

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 789**

51 Int. Cl.:  
**C07K 7/06** (2006.01)  
**C07K 16/18** (2006.01)  
**A61K 38/08** (2006.01)  
**A61P 25/16** (2006.01)  
**A61P 25/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09761152 .9**  
96 Fecha de presentación: **12.06.2009**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2310033**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.04.2011**

54 Título: **Compuestos peptídicos para tratar las amiloidosis.**

30 Prioridad:  
**12.06.2008 AT 9522008**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**13.12.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**13.12.2012**

73 Titular/es:  
**AFFIRIS AG (100.0%)**  
**Karl-Farkas-Gasse 22**  
**1030 Wien**

72 Inventor/es:  
**MANDLER, MARKUS;**  
**SANTIC, RADMILA;**  
**WENINGER, HARALD y**  
**KOPINITS, EDITH**

74 Agente/Representante:  
**CURELL AGUILÁ, Mireia**

ES 2 392 789 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Compuestos peptídicos para tratar las amiloidosis.

5 La presente invención se refiere a la prevención y al tratamiento de enfermedades asociadas con la formación y/o agregación  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ -amiloidosis). Más específicamente, la presente invención proporciona nuevos mimotopos que provocan una respuesta inmunitaria dirigida contra  $\beta$ -amiloides y fragmentos  $\beta$ -amiloides truncados por el terminal N y/o modificados después de la traducción y nuevos anticuerpos que reconocen dichos mimotopos y péptidos A $\beta$  para su utilización en la prevención, el tratamiento y el diagnóstico de enfermedades asociadas a la formación y/o agregación  $\beta$ -amiloide.

10 Diversas enfermedades degenerativas se caracterizan por la polimerización anormal y la acumulación de proteínas específicas denominadas proteopatías. La presente invención se refiere a la prevención, al tratamiento y al diagnóstico de proteopatías asociadas a proteínas  $\beta$ -amiloides resumidas bajo el término  $\beta$ -amiloidosis. La forma más destacada de  $\beta$ -amiloidosis es la enfermedad de Alzheimer (EA). Otros ejemplos comprenden de manera no limitativa la demencia con cuerpos de Lewy y la demencia en el síndrome de Down.

15 La EA es la forma más común de demencia en los seres humanos. Hasta el momento no se dispone de un tratamiento eficaz para detener la neurodegeneración progresiva y el deterioro cognitivo asociado en pacientes humanos. La EA se caracteriza por la acumulación anormal de placas amiloides extracelulares - estrechamente asociadas a la astrocitosis extensa y a la microgliosis, así como las neuronas distróficas y la pérdida neuronal. Estas placas amiloides se componen principalmente de la  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ ; derivado de PPA (gi: 112927) péptidos A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42 derivados de la proteína precursora amiloide (PPA), que se expresa en varios tipos de células en el sistema nervioso. Se considera que los péptidos A $\beta$  están directamente implicados en la patogenia y evolución de la EA. Por consiguiente, la reducción de la carga de A $\beta$  en el cerebro está previsto que reduce la velocidad o detiene la evolución de la enfermedad y también podría detener el deterioro cognitivo en pacientes con la EA.

20 La PPA se procesa normalmente en dos pasos de escisión para formar las formas actualmente conocidas de Abeta x-40/42/43. La primera escisión la realizan las denominadas enzimas 1 y 2 que escinden PPA en el punto beta (BACE1 y BACE2); la segunda etapa proteolítica la lleva a cabo el complejo gamma-secretasa.

25 Las enzimas BACE reconocen dos puntos en la parte del terminal N del supuesto péptido A $\beta$  y la actividad proteolítica de BACE conduce a la formación de Abeta 1-X y 11-X, respectivamente. De este modo, el tratamiento de PPA mediado por BACE crea una variedad de diferentes especies de A $\beta$  Abeta 1-40/42 completo como contribuyente principal. La actividad de la gamma-secretasa conduce a la producción de 3 fragmentos principales: A $\beta$  1-40/42/43. Una vez que estos péptidos se producen se tratan más con amino-peptidasas dando como resultado su degradación gradual posterior. Estas nuevas etapas conducen a la formación de otras formas como por ejemplo A $\beta$ 3-40/42 respectivamente.

30 La tercera familia de enzimas proteolíticas involucradas en el tratamiento de PPA es la denominada familia alfa-secretasa (familia ADAM de (desintegrina y metaloproteasa)). Las alfa secretasas escinden la proteína precursora de amiloide (PPA) en su región transmembrana (entre aa16 aa17 de la secuencia de péptidos A $\beta$ ) y descartan la formación de péptidos A $\beta$ . Por lo tanto la escisión de alfa secretasa es la etapa crucial para el tratamiento de PPA no amiloidógeno. Específicamente, la escisión de alfa secretasas produce la liberación de una forma segregada denominada sPPAalfa. Se considera que sPPAalfa es suficiente para mediar en la mayoría de las funciones fisiológicas de PPA y puede servir como una molécula de señalización. Las pruebas sugieren que el ectodominio liberado desempeña una función en el crecimiento de los fibroblastos en cultivo. La sPPA resultó ser neuroprotector para las neuronas primarias en cultivo, evitando elevaciones en las concentraciones de Ca<sup>2+</sup> intracelular causados por la privación de glucosa y elevando el umbral de excitotoxicidad del glutamato, así como la mediación del crecimiento axonal y dendrítico.

35 En los seres humanos, por término medio, del 60 al 85% de material de placa amiloide está formada por derivados de A $\beta$ 40/42 que están truncados en el terminal N y modificados con frecuencia. Las cantidades relativas de especies A $\beta$  truncadas en el terminal N son variables con respecto a los niveles de A $\beta$ , mutaciones y la actividad de BACE. Las formas truncadas de A $\beta$  más abundantes son: A $\beta$ -40/42 y A $\beta$ 11-40/42 que se cree que constituyen hasta el 50% de todas las formas truncadas. Esto significa que estas isoformas constituyen del 25 al 40% de todos los péptidos amiloides en cerebros con EA. Ambos péptidos contienen un resto de glutamato en el terminal N, que está modificado frecuentemente por enzimas a piro-glutamato, dando como resultado la formación de A $\beta$ 3 (pE)-40/42 y A $\beta$ 11 (pE)-40/42, respectivamente. Debido a que el terminal amino de los péptidos Abeta 3 (PE) y 11 (PE) está bloqueado por lactama interna, está protegido de la acción proteolítica de otras aminopeptidasas aparte de las específicos para piroglutamato y por lo tanto puede permanecer estable en los tejidos. Más variantes amiloides truncadas en el terminal N que empiezan en la posición 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 de beta amiloide se pueden detectar en pacientes con EA. Estas formas se modifican frecuentemente después de la traducción, por ejemplo, por metilación.

Se ha demostrado anteriormente que los péptidos truncados y modificados son más estables en el tejido nervioso que Aβ completo. Además, las formas truncadas de Aβ en el terminal N son más amilaceógenas que los péptidos Aβ sin modificar, aumentando así la cantidad de formación de placas, y además muestran actividad neurotóxica cuando se aplican a las neuronas en cultivo así como en experimentos *in vivo*. Las formas truncadas de Aβ ya se puede detectar en conjuntos difusos de Aβ en las etapas iniciales de la EA y podrían estar involucradas en la formación inicial de placas, actuando como semillas individuales *in vivo*. Debido a estos efectos, se sugiere que los péptidos Aβ x-40/42 puede iniciar y/o acelerar la formación de placas, quizá al actuar como centros de nucleación que siembran la posterior deposición de péptidos Aβ completos relativamente menos amilaceógenos pero aparentemente más abundantes. Además, no hay pruebas convincentes de que la aparición de especies Aβ con el terminal N truncado se correlacione con el aumento de la gravedad y del inicio temprano de la neurodegeneración en la enfermedad de Alzheimer esporádica y familiar, así como en los pacientes con síndrome de Down. Los datos de estos pacientes están implica una relación entre la formación temprana de especies con Aβ truncado y el comienzo, así como la evolución, de la enfermedad. En resumen, los resultados predicen que la heterogeneidad del terminal N de los péptidos Aβ, que se ha demostrado que se produce tanto *in vitro* como en el cerebro de EA, puede acelerar la deposición de Aβ en las placas. Por lo tanto, los episodios proteolíticos que contribuyen a la escisión de la PPA en el dominio del terminal N de Aβ pueden ser de considerable importancia en la patogenia de EA y los trastornos relacionados.

A partir de estos resultados, parece ser importante disminuir la cantidad de estas especies de péptidos en pacientes con EA para modificar la evolución de la enfermedad y reducir la toxicidad y la disminución cognitiva que la acompaña. Un vacuna contra EA óptima debería provocar por lo tanto una respuesta inmunitaria que es capaz de dirigirse a las formas más destacadas de péptidos Aβ presentes en el cerebro de pacientes con EA, Aβ1-40/42 Aβ3-40/42, así como Aβ3 (p) E-40/42 y Aβ11-40/42 así como Aβ11 (p) E-40/42 sin interferir con las funciones fisiológicas de la PPA de señalización, especialmente con las funciones de sPPAalfa.

El tratamiento inmunoterapéutico utilizando estrategias de inmunización activa y pasiva para dirigirse a Aβ completa, condujo a la reducción de las placas de Aβ y tuvo un impacto beneficioso sobre la evolución de la enfermedad en modelos animales de EA. Todos los métodos de vacunación activos ensayados en modelos de ratón utilizaron Aβ40/42 completa o fragmentos que contienen la secuencia natural de Aβ.

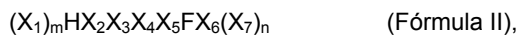
Sin embargo, la primera prueba de vacunación en fase IIa clínica en pacientes con EA que utilizan Aβ42 completo como antígeno tuvo que ser interrumpida debido a efectos secundarios neuroinflamatorios graves incluyendo la infiltración en el cerebro de linfocitos T autorreactivos (Nicoll, J.A. *et al. Nat. Med.* 2003 9:448-452; Bayer, A.J., *et al.* 2005 *Neurology* 64:94-101). No obstante, los estudios que investigan los efectos clínicos en pacientes tratados con AN-1792 pusieron de manifiesto que los pacientes que desarrollaron una respuesta de anticuerpos contra Aβ42 pero que no padecían de meningoencefalitis respondían mejor a las pruebas cognitivas que los pacientes que no respondían, lo que indica que la inmunoterapia podría ser un método de tratamiento útil en la EA.

Más importante aún, es que los resultados recientes obtenidos de los casos de autopsia al analizar pacientes que se sometieron a vacunación con AN1792 mostraban una eliminación de especies de AB de extensión completa del encéfalo, pero una persistencia de formas truncadas de Aβ en el terminal N (Nicoll, J.A., *et al.* 2006 *J. Exp. Neurol. Neuropathol.* 65:1040-1048). Esto pone de relieve la necesidad de la invención de nuevas vacunas que se dirijan a Aβ completos así como de formas truncadas y modificadas en el terminal N de esta molécula.

La inducción de una respuesta inmunitaria contra péptidos Aβ40/42 en seres humanos pueden interferir con la disminución cognitiva en pacientes con EA, pero una vacuna segura contra el Alzheimer debe evitar la formación de linfocitos T autorreactivos. La vacunación utilizando péptidos nativos Aβ40/42 o fragmentos de los mismos padece el riesgo intrínseco de la inducción de la enfermedad autoinmunitaria en los pacientes, ya que la respuesta inmunitaria no puede dirigirse exclusivamente a Aβ.

Un objetivo de la presente invención consiste en proporcionar compuestos y medicamentos que se pueden utilizar para tratar y/o prevenir la enfermedad de Alzheimer. Estos compuestos no deberían presentar ninguna o una reducción significativa del riesgo de producir enfermedades autoinmunitarias cuando se administran a un paciente. Según otro objetivo de la presente invención, dicho compuesto puede ser capaz de provocar la formación *in vivo* de anticuerpos en un individuo que se dirigen a formas truncadas y/o estabilizadas de Aβ, que suelen ser componentes principales de los depósitos amiloides.

Por lo tanto la presente invención se refiere al uso de un compuesto por lo menos que comprende la secuencia de aminoácidos



en la que

X<sub>1</sub> es serina (S), treonina (T) o cisteína (C),

X<sub>2</sub> es la glutamina (Q), treonina (T) o metionina (M),

X<sub>3</sub> es lisina (K) o arginina (R),

5 X<sub>4</sub> es la leucina (L), metionina (M),

X<sub>5</sub> es triptófano (W), tirosina (Y), fenilalanina (F) o isoleucina (I),

10 X<sub>6</sub> es asparagina (N), ácido glutámico (E), alanina (A) o cisteína (C),

X<sub>7</sub> es cisteína (C),

n y m son, independientemente, 0 ó 1,

15 presentando dicho compuesto una capacidad de unión a un anticuerpo que es específico para un epítipo del péptido beta amiloide (A $\beta$ ) que comprende la secuencia de aminoácidos HQKLVF y/o HQKLVFFAED

para producir un medicamento destinado a la prevención y/o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

20 La invención presentada en la presente memoria se refiere a antígenos que no contienen secuencias del péptido A $\beta$  nativo, pero están imitando sin embargo la estructura de neo-epítopos de A $\beta$  no detectables por mimotopos tales como los descritos en el documento WO 2004/062556. Dicha vacuna contra EA a base de mimotopos provoca por lo tanto respuestas de anticuerpos que reaccionan exclusivamente con las moléculas A $\beta$  patológicas mencionadas anteriormente, pero no con estructuras parentales. Es importante destacar que la respuesta inmunitaria provocada por estos mimotopos no interactúa con PPA completo ni con PPAalfa segregada (sPPAalfa) y por lo tanto la vacunación conserva funciones fisiológicas normales de ambas moléculas. Además, los mimotopos no contienen autoepítopos potenciales de linfocitos T y evitar la inducción de linfocitos T autorreactivos perjudiciales.

30 Resultó sorprendente, que un compuesto que comprende una secuencia de aminoácidos de fórmula I es capaz de provocar la formación *in vivo* de anticuerpos que se dirigen a la forma A $\beta$ 1-40/42 de A $\beta$  no truncada, y a formas truncadas terminal N como A $\beta$ 3-40/42, A $\beta$  (PE) 3-40/42, A $\beta$ 11-40/42 sin modificar, A $\beta$  (PE)11-40/42 y A $\beta$ 14-40/42 modificados, respectivamente, y también para variantes truncadas además en el terminal N y amiloides modificadas después de la traducción empezando en la posición 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 de A $\beta$ . Es importante destacar que estos mimotopos no provocan una reactividad cruzada con los neoepítopos presentes en sPPA alfa después de la escisión de PPA y por lo tanto no interfieren con la señalización normal de sPPA alfa.

35 Los anticuerpos formados por la vacunación de las moléculas (mimotopos) de la presente invención son capaces de unirse a los fragmentos de A $\beta$  mencionados anteriormente dando como resultado la disgregación de las placas de A $\beta$ .

40 Las fórmulas I y II y todas las demás moléculas peptídicas descritas en la presente memoria simulan los péptidos A $\beta$  naturales y las variantes A $\beta$ 1-40/42, A $\beta$ pE3-40/42, A $\beta$ 3-40/42 y A $\beta$ 11-40/42, A $\beta$ pE11-40/42 y A $\beta$ 14-40/42 de modo que los compuestos que comprenden las secuencias de aminoácidos descritas en la presente memoria son capaces de provocar la formación de anticuerpos respectivos. Dichos anticuerpos pueden detectar también variantes adicionales de amiloides truncadas en el terminal N y modificadas después de la traducción que empiezan en la posición 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 de A $\beta$ .

50 "β-amiloidosis", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a diversas enfermedades degenerativas que se caracterizan por la polimerización anormal y la acumulación de proteínas específicas denominadas proteopatías. La presente invención se refiere a la prevención, tratamiento y diagnóstico de proteopatías asociadas a proteínas β-amiloides resumidas bajo el término de β-amiloidosis. La forma más destacada de β-amiloidosis es la enfermedad de Alzheimer (EA). Otros ejemplos incluyen pero no se limitan a demencia con cuerpos de Lewy y demencia en el síndrome de Down. Otros ejemplos son la demencia con cuerpos de Lewy, miositis, miositis esporádica con cuerpos de inclusión, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés), angiopatía amiloide cerebral, vasculitis relacionada con A $\beta$ .

55 La administración de un compuesto que comprende una secuencia de aminoácidos de fórmula II provoca una respuesta inmunitaria contra las mismas formas de A $\beta$  truncadas y no truncadas y modificadas después de la traducción como los compuestos que comprenden una secuencia de aminoácidos de fórmula I.

60 Según una forma de realización preferida de la presente invención, el compuesto comprende un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo constituido en SHTRLYF (C), HMRLFFN (C), SHQRLWF (C), HQKMIFA (C), HMRMYFE (C), THQRLWF (C) y HQKMIF (C), preferentemente de entre el grupo que consiste en SHTRLYF (C), HMRLFFN (C), HQKMIFA (C), HMRMYFE (C), THQRLWF (C) (todos los cuales son capaces de provocar *in vivo* la formación de anticuerpos dirigidos a los péptidos A $\beta$ ).

65

Según otra forma de realización preferida de la presente invención, por lo menos un compuesto comprende un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos SHTRL YF (C), SGEYVFH (C), SGQLKFP (C), SGQIWFR (C), SGEIHFN (C), HMRLFFN (C), GELWFP (C), HQKMIFA (C), GEIWFEG (C), GEIYFER (C), THQRLWF (C), GEIRFGS (C), GEIKFDH (C) o GEIQFGA (C), en particular HQKMIFA (C).

Otro aspecto de la presente invención se refiere a la utilización de por lo menos un compuesto que comprende la secuencia de aminoácidos

$(X_1)_mGX_2X_3X_4FX_5X_6(X_7)_n$  (Fórmula I),

en la que

$X_1$  es serina (S), alanina (A) o cisteína (C),

$X_2$  es serina (S), treonina (T), ácido glutámico (E), ácido aspártico (D), glutamina (Q) o metionina (M),

$X_3$  es isoleucina (I), tirosina (Y), metionina (M) o leucina (L),

$X_4$  es leucina (L), arginina (R), glutamina (Q), triptófano (W), valina (V), histidina (H), tirosina (Y), isoleucina (I), lisina (K) metionina (M) o fenilalanina (F),

$X_5$  es alanina (A), fenilalanina (F), histidina (H), asparagina (N), arginina (R), ácido glutámico (E), isoleucina (I), glutamina (Q), ácido aspártico (D), prolina (P) o triptófano (W), glicina (G),

$X_6$  es cualquier resto de aminoácido,

$X_7$  es cisteína (C),

m y n son, independientemente, 0 ó 1,

teniendo dicho compuesto una capacidad de unión a un anticuerpo que es específico para un epítipo del péptido beta-amiloide (A $\beta$ ) que comprende la secuencia de aminoácidos HQKLVF y/o HQKLVFFAED para producir un medicamento para la prevención y/o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Según una forma de realización preferida de la presente invención, el compuesto comprende un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en SGEYVFH (C), SGQLKFP (C), SGQIWFR (C), SGEIHFN (C), GQIWFIS (C), GQIIFQS (C), GQIRFDH (C), GEMWFAL (C), GELQFPP (C), GELWFP (C), GEMQFFI (C), GELYFRA (C), GEIRFAL (C), GMIVFPH (C), GEIWFEG (C), GDLKFPL (C), GQILFPV (C), GELFFPK (C), GQIMFPR (C), GSLFFWP (C), GEILFGM (C), GQLKFPP (C), GTIFFRD (C), GQIKFAQ (C), GTLIFHH (C), GEIRFGS (C), GQIQFPL (C), GEIKFDH (C), GEIQFGA (C), GELFFEK (C), GEIRFEL (C), GEIYFER (C), SGEIYFER (C), AGEIYFER (C) y (C) GEIYFER.

Los compuestos particularmente preferidos de la presente invención comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos, anteriormente identificadas, por lo que el terminal C de dicho péptido puede o no comprender un resto de cisteína (indicado por paréntesis) para que el compuesto obtenido se puede acoplar, por ejemplo, a una molécula portadora. Sin embargo, es desde luego también posible enlazar con el terminal N de dicho péptido un resto de cisteína.

Según una forma de realización particularmente preferida de la presente invención, la secuencia de aminoácidos se selecciona de entre el grupo que consiste en GELWFP (C), GEIWFEG (C), GEIYFER (C), GEILFGM (C), GEIKFDH (C), GEIQFGA (C) (todos los cuales son péptidos competidores) y GEIKFDH (C), GEIRFGS (C), SGQLKFP (C), SGQIWFR (C), SGEIHFN (C), GELWFP (C), GEIWFEG (C), GEIYFER (C), GEIQFGA (C), SGEYVFH (C) ( todos los cuales son capaces de provocar *in vivo* la formación de anticuerpos dirigidos a los péptidos A $\beta$  mencionados anteriormente).

Otro aspecto de la presente invención se refiere a la utilización de al menos un compuesto que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en AIPLFVM (C), KLPLFVM (C), QLPLFVL (C) y NDAKIVF (C) para la producción de un medicamento para prevenir y/o tratar la enfermedad de Alzheimer.

Cada uno de los compuestos de la presente invención es capaz de provocar la formación *in vivo* de anticuerpos dirigidos a péptidos derivados de A $\beta$ 40/42 incluyendo A $\beta$ 1-40/42, y las formas truncadas en el terminal N como A $\beta$ 3-40/42, A $\beta$  (pE) 3-40/42, A $\beta$ 11-40/42 sin modificar, modificado A $\beta$ p(E)11-40/42 y A $\beta$ 14-40/42, respectivamente. Puesto que los compuestos de la presente invención están aislados por un anticuerpo que se dirige a los restos de los aminoácidos 14 a 19 de A $\beta$ , los compuestos de la presente invención son capaces de provocar la formación de anticuerpos que pueden unirse a truncamientos del péptido A $\beta$  partiendo de la posición del aminoácido 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ó 14 de los péptidos A $\beta$ . Por lo tanto estos compuestos son particularmente muy adecuados

para tratar y/o prevenir la EA porque la administración de al menos uno de dichos compuestos produce la formación de anticuerpos que son capaces de reconocer las principales formas A $\beta$ , por ejemplo, A $\beta$ 1-40/42, A $\beta$ E3-40/42 y A $\beta$ 3-40/42. Estos mimotopos además no pueden producir una reactividad cruzada con los neoepítomos presentes en sPPA alfa tras la escisión de PPA y por lo tanto no interfieren con la señalización normal de sPPA alfa.

5 Los compuestos de la presente invención, en particular los péptidos de la presente invención pueden modificarse además en su terminal N por una reacción de acilación y/o acetilación. Por ejemplo, un compuesto particularmente preferido comprende la secuencia de aminoácidos AC-GEIYFER (C).

10 Según la presente invención, el término "mimotopo" se refiere a una molécula con una configuración que tiene una topología equivalente al epítomo de la que es una simulación. El mimotopo se une a la misma región de unión al antígeno de un anticuerpo que se une de manera inmuno-específica a un antígeno deseado. El mimotopo provocará una respuesta inmunológica en un hospedador que es reactivo con el antígeno para el que es una simulación. El mimotopo puede también actuar como un competidor para el epítomo del que es una simulación en ensayos de inhibición *in vitro* (por ejemplo, ensayos de inhibición ELISA) que implican el epítomo y un anticuerpo de unión a dicho epítomo. Sin embargo, un mimotopo de la presente invención no necesariamente puede prevenir o competir con la unión del epítomo de la que es una simulación en un ensayo de inhibición *in vitro*, aunque es capaz de provocar una respuesta inmunitaria específica cuando se administra a un mamífero.

20 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "epítomo" se refiere a una región inmunógena de un antígeno que es reconocido por una molécula de anticuerpo concreta. En general, un antígeno poseerá uno o más epítomos, cada uno capaz de unirse a un anticuerpo que reconoce el epítomo concreto.

25 Los mimotopos de la presente invención pueden producirse sintéticamente por procedimientos de síntesis química que son bien conocidos en la técnica, ya sea como un péptido aislado o como parte de otro péptido o polipéptido. Alternativamente, el mimotopo peptídico puede producirse en un microorganismo que produce el mimotopo peptídico que se aísla a continuación y, si se desea, purificarse además. El mimotopo peptídico puede producirse en microorganismos tales como bacterias, levaduras u hongos, en células eucariotas tales como una célula de mamífero o una célula de insecto o en un vector de virus recombinante, tales como adenovirus, poxvirus, herpesvirus, virus forestal Simliki, baculovirus, bacteriófago, virus sindbis o virus sendai. Las bacterias adecuadas para producir el mimotopo peptídico incluyen *E. coli*, *B. subtilis* o cualquier otra bacteria que sea capaz de expresar péptidos tal como el mimotopo peptídico. Los tipos adecuados de levadura para expresar el mimotopo peptídico incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida*, *Pichia pastoris* o cualquier otra levadura capaz de expresar péptidos. Los procedimientos correspondientes son bien conocidos en la técnica. También los procedimientos para aislar y purificar péptidos producidos de forma recombinante son bien conocidos en la técnica e incluyen por ejemplo, como filtración en gel, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, etc.

40 Para facilitar el aislamiento del mimotopo peptídico, se puede preparar un polipéptido de fusión en el que el mimotopo peptídico se fusiona en la traducción (se une por enlace covalente) a un polipéptido heterólogo que permite el aislamiento por cromatografía de afinidad. Son típicos los polipéptidos heterólogos His-Tag (por ejemplo, His<sub>6</sub>; 6 restos de histidina), GST-Tag (glutación-S-transferasa), etc. El polipéptido de fusión facilita no sólo la purificación de los mimotopos sino también puede evitar que el mimotopo polipéptido se degrade durante la purificación. Si se desea eliminar el polipéptido heterólogo después de la purificación el polipéptido de fusión puede comprender un sitio de escisión en la unión entre el mimotopo peptídico y el polipéptido heterólogo. El sitio de escisión consiste en una secuencia de aminoácidos que se escinde con una enzima específica para la secuencia de aminoácidos en el sitio (por ejemplo, proteasas).

50 Los mimotopos de la presente invención también pueden modificarse en sus terminales N y/o C o cerca de los mismos de modo que en dichas posiciones esté unido a los mismos un resto de cisteína. En una forma de realización preferida se utilizan restos de cisteína colocados en el terminal (situados en los terminales N y C del péptido) para ciclar los péptidos mediante un enlace disulfuro.

55 Los mimotopos de la presente invención también se pueden utilizar en diversos ensayos y kits, en particular en ensayos inmunológicos y kits. Por lo tanto, se prefiere especialmente que el mimotopo pueda formar parte de otro péptido o polipéptido, en particular de una enzima que se utiliza como informadora en los ensayos inmunológicos. Dichas enzimas informadoras incluyen por ejemplo fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante.

60 Los mimotopos según la presente invención son preferentemente polipéptidos antigénicos que en su secuencia de aminoácidos varían de la secuencia de aminoácidos de A $\beta$  o de fragmentos de A $\beta$ . A este respecto, los mimotopos de la invención no sólo pueden comprender sustituciones de aminoácidos de uno o más aminoácidos naturales sino también de uno o más aminoácidos artificiales (es decir, no de los 20 aminoácidos "clásicos") o pueden ser completamente montados de dichos aminoácidos artificiales. Por otra parte, los antígenos de la invención que inducen anticuerpos dirigidos y que se unen a A $\beta$ 1-40/42, A $\beta$ pE3-40/42, A $\beta$ 3-40/42, A $\beta$ 11-40/42, A $\beta$ pE11-40/42 y A $\beta$ 14-40/42 (y otras formas truncadas de A $\beta$  en el terminal N partiendo de las posiciones de aminoácidos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13) pueden montarse de D- o L-amino ácidos o de combinaciones de DL-aminoácidos y,

opcionalmente, pueden haberse cambiado por otras modificaciones, cierres de anillo o modificaciones. Se pueden proporcionar antígenos inductores de anticuerpos adecuados procedentes de bancos de péptidos disponibles en el mercado. Preferentemente, estos péptidos son por lo menos de 7 aminoácidos, y las longitudes preferidas puede ser de hasta 16, preferentemente de hasta 14 ó 20 aminoácidos (por ejemplo 5 a 16 restos de aminoácidos). Según la invención, sin embargo, también pueden emplearse muy bien péptidos más largos como antígenos inductores de anticuerpos. Además, los mimotopos de la presente invención también pueden formar parte de un polipéptido y, por consiguiente comprender en su terminal N y/o C al menos otro resto de aminoácido.

Para la preparación de los mimotopos de la presente invención (es decir, los antígenos que producen anticuerpos descritos en la presente memoria), por supuesto, también son adecuados los bancos de fagos, los bancos de péptidos, por ejemplo producidos por medio de la química combinatoria u obtenidos por medio de técnicas de cribado de alto rendimiento para la mayoría de las estructuras variables (Display: A Laboratory Manual por Carlos F. Barbas (Editor), *et al.*; Willats WG Phage display: practicalities and prospects. *Plant Mol. Biol.*. Diciembre 2002; 50 (6) :837-54).

Además, según la invención también pueden emplearse antígenos productores de anticuerpos anti-A $\beta$ 1-40/42, -A $\beta$ pE3-40/42-, -A $\beta$ 3-40/42-, -A $\beta$ 11-40/42- A $\beta$ pE11-40/42- y A $\beta$ 14-40/42 a base de ácidos nucleicos ("aptámeros"), y éstos, también, se pueden encontrar con los bancos más variados (oligonucleótidos) (por ejemplo con 2 a 180 restos de ácidos nucleicos) (por ejemplo, Burgstaller *et al.*, *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.* 5 (5) (2002), 690-700; Famulok *et al.*, *Acc. Chem. Res.* 33 (2000), 591-599; Mayer *et al.*, *PNAS* 98 (2001), 4961-4965, etc.) En antígenos que producen anticuerpos a base de ácidos nucleicos, el eje central de ácido nucleico puede ser proporcionado por ejemplo, por los compuestos naturales de diéster fosfórico o también por fosforotioatos o combinaciones o variaciones químicas (por ejemplo, como APN), en las que como bases, según la invención pueden emplearse principalmente U, T, A, C, G, H y mC. Los restos en 2' de los nucleótidos que pueden utilizarse según la presente invención son preferentemente H, OH, F, Cl, NH<sub>2</sub>, O-metilo, O-etilo, O-propilo u O-butilo, en los que los ácidos nucleicos también pueden estar modificados de manera diferente, es decir, por ejemplo, con grupos protectores, como se emplean normalmente en la síntesis de oligonucleótidos. Por lo tanto, los antígenos que producen anticuerpos a base de aptámeros son también antígenos preferidos productores de anticuerpos dentro del alcance de la presente invención.

Según una forma de realización preferida de la presente invención, el compuesto está acoplado a un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferentemente KLH (hemocianina de lapa californiana), vacuna antitetánica, proteína de unión a albúmina, albúmina de suero bovino, un dendrímero (MAP; *Biol. Chem.* 358: 581), enlazadores peptídicos (o regiones flanqueantes), así como las sustancias coadyuvantes descritas en Singh *et al.*, *Nat. Biotech.* 17 (1999), 1075-1081 (en particular los de la Tabla 1 de este documento) y O'Hagan *et al.*, *Nature Reviews, Drug Discovery* 2 (9) (2003), 727-735 (en particular los compuestos endógenos inmunopotenciadores y sistemas de suministro descritos en la presente memoria), o mezclas de los mismos. La química de conjugación (por ejemplo, por medio de compuestos heterobifuncionales tal como GMBS y por supuesto también otros como los descritos en "*Bioconjugate Techniques*", Greg T. Hermanson) en este contexto se pueden seleccionar a partir de reacciones conocidas por el experto en la materia. Por otra parte, la composición de vacuna puede formularse con un adyuvante, preferentemente una composición con poco aluminio soluble, en concreto, hidróxido de aluminio. Desde luego, pueden utilizarse también adyuvantes tales como fosfato de aluminio MF59, fosfato de calcio, citocinas (por ejemplo, IL-2, IL-12, GM-CSF), saponinas (por ejemplo, QS21), derivados de MDP, oligos CpG, LPS, MPL, polifosfacenos, emulsiones (por ejemplo, de Freund, SAF), liposomas, virosomas, complejos inmunoestimulantes (ISCOM), cocleatos, micropartículas de PLG, partículas de poloxámero, partículas similares a virus, enterotoxina lábil al calor (LT), toxina del cólera (TC), toxinas mutantes (por ejemplo, LTK63 y LTR72), micropartículas y/o liposomas polimerizados.

El compuesto de la presente invención está preferentemente unido al vehículo o adyuvante a través de un enlazador, que se selecciona de entre el grupo que consiste en NHS-poli (óxido de etileno) (PEO) (por ejemplo, NHS-PEO<sub>4</sub>-maleimida).

Una vacuna que comprende el presente compuesto (mimotopo) y el vehículo farmacéuticamente aceptable se pueden administrar por cualquier modo adecuado de aplicación, por ejemplo id., iv., ip., im., por vía intranasal, oral, subcutánea, etc., y en cualquier dispositivo de administración adecuado (O'Hagan *et al.*, *Nature Reviews, Drug Discovery* 2 (9), (2003), 727-735). El compuesto de la presente invención se formula preferentemente para administración intravenosa, subcutánea, intradérmica o intramuscular (véase, por ejemplo "Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations", Sarfaraz Niazi, CRC Press Inc., 2004).

El medicamento (vacuna) según la presente invención contiene el compuesto según la invención en una cantidad comprendida entre 0,1 ng y 10 mg, preferentemente 10 ng a 1 mg, en particular 100 ng a 100  $\mu$ g, o, alternativamente, por ejemplo, 100 fmol a 10  $\mu$ mol, preferentemente de 10 pmol a 1  $\mu$ mol, en particular 100 pmol a 100 nmol. Por lo general, la vacuna puede contener también sustancias auxiliares, por ejemplo, tampones, estabilizantes, etc.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a la utilización de un compuesto como se ha definido anteriormente para el tratamiento y/o la mejora de los síntomas de sinucleopatía.

5 Sorprendentemente resultó que los compuestos de la presente invención también se puede utilizar para tratar y aliviar los síntomas asociados a sinucleopatías.

10 Las amiloidosis y sinucleopatías están asociadas a la acumulación cerebral de  $\beta$ -amiloide y  $\alpha$ -sinucleína, respectivamente. Algunos pacientes presentan características clínicas y patológicas de ambas enfermedades, aumentando la posibilidad de superposición de las vías patógenas. Estos pacientes también se clasifican en la medida en que padecen un síndrome recién identificado descrito como demencia con cuerpos de Lewy o enfermedad de Parkinson con demencia (DLB/PDD). En un modelo animal transgénico reciente para DLB/PDD se ha demostrado que la sobreexpresión de ambas,  $\alpha$ -sinucleína y proteína precursora de amiloide (hPPA), en ratones da lugar al desarrollo de alteraciones cognitivas y motrices acompañadas por la pérdida de neuronas colinérgicas y la reducción en vesículas sinápticas, formación de placas amiloides extensas e inclusiones fibrilares intraneuronales inmunorreactivas a haSYN. Todas estas características se encuentran también en el síndrome de DLB/PDD. Se ha descrito recientemente que ambas moléculas son potencialmente capaces de interactuar y formar oligómeros híbridos *in vitro*. También se ha demostrado que la sobreexpresión de la PPA puede emperorar algunos de los efectos patológicos de la sobreexpresión de  $\alpha$ -sinucleína. Por el contrario,  $\alpha$ -sinucleína es capaz de aumentar la secreción y la toxicidad de los péptidos beta amiloides y por lo tanto podría también aumentar los efectos de  $\beta$ -amiloide que apoyan la noción de la superposición de las vías patógenas en los procesos neurodegenerativos.

20 En ambas proteopatías progresivas la acumulación de oligómeros peptídicos se ha identificado como uno de los episodios tóxicos principales que conducen a diversas alteraciones típicas ya sea para sinucleopatías o amiloidosis. A pesar de esta similitud mecánica, se supone que  $\alpha$ -sinucleína y A $\beta$  tienen distintos efectos, así como convergentes y patógenos sobre la integridad y la función del cerebro. Se cree que las sinucleínas afectan la función motriz de manera más grave que la función cognitiva, mientras que los péptidos  $\beta$ -amiloides se describe que tienen efectos opuestos. La razón de esta discrepancia es actualmente desconocida, pero excluye una descripción clara de las interdependencias y efectos de ambas moléculas.

25 El método de tratamiento presentado en la presente invención consiste en describir una inmunoterapia dirigida a A $\beta$  que dará lugar a la eliminación del amiloide principalmente extracelular. Así, se considera que alivia las alteraciones amiloides asociadas que comprenden desde la deposición de la placa a la muerte neuronal, así como a problemas de memoria y deterioro cognitivo. La localización subcelular de sinucleínas sin embargo indica que estas proteínas intracelulares son principalmente activas en la sinapsis, especialmente limitadas a las vesículas sinápticas. Curiosamente, también acumulaciones sinucleína, que son el sello patológico unificador de sinucleopatías, se detectan principalmente en el interior de las células. Además, las sinucleopatías subyacentes del mecanismo patógeno se cree que son atribuibles a los cambios intraneuronales que comprenden desde la disfunción mitocondrial, la acumulación de proteínas replegadas de forma anormal, omnipresentes o fosforiladas así como la acumulación de alfa sinucleína. Estas alteraciones están produciendo como consecuencia cambios en las funciones sinápticas, insuficiencia sináptica y pérdida de neuronas dopaminérgicas y signos clínicos clásicos de sinucleopatías. Por el contrario A $\beta$  se puede detectar principalmente fuera de las neuronas y las placas amiloides, así como en fibrillas, protofibrillas y oligómeros de beta amiloide pueden ejercer funciones neurotóxicas cuando se aplican fuera de las células o en el interior del cerebro. Por lo tanto, es un hallazgo sorprendente para el experto que un método dirigido principalmente al amiloide extracelular podría reducir los síntomas desinucleopatías como PD, que están afectando principalmente a procesos intracelulares que conducen a los síntomas típicos descritos a continuación. Es aún más sorprendente, como se cree actualmente que los efectos de superposición de ambas moléculas son producidos por interacciones directas de dos proteínas que se producirían principalmente en el interior de las células.

30 Según la presente invención, el término "sinucleinopatía" incluye todos los trastornos neurodegenerativos caracterizados por conjuntos patológicos de sinucleína. Varios trastornos neurodegenerativos incluyendo la enfermedad de Parkinson (EP), la enfermedad con cuerpos de Lewy (ECL), enfermedad difusa con cuerpos de Lewy (EDCL), demencia con cuerpos de Lewy (DCL), Parkinson con demencia (PDD), atrofia multisistémica (AMS) y neurodegeneración con acumulación de hierro encefálica tipo I (NBIA tipo I) se agrupan en conjunto como sinucleinopatías.

35 "Síntomas de sinucleopatía", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a los síntomas de los sinucleopatías, en particular la enfermedad de Parkinson, que afecta el comportamiento motriz y no motriz de un paciente que padece dicha enfermedad. "Los síntomas motores" incluyen temblor en reposo, bradicinesia, rigidez, inestabilidad ortostática, postura encorvada, distonía, fatiga, habilidad alterada de la motricidad fina y coordinación motriz, coordinación motriz gruesa alterada, pobreza de movimiento (disminución del balanceo del brazo), acatisia, problemas del habla, por ejemplo, como la debilidad de la voz o dificultad para hablar causada por la falta de control muscular, pérdida de la expresión facial, o "máscara", micrografía, dificultad para tragar, disfunción sexual, babeo, etc. Los síntomas "no motrices" incluyen dolor, demencia o confusión, alteraciones del sueño, estreñimiento, problemas de piel, depresión, miedo o ansiedad, dificultades de memoria y lentitud de pensamiento, problemas urinarios, fatiga y dolor, pérdida de energía, comportamiento compulsivo, calambres, etc.



Según una forma de realización preferida de la presente invención la sinucleopatía se selecciona de entre el grupo de la enfermedad de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewy, atrofia multisistémica y la neurodegeneración con acumulación de hierro encefálica. Es particularmente preferida la enfermedad de Parkinson.

5 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un péptido que tiene o que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en SHTRLYF (C), SGEYVFH (C), SGQLKFP (C), SGQIWFR (C), SGEIHFN (C), GQIWFIS (C), NDAKIVF (C), GQIIFQS (C), GQIRFDH (C), HMRLFFN (C), GEMWFAL (C), GELQFPP (C), GELWFP (C), SHQRLWF (C), HQKMIFA (C), GEMQFFI (C), GELYFRA (C), GEIRFAL (C), GMIVFPH (C), GEIWFEG (C), GEIYFER (C), AIPLFVM (C), GDLKFPL (C), GQILFPV (C), GELFFPK (C), GQIMFPR (C), HMRMYFE (C), GSLFFWP (C), GEILFGM (C), GQLKFPF (C), KLPLFVM (C), GTIFFRD (C), THQRLWF (C), GQIKFAQ (C), GTLIFHH (C), GEIRFGS (C), GQIQFPL (C), GEIKFDH (C), GEIQFGA (C), QLPLFVL (C), HQKMIF (C), GELFFEK (C), GEIRFEL (C), AcGEIYFER (C), SGEIYFER (C), AGEIYFER (C) y GEIYFER (C). Como se indica mediante el empleo de paréntesis los péptidos de la presente invención pueden o no comprender el resto de cisteína en el terminal C o N. Por consiguiente, la presente invención comprende también las secuencias de aminoácidos siguientes: SHTRLYF, SGEYVFH, SGQLKFP, SGQIWFR, SGEIHFN, GQIWFIS, NDAKIVF, GQIIFQS, GQIRFDH, HMRLFFN, GEMWFAL, GELQFPP, GELWFP, SHQRLWF, HQKMIFA, GEMQFFI, GELYFRA, GEIRFAL, GMIVFPH, GEIWFEG, GEIYFER, AIPLFVM, GDLKFPL, GQILFPV, GELFFPK, GQIMFPR, HMRMYFE, GSLFFWP, GEILFGM, GQLKFPF, KLPLFVM, GTIFFRD, THQRLWF, GQIKFAQ, GTLIFHH, GEIRFGS, GQIQFPL, GEIKFDH, GEIQFGA, QLPLFVL, HQKMIF, GELFFEK, GEIRFEL, SGEIYFER, y AGEIYFER.

10 Según una forma de realización preferida, el péptido está acoplado a un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferentemente KLH (hemocianina de lapa californiana).

15 Todavía otro aspecto de la presente invención se refiere a una formulación farmacéutica, preferentemente una vacuna que comprende por lo menos un péptido según la presente invención. Dicha formulación farmacéutica puede utilizarse para tratar individuos que padecen la enfermedad de Alzheimer o prevenir la formación de placas AB en un individuo para impedir la formación de la enfermedad de Alzheimer.

20 La presente invención se ilustra además mediante las siguientes figuras y ejemplos, sin estar limitada sin embargo a los mismos.

La figura 1 muestra la unión del anticuerpo monoclonal MV-002 a péptidos específicos y proteínas recombinantes.

25 La figura 2 muestra ensayos típicos de unión con mimotopos para  $\beta$ -amiloide y fragmentos de  $\beta$ -amiloide truncados en el terminal N y/o modificados después de la traducción.

La figura 3 muestra ensayos típicos de inhibición con mimotopos para  $\beta$ -amiloide y fragmentos de  $\beta$ -amiloide truncados en el terminal N y/o modificados después de la traducción.

30 La figura 4 muestra ejemplos de caracterizaciones *in vivo* de la respuesta inmunitaria provocada por vacunación con mimotopo (péptido inyectado/péptido irrelevante).

La figura 5 muestra ejemplos para la caracterización *in vivo* de la respuesta inmunitaria provocada por vacunación con mimotopo contra fragmentos de beta amiloide y SPPA-alfa.

35 La figura 6 muestra ejemplos para la caracterización *in vivo* de la respuesta inmunitaria provocada por la vacunación con mimotopo contra A $\beta$ 40/42 completo.

La figura 7 muestra las áreas ocupadas por placas amiloides. Tg2576 se inyectaron 6 veces con vacunas de mimotopo con hidróxido de aluminio (ALUM) como adyuvante por inoculación sc. una vez al mes. Los ratones de referencia recibieron PBS-ALUM solamente. El área ocupada por las placas amiloides se muestra en porcentaje del grupo de referencia. Grupo de referencia Gr1 ...; Gr2 ... recibido P4675.

## Ejemplos

### Métodos

40 Los anticuerpos utilizados para la identificación de mimotopos según la presente invención detectan secuencias de aminoácidos derivadas de A $\beta$  humano pero no se unen a PPA humana completa. Las secuencias detectadas incluyen EVHHQKLVFFAED (= epítipo original aa11-24 de A $\beta$ ) y p (E) VHHQKLVF (p4374 = original epítipo aa11-19 de A $\beta$  con una modificación de piroglutamato en el terminal N). El anticuerpo puede ser un preparado de anticuerpo monoclonal o policlonal, o cualquier parte de anticuerpo o derivado del mismo, siendo el único requisito que la molécula de anticuerpo reconozca específicamente al menos uno de los epítipos mencionados anteriormente (derivado de A $\beta$  humano), pero no se una a la PPA humana completa.

Los mimotopos se identifican y se caracterizan además con dichos bancos de anticuerpos monoclonales y de péptidos.

**Ejemplo 1: Generación de anticuerpos monoclonales para detectar específicamente  $\beta$ -amiloides y fragmentos de  $\beta$ -amiloides truncados en el terminal N y/o modificados después de la traducción**

Se generó un anticuerpo monoclonal derivado de la fusión de experimento Alz-9: ratones C57/B16 se inmunizaron repetidamente con el original epítipo HQKLVFC de A $\beta$  acoplado a KLH (hemocianina de lapa californiana) y alumbre (hidróxido de aluminio) como adyuvante. Se detectaron hibridomas productores de anticuerpos específicos para el péptido p4377 por ELISA (placas ELISA recubiertas con péptido p4377). La A $\beta$ 40/42 humana (proteína recombinante) se utilizó como péptido positivo de referencia: hibridomas que reconocen la proteína recombinante inmovilizada sobre placas de ELISA se incluyeron debido a que estaban uniéndose específicamente tanto al péptido como A $\beta$  completo. Se utilizó p1454 (A $\beta$  33-40 humano) como péptido negativo de referencia. Además se ensayaron hibridomas frente a p4374, p1323 y sPPA alfa. Sólo los hibridomas con buena unión a p4374 y p1323 y una falta de unión a SPPA-alfa se utilizaron para el desarrollo de anticuerpo adicional.

El clon MV-002 de hibridoma (denominación interna A115; IgG2b), se purificó y se analizó para la detección específica de p1323, p4374, p4377, p1454, A $\beta$  y Sapp alfa, respectivamente. MV-002 reconoció los epítipos p1323 así como p4377 y la proteína A $\beta$  completa (proteína recombinante; adquirida en Bachem AG, Bubendorf, Suiza) en ELISA. No obstante, no se detectó p1454 en ELISA. Además, los anticuerpos MV-002 no pudieron detectar SPPA-alfa, pero se unieron específicamente al péptido p4374 que codifica la versión piroglutamato de A $\beta$ 11-19.

**Ejemplo 2: Presentación de fago, unión in vitro e inhibición por ELISA**

Los bancos de presentación de fagos utilizados en este ejemplo fueron: Ph.D. 7: New England BioLabs E8102L (lineal banco de heptámeros lineales). La presentación en fagos se realizó según el protocolo del fabricante ([www.neb.com](http://www.neb.com)).

Después de 2 ó 3 rondas posteriores de adhesión celular sobre plástico, se recogieron los clones de cada uno de los fagos y sobrenadantes de los fagos se sometieron a ELISA en placas recubiertas con el anticuerpo que se usó para el procedimiento de adhesión celular sobre plástico. Los clones de fagos que fueron positivos en este ensayo ELISA (señal fuerte para la diana, pero sin señal para la referencia no específica) se secuenciaron. A partir de secuencias de ADN, se dedujeron las secuencias de péptidos. Estos péptidos se sintetizaron y caracterizaron en ELISA de unión e inhibición. Además, se crearon algunos mimotopos nuevos combinando la información de la secuencia de los mimotopos identificados en la pantalla para ayudar a la identificación de una secuencia de consenso para una vacunación con mimotopos.

*1. Ensayo de unión in vitro (ELISA)*

Los péptidos derivados de presentación en fagos, así como variantes de la misma se acoplaron a BSA y se unieron a placas de ELISA (1  $\mu$ M; como se indica en las figuras respectivas) y posteriormente se incubaron con el anticuerpo monoclonal que se utilizó en el procedimiento de detección para analizar la capacidad de unión de los péptidos identificados.

*2. Ensayo de inhibición in vitro (ELISA)*

Diferentes cantidades de péptidos (concentraciones comprendidas entre 5  $\mu$ g y 0,03  $\mu$ g; diluciones en serie), procedentes de la presentación del fago se incubaron con anticuerpo monoclonal que se utilizó para el procedimiento de detección. Los péptidos que disminuyen la unión posterior del anticuerpo al epítipo original revestidos sobre placas de ELISA se consideraron inhibidores en este ensayo.

**Ejemplo 3: Ensayo in vivo de mimotopos: análisis de la inmunogenicidad y reactividad cruzada**

*1. Ensayos in vivo de mimotopos*

Péptidos inhibidores, así como no inhibidores se acoplaron a KLH y se inyectaron en ratones de tipo salvaje (ratones C57/B16 naturales; inyección subcutánea en el costado), junto con un adyuvante apropiado (hidróxido de aluminio). Los animales se vacunaron 3 a 6 veces a intervalos quincenales, y los sueros se tomaron quincenalmente también. Los títulos de los péptidos inyectados, así como de un péptido irrelevante se determinaron con cada suero. Además, los títulos contra la proteína A $\beta$  humana recombinante, y frente a los péptidos originales se determinaron respectivamente. En general, los sueros se analizaron por reacción contra los péptidos acoplados a albúmina de suero bovino (BSA) y proteínas recombinantes completas, que se inmovilizaron en placas ELISA. Los títulos se determinaron utilizando anticuerpos anti-ratón específicos para IgG. Para resultados detallados véanse las Figuras 4, 5 y 6 respectivamente.

## 2. Resultados

2.1. Identificación de anticuerpos monoclonales específicos (mAb) dirigidos contra formas de A $\beta$  truncadas en el terminal N y modificadas:

5 La Figura 1 representa la caracterización del anticuerpo monoclonal MV-002 (denominación interna A115; IgG2b) procedente del experimento Alz-9 que demuestra la especificidad para A $\beta$  completa y fragmentos de A $\beta$  truncados en la posición E11 y H14 y modificados en la posición E11 a PE11.

2.2. Cribado con mAb específicos dirigidos contra formas truncadas en el terminal N y modificadas de A $\beta$ :

## 2.2.1. Banco Ph. D. 7 de presentación de fagos

2.2.1.1. Cribado con anticuerpo monoclonal dirigido contra p1323

15 Se identificaron 47 secuencias cribando de bancos PhD 7 de presentación de fagos en este cribado: la Tabla 1 resume los péptidos identificados y su capacidad de unión en comparación con el epítipo original.

Tabla 1: Enlace de mimotopos al anticuerpo parental MV-002

Número interno de péptido	SEC. ID. nº	Secuencia	Capacidad de enlace
p4403	1	SHTRLYFC	1
p4404	2	SGEYVFHC	1
p4413	3	SGQLKFPC	1
p4414	4	SGQIWFRC	1
p4415	5	SGEIHFNFC	1
p4666	6	GQIWFISC	1
p4667	7	NDAKIVFC	3
p4668	8	GQIIFQSC	2
p4669	9	GQIRFDHC	3
p4670	10	HMRLFFNC	3
P4671	11	GEMWFALC	3
p4672	12	GELQFPPC	3
p4673	13	GELWFPC	3
p4674	14	SHQRLWFC	3
P4675	15	HQKMIFAC	3
p4676	16	GEMQFFIC	3
p4677	17	GELYFRAC	3
p4678	18	GEIRFALC	3
p4679	19	GMIVFPHC	3
p4680	20	GEIWFEGC	3
p4681	21	GEIYFERC	3
p4682	22	AIPLFVMC	1
p4683	23	GDLKFPLC	3
p4684	24	GQILFPVC	3
p4685	25	GELFFPKC	3
p4686	26	GQIMFPRC	3
p4687	27	HMRMYFEC	3
p4688	28	GSLFFWPC	2

(continuación)

Número interno de péptido	SEC. ID. nº	Secuencia	Capacidad de enlace
p4689	29	GEILFGMC	3
p4690	30	GQLKFPFC	3
p4691	31	KLPLFVMC	1
p4692	32	GTIFFRDC	1
p4693	33	THQRLWFC	3
p4694	34	GQIKFAQC	3
p4695	35	GTLIFHHC	2
p4696	36	GEIRFGSC	3
p4697	37	GQIQFPLC	3
p4698	38	GEIKFDHC	3
p4699	39	GEIQFGAC	3
p4700	40	QLPLFVL	1
p4794	41	HQKMIFC	2
p4795	42	GELFFEKC	2
p4796	43	GEIRFELC	2
p4804	44	Ac-GEIYFERC	2
p4805	45	SGEIYFERC	1
p4806	46	AGEIYFERC	1
p4807	47	CGEIYFER	1

Legenda de la Tabla 1: la capacidad de enlace está codificada por el siguiente código de enlace: 1: X describe el factor de dilución de la AB parental. Ac-... indica aminoácido etilado

5	<b>código de enlace</b>	<b>DO mitad máx.</b>
		<b>1: X</b>
	0 sin enlace	: 0
10	1 enlace débil	: <40000
	2 enlace medio	:40000-320000
15	3 enlace fuerte	:>320000

### 2.3. Caracterización *in vitro* de mimotopos identificados en el cribado de bancos de presentación de fagos con anticuerpos monoclonales dirigidos contra formas de AB con terminal N truncado y modificadas:

Las figuras 2 y 3 muestran ejemplos representativos para la unión y los ensayos de inhibición utilizados para caracterizar mimotopos *in vitro*. Los datos obtenidos se resumen en las Tablas 1 y 2 respectivamente.

Mimotopos de MV-002: De las 47 secuencias presentada 11 secuencias inhibieron la unión del anticuerpo monoclonal MV-002 en experimentos de competencia *in vitro*. Se identificaron 36 secuencias más que no inhibían la unión del anticuerpo monoclonal en experimentos de competencia *in vitro*, pero todavía conservaban la capacidad de unión al anticuerpo parental (Tabla 2). Es importante destacar que, tal como se describe en las figuras 4 a 6, la capacidad para competir con el epítipo original para la unión al anticuerpo parental *in vitro* no era requisito para montar respuestas inmunitarias específicas por reacción cruzada con péptidos específicos *in vivo*. Por lo tanto la inhibición así como la ausencia de inhibición de péptidos pueden utilizarse para provocar respuestas inmunitarias que detectan de péptidos *in vivo* (para más detalles véanse: las figuras 4 a 6) que pueden conducir a la eliminación de los péptidos amiloides del cerebro.

Tabla 2: mimotopos identificados en la presente invención que dan resultados positivos en ensayos de inhibición; mimotopos MV-002

Número interno de péptido	SEC. ID. nº	Secuencia	Capacidad de inhibición
p4667	7	NDAKIVFC	1
p4670	10	HMRLFFNC	1
p4673	13	GELWFPC	1
p4674	14	SHQRLWFC	1
P4675	15	HQKMIFAC	2
p4680	20	GEIWFEGC	2
p4681	21	GEIYFERC	2
p4689	29	GEILFGMC	1
p4698	38	GEIKFDHC	2
p4699	39	GEIQFGAC	1
p4794	41	HQKMIFC	1

- 5 Leyenda de la Tabla 2: la capacidad de inhibición está codificada por el código siguiente: inhibición débil significa que se necesita más péptido para disminuir la unión de antibiótico que con el epítipo original; fuerte inhibición significa que cantidades similares de péptidos son necesarias para el mimotopo y el epítipo para disminuir la unión de AB. Los mimotopos se comparan con el péptido original como patrón. DO a 5 µg de péptido utilizado en el ensayo se utiliza para calcular la capacidad de competencia en comparación con el péptido original.

Código de competencia	
0	sin inhibición (D.O. de péptido anterior 4,6 veces de péptido original)
1	Más débil que epítipo original (D.O. de péptido inferior a 4, 6 veces de péptido original)
2	fuerte inhibición (como epítipo original; D.O. de péptido inferior a 2, 3 veces de péptido original)

- 10 2.4. Caracterización *in vivo* de mimotopos identificados en el cribado de bancos de presentación de fagos con un anticuerpo monoclonal dirigido contra beta amiloide:

Ratones C57/B16 hembra, 5 a 6 por grupo, se inmunizaron por vía subcutánea con 30 g de péptido acoplado a KLH. A los grupos de referencia se les administraron conjugados epítipo-KLH originales respectivamente. Como adyuvante se utilizó alumbre (siempre 1 mg por ratón). Los péptidos administrados eran todos capaces de unirse a anticuerpos monoclonales específicamente, aunque algunos de los péptidos no inhibieron la unión del epítipo original a su anticuerpo parental *in vitro* (en un ensayo de inhibición *in vitro*). El ensayo ELISA *in vitro* para determinar el título de anticuerpos se realizó con suero de cada uno de los ratones después de cada vacunación en un intervalo de dos semanas (véase las figs. 6 y 7, respectivamente). Los títulos se calcularon como D.O. max/2 en todas las figuras mostradas. Los pocillos de la placa ELISA se recubrieron con conjugado mimotopo-BSA y un conjugado péptido-BSA irrelevante (referencia negativa). La referencia positivo se realizó mediante la reacción del anticuerpo parental con el conjugado mimotopo-BSA respectivo. La detección se realizó con anti-IgG de ratón. Además, las proteínas recombinantes se inmovilizaron en placas ELISA y sueros reaccionaron en consecuencia. Las figuras 4, 5 y 6 muestran ejemplos representativos para los ensayos utilizados para caracterizar mimotopos *in vivo*. Los resultados representados procedían de péptidos activos en ensayos de inhibición *in vitro* como p4670, P4675, p4680 y p4681 y un péptido sin capacidad de inhibición, p4403, respectivamente.

La figura 4 muestra ejemplos para caracterizaciones *in vivo* de la respuesta inmunitaria provocada por la vacunación con mimotopo mediante el análisis de la respuesta inmunitaria contra el péptido inyectado y un péptido irrelevante, que contiene una secuencia no relacionada. En los ejemplos mostrados, el epítipo p4377 y los mimotopos p4670, P4675, p4680, p4681 y p4403 provocaron respuestas inmunitarias contra los péptidos inyectados pero no pudieron provocar una respuesta inmunitaria inespecífica pertinente contra una secuencia no relacionada (p1454).

La figura 5 muestra ejemplos para caracterizaciones *in vivo* de la respuesta inmunitaria provocada por la vacunación con mimotopo contra el epítipo original respectivo del anticuerpo parental (p4377), así como contra los péptidos derivados de las especies truncadas de Aβ (p1323 y p4374) y contra sPPA alfa.

El p4377 y los mimotopos p4670, P4675, p4680, p4681 y p4403 montaron respuestas inmunitarias detectables contra el epítipo original p4377. Un fenómeno similar se pudo detectar analizando la reactividad cruzada frente a la forma modificada como muestra p4374. Curiosamente, el epítipo original y las vacunas de mimotopo montaron títulos relevantes contra p4374 forma modificada del epítipo original. Sorprendentemente, los mimotopos parecían ser capaces de provocar pero no necesariamente de provocar una respuesta inmunitaria más eficaz contra p1323 lo que indica un potencial para provocar una inmunoreactividad más amplia en comparación con el fragmento A $\beta$  original. Además, no se pudo detectar reactividad contra sPPA alfa.

La Figura 6 muestra ejemplos de caracterizaciones *in vivo* de la respuesta inmunitaria provocada por la vacunación con mimotopo contra A $\beta$  completa. Sorprendentemente, los mimotopos seleccionados utilizando MV-002 produjeron una reacción cruzada no sólo con los epítipos cortos truncados o modificados que se utilizan para crear los anticuerpos, sino también produjeron reactividad cruzada a las formas de A $\beta$  completa, no modificadas prácticamente la secuencia original, o incluso de manera más eficiente que p4377.

Curiosamente los péptidos competidores así como los que no compiten pudieron provocar respuestas inmunitarias similares interactuando específicamente con péptidos que contienen secuencias originales de A $\beta$ . De este modo los mimotopos presentados en la presente invención constituyen nuevas vacunas experimentales optimizadas para dirigirse a un amplio espectro de formas naturales de los péptidos A $\beta$  que se han encontrado en el cerebro de pacientes con EA. Las formas incluyen pero no se limitan a A $\beta$ 1-40/42 y formas truncadas en el terminal N como A $\beta$ 3-40/42, A $\beta$  (PE) 3-40/42, A $\beta$ 11-40/42 sin modificar, ASSP (E) 11-40/42 modificada y A $\beta$ 14-40/42 respectivamente. Es importante destacar que los mimotopos presentados tampoco producían una reactividad cruzada con los neopéptidos presentes en sPPA alfa después de la escisión de PPA y por lo tanto no interfieren con la señalización normal de sPPA alfa (véase la figura 5 para más detalles).

Tabla 3: Peptidos no mimotópicos utilizados

Péptido interno n°	SEC. ID. n°	Secuencia
P1253	48	DAEFRHDSGYC
p1323	49	CHQKLVFFAED
p4374	50	p (E) VHHQKLVFC
p4377	51	EVHHQKLVFC
p1454	52	CGLMVGGVV
A $\beta$ 1-40	53	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV, derivado de PPA humano (gi: 112927)
A $\beta$ 1-42	54	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVIA, derivado de PPA humano (gi: 112927)
sPPAalfa	55	producto de escisión producido por alfa-secretasa derivado de PPA humano (gi: 112927)

En la Tabla 4 se describen otros ejemplos de la respuesta inmunitaria provocada por la vacunación con mimotopos contra A $\beta$  completa utilizando mimotopos derivados de MV-002. Todos los péptidos presentados en la Tabla 4 montan reacciones inmunitarias específicas contra formas de A $\beta$  o fragmentos de las mismas completas y/o truncadas y modificadas.

Tabla 4: Caracterización *in vivo* de mimotopos: MV-002

Número de péptido interno	SEC. ID. n°	Detección de formas de A $\beta$ truncadas/modificadas
p4403	1	+
p4404	2	+
p4413	3	+
p4414	4	+
p4415	5	+
p4670	10	+
p4673	13	+

P4675	15	+
p4680	20	+
p4681	21	+
p4693	33	+
p4696	36	+
p4698	38	+
p4699	39	+

2. 5: Caracterización in vivo de mimotopos por eficacia para reducir la EA como enfermedad en animales transgénicos (prueba de análisis conceptual)

5 El modelo de ratón Tg2576 AD se utilizó para estudiar la eficacia preclínica de las vacunas con mimotopos. Esta estirpe transgénica está expresando PPA humana portadora de doble mutación sueca en la posición de aa 670/671 bajo el control de un activador de la proteína del prion de hámster (PrP), lo que da lugar a la sobreexpresión de la proteína. En la actualidad es uno de los modelos más utilizados en la investigación de Alzheimer. El modelo Tg2576 resume varias características de la patología de EA, incluyendo la deposición de placas amiloides específicas de la enfermedad y astrocitosis. Como todos los demás sistemas de modelo de EA disponibles hasta la fecha, no refleja todas las características neuropatológicas fundamentales de la EA.

15 Para evaluar si el tratamiento con mimotopos es capaz de evitar la acumulación de A $\beta$  en el cerebro, se inyectó por vía sc. a ratones Tg2576 6 veces a intervalos mensuales con conjugados péptido-KLH adsorbidos en alumbre (adyuvante: hidróxido de aluminio) o PBS adsorbido en alumbre (denominado PBS o referencia) solo. Más de ocho semanas después de la última inmunización, se sacrificaron los animales, se recogieron sus cerebros y se analizó su carga de A $\beta$  (patología tipo EA). Los ratones se sacrificaron bajo anestesia profunda. Posteriormente, se aisló el cerebro, se fijó en PFA al 4% y se deshidrató en series de etanol escalonadas seguidas de incubación en xileno y empapado en parafina. Cada cerebro embebido en parafina se seccionó a 7 $\mu$ M utilizando un micrótopo de corte en secciones y las secciones se montaron en portaobjetos de vidrio.

25 Como método para ensayar la patología de tipo EA en animales Tg2576, se analizó el área relativa ocupada por depósitos amiloides en el cerebro de los animales tratados. Este análisis se realizó utilizando un programa automático de reconocimiento de área. Para identificar las placas, las secciones se tiñeron con el anticuerpo monoclonal (mAb) 3A5 (específico para A $\beta$ 40/42). Los animales tratados con mimotopo se compararon con los animales de referencia. Todos los animales se han sacrificado a una edad de 13,5 a 14 meses. Para este análisis se seleccionaron 3 secciones/animales que cubren la corteza cerebral y el hipocampo, se tiñeron con mAb 3A5 y posteriormente se documentaron utilizando el sistema Mirax (Zeiss). Para el cálculo de la zona ocupada por placas amiloides, se analizaron hasta cuatro secciones individuales por portaobjetos y las secciones portadoras de artefactos de tejido e intensidades de tinción anormales se han excluido después de la inspección de las imágenes resultantes.

35 Para los mimotopos de MV002 se realizó un análisis de área utilizando un ejemplar experimental: El análisis se realizó después de la vacunación repetida utilizando vacunas con conjugado péptido-KLH. El grupo referencia presentó una ocupación media del 0,35% en comparación con el 0,24% de los animales tratados con mimotopos respectivamente. Esto corresponde a una reducción después del tratamiento con mimotopo de 31% en el grupo 2.

Por lo tanto, este conjunto de datos indica claramente un efecto beneficioso del tratamiento con la vacuna de mimotopo en la EA como patología en animales transgénicos.

## REIVINDICACIONES

1. Utilización de por lo menos un compuesto que comprende la secuencia de aminoácidos

5  $(X_1)_mHX_2X_3X_4X_5FX_6(X_7)_n$  (Fórmula II),

en la que

10  $X_1$  es serina (S), treonina (T) o cisteína (C),

$X_2$  es la glutamina (Q), treonina (T) o metionina (M),

$X_3$  es lisina (K) o arginina (R),

15  $X_4$  es la leucina (L), metionina (M),

$X_5$  es triptófano (W), tirosina (Y), fenilalanina (F) o isoleucina (I),

20  $X_6$  es asparagina (N), ácido glutámico (E), alanina (A) o cisteína (C),

$X_7$  es cisteína (C),

n y m son, independientemente, 0 ó 1,

25 presentando dicho compuesto una capacidad de unión a un anticuerpo que es específico para un epítipo del péptido beta amiloide (A $\beta$ ) que comprende la secuencia de aminoácidos HQKLVF y/o HQKLVFFAED

para producir un medicamento destinado a la prevención y/o al tratamiento de la  $\beta$ -amiloidosis que incluye la enfermedad de Alzheimer.

30 2. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada porque el compuesto comprende un péptido que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo constituido en SHTRLFY (C), HMRLFFN (C), SHQRLWF (C), HQKMIFA (C), HMRMYFE (C), THQRLWF (C) y HQKMIF (C).

35 3. Utilización de por lo menos un compuesto que comprende la secuencia de aminoácidos

$(X_1)_mGX_2X_3X_4FX_5X_6(X_7)_n$  (Fórmula I),

en la que

40  $X_1$  es serina (S), alanina (A) o cisteína (C),

$X_2$  es serina (S), treonina (T), ácido glutámico (E), ácido aspártico (D), glutamina (Q) o metionina (M),

45  $X_3$  es isoleucina (I), tirosina (Y), metionina (M) o leucina (L),

$X_4$  es leucina (L), arginina (R), glutamina (Q), triptófano (W), valina (V), histidina (H), tirosina (Y), isoleucina (I), lisina (K) metionina (M) o fenilalanina (F),

50  $X_5$  es alanina (A), fenilalanina (F), histidina (H), asparagina (N), arginina (R), ácido glutámico (E), isoleucina (I), glutamina (Q), ácido aspártico (D), prolina ( P) o triptófano (W), glicina (G),

$X_6$  es cualquier resto de aminoácido,

55  $X_7$  es cisteína (C),

m y n son, independientemente, 0 ó 1,

60 presentando dicho compuesto una capacidad de unión a un anticuerpo que es específico para un epítipo del péptido beta-amiloide (A $\beta$ ) que comprende la secuencia de aminoácidos HQKLVF y/o HQKLVFFAED para producir un medicamento destinado a la prevención y/o al tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

65 4. Utilización según la reivindicación 3, caracterizada porque el compuesto comprende un péptido que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en SGEYVFH (C), SGQLKFP (C), SGQIWFR (C), SGEIHFN (C), GQIWFIS (C), GQIIFQS (C), GQIRFDH (C), GEMWFAL (C), GELQFPP (C), GELWFP



(C), GEMQFFI (C), GELYFRA (C), GEIRFAL (C), GMIVFPH (C), GEIWFEG (C), GQILFPV (C) GELFFPK, (C), GQIMFPR (C), GSLFFWP (C), GEILFGM (C), GQLKFPF (C), GTIFFRD (C), GQIKFAQ (C), GTLIFHH (C), GEIRFGS (C), GQIQFPL (C) GEIKFDH, (C), GEIQFGA (C), GELFFEK (C), GEIRFEL (C), GEIYFER (C), SGEIYFER (C), AGEIYFER (C) y GEIYFER (C).

5 5. Utilización de por lo menos un compuesto que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en AIPLFVM (C), KLPLFVM (C), QLPLFVL (C) y NDAKIVF (C) para la producción de un medicamento destinado a prevenir y/o a tratar la  $\beta$ -amiloidosis incluyendo la enfermedad de Alzheimer.

10 6. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada porque el compuesto es un polipéptido que comprende 4 a 20 restos de aminoácidos.

15 7. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada porque el compuesto está acoplado a un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferentemente KLH (hemocianina de lapa californiana).

8. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizada porque el compuesto está formulado para la administración intravenosa, subcutánea, intradérmica o intramuscular.

20 9. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizada porque el compuesto está formulado con un adyuvante, preferentemente hidróxido de aluminio.

10. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizada porque el compuesto está contenido en el medicamento en una cantidad desde 0,1 ng a 10 mg, preferentemente 10 ng a 1 mg, en particular 100 ng a 10  $\mu$ g.

25 11. Utilización de un compuesto como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para tratar y/o aliviar los síntomas de la sinucleopatía.

30 12. Utilización según la reivindicación 11, caracterizada porque la sinucleopatía se selecciona de entre el grupo de la enfermedad de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewy, atrofia multisistémica y neurodegeneración con acumulación de hierro encefálica.

35 13. Péptido que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en SHTRLYF (C), SGEYVFH (C), SGQLKFP (C), SGQIWF (C), SGEIHFN (C), GQIWFIS (C), NDAKIVF (C), GQIIFQS (C), GQIRFDH (C), HMRLFFN (C), GEMWFAL (C), GELQFPP (C), GELWFP (C), SHQRLWF (C), HQKMIFA (C), GEMQFFI (C), GELYFRA (C), GEIRFAL (C), GMIVFPH (C), GEIWFEG (C), GEIYFER (C), AIPLFVM (C), GDLKFPL (C), GQILFPV (C), GELFFPK (C), GQIMFPR (C), HMRMYFE (C), GSLFFWP (C), GEILFGM (C), GQLKFPF (C), KLPLFVM (C), GTIFFRD (C), THQRLWF (C), GQIKFAQ (C), GTLIFHH (C), GEIRFGS (C), GQIQFPL (C), GEIKFDH (C), GEIQFGA (C), QLPLFVL (C), HQKMIF (C), GELFFEK (C), GEIRFEL (C), AcGEIYFER (C), SGEIYFER (C), AGEIYFER (C) y GEIYFER (C).

40 14. Péptido según la reivindicación 13, caracterizado porque el péptido está acoplado a un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferentemente KLH (hemocianina de lapa californiana).

45 15. Formulación farmacéutica, preferentemente una vacuna, que comprende por lo menos un péptido según la reivindicación 13 ó 14.

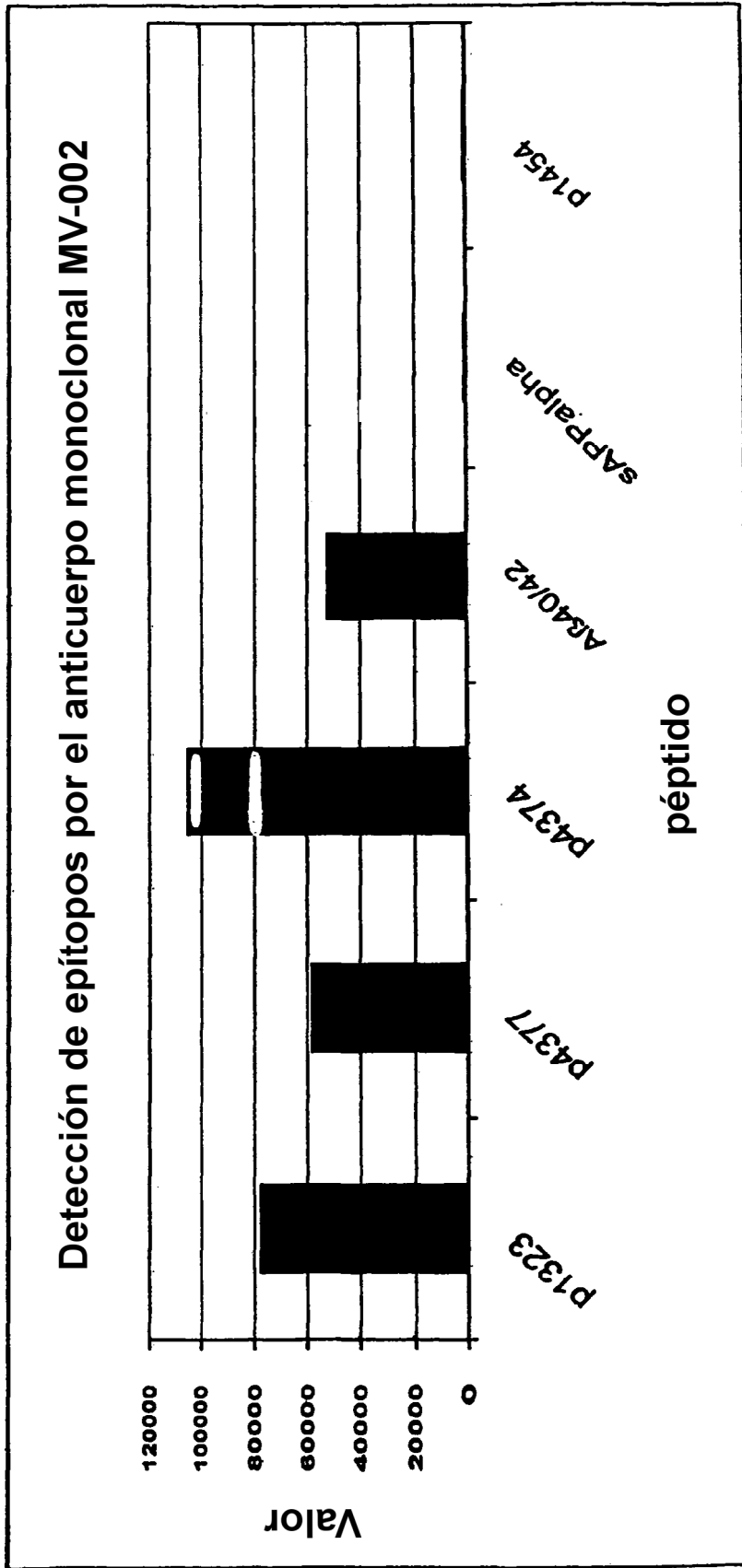


Fig.1

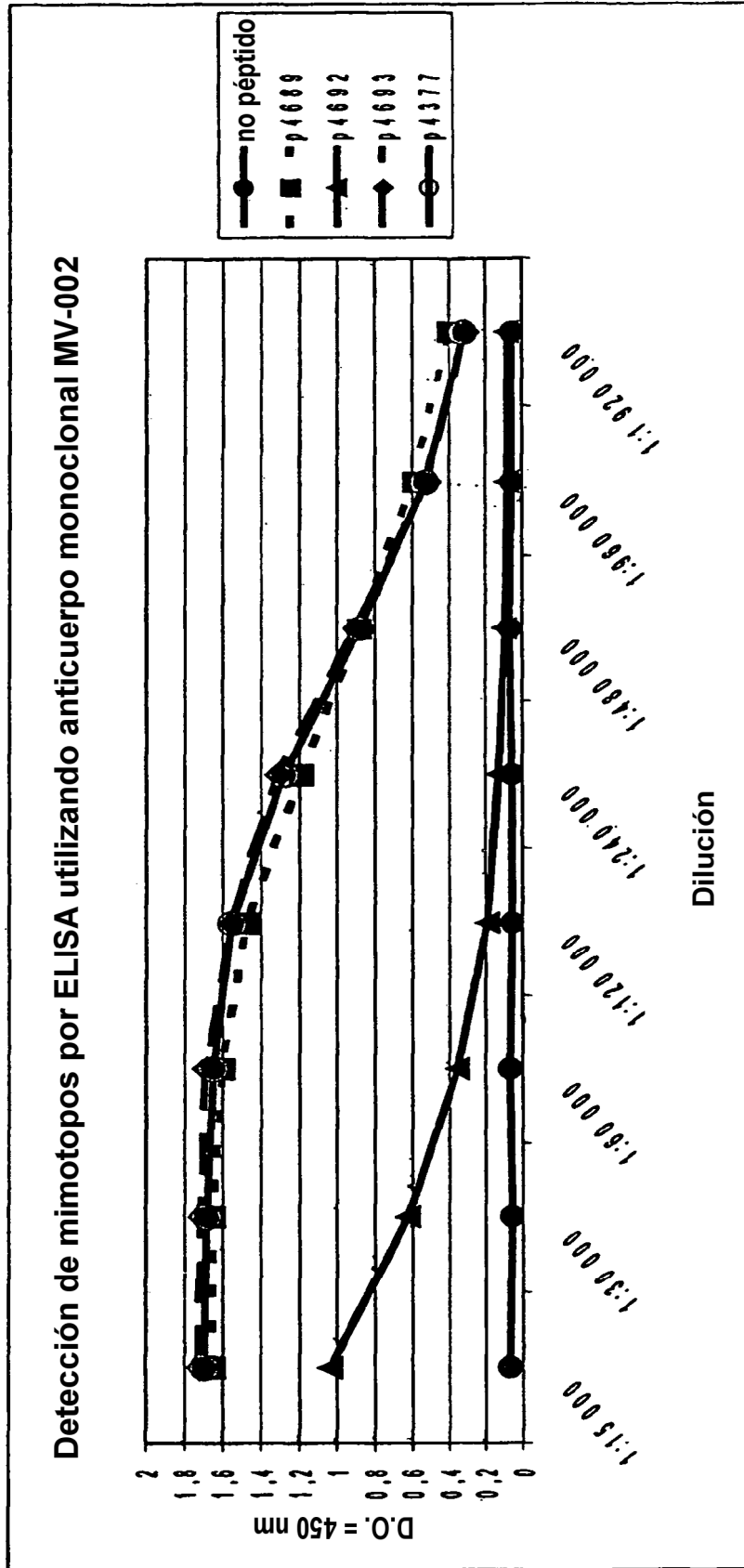


Fig. 2

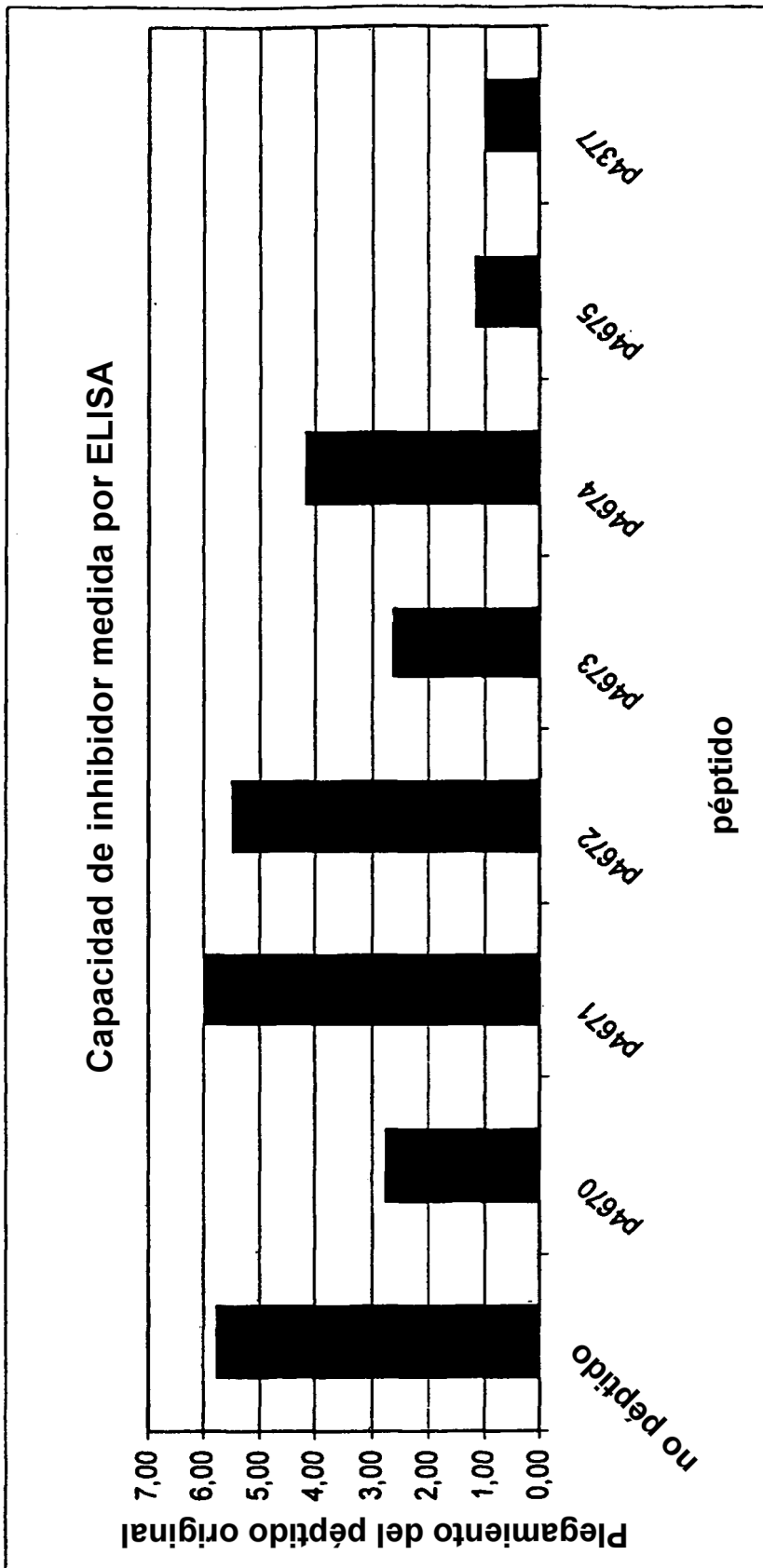


Fig. 3

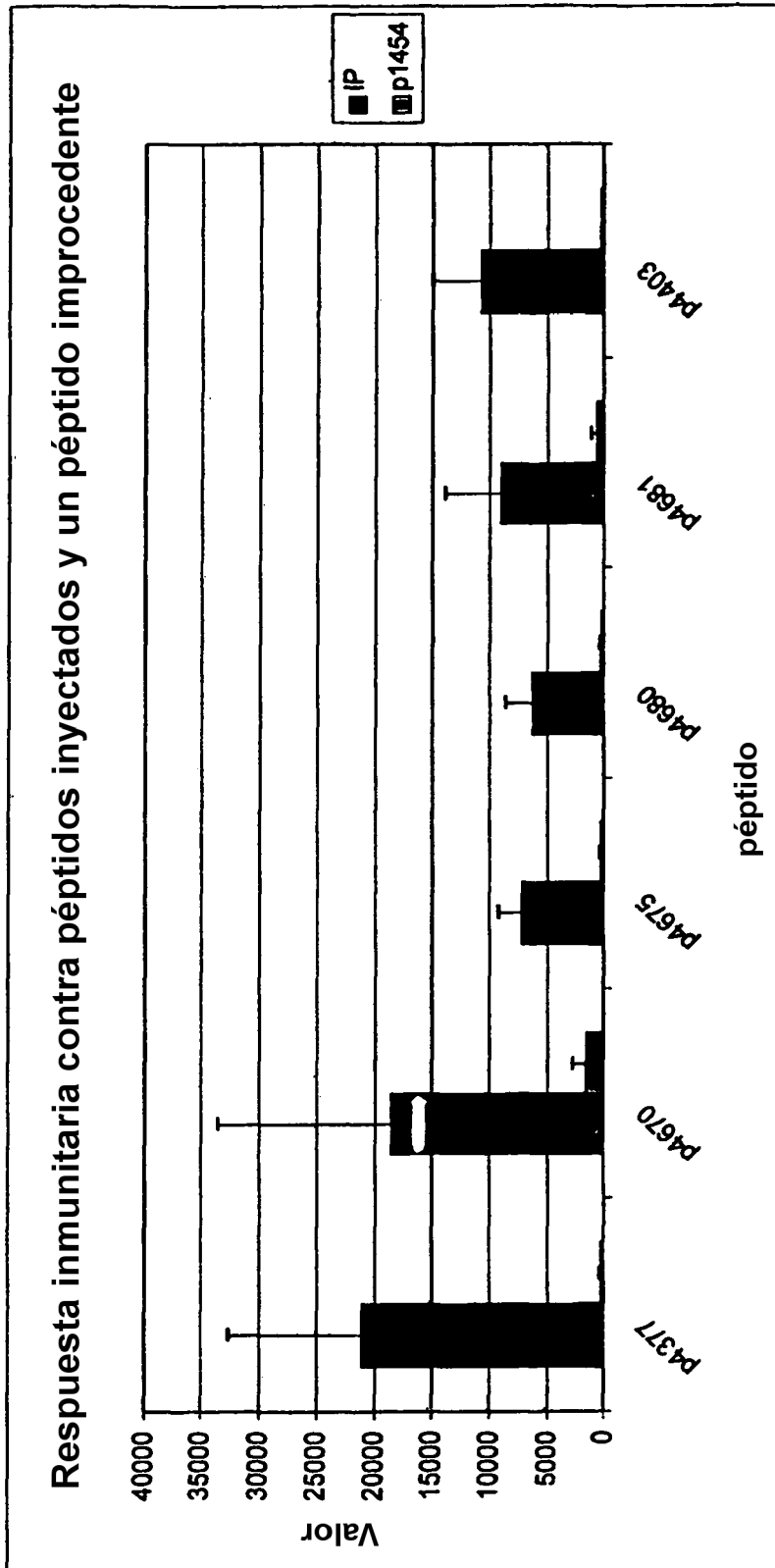


Fig. 4

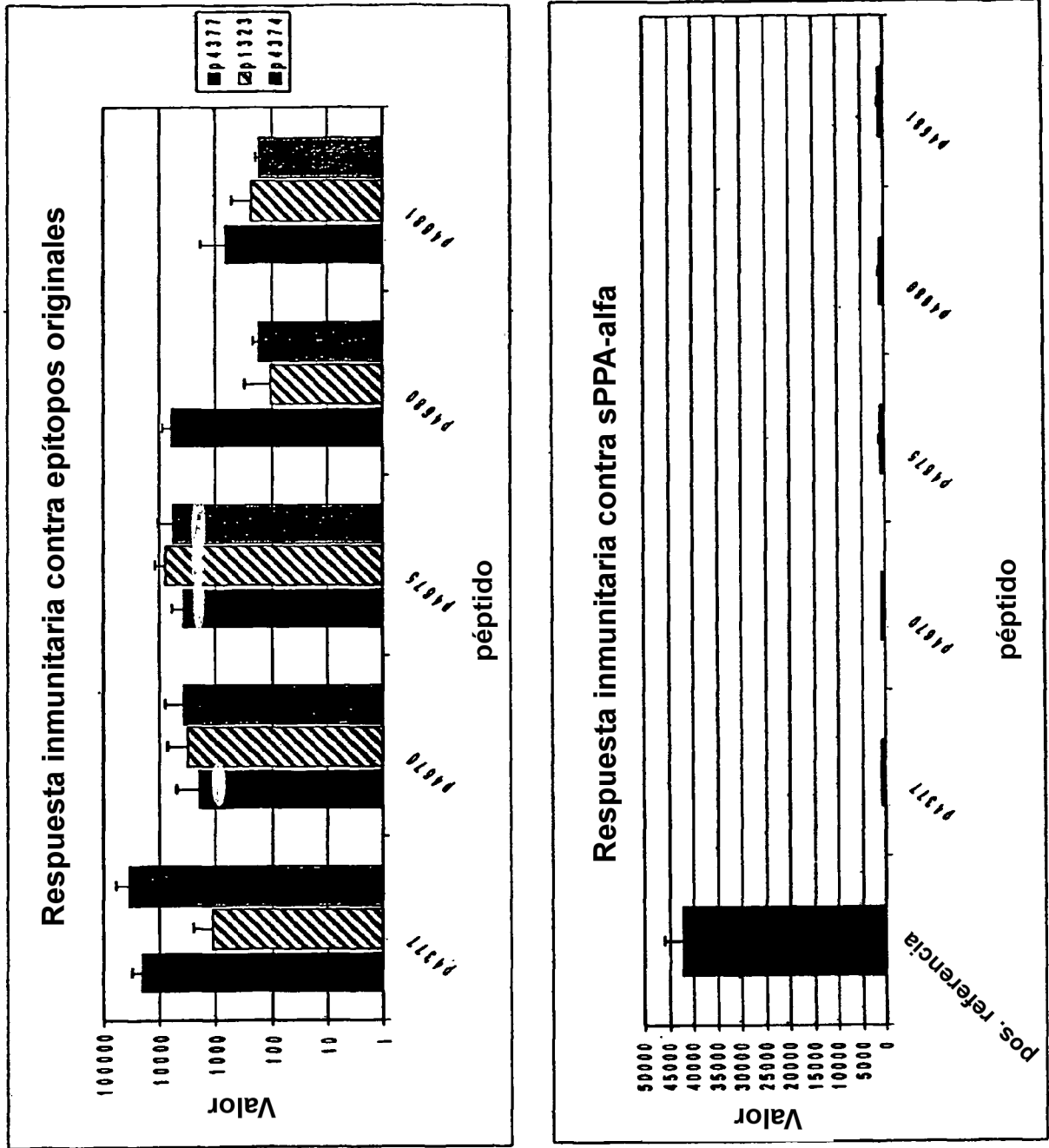


Fig. 5

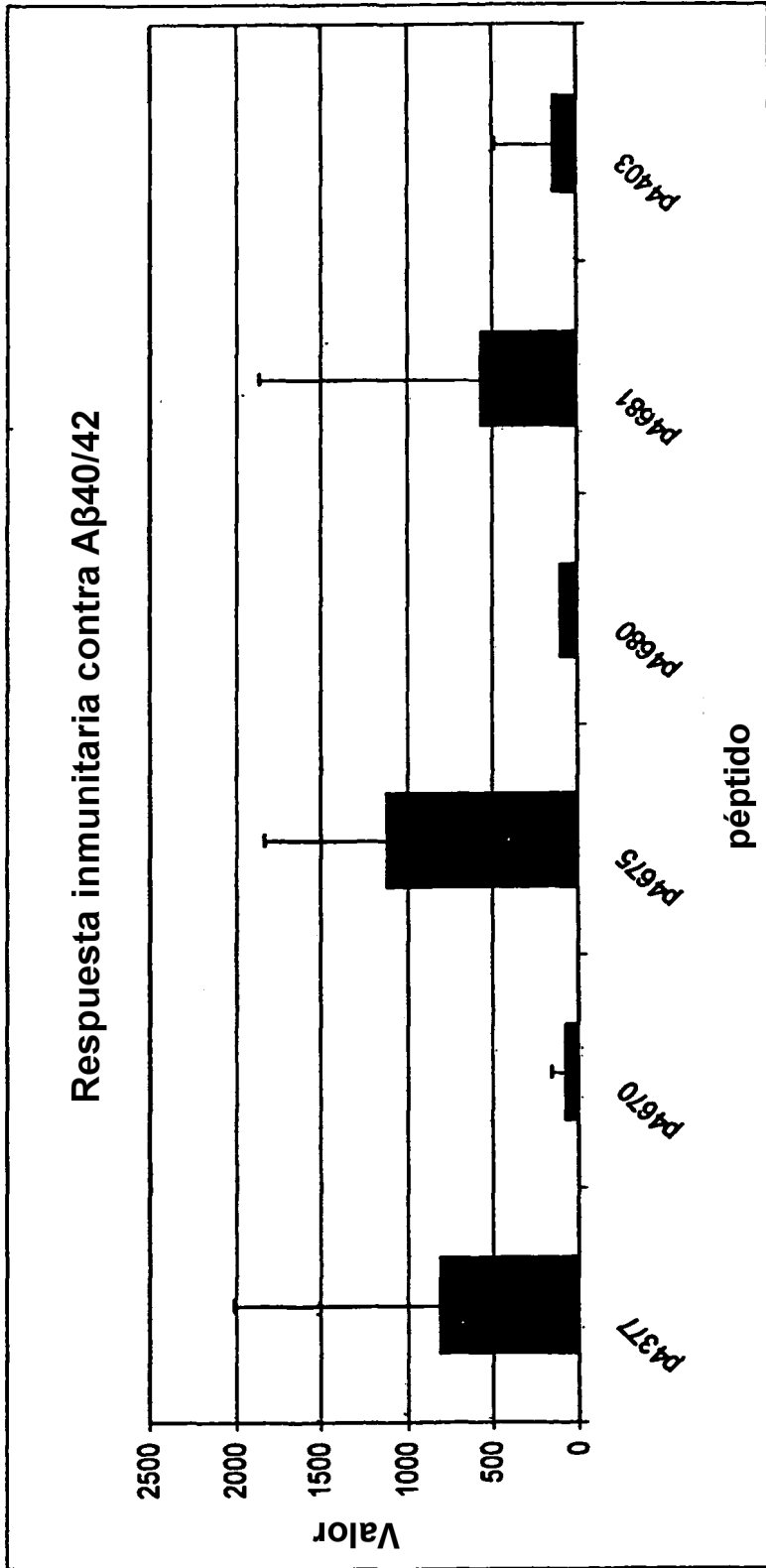


Fig. 6

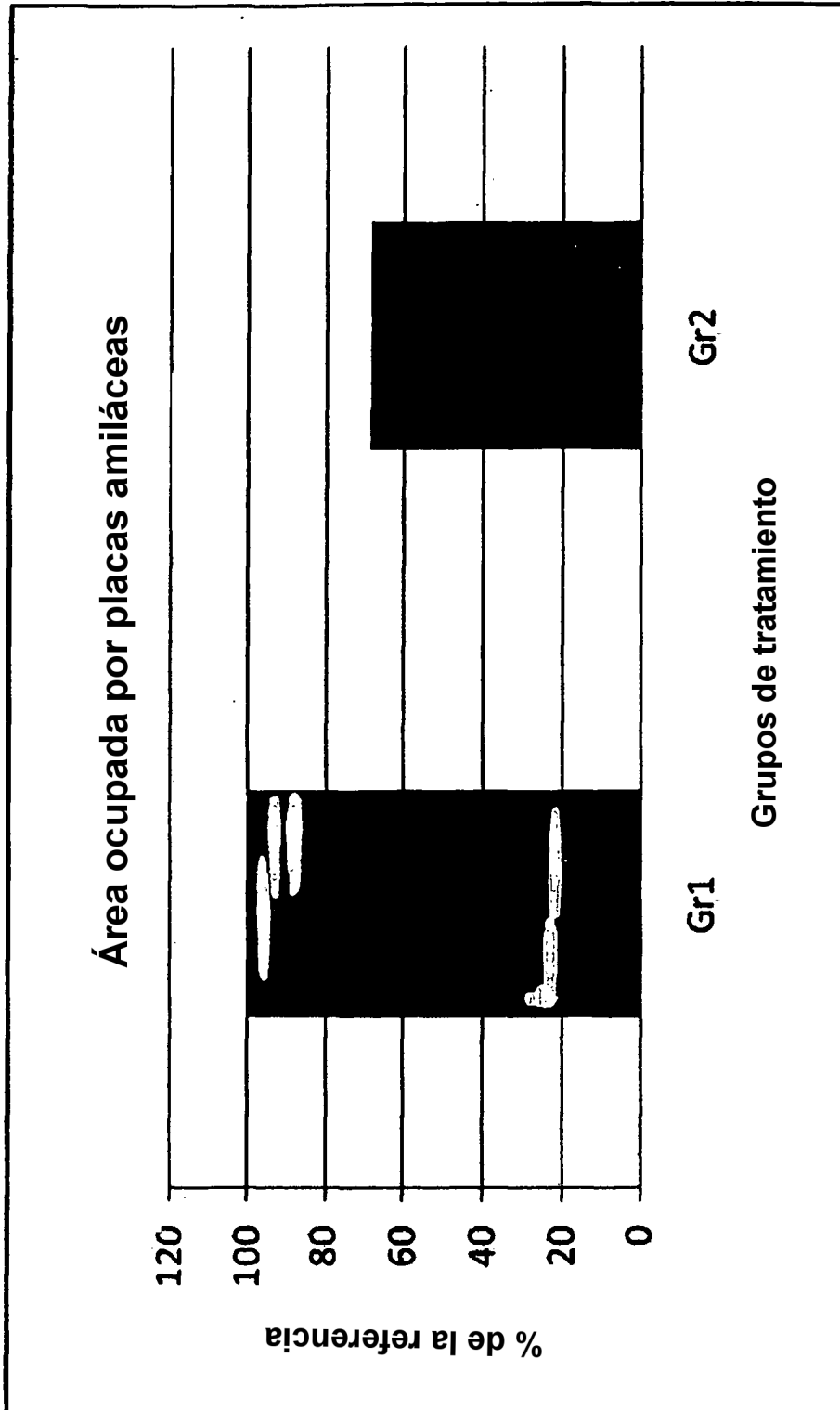


Fig. 7