

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 641**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/47** (2006.01)

**C07K 16/18** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2009 E 09773784 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2012 EP 2297196**

54 Título: **Vacuna contra el intermediario de plegado amiloide**

30 Prioridad:

**01.07.2008 EP 08159385**

**01.07.2008 US 77264 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**08.03.2013**

73 Titular/es:

**DE STAAT DER NEDERLANDEN, VERT. DOOR  
DE MINISTER VAN VWS (100.0%)**

**Postbus 20350**

**2500 EJ Den Haag, NL**

72 Inventor/es:

**HOGERHOUT, PETER y  
VAN DEN DOBBELSTEEN, GERARDA,  
PETRONELLA, J M**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

**ES 2 397 641 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

Vacuna contra el intermediario de plegado amiloide

## 5 Campo de la invención

[0001] La invención se refiere a una vacuna mejorada que se puede usar para tratar la enfermedad de Alzheimer.

## Antecedentes de la invención

10

[0002] La Organización Mundial de la Salud estima que 18 millones de personas padecen la enfermedad de Alzheimer a nivel mundial (Vas et al. 2001). En los Países Bajos, aproximadamente 250 000 personas tienen la enfermedad de Alzheimer. El problema está creciendo con el aumento de la edad media de la población. Cuidar a un paciente en un asilo de ancianos se estima que cuesta 30 000-60 000€ por año (McDonnell et al. 2001). La vacunación sería rentable.

15

20

[0003] La enfermedad de Alzheimer es un trastorno conformacional neurodegenerativo (Sadowski & Wisniewski 2004, Blennow et al. 2006, Editorials Nature Med. 2006). Una característica de la enfermedad es la formación de placas en el cerebro o en los vasos sanguíneos del cerebro. Estas placas se originan de una proteína unida a la membrana neuronal, la proteína amiloide precursora. Un fragmento  $\alpha$ -helicoidal de 38-43 (típicamente 42) residuos de aminoácidos se divide enzimáticamente de la proteína formando así un péptido llamado soluble A $\beta$ .  $\beta$  probablemente primero adopta una conformación extendida y está presente en todos los líquidos biológicos. Si es soluble, A $\beta$  alcanza una alta concentración, sufrirá cambios conformacionales y agregados de forma. Una plétora de agregados ha sido encontrada *in vitro* o *in vivo*, incluyendo múltiples conformeros de monómero, diferentes tipos de oligómeros, ligandos difundibles A $\beta$ -derivados, protofibrillas, fibrillas y esféricas (adoptados de Klein et al. 2004). A $\beta$  fibrilar tiene una estructura de espina beta cruzada (Sawaia et al. 2007) y es finalmente depositada en el cerebro para formar las placas neurodegenerativas.

25

30

[0004] La inmunización de ratones transgénicos (Schenk et al. 1999) y pacientes humanos en una prueba clínica de fase I (Hock et al. 2002) con una suspensión de "pre-agregado" A $\beta$ 1-42 parece ser beneficiosa. Los anticuerpos en sueros inmunológicos humanos reconocieron placas, depósitos de A $\beta$  y  $\beta$ -amiloide en los vasos sanguíneos del cerebro. Los anticuerpos no reconocieron la proteína amiloide precursora o soluble A $\beta$ .

35

[0005] Una desventaja de la suspensión de "pre-agregado" A $\beta$ 1-42 es que las propiedades físicas de este material están mal definidas. No obstante, un problema mucho más serio fue la inducción de meningoencefalitis como un efecto secundario relacionado con la vacuna en el 6% de los pacientes durante un ensayo clínico en fase II (Check 2002, Gilman et al. 2005). Este efecto secundario se produce por una reacción inflamatoria celular, atribuida a una respuesta celular Th1 a epítomos localizados en la parte C-terminal y central de A $\beta$ 11- 42 (McLaurin et al. 2002, Gelinis et al. 2004).

40

45

[0006] Se ha demostrado que los anticuerpos beneficiosos inducidos por A $\beta$ 1-42 se dirigen contra el N-término (McLaurin et al. 2002, (Lee et al. 2005). Fue, por lo tanto, propuesto usar péptidos A $\beta$  C-terminalmente truncados como inmunógenos (Sigurdsson et al. 2004, Lemere et al. 2006, Gevorkian et al. 2004, Lemere et al. 2007). Tales péptidos cortos son poco inmunogénicos. Para aumentar la inmunogenicidad, copias múltiples del péptido deberían ser acopladas a portadores no-inmunogénicos (con el objetivo de introducir IgM) o a portadores que proporcionen epítomos de células t heterólogos (Agadjanyan et al. 2005, Ghochikyan et al. 2006, Maier et al. 2006, (Movsesyan et al. 2008)). En ninguno de estos conjugados el péptido está previsto que adopte la conformación de residuos 4-10 como expuesto por los oligómeros de  $\beta$  amiloide o pre-fibrillas. Así, los anticuerpos inducidos con conjugados de péptido truncados se espera que sean débilmente específicos para los oligómeros o pre-fibrillas.

50

[0007] Por lo tanto, hay todavía una necesidad de un medicamento eficaz, preferiblemente una vacuna contra la enfermedad de Alzheimer. La presente invención proporciona una vacuna mejorada, que no tiene todos los inconvenientes de las vacunas existentes: menos que ninguna toxicidad y todavía es capaz de inducir una respuesta de anticuerpo eficaz para inmunización. La vacuna propuesta en la presente invención es un nuevo análogo del péptido  $\beta$ -amiloide.

55

[0008] WO-A-0205552 (Fraunhofer Ges. et al.) divulga péptidos cíclicos derivados de proteína de amiloide que se usan para un alcance pertinente. No obstante, estos péptidos son más bien largos y muestran por lo tanto una toxicidad notable.

60

## Descripción de la invención

## Péptidos de la invención

65

[0009] En un primer aspecto de la invención, se proporciona un péptido comprendiente la siguiente secuencia X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>VGSNK- Z o X<sub>3</sub>VGSNKG-Z, donde tal y como se define en la reivindicación 1 X<sub>2</sub> es E, G, Q o K, X<sub>3</sub> es D o N, y Z es un agente que estabiliza el presente pliegue dentro de la secuencia peptídica X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>VGSNK-Z o X<sub>3</sub>VGSNKG-Z. Los

péptidos de la invención son péptidos modificados que deben ser entendidos aquí como péptidos que no son un Aβ 1-42 de origen natural. Z puede también ser definido como un agente que estabiliza la conformación de X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>VGSNK (identidad SEC nº 2) o X<sub>3</sub>VGSNKG (identidad SEC nº 3) como posiblemente adoptado en Aβ 1-42, preferiblemente como adoptado en Aβ 1-42. Las secuencias peptídicas X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>VGSNK y X<sub>3</sub>VGSNKG como identificadas arriba corresponden respectivamente a aminoácidos 22-28 y 23-29 de Aβ 1-42. Una secuencia de péptido preferida es X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>VGSNK que corresponde a aminoácidos 22-28 de Aβ 1-42. Las posibles identidades diferentes para X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> y X<sub>3</sub> como se indica aquí vienen de la presencia de varias mutaciones conocidas en la población humana en la secuencia de Aβ 1-42: X<sub>2</sub> es aminoácido 22 y es predominantemente E en la población. No obstante, las mutaciones ártica (E22G), holandesa (E22Q) e italiana (E22K) son también conocidas. Recientemente, otra mutación ha sido identificada (E22Δ) (Tomiyama et al. 2008). X<sub>3</sub> es el aminoácido 23 y es predominantemente D. No obstante, la mutación de Iowa ya ha sido identificada (D23N). Por lo tanto, es obvio para la persona experta que si cualquier otra mutación fuera identificada más adelante en una parte específica de Aβ 1-42 como se identifica aquí; es decir el aminoácido 21-27, 22-28 o 23-29, la secuencia del péptido de la invención puede posiblemente ser adaptada para tener en cuenta esta mutación identificada más adelante.

[0010] Diferentes secuencias peptídicas de superposición fueron evaluadas (ver el ejemplo). Hasta donde nosotros somos conscientes, dos de las secuencias peptídicas evaluadas (aa 22-28 o 23-29) fueron capaces de inducir una respuesta de anticuerpo en ratones, este anticuerpo fue específicamente capaz de reconocer un epítipo conformacional de Aβ 1-42 como expresado en el monómero, oligómero soluble (Haass and Selkoe 2007, Lambert et al, 2007, and Wash and Selkoe, 2007), fibrillas o placas neurodegenerativas. Parece que el reconocimiento del Ab oligomérico es incluso más crucial que el reconocimiento de fibrilla o placa, ya que el Ab oligomérico es más tóxico para las neuronas. El aclaramiento de oligómeros solubles mejora rápidamente la cognición mientras que las placas están todavía presentes. La funcionalidad de un péptido de la invención es preferiblemente evaluada tal y como se expone en el ejemplo 2: ELISA. El uso de conjugados de péptido-BSA como antígenos de recubrimiento en el ELISA permite determinar del título de anti-péptido, mientras que el recubrimiento de Aβ 1-42 fibrilar y oligomérico permite la detección de reactividad cruzada específica. El experto en la materia entenderá que cualquier otra secuencia peptídica derivada de Aβ 1-42 e incorporada en un péptido según la invención y que sea capaz de adoptar la conformación de X<sub>2</sub> X<sub>3</sub> VGSNK o X<sub>3</sub> VGSNKG como posiblemente adoptada en Aβ 1-42 es también abarcada por la presente invención.

[0011] En una forma de realización, el péptido de la invención consiste en la fórmula X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>VGSNK-Z o X<sub>3</sub>VGSNKG-Z, donde X<sub>2</sub> es E, G, Q o K, X<sub>3</sub> es D o N, y Z es un agente que estabiliza el plegado presente en la secuencia peptídica X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>VGSN, X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>VGSNK o X<sub>3</sub>VGSNKG como se define en la reivindicación 1.

[0012] En un péptido de la invención, es crítico que el plegado presente dentro de X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>VGSNK o X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>VGSN sea estabilizado ya que nuestro objetivo es diseñar un péptido que imite un epítipo conformacional presente en el Aβ 1-42 plegado, tal y como se expresa en el monómero, oligómero soluble, fibrillas o placas neurodegenerativas. Cualquier modo de realización de esta estabilización es abarcada por la presente invención. El experto en la materia después de tener sintetizado tal péptido de la invención puede probar su conformación por un método conocido en la técnica, por ejemplo por RMN como se muestra en el ejemplo 1.

[0013] En una forma de realización preferida, una primera forma de realizar esta estabilización es ciclar un péptido de la invención. Por lo tanto, un péptido preferido de la invención es un péptido cíclico. El experto en la materia sabe cómo a ciclar un péptido. La reacción de ciclización real puede ser realizada entre cualquier posición sucesiva, Z inclusive, de la secuencia. Además, la reacción de ciclización real se puede realizar en una secuencia precursora que aún no contenga Z, pero produciendo Z como resultado de la ciclización. La ciclización puede llevarse a cabo mediante enlace, preferiblemente mediante enlace covalente, del aminoácido N-terminal de la secuencia peptídica, preferiblemente X<sub>2</sub> o X<sub>3</sub> en respectivamente X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>VGSNK-Z o X<sub>3</sub>VGSNKG-Z, a Z. De esta manera, el aminoácido C-terminal de las secuencias peptídicas X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>VGSNK o X<sub>3</sub>VGSNKG es no acoplado en la ciclización. Convenientemente, la ciclización se realiza en fase sólida. Por ejemplo, D23, cadena lateral enlazada a la fase sólida, se pueden ciclar a E22, lo que en un enlazador de ácido carbónico produce ciclo-E22-D23. En otra opción D27, cadena lateral enlazada a la fase sólida, se puede ciclar a K28, lo que en el enlazador de amida produce ciclo-N27-K28. Preferiblemente, la ciclización se realiza entre aminoácidos en el Z de contrabucle, tal como por ejemplo de D a G (se vuelve N-G) o de G a K\*, si Z es YNGK. Es también posible ciclar en la solución, por ejemplo de G25 a S26 o de G a K\*, si Z es YNGK. Se cree que la ciclización es importante para estabilizar el plegado presente dentro de X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>VGSNK o X<sub>3</sub>VGSNKG.

[0014] Otra forma preferida de ciclización de un péptido es añadir una cisteína al N-y C-terminales de la secuencia peptídica, o por adición de una cisteína al N-término de la secuencia peptídica y otro a Z. La presencia de dos cisteínas permitirá llevar a cabo una ciclización disulfura, como es bien conocido por el experto en la materia.

[0015] En otra forma de realización preferida, una segunda forma de realización de esta estabilización es usar Z. Como se ha indicado anteriormente aquí, Z es un agente que estabiliza el plegado presente dentro de X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>VGSNK o X<sub>3</sub>VGSNKG en un péptido de la invención. En una forma de realización preferida, Z estabiliza el plegado presente dentro de X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>VGSNK o X<sub>3</sub>VGSNKG para asegurar que el péptido posiblemente adoptará la conformación de plegado Aβ 1-42. En una forma de realización más preferida, Z estabiliza el plegado presente dentro de X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>VGSNK o X<sub>3</sub>VGSNKG para asegurar que estos péptidos adoptarán la conformación de plegado Aβ 1-42. A partir de estudios se cree que hay un plegado en la conformación de Aβ 1-42 plegado, este plegado es previsto que esté presente en una

posición correspondiente a la posición entre S y N en  $X_1X_2X_3VGSN$ ,  $X_2X_3VGSNK$  o  $X_3VGSNKG$ .

[0016] Z es un tetrapéptido seleccionado del grupo que consiste en YNGK, TCGV, CGNT, LCGT, LKGT, GAIK, GAIC, AIK, y AIC. Más preferiblemente, el tetrapéptido es seleccionado del grupo que consiste en YNGK, TCGV, CGNT, LCGT y LKGT. De la forma más preferible, el tetrapéptido es seleccionado del grupo que consiste en YNGK, TcGV, CGNT, LcGT y LkGT, donde c = D-Cys y donde k = D-Lys (ver por ejemplo Oomen et al. 2003 y Oomen et al. 2005). Ejemplos de proteínas que se pueden utilizar para Z son, HSA, IgG y otras proteínas séricas. Ejemplos de antígenos son toxinas (bacterianas) y partículas tipo virus. Z puede también ser una estructura de esteroides tal como se describe en, por ejemplo, Bode et al. (2007, J.Pept.Sci., 13:702-708). Las estructuras de esteroides adecuadas para su uso como Z incluyen, por ejemplo, ácidos biliares y derivados de los mismos, tal como por ejemplo ácido cólico, ácido deoxicólico y 7- $\alpha$ -acetoxi-3 $\alpha$ -amino-12 $\alpha$ -amino-5 $\beta$ -colan-24-oato de metilo. Preferiblemente, en los péptidos de la invención, las secuencias peptídicas se conectan a las posiciones C-3 y C-12 de la estructura de esteroides, por ejemplo como descrito por Bode et al. (2007, supra).

[0017] Z se puede enlazar a la secuencia peptídica antes de ciclización y opcionalmente ser ciclizado con el resto de la secuencia peptídica. En esta forma de realización, Z es preferiblemente una molécula relativamente corta como un tetrapéptido. En esta forma de realización preferida, el número total de aminoácidos (de la secuencia peptídica originada de A $\beta$  1-42 y de Z) es preferiblemente diez u once. Incluso más preferiblemente, este número es once.

[0018] Alternativamente, Z se puede enlazar a la secuencia peptídica ciclizada.

[0019] Se obtienen mejores resultados cuando ambas formas son combinadas (ciclización y la presencia de Z) para estabilizar el péptido. Incluso más preferiblemente, Z se enlaza a la secuencia peptídica y es posteriormente ciclizada con el resto de la secuencia peptídica. Alternativamente, Z se forma como resultado de la reacción de ciclización. Dentro de esta forma de realización preferida, se obtuvieron mejores resultados con Z siendo el tetrapéptido tal como se ha definido anteriormente, tal como por ejemplo YNGK. Más preferiblemente, el tetrapéptido comprende al menos una de una cisteína y una lisina para permitir conjugación selectiva del péptido a una molécula portadora como se describe más adelante. La lisina es preferiblemente una lisina modificada tal como N<sup>ε</sup>-(S-acetilmercaptoacetil)lisina (Lys-SAMA). La presencia de al menos una de una cisteína y un residuo de Lys-SAMA en el tetrapéptido permite conjugación selectiva del péptido de la invención a un portador reactivo de sulhidrilo, tal como una proteína transportadora.

[0020] En una forma de realización más preferida, se proporciona un péptido que consiste en la fórmula  $X_2X_3VGSNK-Z$  donde  $X_2$  es E, G, Q o K,  $X_3$  es D o N y Z es un agente que estabiliza el plegado presente dentro de  $X_2X_3VGSNK$ . Preferiblemente, Z es YNGK, donde incluso más preferiblemente, K en YNGK es una lisina modificada (Lys-SAMA) para permitir conjugación selectiva del péptido.

[0021] En otra forma de realización más preferida, se proporciona un péptido que comprende la siguiente secuencia  $X_3VGSNKG-Z$ , donde  $X_3$  es D o N y Z es un agente que estabiliza el plegado presente dentro de  $X_3VGSNKG$ . Preferiblemente, Z es YNGK donde incluso más preferiblemente, K en YNGK es una lisina modificada (Lys-SAMA) para permitir conjugación selectiva del péptido.

[0022] Un péptido comprendiendo la secuencia  $X_2X_3VGSNKGAI-Z$  donde  $X_2$  es E,  $X_3$  es D, y Z es una lisina modificada (Lys-SAMA) y un péptido comprendiendo la secuencia  $VGSNKG-Z$  donde Z es una lisina modificada (Lys-SAMA) se encontró que generan respuestas de anticuerpos para los péptidos de inmunización ellos mismos, no obstante los anticuerpos así generados no tenían reacción cruzada con A $\beta$  1-42 oligomérico o fibrilar.

[0023] Un péptido de la invención puede estar presente como un único péptido o incorporado en una molécula de fusión, tal como una proteína de fusión. Un péptido puede ser además modificado por eliminación o sustitución de uno o más aminoácidos, por extensión al N- y/o C-término con aminoácidos adicionales o grupos funcionales, lo que puede mejorar la biodisponibilidad, dirigirse a células T, o comprender o liberar sustancias de modulación inmunológica que proporcionan funciones adyuvantes o (co)estimulatorias. El impacto de estas modificaciones es preferiblemente evaluado en la conformación del péptido sintetizado. Este puede realizarse por RMN, por ejemplo. Es importante que en un péptido así obtenido, la conformación de  $X_2X_3VGSNK$  o  $X_3VGSNKG$  como posiblemente adoptada en A $\beta$  1-42, preferiblemente como adoptada en A $\beta$  1-42 no haya sido modificada. Los aminoácidos adicionales opcionales al N- y/o C-término están preferiblemente no presentes en las posiciones correspondientes en la secuencia de aminoácidos de la proteína de la que deriva, es decir la secuencia de aminoácidos A $\beta$  1-42. Por lo tanto, en una forma de realización aún más preferida, para mejorar la inmunogenicidad de un péptido de la invención, este péptido, preferiblemente un péptido cíclico como se ha descrito anteriormente, se conjuga a una molécula inmunogénica portadora, preferiblemente selectivamente a través de la conexión de Z y la molécula inmunogénica portadora. Tal péptido se llama un péptido conjugado. Por lo tanto, en una forma de realización preferida, un péptido de la invención es un péptido conjugado, más preferiblemente un péptido conjugado cíclico. Una molécula inmunogénica portadora es preferiblemente un portador que cuando está conjugado a un péptido de la invención induce una respuesta inmunitaria al péptido de la invención al administrárselo a un sujeto, tal como un mamífero. El portador inmunogénico puede también tener actividad adyuvante como se definirá más adelante. Numerosas moléculas portadoras inmunogénicas son conocidas por la persona experta (Hermanson, G.T., 1996, Bioconjugate techniques. Academic Press, San Diego ; Drijfhout and Hoogerhout, 2000). Moléculas portadoras inmunogénicas adecuadas incluyen, por ejemplo, toxinas o toxoides bacterianos tal como

exotoxinas y variantes de las mismas con toxicidad reducida. Moléculas portadoras inmunogénicas preferidas incluyen toxoide de difteria CRM197, una albúmina de suero (p. ej. albúmina de suero humano) y toxoide de tétanos (Beuvery et al., 1986; Claesson et al., 2005).

## 5 Composición

[0024] En otro aspecto, se proporciona una composición que comprende un péptido tal y como se define aquí. Tal composición puede ser una composición farmacéutica o un medicamento.

10 [0025] En una forma de realización más preferida, un péptido o una composición peptídica comprende además un excipiente farmacéutico y/o un portador farmacéuticamente aceptable y/o un modulador inmunológico. Cualquier portador farmacéuticamente aceptable inerte y/o excipiente conocido se puede adicionar a una composición. La formulación de medicamentos y el uso de excipientes aceptables farmacéuticamente se conocen y son habituales en la técnica y por ejemplo descritos en Remington; The Science and Practice of Pharmacy, 21nd Edition 2005, University of Sciences in Philadelphia.

15 [0026] Una composición farmacéutica puede comprender además agentes estabilizantes aceptables farmacéuticamente, agentes osmóticos, agentes tampón, agentes de dispersión y similares. La forma preferida de la composición farmacéutica depende del modo de administración y uso terapéutico. El soporte farmacéutico puede ser cualquier sustancia compatible no-tóxica adecuada para entregar los ingredientes activos, es decir, un péptido a un paciente. Los portadores aceptables farmacéuticamente para entrega intranasal se ejemplifican por agua, soluciones salinas tamponadas, glicerina, polisorbato 20, cremofor EL y una mezcla acuosa de glicérido caprílico/cáprico, y se pueden tamponar para proporcionar un entorno de pH neutro. Los portadores aceptables farmacéuticamente para entrega parenteral se ejemplifican por estéril tamponados 0,9% NaCl o 5% glucosa opcionalmente suplementada con un 20% albúmina. Las preparaciones para administración parental deben ser estériles. La vía parental para administración de los ingredientes activos es acorde con los métodos conocidos, por ejemplo inyección o infusión por vías subcutáneas, intravenosas, intraperitoneales, intramusculares intraarteriales o intralesionales. Una composición de la invención es preferiblemente administrada por inyección en bolo. Una composición farmacéutica típica para inyección intramuscular sería realizada para contener, por ejemplo, 1 - 10 ml de suero salino tamponado con fosfato y de 1 a 100 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 65 µg, preferiblemente 15-45 µg de un péptido conjugado modificado. Para la administración oral, la sustancia activa se puede administrar en formas de dosificación líquidas, tal como elixires, jarabes y suspensiones. Las formas de dosificación líquidas para administración oral pueden contener coloraciones y aromatizantes para aumentar la aceptación del paciente.

[0027] Los métodos para preparar composiciones administrables por vía parenteral, por vía oral o por vía intranasal se conocen bien en la técnica y están descritos con más detalle en varias fuentes, inclusive, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science (15th ed., Mack Publishing, Easton, PA, 1980) (incorporada por referencia en su totalidad para todos los fines).

[0028] Cualquier modulador inmunológico conocido, en particular moduladores conduciendo a una respuesta de Th2/th1 equilibrada, como fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio, se pueden adicionar a una composición. Preferiblemente, el modulador inmunológico es un adyuvante. Más preferiblemente, la composición comprende un péptido como se ha definido anteriormente y al menos un adyuvante. Un adyuvante es aquí definido para incluir cualquier sustancia o compuesto que, cuando se usa en combinación con un péptido para inmunizar un mamífero, preferiblemente un humano, estimula el sistema inmunológico, provocando así el aumento de o facilitando la respuesta inmunitaria contra el péptido, preferiblemente sin generar una respuesta inmunitaria específica al adyuvante mismo. Los adyuvantes preferidos mejoran la respuesta inmunológica contra un antígeno dado por al menos un factor de 1,5, 2, 2,5, 5, 10 o 20, en comparación con la respuesta inmunitaria generada contra el péptido bajo las mismas condiciones pero en ausencia del adyuvante. Las pruebas para determinar la mejora de promedio estadístico de la respuesta inmunitaria contra un péptido dado como la producida por un adyuvante en un grupo de animales o seres humanos sobre un grupo de control correspondiente están disponibles en la técnica. Un adyuvante, como se utiliza en este caso, usualmente será un compuesto que es foráneo a un mamífero, excluyendo de este modo los compuestos de inmunoestimuladores que son endógenos de los mamíferos, tal como por ejemplo interleukinas, interferones y otras hormonas.

[0029] Una composición de la presente invención puede contener al menos un adyuvante. Un adyuvante usado en la presente invención será seleccionado de modo que el efecto del péptido no esté inhibido. Los adyuvantes utilizados en la presente invención son los que son fisiológicamente aceptables para los seres humanos, estos incluyen, pero de forma no limitativa, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, adyuvantes de emulsiones a base de aceite/surfactante, tal como Montanide™, en el que diferentes tensioactivos (especialmente oleato de mannilil) se combinan con un aceite mineral, emulsiones que contienen escualeno, tal como MF59™, lípido A de monofosforil, o lipopolisacárido mutante de Neisseriae (como se describe en PCT/NL98/0063).

[0030] Un medicamento se puede administrar como una única administración. Alternativamente, la administración de un péptido como anteriormente se ha definido y/o un adyuvante puede repetirse si es necesario y/o péptidos diferentes y/o adyuvantes diferentes pueden ser consecutivamente administrados. El péptido, la composición y el medicamento de la invención están preferiblemente formulados para ser adecuados para la administración intravenosa o subcutánea o

intramuscular, aunque se pueden prever otras vías de administración, tal como administración mucosa o administración intracutánea y/o intradérmica, por ejemplo por inyección.

5 [0031] Por consiguiente, en una forma de realización preferida, un péptido como se describe en este caso se usa como un medicamento. Más preferiblemente, este medicamento es una vacuna contra la enfermedad de Alzheimer. Incluso más preferiblemente, el medicamento es para evitar, demorando y/o tratando, la enfermedad de Alzheimer. Una vacuna tal y como se define aquí se puede utilizar para la protección profiláctica contra la enfermedad de Alzheimer o para el tratamiento de esta enfermedad.

10 [0032] En el contexto de la invención, un organismo o un individuo o un sujeto puede ser un animal o un ser humano. Preferiblemente, el organismo es un ser humano. Preferiblemente, un organismo tratado es sospechoso de tener un alto riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer debido, por ejemplo, a predisposición potencial genética y/o a la edad del sujeto y/o al estilo de vida del sujeto (por ejemplo hábito nutritivo y/o a la ausencia de actividad física) y/o a cualquier otro parámetro conocido que indique que este sujeto tiene un riesgo aumentado de desarrollar la enfermedad de Alzheimer.

15 [0033] El término "prevención" debe ser entendido para incluir la prevención completa, profilaxis, al igual que para reducir el riesgo del individuo de enfermar de dicha enfermedad o condición y demorar la aparición de la enfermedad o condición. El término "prevención" así también comprende el tratamiento de personas sospechosas de estar en riesgo de enfermar de dicha enfermedad o condición. El término debe también ser entendido para incluir alivio de síntomas ya desarrollados.

20 [0034] El término "retrasar" usado aquí significa administración de un péptido a un organismo, es decir a un paciente que está en una pre-fase de la condición que va ser tratada en la que se diagnostica a pacientes, por métodos conocidos en la técnica, una pre-forma de la condición correspondiente.

25 [0035] El término "tratamiento" o "tratar" se entiende como la gestión y cuidado de un paciente con el fin de combatir la enfermedad, condición o trastorno.

30 [0036] En el contexto de la invención, "tratar la enfermedad de Alzheimer y/o retrasar su progresión" preferiblemente significa que se añade una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido. Se refiere a una cantidad eficaz, en dosificaciones y para períodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico deseado, es decir tratar la enfermedad de Alzheimer y/o retardar su progresión.

35 [0037] La cantidad de un péptido puede variar según factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo y la capacidad del agente farmacológico para suscitar una respuesta deseada en el individuo.

40 [0038] Un efecto terapéutico (conduciendo a tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y/o demorando su progresión) es preferiblemente uno que produce al menos uno de los siguientes:

- una reducción de la carga de placas beta presentes en el cerebro;
- una reducción de la cantidad de oligómeros o prefibrillas A $\beta$  solubles presentes en el cerebro; y,
- una reducción de la gravedad de un síntoma asociado a la enfermedad de Alzheimer.

45 [0039] Una reducción en la carga de placas beta presentes en el cerebro de un paciente tratado preferiblemente significa que la cantidad de un péptido adicionado será capaz de prevenir formación *de novo* de placas beta al menos en parte y/o que placas existentes serán al menos en parte inhibidas de su capacidad para expandirse. Preferiblemente, en este contexto, la deposición de placas beta no aumentará en un paciente tratado en cuanto a carga de placas beta como se identifica usando una técnica de formación de imágenes, tal como escaneado PET (Henriksen, Yousefi et al., 2008) and/or magnetic resonance imaging (MRI) (O'Brien, 2007). En un escaneado PET, la cantidad de carga de placas beta es proporcional a la absorción del trazador. Preferiblemente, la carga de placas beta se reducirá a al menos 2%, 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más. Incluso más preferiblemente, ninguna placa beta será detectada. El experto en la materia sabe que la visualización de placas beta debería ser hecha aproximadamente al menos un día, al menos una semana, al menos un mes después de la vacunación o más. (Meyer-Luehmann, Spiers-Jones et al., 2008). Si fuese necesario, uno puede decidir vacunar varias veces y controlar la carga de placas beta regularmente.

50 [0040] Una reducción de la cantidad de oligómeros o prefibrillas A $\beta$  solubles presentes en el cerebro de un paciente tratado preferiblemente significa que la cantidad de un péptido adicionado será capaz de prevenir formación *de novo* de oligómeros o prefibrillas A $\beta$  solubles al menos en parte y/o que los oligómeros o prefibrillas A $\beta$  solubles existentes serán, al menos en parte, inhibidos de su capacidad para expandirse. Preferiblemente, en este contexto, la cantidad de oligómeros o prefibrillas A $\beta$  solubles no aumentará en un paciente tratado en términos de una superficie como la identificada por una técnica de formación de imágenes, tal como se ha definido anteriormente. Preferiblemente, la cantidad de oligómeros o prefibrillas A $\beta$  solubles se reducirá a al menos 2%, 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más. Más preferiblemente, la cantidad de oligómeros o prefibrillas A $\beta$  solubles no será detectable usando el mismo método.

[0041] En el contexto de la invención, un oligómero, prefibrilla o protofibrilla A $\beta$  soluble es un indicador de un ensamblaje de 2-24 monómeros A $\beta$  (Haas and Selkoe 2007).

5 [0042] En el contexto de la invención, "una reducción de la severidad de un síntoma asociado a la enfermedad de Alzheimer" significa preferiblemente una mejora de cognición como la medida con una prueba psicológica para valorar la mejora de cognición en pacientes que sufren la enfermedad de Alzheimer.

Uso

10

[0043] Por consiguiente, en otro aspecto, se proporciona el uso de un péptido o de una composición tal y como se define aquí para la producción de un medicamento contra la enfermedad de Alzheimer. Preferiblemente, el medicamento es una vacuna. Más preferiblemente, la vacuna es para evitar, demorar y/o tratar la enfermedad de Alzheimer.

15

[0044] Por consiguiente, en otro aspecto más, se proporciona un método de prevención, demora y/o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer por administración de un péptido o una composición, tal y como se define aquí, para un paciente que necesita la misma.

20

Método para sintetizar un péptido

[0045] La técnica conoce actualmente muchas formas para generar un péptido de la invención. La invención no se limita a cualquier forma de generar un péptido siempre que el péptido generado comprenda, consista o coincida con cualquiera de las secuencias modificadas dadas, como identificadas aquí, y tenga la conformación requerida como se ha definido anteriormente.

25

[0046] Por consiguiente, en otro aspecto se proporciona un método para la producción de un péptido modificado cíclico, tal y como se define aquí, dicho método comprendiendo los pasos siguientes:

30

- a) sintetizar un péptido cíclico que comprende la secuencia X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>VGSNK-Z o X<sub>3</sub>VGSNKG-Z, donde X<sub>1</sub> es A o G, X<sub>2</sub> es E, G, Q o K, X<sub>3</sub> es D o N, y Z es un agente que estabiliza el plegado presente en la secuencia peptídica X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>VGSNK o X<sub>3</sub>VGSNKG; y
- b) opcionalmente conjugar una molécula portadora inmunogénica al péptido cíclico obtenido en b), preferiblemente a través de la conexión de Z a la molécula portadora inmunogénica.

35

[0047] Cada paso de este método es conocido por el experto en la materia y ha sido extensamente descrito en el ejemplo.

Anticuerpo

40

[0048] En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo dirigido contra un péptido modificado (cíclico) de la invención, tal y como se define aquí. El experto en la materia sabe cómo producir tal anticuerpo en un animal. Los métodos para generar anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que específicamente se enlazan a un polipéptido dado son descritos en, por ejemplo, Harlow and Lane (1988, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY ) y WO 91/19818; WO 91/18989; WO 92/01047; WO 92/06204; WO 92/18619; y US 6,420,113 y en las referencias citadas en estas. El término "enlace específico" como se usa aquí, incluye los enlaces específicos tanto de baja como de alta afinidad. El enlace específico puede ser expuesto, por ejemplo, por un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de baja afinidad con un K<sub>d</sub> de al menos aproximadamente 10<sup>-4</sup> M. El enlace específico también puede ser expuesto por un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de alta afinidad, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo con un K<sub>d</sub> de al menos aproximadamente 10<sup>-7</sup> M, al menos aproximadamente 10<sup>-8</sup> M, al menos aproximadamente 10<sup>-9</sup> M, al menos aproximadamente 10<sup>-10</sup> M, o puede tener un K<sub>d</sub> de al menos aproximadamente 10<sup>-11</sup> M o 10<sup>-12</sup> M o superior.

50

Métodos de diagnóstico

55

[0049] En otro aspecto, se proporciona un método para diagnosticar una enfermedad neurodegenerativa o condición, tal como la enfermedad de Alzheimer. El método comprende determinar la presencia o ausencia de una placa de beta-amiloide (es decir, placa neurodegenerativa) en el cerebro de un paciente que utiliza un anticuerpo tal y como se define aquí. Preferiblemente en el método, la presencia de una placa de beta-amiloide en el cerebro del sujeto (o una muestra de la misma) es indicativa de que el sujeto corre el riesgo de desarrollar una enfermedad neurodegenerativa o condición, tal como la enfermedad de Alzheimer, o indicativa para el diagnóstico de la enfermedad neurodegenerativa o condición, tal como la enfermedad de Alzheimer. Preferiblemente, tal método se usa para pronosticar o diagnosticar la enfermedad de Alzheimer en el cerebro de un paciente. En el contexto de la invención, diagnóstico significa bien una estimación de riesgos predictiva de que un sujeto desarrolle más tarde la enfermedad de Alzheimer o preferiblemente una evaluación del desarrollo de la enfermedad de Alzheimer en un sujeto. En el contexto de la invención, un sujeto puede ser un animal o un ser humano. Preferiblemente, un sujeto es un ser humano.

60

65

[0050] Según una forma de realización preferida, el método se realiza *in vitro* o *ex vivo* en una muestra obtenida de un sujeto. La muestra preferiblemente comprende tejido cerebral aislado de un sujeto. Más preferiblemente, el tejido es un vaso sanguíneo de cerebro.

[0051] Preferiblemente, una detección de la presencia de una placa de beta-amiloide se revela por la unión de un anticuerpo de la invención a una muestra de cerebro como la evaluada por ELISA, tal y como se ha explicado en el ejemplo. El método de diagnóstico puede ser consecutivamente aplicado a un sujeto para controlar el desarrollo de la enfermedad.

[0052] En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitativo para querer decir que los elementos que siguen a la palabra están incluidos, pero los elementos no específicamente mencionados no están excluidos. Además el verbo "consistir" se puede sustituir por "consistir esencialmente en" que significa que un péptido o una composición tal y como se define aquí puede comprender componente(s) adicional(es) a los específicamente identificados, dicho componente(s) adicional(es) no altera la única característica de la invención. Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" o "uno" no excluye la posibilidad de que más de uno de los elementos esté presente, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y sólo uno de los elementos. De este modo, el artículo indefinido "un" o "uno" normalmente significa "al menos uno".

Descripción de las figuras

[0053]

Figura 1. Modelo de una fibrilla A $\beta$ 1-42. A y B representan una unidad de cruce- $\beta$  dimérico y C la fibrilla ensamblada. [Credit: Olofsson et al. 2006 J. Biol. Chem. 281,477-483].

Figura 2. Secuencias de péptidos cíclicos derivados de amiloide (K\* es un residuo de lisina modificada para uso de conjugación).

Figura 3: títulos de anticuerpo IgG de sueros de ratones agrupados contra los conjugados de péptido-BSA homólogos. El título es el <sup>10</sup>log de la dilución de suero recíproca al 50% de la densidad óptica máxima a 450 nm en ELISA.

Figura 4: OD450nm de sueros de ratones agrupados como una función de dilución con recubrimiento A $\beta$  1-42 fibrilar u oligomérico.

Figura 5: títulos de anticuerpo IgG de sueros de ratones individuales de grupos 8 y 9 contra A $\beta$  1-42 fibrilar u oligomérico. El título es la dilución de suero recíproca al 50% de la densidad óptica máxima a 450 nm en ELISA.

Figura 6: Coloración inmunohistoquímica de donante de sección de cerebro humano 99-30 (Braak 6) con un suero de ratón (1:300) inmunizado con conjugado toxoide de ciclo[A $\beta$ (22-28)-YNGK]/tétanos (a) y el control monoclonal 6E10 (1: 15.000) en (b). Modelos similares de placas fueron reconocidos por los sueros de ratón como control positivo. (Microscopio: Leica DMRE equipados con una cámara fotográfica DC300)

Ejemplos

### Ejemplo 1: estrategia de síntesis

[0054] Evaluamos péptidos truncados de A $\beta$ , que no comprenden el epítipo de células B de N-terminal inmunodominante. Nuestro objetivo es conseguir una respuesta de anticuerpo para A $\beta$  precozmente mal plegado.

[0055] La secuencia de A $\beta$  1-42 es:

DAEFR<sup>5</sup>HDSGY<sup>10</sup>EVHHQ<sup>15</sup>KLVFF<sup>20</sup>AEDVG<sup>25</sup>SNKGA<sup>30</sup>IIGLM<sup>35</sup>VGGVV<sup>40</sup>IA (identidad de SEC n° 4).

[0056] La estructura de las fibrillas de A $\beta$  1-42 ha sido resuelta por espectroscopia de RMN (Olofsson et al. 2006). Los experimentos de intercambio de hidrógeno/deuterio con fibrillas mostraron que las regiones Glu<sup>11</sup>-Gly<sup>25</sup> y Lys<sup>28</sup>-Ala<sup>42</sup> en la secuencia de A $\beta$  están resguardadas del solvente, mientras que el N-término Asp<sup>1</sup>-Tyr<sup>10</sup> y el fragmento de dos residuos Ser<sup>26</sup>-Asn<sup>27</sup> son accesibles por el solvente. Los datos de RMN concuerdan: Asp<sup>1</sup>-Tyr<sup>10</sup> y el fragmento de dos residuos Ser<sup>26</sup>-Asn<sup>27</sup> son accesibles por el solvente. Los datos de RMN concuerdan con un modelo de la fibrilla como se muestra en la Figura 1C. La estructura anteriormente mencionada es una espina de cruce- $\beta$  retorcido. La figura 1A y 1B muestran una sección, la unidad de cruce- $\beta$  dimérico. En el dímero, cada monómero contiene dos hojas  $\beta$  antiparalelas que se conectan por un compuesto a su vez de Ser<sup>26</sup>-Asn<sup>27</sup>.

[0057] Basándonos en el modelo de fibrilla de amiloide (Figura 1), decidimos preparar un conjunto de YNGK\* cíclico



estabilizado 10 y 11 mer péptidos amiloides. La figura 2 muestra los decapeptidos de amiloide dirigidos. Supusimos que podríamos estabilizar la conformación de pequeños péptidos A $\beta$  añadiendo una secuencia artificial YNGK\*, en la que K\* es un residuo de lisina modificado para conjugación selectiva con una proteína transportadora, seguido de la ciclación de amida de la cadena principal ("cabeza-cola") (Oomen et al (2005)). Asimismo, preparamos un pequeño panel de péptidos decaméricos y no decaméricos cíclicos midiendo seis o siete residuos de la región 21-31 de A $\beta$  y YNGK\* (ver tabla 1).

Tabla 1: péptidos sintetizados

Grupo	Antígeno	Código de péptido	Péptido MH <sup>+</sup> encontrado/calculado
1	A $\beta$ 1-42 oligómero	-	-
2	A $\beta$ 1-42 fibrilar	-	-
3	A $\beta$ (22-28)/TTd lineal	S070-07	1367,8/1367,6
4	ciclo-A $\beta$ (25-30)/TTd	S060-08	1093,5/1093,5
5	ciclo-A $\beta$ (24-29)/TTd	S060-09	1121,5/1121,5
6	ciclo-A $\beta$ (23-28)/TTd	S060-10	1179,6/1179,5
7	ciclo-A $\beta$ (24-30)/TTd	S061-56	1192,7/1192,5
8	ciclo-A $\beta$ (23-29)/TTd	S060-05	1236,5/1236,5
9	ciclo-A $\beta$ (22-28)/TTd	S060-06	1308,7/1308,6
10	ciclo-A $\beta$ (21-27)/TTd	S076-08	1251,5/1251,5

### Ejemplo 2: especificidad de algunos de los péptidos ciclados modificados para un epítipo conformacional de A $\beta$ 1-42 plegado

[0058] Un conjugado toxoide tétanico del péptido cíclico [A $\beta$  (22-28)-YNGK\*], es decir ciclo[EDVGSNKiNGK\*] o péptido definido como grupo 9 en la Tabla 1, suscitó anticuerpos que reaccionan en cruce *in vitro* con A $\beta$  (1-42)-oligómeros (Figura 4 o 5) y A $\beta$  (1-42)-fibrillas (Figura 4 o 5). Estos anticuerpos también reconocen depósitos de A $\beta$  en tejido de cerebro humano post-mortem con EA (hipocampo), ver figura 6. El conjugado correspondiente de la amida peptídica N-acetilada lineal Ac-K\*EDVGSNKYNG-NH<sub>2</sub> indujo buenos títulos de anticuerpo de antipéptido pero los anticuerpos generados no reconocieron el A $\beta$  oligomérico o fibrilar. Así, el péptido cíclico imita un epítipo conformacional en A $\beta$  1-42 plegado que normalmente no induce una respuesta de anticuerpo. Cuando se depositó la prueba de una respuesta de anticuerpos para el conjugado con el péptido definido como grupo 10, el péptido cíclico [A $\beta$  (21-27)-YNGK\*] estaba aún en progreso.

### 25 Materiales y métodos

#### Síntesis, purificación y conjugación peptídica

[0059] El éster de  $\alpha$ -(2,4-dimetoxibenzilo) de N<sup>o</sup>-fluorenilmetoxicarbonilo-L-ácido aspártico (Fmoc-Asp-ODmb) fue acoplado a través de su cadena lateral a un polímero para la síntesis de amidas peptídicas (para convertir más tarde el Asp de inicio en Asn). La secuencia ligada con resina de la cadena lateral protegida GK\*EDVGSNKiD(resina), en la que K\* es N<sup>o</sup>-(S- acetilmercaptoacetil)lisil, fue luego ensamblada como se ha descrito anteriormente (Brugghe et al., 1994). El péptido lineal ligado con resina fue convertido en ciclo[GK\*EDVGSNKiD(resina)]. Después de la desprotección de la cadena lateral, excepto de Lys(SAMA), y la escisión de la resina ciclo[GK\*EDVGSNKiN]≡ciclo[EDVGSNKiNGK\*], se obtuvo el péptido del grupo 9 (tabla 1). Los péptidos de los grupos 4-8 fueron preparados de forma similar. El péptido del grupo 10, ciclo[AEDVGSNiNGK\*], fue obtenido a partir del precursor lineal ligado con resina de la cadena lateral protegida YNGK\*AEDVGSd(resina). Los péptidos fueron purificados por cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa y caracterizados por espectrometría de masa de pulverización de ión (MH<sup>+</sup> encontrado/calculado, ver tabla 1). Los péptidos purificados fueron acoplados a toxoide tétanico bromoacetilado o albúmina de suero bovino de maleimidilo-modificado (BSA) (reactivo modificador: NHS-PEO2-Maleimida Pierce) (Drijfhout JW et al., 2000).

#### Disgregación de A $\beta$ (1-42)

[0060] Se disolvió A $\beta$  1-42 liofilizado (Anaspec) en ácido trifluoroacético a una concentración de 1,0 mM, se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 h y se secó bajo una corriente de nitrógeno y luego en un vacío (1 mm Hg) durante 15 min. El péptido se disolvió después en hexafluoroisopropanol a una concentración de 1,0 mM y, después de 1 h de incubación a temperatura ambiente, se secó como se ha descrito anteriormente (Zeng et al., 2001). El péptido fue

almacenado a -20 °C durante 18-20 h.

Preparación de A $\beta$  (1-42) fibrilar u oligomérico

5 [0061] Se disolvió el disgregado de A $\beta$  1-42 en el dimetilsulfóxido a una concentración de 5,0 mM, se diluyó 50 veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés), pH 7,2, o 10 mM ácido clorhídrico. La solución en PBS fue incubada a 4 °C durante 24 h (para dar oligómeros), mientras que la solución en 10 mM HCl fue incubada a 37°C durante 24 h (para dar fibrillas) (Stine et al).

10 Inmunización de ratones

[0062] Grupos de ocho ratones hembra Balb/C de 6-8 semanas de edad fueron inmunizados subcutáneamente en los días 0 y 28 con 25  $\mu$ g A $\beta$  1-42 en PBS sin adyuvante o con 50  $\mu$ g conjugado de péptido-TTd y 75  $\mu$ g AlPO<sub>4</sub> en PBS. Se recogieron pequeñas muestras de suero en el día 0. Los ratones fueron desangrados en el día 42.

15

ELISA

[0063] Placas de microtitulación (Greiner 655092) fueron revestidas con A $\beta$ 1-42 o conjugados de péptido-BSA. Se diluyeron oligómeros o fibrillas de A $\beta$  1-42 recientemente preparados a una concentración final de 2,5  $\mu$ M (11,3  $\mu$ g/ml) en 0,04 M tampón de carbonato/bicarbonato de sodio, pH 9,7. Los conjugados de péptido-BSA en suero salino tamponado con fosfato, pH 7,2 (PBS), tuvieron una concentración de proteína total de 0,5  $\mu$ g/ml. Partes alícuotas (100  $\mu$ l) de estas soluciones fueron transferidas a los pocillos de las placas. Las placas fueron incubadas durante 90 min a 37 °C. Las placas fueron procesadas adicionalmente como se ha descrito anteriormente (Westdijk, Van den Ijssel et al., 1997).

25

Coloración inmunohistoquímica

[0064] Se utilizaron secciones de cerebro humano del hipocampo de diferentes donantes con enfermedad de Alzheimer (Braak 5 o 6) (Netherlands Brain Bank). Se cortaron criosecciones (10  $\mu$ m) de tejido directamente congelado no-fijado, se montaron en deshielo, se secaron durante 1 hora y se almacenaron en una caja sellada a -20C. Para la inmunocoloración, las secciones fueron fijadas en 4% de solución PFA-PBS durante 10 min, se lavaron en 0,05 M de tampón de fosfato (PB) durante 10 min con 2 intercambios y se bloquearon con 10% de suero de burro normal (NDS) + 0,4% TritonX100 en 0,05M PB durante 1 hora a RT. La solución de bloqueo fue descartada y se diluyeron sueros de ratón (1 :300; primer anticuerpo) en 3% NDS + 0,4% TritonX100 en 0,05 M PB fue añadido y fue incubado O/N a RT en una caja con tejidos mojados. Se lavaron las secciones con 0,05M PB; al menos 30 min con uno o más intercambios. Luego, las secciones fueron incubadas con burro-anti-ratón ~Cy3 1:1400 en 0,05 M PB durante 2 horas. Se lavaron las secciones con 0,05M PB; al menos 30 min con uno o más intercambios. Se sellaron las secciones en el Vectashield con Dapi (Vector). Se usó 6E10 monoclonal de ratón para beta amiloide 1-17 (Abcam, Cambridge, UK) como control positivo (1:15 000).

40

Listado de secuencias

[0065]

45

<110> De Staat der Nederlanden vertegenwoordigd door de Ministerie van VWS

<120> Vacuna contra el intermediario de plegado amiloide

<130> P6021165EP

50

<150> EP 08159385.7

<151> 2008-07-01

<150> US 61/077,264

55

<151> 2008-07-01

<160> 4

<170> Versión de patentIn 3.3

60

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

65

<220>

<223> péptido sintético

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISC  
 5 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa = Ala o Gly

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISC  
 10 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa = Glu, Gly, Gln o Lys

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISC  
 15 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa = Asp o Asn

<400> 1  
 20 **Xaa Xaa Xaa Val Gly Ser Asn**  
**1 5**

<210> 2  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 25

<220>  
 <223> péptido sintético

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISC  
 30 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa = Glu, Gly, Gln o Lys

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISC  
 35 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa = Asp o Asn

<400> 2  
 40 **Xaa Xaa Val Gly Ser Asn Lys**  
**1 5**

<210> 3  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 45

<220>  
 <223> péptido sintético

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISC  
 50 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa = Asp o Asn

<400> 3  
 55 **Xaa Val Gly Ser Asn Lys Gly**  
**1 5**

<210> 4  
 <211> 42  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 60

<400> 4

ES 2 397 641 T3

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys  
1 5 10 15

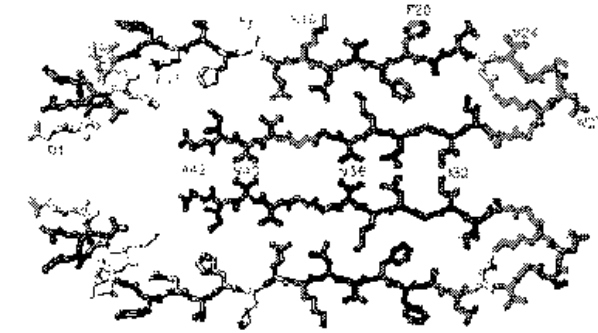
Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile  
20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala  
35 40

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Péptido cíclico que consiste en la fórmula  $X_2X_3VGSNK-Z$  o  $X_3VGSNKG-Z$ , donde  $X_2$  es E, G, Q o K,  $X_3$  es D o N y Z es un agente estabilizante del plegado presente en la secuencia peptídica  $X_2X_3VGSNK$  o  $X_3VGSNKG$ , donde el péptido está ciclado por enlace covalente del aminoácido N-terminal de la secuencia peptídica para Z, y donde Z es un fragmento peptídico seleccionado del grupo que consiste en YNGK, TCGV, CGNT, LCGT, LKGT, GAIK, GAIC, AIIK, AIIC, TCGV, CGNT, LCGT y LKGT, donde c = D-Cys y donde k = D-Lys; o donde Z es un esqueleto de esteroide, que es un ácido biliar o un derivado del mismo.
- 10 2. Péptido según la reivindicación 1, donde el ácido biliar o derivado del mismo es seleccionado del grupo que consiste en ácido cólico, ácido desoxicólico y metil 7- $\alpha$ -acetoxi-3 $\alpha$ -amino-12 $\alpha$ -amino-5 $\beta$ -colan-24-oato.
- 15 3. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde el péptido se conjuga a una molécula portadora inmunogénica.
- 20 4. Péptido según la reivindicación 3, donde el péptido se conjuga a la molécula portadora inmunogénica por un enlace covalente selectivo de Z a la molécula portadora inmunogénica.
- 25 5. Péptido según la reivindicación 3 o 4, donde la molécula portadora inmunogénica es toxoide tetánico.
- 30 6. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, para su utilización como medicamento.
- 35 7. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, para su utilización en el tratamiento o prevención de la enfermedad de Alzheimer.
- 40 8. Uso de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la enfermedad de Alzheimer.
- 45 9. Método para producir un péptido cíclico como el definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, donde el método incluye las siguientes etapas de:
- a) sintetizar un péptido cíclico que consiste de la secuencia  $X_2X_3VGSNK-Z$  o  $X_3VGSNKG-Z$ , donde  $X_2$  es E, G, Q o K,  $X_3$  es D o N, donde el péptido es ciclado por enlace covalente del aminoácido N-terminal de la secuencia peptídica para Z, y donde Z es un agente estabilizante del plegado presente en la secuencia peptídica  $X_2X_3VGSNK$  o  $X_3VGSNKG$ , tal y como se define en la reivindicación 1 o 2 y
- b) opcionalmente, conjugar una molécula portadora inmunogénica al péptido cíclico obtenido en a), preferiblemente a través de un enlace de Z a la molécula portadora inmunogénica.
10. Anticuerpo dirigido contra el péptido tal y como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5.
11. Método *in vitro* para diagnosticar una enfermedad o condición neurodegenerativa, donde el método comprende el paso de determinar en una muestra de un paciente la presencia o ausencia de una placa beta-amiloide, usando un anticuerpo tal y como se ha definido en la reivindicación 10.
12. Método *in vitro* según la reivindicación 11, para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer.

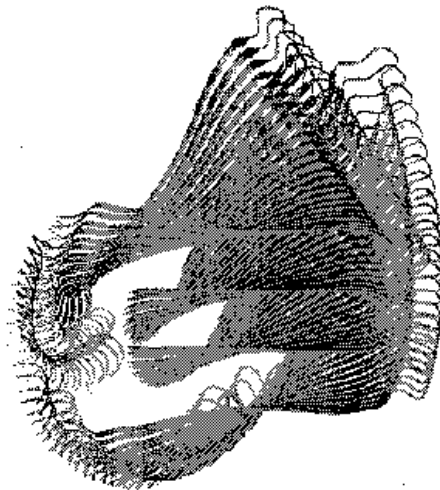
Fig 1



A

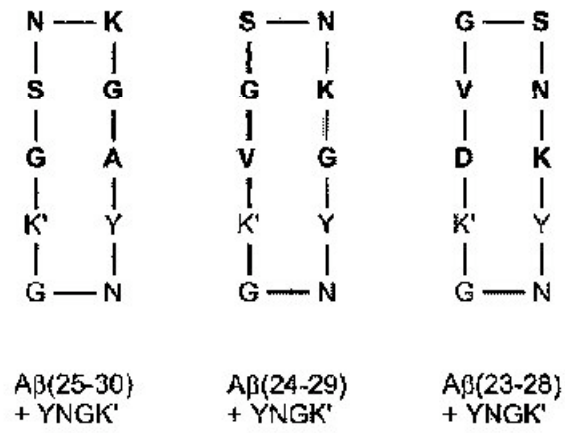


B



C

**Fig 2**



**Fig 3**

**Titulos de anticuerpos IgG de sueros agrupados  
contra conjugados de péptido-BSA homólogos**

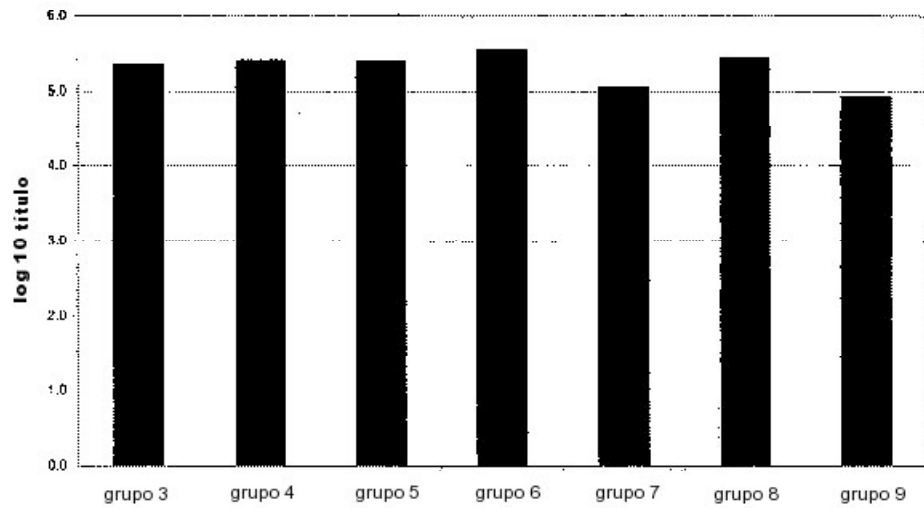


Fig 4a

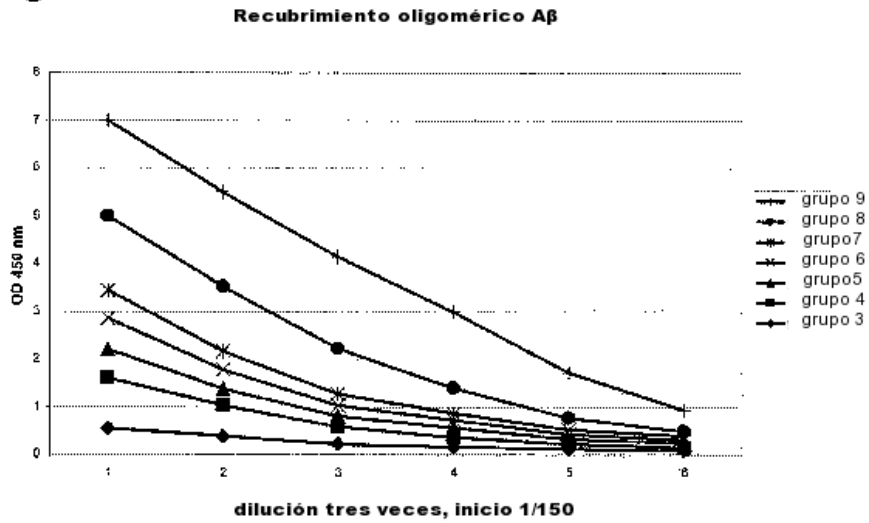
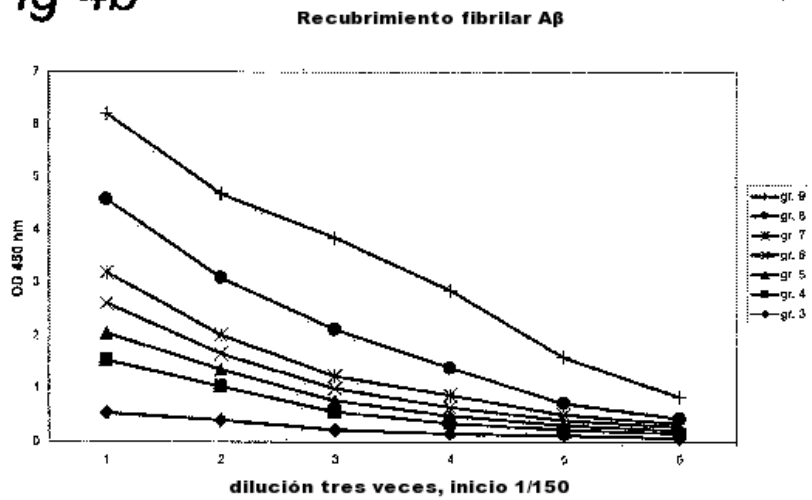


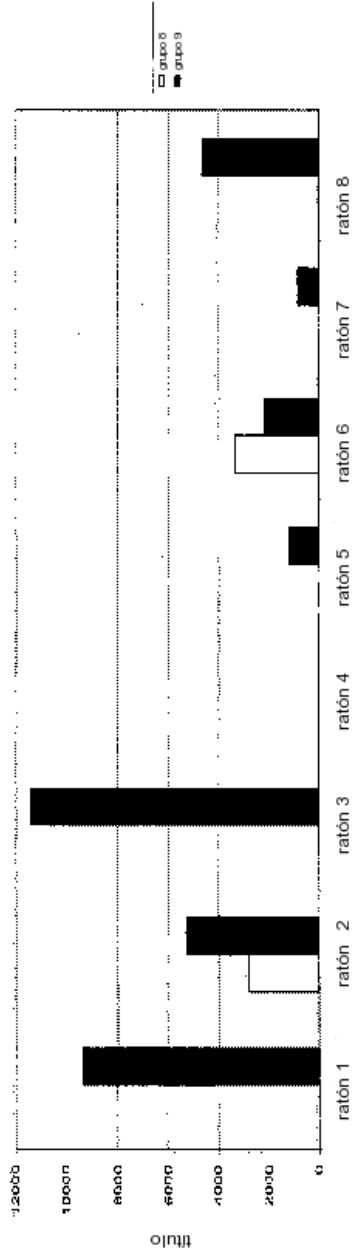
Fig 4b





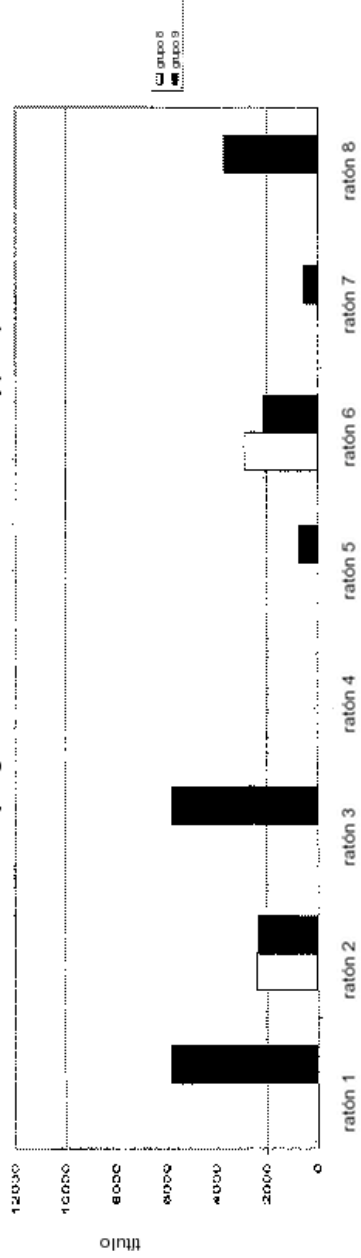
**Fig 5a**

**Títulos de anticuerpo IgG de sueros individuales contra Aβ(1-42) oligomérico**

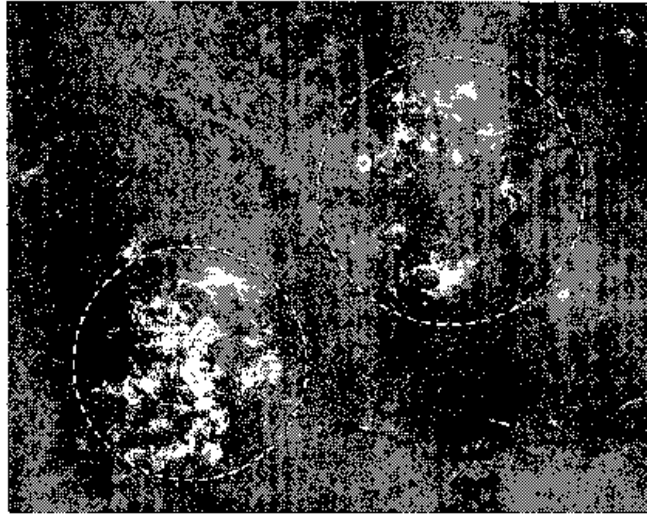


**Fig 5b**

**Títulos de anticuerpo IgG de sueros individuales contra Aβ(1-42) fibrilar**



*Fig 6a*



*Fig 6b*

