



Desarrollo de la Vacuna EuroEspes EB101

Introducción

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más frecuente de demencia en los países desarrollados, con una prevalencia de alrededor del 1% a la edad de 65 años y más del 25% en personas mayores de 85 años. Clínicamente, se caracteriza por un progresivo deterioro cognitivo, trastornos conductuales y deterioro funcional. La EA es un trastorno poligénico-complejo en el que podrían participar cientos de genes, distribuidos por el genoma humano, en estrecha cooperación con inductores ambientales, disfunción cerebrovascular y fenómenos epigenéticos [1].

Los principales sellos neuropatológicos de EA incluyen acumulación de péptido amiloide- β ($A\beta$); ovillos neurofibrilares (NFT) compuestos principalmente por filamentos helicoidales aparejados con proteínas tau hiperfosforiladas; pérdida neuronal y sináptica [2]; reducción del volumen cerebral total, con daños específicos de la corteza entorrinal del hipocampo [3]; neuroinflamación; gliosis; formación de radicales libres [4]; déficit de neurotransmisor y factores neurotróficos; deterioro metabólico [5]; y desregulación de proteosomas y chaperonas [6]. En la última década, numerosos estudios inmunoterapéuticos han demostrado que algunas

contra la enfermedad de Alzheimer

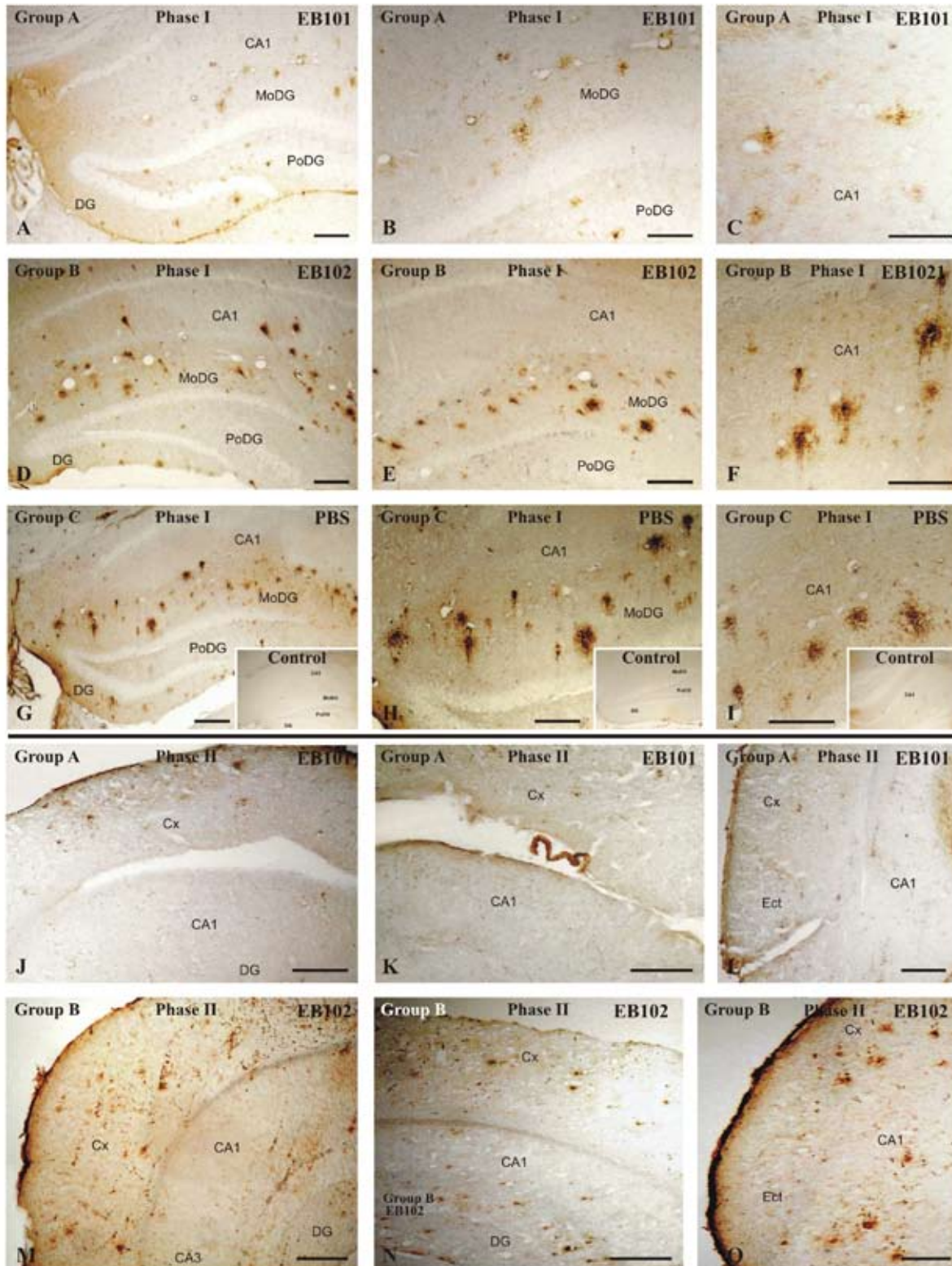
Iván Carrera¹, Ignacio Etcheverría¹, Lucía Fernández-Novoa¹, Valter Lombardi¹, Carmen Vigo³, Ramón Cacabelos^{1,2}

¹Departamento de Neurociencias, EuroEspes Biotecnología; ²Centro de Investigación Biomédica EuroEspes, Instituto de enfermedades del SNC y Medicina Genómica, Coruña, España; ³Atlas Pharmaceuticals, Sunnyvale, CA, EEUU.

formas de péptidos A β agregados desempeñan un papel importante en la patogenia de esta enfermedad neurodegenerativa [7-9]. Estos resultados llevaron a estrategias de inmunización terapéutica experimental y más tarde a los ensayos clínicos orientados a reducir el exceso perjudicial de A β cerebral. Ratones transgénicos que expresan las formas mutadas del gen de la proteína precursora amiloidea humana (hAPP) muestran un prematuro incremento en los niveles de proteínas A β y su acúmulo en forma de depósitos en la corteza cerebral y en el hipocampo [10-12], desarrollando características neuropatológicas similares a las observadas en

el cerebro de los pacientes con la enfermedad de Alzheimer [13]. Ratones transgénicos con la mutación en el gen de la presenilina-1 (PS1) también muestran un aumento en la generación de péptidos A β_{42} , potenciando su depósito en el cerebro a los 6 meses de edad [14]. En nuestros estudios, hemos utilizado ratones transgénicos con doble mutación, derivados de la co-expresión de los genes mutados de APP y PS1, ya que demuestran una aceleración en el proceso de acumulación de depósitos A β en el cerebro en comparación con los modelos animales con mutación simple [15-19]. Estos ratones transgénicos dobles se han utilizado »

Figura 1. Efecto de la vacuna EB101 en los depósitos beta-amiloide ($A\beta$) en cerebro de ratones B6C3F1/J. Imágenes comparativas de la inmunoreactividad frente a $A\beta$ en el hipocampo (A-K,M,N) y regiones corticales (L,O) del cerebro de ratones transgénicos inmunizados con la vacuna EB101 (Grupo A). Fase preventiva (Figuras A-I), antes de la formación de las placas de $A\beta$, y fase terapéutica (Figuras J-O), después de la neurodegeneración amiloidea. Se observa la notable reducción de placas $A\beta$ en las secciones cerebrales del grupo A en comparación a los demás grupos experimentales. Barra de calibrado: 100 μ m.





en numerosos estudios para investigar terapias emergentes con el fin de prevenir o tratar las características neuropatológicas de la enfermedad de Alzheimer.

La inmunoterapia basada en A β ha demostrado ser el más prometedor enfoque terapéutico [20-25]. Hay más de 10.000 pacientes actualmente implicados en tratamientos de inmunoterapia A β activa o pasiva, que hasta ahora muestran un cierto grado de éxito en la disminución de beta amiloide [26-30] y de déficits de memoria [9,31,32]. Sin embargo, el primer ensayo clínico en 2001 por Elan y Wyeth con inmunización activa, consistente en agregados peptídica sintéticos de A β_{42} con el adyuvante QS21, resultó en la muerte del 6% de los pacientes debido a una reacción meningoencefálica [26,33], probablemente provocada por una extrema respuesta autoinmune mediada por células-T [34,35]. Sorprendentemente, los pacientes con un tratamiento abreviado generaron niveles satisfactorios de anticuerpos anti-A β , una leve reducción de los niveles de proteína tau cerebroespinal y un declive cognitivo más lento [36,37]. Apoyándonos en todos estos estudios hemos desarrollado un novedoso inmunógeno diseñado para reducir la deposición de A β evitando la activación masiva de respuesta inmune medida por células T, que potencialmente causaron los efectos adversos observados en la vacuna de Wyeth/Elan. Nuestra vacuna pretende tener un efecto de larga duración, dirigido principalmente a la reducción de la carga A β en núcleos hipocámpicos, generando una producción de anticuerpos anti-A β robusta, previniendo o frenando el deterioro cognitivo y reduciendo la formación de los ovillos

neurofibrilares asociados. Esta nueva vacuna también favorece la regeneración de las neuronas dañadas y estimula una respuesta inmune de tipo Th2 antiinflamatoria. Todos estos requisitos se han logrado en esta vacuna mediante el diseño de un adyuvante compuesto por fosfolípidos naturales, probando ser seguro y eficaz en otro tipo de vacunas como la gripe, y con un fosfolípido añadido, S1P, biológicamente activo, fundamental para estimular una reacción antiinflamatoria y actuar como agente de regeneración neuronal. La inclusión del componente S1P fue crucial para el éxito de los resultados obtenidos, ya que

Figura 2. Cuantificación de placas A β en cerebro y efecto psicomotriz de ratones B6C3F1/J.

Gráfico A: Estimación media de placas A β en el hipocampo y regiones corticales presente en los tres grupos de tratamiento (EB101, EB102 y PBS). Véase la notable reducción de placas A β en el grupo A (EB101) en comparación con los demás grupos experimentales, grupo B (EB102) y grupo C (PBS), tanto en fase preventiva como terapéutica.

Gráfico B: Análisis cuantitativo del área ocupada por las placas A β en el hipocampo y regiones corticales de ratones transgénicos tratados con EB101, EB102 o PBS, siendo dichas áreas representadas por el número de píxeles en cada placa A β .

Gráfico C: Representación de los resultados psicomotores y comportamentales obtenidos del test Rota-rod en las fases preventiva y terapéutica. Se observa un índice de coordinación motora normal en los modelos vacunados con EB101 a diferencia de los demás grupos experimentales.

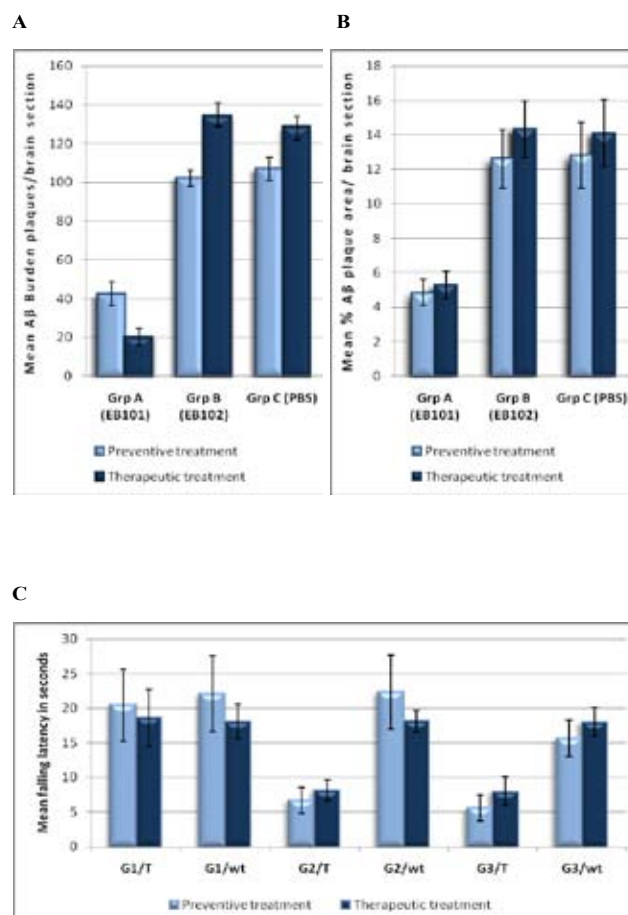
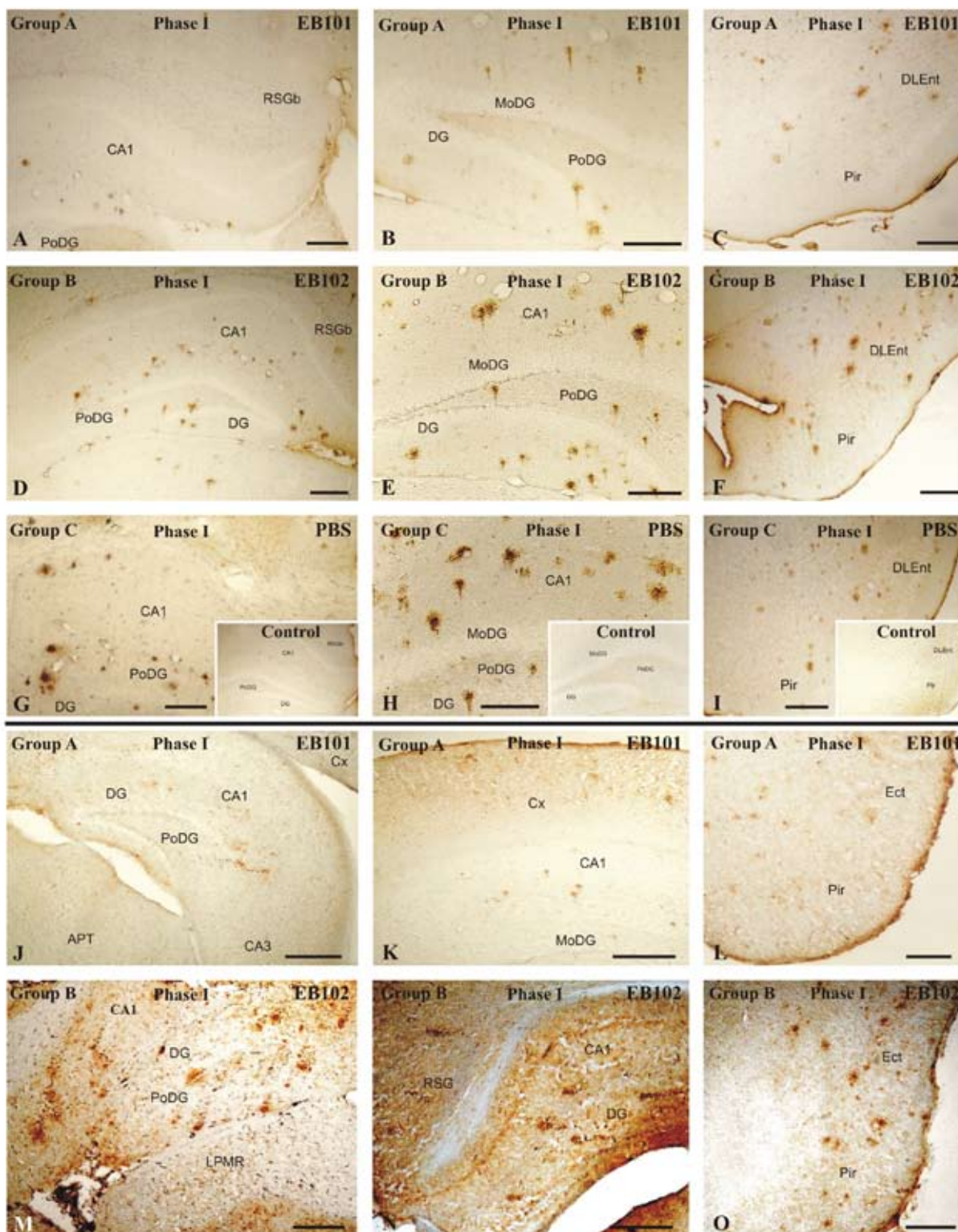


Figura 3. Efecto de la vacuna EB101 en los ovillos neurofibrilares (NFT) presentes en el cerebro de ratones B6C3F1/J. Imágenes comparativas de la inmunoreactividad frente a NFT en el hipocampo (A,B,D,E,G,H,J,K,M,N) y regiones corticales (C,F,I,L,O) del cerebro de ratones transgénicos durante la fase preventiva (Figuras A-I) y terapéutica (Figuras J-O). Véase la notable reducción de ovillos neurofibrilares en el grupo A, tratados con la vacuna EB101 durante las dos fases. Barra de calibrado: 100 µm.



está presente en el plasma sanguíneo y es uno de los factores de crecimiento celular más potentes con propiedades pro-angiogénicas [38]. En diversos estudios el S1P ha demostrado actuar como un mensajero intracelular y extracelular en el sistema nervioso [39] para controlar la proliferación, supervivencia, diferenciación y la prevención de la apoptosis en células neuronales, regulando así las señales nerviosas y su función [40,41]. S1P también controla la migración de las células madre neuronales hacia el sitio de la lesión en la médula espinal lesionada, sugiriendo con ello que el S1P tiene un enorme potencial terapéutico como agente regenerativo en el sistema nervioso central [42].

Diseño Experimental

En este estudio se utilizaron ratones transgénicos con doble mutación, B6C3F1/J del Jackson Laboratory de EEUU, expresando una proteína amiloide precursora quimérica ratón/humanas (Mo/HuAPP695swe) y presenilina humana 1 (PS1-dE9), ambas dirigidas a las neuronas del sistema nervioso central. Se realizaron dos estudios experimentales; un estudio del efecto profiláctico de la vacuna (antes del comienzo de la patología en ratones, tratamiento preventivo) y un segundo estudio paliativo de los signos de la enfermedad tras su aparición en ratones de 35 semanas de edad (una vez desarrolladas las patologías neuronales, tratamiento terapéutico). En cada estudio los ratones B6C3-Tg (APPswe, PSEN1dE9) 85Dbo/J fueron divididos en tres grupos de tratamiento: Grupo A formado por ratones inmunizados por vía intraperitoneal con un cóctel sintético humano A β 42/S1P/liposoma (EB101); Grupo B, formado por ratones inmunizados sólo con liposomas (EB102); y el grupo C, formado por ratones inoculados con PBS (suero salino). El mismo procedimiento experimental se aplicó posteriormente al tratamiento terapéutico. Los ratones fueron inmunizados con inyecciones durante siete meses, inoculando un volumen de 100 μ L por inyección que contienen un total de 100 g de A β y 1mg de



fosfolípidos. Al final del tratamiento preventivo los ratones tenían 11 meses de edad y 18 meses de edad al final del tratamiento terapéutico. Todos los procedimientos experimentales están en conformidad a las directrices establecidas por la Directiva del Consejo de las Comunidades Europeas (86/609/CEE) y por el Real Decreto 1201/2005 para la experimentación con animales.

Resultados

Efectos profilácticos de la vacuna EB101 sobre la patología Alzheimer

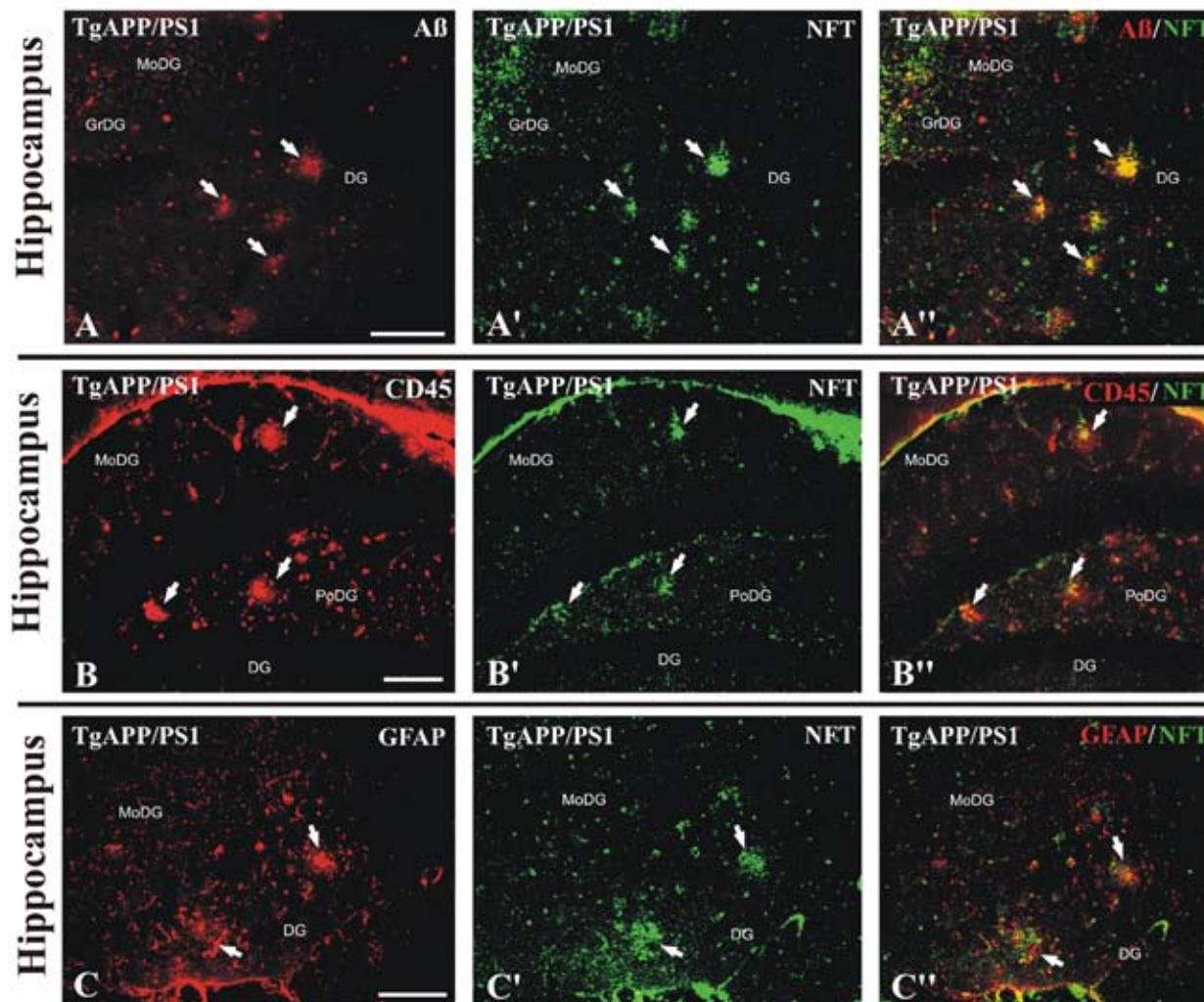
El análisis de imágenes de las secciones del cerebro de los ratones transgénicos (Figuras 1A-O), indica una notable reducción del valor promedio de depósitos A β en el hipocampo y capas corticales de ratones transgénicos tratados con la vacuna EB101 (grupo A; 42,5 A β placas/cerebro) cuando son comparados con los

Tabla

Antibody	Antigen	Type	Source	Dilution	Ref
β -Amyloid	A β ₁₋₄₂ (mouse)	Mouse monoclonal	Millipore	1:1000	21
Neurofibrillary tangles	NT (rabbit)	Rabbit polyclonal	Millipore	1:300	19
Glial fibrillary acidic p	GFAP (mouse)	Mouse monoclonal	Sigma	1:400	27,29,45
CD45RA	B-cells (mouse)	Mouse monoclonal	Dako	1:100	28,30
CD3	T-cells (rabbit)	Rabbit polyclonal	Dako	1:100	30

Figura 4. Relación de los ovillos neurofibrilares con los diversos elementos neuropatológicos en el cerebro de ratones transgénicos B6C3F1/J.

Imágenes de secciones transversales del hipocampo de ratones transgénicos en los que se observa una co-distribución en la inmunoreactividad frente a ovillos neurofibrilares, placas A β y células gliales marcadas con GFAP. Barra de calibrado: 100 μ m.



ratones tratados sin la vacuna, grupo B (102.2 A β placas/cerebro) y grupo C (106.9 A β placas/cerebro), (Figura 2A). Las escasas placas A β que aparecen en ratones transgénicos tratados con la vacuna se localizan principalmente en las capas externas de la región encefálica del giro dentado (Figuras 1A-C), y que al ser de pequeño tamaño, dispersas y con núcleo difuso, representan los estadios iniciales de su desarrollo (tipo 2a). El análisis histológico de las secciones del cerebro de los ratones del estudio revelaron cuatro tipos diferentes de placas A β : tipo 1, 2a, b y c, basado en la caracterización morfológica descrita por Bussière *et al* [45], como se observa en la figura 1A-I. Estas placas β -amiloide estuvieron presentes principalmente en el hipocampo del cerebro del ratón transgénico de los grupos B y C (Figura 1-I), ubicadas principalmente en el giro dentado (capa granular), seguido por las regiones neocorticales como las zonas de la corteza retrosplenial,

ectorrinal y capas piriformes. Analizando el área ocupada por los depósitos A β en el hipocampo y la corteza cerebral de secciones de cerebro de ratones transgénicos (Figuras 1A-C) después de tratamiento preventivo con la vacuna, se constata una reducción notable (4.83%, $p < 0.05$; Figura 2B) y difiere significativamente del área de depósitos A β observada en las secciones de los ratones tratados sin la vacuna, grupo B (12.6%, $p < 0.05$; Figura 2B) y grupo C (12.81%, $p < 0.05$; Figura 2B). Los ratones control no mostraron depósitos A β en ninguna región del cerebro (véase área cuadrado en figuras 1G-I).

El efecto en la psicomotricidad en los ratones del estudio se evaluó al final del tratamiento (7 meses) mediante una prueba estandarizada de rota-rod. Los resultados de habilidades motoras mostraron un mejor índice de coordinación motora en los ratones tratados con la vacuna EB101 en comparación con los dos otros controles, que

Figure 5. Efecto de la vacuna EB101 en la incidencia de astrogliosis y activación inmunitaria. Imágenes comparativas de la inmunoreactividad frente a marcadores gliales (GFAP), células B (CD45RA) y células T (CD3) en el hipocampo (Figuras A-I,L,O,R) y regiones corticales (Figuras J,K,M,N,P,Q) durante la fase preventiva (Figuras A-I) y terapéutica (Figuras J-R). Se observa una notable ausencia de procesos neuroinflamatorios en forma de astrogliosis en el giro dentado (A), contrastando con los astrocitos reactivos densamente distróficos, típicos de una reacción inflamatoria, observada en las secciones de cerebro de ratón correspondientes a los grupos B (ratones tratados con EB102) y grupo C (PBS-tratados). Barra de calibrado: 100 μ m.

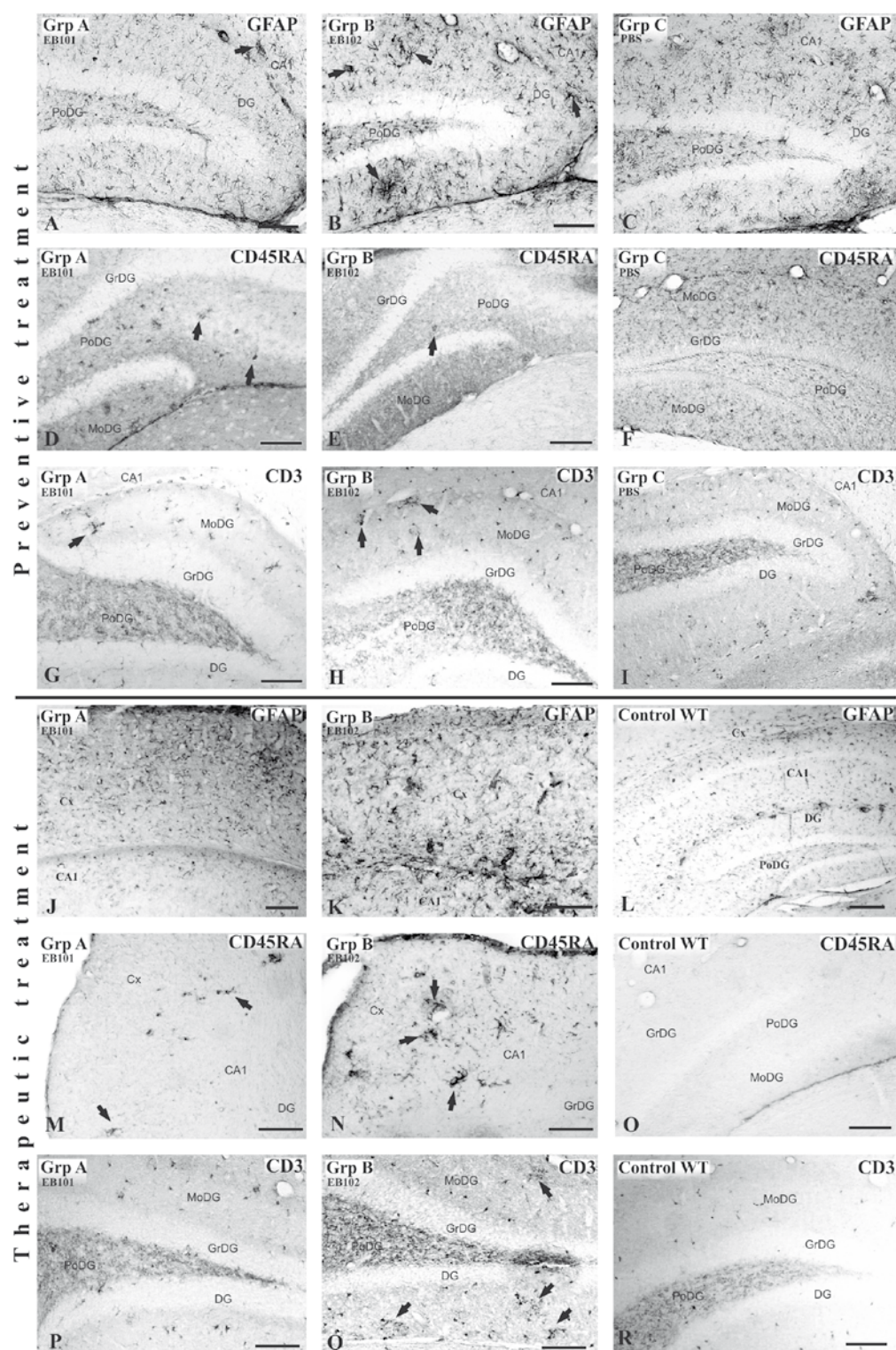


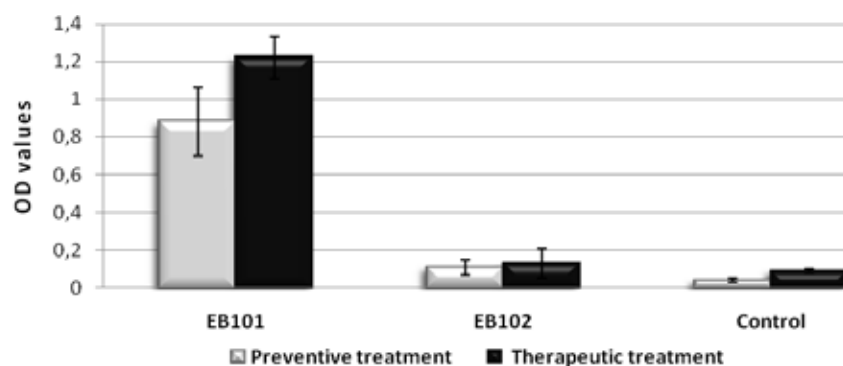
Figura 6. Cuantificación de anticuerpos IgG anti β -amiloide y citoquinas Th1/Th2.

A. Gráfico de la presencia de anticuerpos anti β -amiloide en el suero de ratones transgénicos después del tratamiento preventivo y terapéutico. Véase el efecto de la vacuna EB101 con una notable producción de anticuerpos IgG. Cada barra representa el valor medio OD significativo $\pm$ desviación típica en cada grupo experimental.

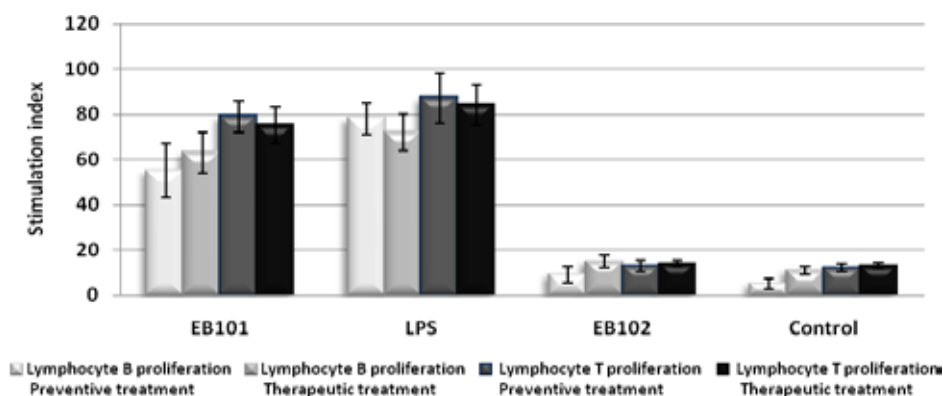
B. Respuesta proliferativa de las células del bazo de ratones tratados con EB101 y controles tras el tratamiento preventivo y terapéutico. Los resultados mostraron que EB101 y LPS habían inducido respuestas proliferativas de linfocitos T yB.

C. Detección de citoquinas Th1 y Th2 en ratones transgénicos después del tratamiento terapéutico. Análisis de varianza (ANOVA) para IL-5, -6, -10 y -13 con diferencias significativas entre vacunados con EB101 y grupos de control. Resultados en pg/mL $\pm$ SEM

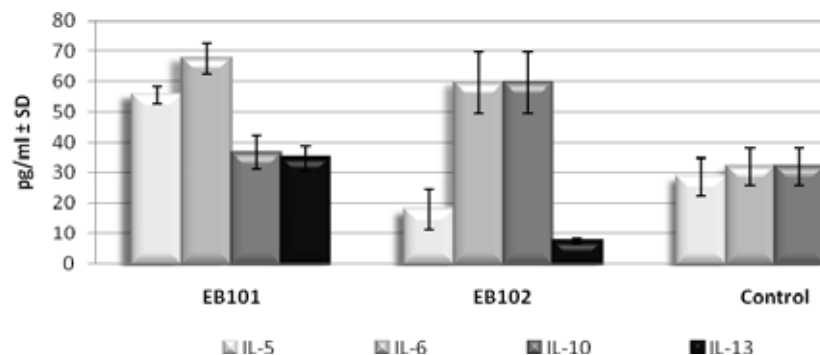
A



B



C



mostraban un moderado-severo deterioro en la coordinación motriz (Figura 2).

También se estudió el efecto de la vacuna EB101 en los ovillos neurofibrilares utilizando anticuerpos contra NFT. Estas placas de desarrollo degenerativo fueron observados en los ratones transgénicos (Figuras 3A-I), aunque su densidad fue sustancialmente mayor en cerebros de ratón del grupo B (Figuras 3D-F) y C (Figuras 3G-I) en comparación con los ratones tratados con la vacuna EB101, grupo A. Estas estructuras inmunopositivas están situadas principalmente en las regiones del hipocampo del cerebro de los ratones tratados sin vacuna (EB102 y PBS) y están compuestas por agregados hiperfosforilados de la proteína tau, situada a lo largo de los filamentos helicoidales neuronales, presentando un núcleo inmunorreactivo similar y una extensión variable de dendrita apical (a menudo con una apariencia en forma de llama como se muestra en la figura 3). Las regiones del cerebro de ratones transgénicos tratados con la vacuna EB101 (grupo A) está en su mayor parte desprovista de NFT (Figuras 3A-C), y sólo se observaron de forma espaciada en el giro dentado (Figuras 3B) y en capas de la corteza entorrinal (Figura 3). Sin embargo, las mismas regiones del grupo B (Figuras 3D-F), notablemente similares a las observados en los ratones transgénicos del grupo C (Figuras 3G-I), mostraron una amplia densidad de ovillos neurofibrilares ocupando todas las regiones del hipocampo, área retrosplenial, ectorrinal y corteza piriforme. La intensidad del marcaje de los ovillos neurofibrilares observados en los grupos B y C, incluyendo la densidad y el área ocupada, contrasta con la escasez y la casi ausencia de estas características neuropatológicas en ratones tratados con la vacuna EB101.



Los ratones control no mostraron placas en ninguna región del cerebro (véase área del cuadrado en figuras 3G-I). La citoarquitectura y distribución neuronal del marcador presináptico, sinaptofisina, no muestra variación de densidad ni diferencias significativas entre los cerebros de ratón de los tres grupos estudiados.



Efecto terapéutico de la vacuna EB101 en placas A β , NFT y neuroglía de ratones B6C3F1/J

El efecto terapéutico de la vacuna EB101 en ratones B6C3F1/J se inició a las 35 semanas de edad después de la aparición de la neuropatología asociada al Alzheimer. Los ratones fueron tratados y se analizaron utilizando el mismo protocolo que en el tratamiento preventivo. Para determinar si la vacuna EB101 invierte el desarrollo masivo de placas β -amiloide, NFT y glía reactiva en cerebro, secciones de todos los ratones experimentales (transgénicos y de control) fueron analizados con los anticuerpos específicos para identificar estos sellos patológicos.

Los resultados obtenidos tras el tratamiento terapéutico mostraron que los depósitos A β estaban casi completamente ausentes en las secciones del cerebro de ratones tratados con la vacuna EB101 (20,3 placas A β /cerebro; Figuras 1J-L, 2A), diametralmente diferente de los niveles de placas A β observadas en los demás grupos de ratones, grupo B (134,3 A β placas/cerebro; Figuras 1 M-O, 2A) y grupo C (128,6 A β placas/cerebro; Figura 2A). Las pocas placas A β observadas en ratones vacunados presentan un pequeño núcleo central rodeado de escaso material fibrilar (tipo 2a), con una menor área de depósito A β (5,27%, $p < 0,05$; Figura 2B), ubicadas principalmente en las capas corticales externas (Figuras 1J-L) y casi totalmente ausente en las regiones del hipocampo. En la sección del cerebro de las mismas regiones transversales, ratones del grupo B presentan una extensa área de placas A β (14,32%, $p < 0,05$; Figuras 1 M-O, 2B), mostrando una distribución dispersa a lo largo de las capas del hipocampo y corticales, similares a la observada en el grupo C (14,07%, $p < 0,05$; Figuras 2B).

La prueba de psicomotricidad en el rota-rod, para medir la coordinación motora durante el tratamiento terapéutico, no mostró ningún efecto negativo en los ratones tratados con la vacuna EB101 (Figura 2), pero indica un moderado/severo deterioro en la capacidad motora de los demás ratones tratados (Figura 2). El análisis histológico del grupo A de ratones después del tratamiento terapéutico mostraba

un patrón de distribución menos denso de ovillos neurofibrilares (Figuras 3J-L) que el observado en el tratamiento preventivo. Después del tratamiento terapéutico (Figuras 3 M-O), los ratones de grupo B presentaron una densidad elevada de placas neuríticas similar a la observada en el tratamiento preventivo. El análisis de la plasticidad sináptica revela que estos grupos B y C presentan niveles de densidad diferentes pero no significativamente menores de sinaptofisina, principalmente en las regiones del hipocampo, en comparación con el grupo A.

Marcadores neuropatológicos.

Detección por doble inmunofluorescencia

La detección por doble inmunofluorescencia se aplicó en el análisis de colocalización de placas $A\beta$ y ovillos neurofibrilares en los cerebros de ratones transgénicos (Figuras 4A-A"). Observamos algunas placas dispersas en el hipocampo y en la región entorrinal de ratones B6C3F1/J, colocalizadas principalmente en la capa molecular del giro dentado (Figuras 4A-A") y en la corteza entorrinal. Inmunofluorescencia a CD45RA (linfocitos B) y a los ovillos neurofibrilares también fue analizada por microscopía confocal, mostrando que los linfocitos B rodean los ovillos neurofibrilares principalmente en las capas moleculares del giro dentado (Figuras 4B-B"). Doble inmunofluorescencia GFAP y a ovillos neurofibrilares mostraron que las células gliales activas se localizan alrededor de los ovillos neurofibrilares en el giro dentado (Figuras 4 C-C") y en la corteza entorrinal, aunque no se observó ninguna colocalización.

Efecto de la vacuna EB101 en la respuesta inmune

Con el fin de evaluar el efecto de la vacunación en la reactividad microglial y neuroinflamación, analizamos la distribución de proteína ácida fibrilar glial (GFAP), de células B (CD45RA) y células T (CD3) de marcadores de superficie en la sección transversal de los cerebros de ratón (Figuras 5A-R). Después del tratamiento preventivo, se observó neuroglia reactiva, astrogliá, formando agregados de astrocitos reemplazando neuronas muertas, alrededor de placas $A\beta$ y ovillos neurofibrilares en la región cortical e hipocámpica del cerebro de ratones transgénicos de los grupos B (Figura 5B) y C (Figura 5C). Las mismas regiones del cerebro de ratones transgénicos tratados con la vacuna están casi desprovistas de neuroglia reactiva (Figura 5A). Las secciones del cerebro de ratones transgénicos vacunados con EB101 mostraban algunos linfocitos B inmunorreactivos en la región del hipocampo (Figura 5D), con mucho menor densidad en los grupos B (EB102; Figura 5E) y C (PBS; Figura 5F). No hay indicios de

astrocitosis ni de linfocitos B en ningún ratón control (Figuras 5L,O).

En el tratamiento preventivo, las células T inmunorreactivas fueron encontradas en todos los cerebros de ratones transgénicos, formando conspicuos agregados en el hipocampo (Figuras 5G-I) y regiones corticales, aunque estos grupos microgliales se encontraron en menor densidad en los ratones transgénicos tratados con la vacuna EB101 (Figura 5). La distribución glial en cerebros de ratón transgénico tratados con la vacuna EB101 (Figura 5J) tenía un patrón similar a los ratones control, con ningún acúmulo reactivo glial en todo el cerebro excepto en zonas corticales específicas (Figura 5J). Por lo tanto, el patrón de distribución de células inmunorreactivas a GFAP mostró una ausencia generalizada de astrocitosis en ratones con vacuna EB101, contrastando con los grupos B (Figura 5K) y C, donde procesos de astrocitosis se observaron en las regiones del hipocampo y corticales. También hemos apreciado que la densidad de células B en los ratones tratados con la vacuna EB101 (Figura 5M) después del tratamiento terapéutico era similar a la densidad del régimen preventivo. Cabe destacar que los agregados de células T no se observaron en ninguno de los grupos control (Figura 5R). Sin embargo, los ratones transgénicos de los grupos B (Figura 5N) y C mostraron un pronunciado incremento en los marcadores de CD45RA en las zonas corticales cerebrales con densas placas amiloides. Los grupos B (Figura 5P) y C mostraron gran densidad de microglía en el hipocampo y el neocórtex, formada por células inmunorreactivas a CD3 en áreas ricas en placas amiloides (Figura 5Q; véase doble inmunoreactividad en la figura 4). La ausencia de linfocitos T en ratones transgénicos tratados con la vacuna EB101 (Figura 5P) contrasta con los resultados observados en los demás grupos experimentales.

Inmunogénesis de anticuerpos $A\beta$ en ratones transgénicos

La concentración de anticuerpos $A\beta$ en ratones transgénicos fueron determinadas por ELISA utilizando anticuerpos específicos anti- $A\beta$. El tratamiento preventivo con la vacuna EB101 dio lugar a un marcado aumento de la producción de anticuerpos IgG $A\beta_{42}$ con valores de 1:1400-1:2000 hasta 1:6000 en algunos animales. Los ratones transgénicos de los demás grupos tratados con liposomas vacíos (EB102) o con PBS, mostraron niveles bajos de anticuerpos anti- $A\beta_{42}$. Después del tratamiento terapéutico, todos los ratones tratados con la vacuna EB101 produjeron anticuerpos IgG (Figura 6A). Las concentraciones de anticuerpos eran similares a las detectadas después del tratamiento preventivo. En los modelos preventivos y terapéuticos, los resultados mostraron que

la vacunación por EB101 induce una fuerte respuesta proliferativa linfocitaria de células B y un consecuente incremento en células T ($P < 0.01$; Figura 6B), mientras que en los casos de los grupos tratados con EB102 y PBS no mostraron ninguna respuesta inmune destacable.

La detección de la respuesta de citoquinas Th1 y Th2 se llevó a cabo en sueros de cada ratón

estudiado (Figura 6). Los resultados obtenidos de dicha detección indican diferencias significativas entre los ratones vacunados y los demás grupos control en cuanto a citoquinas IL-5, 6, 10 y 13, lo que sugiere que la inmunidad mediada por anticuerpos observada en el presente estudio induce a un tipo de reacción inmunológica esperable de células T Th2.



Iván Carrera

neuromorfologia@ebiotech.com

Conclusiones

En estos últimos años hemos enfocando nuestros esfuerzos en el desarrollo de una vacuna contra la patología cerebral del Alzheimer, dirigida no sólo a la reducción de placas A β mediante la génesis endógena de anticuerpos anti-A β , sino también en la reducción de la formación de los ovillos neurofibrilares, prevención de deterioro cognitivo y regeneración de las neuronas dañadas. Impulsados por el gran potencial de una vacuna eficaz en la prevención y tratamiento de EA y la selectiva eficacia de la primera vacuna activa para reducir los niveles de A β , hemos optado por un nuevo enfoque para eludir el fracaso de intentos anteriores (AN1793), seleccionando experimentalmente todos los componentes que aseguran una eficacia tanto preventiva como terapéutica frente a los obstáculos empíricos de pruebas anteriores. Los componentes de la vacuna presentan una eficacia comprobada por numerosos estudios, entre los que destacan el adyuvante de matriz fisiológica, liposomas compuestos por fosfolípidos naturales: fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol y el colesterol, utilizados también en otros tipos de vacunas, como en la vacuna de la gripe. Además se añadió un esfingolípid biológicamente activo, el S1P, y que actúa como un mediador importante de lípidos tanto dentro como fuera de las neuronas [46,47]. Se sabe que el S1P facilita la secreción de glutamato en las neuronas del hipocampo y participa en los mecanismos subyacentes de la regulación de la transmisión sináptica. Extracelularmente, S1P se une a los miembros de la proteína GTP (proteína G), provocando diversos efectos celulares, incluida la angiogénesis, desarrollo cardíaco, inmunidad, motilidad celular y extensión de desarrollo [37,38], actuando en una red autocrina y paracrina [48-50]. Intracelularmente, el S1P ha demostrado actuar en la movilización de calcio celular, crecimiento celular y supresión de la apoptosis [51-54]. Estas acciones inducidas por S1P pueden facilitar la formación de un ciclo de activación positiva en neuronas excitatorias ya que el S1P intracelular aumenta la excitabilidad inducida por el factor de crecimiento nervioso en las neuronas sensoriales [39]. Por último, el S1P también controla la migración de las células madre neuronales hacia el sitio de la lesión en la médula espinal, sugiriendo con ello que el S1P tiene un potencial terapéutico como agente regenerativo en el sistema nervioso central [42].

Aprovechando estas propiedades del S1P, hemos incorporado S1P con la mezcla de fosfolípidos para formar una matriz liposomal utilizada como coadyuvante para entregar el antígeno activo, A β_{42} [56]. Esta combinación añadió un componente regenerativo y antiinflamatorio a la vacuna, elementos clave para aumentar la actividad neuronal y evitar la posible inflamación en el cerebro de los pacientes de Alzheimer.

Las principales conclusiones de este estudio indican que: las principales señas de identidad de la enfermedad de Alzheimer como (i) placas de beta amiloide y los ovillos neurofibrilares, se evitan de forma notable en los ratones transgénicos experimentales; (ii) la activación de la respuesta de microglía y consecuente neuroinflamación, que espontáneamente se manifiestan en estos ratones transgénicos como patología asociada a la enfermedad de Alzheimer, se reducen por tratamiento con la vacuna EB101; (iii) una fuerte respuesta inmunitaria se observó tras el tratamiento con la vacuna EB101, según lo determinado por las concentraciones de anticuerpos A β detectados en sueros; (iv) nuestra vacuna EB101 también dio lugar a una mejora significativa en la psicomotricidad de los ratones transgénicos tratados; y (v) no provoca ningún efecto de atrofia o parálisis en las extremidades de los ratones tratados con la vacuna EB101.

Esta nueva vacuna EB101 superó la patológica respuesta autoinmune que se detectó con la vacuna AN1793 (Elan y Wyeth, 2001): un error debido a la incorporación de un coadyuvante, QS-21 y el detergente polisorbato 80, se cree que pudo haber inducido la respuesta pro-inflamatoria de tipo Th1 [33]. En este trabajo hemos demostrado que la formulación y composición de nuestra vacuna EB101 es efectiva e inócua, cubriendo la necesidad que hay en nuestra sociedad desde hace mucho tiempo de una vacuna segura y eficaz para prevenir o mejorar la neuropatología de la enfermedad de Alzheimer. La vacuna EB101 cumple íntegramente los requisitos para la puesta en marcha de la primera fase de ensayos clínicos: inducción de una fuerte respuesta inmune del tipo Th2 para la reducción de las neuropatologías características, placas beta amiloide y ovillos neurofibrilares, reduciendo así la neuroinflamación, mediada por la activación de la microglía. Estos resultados respaldados por el tratamiento preventivo y terapéutico, sugieren que la vacuna EB101 es eficaz no sólo en la prevención de la neuropatología asociada al Alzheimer sino también en su reducción terapéutica.

Los resultados obtenidos confirman que en los ratones no vacunados con EB101 la tinción anti-A β se acumula en placas amiloides no fibrilares en el periodo inicial del proceso patológico. Estos resultados se intensifican en etapas posteriores, como era de esperar, con el avance de la enfermedad, en las que las placas fibrilares difusas son cada vez más numerosas en estas regiones del cerebro

[13]. Sin embargo, los resultados obtenidos después de la vacunación preventiva con EB101 en ratones transgénicos demuestran un índice significativamente bajo en la densidad de placas A β presentes en las mismas regiones cerebrales de ratón, así como una notable reducción del áreas de placas en comparación con los ratones no vacunados con EB101 (Grupo B y C). El hecho de que el análisis de imagen inmunohistoquímica y de fluorescencia confirmara esta eficaz reducción de los primeros depósitos A β (4,83%) en el cerebro de ratones por la vacuna EB101 sugiere que dicha vacuna funciona como un tratamiento preventivo en la aparición de las placas amiloide de la enfermedad de Alzheimer en ratones transgénicos. Durante este periodo temprano del desarrollo de la enfermedad, la inmunización con la vacuna EB101 también impidió significativamente el desarrollo masivo de otras señales patológicas como los ovillos neurofibrilares, la deficiencia en la coordinación motora y la reactivación microglial. Esta activación microglial en respuesta a los primeros depósitos A β [17,57,58-60] se ha visto reducida por nuestra vacuna, mostrando una marcada ausencia de astrocitosis relacionada con acúmulos A β en ratones inmunizados con EB101. Mediante el uso de técnicas de doble tinción inmunohistoquímica en cerebros de ratón, se comprobó dicha interacción patológica, puesto que un gran número de astrositos inmunopositivos al marcador celular GFAP se identificaron alrededor de los ovillos neurofibrilares, estrechamente relacionados con las placas amiloides y con los marcadores de neuroinflamación [61]. Por lo tanto, la vacuna EB101 parece prevenir significativamente la acumulación, en el periodo inicial de la enfermedad degenerativa, de placas amiloides no fibrilares así como procesos de inflamación asociados a las regiones cerebrales de la corteza y el hipocampo en ratones transgénicos APPswe/PS1dE9.

En cuanto a los resultados obtenidos después del tratamiento terapéutico con la vacuna EB101, se observó una clara disminución de los principales sellos patológicos asociados a la enfermedad de Alzheimer. Estos resultados obtenidos mediante el análisis inmunohistoquímico y ELISA demostraron un fuerte efecto del tratamiento EB101 en la eliminación de la densidad de placas A β , incremento de los niveles de anticuerpos anti-A β , ausencia de neuroinflamación y un índice normal en las tareas de coordinación motriz en comparación con los ratones tratados con EB102 y PBS. Estos efectos, observados en los tratamientos preventivos y terapéuticos, demuestran una vez más la eficacia de la vacuna EB101 para prevenir y reducir la carga β -amiloide y, en consecuencia, la neurodegeneración resultante. Los análisis de inflamación y respuesta inmune, realizados al finalizar el tratamiento terapéutico, no mostraron ninguna reacción inflamatoria importante en el cerebro de ratones vacunados con EB101, al contrario de lo que se observó anteriormente con otros tipos de vacunas realizadas en estudios con ratones tg APP [62] y en pacientes vacunados con A β [33]. No se han detectado signos de neuroinflamación, medido por citoquinas pro-inflamatorias [63] o por un aumento de la GFAP, marcador de astrogliosis [64], en los ratones inmunizados de EB101, en contraste con los resultados observados en los grupos de ratones transgénicos vacunados con EB102 y PBS. Niveles bajos de células T reactivas se detectaron en cerebros de ratones inmunizados con EB101, al contrario de lo que se observó en los pacientes vacunados y con lo que se relaciona directamente los procesos de meningoencefalitis que parecen haber sido la causa probable de los efectos adversos de la vacuna de Elan [9,65].

En estudios previos, mediante inmunoterapia A β en ratones APP-tg, se han observado diferentes niveles de anticuerpos A β en suero, dependiendo del modelo de ratón utilizado, metodología de inmunización y tipo de coadyuvante en la formulación de la vacuna. Nuestra formulación de la vacuna liposomal (EB101) difiere notablemente de las demás, principalmente por el agente coadyuvante utilizado, presentando mejores resultados inmunogénicos que los utilizados en estudios anteriores como el Freund [20,29] o el Quil-A[66]. El adyuvante utilizado en esta nueva vacuna tienen un impacto significativo en la respuesta inmune suscitada [67], potenciando así el efecto positivo de la inmunización (EB101) observada incluso en ratones después del establecimiento de depósitos encefálicos de A β y posteriores cambios neuropatológicos, indicando claramente que esta vacuna tiene un gran potencial como agente terapéutico para prevenir y revertir la patología cerebral de la enfermedad de Alzheimer [31,44,68,69]. Aunque falta por descifrar el mecanismo por el cual los procesos de inmunización disminuyen los efectos neuropatológicos de la EA y previenen o disminuyen el déficit cognitivo, se cree que varios aspectos metabólicos podrían ser responsables de la degradación de las placas A β , tales como el tráfico de anticuerpos específicos anti-A β al cerebro [70], el transporte de A β soluble en el plasma con una posterior degradación mediada por anticuerpos (hipótesis de receptores periféricos) [71] y los sistemas de transporte de IgG [43]. El concepto de que la completa especificidad de la respuesta inmune frente al antígeno A β disminuye la probabilidad de activar la respuesta inflamatoria ha sido respaldada por muchos autores [43,72] y parece confirmarse con nuestra vacuna.

La evidente reducción de los marcadores neuropatológicos producida por la administración de la vacuna EB101 en ratones transgénicos para la enfermedad de Alzheimer abre paso a nuevas etapas de investigaciones preclínicas y clínicas. Parece previsible que la respuesta terapéutica a la inmunización A β sea positiva y variable dependiendo del perfil genotípico específico de cada paciente [73,74]. En el modelo transgénico utilizado en nuestra plataforma experimental de vacunación, los resultados demuestran inequívocamente que la vacuna EB101 no sólo puede detener las diferentes neuropatologías relacionada con la enfermedad de Alzheimer y déficits motores, sino también llegar a revertir el proceso neurodegenerativo, conduciendo a una sólida respuesta inmunológica y a un efecto antiinflamatorio que conduce a la estabilización de los patrones neuronales afectados. Con este trabajo de varios años, nuestro grupo de investigación cree haber aportado un rayo de esperanza en el largo y penoso camino hacia la prevención de la enfermedad de Alzheimer. ■

Referencias bibliográficas

- Cacabelos R, Fernández-Novoa L, Lombardi V, Kubota Y, Takeda M. Molecular genetics of Alzheimer's disease and aging. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2005; 27 Suppl A:1-573.
- Selkoe D. Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 924:17-25.
- Blennow K, de Leon M, Zetterberg H. Alzheimer's disease. *Lancet* 2006; 368:387-403.
- Nunomura A, Hofer T, Moreira P, Castellani R, Smith M, Perry G. RNA oxidation in Alzheimer disease and related neurodegenerative disorders. *Acta Neuropathol* 2009; 118:151-66.
- Selkoe D. Toward a remembrance of things past: deciphering Alzheimer disease. *Harvey Lect* 2004; 99:23-45.
- Cacabelos R. Pharmacogenomics in Alzheimer's disease. *Meth Mol Biol* 2008; 448:213-357.
- Roher A, Esh C, Kokjohn T et al. Amyloid beta peptides in human plasma and tissues and their significance for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2009; 5:18-29.
- Walsh D, Selkoe D. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron* 2004; 44:181-93.
- Maier M, Seabrook T, Lazo N et al. Short amyloid-beta (Abeta) immunogens reduce cerebral Abeta load and learning deficits in an Alzheimer's disease mouse model in the absence of an Abeta-specific cellular immune response. *J Neurosci* 2006; 26:4717-28.
- Games D, Adams D, Alessandrini R et al. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta amyloid precursor protein. *Nature* 1995; 373:523-7.
- Hsiao K, Chapman P, Nilsen S et al. Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 1996; 274:99-102.
- Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M et al. Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:13287-92.
- Mustafiz T, Portelius E, Gustavsson M et al. Characterization of the Brain β -Amyloid isoform pattern at different ages of Tg2576 mice. *Neurodegener Dis* 2011; 8:352-63.
- McGowan E, Sanders S, Iwatsubo T et al. Amyloid phenotype characterization of transgenic mice overexpressing both mutant amyloid precursor protein and mutant presenilin 1 transgenes. *Neurobiol Dis* 1999; 6:231-44.
- Holcomb L, Gordon M, McGowan E et al. Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat Med* 1998; 4:97-100.
- Chishti M, Yang D, Janus C et al. Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695. *J Biol Chem* 2001; 276:21562-70.
- Gordon M, Holcomb L, Jantzen P et al. Time course of the development of Alzheimer-like pathology in the doubly transgenic PS1+APP mouse. *Exp Neurol* 2002; 173:183-95.
- Jankowsky J, Fadale D, Anderson J et al. Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. *Hum Mol Genet* 2003; 13:159-70.
- Trinchese F, Liu S, Battaglia F, Walter S, Mathews P, Arancio O. Progressive age-related development of Alzheimer-like pathology in APP/PS1 mice. *Ann Neurol* 2004; 55:801-14.
- Schenk D, Barbour R, Dunn W et al. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 1999; 400:173-7.
- Bard F, Barbour R, Cannon C et al. Epitope and isotype specificities of antibodies to beta-amyloid peptide for protection against Alzheimer's disease-like neuropathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:2023-8.
- Carty N, Wilcock D, Rosenthal A et al. Intracranial administration of deglycosylated C-terminal-specific anti-Abeta antibody efficiently clears amyloid plaques without activating microglia in amyloid-depositing transgenic mice. *J Neuroinflammation* 2006; 3:11.
- Morgan D. Immunotherapy for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2006; 9(3 Suppl):425-32.
- Mamikonyan G, Necula M, Mkrtchyan M et al. Anti-A beta 1-11 antibody binds to different beta-amyloid species, inhibits fibril formation, and disaggregates preformed fibrils but not the most toxic oligomers. *J Biol Chem* 2007; 282:22376-86.
- Lemere C, Masliah E. Can Alzheimer disease be prevented by amyloid-beta immunotherapy? *Nat Rev Neurol* 2010; 6:108-19.
- Schenk D. Amyloid- β immunotherapy for Alzheimer's disease: the end of the beginning. *Nature* 2002; 3:824-8.
- Morgan D. Modulation of microglial activation state following passive immunization in amyloid depositing transgenic mice. *Neurochem Int* 2006; 49:190-4.
- Chen G, Chen K, Kobayashi D et al. Active beta-amyloid immunization restores spatial learning in PDAPP mice displaying very low levels of beta-amyloid. *J Neurosci* 2007; 27:2654-62.
- Wilcock D, Gharkholonarehe N, van Nostrand W, Davis J, Vitek M, Colton C. Amyloid reduction by amyloid-beta vaccination also reduces mouse tau pathology and protects from neuron loss in two mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2009; 29:7957-65.
- Fu H, Liu B, Frost J, Lemere C. Amyloid-beta immunotherapy for Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2010; 9:197-206.
- Dodart J, Bales K, Gannon K et al. Immunization reverses memory deficits without reducing brain Abeta burden in Alzheimer's disease model. *Nat Neurosci* 2002; 5:452-7.
- Kotilinek L, Bacskai B, Westerman M et al. Reversible memory loss in a mouse transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2002; 22:6331-5.
- Orgogozo J, Gilman S, Dartigues J et al. Subcutaneous immunization in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. *Neurology* 2003; 61:46-54.
- Nicoll J, Wilkinson D, Holmes C, Steart P, Markham H, Weller R. Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. *Nat Med* 2003; 9:448-52.
- Ferrer I, Boada-Rovira M, Sánchez-Guerra M, Rey M, Costa-Jussà F. Neuropathology and pathogenesis of encephalitis following amyloid-beta immunization in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 2004; 14:11-20.
- Gilman S, Koller M, Black R et al. Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology* 2005; 64:1553-62.
- Masliah E, Hansen L, Adame A et al. Abeta vaccination effects on plaque pathology in the absence of encephalitis in Alzheimer disease. *Neurology* 2005; 64:129-31.
- Pilorget A, Annabi B, Bouzeghrane F, Marvaldi J, Luis J, Béliveau R. Inhibition of angiogenic properties of brain endothelial cells by platelet-derived sphingosine-1-phosphate. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005; 25:1171-82.

39. Anelli V, Bassi R, Tettamanti G, Viani P, Riboni L. Extracellular release of newly synthesized sphingosine-1-phosphate by cerebellar granule cells and astrocytes. *J Neurochem* 2005; 92:1204-15.
40. Colomboaioni L, Garcia-Gil M. Sphingolipid metabolites in neural signalling and function. *Brain Res Brain Res Rev* 2004; 46:328-55.
41. Saba J, Hla T. Point-counterpoint of sphingosine 1-phosphate metabolism. *Circ Res* 2004; 94:724-34.
42. Kimura A, Ohmori T, Ohkawa R et al. Essential roles of sphingosine 1-phosphate/S1P1 receptor axis in the migration of neural stem cells toward a site of spinal cord injury. *Stem Cells* 2007; 25:115-24.
43. Zhou J, Fonseca M, Kayed R et al. Novel Abeta peptide immunogens modulate plaque pathology and inflammation in a murine model of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 2005; 2:28.
44. Allison A, Cacabelos R, Lombardi V, Álvarez X, Vigo C. Celastrol, a potent antioxidant and anti-inflammatory drug, as a possible treatment for Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2001; 25:1341-57.
45. Bussiére T, Bard F, Barbour R et al. Morphological characterization of Thioflavin-S-positive amyloid plaques in transgenic Alzheimer mice and effect of passive Abeta immunotherapy on their clearance. *Am J Pathol* 2004; 165:987-95.
46. Le Stunff H, Milstien S, Spiegel S. Generation and metabolism of bioactive sphingosine-1-phosphate. *J Cell Biochem* 2004; 92:882-99.
47. Pyne S, Long J, Ktistakis N, Pyne N. Lipid phosphate phosphatases and lipid phosphate signalling. *Biochem Soc Trans* 2005; 33:1370-4.
48. Rosen H, Goetzl E. Sphingosine 1-phosphate and its receptors: an autocrine and paracrine network. *Nat Rev Immunol* 2005; 5:560-70.
49. Alvarez S, Milstien S, Spiegel S. Autocrine and paracrine roles of sphingosine-1-phosphate. *Trends Endocrinol Metab* 2007; 18:300-7.
50. Yatomi Y. Sphingosine 1-phosphate in vascular biology: possible therapeutic strategies to control vascular diseases. *Curr Pharm Des* 2006; 12:575-87.
51. Hla T. Signaling and biological actions of sphingosine 1-phosphate. *Pharmacol Res* 2003; 47:401-7.
52. Hla T, Brinkmann V. Sphingosine 1-phosphate (S1P): Physiology and the effects of S1P receptor modulation. *Neurology* 2011; 76 (8 Suppl 3):3-8.
53. Spiegel S, Milstien S. The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity. *Nat Rev Immunol* 2011; 11:403-15.
54. Kajimoto T, Okada T, Yu H, Goparaju S, Jahangeer S, Nakamura S. Involvement of sphingosine-1-phosphate in glutamate secretion in hippocampal neurons. *Mol Cell Biol* 2007; 27:3429-40.
55. Lee S, Woo C, Chang J, Kim J. Roles of Rac and cytosolic phospholipase A2 in the intracellular signalling in response to titanium particles. *Cell Signal* 2003; 15:339-45.
56. Vigo-Pelfrey C, Lee D, Keim P, Lieberburg I, Schenk D. Characterization of Beta amyloid peptide from human cerebrospinal fluid. *J Neurochem* 1993; 61:1965-8.
57. Heneka M, Wiesinger H, Dumitrescu-Ozimek L et al. Neuronal and glial coexpression of argininosuccinatesynthetase and inducible nitric oxide synthase in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001; 60:906-16.
58. Ruan L, Kang Z, Pei G, Le Y. Amyloid deposition and inflammation in APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2009; 6:531-40.
59. Koistinaho M, Lin S, Wu X et al. Apolipoprotein E promotes astrocyte colocalization and degradation of deposited amyloid-beta peptides. *Nat Med* 2004; 10:719-26.
60. Wyss-Coray T, Loike J, Brionne T et al. Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat Med* 2003; 9:453-7.
61. Minkeviciene R, Loike J, Brionne T et al. Age-related decrease in stimulated glutamate release and vesicular glutamate transporters in APP/PS1 transgenic and wild-type mice. *J Neurochem* 2008; 105:584-94.
62. Monsonego A, Imitola J, Petrovic S et al. Abeta-induced meningoencephalitis is IFN-gamma-dependent and is associated with T-cell-dependent clearance of Abeta in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:5048-53.
63. Muhs A, Hickman D, Pihlgren M et al. Liposomal vaccines with conformation-specific amyloid peptide antigens define immune response and efficacy in APP transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:9810-5.
64. Weiner H, Frenkel D. Immunology and immunotherapy of Alzheimer's disease. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:404-16.
65. Kitazawa M, Oddo S, Yamasaki T, Green K, LaFerla F. Lipopolysaccharide-induced inflammation exacerbates tau pathology by a cyclin-dependent kinase 5-mediated pathway in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2005; 25:8843-53.
66. Vasilevko V, Xu F, Previti M, van Nostrand W, Cribbs D. Experimental investigation of antibody-mediated clearance mechanisms of amyloid-beta in CNS of Tg-SwDI transgenic mice. *J Neurosci* 2007; 27:13376-83.
67. Cribbs D, Ghochikyan A, Vasilevko V et al. Adjuvant-dependent modulation of Th1 and Th2 responses to immunization with beta-amyloid. *Int Immunol* 2003; 15:505-14.
68. Lambert M, Barlow A, Chromy B et al. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Aβ1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:6448-53.
69. Boutajangout A, Quartermain D, Sigurdsson E. Immunotherapy targeting pathological tau prevents cognitive decline in a new tangle mouse model. *J Neurosci* 2010; 30:16559-66.
70. Racke M, Boone L, Hepburn D et al. 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 beta. *J Neurosci* 2005; 25:629-36.
71. DeMattos R, Bales K, Cummins D, Dodart J, Paul S, Holtzman D. 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* 2001; 98:8850-5.
72. Vollmar P, Kullmann J, Thilo B et al. Active immunization with amyloid-beta 1-42 impairs memory performance through TLR2/4-dependent activation of the innate immune system. *J Immunol* 2010; 185:6338-47.
73. Cacabelos R. Pharmacogenomics in Alzheimer's disease. *Methods Mol Biol* 2008; 448:213-357.
74. Cacabelos R. Pharmacogenomics and therapeutic strategies for dementia. *Expert Rev Mol Diag* 2009; 9:567-611.