enfermedades y trastornos asociados con formación de placa amiloide, incluso amiloidosis secundaria y a fin de aliviar los síntomas asociados con la enfermedad o restablecer una condición que se encuentra en individuos sanos no afectados por la enfermedad.

En ciertas formas de realización, la construcción antigénica supramolecular de la presente invención comprende una secuencia de péptido antigénico tal como se describió antes en la presente, adosada covalentemente a lisina pegilada al menos uno en cada terminal, pero particularmente 1 o 2 en cada terminal. La longitud de la cadena PEG (polietilenglicol) puede variar de $n = 8$ a $n = 150.000$ o más, particularmente de $n = 10$ a $n = 80.000$, más particularmente de $n = 10$ a $n = 10.000$. En una forma de realización específica de la invención, la longitud de la cadena PEG no es más de $n = 45$, particularmente entre $n = 5$ y $n = 40$, más particularmente entre $n = 10$ y $n = 30$, y aun más particularmente $n = 10$.

Los liposomas que se pueden usar en las composiciones de la presente invención incluyen los conocidos por un experto en el arte. Se puede usar cualquiera de los lípidos estándar de utilidad para preparar liposomas. Se pueden usar los liposomas de bicapas y multicapas estándar para preparar composiciones de la presente invención. Si bien se puede usar cualquier método para preparar liposomas conocido por un experto en el arte, los liposomas de mayor preferencia se preparan de acuerdo con el método de Alving et al., *Infect. Immun.* 60:2438-2444, 1992, incorporad así como referencia. El liposoma opcionalmente puede contener un coadyuvante y un inmunomodulador, o ambos. Un inmunomodulador de preferencia es lípido A, particularmente un lípido A detoxificado tal como, por ejemplo, monofosforil o difosforil lípido A.

El liposoma puede tener una función dual por cuanto se puede usar como portador que comprende la construcción supramolecular tal como se describió antes en la presente y al mismo tiempo actuar como coadyuvante para aumentar

o estimular la respuesta inmune dentro del animal blanco o humano a tratar con la vacuna terapéutica de acuerdo con la invención. Opcionalmente, el liposoma además puede contener otro coadyuvante y inmunomodulador o ambos tales como, por ejemplo, lípido A, alúmina, fosfato de calcio, interleuquina 1, y/o microcápsulas de polisacáridos y proteínas, pero particularmente un lípido A, más particularmente a lípido A detoxificado, tales como monofosforil o difosforil lípido A, o alúmina.

En particular, se trata una amiloidosis relacionada con la edad avanzada, incluso trastornos neurológicos tales como enfermedad de Alzheimer (AD), incluso enfermedades o condiciones caracterizados por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), demencia de cuerpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo Dutch); el complejo de demencia de Parkinson de Guam; además de otras enfermedades basadas sobre o asociadas con proteínas simil amiloide tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes de inicio en el adulto; amiloidosis cardíaca senil; tumores endocrinos, y otros, incluso degeneración macular, pero particularmente una enfermedad o condición caracterizados por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), por administración de una construcción antigénica supramolecular de acuerdo con la presente invención, pero particularmente una composición de vacuna que comprende dicha construcción antigénica supramolecular de acuerdo con la invención a un animal, particularmente un mamífero o un humano, afectado por dicho trastorno y en consecuencia que necesita dicho tratamiento, pero especialmente enfermedad de

Alzheimer, cuya manifestación sintomática se evidencia con leve falta de memoria hasta pérdida total de la memoria.

La composición de la presente invención que comprende una construcción antigénica supramolecular de acuerdo con la invención y tal como se describió antes en la presente se puede preparar en la forma de una solución líquida, o de una suspensión inyectable, o en una forma sólida adecuada para la solubilización antes de la inyección en el contexto, por ejemplo, de un kit para usar la presente composición, tal como se describe más adelante.

La composición de la presente invención que comprende una construcción antigénica supramolecular se administra a un humano o animal que padece una enfermedad asociada a amiloide para inducir una respuesta inmune en dicho humano o animal para aliviar los síntomas asociados con la enfermedad o restablecer una condición hallada en individuos sanos que no están afectados por la enfermedad.

Las composiciones de la presente invención se administran a un humano o animal por cualquiera de las vías estándar adecuadas de administración. En general, la composición se puede administrar por las vías tópica, oral, rectal, nasal o parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea o intramuscular). Además, la composición se puede incorporar en matrices de liberación sostenida tales como polímeros biodegradables, en donde los polímeros se implantan cerca de donde se desea la provisión, por ejemplo, en el sitio de un tumor. El método incluye la administración de una dosis única, la administración de dosis repetidas con intervalos predeterminados, y administración sostenida durante un periodo predeterminado.

En particular, la composición de péptido antigénico de acuerdo con la invención se administra por inyección parenteral, particularmente por inyección intraperitoneal, intravenosa, subcutánea e intramuscular.

La dosis de la composición dependerá de la condición tratada, la composición particular usada, y otros factores clínicos tales como peso, tamaño y condición del paciente, superficie corporal, el compuesto o composición particular administrados, otros fármacos administrados en forma concurrente, y la vía de administración.

La composición de vacuna terapéutica de acuerdo con la invención se puede administrar en combinación con otras sustancias y procedimientos biológicamente activos para el tratamiento de enfermedades. Las otras sustancias biológicamente activas pueden ser partes de la misma composición que ya comprenden la vacuna terapéutica de acuerdo con la invención, en la forma de una mezcla, en donde la vacuna terapéutica y la otra sustancia biológicamente activa se entremezclan en o con el mismo solvente y/o portador farmacéuticamente aceptable o se puede proveer por separado como parte de composiciones por separado, lo cual se puede ofrecer por separado o junto, en forma de un kit de partes.

La composición de vacuna terapéutica de acuerdo con la invención se puede administrar concomitantemente con la otra sustancia o sustancias biológicamente activas, en forma intermitente o en secuencia. Por ejemplo, la composición de vacuna terapéutica de acuerdo con la invención se puede administrar simultáneamente con una primera sustancia adicional biológicamente activa o secuencialmente después o antes de la administración de la vacuna terapéutica. Si se elige un esquema de aplicación en el cual más de una sustancia biológicamente activa adicional se administran junto con la al menos una vacuna terapéutica de acuerdo con la invención, el compuesto o sustancia may se puede administrar en forma parcialmente simultánea, parcialmente en secuencia en diversas combinaciones.

Es otro objeto de la presente invención proveer mezclas de una vacuna terapéutica de acuerdo con la invención y opcionalmente, una o más sustancias biológicamente activas, además de métodos para usar una vacuna terapéutica de acuerdo con la invención, o sus mezclas, incluso composiciones que comprenden dicha vacuna terapéutica o mezclas de vacuna terapéutica para el tratamiento de prevención y/o terapéutica y/o aliviar los efectos de amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con formación de placa amiloide, incluso amiloidosis secundarias y amiloidosis relacionadas con la edad avanzada tales como enfermedades incluso, sin limitaciones, trastornos neurológicos tales como enfermedad de Alzheimer (AD), incluso enfermedades o condiciones caracterizados por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), demencia de cuerpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo Dutch); el complejo de demencia de Parkinson de Guam; además de otras enfermedades basadas sobre o asociadas con proteínas símil amiloide tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeld Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes de inicio en el adulto; amiloidosis cardiaca senil; tumores endocrinos, y otros, incluso degeneración macular.

Las mezclas de acuerdo con la invención pueden comprender, además de una vacuna terapéutica de acuerdo con la invención, una sustancia biológicamente activa tal como, por ejemplo, compuestos conocidos usados en la medicación de amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con amiloide o proteína símil amiloide tales como la proteína A β que interviene en enfermedad de Alzheimer, incluso un anticuerpo generado contra un antígeno peptídico amiloidogénico, particularmente un anticuerpo generado contra un antígeno amiloidogénico presentado en la forma de una construcción antigénica

supramolecular, más particularmente un anticuerpo de acuerdo con la presente invención y tal como se describe en la presente.

En otra forma de realización de la invención, la otra sustancia o compuesto biológicamente activo también puede ser un agente terapéutico que se puede usar en el tratamiento de enfermedades y trastornos causados por o asociados con amiloide o proteínas símil amiloide, incluso amiloidosis causada por amiloide β o se puede usar en la medicación de otros trastornos neurológicos.

La otra sustancia o compuesto biológicamente activa puede ejercer su efecto biológico por el mismo mecanismo o uno similar a la vacuna terapéutica de acuerdo con la invención o por un mecanismo no relacionado de acción o por una multiplicidad de mecanismos de acción relacionados y/o no relacionados.

Generalmente, los otros compuestos biológicamente activos pueden incluir mejoradores de transmisión de neutrones, fármacos psicoterapéuticos, inhibidores de acetilcolinesterasa, bloqueadores de los canales de calcio, aminas biogénicas, tranquilizantes de benzodiazepinas, mejoradores de síntesis, depósito o liberación de acetilcolina, agonistas de receptor pos-sináptico de acetilcolina, inhibidores de monoaminoxidasa-A o B, antagonistas de receptor de N-metil-D-aspartatoglutamato, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, antioxidantes, y antagonistas de receptores serotoninérgicos.

En particular, la mezcla de acuerdo con la invención puede comprender al menos otro compuesto biológicamente activo seleccionado del grupo que consiste en compuestos contra estrés oxidativo, compuestos antiapoptóticos, quelantes de metal, inhibidores de la reparación de ADN tales como pirenzepina y sus metabolitos, ácido 3-amino-1-propanosulfónico (3APS), 1,3-propanedisulfonato (1,3PDS), activadores de secretasa, inhibidores de β y γ secretasa, proteínas tau, neurotransmisores, disruptores de láminas β , moléculas antiinflamatorias o inhibidores de colinesterasas (ChEI) tales como tacrina, rivastigmina, donepezilo,

y/o galantamina y otros fármacos y suplementos nutritivos, junto con una vacuna terapéutica de acuerdo con la invención y opcionalmente, un portador y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otra forma de realización, las mezclas de acuerdo con la invención pueden comprender niacina o memantina junto con una vacuna terapéutica de acuerdo con la invención y opcionalmente, un portador y/o diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En aun otra forma de realización de la invención se proveen mezclas que comprenden "antipsicóticos atípicos" tales como, por ejemplo clozapina, ziprasidona, risperidona, aripiprazol u olanzapina para el tratamiento de síntomas psicóticos positivos y negativos incluso alucinaciones, delusiones, trastornos del pensamiento (manifestados por marcada incoherencia, salidas de carril, tangencialidad), y comportamiento bizarro o desorganizado, además de anhedonia, afecto disminuido, apatía, y retracción social, junto con una vacuna terapéutica de acuerdo con la invención y opcionalmente, un portador y/o diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En una forma de realización específica de la invención, las composiciones y mezclas de acuerdo con la invención y tal como se describió antes en la presente comprenden la vacuna de acuerdo con la invención y la sustancia biológicamente activa, respectivamente, en una cantidad terapéuticamente o preventivamente efectiva.

Otros compuestos que se pueden usar adecuadamente en mezclas en combinación con la vacuna de acuerdo con la invención se describen, por ejemplo, en el documento WO 2004/058258 (ver especialmente páginas 16 y 17) incluso blancos farmacológicos terapéuticos (páginas 36-39), ácidos alcansulfónicos y alcanolsulfiricos (páginas 39-51), inhibidores de colinesterasa (páginas 51-56), antagonistas de receptor de NMDA (páginas 56-58), estrógenos (páginas 58-59),

fármacos antiinflamatorios no esteroides (páginas 60-61), antioxidantes (páginas 61-62), receptores activados por proliferadores de peroxisoma (PPAR) agonistas (páginas 63-67), agentes reductores de colesterol (páginas 68-75); inhibidores de amiloide (páginas 75-77), inhibidores de formación de amiloide (páginas 77-78), quelantes de metal (páginas 78-79), antipsicóticos y antidepresivos (páginas 80-82), suplementos de nutrición (páginas 83-89) y compuestos que aumentan la disponibilidad de sustancias biológicamente activas en el cerebro (ver páginas 89-93) y profármacos (páginas 93 y 94), cuyo documento se incorpora en la presente como referencia, pero especialmente los compuestos mencionados en las páginas antes mencionadas.

Se ha sabido por mucho tiempo que la vacunación de un huésped animal o humano con una proteína normal del huésped puede conducir al desarrollo de autoanticuerpos dirigidos contra la proteína del huésped, lo cual da como resultado trastornos conocidos en conjunto como trastornos autoinmunes. A β y su precursor proteico APP son de este tipo de proteínas normales. En consecuencia, el uso de estas proteínas de huésped en una vacuna tiene el potencial de crear efectos secundarios indeseables. Existen evidencias en la bibliografía de que A β puede activar una respuesta neuroinflamatoria causada en parte por una sobre activación del sistema de complemento, que ya está muy activado en pacientes que padecen enfermedad de Alzheimer u otras enfermedades neurodegenerativas.

A β humano en su conformación de lámina β es un poderoso activador del sistema de complemento humano. Se fija con fuerza a la cola de colágeno del complemento humano C1q. La sobre activación del sistema de complemento puede dar por resultado que el sistema de defensas natural del huésped se dé vuelta y conduzca a la autodestrucción de células y tejidos incluso neuronas y sus procesos. Por ejemplo, el complejo de ataque a membrana (MAC), que es parte

del sistema de defensas naturales del huésped y protege al huésped contra las bacterias y los virus invasores al insertarse dentro de dichas bacterias y virus, que ante la sobreactivación se pueden insertar dentro de células huésped y causar la autodestrucción. La sobreactivación también puede conducir a la estimulación de microglía para producir compuestos tóxicos tales como radicales libres de oxígeno y proteasas dañinas.

En consecuencia, es otro objeto de la presente invención prevenir potenciales efectos secundarios tales como complicaciones neurológicas causadas por la vacunación de un animal o un humano que padece una enfermedad autoinmune con un autoantígeno, que tiene el potencial de estimular también un sistema de complemento ya sobreactivado. Esto se puede lograr dentro del alcance de la presente invención al administrar un antígeno peptídico A β , particularmente un antígeno peptídico palmitoilado A β , más particularmente antígeno peptídico palmitoilado A β_{1-15} , pero especialmente el antígeno peptídico palmitoilado A β_{1-15} (ACI-24, A β_{1-15}) en combinación con un inhibidor de complemento.

En consecuencia, es otra forma de realización de la invención proveer una composición de vacuna que comprende además de un antígeno peptídico A β , particularmente el antígeno peptídico A β de acuerdo con la invención y descrito con anterioridad en la presente; un inhibidor del sistema del complemento.

El inhibidor de complemento puede ser un compuesto seleccionado del grupo que consiste en receptor de complemento soluble humano 1, proteína de complemento antihumano C5 tales como, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal humanizado anti C5 o un fragmento de cadena única de un anticuerpo humanizado monoclonal, inhibidor-N de C1-esterasa e inhibidor de C1 natural humano.

114

Reciente énfasis sobre la co/morbilidad de A β y enfermedad cerebrovascular, el enlace entre A β y aterosclerosis, deterioro cognitivo asociado con angiopatía amiloide, significativa patología microvascular cerebral, y deficiente clearance de A β a través de la barrera cerebrovascular en enfermedad de Alzheimer, todos indican que el trastorno vascular es una característica importante de la condición de neurodegeneración crónica en enfermedad de Alzheimer. (Zlokovic, B.: (2005) Trends in Neurosciences 28, 202-208) En consecuencia, la disfunción neurovascular podría tener un papel importante en la patogenia de la enfermedad de Alzheimer.

Hay amplia evidencia sobre una fuerte asociación entre declinación cognitiva en la enfermedad de Alzheimer y trastorno cerebrovascular (Torre, de la, J. C.: (2004) Neurol. Res. 26, 517-524, Gorelick, P. B.: (2004) Stroke 35, 2620-2622). Se ha descrito reducción de la densidad microvascular, aumento de la cantidad de vasos fragmentados, marcados cambios de diámetros de vasos, etc. En enfermedad de Alzheimer (Bailey, T. L. et al: (2004) Neurol. Res. 26, 573-578 Farkas, E., y Luiten, P. G.: (2001) Prof. Neurobiol. 64, 575-611).

Varios estudios, incluso el estudio basado en una amplia población de Rotterdam (Greenberg, S. M et al: (2004) Stroke 35, 2616-2619) demostraron que los factores de riesgo vascular podrían ser responsables de la declinación cognitiva en la edad avanzada – que conduce a la denominada "demencia vascular". Varios factores de riesgo de enfermedad de Alzheimer y demencia vascular se superponen, incluso ataques de isquemia transitoria, aterosclerosis, enfermedad cardíaca, alta viscosidad del suero, etc.

La demencia vascular ocurre como consecuencia de daño del tejido cerebral tras la privación de oxígeno causada por el estrechamiento o el bloqueo de vasos sanguíneos en el cerebro y es la segunda forma más frecuente de demencia. Los pacientes frecuentemente sufren enfermedad de Alzheimer y

demencia vascular. Se estima que 1,7 millones de personas en la UE y 55.000 personas en EE. UU. sufren demencia vascular.

Una terapia para restablecer la presión normal de O_2 en el cerebro, a pesar del deterioro de flujo sanguíneo en el cerebro tiene el potencial de influir significativamente sobre la evolución de la enfermedad de Alzheimer y de reducir dramáticamente la demencia vascular.

En consecuencia, es también otra forma de realización de la invención proveer una composición de vacuna que comprende además de un antígeno peptídico $A\beta$, particularmente el antígeno peptídico $A\beta$ de acuerdo con la invención y tal como se describió antes en la presente, un compuesto que desencadena un descenso de la afinidad de O_2 /hemoglobina, por lo que el oxígeno es liberado en forma regulada posterior a los tejidos órganos.

En particular, el compuesto que modula la afinidad de O_2 /hemoglobina puede ser un compuesto seleccionado del grupo que consiste en un fármaco antilipemiente tales como, por ejemplo, ácido clofibrato o bezafibrato, incluso los derivados de bezafibrato LR16 y L35, derivados de urea tales como, por ejemplo, ácido [2-{4-[(arilamino)carbonil]-amino]fenoxi}-2-metilpropiónico, un efector alostérico de hemoglobina tales como, por ejemplo, 2,3-difosfoglicerato (DPG), inositolhexakisfosfato (IHP), y fosfato de piridoxal.

Más particularmente, el compuesto que modula la afinidad de O_2 /hemoglobina puede ser un compuesto que comprende un ligando aniónico para un sitio alostérico de hemoglobina, en donde el ligando aniónico comprende un anillo interno de pirofosfato, opcionalmente junto con un catión no tóxico.

Aun más particularmente, el compuesto que modula la afinidad de O_2 /hemoglobina es un derivado de hexafosfato de inositol (IHP) que comprende al menos comprende un anillo interno de pirofosfato, opcionalmente junto con un catión no tóxico.

A fin de capturar los efectos beneficiosos ofrecidos por un inhibidor de complemento y un compuesto que modula la afinidad de O₂/hemoglobina para aliviar los efectos potencialmente dañinos de un sistema del complemento sobreactivado y trastornos cerebrovasculares, respectivamente, la presente invención provee una composición de vacuna en donde un antígeno peptídico A β , particularmente el antígeno peptídico A β de acuerdo con la invención y descrito antes en la presente, está comprendido en combinación con un inhibidor del sistema del complemento y un compuesto que modula la afinidad de O₂/hemoglobina, particularmente un efector alostérico de hemoglobina.

La composición de vacuna de acuerdo con la invención que comprende un antígeno peptídico A β , particularmente el antígeno peptídico A β de acuerdo con la invención y descrito con anterioridad en la presente, se puede administrar en forma concomitante, intermitente o secuencial con un inhibidor de complemento y/o un compuesto que modula la afinidad de O₂/hemoglobina para aliviar los efectos potencialmente dañinos de un sistema del complemento sobreactivado y trastornos cerebrovasculares, respectivamente. Por ejemplo, la composición de vacuna de acuerdo con la invención se puede administrar simultáneamente con un inhibidor de complemento o secuencialmente después o antes de la administración de la vacuna. Si se elige un esquema de aplicación en donde se administra un inhibidor de complemento y un compuesto que modula la afinidad de O₂/hemoglobina, particularmente un efector alostérico de hemoglobina, junto con al menos una vacuna de acuerdo con la invención, los compuestos o sustancias se pueden administrar parcialmente en forma simultánea, parcialmente en forma de secuencia en diversas combinaciones.

Es otro objeto de la presente invención proveer mezclas de una vacuna de acuerdo con la invención y un inhibidor de complemento y/o un compuesto que modula la afinidad de O₂/hemoglobina, particularmente un efector alostérico de

hemoglobina, además de métodos para usar una vacuna de acuerdo con la invención, o sus mezclas incluso composiciones que comprenden dicha vacuna o mezclas de una vacuna de acuerdo con la invención y un inhibidor de complemento y/o un compuesto que modula la afinidad de O₂/hemoglobina, particularmente un efector alostérico de hemoglobina, para el tratamiento de prevención y/o terapéutico y/o alivio de los efectos de amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con formación de placa amiloide, incluso amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la enfermedad avanzada tales como enfermedades incluso, sin limitaciones, trastornos neurológicos tales como enfermedad de Alzheimer (enfermedad de Alzheimer), demencia de cuerpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo Dutch); el complejo de demencia de Parkinson de Guam; además de otras enfermedades basadas sobre o asociadas con proteínas símil amiloide tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes de inicio en el adulto; amiloidosis cardíaca senil; tumores endocrinos, y otros, incluso degeneración macular.

El péptido de amiloide modificado 1-15 péptido puede ser sintetizado según el método informado por Nicolau et al. (2002) Proc Natl. Acad. Sci USA 99, 2332-2337. El enfoque informado por Nicolau et al incluye modificar el péptido antigénico mediante un injerto sobre resina de un residuo lipofílico o hidrofóbico, a los residuos de aminoácidos terminales de un péptido preformado. En particular, se adosa un aminoácido protegido, particularmente un aminoácido Fmoc protegido, a una resina mediante química de acople conocida. El grupo protector se elimina y se acopla un segundo residuo de aminoácidos protegido. La síntesis estándar de péptido automatizada mediante química de protección conocida, particularmente química Fmoc/tBu, y grupos protectores de cadenas laterales

luego se usa para la síntesis de péptido antigénico A β , particularmente el péptido antigénico A β ₁₋₁₅ al acoplarse sobre los aminoácidos 1 a 15 de proteína amiloide A β ₁₋₄₂ para producir el fragmento peptídico con una secuencia dada en SEQ ID NO:1. En un paso final se acoplan otros dos aminoácidos protegidos al fragmento peptídico en crecimiento. Los grupos Mtt luego se pueden escindir y acoplar selectivamente con ácido palmítico. Después de lavar la resina, se elimina el grupo protector y simultáneamente se escinde la resina, seguido de desprotecciones de cadenas laterales mediante metodología estándar. El producto final luego se puede obtener con alta pureza y se confirma su identidad por métodos conocidos en el arte tales como, por ejemplo, espectrometría de masa por electrospray.

El residuo lipofílico o hidrofóbico de acuerdo con la presente invención puede ser un ácido graso, un triglicérido o un fosfolípido en donde el esqueleto carbonado de ácidos grasos tiene al menos 10 átomos de carbono. Particularmente, el residuo lipofílico o hidrofóbico es un ácido graso con un esqueleto carbonado de al menos aproximadamente 14 átomos de carbono y hasta aproximadamente 24 átomos de carbono, donde cada cantidad individual de átomos de carbono caen dentro de este rango también es parte de la presente invención. Más particularmente, el residuo lipofílico o hidrofóbico tiene un esqueleto carbonado de al menos 14 átomos de carbono, pero especialmente 16 átomos de carbono. Los ejemplos de residuos hidrofóbicos incluyen, sin limitaciones, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido mirístico, ácido láurico, ácido oleico, ácido linoleico, y ácido linolénico. En una forma específica de realización de la presente invención, el residuo lipofílico o hidrofóbico es ácido palmítico.

Los antígenos liposomales de acuerdo con la invención luego se pueden preparar tal como se describe en Nicolau et al., 2002. El péptido antigénico amiloide modificado A β , particularmente péptido antigénico amiloide modificado

A β_{1-15} se puede reconstituir en una construcción que consiste en liposomas, particularmente liposomas formados por dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPEA), dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG) y colesterol, que opcionalmente contiene monofosforil lípido A.

En una forma de realización específica de la invención se usan liposomas con lípido A como coadyuvante para preparar la vacuna anti-amiloide. Se mezclan dimiristoilfosfatidilcolina, glicerol y colesterol, particularmente en una relación molar de 0,9:1,0:0,7. Luego se agrega un inmunomodulador fuerte tal como, por ejemplo, monofosforil lípido A en una concentración adecuada, particularmente en una concentración de entre 30 y 50 mg por mmol, más particularmente de 40 mg por mmol de fosfolípidos. El péptido antigénico amiloide modificado A β luego se agrega en una relación molar de péptido a fosfolípido de entre 1:30 y 1:200, particularmente en una relación molar de entre 1:50 y 1:120, más particularmente de 1:100. Se extraen los solventes, por ejemplo por evaporación, y la película resultante se hidrata con solución buffer estéril tal como, por ejemplo PBS.

También se pueden preparar los liposomas mediante la técnica de inyección por flujo cruzado tal como se describe, por ejemplo, en Wagner et al (2002) Journal of Liposome Research Vol 12(3), pp 259 – 270. Durante la inyección de soluciones lipídicas en un sistema buffer acuoso, los lípidos tienden a formar "precipitados", seguidos de autodisposiciones en vesículas. El tamaño de vesícula obtenido depende de factores tales como concentración de lípidos, velocidad de agitación, tasa de inyección, y la elección de lípidos. El sistema de preparación puede consistir en un módulo de inyección por flujo cruzado, vasos para la fase polar (por ejemplo una solución buffer PBS), un vaso de solución de etanol/lípido y un dispositivo de presión, pero particularmente un dispositivo de presión de nitrógeno. Mientras se bombea la solución acuosa o polar a través del módulo de inyección de flujo cruzado se inyecta la solución de etanol/lípido en l

fase polar con aplicación de presiones variables. Para determinar la inmunogenicidad de la construcción antigénica modificada A β en un animal adecuado seleccionado del grupo que consiste en ratones, ratas, conejos, cerdos, aves, etc., pero particularmente ratones, especialmente ratones C57BL/6 se inmunizan con el péptido antigénico. La inmunogenicidad de la construcción antigénica se determina con sondas de muestras de suero con intervalos adecuados tras la inmunización con un inmunoensayo tal como, por ejemplo, un ensayo de ELISA.

La construcción antigénica modificada, particularmente la construcción antigénica palmitoilada y más particularmente, construcción palmitoilada A β ₁₋₁₅ se usa para la inmunización de un animal, particularmente un mamífero o un humano, que padece síntomas asociado con amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con formación de placa amiloide, incluso amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad avanzada incluso, sin limitaciones, trastornos neurológicos tales como enfermedad de Alzheimer (AD), incluso enfermedades o condiciones caracterizados por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), demencia de cuerpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo Dutch); el complejo de demencia de Parkinson de Guam; además de otras enfermedades basadas sobre o asociadas con proteínas símil amiloide tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes de inicio en el adulto; amiloidosis cardíaca senil; tumores endocrinos, y otros, incluso degeneración macular, pero particularmente a enfermedad o condición caracterizados por a pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como,

por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI) o cualquier otra enfermedad asociada con amiloide.

La construcción antigénica supramolecular de acuerdo con la presente invención, pero particularmente una composición de vacuna que comprende dicha construcción antigénica supramolecular de acuerdo con la invención se administra a un animal, particularmente un mamífero o un humano, por cualquiera de las vías estándar adecuadas de administración. En general, la composición se puede administrar por las vías tópica, oral, rectal, nasal o parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea o intramuscular). Además, la composición se puede incorporar en matrices de liberación sostenida tales como polímeros biodegradables, en donde los polímeros se implantan cerca de donde se desea la provisión, por ejemplo, en el sitio de un tumor. El método incluye la administración de una dosis única, la administración de dosis repetidas a intervalos de tiempo predeterminados, y administración sostenida guante un periodo predeterminado.

En una forma de realización específica de la invención, la construcción antigénica de acuerdo con la invención, particularmente una composición de vacuna que comprende dicha construcción antigénica en una forma farmacéuticamente aceptable, se administra en dosis repetidas, en particular en 1 a 15 dosis, más particularmente en 2 a 10 dosis, más particularmente en 3 7 dosis y aun más particularmente en 4 a 6 dosis, con intervalos de entre 1 y 10 semanas, particularmente en intervalos de entre 1 y 6 semanas, más particularmente en intervalos de entre 1 y 4 semanas, y aun más particularmente en intervalos de entre 2 y 3 semanas. La respuesta inmune se monitorea mediante la toma de muestras de suero en momentos adecuados después del refuerzo, particularmente 3 a 10 días después del refuerzo, más particularmente 4 a 8 días después del refuerzo y más particularmente 5 a 6 días después del refuerzo y determinar la inmunogenicidad de la construcción antigénica mediante

metodología conocida, particularmente uno de los inmunoensayos de uso común tales como, por ejemplo, un ensayo de ELISA

La inmunización con la construcción antigénica de acuerdo con la invención, pero particularmente con una composición de vacuna que comprende la construcción antigénica de acuerdo con la invención en una forma farmacéuticamente aceptable conduce a una significativa y altamente específica respuesta inmune en el animal o humano tratado.

Las composiciones de construcción antigénica supramolecular de la presente invención se administran a un humano o animal para inducir inmunidad para agentes antigénicos tales como organismos infecciosos o aspectos antigénicos de otras condiciones patológicas tales como agregación de β -amiloide (enfermedad de Alzheimer) o trastornos hiperproliferativos tales como cáncer. El humano o animal inmunizado desarrolla anticuerpos circulantes contra el organismo infeccioso, por lo que reduce o inactiva su capacidad para estimular la enfermedad.

Las composiciones de la presente invención también se pueden usar para producir anticuerpos dirigidos contra péptidos antigénicos. Los anticuerpos obtenidos se administran a individuos para conferirles inmunización pasiva contra diversas enfermedades o trastornos, incluso sin limitaciones, enfermedades asociadas con proteína amiloide.

En consecuencia, en una forma de realización específica de la invención, las composiciones de la construcción antigénica supramolecular de la presente invención se usan para producir un panel de anticuerpos monoclonales o policlonales específicos para diversos trastornos, incluso por ejemplo, enfermedad de Alzheimer. Los anticuerpos se preparan por métodos bien conocidos por los que tienen experiencia común en el arte.

173

Las composiciones de la presente invención se administran a un humano o animal por cualquier medio adecuado, de preferencia por inyección. Por ejemplo, un péptido antigénico modificado reconstituido en liposomas se administra por inyección subcutánea. Ya sea que se produzcan internamente o se provean de fuentes externas, los anticuerpos circulantes se unen al antígeno y reducen o inactivan su capacidad para estimular la enfermedad.

En ciertas formas de realización, la construcción antigénica supramolecular comprende un péptido con la secuencia de aminoácido de β -amiloide. Los péptidos también pueden comprender o corresponder a péptidos amiloides beta enteros y sus fragmentos activos. Además, los péptidos de utilidad para la presente invención también comprenden $A\beta$.

También se provee un método para producir un anticuerpo, incluso cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o sus partes funcionales de acuerdo con la presente invención, particularmente un método para producir un anticuerpo monoclonal, incluso cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o sus partes funcionales de acuerdo con la invención, en donde el método comprende elevar anticuerpos pero particularmente anticuerpos monoclonales contra una construcción antigénica supramolecular que comprenden un péptido antigénico correspondiente a la secuencia de aminoácido del antígeno peptídico $A\beta$ de acuerdo con la invención y tal como se describió antes en la presente, pero particularmente un antígeno peptídico $A\beta_{1-16}(\Delta 15)$, más particularmente antígeno peptídico $A\beta_{1-16}(\Delta 14)$ o $A\beta_{1-16}(\Delta 13)$, aun más particularmente antígeno peptídico $A\beta_{1-14}$, pero especialmente el péptido β -amiloide modificado $A\beta_{1-15}$, con residuos hidrofóbicos tales como, por ejemplo, ácido palmítico o un residuo hidrofílico tal como, por ejemplo, polietilenglicol (PEG) o una combinación de ambos, en donde dicho residuo hidrofóbico e hidrofílico, respectivamente, está covalentemente unido a cada terminal del péptido antigénico mediante al menos

uno, particularmente mediante 1 o 2 aminoácidos acoplado al residuo de aminoácidos terminal en cada extremo del péptido antigénico, tales como, por ejemplo, lisina o cualquier otro aminoácido adecuado o análogo de aminoácido capaz de servir como dispositivo conector para acoplar el residuo hidrofóbico e hidrofílico al fragmento peptídico tales como, por ejemplo, ácido glutámico y cisteína.

El anticuerpo, particularmente el anticuerpo monoclonal, que se obtiene mediante dicho método es capaz, tras la administración a un animal, particularmente un mamífero o un humano, que padece deterioro de la memoria, de retener o aumentar la capacidad de memoria cognitiva en el animal, mamífero o humano tratado. Es otro aspecto de la invención proveer un anticuerpo incluso cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o sus partes funcionales, o, más particularmente, un anticuerpo monoclonal, incluso cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o sus partes funcionales, que se han formado contra una construcción antigénica supramolecular que comprende un péptido antigénico que corresponde a la secuencia de aminoácidos del antígeno peptídico A β de acuerdo con la invención y tal como se describió antes en la presente, pero particularmente un antígeno peptídico A β 1-16(Δ 15), más particularmente un antígeno peptídico A β 1-16(Δ 14) o A β 1-16(Δ 13), aun más particularmente un antígeno peptídico A β 1-14, pero especialmente el péptido β -amiloide modificado A β 1-15, con un residuo hidrofóbico tales como, por ejemplo, ácido palmítico o un residuo hidrofílico tales como, por ejemplo, polietilenglicol (PEG) o una combinación de ambos, en donde dicho residuo hidrofóbico y hidrofílico, respectivamente, está ligado covalentemente a cada uno de los términos del péptido antigénico mediante un aminoácido tales como, por ejemplo, lisina o cualquier otro aminoácido o aminoácido análogo adecuado capaz de servir como molécula ligadora. Cuando se usa un PEG como residuo hidrofílico, los terminales

PEG libres se unen covalentemente a fosfatidiletanolamina o cualquier otro compuesto adecuado para actuar como elemento de anclaje para incluir la construcción antigénica en la bicapa de un liposoma.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: Síntesis de antígeno peptídico tetra(palmitoil lisina)-A β ₁₋₁₅

1.1 Protocolo de síntesis 1:

El péptido amiloide palmitoilado 1-15 se sintetizó según un método previamente informado mejorado (Nicolau et. al. 2002). Este nuevo enfoque incluye un injerto sobre resina de ácido palmítico a los residuos terminales Lys del péptido preformado, en lugar de la síntesis gradual de fase sólida que incorpora el aminoácido modificado Fmoc-Lys(Pal)-OH. Este nuevo enfoque mejora la eficiencia de acople y da un producto de considerable mayor pureza. En consecuencia, el aminoácido ortogonalmente protegido Fmoc-Lys(Mtt)-OH se adosó a una resina Wang por química de acople HBTU. El grupo Fmoc se eliminó mediante 20% de piperidina en DMF y se acopló un segundo residuo de Fmoc-Lys(Mtt)-OH. Luego se usó la síntesis automática estándar de péptido mediante química Fmoc/tBu y grupos protectores de cadena lateral estándar para acoplarse a los siguientes 15 aminoácidos. Por último, los últimos dos aminoácidos acoplados son Fmoc-Lys(Mtt)-OH. Los grupos Mtt luego se escindieron selectivamente mediante 1% de TFA en diclorometano y luego se acoplaron a ácido palmítico con HBTU. Después del lavado de la resina, se extrajo el grupo Fmoc con 20% de piperidina en N, N-dimetilformamida (DMF) y finalmente se realizó escisión simultánea de la resina y la desprotección de las cadenas laterales con TFA en condiciones estándar. Por trituración con éter dietílico frío se obtuvo el producto como sólido blanco. Por espectrometría de masa por electrospray se confirmó la identidad del producto (m/z esperado: 1097,9 ([M]³⁺).

hallado: 1096,8 ([M-3H]³⁺), sin detectar otros péptidos tri-, di- o monopalmitoilados.

1.2 Protocolo de síntesis 2:

Se puede usar un enfoque alternativo para la síntesis de antígeno peptídico tetra(palmitoil lisina)-A β ₁₋₁₅ basado sobre el injerto sobre resina de ácido palmítico a los residuos de terminal Lisina del péptido preformado. En consecuencia, sobre la resina 2-clorotritilo se acopló el aminoácido ortogonalmente protegido Fmoc-Lys(ivDde)-OH. Después de la desprotección de Fmoc se acopló un segundo Fmoc-Lys(ivDde)-OH después de 15 ruedas de síntesis de péptido automatizada estándar mediante química Fmoc/tBu y grupos protectores de cadena lateral estándar de aminoácidos. Después de acoplar los últimos dos residuos Fmoc-Lys(ivDde)-OH, se extrajo el grupo Fmoc con 20% de piperidina en DMF y el N terminal protegido con un grupo Boc mediante bicarbonato de *ter*-butilo. Luego se eliminaron quimiosselectivamente los grupos protectores ivDde por tratamiento con 3% de hidrazina en DMF y luego se acopló ácido palmítico a estos cuatro residuos de Lisina con HBTU mediante dos acoplamientos de 18h cada uno. Después del lavado de la resina se desprotegieron las cadenas laterales con TFA / TIPS en condiciones estándar. Por trituración con éter dietílico frío se obtuvo el producto como sólido blanco. MALDI-Tof confirmó la identidad del producto sin detectar otros péptidos tri-, di- o monopalmitoilados.

Las vacunas de liposomas se prepararon por un método tal como se describe en US6843942 y EP1337322.

EJEMPLO 2: Síntesis de péptido antigénico β -amiloide lipid-PEG N- y C-terminal

La palmitoilación, a la vez de proveer un ancla para el péptido en la bicapa del liposoma, debido a la relativamente reducida longitud del residuo de ácido graso C_{16:0} conduce a que el péptido prácticamente esté acostado sobre la

superficie del liposoma. En consecuencia, las células que procesan el antígeno captan todo el liposoma con el péptido, lo cual podría dar por resultado una respuesta inmune más lenta en términos relativos.

Para mejorar la respuesta inmune, se ha aplicado otro anclaje/espaciador para reconstituir el péptido en el liposoma, por ejemplo polietilenglicol (PEG). PEG se adosa covalentemente al residuo de lisina unido en ambos terminales del péptido. En el otro extremo de la cadena (PEG_n=70) se unió fosfatidiletanolamina (PEA) covalentemente para actuar como elemento de anclaje en la bicapa del liposoma. En consecuencia, el liposoma aun actúa como coadyuvante y el péptido suficientemente alejado de la bicapa se puede procesar solo y así aumenta su inmunogenicidad, comparado con el antígeno palmitoilado.

Las metodologías para la monopegilación de péptidos en la posición N- α son conocidos de ampliamente usados. También se ha descrito la monopegilación específica de sitio en residuos internos de aminoácidos N o C terminales de péptidos de tamaño intermedio según enfoques de fase sólida o de injerto de péptido.

A fin de evitar problemas con el impedimento estérico, la reacción se llevó a cabo en la fase de solución. Este enfoque exitoso incluye la síntesis de las secuencias de péptidos mediante protecciones estándar Fmoc/tBu de cadenas laterales de aminoácidos. Para las secuencias de péptido que contienen residuos internos Lys o His (1-16, 1-15), se agregó un Lys(ivDde) ortogonalmente protegido a cada terminal. Se agregó un Gly adicional al C terminal para facilitar la síntesis. Se extrajo el grupo Fmoc con 20% de piperidina en DMF y se N acetiló con anhídrido acético. Se logró la escisión selectiva de los grupos ivDde con 3% de hidrato de hidrazina en DMF durante 1 h. Se favoreció la resina 2-clorotritilo sobre la más ampliamente usada resina Wang dado que la primera demostró ser mucho más resistente a hidrazinólisis. Además, la resina 2-clorotritilo es extremadamente

sensible a ácidos y en consecuencia, a diferencia de la resina Wang, permite el aislamiento de los péptidos protegidos. De hecho, fue necesario realizar la reacción de acoplamiento en la fase de solución como acoplamiento del péptido ligado a resina dado que el reactivo lipídico preactivado pegilado DSPE-PEG-SPA no daba origen a ningún producto de acoplamiento. En consecuencia, la escisión selectiva a partir de la resina en condiciones leves (ácido acético/ trifluoroetanol / diclorometano, 1:1:8, 1 h, ta) dio los péptidos internamente protegidos.

Los acoplamientos en fase de solución se obtuvieron con éxito con el péptido derivado de la secuencia 1-16, 1-15 a DSPE-PEG-SPA en DMSO y exceso de base. Las reacciones luego se atemperaron por adición de exceso de etanolamina durante 2 h y la solución se liofilizó.

La purificación por HPLC (columna semipreparada de fase inversa C₄) dio entre 50-70% de pureza de los conjugados N y C terminal de PEG-lípido, cuyas identidades se confirmaron por MALDI. Cada secuencia mostró considerable variación en la facilidad de la reacción de acoplamiento y las condiciones se ajustaron en consecuencia (temperatura, cantidad de equivalentes molares de DSPE-PEG-SPA, tiempo). Para la separación del exceso de DSPE-PEG-SPA del producto deseado se aplica purificación HPLC. La separación de los productos mono y diacoplados antes de las desprotecciones finales de las cadenas laterales se puede lograr mediante cromatografía de intercambio de cationes. Las posteriores desprotecciones de cadenas laterales de péptidos y separación del exceso atemperado de DSPE-PEG-SPA conduce al aislamiento de los conjugados de interés con aceptable pureza.

Antígenos pegilados y palmitoilados

AB₁₋₁₅ (ACI-24)

reconstituida en liposomas se midió mediante dicroísmo circular (Figura 1a). El A β 1-16 PEGilado parece estar en una conformación de arrollamiento al azar o de proteína no estructurada (señal negativa a 210 nm y que se acerca lentamente al eje cero hasta 260 nm) mientras que el péptido palmitoilado A β 1-15 contiene una proporción significativa de conformación de lámina β (señal positiva hacia 210 nm, que cruza el eje cero y se vuelve a acercarse a 260 nm). En consecuencia parece que la mayor cercanía del péptido palmitoilado a la superficie liposomal puede imponer una conformación secundaria definida. Esto es potencialmente debido a interacciones electrostáticas del péptido con la superficie del liposoma, que aparentemente no es posible con el péptido PEGilado.

3.2 Análisis de estructura de β -amiloide 1-15 palmitoilado reconstituido en liposomas

Para analizar la influencia de diferentes moléculas ligadoras sobre la conformación del péptido β -amiloide 1-15 reconstituido en liposomas se realizó un análisis RMN (Figuras 1b y 1c). Aquí se usaron ácido palmitoilico y polietilenglicol (PEG con $n=77$), respectivamente, como molécula ligadora o ancla para el liposoma.

Para los estudios por RMN se homogeneizaron muestras que abarcaban los péptidos amiloide 1-15 (ACI-24) palmitoilado y antígeno pegilado A β 1-16 (ACI-01) reconstituidos en liposomas por agitación fuerte y la concentración de la solución se aumentó por centrifugación (3000 rpm durante 3*90 minutos a 4°C), y los sedimentos húmedos obtenidos se transfirieron a rotores MAS. Se prepararon muestras adicionales por suspensión de las preparaciones de péptidos ACI-01 y ACI-24 a una concentración de 1 mM en buffer PBS a pH 7,2, además de una solución 4 mM en el mismo buffer de la secuencia de péptido sin ligador. Se agregó 10% de D₂O a cada muestra.

Se registraron los espectros de RMN ^1H HR-MAS en un espectrómetro Bruker Avance 500 que operaba a una frecuencia de 500,13 MHz (11,4T) equipado con una sonda de 4 mm de triple resonancia ($^1\text{H}/^{13}\text{C}/^2\text{H}$) HR-MAS. Cada muestra se introdujo en rotores de 4 mm de ZrO_2 ajustados con inscripciones cilíndricas de 50 μL . Para todos los experimentos de RMN, las muestras se giraron a una frecuencia igual al ancho de espectro (6250 Hz) que elimina las bandas laterales de giro del espectro. Se adquirió el espectro de RMN de protón de una dimensión con presaturación y la secuencia Watergate (Piotto, M. et al (1992); Piotto, M., et al (2005)) y al acumular 1000-1500 escaneos. La temperatura del aire portador que fluía dentro de la sonda se fijó en 295K para asegurar 298K en la muestra.

Las Figuras 1b y 1c demuestran las diferencias en el espectro RMN de una dimensión de péptido β -amiloide palmitoilado y pegilado. Se observaron dos significativas diferencias en 8,00 y 8,25 ppm. Debido al hecho de que ambos péptidos tienen exactamente la misma secuencia de aminoácidos, con la excepción de Lisina 16th, estas diferencias en 8,00 y 8,25 ppm indican diferencias en la estructura secundaria dado que la Lisina no debería dar una señal positiva en esta zona del espectro de los residuos aromáticos de aminoácidos.

Se pudo demostrar por espectro de RMN de protón de una dimensión en la zona de los residuos aromáticos de aminoácidos que este diseño específico de la construcción supramolecular de acuerdo con la presente invención da por resultado un péptido antigénico amiloide con una singular, altamente específica y significativa estructura secundaria cuando está reconstituida en los liposomas, que difieren con diferentes moléculas de ligador. Esto podría significar que el ligador / ancla fuerza y fija el péptido en una determinada o definida estructura secundaria que depende de la molécula de ligador usada. En el caso de usar estas moléculas como vacuna para la inmunización activa es probable que los

anticuerpos formados contra estos antígenos estructuralmente diferentes sean específicos de antígeno y de conformación.

Los datos previos obtenidos por ELISA y ORT (tarea de reconocimiento de objeto en una prueba de memoria cognitiva) tras la inmunización de ratones APP x PS-1 con antígenos palmitoilado $A\beta_{1-15}$ y pegilado $A\beta_{1-16}$ (ver Ejemplo más adelante) demuestran que solo el antígeno palmitoilado restablece el deterioro de la memoria en este modelo de enfermedad de Alzheimer aunque ambos demostraron la misma inmunogenicidad. El posible mecanismo por el cual dos antígenos que presentan el mismo péptido forman *in vivo* dos anticuerpos funcionales diferentes, muy probablemente esté ligado a la diferente estructura secundaria del péptido presentado formado por la tecnología de ligador.

EJEMPLO 4: Cuantificación de péptido reconstituido con orientación externa e interna

La cantidad de péptido reconstituido en ACI-01 y ACI-24 fue establecida mediante un ensayo basado en fluorescamina (FLA) que reacciona específicamente con aminas primarias para formar aductos covalentes altamente fluorescentes (Udenfriend, S. *et al*, 1972). Se prevé la reacción de FLA con el N terminal del péptido Pal1-15 en ACI-24 y con Lys-16 en ACI-01.

A fin de separar los péptidos libres de los de los liposomas, las muestras se sometieron a ultracentrifugación y los sobrenadantes obtenidos se analizaron para determinar el contenido de péptido mediante el ensayo FLA. No se detectaron péptidos libres en el sobrenadante de ACI-01 o ACI-24. El rotulado de las fracciones sedimentadas con FLA mostró muy elevada selectividad para la reacción con el péptido en los liposomas para ACI-24 y ACI-01. A fin de determinar el total de péptido presente sobre las superficies de los liposomas, se repitieron los ensayos en presencia de Triton X-100 (2% en PBS) para alterar las bicapas lipídicas. Esto dio por resultado un significativo aumento del rotulado; lo

cual reveló que aproximadamente 63 % del péptido está expuesto sobre la superficie de la membrana externa. Por otra parte, el rotulado de ACI-01 con FLA solo alcanza una meseta en 1,2 mM de FLA, en cuya concentración la emisión es idéntica cuando el ensayo se realiza en ausencia o presencia de Triton X-100. Esto demuestra que la totalidad del péptido está expuesto sobre la superficie de la vacuna pegilada ACI-01.

EJEMPLO 5: Comparación de la Inmunogenicidad de antígenos pegilados y palmitoilados en ratones de tipo salvaje C57BL/6 (ELISA)

Se prepararon antígenos liposomales tal como se describe (Nicolau et al., 2002). Los antígenos pegilado $A\beta_{1-16(\Delta 14)}$, $A\beta_{4-11}$ y palmitoilado $A\beta_{1-15}$ se reconstituyeron en una construcción que consiste en liposomas preparados de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPEA), dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG) y colesterol (relaciones molares 0,9: 0,1: 0,1: 0,7) que contienen monofosforil-lípido A (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE. UU.) a 40mg/mM de fosfolípidos.

Los antígenos pegilado $A\beta_{1-16(\Delta 14)}$, $A\beta_{4-11}$ y palmitoilado $A\beta_{1-15}$ (ACI-24) se usaron para la inmunización en ratones C57BL/6 con intervalos de 2 semanas. Se inmunizaron 10-12 animales con cada antígeno. Se tomaron sueros 5 días después del refuerzo y se realizaron ELISA con varias diluciones del suero. Se presentan los resultados comparativos que muestran la inmunogenicidad de los diferentes antígenos.

Los datos por ELISA demostraron que PEG- $A\beta_{1-16(\Delta 14)}$ liposomal es significativamente más inmunogénico que $A\beta_{1-15}$ palmitoilado. ALUM adicional no mejoró la inmunogenicidad de PEG- $A\beta_{1-16(\Delta 14)}$ en los ratones. La respuesta de anticuerpos inducida por PEG- $A\beta_{4-11}$ era más lenta en comparación con PEG- $A\beta_{1-16(\Delta 14)}$.

Debido a la cuestión de la traslación de la respuesta inmune más rápida en una mayor capacidad de memoria, se comparó el antígeno pegilado con el antígeno palmitoilado en un modelo de ratones dobles transgénicos de enfermedad de Alzheimer.

Se puede usar un método alternativo tal como se describe en US6843942 y EP1337322.

EJEMPLO 6: Comparación de inmunogenicidad de antígenos pegilados versus palmitoilados en modelo de ratones de enfermedad de Alzheimer (ELISA)

6.1 Para los estudios de inmunización *in vivo*, ratones APP717 C57BL/6 x PS-1 A246E FVB (ratones APPxPS-1) se colocaron en jaulas individuales, se separaron en doble ciego aleatorio, se equipararon por edad y se obtuvo el genotipo por PCR.

Se usaron ratones hembra jóvenes (3-4 meses) de una cepa doble transgénica que expresa la proteína precursora amiloide humano mutante (APP-V717I) y presenilina-1 mutante humana (PS1-A246E) ambos bajo el control del promotor de gen murino *thy1* y en antecedentes genéticos F1 (FVB x C57Bl). En todos los ratones se determinó el genotipo por reacción en cadena de polimerasa (PCR) a la edad de 3 semanas y cada ratón se rotuló en forma exclusiva. En todos los ratones se determinó dos veces el genotipo durante su vida mediante una segunda PCR realizada al comienzo del estudio, y antes de la separación por doble ciego aleatorizado en diferentes grupos experimentales. Los ratones tenían libre acceso a agua y alimento estándar para ratones (Muracon-G, Trouw Nutrition, Gent, Bélgica). Los ratones se alojaron en jaulas de metal estándar con ritmo invertido día-noche, de acuerdo con la legislación local sobre trato de animales. 5 d antes del inicio de la prueba de comportamiento se enjaularon los ratones en

jaulas de macrolon Tipo 2 y se transportaron al laboratorio de comportamiento para aclimatizarse y habituarse al ambiente del laboratorio de pruebas.

6.2 Inmunización

Se usaron liposomas con lípido A como coadyuvante para preparar la vacuna antiamiloides (Nicolau et al., 2002). Se mezclaron dimiristoilfosfatidilcolina, dimiristoilfosfatidilglicerol y colesterol en una relación molar de 0,9:1,0:0,7. Se agregó monofosforil-lípido A, un inmunomodulador fuerte, en una concentración de 40 mg por mmol de fosfolípidos. Se agregaron los péptidos palmitoilado y pegilado en una relación molar péptido a fosfolípidos 1:100. Se evaporaron los solventes, y la película obtenida se hidrató con PBS estéril (pH7,3) hasta una concentración final de fosfolípido de 4 mmol.

Se usaron los antígenos palmitoilado (ACI-24, A β ₁₋₁₅) y pegilado (ACI-01, A β ₁₋₁₆) para la inmunización en ratones APPxPS-1 con intervalos de 2 semanas (5 bisemanalmente en inoculaciones i.p.). En cada grupo experimental se inmunizaron 10 animales con cada antígeno por inyección intraperitoneal (200 μ l por inyección, que contiene 8 nmoles de los péptidos). Liposomas vacíos sirvieron como control. Se tomaron sueros a intervalos regulares (bisemanalmente) y también 5 días después del refuerzo y se realizó un ELISA antiamiloides con varias diluciones del suero. Se presentan resultados comparativos que muestran la inmunogenicidad de los diferentes antígenos.

Se obtuvo significativa respuesta inmune en los ratones APPxPS-1 inmunizados con liposoma / A β antígeno palmitoilado y pegilado cinco días después de la sexta inoculación de antígeno, pero en contraste con la respuesta inmune en ratones C57BL/6 sanos, el antígeno pegilado no generó mayor título de anticuerpos que el antígeno palmitoilado en el modelo de enfermedad.

La respuesta inmune de IgG específica anti A β aumentó más rápidamente con ACI-24, con pico tras 5 semanas. Ambas vacunas generaron clases e isotipos

136

significativamente diferentes de inmunoglobulina, donde el antígeno palmitoilado ACI-24 dio mayores títulos de IgG, en oposición del pegilado ACI-01, que generó más anticuerpos de la clase IgM. Las muestras finales de sangre proveniente de todos los animales también se analizaron para el isotipo de IgG. (Figura 2)

Se identificaron los anticuerpos IgG e IgM específicos para A β_{1-42} por ELISA. Las placas se recubrieron con 10 μ g/ml de amiloide β_{1-42} durante la noche a 4°C. Después de lavar cada cavidad con PBS-0,05% Tween 20 y bloquear con 1% BSA, se agregaron diluciones seriadas de suero a las placas y se incubaron a 37°C durante 2 horas. Después de lavar, se incubaron las placas con un Ig fosfatasa-conjugado antimurino (IgG, anticuerpo entero, Sigma-Aldrich St. Louis, MO, EE. UU.) o anticuerpo específico de isotipo (IgM, IgG1, IgG2a e IgG3, adquirido de Pharmingen BD, San Diego, CA, EE. UU. e Ig2b de Zymed Laboratories, San Francisco, CA) durante 2 h a 37°C. Después del lavado final se incubaron las placas con PNPP (para-nitrofenilfosfato), el sustrato de fosfatasa, y se leyó a 405 nm con un lector de placas de ELISA. Los resultados se expresaron en referencia a las diluciones seriadas de un pool titulado de suero de ratones adultos inmunizados o de diluciones seriadas de un anticuerpo disponible en el comercio (6E10, Chemicon International, Temecula, CA, EE. UU.). Alternativamente, se expresan los resultados como DO en una dilución en la cual ningún suero estaba en nivel de saturación (Tabla 1).

Tabla 1.

	IgG1			IgG2a			IgG2b		
	Control	ACI-01	ACI-24	Control	ACI-01	ACI-24	Control	ACI-01	ACI-24
Promedio	0,1	0,11	1,33	0,15	0,22	0,55	0,59	1,81	2,88
SD	0,01	0,02	0,98	0,03	0,03	0,77	0,12	1,23	0,82

107

	IgG3 Control	ACI- 01	ACI- 24
Promedio	0,1	0,63	2,05
SD	0,00	0,22	0,39

Se halló ACI-24 principalmente en los isotipos IgG1 e IgG2b, ambos subtipos predominantemente no inflamatorios Th2, y también en IgG3, que es una subclase de IgG independiente de las células T. Con la excepción de un animal vacunado con ACI-24, ambas vacunas solo indujeron valores muy bajos de IgG2a (Th1).

Se realizó el mapeo de epitopos de los anticuerpos obtenidos por ELISA mediante una biblioteca de péptidos que comprende un total de 33 péptidos biotinilados que cubren la totalidad de la secuencia de aminoácidos de Aβ1-42 mientras que un péptido β biotinilado completo sirvió como control positivo. La inmunización con ambas vacunas, ACI-01 y ACI-24, dio por resultado anticuerpos anti-Aβ con los mismos epitopos definidos por los aminoácidos 1-9 de Aβ (péptido1). Además, se analizó la eventual dependencia de conformación al medir la unión específica de los antisueros anti-Aβ obtenidos contra Aβ polimérico, al adaptar el ensayo ELISA a las fibras Aβ1-42. La inmunización con ACI-24 elevó más significativamente los títulos elevados de anticuerpos anti-Aβ que reconocen fibras Aβ1-42 que los antisueros producidos por ratones inmunizados con ACI-01 (Tabla 2). De los resultados obtenidos surge que la inmunización con ACI-01 y ACI-24 produce respuesta inmune que no solo difieren en el título, las subclases y los isotipos de Ig, sino también en su especificidad de conformación. Tabla 2.

	Control	ACI-01	ACI-24
SEM	2049,0 ± 46,7	3426,2 ± 221,9	7770,6 ± 2090,1
Estadística por ANOVA		p< 0,05	p< 0,01

EJEMPLO 7: Comparación de antígenos pegilados versus palmitoilados en su capacidad de reconocimiento en un modelo de ratón con enfermedad de Alzheimer (ORT)

7.1 Impacto sobre la mejora de la capacidad de la memoria no espacial, dependiente del hipocampo en el modelo murino APP x PS1 de enfermedad de Alzheimer

Para analizar el impacto sobre la mejora de la capacidad de memoria no espacial, dependiente del hipocampo en el modelo murino APP x PS1 con enfermedad de Alzheimer durante el periodo de 3 meses de inmunización por vacunación activa anti-A β 1-16/1-15 con antígenos palmitoilado (ACI-24, A β ₁₋₁₅) y pegilado (ACI-01, A β ₁₋₁₅), se realizó una prueba de reconocimiento de objeto (ORT) esencialmente tal como se describe (Tang *et al.* 1999; Rampon *et al.* 2000). Se realizó el análisis estadístico mediante la prueba de comparación múltiple ANOVA de Turkey-Kramer tal como se describe (Moechars, D. *et al.* (1999) y (1996)). Esta prueba se realizó mediante GraphPad InStat version 3.06 para Windows, GraphPad Software, San Diego California EE. UU., www.graphpad.com.

Brevemente, se instaló un esquema de tres meses de inmunización con seis inoculaciones bisemanales de ACI-01 y ACI-24. Un grupo de ratones recibió liposomas vacíos como control. Los ratones se habituaron durante 1 h a una caja de campo abierto de Plexiglas (52 x 52 x 40 cm) con paredes verticales negras y un piso translúcido suavemente iluminado por una lámpara ubicada debajo de la

caja. Al día siguiente se colocaron los animales en la misma caja y se sometieron a 10 min de prueba de adquisición. Durante este estudio se colocaron los ratones individualmente en el campo abierto en presencia de un objeto A (bolita o dado), y se midió el tiempo ocupado en explorar el objeto A (cuando la trompa del animal estaba dirigida hacia el objeto a una distancia < 1 cm). Durante una prueba de 10 min de retención (segunda prueba), realizada 3 h más tarde, se colocaron nuevos objetos (objeto B: bolita o dado) junto con el objeto conocido (objeto A) en el campo abierto. Se registró el tiempo (t_A y t_B) ocupado por el animal en explorar los dos objetos. Se usó el índice de reconocimiento (RI), definido como la relación entre el tiempo ocupado en explorar los nuevos objetos respecto del tiempo ocupado en explorar ambos objetos $[(t_B/(t_A + t_B)) \times 100]$ para medir la memoria no espacial. Se realizó el análisis estadístico mediante ANOVA de factor único tal como se describe ((Moechars *et al.* 1999; Moechars *et al.* 1996)).

Se usaron antígenos palmitoilado (ACI-24) y pegilado (ACI-01) para la inmunización en ratones APPxPS-1 con intervalos de 2 semanas. Se inmunizaron 10 animales de 3 meses por i.p. con cada antígeno (200 μ l por cada inyección i.p. y 100 μ g de péptido) y un liposoma vacío sirvió como control. Se obtuvieron sueros 5 días después de la inmunización y se realizó ELISA con varias diluciones del suero. Los resultados comparativos muestran la inmunogenicidad de los diferentes antígenos.

La capacidad cognitiva de los ratones transgénicos APPxPS-1 inmunizados con antígenos A β , palmitoilado (ACI-24) y pegilado (ACI-01), se evaluó en un paradigma de memoria de reconocimiento visual no espacial, al someterlos a una tarea de reconocimiento de objeto conocida por depender de la actividad del hipocampo ((Tang *et al.* 1999), (Rampon *et al.* 2000)). Básicamente, tres horas después de la capacitación para familiarizar a todos los ratones con determinado

objeto, se analizaron para la retención al confrontarlos con nuevos objetos, junto y además del conocido.

La capacidad de retención o de memoria cognitiva de ratones APP x PS-1 se podía aumentar significativamente por inmunización con antígeno palmitilado $A\beta_{1-15}$ (ACI-24) comparado con los ratones control APP x PS-1 tratados ($76,1 \pm 3,9\%$ versus $49,1 \pm 4,5\%$ para control; Tabla 3). Esto demuestra que los ratones ACI-24 inmunizados reconocieron y recordaron el objeto original durante al menos 3 horas, por lo que liberaron su motivación y su capacidad de exploración estaba intacta, al igual que ratones sanos equiparables en edad, sexo, y cepa, comparados con ratones de tipo salvaje no tratados y no transgénicos ($61,8 \pm 5,1\%$). Aunque el péptido ACI-01 solo es un aminoácido más largo en el C terminal (Lisina 16th) que el péptido ACI-24 y solo la tecnología del ligador es diferente entre estas vacunas, la inmunización con antígeno pegilado $A\beta_{1-16}$ (ACI-01) no demuestra restablecimiento de la memoria ($45,6 \pm 6,2\%$) comparable con ACI-24.

Tabla 3.

	Control	ACI-01	ACI-24	Sanos
SEM	$49,1 \pm 4,5$	$45,6 \pm 6,2$	$76,1 \pm 3,9$	$61,8 \pm 5,1$
Estadística		n.s.* versus control	$p < 0,05$ versus control	n.s.* versus control

n.s.*: no significativo

7.2 Potencial contribución de las diferentes clases de anticuerpo IgM e IgG a la función cognitiva

Para analizar la potencial contribución de las diferentes clases de anticuerpo IgM e IgG a la función cognitiva, se realizó un análisis de correlación.

Los anticuerpos IgM no se correlacionaron con la capacidad de memoria ($r^2=0,2333$) pero los anticuerpos resultantes de clase IgG se correlacionaron en

términos generales ($r^2=0,857$) con el grado de capacidad de memoria (Índice ORT) en dos fases. Entre un Índice ORT de 0 a 20 se observó una relación más lineal, mientras que con un índice ORT superior a 20 la correlación entra en una fase de saturación. Esto podría indicar que los anticuerpos IgM que no atravesaron la barrera hematoencefálica no contribuyen al restablecimiento de la memoria. En contraste, los anticuerpos IgG atraviesan la barrera hematoencefálica según la subclase y están ligados al mejoramiento de la memoria.

Para evaluar la capacidad de la inmunización con ACI-24 a fin de modificar la cantidad de péptidos de amiloide solubles e insolubles en el cerebro de ratones APPxPS-1, se midieron A β 1-40 y A β 1-42 humanos mediante ELISA específico en la fracción soluble de homogenados de cerebro. Se usaron kits de ELISA disponibles en el comercio (Amyloid β 40 o β 42 ELISA, The Genetics Company, Zurich, Suiza). Se realizó ELISA de acuerdo con el protocolo del fabricante. La cuantificación del contenido de A β de las muestras se obtuvo al comparar la absorbancia con la curva estándar preparada con A β 1-40 o A β 1-42 sintético (Tabla 4)

Tabla 4.

	A β Soluble	A β 42 Soluble	A β 40 Insoluble	A β 42 Insoluble
Control	2,6 $\pm$ 0,6	3,1 $\pm$ 1,0	3,0 $\pm$ 0,1	3,0 $\pm$ 0,04
ACI-24	2,1 $\pm$ 0,8	2,1 $\pm$ 0,9	2,0 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,07
ANOVA estadística	n.s.	p<0,01	p<0,05	p<0,05

n.s.* no significativo

Los datos se expresan en promedio (A β ng/g homogenado de cerebro $\pm$ SEM)

La inmunización con ACI-24 condujo a un significativo descenso de A β 1-40 y A β 1-42 insoluble, relacionado con placa. Los niveles de A β 1-42 soluble también

estaban significativamente reducidos, mientras que los niveles de A β 1-40 soluble solo mostraron tendencia a descender.

Ejemplo 8: La inmunización con ACI-01 y -24 no causa inflamación

Se evaluó la seguridad de ambas vacunas liposómicas, ACI-01 y ACI-24, al medir la producción local de las citoquinas inflamatorias IL-1 β , IL-6, IFN- γ y TNF α por ELISA específico. Se midieron los niveles de TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-1 β en homogenados totales de cerebro mediante ELISA en emparejado, de acuerdo con los manuales del fabricante (all R&D Systems, Minneapolis, MN, EE. UU.). Los resultados se expresan en pg/ml en referencia a las diluciones seriadas de las citoquinas recombinantes. Se evaluó el grado de células de la microglía (MHCII) y astrogliosis (GFAP) activadas en el cerebro en la región del subículo, mediante inmunohistoquímica cuantitativa.

La inmunización con ACI-01 o ACI-24 no aumentó significativamente los niveles de IL-1 β , IL-6, IFN- γ y TNF α en el cerebro. De modo similar, no se observaron diferencias en astrogliosis tras la inmunización con ACI-24, mientras que el grado de microglía activada mostró una tendencia a disminuir después de un periodo de inmunización de tres meses.

EJEMPLO 7: Fabricación de mAbs :

Se usó antígeno palmitoilado (ACI-24, A β ₁₋₁₅) para la inmunización en ratones C57BL/6 con intervalos de 2 semanas. Se inmunizaron 10-12 animales con cada antígeno (vol. de inyección: 200 μ l que contienen 8 nmoles de péptido). La última inyección se aplicó 4 días antes de sacrificar los animales. Después de 5 inmunizaciones se seleccionaron ratones inmunizados con títulos terapéuticos (cuando una dilución 1:5.000 del suero era positiva para ELISA) para una fusión. Se cosecharon células de bazo de animales inmunizados e hibridomas generados por fusión de células de bazo sensibilizadas con una línea celular de mieloma. La fusión de los linfocitos B de ratón provenientes de los bazos se realizó con células

de la línea celular de mieloma SP2-0. (ATCC, Manassas, VA) mediante los procesos bien conocidos de Kohler y Milstein (Nature 256: 495-497 (1975)) y Harlow y Lane (Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York 1988))

Las células fueron inducidas para fusionarse por adición de polietilenglicol. Las células híbridas obtenidas luego se clonaron de manera convencional, por ejemplo se seleccionaron mediante dilución limitante de clones de IgG productora de hibridoma y se analizaron por su unión específica al péptido A β ₁₋₄₂ por ELISA y se cultivaron los clones obtenidos, que produjeron los anticuerpos monoclonales buscados.

Los hibridomas así obtenidos se seleccionan químicamente por plaqueado de las células en un medio de selección que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT).

Luego se analizan los hibridomas para la capacidad de producir anticuerpos monoclonales contra específicas enfermedades o trastornos asociados a amiloide. Se clonan los hibridomas productores de los anticuerpos de interés, se expanden y se guardan congelados para la futura producción. El hibridoma de preferencia produce un anticuerpo monoclonal con el isotipo IgG, de mayor preferencia el isotipo IgG2.

EJEMPLO 8: Determinación de especificidad para anticuerpo mACI-24-Ab4

Para analizar la especificidad del anticuerpo ACI-24-Ab4, se estudiaron diferentes concentraciones de fibrillas de amiloide 1-42, 1-40 y 1-38 preformadas en Hybond ECL Nitrocellulose Membrane (Amersham Biosciences). Después de bloquear con 10% de leche en polvo y 0,7 % de Tween 20, las membranas se incubaron anticuerpo primario a 20 μ g/ml durante 2h a RT. Después de lavar, se incubaron las membranas con anticuerpo IgG antimurino de oveja conjugado con peroxidasa de rábano de caballo (Amersham Biosciences) durante 1 h a TA, se

lavarón y se incubaron con solución quimioluminiscente, seguido de exposición de la membrana a película de rayos X.

Para medir la unión de mAb (mAC1-24-Ab4) a fibras de amiloide β 1-42, se preformaron fibras $A\beta$ 1-42, 1-40 y 1-38 durante siete días a 37°C y se analizaron sobre la membrana. Se usaron 20 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo para medir la capacidad de fijación y se detectó el anticuerpo con anticuerpo IgG antimurino de oveja conjugado con peroxidasa de rábano de caballo durante 20 minutos de exposición.

Tal como se pudo demostrar por análisis Dot Blot, el anticuerpo mAC1-24-Ab4 se une a diferentes fibras preformadas $A\beta$ con diferente sensibilidad. El anticuerpo exhibe mayor sensibilidad de unión a las fibras $A\beta_{1-42}$ que $A\beta_{1-40}$ o $A\beta_{1-38}$. Puede detectar al menos 0,001 μg de fibras $A\beta_{1-42}$ mientras que el límite de detección del anticuerpo para las fibras $A\beta_{1-40}$ es al menos de 0,1 μg y para las fibras $A\beta_{1-38}$ de 1 μg , lo cual significa que la sensibilidad es 100 veces a 1000 veces inferior para estos tipos de fibras de amiloide. Estos datos demuestran que el anticuerpo AC1-24-Ab4 es al menos 100 veces más sensible a la forma de amiloide (1-42) que es sabido que se hace insoluble al cambiar la conformación secundaria y compone la mayor parte de las placas amiloides en los cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer.

EJEMPLO 9: Fraccionamiento por ultracentrifugación de gradiente de densidad

Las propiedades de los anticuerpos monoclonales para inhibir la polimerización de las fibras $A\beta_{1-42}$ y desagregar las fibras $A\beta_{1-42}$ -se estudiaron mediante ultracentrifugación de gradiente de densidad (Rzepecki et al., 2004) basado en el principio de distribución entre las fibras peptídicas de diferente tamaño que se obtienen tras la incubación con y sin anticuerpos, seguido de análisis de sedimentación SDS-PAGE en un gradiente preformado (OptiPrep™). El análisis simultáneo de la población de fibras preformadas $A\beta$, las propiedades

de desagregación y la inhibición de la agregación de los anticuerpos coincubados, y la fijación de los anticuerpos a las fibras son obvias ventajas de este método.

Los anticuerpos monoclonales formados contra $A\beta_{1-15}$ (mACI-24-Ab4) se analizaron todos en ensayos de desagregación e inhibición.

Para la inhibición de la agregación de $A\beta_{1-42}$, se incubaron monómeros de $A\beta_{1-42}$ con mAbs en dos diferentes relaciones molares (relación molar de monómero $A\beta_{1-42}$ treinta o cien veces mayor que MAb) con la concentración final de $A\beta$ de 50 μ M. Tras 24 h de incubación a 37 °C, las muestras se superpusieron sobre un gradiente discontinuo de Optiprep™ y los tubos se centrifugaron a 259 000 g durante 3 h a 4°C. Se cosecharon 15 fracciones (140 μ L cada una), en donde la fracción 1 era la fracción menos densa desde la parte superior del gradiente y la fracción 15 era la fracción más densa de la parte inferior del gradiente. También se tomó el sedimento. Las fracciones recolectadas se analizaron por SDS-PAGE con tinción de plata. La concentración de $A\beta_{1-42}$ para los ensayos de inhibición era cinco veces inferior que para los ensayos de desagregación que disminuyen la cinética de agregación de amiloide y aseguran la medición dentro de la fase lineal.

Sin adición de mAb, se agregó péptido $A\beta$ tras 24 h de incubación y se halló la mayor parte de la proteína en las fracciones 13 al sedimento (sedimento, muy poco en 12), lo cual demuestra la completa polimerización de los monómeros de péptido $A\beta$. La inhibición exitosa y significativa de la agregación debería dar fibras más pequeñas u oligómeros, que se deberían encontrar en las fracciones con más baja densidad. En el ensayo de agregación mACI-24-Ab4 generaron un cambio en las bandas para la mayoría (banda más fuerte) desde 13 a 11 y 12 y una significativa solubilización de las bandas que corrían en la fracción 13 hasta el sedimento. Esto significa que mACI-24-Ab4 exhibe una fuerte capacidad para

inhibir la polimerización de monómeros de péptido A β en fibras y reveló una unión específica a las fibras A β (en las fracciones 11 y 12).

Para la desagregación de las fibrillas preformadas A β_{1-42} por coincubación con MAb (en dos relaciones molares diferentes 1:30 y 1:100, MAb + Monómero A β_{1-42} con la concentración A β final de 246 μ M), se incubaron las muestras durante 24 horas a 37°C. Después de 24 h se fraccionaron las muestras por ultracentrifugación y se separaron por SDS-PAGE tal como se describió con anterioridad y antes (Rzepecki et al., 2004).

De modo similar al ensayo de agregación, se pudo demostrar la completa polimerización de las fibras por la distribución de fibrillas A β_{1-42} solas en las fracciones 12 a P (sedimento). Aquí los cambios de las fibras hacia las fracciones de menor densidad indicarían actividad de desagregación del anticuerpo, cuando se coincuban con las fibras preformadas. La adición de mACI-24-Ab4 en una relación molar 1:100 mostró un cambio de la mayoría de las fibras de amiloide de 12 a 11. En consecuencia, mACI-24-Ab4 indica también una fuerte actividad de desagregación.

Ejemplo 10: Aplicación combinada de un antígeno palmitoilado y un inhibidor de la activación del complemento en un estudio de retención de la capacidad de reconocimiento en un modelo murino de enfermedad de Alzheimer (ORT)

A fin de prevenir potenciales efectos secundarios tales como complicaciones neurológicas causadas por mayor estimulación por vacunación de un sistema de complemento ya sobreactivado, el antígeno palmitoilado (ACI-24, A β_{1-15}) se administró en combinación con un inhibidor de complemento seleccionado del grupo que consiste en TP10 (receptor 1 de complemento humano soluble), Eculizumab (proteína C5 de complemento antihumano),

Pexelizumab (complemento anti-C5), inhibidor natural de C1 Cetor® (inhibidor N de esterasa C1) e inhibidor de C1 natural humano.

El inhibidor de complemento se administra antes de la vacunación de un paciente humano con el antígeno palmitoilado (ACI-24, A β ₁₋₁₅) o poco después.

En un esquema de aplicación en donde el inhibidor de complemento se administra antes de la vacunación con el antígeno palmitoilado (ACI-24, A β ₁₋₁₅), el compuesto inhibidor se administra en una ventana temporal que comienza 20 horas antes de la vacunación y que termina inmediatamente antes de la vacunación. (Esquema de aplicación 1)

En un esquema de aplicación en el cual el inhibidor de complemento se administra después de la vacunación con el antígeno palmitoilado (ACI-24, A β ₁₋₁₅), el compuesto inhibidor se administra en una ventana temporal que comienza inmediatamente después de la vacunación y termina 1 día después de la aplicación de la vacuna. (Esquema de aplicación 2)

10.1 TP10 (receptor 1 de complemento soluble humano)

En estudios humanos con TP10 se halló que es preferible mantener una concentración de TP10 en un rango de entre 100 µg/mL y 160 µg/mL durante 24 horas después de CPB. A fin de obtener dicho rango de concentración es más adecuado dar una dosis inicial de 10 mg/kg durante 0,5 horas, seguido de 10 mg/kg durante 23,5 horas (LI JS, Am Heart J. 2004 Jan;147(1):173-80.)

La vacunación con antígeno palmitoilado (ACI-24, A β ₁₋₁₅) se realiza después de obtener una concentración deseada de TP10 después del esquema de aplicación 1 o, alternativamente, antes de aplicar la dosis inicial de 10 mg/kg TP10 de acuerdo con el esquema de aplicación 2.

10.2 Eculizumab (proteína C5 de complemento anti humano)

Eculizumab (600 mg) se administra por infusión cada semana durante cuatro semanas, seguido una semana después por una dosis de 900-mg y luego

por otras dosis de 900 mg semana de por medio hasta la semana 12 (Hillmen P, N Engl J Med. 2004 Feb 5;350(6):552-9.).

Para el tratamiento prolongado se puede administrar Eculizumab en una dosis de 900 mg cada 12 a 14 días. (Hill A, Blood. 2005 Oct 1;106(7):2559-65. Epub 2005 Jun 28.)

La vacunación con antígeno palmitoilado (ACI-24, A β_{1-15}) se realiza después de administrar la primera dosis de 600 mg de Eculizumab según el esquema de aplicación 1 o, alternativamente, antes de dar la dosis inicial de 600 mg de Eculizumab, según el esquema de aplicación 2.

En algunos casos puede ser más adecuado aplicar el esquema de aplicación 1 solo después de la semana 4, cuando se terminaron de dar las primeras cuatro rondas de administración de Eculizumab y se logra una concentración estable de estado estable en el cuerpo humano.

10.3 Pexelizumab (complemento anti- C5)

Pexelizumab se da por vía intravenosa como bolo de 2,0 mg/kg durante 10 minutos en donde la administración en bolo puede ser seguida de una infusión de 1,0 mg/kg durante 20 horas (<http://circ.ahajournals.org/cgi/content/full/106/23/2986-a>) o de 0,05 mg/kg/hora durante 24 horas.

La vacunación con antígeno palmitoilado (ACI-24, A β_{1-15}) se realiza después de administrar el primer bolo de 2,0 mg/kg de Pexelizumab según el esquema de aplicación 1 o, alternativamente, antes de dar el bolo inicial de 2,0 mg/kg de Pexelizumab de acuerdo con el esquema de aplicación 2.

En algunos casos puede ser más adecuado aplicar el esquema de aplicación solo después de completar la segunda aplicación por infusión y obtener una concentración estable de estado estable en el cuerpo humano.

10.4 Inhibidor natural humano C1

El inhibidor C1 se administra en dosis de 6,25 a 100 U/kg (Van Doorn MB, Allergy Clin Immunol. 2005 Oct; 116(4):876-83. Epub 2005 Aug 8.)

Alternativamente, se puede administrar un concentrado de inhibidor pasteurizado de C1 esterasa en dosis de entre 500-1000 IU (De Serres J, Transfus Apher Sci. 2003 Dec;29(3):247-54.); (Börk K, Arch Intern Med. 2001 Mar 12;161(5):714-8.)

El inhibidor C1 también se puede dar por vía intravenosa en infusión de 1 h, comenzando con 6000 IU, seguido de 3000 IU, 2000 IU, y 1000 IU con intervalos de 12 h (Callezi C, Crit Care Med. 2002 Aug; 30(8):1722-8.)

Por último, se puede administrar el inhibidor C1 por vía intravenosa cada tres días como concentrado de inhibidor calentado al vapor en una concentración de 25 unidades de plasma por kilogramo de peso corporal. (Waytes AT, N Engl J Med. 1996 Jun 20; 334(25):1630-4.).

La vacunación con antígeno palmitoilado (ACI-24, A β ₁₋₁₅) se realiza después de administrar inhibidor C1 según el esquema de aplicación 1 o, alternativamente, antes de dar la dosis inicial de inhibidor C1 de acuerdo con el esquema de aplicación 2.

10.5 Inhibidor natural C1 Ceter® (inhibidor N de esterasa C1)

El inhibidor N de esterasa C1 o Ceter® se administra en una dosis de 1.000 U, 1.500 U o 2.000 U y más tarde se administra en la misma dosis del otro producto.

La vacunación con antígeno palmitoilado (ACI-24, A β ₁₋₁₅) se realiza tras la administración de la 2ª dosis según el esquema de aplicación 1 o, alternativamente, se da antes de la dosis inicial de 1.000 U, 1.500 U o 2.000 U de inhibidor N de esterasa C1 o Ceter® de acuerdo con el esquema de aplicación 2.

Figuras

Figura 1a: Diseño y caracterización biofísica de las dos vacunas liposómicas que contienen péptidos inmunógenos con los primeros 15 (ACI-24, A β 1-15) y 16 (ACI-01, A β 1-16) aminoácidos del péptido amiloide β 1-42 de longitud total. b) ACI-01 contiene A β 1-16 flanqueado con un residuo de lisina pegilado en cada lado que porta DSPE que sirve como ancla liposomal en el otro extremo de la cadena PEG (a). Para ACI-24 (b), dos residuos terminales de lisina palmitoilados se unieron covalentemente a cada extremo de A β 1-15 para reconstituir y anclar en antígeno dentro del liposoma (a). c) Espectros CD de los dos antígenos reconstituidos en el liposoma. ACI-01 exhibe espectros que indican una conformación de proteína con enrollamiento aleatorio o no estructurada (señal negativa hasta 210 nm y que se acerca lentamente al eje cero hasta 260nm) mientras que los espectros de ACI-24 contienen una significativa proporción de estructura beta (señal positiva hasta 210 nm, luego cruza el eje cero y se vuelve a acercarse hasta 260 nm). Para el análisis del espectro CD se reconstituyeron muestras de beta-amiloide para análisis (ACI-01 y ACI-24) en el liposoma y se sometieron a ultrasonida mediante un sonicador de sonda con una concentración de péptido de 0,9865 mg/ml (1 ml en PBS). Los espectros CD se registraron en un Dichrograph (JASCO J-810) con una cubeta de celda de cuarzo de 0,1 cm de longitud de vía óptica. La ventana del espectro era de 190-260 nm con una velocidad de escaneo de 20 nm/min a 25°C y los datos crudos se expresaron en elipticidad en unidades θ (mdeg).

Figura 1b: La región espectral ^1H que abarca los protones amida del péptido y las cadenas laterales aromáticas de los espectros RMN de ángulo de spin mágico de A. la vacuna ACI-01, B. la vacuna ACI-24, C. 1 mM ACI-01, D. 1 mM ACI-24 y E. 4 mM de péptido Ab1-15 en buffer PBS, pH 7,2.

Figura1c: Espectro unidimensional ^1H RMN desde 9 a 5,5 ppm de beta amiloide pegilado (negro) y palmitoilado 1-15 (azul). Los péptidos se sintetizaron, se ligaron covalentemente a ácido palmítico o a PEG, respectivamente y se reconstituyeron en PBS. Para el análisis en RMN, las muestras se centrifugaron y se registró un espectro total de 9 a 0,2 ppm.

Figura 2: Análisis de títulos específicos de amiloide en el suero de ratones APPxPS1 inmunizados con antígenos pegilado (ACI-01) o palmitoilado (ACI-24) en liposomas, comparado con ratones inmunizados con liposomas vacíos (control). a) La inmunización con ACI-24 generó niveles elevados de anticuerpos IgG específicos de amiloide (a, izquierda) solo después de dos inmunizaciones y tres semanas después de la primera y alcanzaron un máximo después de 5 semanas. Mientras que la inmunización con ACI-01 generó niveles elevados de anticuerpos IgM específicos de amiloide (a, derecha) con un máximo después de 7 semanas pero solo niveles bajos de IgG, comparado con ACI-24 (a, izquierda, $p < 0,5$).

Depósitos:

Las siguientes líneas celulares de hibridoma se depositaron en "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, bajo las provisiones del tratado de Budapest:

Designación de la línea de hibridoma	designación de anticuerpo	Fecha de depósito	N.º de acceso
EJ 7H3	mACI-24-Ab4	08 de diciembre 2005	DSM ACC2756

Referencias

- Alving et al., *Infect. Immun.* 60:2438-2444, 1992
- Bork K, *Arch Intern Med.* 2001 Mar 12;161(5):714-8
- Caliezi C, *Crit Care Med.* 2002 Aug;30(8):1722-8.
- De Serres J, *Transfus Apher Sci.* 2003 Dec;29(3):247-54
- Doorn MB van, , *Allergy Clin Immunol.* 2005 Oct;116(4):876-83. Epub 2005 Aug 8
- Harlow y Lane (Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988)
- FILAKTAKIDOU, K.C., LEHN, J.-M. GREFERATH, R. NICOLAU, C., "Inositol triphosphate: a new membrane permeant allosteric effector of haemoglobin", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15, 1605-1608, 2005.
- Hodgson et al., *Bio/Technology*, 9:421 (1991)
- Khaw, B. A. et al. *J. Nucl. Med.* 23:1011-1019 (1982)
- Kohler y Milstein (*Nature* 256: 495-497 (1975)
- Moechars, D., Dewachter, I., Lorent, K., Reverse, D., Baekelandt, V., Naidu, A., Tesseur, I., Spittaels, K., Haute, C.V., Checler, F., Godaux, E., Cordell, B. y Van Leuven, F.: 1999, *J. Biol. Chem.* 274, 6483-6492.
- Moechars, D., Lorent, K., De Strooper, B., Dewachter, I., & Van Leuven, F. Expression in brain of amyloid precursor protein mutated in the alpha-secretase site causes disturbed behavior, neuronal degeneration and premature death in transgenic mice. *EMBO J.* 15, 1265-1274 (1996).
- Hill A, *Blood.* 2005 Oct 1;106(7):2559-65. Epub 2005 Jun 28.
- Hillmen P, *N Engl J Med.* 2004 Feb 5;350(6):552-9.
- Li JS, *Am Heart J.* 2004 Jan;147(1):173-80
- Moechars, D., Lorent, K., De Strooper, B., Dewachter, I. y Van Leuven, F.: 1996, *EMBO J.* 15, 1265-1274.

- Nicolau, C., Greferath, R., Balaban, T. S., Lazarte, J. E., y Hopkins, R. J. (2002). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2332-2337.
- Piotto, M., Saudek, V., & Sklenar, V. Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J. Biomol. NMR* 2, 661-665 (1992).
- Piotto, M., Elbayed, K., Wieruszeski, J. M., & Lippens, G. Practical aspects of shimming a high resolution magic angle spinning probe. *J. Magn Reson.* 173, 84-89 (2005).
- Queen et al., *Proc. Natl Acad Sci USA*, 86:10029-10032 (1989)
- Rampon, C., Tang, Y. P., Goodhouse, J., Shimizu, E., Kyin, M. y Tsien, J. Z.: 2000, *Nat. Neurosci.* 3, 238-244.
- Rzepecki et al., 2004
- Rousseaux et al, *Methods Enzymology*, 121:663-69, Academic Press, 1986
- Tang, Y. P., Shimizu, E., Dube, G. R., Rampon, C., Kerchner, G. A., Zhuo, M., Liu, G. y Tsien, J. Z.: 1999, *Nature* 401, 63-69.
- B Teisseire, C Ropars, M C Villeréal, y C Nicolau, « Long-term physiological effects of enhanced O₂ release by inositol hexaphosphate-loaded erythrocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 October; 84(19): 6894-6898
- Teisseire B, Ropars C, Villeréal MC, Nicolau C. Long-term physiological effects of enhanced O₂ release by inositol hexaphosphate-loaded erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Oct; 84(19) 6894-6898.
- Udenfriend, S. et al. Fluorescamina: a reagent for assay of amino acids, peptides, proteins, and primary amines in the picomole range. *Science* 178, 871-872 (1972).
- Wagner et al (2002) *Journal of Liposoma Research* Vol 12(3), pp 259 – 270
- Waytes AT, *N Engl J Med.* 1996 Jun 20; 334(25):1630-4
- US-P 6843942
- EPA 1337322

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> antígeno peptídico A β 1-16

<400> 2

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys 16

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> antígeno peptídico A β 1-18(Δ 14)

<400> 3

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His Gln Lys 15

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> antígeno peptídico A β 4-11

<400> 4

Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu 8

<210> 5

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> antígeno peptídico A β 22-35

<400> 5

Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu 13

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> antígeno peptídico A β 29-40

<400> 6

Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val 12

REIVINDICACIONES

Habiendo así especialmente descrito y determinado la naturaleza de la presente invención y la forma como la misma ha de ser llevada a la práctica, se declara reivindicar como de propiedad y derecho exclusivo:

1. Un método para producir una composición de vacuna terapéutica que comprende usar un fragmento peptídico antigénico A β que consiste en una extensión única o repetida de entre 13 y 15 residuos contiguos de aminoácidos de la parte N terminal del péptido A β para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada a amiloide.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la extensión contigua de 13 a 15 residuos de aminoácidos se obtiene a partir del fragmento N terminal 1-16 o 1-17 del péptido A β .
3. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, en donde la composición de vacuna terapéutica comprende un fragmento peptídico A β que consiste en una extensión única o repetida de entre 13 y 15 residuos contiguos de aminoácidos de la parte N terminal del péptido A β seleccionado del grupo que consiste en los residuos 1-15, 1-14, y 1-13.
4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la composición de vacuna terapéutica comprende un fragmento único o repetido de péptido A β seleccionado del grupo que consiste en antígeno peptídico A β ₁₋₁₅ dado en SEQ ID NO: 1 y A β _{1-16(Δ 14)} dado en SEQ ID NO: 3.
5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el antígeno peptídico A β está modificado de manera tal que es capaz de mantener y estabilizar una conformación definida caracterizada por una proporción equilibrada de porciones α -helicoidal y/o lámina β y/o arrollamientos aleatorios.

6. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el antígeno peptídico A β se presenta reconstituido en un portador tal como, por ejemplo, una vesícula, un cuerpo particulado o molécula.
7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el antígeno peptídico A β se presenta reconstituido en un liposoma.
8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el antígeno peptídico A β es modificado por un residuo lipofílico o hidrofóbico que facilita la inserción en la bicapa lipídica del liposoma portador/coadyuvante.
9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la dimensión del residuo lipofílico o hidrofóbico en combinación con la carga neta global del péptido antigénico y del portador/coadyuvante al que se adosa el péptido, se incorpora o es reconstituido es tal que el péptido antigénico se expone, estabiliza y presenta en una conformación con alta actividad biológica, que permite al sistema inmune del organismo blanco interactuar libremente con los determinantes antigénicos contenidos en la construcción antigénica en su conformación expuesta, estabilizada y con alta actividad biológica, lo cual conduce a una fuerte respuesta inmune.
10. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, en donde el residuo lipofílico o hidrofóbico es un ácido graso, un triglicérido o un fosfolípido.
11. Un método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el residuo lipofílico o hidrofóbico es un ácido graso, particularmente un ácido graso con un esqueleto carbonado de al menos 10 átomos de carbono.
12. Un método de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el residuo hidrofóbico es ácido palmítico.
13. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, en donde la preparación de liposoma contiene un coadyuvante.

14. Un método de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el coadyuvante es lípido A, particularmente lípido A detoxificado, tales como monofosforil o difosforil-lípido A o alúmina.

15. Un método para producir una composición de vacuna terapéutica que comprende usar un péptido antigénico inmunogénico para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada a amiloide, en donde el antígeno peptídico β -amiloide es un péptido antígeno palmitoilado modificado $A\beta_{1-15}$ por adosar covalentemente residuos de aminoácidos palmitoilados, particularmente entre 2 y 4, más particularmente 4 residuos, reconstituidos en un liposoma.

16. Un método de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el péptido antigénico $A\beta_{1-15}$ es modificado por dos residuos palmitoilado de aminoácidos adosado covalentemente al terminal N y C del péptido, respectivamente.

17. Un método de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el péptido antigénico $A\beta_{1-15}$ es modificado por 4 residuos de aminoácidos palmitoilados, dos de los cuales se adosan covalentemente a los terminales N y C del péptido, respectivamente.

18. Un método de acuerdo con la reivindicación 15, en donde dos o más moléculas de péptido antigénico palmitoilado $A\beta_{1-15}$ modificado por residuos palmitoilos adosados covalentemente, particularmente uno o dos residuos, en cada extremo del péptido están reconstituidos en un único liposoma.

19. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en donde la enfermedad o condición asociada a amiloide es una seleccionada del grupo que consiste en enfermedades incluyendo, sin limitaciones, trastornos neurológicos tales como enfermedad de Alzheimer (AD), incluso enfermedades o condiciones caracterizados por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), demencia de cuerpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo

Dutch); el complejo de demencia de Parkinson de Guam; además de otras enfermedades basadas sobre o asociadas con proteínas símil amiloide tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeld Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes de inicio en el adulto; amiloidosis cardiaca senil; tumores endocrinos, y otros, incluso degeneración macular.

20. Un método de acuerdo con la reivindicación 19, en donde la enfermedad o condición asociada a amiloide es enfermedad de Alzheimer.

21. Un método de acuerdo con la reivindicación 19, en donde la condición asociada a amiloide se caracteriza por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva en un animal, particularmente un mamífero o un humano.

22. Un método de acuerdo con la reivindicación 21, en donde el tratamiento de un animal, particularmente un mamífero o un humano, que padece una condición asociada con amiloide caracterizada por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva conduce a un aumento de la retención de la capacidad de memoria cognitiva.

23. Un método de acuerdo con la reivindicación 22, en donde el tratamiento de un animal, particularmente un mamífero o un humano, que padece una condición asociada con amiloide caracterizada por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva conduce al restablecimiento completo de capacidad de memoria cognitiva.

24. Una construcción antigénica que comprende un fragmento peptídico antigénico A β que consiste en una extensión única o repetida de entre 13 y 15 residuos contiguos de aminoácidos de la parte N terminal del péptido A β para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada a amiloide.

25. Una construcción antigénica de acuerdo con la reivindicación 24, en donde la extensión contigua de 13 a 15 residuos de aminoácidos se obtiene del fragmento N terminal 1-16 o 1-17 del péptido A β .

26. Una construcción antigénica de acuerdo con la reivindicación 24, en donde la composición de vacuna terapéutica comprende un fragmento peptídico A β que consiste en una extensión única o repetida de entre 13 y 15 residuos contiguos de aminoácidos de la parte N terminal del péptido A β seleccionado del grupo que consiste en residuos 1-15, 1-14, y 1-13.

27. Una construcción antigénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26, en donde la composición de vacuna terapéutica comprende un fragmento único o repetido de péptido A β seleccionado del grupo que consiste en antígeno peptídico A β ₁₋₁₅ dados en SEQ ID NO: 1 y A β _{1-16(Δ 14)} dados en SEQ ID NO: 3.

28. Una construcción antigénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24 a 27, en donde el antígeno peptídico A β está modificado de manera tal que es capaz de mantener y estabilizar una conformación definida caracterizada por una proporción equilibrada de las porciones α -helicoidal y/o de lámina β y/o de arrollamientos aleatorios.

29. Una construcción antigénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24 a 28, en donde el antígeno peptídico A β se presenta adosado o reconstituido en un portador/coadyuvante tal como, por ejemplo, una vesícula, un cuerpo particulado o molécula.

30. Una construcción antigénica de acuerdo con la reivindicación 29, en donde el antígeno peptídico A β se presenta reconstituido en un liposoma.

31. Una construcción antigénica de acuerdo con la reivindicación 30, en donde el antígeno peptídico A β es modificado por un resto lipofílico o hidrofóbico que facilita la inserción en la bicapa lipídica del liposoma portador.

32. Una construcción antigénica de acuerdo con la reivindicación 30, en donde la dimensión del resto lipofílico o hidrofóbico en combinación con la carga neta global del péptido antigénico y del portador al que el péptido se adosa, incorpora o reconstituye de tal manera que el péptido antigénico es expuesto al solvente y presentado en una conformación que es biológicamente activa pues permite al sistema inmune del organismo blanco interactuar libremente con los determinantes antigénicos contenidos en la construcción antigénica, lo cual conduce a una fuerte respuesta inmunogénica y en consecuencia, a un elevado título de anticuerpo en el organismo blanco.

33. Una construcción antigénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 30 a 32, en donde el resto lipofílico o hidrofóbico es un ácido graso, un triglicérido o un fosfolípido.

34. Una construcción antigénica de acuerdo con la reivindicación 33, en donde el resto lipofílico o hidrofóbico es un ácido graso, particularmente un ácido graso con un esqueleto carbonado de al menos 10 átomos de carbono.

35. Una construcción antigénica de acuerdo con la reivindicación 34, en donde el resto hidrofóbico es ácido palmítico.

36. Una construcción antigénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 30 a 35, en donde la preparación de liposoma contiene un coadyuvante o un inmunomodulador.

37. Una construcción antigénica de acuerdo con la reivindicación 36, en donde el inmunomodulador es lípido A, particularmente lípido A detoxificado tal como monofosforil o difosforil lípido A o alúmina.

38. Una composición de vacuna que comprende un antígeno peptídico A β ₁₋₁₅ para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada a amiloide.

39. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 38, en donde el antígeno peptídico A β ₁₋₁₅ es modificado de manera tal que es capaz de

mantener y estabilizar una conformación definida caracterizada por una proporción equilibrada de porciones de arrollamiento aleatorio, hélice α y lámina β .

40. Una composición de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 38 ó 39, en donde el antígeno peptídico $A\beta_{1-15}$ se presenta adosado a un portador tal como, por ejemplo, una vesícula, un cuerpo particulado o molécula.

41. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 40, en donde el antígeno peptídico $A\beta_{1-15}$ se presenta reconstituido en un liposoma.

42. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 41, en donde el antígeno peptídico $A\beta_{1-15}$ es modificado por un resto lipofílico o hidrofóbico que facilita la inserción en la bicapa lipídica hidrofóbica del liposoma portador/coadyuvante.

43. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 42, en donde la dimensión del resto lipofílico o hidrofóbico provee un ancla para el péptido en la bicapa del liposoma en combinación con la carga neta global del péptido antigénico y del portador al cual el péptido se adosa, incorpora o reconstituye de manera tal que el péptido antigénico es expuesto al solvente y presenta una conformación biológicamente activa pues permite que el sistema inmune del organismo blanco interactúe libremente con los determinantes antigénicos contenidos en la construcción antigénica, lo cual conduce a una fuerte respuesta inmunogénica y, en consecuencia, un elevado título de anticuerpos en el organismo blanco.

44. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 43, en donde el resto lipofílico o hidrofóbico es un ácido graso, triglicérido o fosfolípido.

45. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 44, en donde el esqueleto carbonado de ácidos grasos tiene al menos 10 átomos de carbono.

46. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 45, en donde el resto hidrofóbico es ácido palmítico.
47. Una composición de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 41 a 46, en donde la preparación de liposoma contiene un coadyuvante y/o un inmunomodulador.
48. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 47, en donde el inmunomodulador es lípido A detoxificado, tal como monofosforil o difosforil lípido A.
49. Una composición de vacuna que comprende un péptido antigénico inmunogénico para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada a amiloide, en donde el antígeno peptídico β -amiloide es un antígeno peptídico palmitoilado $A\beta_{1-15}$ modificado por residuos palmitoilos adosados covalentemente, particularmente entre 2 y 4, más particularmente 4 residuos, en cada extremo del péptido reconstituido en un liposoma.
50. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 49, en donde dos o más moléculas de antígeno peptídico palmitoilado $A\beta_{1-15}$ modificado por residuos palmitoilos adosados covalentemente en cada extremo del péptido están reconstituidos en un único liposoma.
51. Una composición de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, la administración a un animal, particularmente un mamífero, pero especialmente un humano, da por resultado sobre todo la generación de anticuerpos de subtipos no inflamatorios.
52. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 51, en donde dichos anticuerpos son de subtipo no inflamatorio Th2, particularmente de isotipo IgG1 e IgG2b.
53. Una composición de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la administración a un animal,

particularmente un mamífero, pero especialmente un humano, da por resultado sobre todo la generación de anticuerpos de la subclase de IgG independiente de células T.

54. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 53, en donde dichos anticuerpos son de isotipo IgG3.

55. Una composición de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, la administración a un animal, particularmente un mamífero, pero especialmente un humano no conduce a un significativo aumento de marcadores de inflamación en el cerebro.

56. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 53, en donde dichos marcadores son seleccionados del grupo que consiste en IL-1 β , IL-6, IFN- γ y TNF α .

57. Una composición de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la administración a un animal, particularmente un mamífero, pero especialmente un humano conduce a una significativa disminución de A β 1-40 y A β 1-42 insoluble, relacionada con placa en el cerebro.

58. Una composición de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la administración a un animal, particularmente un mamífero, pero especialmente un humano conduce a significativa reducción del nivel de A β 1-42 soluble en el cerebro.

59. Una composición de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada a amiloide en un animal, particularmente un mamífero o un humano, que padece dicha condición.

60. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 59, en donde la enfermedad o condición asociada a amiloide es una seleccionada del

grupo que consiste en enfermedades incluyendo, sin limitaciones, trastornos neurológicos tales como enfermedad de Alzheimer (AD), incluso enfermedades o condiciones caracterizadas por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), demencia de cuerpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo Dutch); el complejo de demencia de Parkinson de Guam; además de otras enfermedades basadas sobre o asociadas con proteínas símil amiloide tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes de inicio en el adulto; amiloidosis cardíaca senil; tumores endocrinos, y otros, incluso degeneración macular.

61. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 60, en donde la enfermedad o condición asociada a amiloide es enfermedad de Alzheimer.

62. Una composición de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la administración a un animal, particularmente un mamífero o un humano, que padece una condición asociada con amiloide caracterizada por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva conduce a un aumento en la retención de la capacidad de memoria cognitiva.

63. Una composición de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la administración a un animal, particularmente un mamífero, pero especialmente un humano, que padece una condición asociada con amiloide caracterizada por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva conduce al restablecimiento completo de la capacidad de memoria cognitiva.

64. Una composición de vacuna que comprenden un antígeno peptídico A β para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada a amiloide junto con un inhibidor del sistema del complemento.

65. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 64, en donde el antígeno peptídico A β es un antígeno peptídico A β_{1-15} .

66. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 65 que comprende un péptido antigénico inmunogénico para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada a amiloide, en donde el antígeno peptídico β -amiloide es un antígeno peptídico palmitoilado A β_{1-15} modificado por residuos palmitoilos adosados covalentemente, particularmente entre 2 y 4, más particularmente 4 residuos, en cada extremo del péptido reconstituido en un liposoma junto con un inhibidor del sistema del complemento.

67. Una composición de vacuna que comprende un antígeno peptídico A β para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada a amiloide junto con un compuesto, particularmente un efector alostérico de hemoglobina, que desencadena una liberación aumentada y regulada de oxígeno a los tejidos.

68. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 67, en donde el antígeno peptídico A β es un antígeno peptídico A β_{1-15} .

69. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 68 que comprende un péptido antigénico inmunogénico para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada a amiloide, en donde el antígeno peptídico β -amiloide es un antígeno peptídico palmitoilado A β_{1-15} modificado por residuos palmitoilos adosados covalentemente, particularmente entre 2 y 4, más particularmente 4 residuos, en cada extremo del péptido reconstituido en un liposoma junto con un compuesto, particularmente un efector alostérico de hemoglobina, que desencadena una liberación aumentada y regulada de oxígeno a los tejidos.

70. Una composición de vacuna que comprende un antígeno peptídico A β para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada a amiloide junto con un inhibidor del sistema del complemento y un compuesto, particularmente un efector alostérico de hemoglobina, que desencadena una liberación aumentada y regulada de oxígeno a los tejidos.

71. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 70, en donde el antígeno peptídico A β es un antígeno peptídico A β_{1-15} .

72. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 71 que comprende un péptido antigénico inmunogénico para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada a amiloide, en donde el antígeno peptídico β -amiloide es un antígeno peptídico palmitoilado A β_{1-15} modificado por residuos palmitoilo adosados covalentemente, particularmente entre 2 y 4, más particularmente 4 residuos, en cada extremo del péptido reconstituido en un liposoma junto con un inhibidor del sistema del complemento y un compuesto que modula la afinidad de O₂/hemoglobina, particularmente un efector alostérico de hemoglobina, que desencadena una liberación aumentada y regulada de oxígeno a los tejidos.

73. Una composición de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 64 a 66 y 70 a 72, en donde el inhibidor de complemento es un compuesto seleccionado del grupo que consiste en receptor 1 de complemento soluble humano, proteína anti-C5 de complemento humano tales como, por ejemplo, un anticuerpo humanizado anti-C5 monoclonal o un fragmento de cadena sencilla de un anticuerpo humanizado monoclonal, inhibidor N de C1-esterasa e inhibidor C1 natural humano.

74. Una composición de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 67 a 69 y 70 a 72, en donde el compuesto que modula la afinidad de O₂/hemoglobina es un compuesto seleccionado del grupo que consiste en un

fármaco antilipemiente tal como, por ejemplo, ácido clofibrato o bezafibrato incluso los derivados bezafibrato LR16 y L35, derivados de urea tales como, por ejemplo, ácido [2-[4[[[arilamino)carbonil]-amino]fenoxi]-2-metilpropiónico, un efector alostérico de hemoglobina tal como, por ejemplo, 2,3-difosfoglicerato (DPG), hexakisfosfato de inositol (IHP), y fosfato de piridoxal.

75. Una composición de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 67 a 69 y 70 a 72, en donde el compuesto que modula la afinidad de O₂/hemoglobina es un compuesto que comprenden un ligando aniónico para un sitio alostérico de hemoglobina, en donde el ligando aniónico comprende un anillo interno de pirofosfato, opcionalmente junto con un catión no tóxico.

76. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 75, en donde el compuesto que modula la afinidad de O₂/hemoglobina es un derivado de hexafosfato de inositol (IHP) que comprende al menos un anillo interno de pirofosfato, opcionalmente junto con un catión no tóxico.

77. Una composición de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 64 a 75, en donde el antígeno peptídico β -amiloide comprende una construcción antigénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24 a 37.

78. Uso de un fragmento de antígeno peptídico A β que consiste en una extensión única o repetida de entre 13 y 15 residuos contiguos de aminoácidos de la parte N terminal del péptido A β para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada a amiloide.

79. Uso de un antígeno peptídico A β tal como se describe de acuerdo con las reivindicaciones 2 a 23 o una construcción antigénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24 a 37 para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada a amiloide.

80. Uso de un antígeno peptídico A β de acuerdo con la reivindicación 79, en donde la enfermedad o condición asociada a amiloide es una seleccionado del grupo que consiste en enfermedades incluyendo, sin limitaciones, trastornos neurológicos tales como enfermedad de Alzheimer (AD)_h incluso enfermedades o condiciones caracterizadas por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), demencia de cuerpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo Dutch); el complejo de demencia de Parkinson de Guam; además de otras enfermedades basadas sobre o asociadas con proteínas simil amiloide tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeld Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes de inicio en el adulto; amiloidosis cardiaca senil; tumores endocrinos, y otros, incluso degeneración macular.

81. Uso de un antígeno peptídico A β de acuerdo con la reivindicación 80, en donde la enfermedad o condición asociada a amiloide es enfermedad de Alzheimer.

82. Uso de un antígeno peptídico A β de acuerdo con la reivindicación 80, en donde la condición asociada a amiloide se caracteriza por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tal como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI) en un animal, particularmente un mamífero o un humano.

83. Uso de un antígeno peptídico A β de acuerdo con la reivindicación 80, en donde tratamiento de un animal, particularmente un mamífero o un humano, que padece una condición asociada con amiloide caracterizada por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva conduce a un aumento de la retención de la capacidad de memoria cognitiva.

84. Uso de un antígeno peptídico A β de acuerdo con la reivindicación 80, en donde el tratamiento de un animal, particularmente un mamífero o un

humano, que padece una condición asociada con amiloide caracterizada por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva conduce al restablecimiento completo de capacidad de memoria cognitiva.

85. Un método para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada a amiloide que comprende administrar a un animal, particularmente a un mamífero, pero especialmente un humano, que padece dicha enfermedad o condición una composición de vacuna terapéutica tal como se reivindica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 38 a 77.

86. Un método de acuerdo con la reivindicación 85, en donde la composición de vacuna comprende un antígeno peptídico $A\beta_{1-15}$, particularmente un antígeno peptídico palmitoilado $A\beta_{1-15}$.

87. Un método de acuerdo con la reivindicación 85, en donde la administración de dicha composición de vacuna da por resultado sobre todo la generación de anticuerpos de subtipos no inflamatorios.

88. Un método de acuerdo con la reivindicación 87, en donde dichos anticuerpos son de subtipo Th2 no inflamatorio, particularmente de isotipo IgG1 e IgG2b.

89. Un método de acuerdo con la reivindicación 85, en donde la administración de dicha composición de vacuna da por resultado sobre todo la generación de anticuerpos de la subclase de IgG independiente de células T.

90. Un método de acuerdo con la reivindicación 89, en donde dichos anticuerpos son de isotipo IgG3.

91. Un método de acuerdo con la reivindicación 85, que no conduce a un significativo aumento de los marcadores de inflamación en el cerebro.

92. Un método de acuerdo con la reivindicación 91, en donde dichos marcadores son seleccionados del grupo que consiste en IL-1 β , IL-6, IFN- γ y TNF α .

93. Un método de acuerdo con la reivindicación 85, en donde la administración de dicha composición de vacuna conduce a un significativo descenso de A β 1-40 y A β 1-42 insoluble, relacionado con placa en el cerebro.

94. Un método de acuerdo con la reivindicación 85, en donde la administración de dicha composición de vacuna conduce a significativa reducción del nivel de A β 1-42 soluble en el cerebro.

95. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 85 a 94, en donde la enfermedad o condición asociada a amiloide es una seleccionada del grupo que consiste en enfermedades incluyendo, sin limitaciones, trastornos neurológicos tales como enfermedad de Alzheimer (AD), incluso enfermedades o condiciones caracterizados por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), demencia de cuerpo de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo Dutch); el complejo de demencia de Parkinson de Guam; además de otras enfermedades basadas sobre o asociadas con proteínas simil amiloide tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeld Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes de inicio en el adulto; amiloidosis cardíaca senil; tumores endocrinos, y otros, incluso degeneración macular.

96. Un método de acuerdo con la reivindicación 95, en donde la enfermedad o condición asociada a amiloide es enfermedad de Alzheimer.

97. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 85 a 94, en donde la administración de dicha composición de vacuna a un animal, particularmente un mamífero o un humano, que padece una condición asociada con amiloide caracterizada por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva conduce a un aumento de la retención de la capacidad de memoria cognitiva.

98. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 85 a 94, en donde la administración de dicha composición de vacuna a un animal, particularmente un mamífero o un humano, que padece una condición asociada con amiloide caracterizada por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva conduce al restablecimiento completo de la capacidad de memoria cognitiva.

99. Un método para aumentar significativamente la retención o la capacidad de memoria cognitiva de un mamífero, por inmunización con una composición de vacuna terapéutica tal como se reivindica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 38 a 77.

100. Un método de acuerdo con la reivindicación 99, en donde la composición de vacuna comprende un antígeno peptídico $A\beta_{1-15}$, particularmente un antígeno peptídico palmitoilado $A\beta_{1-15}$.

101. Un método para inducir una respuesta inmune en un animal, particularmente un mamífero o un humano, que padece una condición asociada con amiloide caracterizada por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI) al administrar a dicho animal o humano una composición de vacuna terapéutica tal como se reivindica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 38 a 77 de manera tal que aumente la retención o la capacidad de memoria cognitiva del animal o humano tratado.

102. Un método para inducir una respuesta inmune en un animal, particularmente un mamífero o un humano, que padece una condición asociada con amiloide caracterizada por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI) al administrar a dicho animal o humano una composición de vacuna terapéutica que comprende un antígeno peptídico $A\beta_{1-15}$, particularmente un antígeno peptídico palmitoilado $A\beta_1$.

15 de manera tal que la capacidad de memoria cognitiva del animal o humano tratado se restablezca por completo.

103. Un método de acuerdo con la reivindicación 85, en donde una composición de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 64 - 77 se administra de manera tal que el inhibidor de complemento y la construcción antigénica se administran de manera concomitante, intermitente o secuencial.

104. Un método de acuerdo con la reivindicación 103, en donde el inhibidor de complemento se administra antes de la vacunación con la construcción antigénica, particularmente dentro de una ventana temporal que comienza hasta 20 horas antes de la vacunación y que termina inmediatamente antes de la vacunación.

105. Un método de acuerdo con la reivindicación 103, en donde el inhibidor de complemento se administra después de la vacunación con la construcción antigénica dentro de una ventana temporal que comienza inmediatamente después de la vacunación y termina 1 día después de la aplicación de la vacuna.

106. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 103 a 105, en donde la composición de vacuna comprende un antígeno peptídico $A\beta_{1-15}$, particularmente un antígeno peptídico palmitoilado $A\beta_{1-15}$.

107. Un método para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada a amiloide que comprende usar una composición de vacuna tal como se reivindica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 38 a 77.

108. Un método para producir un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada a amiloide que comprende usar un péptido antigénico inmunogénico, en donde el antígeno peptídico β -amiloide es un antígeno peptídico palmitoilado $A\beta_{1-15}$ modificado por residuos de aminoácidos

palmitoilados adosados covalentemente, particularmente entre 2 y 4, más particularmente cuatro residuos, reconstituidos en un liposoma.

109. Un anticuerpo o una mezcla de anticuerpos que se obtiene de un animal inmunizado con una composición de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 31 a 43.

110. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 50 caracterizado porque es un anticuerpo monoclonal o un derivado del mismo.

p.p.de : AC IMMUNE S.A.

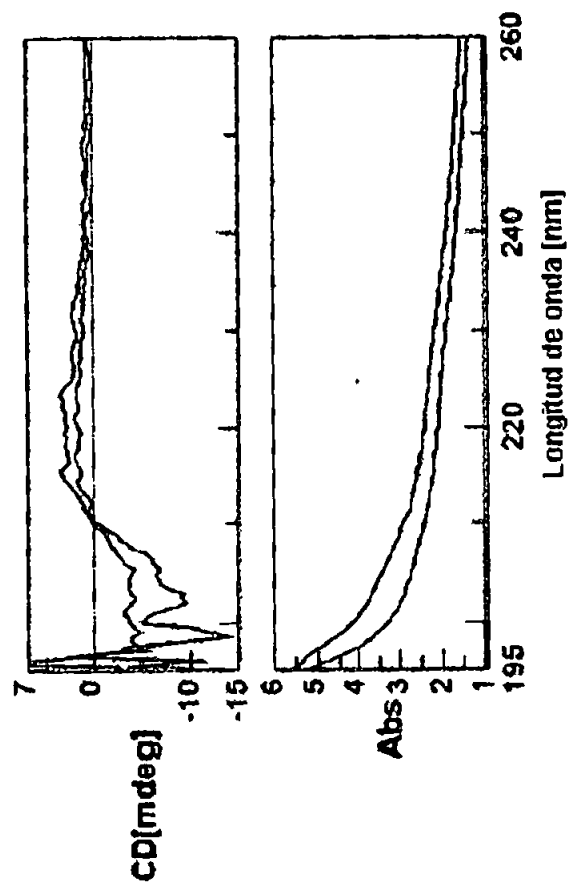


Fig 1 ab

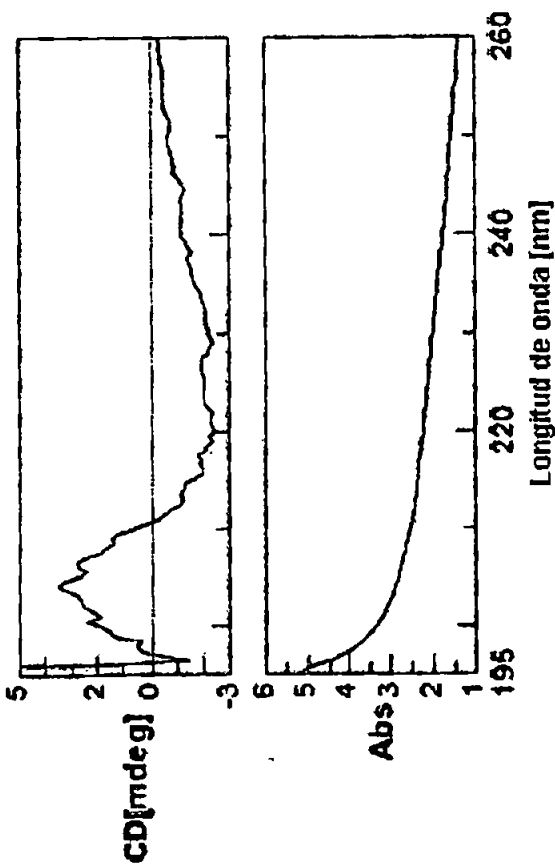
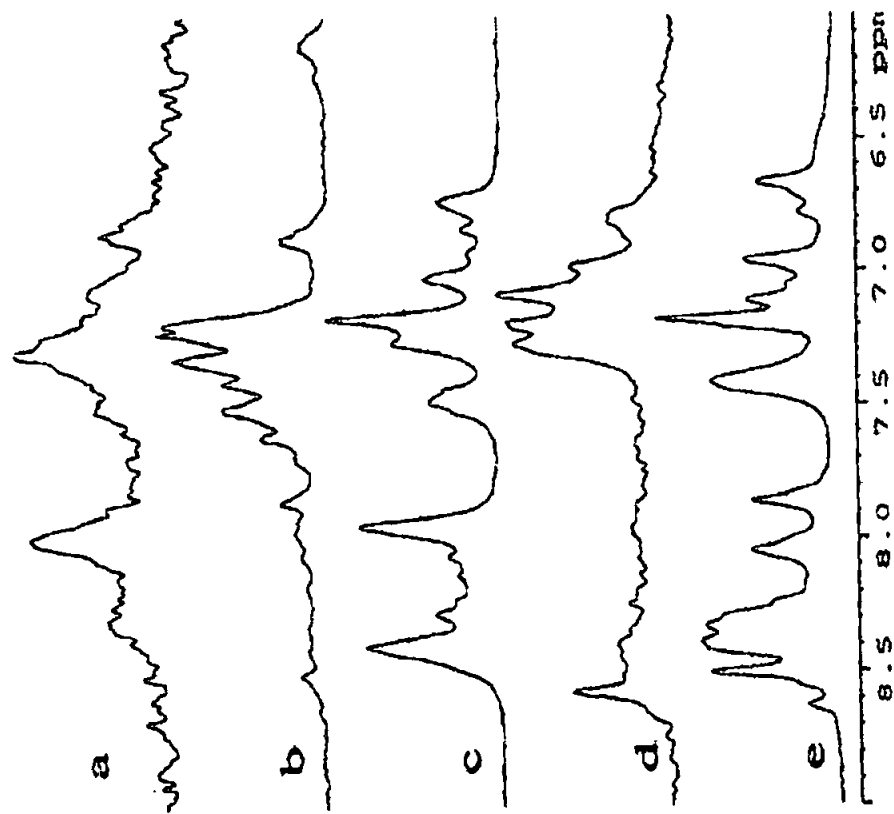
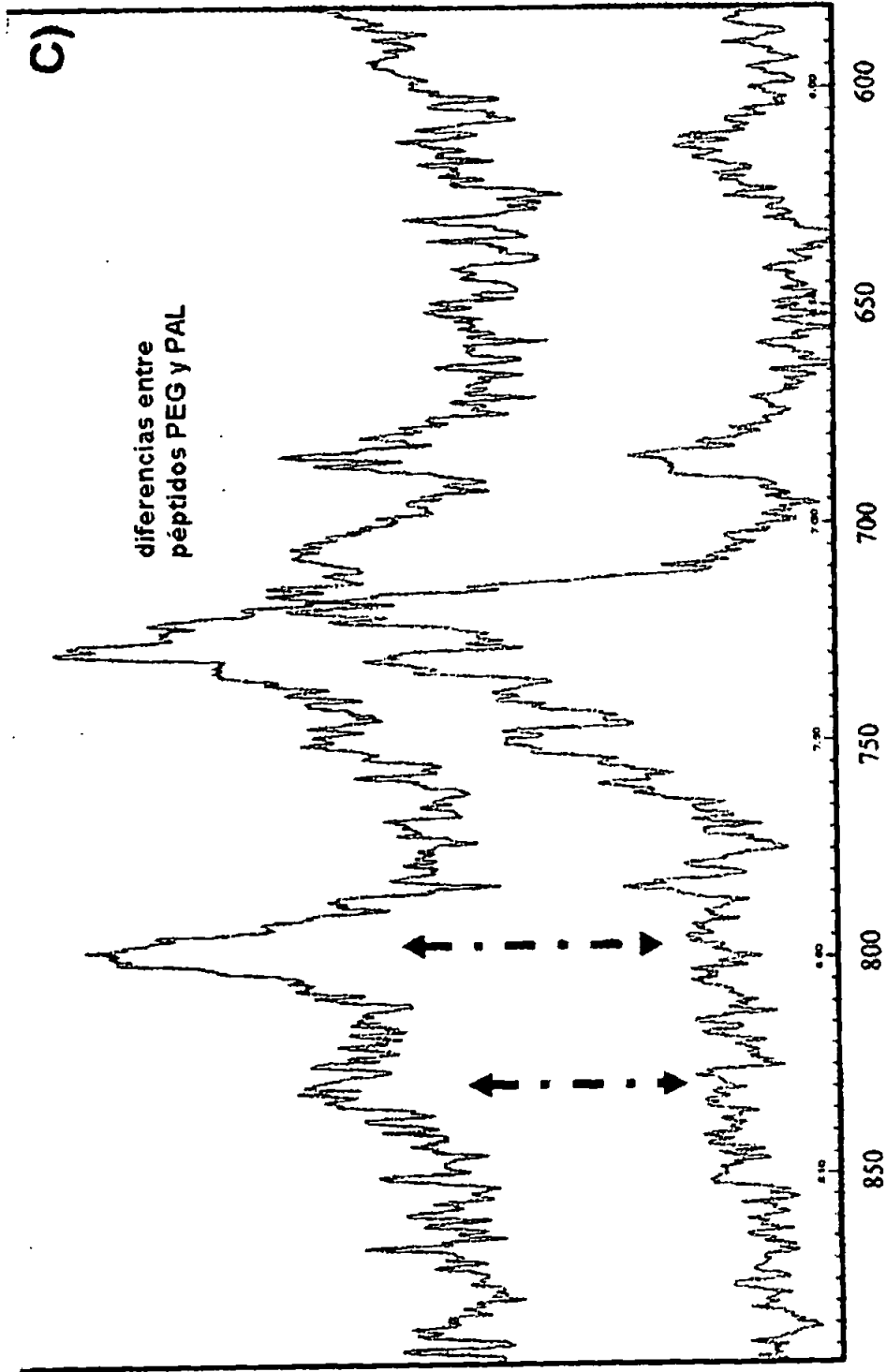
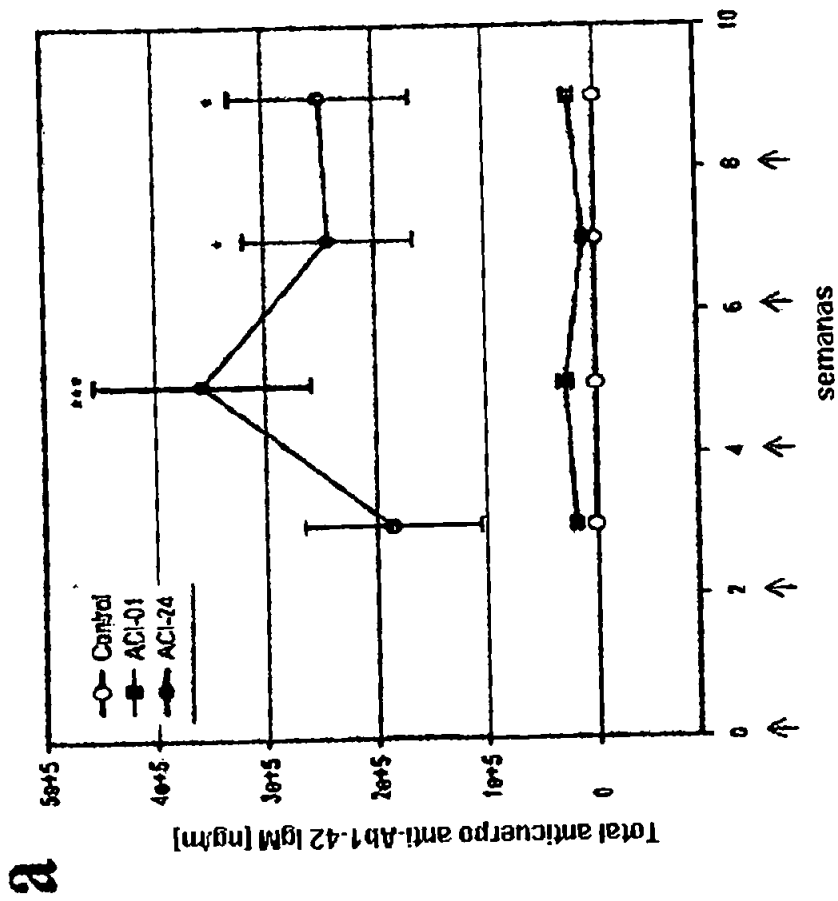
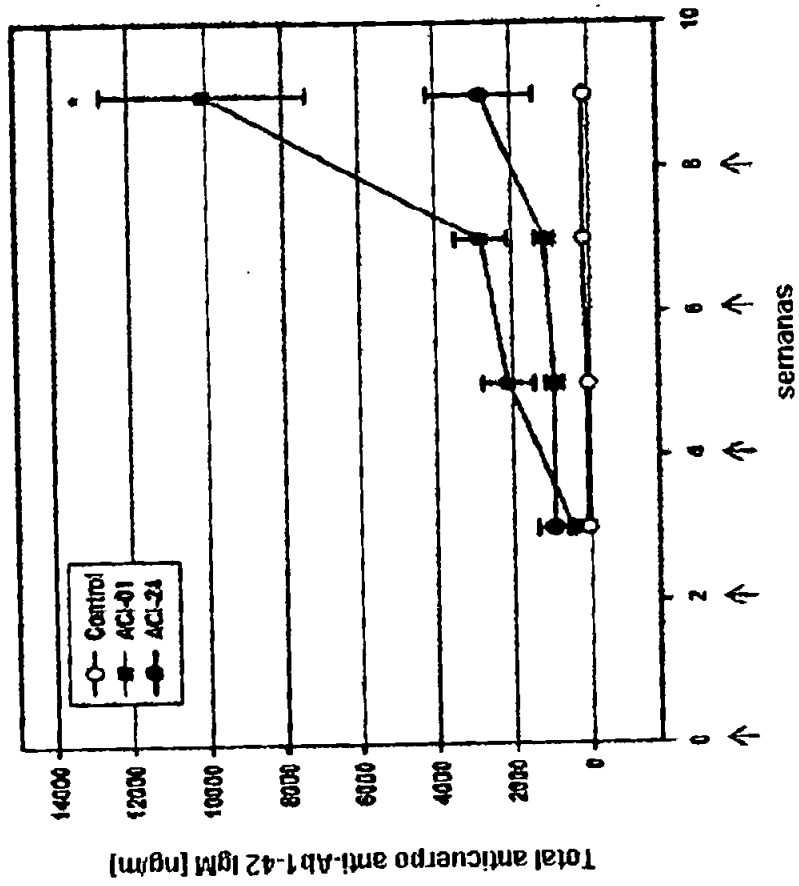


Fig 1 aa

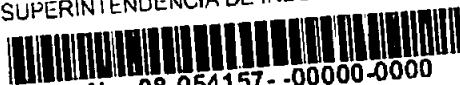
**FIG 1b**

**FIG 1c**



181

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-054157-00000-0000

Fecha: 2008-05-28 15:51:14 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 180

cio

SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION [x]

MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [x] 1
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [x] 1
- ◆ Descripción de la invención [x] 44
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes [x] 177
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [x] 2

COMPLETA [x]

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación 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 []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Edgar Novas
Firma Responsable

Fecha 28-05-08

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
Bogotá, D.C., Colombia

122

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
LLOREDA RICAURTE ALICIA

REFERENCIA	Radicación No.	8 54157
	Solicitud internacional	PCT/EP2006//011861
	Fecha inicio fase nacional	12/07/2008
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	9658

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. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, deben legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil.
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. El solicitante debe presentar un nuevo título que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el título relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente. (Regla 4.3 PCT, Art 26-27 D-486, Circular Única 5.2.9)

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.

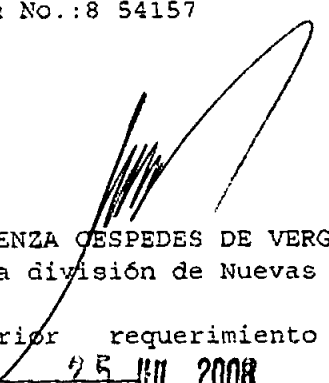
Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

Continúa en la página siguiente...

183

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación No.: 8 54157



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

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 25 JUL. 2008
jfernand