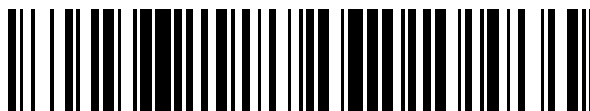


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 407 429**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

**C07K 16/18** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2006** **E 06829455 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2013** **EP 1959991**

54 Título: **Vacuna terapéutica**

30 Prioridad:

**12.12.2005 EP 05027091**

**02.05.2006 EP 06009098**

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

**12.06.2013**

73 Titular/es:

**AC IMMUNE S.A. (100.0%)**  
**EPFL-PSE BUILDING B**  
**1015 LAUSANNE, CH**

72 Inventor/es:

**PFEIFER, ANDREA y**  
**NICOLAU, CLAUDE**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 407 429 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 terapéutica

La presente invención se refiere a métodos y composiciones para el uso terapéutico y diagnóstico en el tratamiento de enfermedades y patologías causadas por proteínas amiloides o semejantes a amiloides, o asociadas con ellas, que incluyen amiloidosis, un grupos de patologías y anomalías asociadas con proteínas amiloides, tales como la Enfermedad de Alzheimer.

La amiloidosis no es una entidad de enfermedades única sino más bien un grupo diverso de procesos progresivos de enfermedades caracterizados por depósitos extracelulares en los tejidos de una proteína cérica, semejante al almidón, denominada amiloide, que se acumula en uno o más órganos o sistemas del cuerpo. A medida que los depósitos amiloides se acumulan, comienzan a interferir con la función normal del órgano o sistema del cuerpo. Existen al menos 15 tipos diferentes de amiloidosis. Las formas principales son la amiloidosis primaria sin antecedentes conocidos, la amiloidosis secundaria que sigue a algún otra condición, y la amiloidosis hereditaria.

La amiloidosis secundaria ocurre en personas aquejadas de una infección crónica o de una enfermedad inflamatoria, tal como la tuberculosis, una infección bacteriana denominada fiebre mediterránea familiar, infecciones óseas (osteomielitis), artritis reumatoide, inflamación del intestino delgado (ileítis granulomatosa), la enfermedad de Hodgkin, y la lepra.

Los depósitos amiloides contienen, típicamente, tres componentes. fibrillas de proteínas amiloides que representan aproximadamente el 90% del material amiloide, que comprenden uno o varios tipos diferentes de proteínas. Estas proteínas son capaces de plegarse dando origen a las fibrillas laminares "beta-plegadas", una configuración proteínica única que pone de manifiesto sitios de unión para el rojo congo, dando por resultado las propiedades de tinción únicas de la proteína amiloide. Además, los depósitos amiloides están asociados estrechamente con el componente amiloide P (pentagonal) (AP), una glicoproteína relacionada con el amiloide P sérico normal (SAP) y con los glucosaminoglucanos sulfatados (GAG), carbohidratos complejos del tejido conjuntivo.

Muchas enfermedades de envejecimiento están basadas o asociadas con proteínas semejantes a las amiloides y se caracterizan, en parte, por la acumulación de depósitos extracelulares de material amiloide o semejante a amiloide que contribuyen a la patogénesis, así como también a la progresión de la enfermedad. Estas enfermedades incluyen, pero no se limitan a patologías neurológicas tales como la Enfermedad de Alzheimer (AD), que incluye enfermedades o condiciones caracterizadas por pérdida de capacidad de la memoria cognitiva tales como, por ejemplo, el deterioro cognitivo leve (MCI), la demencia de cuerpos de Lewy, el síndrome de Down, la hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Dutch) el complejo de Parkinson- Demencia (Enfermedad de Guam). Otras enfermedades basadas o asociadas con proteínas semejantes a amiloides tales como la parálisis supranuclear progresiva, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Creutzfeldt Jacob, la enfermedad de Parkinson, la demencia relacionada con HIV, la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), la diabetes de comienzo en la edad adulta, la amiloidosis cardíaca senil; los tumores endocrinos, y otras, con inclusión de la degeneración macular.

Aun cuando la patogénesis de estas enfermedades puede ser diversa, sus depósitos característicos con frecuencia contienen muchos constituyentes moleculares compartidos. En un grado importante. esto puede atribuirse a la activación local de caminos proinflamatorios que conducen con ella al depósito concurrente de componentes de complemento activados, reactantes de fases agudas, inmunomoduladores, y otros mediadores inflamatorios (McGeer et al., 1994).

La Enfermedad de Alzheimer (AD) es una patología neurológica que se ha pensado que, principalmente, está causada por placas amiloides, una acumulación de depósitos anormales de proteínas en el cerebro. El tipo más frecuente de depósito amiloide encontrado en el cerebro de individuos afectados está compuesto principalmente de fibrillas A $\beta$ . La evidencia científica demuestra que un aumento de la producción y acumulación en placas de proteínas beta-amiloides conduce a la muerte de la célula nerviosa, lo que contribuye al desarrollo y progresión de la Enfermedad de Alzheimer. La pérdida de células nerviosas en zonas estratégicas del cerebro, ocasiona, a su vez, disminución de los neurotransmisores y deterioro de la memoria. Las proteínas principalmente responsables de la acumulación de placas incluyen el proteínas de precursores amiloides (APP) y dos presenilinas (presenilina I y presenilina II). La escisión secuencial de la proteína de precursor amiloide (APP) que es expresado constitutivamente y catabolizado en la mayoría de las células por las enzimas  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasa conduce a la liberación de un péptido A $\beta$  de 39 a 43 aminoácidos. La degradación de las APPs incrementa, probablemente, sus propensión a agregarse en placas. Es especialmente el fragmento A $\beta$ (1-42) el que posee una propensión alta a acumular agregados debido a dos restos de aminoácidos muy hidrófobos existentes en su extremo C-terminal. Se opina, por consiguiente, que el fragmento A $\beta$ (1-42) está implicado principalmente y es responsable de la iniciación de la formación de placas neuríticas en la Enfermedad de Alzheimer, y que tienen, por tanto, un elevado potencial patológico. Por consiguiente, existe la necesidad de anticuerpos específicos que puedan hacer blanco y espaciar la formación de placas amiloides.

Los síntomas de la Enfermedad de Alzheimer se manifiestan lentamente y el primer síntoma puede ser solamente una pequeña falta de memoria. En esta fase, los individuos pueden olvidar acontecimientos y actividades recientes,

los nombres de personas o cosas familiares, y no pueden ser capaces de resolver problemas matemáticos sencillos. A medida que la enfermedad progresa, los síntomas se aprecian más fácilmente y llegan a ser lo bastante graves para hacer que las personas con Enfermedad de Alzheimer o miembros de su familia busquen ayuda médica. Los síntomas de la fase media de la Enfermedad de Alzheimer incluyen olvido de cómo realizar tareas sencillas tales como el cuidado de su aspecto personal, y problemas que se van manifestando con el habla, la comprensión, la lectura o la escritura. Los pacientes en la fase tardía de la Enfermedad de Alzheimer pueden llegar a ser ansiosos o agresivos, pueden deambular sin rumbo fuera de su domicilio y, en último lugar, pueden necesitar un cuidado total.

Actualmente, el único medio definido para diagnosticar la Enfermedad de Alzheimer consiste en identificar placas y marañas existentes en el tejido cerebral en la autopsia realizada después de la muerte del individuo. Por tanto, los doctores solamente pueden establecer un diagnóstico de la Enfermedad de Alzheimer como “posible” o “probable” mientras la persona está todavía viva. Empleando los métodos actuales, los médicos pueden diagnosticar correctamente la Enfermedad de Alzheimer hasta el 90 por ciento de las veces utilizando diversas herramientas para diagnosticar una Enfermedad de Alzheimer “probable”. Los médicos hacen preguntas acerca de la salud general de la persona, problemas médicos del pasado, y la historia de algunas dificultades que la persona haya tenido en la realización de las actividades diarias. Los tests de comportamiento de la memoria, resolución de problemas, atención, cálculo y lenguaje proporcionan información sobre la degeneración cognitiva, y pruebas médicas tales como análisis de sangre, de orina o del fluido espinal, y exploraciones cerebrales, pueden proporcionar alguna información adicional..

La terapia de la Enfermedad de Alzheimer consiste en tratamientos con medicación y sin medicación. Los tratamientos que aspiran a alterar el curso subyacente de la enfermedad (retardar o invertir la progresión) han sido hasta la fecha infructuosos en gran medida. Se ha indicado que medicamentos que restauran el déficit (defecto), o el mal funcionamiento, de los mensajeros químicos de las células nerviosas (neurotransmisores), tales como los inhibidores de la colinesterasa (ChEIs), mejoran los síntomas. También se encuentran disponibles medicaciones para tratar las manifestaciones psiquiátricas de la Enfermedad de Alzheimer.

Los inhibidores de la colinesterasa, tales como Tacrina y Rivastigmina, son actualmente la única clase de agentes que están aprobados por la FDA para el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer. Estos agentes son medicinas que restauran el defecto, o mal funcionamiento, de la neurotransmisión química en el cerebro. Los ChEIs impiden la degradación enzimática de los neurotransmisores aumentando con ello la cantidad de mensajeros químicos disponibles para transmitir las señales nerviosas en el cerebro.

Para algunas personas en las fases precoz y media de la enfermedad, los fármacos tacrina (COGNEX<sup>®</sup>, Morris Plains, NJ), donepezilo (ARICEPT<sup>®</sup>, Tokio, JP), rivastigmina (EXELON<sup>®</sup>, East Hanover, NJ), o galantamina (REMINYL<sup>®</sup>, New Brunswick, NJ), pueden ayudar a evitar que algunos síntomas empeoren durante un período de tiempo limitado. Otro fármaco, memantina (NAMENDA<sup>®</sup>, New York, NY), ha sido aprobado para el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer de moderada a grave. Asimismo, algunas medicinas pueden ayudar a controlar los síntomas de comportamientos de la Enfermedad de Alzheimer tales como insomnio, agitación, vagabundeo, ansiedad y depresión. El tratamiento de estos síntomas hace, frecuentemente, a los pacientes más cómodos lo que hace que su cuidado sea más fácil para sus cuidadores. Desgraciadamente, a pesar de avances importantes en el tratamiento que ponen de manifiesto que esta clase de agentes es consistentemente mejor que un placebo, la enfermedad continúa progresando y el efecto medio sobre el funcionamiento mental solamente ha sido modesto. Los ChEIs tienen también efectos secundarios que incluyen disfunción gastrointestinal, toxicidad hepática y pérdida de peso.

Los avances en la comprensión de las anomalías cerebrales que tienen lugar en la Enfermedad de Alzheimer, es de esperar que proporcionen el entramado de nuevas dianas de tratamiento más enfocadas sobre la alteración del curso y el desarrollo de la enfermedad. Muchos compuesto, con la inclusión de agentes antiinflamatorios, están siendo investigados activamente. Ensayos clínicos realizados empleando inhibidores específicos de la ciclooxigenasa (COX-2) tales como rofecoxib y celecoxib, están también en camino.

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

El deterioro cognitivo leve (MCI) es una expresión general definida lo mas comúnmente como una patología de la memoria, sutil pero que puede medirse. Una persona con MCI experimenta problemas de memoria mayores que los que normalmente son de esperar con la edad, pero no muestran otros síntomas de demencia tales como juicio o razonamiento deteriorado. El MCI es un condición que con frecuencia refleja un condición preclínico de AD.

Se cree que el depósito de proteínas  $\beta$ -amiloides en el interior de la corteza entorhinal (EC) desempeña un papel fundamental en el desarrollo del deterioro cognitivo leve (MCI) en la edad avanzada. Este hecho está en línea con la observación de que los niveles de  $A\beta(1-42)$  de CSF-A decaen significativamente una vez que la AD se hace clínicamente evidente. Al contrario que con los niveles de CSF- $A\beta(1-42)$ , los niveles de CSF-tau están aumentados

significativamente en la fase de MCI, y estos valores continúan siendo elevados después, lo que indica que niveles aumentados de CSF-tau pueden ayudar a detectar sujetos aquejados de MCI que se pronostica desarrollarán AD.

La demencia de cuerpos de Lewy (LBD) es una patología neurodegenerativa que puede ocurrir en personas mayores de 65 años de edad, que causa síntomas de deterioro cognitivo (pensamiento) y cambios de comportamiento anormales. Los síntomas pueden incluir deterioro cognitivo, señales neurológicas, trastorno del sueño y fallo autonómico. El deterioro cognitivo es la carta de presentación de LBD en la mayor parte de los casos. Los pacientes tienen episodios recurrentes de confusión que progresivamente empeoran. La fluctuación de la capacidad cognitiva está asociada frecuentemente con grados de desviación de la atención y diligencia. El deterioro cognitivo y las fluctuaciones de pensamiento pueden variar a lo largo de minutos, horas o días.

Los cuerpos de Lewy se forman a partir de proteínas neurofilamentosas fosforiladas o no fosforiladas; estos cuerpos contienen la proteína sináptica alfa-sinucleína así como ubiquitina, que está involucrada en la eliminación de proteínas dañadas o anormales. Además de los cuerpos de Lewy, pueden estar presentes también, neuritas de Lewy, que son cuerpos de inclusión en los procesos celulares de las células nerviosas. En los cerebros de los pacientes aquejados de DLB pueden formarse placas amiloides; sin embargo tienden a ser menores en número que las observadas en pacientes con Enfermedad de Alzheimer. Las agrupaciones neurofibrilares, la otra marca micropatológica de AD, no son una característica principal de la DLB pero están presentes con frecuencia además de las placas amiloides.

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

La miositis de cuerpos de inclusión (IBM) es una enfermedad paralizante que se encuentra habitualmente en personas de más de 50 años, en la que las fibras musculares desarrollan inflamación y comienzan a atrofiarse, pero en la que el cerebro está disponible y los pacientes retienen su intelecto total. Se ha descubierto que dos enzimas implicadas en la producción de proteína  $\beta$ -amiloide estaban aumentadas en el interior de las células musculares de pacientes con esta enfermedad muscular progresiva, la más común, de gente de edad avanzada, en la que también está aumentada la  $\beta$ -amiloide.

Otra enfermedad que esta basada o asociada con la acumulación y depósito de proteínas semejantes a amiloides es la degeneración macular.

La degeneración macular es una enfermedad común del ojo que causa deterioro de la mácula, que es la zona central de la retina (el tejido de delgadez de papel en la parte posterior del ojo donde las células sensibles a la luz envían señales visuales al cerebro). La visión nítida, clara, "todo seguido" es procesada por la mácula. El daño a la mácula da por resultado el desarrollo de manchas de ceguera y visión borrosa o distorsionada. La degeneración macular relacionada con la edad (AMD) es una de las causas principales de deterioro visual en los Estados Unidos y para las personas de más de 65 años es la causa principal de la ceguera legal entre los caucásicos. Aproximadamente, 1,8 millones de americanos de 40 años y mayores tienen AMD avanzada, y otros 7,3 millones de personas con AMD intermedia están en riesgo sustancial de pérdida de visión. Las autoridades estiman que hacia 2020 podrá haber 2,9 millones de personas con AMD avanzada. Las víctimas de AMD se encuentran con frecuencia sorprendidas y frustradas al saber qué poco se sabe acerca de las causas y del tratamiento de esta condición de ceguera,

Existen dos formas de degeneración macular: la degeneración macular seca y la degeneración macular húmeda. La forma seca, en la que las células de la mácula empiezan a colapsarse lentamente, es diagnosticada en el 85 por ciento de los casos de degeneración macular. Ambos ojos están afectados habitualmente por AMD seca, aun cuando un ojo puede perder visión mientras que el otro ojo permanece sin afectar. Drüsen, que son depósitos amarillos por debajo de la retina, son signos precoces comunes de AMD seca. El riesgo de desarrollar AMD seca o AMD húmeda, en condición avanzada, aumenta a medida que el número o tamaño de las drüsen aumenta. Es posible que la AMD seca avance y ocasione pérdida de visión sin cambiar a la forma húmeda de la enfermedad; sin embargo, también es posible que la AMD seca en su fase precoz, evolucione súbitamente a la forma húmeda.

La forma húmeda, aunque solamente representa el 15 por ciento de los casos, da por resultado el 80 por ciento de la ceguera, y se considera AMD avanzada (no hay fase precoz o intermedia de AMD húmeda) La AMD húmeda va precedida siempre por la forma seca de la enfermedad. A medida que la forma seca empeora, algunas personas comienzan a tener vasos sanguíneos anormales que crecen por detrás de la mácula. Estos vasos son muy frágiles y pueden perder fluido y sangre (de aquí degeneración macular "húmeda"), lo que causa una daño rápido a la mácula.

La forma seca de AMD inicialmente puede ocasionar con frecuencia visión ligeramente borrosa. El centro de visión, en particular, puede luego llegar a hacerse borroso y esta región se hace mayor a medida que la enfermedad progresa. No pueden apreciarse síntomas si solamente un ojo resulta afectado. En la AMD húmeda, las líneas rectas pueden aparecer como onduladas y puede tener lugar rápidamente pérdida de visión central.

El diagnóstico de la degeneración macular lleva consigo, típicamente, un examen del ojo dilatado, un ensayo de agudeza visual, y una exploración de la parte posterior del ojo empleando un procedimiento operatorio denominado fundoscopia para ayudar al diagnóstico de MD, y – si se sospecha que es AMD húmeda – también puede llevarse a cabo angiografía con fluoresceína. Si la AMD seca alcanza las fases avanzadas, no existe tratamiento actual para evitar la pérdida de visión. No obstante, una fórmula específica de dosis altas de antioxidantes y cinc puede retardar o evitar que la AMD intermedia progrese hasta la fase avanzada. Macugen® (inyección de pegaptanib sódico), fotocoagulación con láser y terapia fotodinámica, pueden controlar el crecimiento anormal de los vasos sanguíneos y hemorragia en la mácula, que sirve de ayuda para muchas personas aquejadas de AMD húmeda.; sin embargo, la visión que ya se ha perdido no puede restaurarse mediante estas técnicas. Si ya se ha perdido visión, existen ayudas para visiones bajas que pueden ayudar a mejorar la calidad de vida.

Uno de los signos más precoces de degeneración macular (AMD) relacionada con la edad, es la acumulación de depósitos extracelulares, conocidos como drüsen, entre la lámina basal del epitelio retiniano pigmentado (RPE) y la membrana de Bruch (BM). Estudios recientes llevados a cabo por Anderson et al., han confirmado que los drüsen contienen proteínas beta amiloides (Experimental Eye Research 78 , 243-256 (2004)).

La investigación en marcha continúa con estudios de exploración de factores medioambientales, genéticos, y dietéticos, que pueden contribuir a la AMD. También están siendo exploradas nuevas estrategias de tratamiento, que incluyen transplantes de células retinianas, medicamentos que pueden prevenir o retrasar el progreso de la enfermedad, terapia de radiaciones, terapias génicas, un chip de ordenador implantado en la retina que puede ayudar a estimular la visión, y agentes que pueden evitar el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos bajo la mácula. La patente de EE.UU. 2002/156.036 describe una vacuna basada en liposomas para el tratamiento de una enfermedad asociada a amiloide, que comprende un péptido A $\beta$  1-16 palmitoilado.

Lo que se necesita, por tanto, son composiciones de vacunas terapéuticas eficaces y métodos eficaces para tratar las complicaciones asociadas con la amiloidosis, un grupo de enfermedades y patologías asociadas con la formación de placas amiloides, que incluyen la amiloidosis secundaria y la amiloidosis relacionada con la edad, que incluyen, pero no se limitan a patologías neurológicas tales como la Enfermedad de Alzheimer, e incluyen enfermedades o condiciones caracterizadas por pérdida de capacidad de la memoria cognitiva tales como, por ejemplo, el deterioro cognitivo leve (MCI), la demencia de cuerpos de Lewy, el síndrome de Down, la hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Dutch), y el complejo de Parkinson-Demencia (Enfermedad de Guam), así como también otras enfermedades basadas o asociadas con proteínas semejantes a amiloides, tales como la parálisis supranuclear progresiva, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Creutzfeld Jacob, la enfermedad de Parkinson, la demencia relacionada con HIV, la esclerosis lateral amiotrófica (ALS). la diabetes de comienzo en la edad adulta, la amiloidosis cardíaca senil, los tumores endocrinos y otras, con inclusión de la degeneración macular. En particular lo que se necesita son vacunas terapéuticas especializadas y altamente eficaces, y composiciones que comprendan dichas vacunas, que sean capaces de contrarrestar las manifestaciones fisiológicas de la enfermedad, tales como la formación de placas, asociada con la agregación de fibras de péptido amiloide o semejante a amiloide.

### **Compendio de la invención**

La presente invención proporciona nuevos métodos y nuevas composiciones para inducir una respuesta inmunitaria altamente específica y altamente eficaz, en un organismo, pero particularmente en un animal, particularmente un mamífero o un ser humano, que es capaz de prevenir o aliviar la amiloidosis o los síntomas asociados con la amiloidosis, un grupo de enfermedades y patologías asociadas con la formación de placas amiloides, que incluyen la amiloidosis secundaria y la amiloidosis relacionada con la edad, y que incluyen, pero no se limitan a patologías neurológicas tales como la Enfermedad de Alzheimer, e incluyen enfermedades o condiciones caracterizadas por pérdida de capacidad de la memoria cognitiva, tales como, por ejemplo, el deterioro cognitivo leve (MCI), la demencia de cuerpos de Lewy, el síndrome de Down, la hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Dutch), y el complejo de Parkinson-Demencia (Enfermedad de Guam), así como también otras enfermedades basadas o asociadas con proteínas semejantes a amiloides, tales como la parálisis supranuclear progresiva, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Creutzfeld Jacob, la enfermedad de Parkinson, la demencia relacionada con HIV, la esclerosis lateral amiotrófica (ALS). la diabetes de comienzo en la edad adulta, la amiloidosis cardíaca senil, los tumores endocrinos, y otras, con inclusión de la degeneración macular

En particular se describen nuevos métodos y nuevas composiciones para retener o mejorar, pero particularmente para restaurar, más particularmente para restaurar completamente, la capacidad de la memoria cognitiva de un mamífero que manifiesta una enfermedad o una condición asociada a amiloide.

Además, se describe en la presente memoria una composición de una vacuna terapéutica y un método de producción de tal composición, para el tratamiento de enfermedades y patologías causadas o asociadas con proteínas amiloides o semejantes a amiloides, que incluyen amiloidosis, un grupo de enfermedades y patologías asociadas con la formación de placas amiloides, que incluyen la amiloidosis secundaria y la amiloidosis relacionada con la edad, e incluyen, pero no se limitan a patologías neurológicas tales como la Enfermedad de Alzheimer (AD), particularmente una enfermedad o condición caracterizada por pérdida de capacidad de la memoria cognitiva tal como, por ejemplo, el deterioro cognitivo leve (MCI), que comprende un fragmento de un péptido que procede del

extremo N-terminal de un péptido A $\beta$ , en particular un fragmento de un péptido A $\beta$  que consiste en una extensión, única o repetitiva, de entre 13 y 15 restos de aminoácidos contiguos procedentes de la parte N-terminal del péptido A $\beta$ , pero particularmente un fragmento de un péptido A $\beta$ , que consiste en restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en los restos 1-15, 1-14 y 1-13 desde la parte N-terminal del péptido A $\beta$ , más particularmente del resto 1-15 según se indica en SEQ ID NO:1, con inclusión de fragmentos del mismo funcionalmente equivalentes, pero en especial un fragmento de un péptido A $\beta$  según se cita anteriormente en la presente memoria, unido a, o incorporado o reconstituido en una partícula/adyuvante de soporte tal como, por ejemplo, un liposoma.

Esta extensión de 13 a 15 restos de aminoácidos contiguos puede obtenerse del fragmento del extremo N-terminal 1-16, 1-17, 1-18 ó 1-20 del péptido A $\beta$ , pero particularmente del fragmento del extremo N-terminal 1-16 ó 1-17 del péptido A $\beta$ , según indican las secuencias SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO: 5, respectivamente, y puede estar interrumpido por supresión de uno a tres restos de aminoácidos dando por resultado una extensión de entre 13 y 15 restos de aminoácidos, en donde los restos de aminoácidos suprimidos pueden ser restos de aminoácidos adyacentes o restos separados unos de otros por al menos 1 resto de aminoácido, pero particularmente restos de aminoácidos que son restos no cargados negativamente, si se desea que la carga neta global de la molécula peptídica antigénica sea negativa, o restos de aminoácidos que no están cargados positivamente, si se desea que la carga neta global de la molécula peptídica antigénica sea positiva. Esta extensión contigua de 13-15 restos de aminoácidos puede estar repetida en la construcción antigénica según se describe en la presente memoria, entre 2 y 50 veces, particularmente entre 2 y 30 veces, más particularmente entre 2 y 20 veces, todavía más particularmente entre 2 y 16 veces, pero especialmente entre 2 y 10 veces.

La extensión de 13 a 15 restos de aminoácidos contiguos puede ser utilizada en forma de un polímero seleccionado del grupo que consiste en un 2-mero, un 3-mero, un 4-mero, un 5-mero, un 6-mero, un 7-mero, un 8-mero, un 9-mero, un 10-mero, un 12-mero, un 13-mero, un 14-mero, un 15-mero, un 16-mero, un 20-mero, un 30-mero y un 50-mero.

Además, se describe en la presente memoria una composición de una vacuna terapéutica y un método de producción de tal composición, para el tratamiento de enfermedades y patologías causadas o asociadas con proteínas amiloides o semejantes a amiloides, que incluyen amiloidosis, un grupo de enfermedades y patologías asociadas con la formación de placas amiloides, que incluye la amiloidosis secundaria y la amiloidosis relacionada con la edad, e incluyen, pero no se limitan a patologías neurológicas tales como la Enfermedad de Alzheimer (AD), particularmente una enfermedad o condición caracterizada por pérdida de capacidad de la memoria cognitiva tal como, por ejemplo, el deterioro cognitivo leve (MCI), según se especifica más adelante en esta memoria, que utiliza un fragmento de la parte N-terminal de un péptido A $\beta$ , pero particularmente un fragmento de un péptido A $\beta$  que consiste en restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16( $\Delta$ 2), 1-16( $\Delta$ 4), 1-16( $\Delta$ 5), 1-16( $\Delta$ 6), 1-16( $\Delta$ 8), 1-16( $\Delta$ 9), 1-16( $\Delta$ 10), 1-16( $\Delta$ 12), 16( $\Delta$ 13), 16( $\Delta$ 14), 1-16( $\Delta$ 15), 1-15( $\Delta$ 2), 1-15( $\Delta$ 4), 1-15( $\Delta$ 5), 1-15( $\Delta$ 6), 1-15( $\Delta$ 8), 1-15( $\Delta$ 9), 1-15( $\Delta$ 10); 1-15( $\Delta$ 12), 15( $\Delta$ 13), 15( $\Delta$ 14), más particularmente, un fragmento de un péptido A $\beta$  que consiste en los restos de aminoácidos 1-15 según indica la secuencia SEQ ID NO:1, y 1-16( $\Delta$ 14) según indica la secuencia SEQ ID NO:3.

También se describe en la presente memoria un fragmento de un péptido que es esencialmente idéntico a los fragmentos anteriormente citados y que posee sustancialmente la misma actividad biológica de dichos fragmentos, pero particularmente un fragmento de un péptido que es una variante de dichos fragmentos modificada conservativamente, en la que las alteraciones resultan en la sustitución de uno o más aminoácidos, particularmente de entre uno a 10 aminoácidos, más particularmente de entre uno a 6 aminoácidos, todavía más particularmente de entre uno a 4 aminoácidos, pero especialmente de entre uno a 3 aminoácidos, por un aminoácido químicamente similar. Tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares, son bien conocidas en la técnica y se describen en esta memoria más adelante. La sustitución conservativa se lleva a cabo, preferiblemente, de tal modo que la carga neta global del péptido y también la distribución de cargas a lo largo de la molécula del péptido permanece esencialmente la misma.

En particular al menos uno, particularmente 2, más particularmente 3 ó incluso la totalidad de los restos de aminoácidos cargados negativamente 1, 3, 7, 11, pueden reemplazarse por un aminoácido cargado negativamente, químicamente similar. En particular, el resto Asp situado en las posiciones 1 y 7, respectivamente, puede ser reemplazado por un resto Glu, y el resto Glu en las posiciones 9 y 11, respectivamente, puede ser reemplazado por un resto Asp.

En particular se describe una composición de vacuna terapéutica y un método de producción de tal composición, que comprende un fragmento de un péptido A $\beta$ , que procede de la parte N-terminal del péptido A $\beta$ , pero particularmente un fragmento de un péptido A $\beta$  que consiste en restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16( $\Delta$ 2), 1-16( $\Delta$ 4), 1-16( $\Delta$ 5), 1-16( $\Delta$ 6), 1-16( $\Delta$ 8), 1-16( $\Delta$ 9), 1-16( $\Delta$ 10), 1-16( $\Delta$ 12), 16( $\Delta$ 13), 16( $\Delta$ 14), 1-16( $\Delta$ 15), 1-15( $\Delta$ 2), 1-15( $\Delta$ 4), 1-15( $\Delta$ 5), 1-15( $\Delta$ 6), 1-15( $\Delta$ 8), 1-15( $\Delta$ 9), 1-15( $\Delta$ 10); 1-15( $\Delta$ 12), 15( $\Delta$ 13), 15( $\Delta$ 14), un antígeno del péptido A $\beta$ <sub>1-16( $\Delta$ 15)</sub>, más particularmente un antígeno del péptido A $\beta$ <sub>1-16( $\Delta$ 14)</sub> o A $\beta$ <sub>1-16( $\Delta$ 13)</sub>, aún más particularmente un antígeno del péptido A $\beta$ <sub>1-14</sub>, específicamente un antígeno del péptido A $\beta$ <sub>1-15</sub>, pero especialmente un fragmento de un péptido A $\beta$  que consiste en los restos de aminoácidos 1-15 según indica la secuencia SEQ ID NO: 1, y 1-16( $\Delta$ 14) como indica la secuencia SEQ ID NO:3, para el tratamiento de enfermedades

y patologías ocasionadas o asociadas con proteínas amiloides o semejantes a amiloides, que incluyen amiloidosis, un grupo de enfermedades y patologías asociadas con la formación de placas amiloides, que incluye la amiloidosis secundaria y la amiloidosis relacionada con la edad, e incluyen, pero no se limitan a patologías neurológicas tales como la Enfermedad de Alzheimer (AD), particularmente una enfermedad o una condición caracterizada por pérdida de la capacidad de la memoria cognitiva tal como, por ejemplo, el deterioro cognitivo leve (MCI).

Aun más, se describe en la presente memoria una composición de vacuna terapéutica y un método de producción de una composición de vacuna terapéutica para la retención o la mejoría, en particular para la restauración completa de la capacidad de la memoria cognitiva de un animal, particularmente un mamífero o un ser humano, aquejado de deterioro de la memoria, usando un fragmento de un péptido A $\beta$  que procede de la parte N-terminal del péptido A $\beta$ , pero particularmente un fragmento de un péptido A $\beta$  que consiste en restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16( $\Delta$ 2), 1-16( $\Delta$ 4), 1-16( $\Delta$ 5), 1-16( $\Delta$ 6), 1-16( $\Delta$ 8), 1-16( $\Delta$ 9), 1-16( $\Delta$ 10), 1-16( $\Delta$ 12), 16( $\Delta$ 13), 16( $\Delta$ 14), 1-16( $\Delta$ 15), 1-15( $\Delta$ 2), 1-15( $\Delta$ 4), 1-15( $\Delta$ 5), 1-15( $\Delta$ 6), 1-15( $\Delta$ 8), 1-15( $\Delta$ 9), 1-15( $\Delta$ 10); 1-15( $\Delta$ 12), 15( $\Delta$ 13), 15( $\Delta$ 14), particularmente un antígeno del péptido A $\beta$ <sub>1-16( $\Delta$ 15)</sub>, más particularmente un antígeno del péptido A $\beta$ <sub>1-16( $\Delta$ 14)</sub> o A $\beta$ <sub>1-16( $\Delta$ 13)</sub>, aún más particularmente un antígeno del péptido A $\beta$ <sub>1-14</sub>, específicamente un antígeno del péptido A $\beta$ <sub>1-15</sub>, pero especialmente un fragmento de un péptido A $\beta$  que consiste en los restos de aminoácidos 1-15 según indica la secuencia SEQ ID NO: 1, y 1-16( $\Delta$ 14) como indica la secuencia SEQ ID NO:3.

Se describe en la presente memoria, además, un método para el tratamiento de enfermedades y patologías causadas o asociadas con proteínas amiloides o semejantes a amiloides, que incluyen amiloidosis, un grupo de enfermedades y patologías asociadas con la formación de placas amiloides, que incluye la amiloidosis secundaria y la amiloidosis relacionada con la edad, e incluyen, pero no se limitan a patologías neurológicas tales como la Enfermedad de Alzheimer (AD), particularmente una enfermedad o condición caracterizada por pérdida de capacidad de la memoria cognitiva tal como, por ejemplo, el deterioro cognitivo leve (MCI), por administración a un animal, en particular un mamífero o un ser humano, de una composición de vacuna según la invención y como se describe en la presente memoria.

Además, se describe un método para retener o aumentar la capacidad de la memoria cognitiva pero, particularmente, para restaurar completamente la capacidad de la memoria cognitiva de un animal, en particular un mamífero o un ser humano, aquejado de deterioro de la memoria, por administración a un animal, en particular un mamífero o un ser humano, de una composición de vacuna según la invención y como se describe en la presente memoria.

Aun más, se describe en la presente memoria una composición de vacuna terapéutica y un método de producción de tal composición, así como un método para el tratamiento de enfermedades y patologías causadas o asociadas con proteínas amiloides o semejantes a amiloides, que incluyen amiloidosis, un grupo de enfermedades y patologías asociadas con la formación de placas amiloides, que incluye la amiloidosis secundaria y la amiloidosis relacionada con la edad, e incluyen, pero no se limitan a patologías neurológicas tales como la Enfermedad de Alzheimer (AD), particularmente una enfermedad o condición caracterizada por pérdida de capacidad de la memoria cognitiva tal como, por ejemplo, el deterioro cognitivo leve (MCI), usando un antígeno de un péptido A $\beta$  como se ha descrito anteriormente en esta memoria, pero particularmente un fragmento de un péptido A $\beta$ , que procede de la parte N-terminal del péptido A $\beta$ , pero particularmente un fragmento de un péptido A $\beta$  que consiste en restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16( $\Delta$ 2), 1-16( $\Delta$ 4), 1-16( $\Delta$ 5), 1-16( $\Delta$ 6), 1-16( $\Delta$ 8), 1-16( $\Delta$ 9), 1-16( $\Delta$ 10), 1-16( $\Delta$ 12), 16( $\Delta$ 13), 16( $\Delta$ 14), 1-16( $\Delta$ 15), 1-15( $\Delta$ 2), 1-15( $\Delta$ 4), 1-15( $\Delta$ 5), 1-15( $\Delta$ 6), 1-15( $\Delta$ 8), 1-15( $\Delta$ 9), 1-15( $\Delta$ 10); 1-15( $\Delta$ 12), 15( $\Delta$ 13), 15( $\Delta$ 14), en particular un antígeno del péptido A $\beta$ <sub>1-16( $\Delta$ 15)</sub>, más particularmente un antígeno del péptido A $\beta$ <sub>1-16( $\Delta$ 14)</sub> o A $\beta$ <sub>1-16( $\Delta$ 13)</sub>, aún más particularmente un antígeno del péptido A $\beta$ <sub>1-14</sub>, específicamente un antígeno del péptido A $\beta$ <sub>1-15</sub>, pero especialmente un fragmento de un péptido A $\beta$  que consiste en los restos de aminoácidos 1-15 según indica la secuencia SEQ ID NO: 1, y 1-16( $\Delta$ 14) como indica la secuencia SEQ ID NO:3, en donde el antígeno del péptido A $\beta$  está modificado de tal modo que es capaz de mantener y estabilizar una conformación definida. caracterizada por una proporción equilibrada de porciones  $\alpha$ -helicoidal y/o  $\beta$ -laminar y/o porciones arrolladas al azar, y de inducir en el animal tratado una respuesta inmunitaria altamente específica.

La composición de vacuna según se ha descrito anteriormente en la presente memoria, por administración a un animal, particularmente un mamífero, pero en especial un ser humano, da por resultado principalmente la generación de anticuerpos de los subtipos Th2 no inflamatorios tales como , por ejemplo, los isotipos IgG1 e IgG2b y/o anticuerpos de la subclase de IgG independiente de células T tales como, por ejemplo, la IgG3, y/o no conduce a un aumento importante de los marcadores de inflamación existentes en el cerebro, en particular de marcadores de inflamación seleccionados del grupo que consiste en IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ .

La vacuna como se describe en la presente memoria, por administración a un animal, particularmente un mamífero, pero en especial, un ser humano, conduce a una disminución importante de A $\beta$ <sub>1-40</sub> y A $\beta$ <sub>1-42</sub>, insolubles, relacionados con la placa, en el cerebro

En otro aspecto, todavía, la vacuna como se describe anteriormente en la presente memoria, por administración a un animal, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano, conduce a una reducción importante en el cerebro del nivel de A $\beta$ 1-42 soluble.

Además, una vacuna como se describe anteriormente en la presente memoria, que, por administración a un animal, particularmente un mamífero o un ser humano, aquejado de una condición asociada a amiloide, caracterizada por pérdida de capacidad de la memoria cognitiva, conduce a un aumento de la retención de la capacidad de la memoria cognitiva.

Una vacuna como se describe anteriormente en la presente memoria, que, por administración a un animal, particularmente un mamífero o un ser humano, aquejado de una condición asociada a amiloide, caracterizada por pérdida de capacidad de la memoria cognitiva, puede conducir a la restauración completa de la capacidad de la memoria cognitiva.

En particular, el antígeno de péptido A $\beta$  como se describe anteriormente en la presente memoria, específicamente un fragmento de un péptido A $\beta$  que procede de la parte N-terminal del péptido A $\beta$ , pero particularmente un fragmento de un péptido A $\beta$  que consiste en restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16( $\Delta$ 2), 1-16( $\Delta$ 4), 1-16( $\Delta$ 5), 1-16( $\Delta$ 6), 1-16( $\Delta$ 8), 1-16( $\Delta$ 9), 1-16( $\Delta$ 10), 1-16( $\Delta$ 12), 16( $\Delta$ 13), 16( $\Delta$ 14), 1-16( $\Delta$ 15), 1-15( $\Delta$ 2), 1-15( $\Delta$ 4), 1-15( $\Delta$ 5), 1-15( $\Delta$ 6), 1-15( $\Delta$ 8), 1-15( $\Delta$ 9), 1-15( $\Delta$ 10); 1-15( $\Delta$ 12), 15( $\Delta$ 13), 15( $\Delta$ 14), en particular un antígeno del péptido A $\beta$ <sub>1-16( $\Delta$ 15)</sub>, más particularmente un antígeno del péptido A $\beta$ <sub>1-16( $\Delta$ 14)</sub> o A $\beta$ <sub>1-16( $\Delta$ 13)</sub>, aún más particularmente un antígeno del péptido A $\beta$ <sub>1-14</sub>, específicamente un antígeno del péptido A $\beta$ <sub>1-15</sub>, pero especialmente un fragmento de un péptido A $\beta$  que consiste en los restos de aminoácidos 1-15 según indica la secuencia SEQ ID NO: 1, y 1-16( $\Delta$ 14) como indica la secuencia SEQ ID NO:3, es presentado a, o incorporado o reconstituido en un soporte tal como, por ejemplo, una vesícula, un cuerpo en partículas o una molécula, pero, particularmente, un liposoma.

Las composiciones inmunógenas como se describe en la presente memoria, pueden comprender liposomas obtenidos por reconstitución de liposomas en presencia de péptidos antigénicos purificados o parcialmente purificados o modificados, según la invención. Adicionalmente, fragmentos de péptidos pueden ser reconstituidos en liposomas. Además, se describe en la presente memoria fragmentos de péptidos antigénicos modificados para aumentar su antigenicidad. Por ejemplo, restos antigénicos y adyuvantes pueden fijarse o mezclarse con el péptido. Como ejemplos de restos antigénicos y adyuvantes se incluyen, pero no se limitan a derivados dipeptídicos muramílicos lipófilos, polímeros de bloques no iónicos, adyuvante de hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio. y mezclas de los mismos.

En otro aspecto, el antígeno de un péptido A $\beta$ , como se describe anteriormente en la presente memoria, específicamente un fragmento de un péptido A $\beta$  procedente de la parte N-terminal del péptido A $\beta$ , pero particularmente un fragmento de un péptido A $\beta$  que consiste en restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16( $\Delta$ 2), 1-16( $\Delta$ 4), 1-16( $\Delta$ 5), 1-16( $\Delta$ 6), 1-16( $\Delta$ 8), 1-16( $\Delta$ 9), 1-16( $\Delta$ 10), 1-16( $\Delta$ 12), 16( $\Delta$ 13), 16( $\Delta$ 14), 1-16( $\Delta$ 15), 1-15( $\Delta$ 2), 1-15( $\Delta$ 4), 1-15( $\Delta$ 5), 1-15( $\Delta$ 6), 1-15( $\Delta$ 8), 1-15( $\Delta$ 9), 1-15( $\Delta$ 10); 1-15( $\Delta$ 12), 15( $\Delta$ 13), 15( $\Delta$ 14), en particular un antígeno del péptido A $\beta$ <sub>1-16( $\Delta$ 15)</sub>, más particularmente un antígeno del péptido A $\beta$ <sub>1-16( $\Delta$ 14)</sub> o A $\beta$ <sub>1-16( $\Delta$ 13)</sub>, aún más particularmente un antígeno del péptido A $\beta$ <sub>1-14</sub>, específicamente un antígeno del péptido A $\beta$ <sub>1-15</sub>, pero especialmente un fragmento de un péptido A $\beta$  que consiste en los restos de aminoácidos 1-15 según indica la secuencia SEQ ID NO: 1, y 1-16( $\Delta$ 14) como indica la secuencia SEQ ID NO:3, está modificado por un resto lipófilo o hidrófobo que facilita la inserción en la bicapa lipídica del adyuvante de soporte/inmunitario del liposoma, en particular por un resto lipófilo o hidrófobo que actúa como anclaje para el péptido en la bicapa del liposoma, y tiene una dimensión que conduce a que el péptido se sitúe y se establezca en proximidad estrecha a la superficie del liposoma.

Más específicamente, el resto lipófilo o hidrófobo es un ácido graso, un triglicérido o un fosfolípido, pero especialmente un ácido graso, un triglicérido o un fosfolípido, en donde la cadena principal carbonada del ácido graso tiene al menos 10 átomos de carbono. Particularmente, el resto lipófilo o hidrófobo es un ácido graso con una cadena principal carbonada de al menos, aproximadamente, 14 átomos de carbono y hasta aproximadamente 24 átomos de carbono, estando situado dentro de este intervalo cada número individual de átomos de carbono. Más particularmente, el resto lipófilo o hidrófobo tiene una cadena principal carbonada de al menos 14 átomos de carbono, pero especialmente 16 átomos de carbono. Como ejemplos de restos hidrófobos se incluyen, pero no se limitan a ácido palmítico, ácido esteárico, ácido mirístico, ácido láurico, ácido oleico, ácido linoleico y ácido linolénico. En un aspecto el resto lipófilo o hidrófobo es el ácido palmítico

Aún más específicamente, el resto hidrófobo es ácido palmítico y la preparación de liposoma puede contener, además, un adyuvante tal como, por ejemplo, lípido A, alumbre, fosfato cálcico, interleuquina 1. y/o microcápsulas de polisacáridos y proteínas, pero particularmente un lípido A destoxificado, tal como lípido A monofosforilado o difosforilado, o alumbre.

También se describe en la presente memoria una composición de vacuna terapéutica y un método de producción de una composición tal, usando un péptido antigénico inmunógeno según la invención y como se describe



anteriormente en la presente memoria, para el tratamiento de enfermedades y patologías causadas o asociadas con proteínas amiloides o semejantes a amiloides, que incluyen la amiloidosis, un grupo de enfermedades y patologías asociadas con la formación de placas amiloides, que incluye la amiloidosis secundaria y la amiloidosis relacionada con la edad, e incluyen, pero no se limitan a patologías neurológicas tales como la Enfermedad de Alzheimer (AD), particularmente para la retención, aumento o restauración de la capacidad de la memoria cognitiva de un animal, en particular un mamífero o un ser humano aquejado de deterioro de la memoria, así como un método para el tratamiento de dichas amiloidosis, en donde el antígeno de un péptido  $\beta$ -amiloide es un antígeno de un péptido  $A\beta$  palmitoilado, según la invención, y como se ha descrito anteriormente en la presente memoria, reconstituido en un liposoma, específicamente un fragmento de un péptido  $A\beta$  palmitoilado que procede de la parte N-terminal del péptido  $A\beta$ , pero particularmente un fragmento de un péptido  $A\beta$  palmitoilado que consiste en restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16( $\Delta$ 2), 1-16( $\Delta$ 4), 1-16( $\Delta$ 5), 1-16( $\Delta$ 6), 1-16( $\Delta$ 8), 1-16( $\Delta$ 9), 1-16( $\Delta$ 10), 1-16( $\Delta$ 12), 16( $\Delta$ 13), 16( $\Delta$ 14), 1-16( $\Delta$ 15), 1-15( $\Delta$ 2), 1-15( $\Delta$ 4), 1-15( $\Delta$ 5), 1-15( $\Delta$ 6), 1-15( $\Delta$ 8), 1-15( $\Delta$ 9), 1-15( $\Delta$ 10); 1-15( $\Delta$ 12), 15( $\Delta$ 13), 15( $\Delta$ 14), particularmente un antígeno del péptido  $A\beta_{1-16(\Delta 15)}$  palmitoilado, más particularmente un antígeno del péptido  $A\beta_{1-16(\Delta 14)}$  o  $A\beta_{1-16(\Delta 13)}$  palmitoilado, aún más particularmente un antígeno del péptido  $A\beta_{1-14}$  palmitoilado, específicamente un antígeno del péptido  $A\beta_{1-15}$  palmitoilado, pero especialmente un fragmento de un péptido  $A\beta$  palmitoilado, que consiste en los restos de aminoácidos 1-15 como indica la secuencia SEQ ID NO: 1, y 1-16( $\Delta$ 14) como indica la secuencia SEQ ID NO: 3, modificado por restos palmitoilo enlazados covalentemente, en particular entre 2 y 4 restos palmitoilo, más particularmente 4 restos palmitoilo, unidos a cada uno de los términos del antígeno del péptido mediante uno o más, pero particularmente mediante uno o dos, restos de aminoácidos adecuados tales como lisina, ácido glutámico o cisteína, o cualquier otro resto de aminoácido que pueda usarse adecuadamente para acoplar un resto palmitoilo al péptido antigénico.

En particular, 2 o más de las moléculas de antígeno del péptido  $A\beta$  palmitoilado, modificadas mediante restos palmitoilo enlazados covalentemente en cada extremo del péptido, están reconstituidas en un liposoma único..

Además, se describen en la presente memoria nuevos métodos y nuevas composiciones inmunógenas que comprenden un péptido antigénico inmunógeno, que, por administración a un animal, particularmente un mamífero o un ser humano, aquejado de una condición asociado con compuestos amiloides, en particular de una condición caracterizada por pérdida de la capacidad de la memoria cognitiva tal como, por ejemplo, el deterioro cognitivo leve (MCI), induce una respuesta inmunitaria en dicho animal o ser humano. El tratamiento con la vacuna terapéutica como se describe en la presente memoria, conduce a la retención o a un aumento de la capacidad de la memoria cognitiva pero, particularmente, a una restauración completa de la capacidad de la memoria cognitiva.

En un aspecto, se describen una composición de vacuna terapéutica y un método de producción de una composición tal, empleando un péptido antigénico inmunógeno, para inducir una respuesta inmunitaria en un animal, particularmente un mamífero o un ser humano, así como también un método para inducir una respuesta inmunitaria en un animal, particularmente un mamífero o un ser humano, aquejado de una condición asociada a amiloide, caracterizada por pérdida de capacidad de la memoria cognitiva tal como, por ejemplo, el deterioro cognitivo leve (MCI), por administración a dicho animal o ser humano de una composición de vacuna terapéutica que comprende un antígeno de un péptido  $A\beta$  según la invención y como se describe anteriormente en la presente memoria, pero específicamente un fragmento de un péptido  $A\beta$  palmitoilado que procede de la parte N-terminal del péptido  $A\beta$ , pero particularmente un fragmento de un péptido  $A\beta$  palmitoilado que consiste en restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16( $\Delta$ 2), 1-16( $\Delta$ 4), 1-16( $\Delta$ 5), 1-16( $\Delta$ 6), 1-16( $\Delta$ 8), 1-16( $\Delta$ 9), 1-16( $\Delta$ 10), 1-16( $\Delta$ 12), 16( $\Delta$ 13), 16( $\Delta$ 14), 1-16( $\Delta$ 15), 1-15( $\Delta$ 2), 1-15( $\Delta$ 4), 1-15( $\Delta$ 5), 1-15( $\Delta$ 6), 1-15( $\Delta$ 8), 1-15( $\Delta$ 9), 1-15( $\Delta$ 10); 1-15( $\Delta$ 12), 15( $\Delta$ 13), 15( $\Delta$ 14), particularmente un antígeno del péptido  $A\beta_{1-16(\Delta 15)}$  palmitoilado, más particularmente un antígeno del péptido  $A\beta_{1-16(\Delta 14)}$  o  $A\beta_{1-16(\Delta 13)}$  palmitoilado, aún más particularmente un antígeno del péptido  $A\beta_{1-14}$  palmitoilado, específicamente un antígeno del péptido  $A\beta_{1-15}$  palmitoilado, pero especialmente un fragmento del péptido  $A\beta$  palmitoilado que consiste en los restos de aminoácidos 1-15 indicados en la secuencia SEQ ID NO: 1, y 1-16( $\Delta$ 14) como indica la secuencia SEQ ID NO: 3, tal que la capacidad de la memoria cognitiva del animal o ser humano tratado es retenida o aumentada, pero, particularmente, restaurada completamente.

El péptido antigénico como se describe en la presente memoria anteriormente, pero específicamente un fragmento de un péptido  $A\beta$  que procede de la parte N-terminal del péptido  $A\beta$ , pero particularmente un fragmento de un péptido  $A\beta$  que consiste en restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16( $\Delta$ 2), 1-16( $\Delta$ 4), 1-16( $\Delta$ 5), 1-16( $\Delta$ 6), 1-16( $\Delta$ 8), 1-16( $\Delta$ 9), 1-16( $\Delta$ 10), 1-16( $\Delta$ 12), 16( $\Delta$ 13), 16( $\Delta$ 14), 1-16( $\Delta$ 15), 1-15( $\Delta$ 2), 1-15( $\Delta$ 4), 1-15( $\Delta$ 5), 1-15( $\Delta$ 6), 1-15( $\Delta$ 8), 1-15( $\Delta$ 9), 1-15( $\Delta$ 10); 1-15( $\Delta$ 12), 15( $\Delta$ 13), 15( $\Delta$ 14), particularmente un antígeno del péptido  $A\beta_{1-16(\Delta 15)}$ , más particularmente un antígeno del péptido  $A\beta_{1-16(\Delta 14)}$  o  $A\beta_{1-16(\Delta 13)}$ , aún más particularmente un antígeno del péptido  $A\beta_{1-14}$ , específicamente un antígeno del péptido  $A\beta_{1-15}$ , pero especialmente un fragmento de un péptido  $A\beta$  que consiste en los restos de aminoácidos 1-15 indicados en la secuencia SEQ ID NO: 1, y 1-16( $\Delta$ 14) como indica la secuencia SEQ ID NO: 3, es también parte de la presente invención.

Además, se describe en la presente memoria un antígeno de un péptido  $A\beta$  palmitoilado, como se describe anteriormente en la presente memoria, específicamente un fragmento de un péptido  $A\beta$  palmitoilado que procede

de la parte N-terminal del péptido A $\beta$ , pero particularmente un fragmento de un péptido A $\beta$  palmitoilado que consiste en restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16( $\Delta$ 2), 1-16( $\Delta$ 4), 1-16( $\Delta$ 5), 1-16( $\Delta$ 6), 1-16( $\Delta$ 8), 1-16( $\Delta$ 9), 1-16( $\Delta$ 10), 1-16( $\Delta$ 12), 16( $\Delta$ 13), 16( $\Delta$ 14), 1-16( $\Delta$ 15), 1-15( $\Delta$ 2), 1-15( $\Delta$ 4), 1-15( $\Delta$ 5), 1-15( $\Delta$ 6), 1-15( $\Delta$ 8), 1-15( $\Delta$ 9), 1-15( $\Delta$ 10); 1-15( $\Delta$ 12), 15( $\Delta$ 13), 15( $\Delta$ 14), particularmente un  
 5 antígeno del péptido A $\beta_{1-16(\Delta 15)}$  palmitoilado, más particularmente un antígeno del péptido A $\beta_{1-16(\Delta 14)}$  o A $\beta_{1-16(\Delta 13)}$  palmitoilado, aún más particularmente un antígeno del péptido A $\beta_{1-14}$  palmitoilado, específicamente un antígeno del péptido A $\beta_{1-15}$  palmitoilado, pero especialmente un fragmento de un péptido A $\beta$  palmitoilado que consiste en los restos de aminoácidos 1-15 indicados en la secuencia SEQ ID NO: 1, y 1-16( $\Delta$ 14) como indica la secuencia SEQ ID NO: 3, modificado por restos palmitoilo enlazados covalentemente, en particular entre 2 y 4 restos palmitoilo, más  
 10 particularmente 4 restos palmitoilo, unidos a cada uno de los términos del antígeno del péptido mediante uno o más, pero particularmente mediante uno o dos restos de aminoácidos adecuados tales como lisina, ácido glutámico o cisteína, o cualquier otro resto de aminoácido que pueda usarse adecuadamente para acoplar un resto palmitoilo al péptido antigénico.

En particular, 2 o más de las moléculas de antígeno del péptido A $\beta$  palmitoilado, modificadas por restos palmitoilo enlazados covalentemente en cada extremo del péptido, están reconstituidas en un único liposoma.

Además, se describe en la presente memoria un péptido antigénico presentado fijado, incorporado o reconstituido en un soporte tal como, por ejemplo, una vesícula, un cuerpo en partículas o una molécula pero, particularmente, un liposoma, como se describe anteriormente en esta memoria, pero específicamente un fragmento de un péptido A $\beta$  que procede de la parte N-terminal del péptido A $\beta$ , pero particularmente un fragmento de un péptido A $\beta$  que consiste  
 20 en restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16( $\Delta$ 2), 1-16( $\Delta$ 4), 1-16( $\Delta$ 5), 1-16( $\Delta$ 6), 1-16( $\Delta$ 8), 1-16( $\Delta$ 9), 1-16( $\Delta$ 10), 1-16( $\Delta$ 12), 16( $\Delta$ 13), 16( $\Delta$ 14), 1-16( $\Delta$ 15), 1-15( $\Delta$ 2), 1-15( $\Delta$ 4), 1-15( $\Delta$ 5), 1-15( $\Delta$ 6), 1-15( $\Delta$ 8), 1-15( $\Delta$ 9), 1-15( $\Delta$ 10); 1-15( $\Delta$ 12), 15( $\Delta$ 13), 15( $\Delta$ 14), particularmente un antígeno del péptido A $\beta_{1-16(\Delta 15)}$ , más particularmente un antígeno del péptido A $\beta_{1-16(\Delta 14)}$  o A $\beta_{1-16(\Delta 13)}$ , aún más particularmente un antígeno del péptido A $\beta_{1-14}$ , específicamente un antígeno del péptido A $\beta_{1-15}$ , pero especialmente  
 25 un fragmento de un péptido A $\beta$  que consiste en los restos de aminoácidos 1-15 indicados en la secuencia SEQ ID NO: 1, y 1-16( $\Delta$ 14) como indica la secuencia SEQ ID NO: 3, presentado fijado, o incorporado o reconstituido en un soporte tal como, por ejemplo, una vesícula, un cuerpo en partículas o una molécula como se describe anteriormente en la presente memoria.

La presente invención, por tanto, proporciona en una primera realización una construcción antigénica que comprende un fragmento de un péptido antigénico A $\beta$ , que consiste en una extensión, única o repetitiva, de entre 13 y 15 restos de aminoácidos contiguos que proceden del fragmento del extremo N-terminal 1-16 ó 1-17 del péptido A $\beta$ , para uso en el tratamiento de una enfermedad o una condición asociada a amiloide, caracterizada por pérdida de capacidad de la memoria cognitiva de un animal o un ser humano, en donde el antígeno del péptido A $\beta$  es (a) formado previamente mediante síntesis peptídica automatizada, estándar, sobre resina, y (b) modificado luego por  
 30 injerto sobre resina de un resto lipófilo o hidrófilo en los restos de aminoácidos terminales del péptido A $\beta$  formado previamente, y reconstituido en un liposoma, y en donde la administración de dicha construcción antigénica en forma de una composición de vacuna a un animal o un ser humano aquejado de tal enfermedad o condición conduce a

- a. la generación de anticuerpos del subtipo Th2 no inflamatorio;
- b. la generación de anticuerpos de la subclase de IgG independiente de células T; y
- 40 c. un aumento de la retención de la capacidad de la memoria cognitiva y/o a la restauración completa de la capacidad de la memoria cognitiva.

En la segunda realización la invención proporciona una construcción antigénica para usar según la realización (1), que comprende un fragmento de un péptido A $\beta$  que consiste en una extensión única o repetitiva de entre 13 y 15 restos de aminoácidos contiguos que proceden de la parte N-terminal del péptido A $\beta$ , seleccionado del grupo que  
 45 consiste en los restos 1-15, 1-14 y 1-13.

En la tercera realización de la invención se proporciona una construcción antigénica para uso según una cualquiera de las realizaciones 1a 2, que comprende un fragmento de un péptido A $\beta$ , único o repetitivo, seleccionado del grupo que consiste en antígeno del péptido A $\beta_{1-15}$  según indica la secuencia SEQ ID NO:1 y A $\beta_{1-16\Delta 14}$  como indica la secuencia SEQ ID NO: 3,

En la cuarta realización, la invención proporciona, además, una construcción antigénica para uso según una cualquiera de las realizaciones 1a 3, en donde el antígeno del péptido A $\beta$  se presenta fijado a o reconstituido en un soporte/adyuvante.

En la quinta realización específica de la invención, se proporciona una construcción antigénica para uso según una cualquiera de las realizaciones 1 a 4, en donde el resto lipófilo o hidrófobo es un ácido graso, un triglicérido o un fosfolípido.

En la sexta realización específica de la invención se proporciona una construcción antigénica para uso según la realización 5, en donde el resto hidrófobo es ácido palmítico.

También está comprendida por la presente invención (realización 7) una composición de vacuna que comprende una construcción antigénica para uso según una cualquiera de las realizaciones 1a 6, para el tratamiento de una enfermedad o una condición asociada a amiloide, caracterizada por pérdida de capacidad de la memoria cognitiva de un animal o un ser humano aquejado de una condición tal.

- 5 En una realización específica (8) de la invención se proporciona una composición de vacuna para uso según la realización 7, que comprende un antígeno del péptido  $A\beta_{1-15}$ .

En otra realización específica (9) de la invención se proporciona una composición de vacuna para uso según la realización 8, en donde el antígeno del péptido  $A\beta_{1-15}$  es presentado reconstituido en un liposoma.

- 10 Todavía en otra realización específica (10), la invención proporciona una composición de vacuna para uso según la realización 9, en donde la preparación de liposoma contiene un adyuvante y/o un inmunomodulador.

La invención se refiere, además, a una composición de vacuna (realización 11) para uso según una cualquiera de las realizaciones 7 a 10, para el tratamiento de una enfermedad o una condición asociada a amiloide, en donde el antígeno del péptido  $\beta$ -amiloide es un antígeno del péptido  $A\beta_{1-15}$  palmitoilado modificado por entre 2 y 4 restos palmitoilo enlazados covalentemente en cada extremo del péptido reconstituido en un liposoma.

- 15 En la composición de vacuna (realización 12) para uso según la realización 11, 2 o más moléculas de antígeno del péptido  $A\beta_{1-15}$  palmitoilado, modificadas por restos palmitoilo enlazados covalentemente en cada extremo del péptido, están reconstituidas en un liposoma único.

- 20 Sin pretender estar sujeto por una hipótesis específica, es razonable suponer que la respuesta inmunitaria inducida por la composición de vacuna terapéutica según se describe en esta memoria, puede conducir en el animal o ser humano a una estimulación de las células T y otras células inmunitarias reactivas dirigidas contra un agente inmunógeno, pero particularmente a la generación de anticuerpos altamente específicos y altamente eficaces que poseen la capacidad de reconocer específicamente y unirse a epítopos específicos de una variedad de antígenos  $\beta$ -amiloides, cuyo anticuerpo, por unión al antígeno, media y/o induce el efecto observable de retención, aumento y, en particular, restauración completa de la capacidad de la memoria cognitiva del animal o ser humano tratado

- 25 Además, se describe una composición de vacuna que, por administración a un animal, particularmente un mamífero o a un ser humano, induce la generación de un anticuerpo en el animal o ser humano tratado, que directa y específicamente se une a fibras  $\beta$ -amiloides tales como, por ejemplo, fibras que comprenden péptidos monoméricos  $A\beta$  1-39; 1-40, 1-41, 1-42 ó 1-43, pero especialmente a fibras que comprenden péptidos monoméricos  $A\beta_{1-42}$ , y/o es capaz de inducir la solubilización de fibrillas o filamentos amiloides, poliméricos, de alta magnitud molecular  
30 formados previamente por la agregación de péptidos monoméricos amiloides, en particular péptidos monoméricos  $\beta$ -amiloides, tales como, por ejemplo, los péptidos monoméricos  $A\beta$  1-39; 1-40, 1-41, 1-42 ó 1-43, pero especialmente los péptidos monoméricos  $A\beta_{1-42}$ , por dirigirse y unirse específicamente a un epítipo situado dentro de la región epitópica de la proteína  $\beta$ -amiloide, en particular una región epitópica del polipéptido  $A\beta$  confinada por restos de aminoácidos  $aa_n$ - $aa_m$ , siendo n un número entero entre 2 y 15, particularmente entre 5 y 15, más  
35 particularmente entre 8 y 15, todavía más particularmente entre 10 y 15, y siendo m un número entero entre 3 y 17, particularmente entre 6 y 17, más particularmente entre 9 y 17, todavía más particularmente entre 11 y 17, en donde n y m no puede ser números idénticos y n debe ser siempre un número menor que m, siendo la diferencia entre n y  $m \geq 2$ .

- 40 En particular, el anticuerpo se une a un epítipo situado dentro de la región epitópica de la proteína  $\beta$ -amiloide que comprende restos de los aminoácidos 1-10, pero particularmente restos de aminoácidos 1-9.

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

- 45 Además, se describe un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, que incluye cualquier anticuerpo o partes funcionales del mismo, funcionalmente equivalentes, cuyo anticuerpo incorpora al menos una de las propiedades seleccionadas del grupo que consiste en inhibición de la agregación, desagregación, inducción de transición de conformación, reconocimiento de un epítipo situado en la región 4-16 y unión directa al mismo, particularmente en la región 1-9, pero especialmente una combinación de dos o más de dichas propiedades. Más  
50 específicamente, se proporciona un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, que incluye cualquier anticuerpo o partes funcionales del mismo funcionalmente equivalentes, cuyo anticuerpo pone de manifiesto una reactividad combinada frente a la región 1-16 y 29-40, más particularmente frente a la región 1-16 y 22-35, dado que es capaz de reconocer y unirse a ambas de dichas regiones, la región 1-16 y la 29-40 y la región 1-16 y 22-35, respectivamente, e incorpora al menos una de las propiedades anteriormente citadas en esta memoria, que es  
55 inhibición de la agregación, desagregación e inducción de transición de conformación, pero especialmente una combinación de dos o más de dichas propiedades.

Los anticuerpos que son inducidos por la composición de vacuna como se describe en la presente memoria, y que pueden obtenerse de un animal inmunizado o de una línea celular de un hibridoma que produce dichos anticuerpos, son también parte de la invención.

Además, se describe en la presente memoria un anticuerpo que incluye cualquier anticuerpo o partes funcionales del mismo funcionalmente equivalentes, en particular un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo o partes funcionales del mismo funcionalmente equivalentes, que puede obtenerse inmunizando un animal adecuado con una composición de vacuna según la invención y como se describe anteriormente en la presente memoria, en particular una composición de vacuna que comprende un antígeno del péptido  $A\beta_{1-16(\Delta 1-15)}$ , más particularmente un antígeno del péptido  $A\beta_{1-16(\Delta 14)}$  o  $A\beta_{1-16(\Delta 13)}$ , aún más particularmente un antígeno del péptido  $A\beta_{1-14}$ , pero especialmente un antígeno del péptido  $A\beta_{1-15}$ , cuyo anticuerpo es un anticuerpo bifuncional y, por incubación conjunta con péptidos monoméricos amiloides, en particular péptidos monoméricos  $\beta$ -amiloides tales como, por ejemplo, péptidos monoméricos  $A\beta$  1-38, 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 ó 1-43, pero especialmente péptidos monoméricos  $A\beta_{1-42}$ , inhibe la agregación de los monómeros  $A\beta$  en fibrillas poliméricas de alta magnitud molecular y, además, por incubación conjunta con fibrillas o filamentos amiloides poliméricos de alta magnitud molecular formados previamente, formados por la agregación de péptidos amiloides monoméricos, en particular péptidos  $\beta$ -amiloides monoméricos tales como, por ejemplo, péptidos monoméricos  $A\beta$  1-38, 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 ó 1-43, pero especialmente péptidos monoméricos  $A\beta_{1-42}$ , es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos poliméricos previamente formados

En un aspecto específico se describe un anticuerpo, particularmente un anticuerpo bifuncional, pero especialmente un anticuerpo monoclonal, particularmente un anticuerpo monoclonal bifuncional, que incluye cualquier anticuerpo o partes funcionales del mismo funcionalmente equivalentes, que pone de manifiesto alta especificidad para péptidos monoméricos  $A\beta_{1-42}$  pero que no manifiesta esencialmente o manifiesta una menor reactividad cruzada para los péptidos monoméricos  $A\beta_{1-38}$ ,  $A\beta_{1-39}$ ,  $A\beta_{1-40}$ , y/o  $A\beta_{1-41}$ , particularmente un anticuerpo, pero especialmente un anticuerpo monoclonal, que incluye cualquier anticuerpo o partes funcionales del mismo funcionalmente equivalentes, cuyo anticuerpo es hasta 100 veces, particularmente 50 a 100 veces, más particularmente 80 a 100 veces, pero especialmente 100 veces más sensible a los péptidos amiloides  $A\beta_{1-42}$ , en comparación con  $A\beta_{1-38}$ ,  $A\beta_{1-39}$ ,  $A\beta_{1-40}$ , y  $A\beta_{1-41}$  y hasta 1000 veces, particularmente 500 a 1000 veces, más particularmente 800 a 1000 veces, pero especialmente 1000 veces, más sensible para el péptido amiloide  $A\beta_{1-42}$ , comparado con  $A\beta_{1-38}$ , y por tanto capaz de inhibir, *in vitro* e *in vivo*, la agregación de péptidos monoméricos amiloidógenos, pero especialmente del péptido amiloide  $A\beta_{1-42}$ .

Además, en otro aspecto específico de la invención, se describe un anticuerpo, particularmente un anticuerpo bifuncional, pero especialmente un anticuerpo monoclonal, particularmente un anticuerpo monoclonal bifuncional, que incluye cualquier anticuerpo o parte funcional del mismo funcionalmente equivalente, que posee una alta sensibilidad de unión al péptido amiloide  $A\beta_{1-42}$  y es capaz de detectar fibras de  $A\beta_{1-42}$  en una concentración de hasta al menos 0,001  $\mu\text{g}$ , pero particularmente en un intervalo de concentraciones de entre 0,5  $\mu\text{g}$  y 0,001  $\mu\text{g}$ , más particularmente entre 0,1  $\mu\text{g}$  y 0,001  $\mu\text{g}$ , pero especialmente en una concentración de 0,001  $\mu\text{g}$ .

En un aspecto muy específico se describe un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, que incluye cualquier anticuerpo o parte funcional del mismo funcionalmente equivalente, cuyo anticuerpo es capaz de detectar fibras de  $A\beta_{1-42}$  hasta una concentración mínima de 0,001  $\mu\text{g}$  y fibras de  $A\beta_{1-40}$  hasta una concentración mínima de 0,1  $\mu\text{g}$  y fibras de  $A\beta_{1-38}$  hasta una concentración mínima de una cantidad de 1  $\mu\text{g}$  de fibras.

La unión de los anticuerpos como se describe anteriormente en la presente memoria, a péptidos monoméricos amiloidógenos pero, particularmente, a la forma amiloide (1-42), conduce a inhibición de la agregación de péptidos monoméricos amiloidógenos en fibras o filamentos de alta magnitud molecular. Por medio de la inhibición de la agregación de péptidos monoméricos amiloidógenos los anticuerpos como se describe en la presente memoria son capaces de prevenir o retardar la formación de placas amiloides, particularmente la forma amiloide (1-42) que se sabe que se hace insoluble por cambio de conformación y que constituye la parte principal de las placas amiloides existentes en los cerebros de animales o seres humanos enfermos.

En un aspecto específico, se describe un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo o parte funcional del mismo funcionalmente equivalente, cuyo anticuerpo posee las propiedades características de un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma EJ 7H3, depositada el 8 de diciembre de 2005 como DSM ACC 2756

Más particularmente, el anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo o parte funcional de mismo funcionalmente equivalente, es producido por la línea celular de hibridoma EJ 7H3, depositada el 8 de diciembre de 2005 como DSM ACC 2756.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a una composición de vacuna (realización 13) para uso según una cualquiera de las realizaciones 7 a 12, que, por administración a un animal o a un ser humano, da como resultado la generación de anticuerpos de subtipos no inflamatorios

En otra realización (14) de la invención, se proporciona una composición de vacuna para uso según la realización 13, en donde dichos anticuerpos son del subtipo Th2 no inflamatorio.

En una realización específica (15) de la invención, se proporciona una composición de vacuna para uso según una cualquiera de las realizaciones 7 a 12, que, por administración a un animal o a un ser humano, da como resultado principalmente la generación de anticuerpos de la subclase IgG independiente de células T.

En otra realización específica (16), la invención proporciona una composición de vacuna para uso según la realización 15, en donde dichos anticuerpos son del isotipo IgG3.

Todavía en otra realización específica (17) de la invención, se proporciona una composición de vacuna para uso según una cualquiera de las realizaciones 7 a 16, que, por administración a un animal o a un ser humano no conduce a un aumento importante de marcadores de inflamación en el cerebro.

En una realización (18), la invención proporciona un anticuerpo o una mezcla de anticuerpos, que puede obtenerse de un animal inmunizado con una composición e vacuna según una cualquiera de las realizaciones 7 a 17,

En otra realización (19), la invención proporciona un anticuerpo según la realización 18, caracterizado porque es un anticuerpo monoclonal o uno de sus derivados.

Además, se describe un método para prevenir, tratar o aliviar los efectos de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y patologías asociadas con la formación de placas amiloides, que incluye la amiloidosis secundaria y la amiloidosis relacionada con la edad, que incluyen, pero no se limitan a patologías neurológicas tales como la Enfermedad de Alzheimer (AD), e incluyen enfermedades o condiciones caracterizadas por pérdida de capacidad de la memoria cognitiva, tales como, por ejemplo, el deterioro cognitivo leve (MCI), la demencia de cuerpos de Lewy, el síndrome de Down, la hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Dutch), el complejo Parkinson-Demencia (Enfermedad de Guam), así como también otras enfermedades basadas o asociadas con proteínas semejantes a amiloides, tales como la parálisis supranuclear progresiva, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Creutzfeld Jacob, la enfermedad de Parkinson, la demencia relacionada con HIV, la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), la diabetes de comienzo en la edad adulta, la amiloidosis cardíaca senil, los tumores endocrinos, y otras, con inclusión de la degeneración macular, pero particularmente una enfermedad o una condición caracterizada por pérdida de capacidad de la memoria cognitiva tal como, por ejemplo, el deterioro cognitivo leve (MCI), por administración de una construcción antigénica supramolecular como se describe en la presente memoria, pero particularmente una composición de vacuna que comprende tales construcciones antigénicas supramoleculares según la invención, a un animal, en particular un mamífero o un ser humano, aquejado por una patología tal y, por tanto, necesitado de tal tratamiento.

Además, se describe un método de preparación de una composición de vacuna para inducir una respuesta inmunitaria en un organismo, en particular un animal o un ser humano aquejado de una patología, enfermedad o condición tal y, por tanto, necesitado de tal tratamiento, para prevenir, tratar o aliviar los efectos de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y patologías asociadas con la formación de placas amiloides, que incluye la amiloidosis secundaria y la amiloidosis relacionada con la edad, y que incluyen, pero no se limitan a patologías neurológicas tales como la Enfermedad de Alzheimer (AD), e incluyen enfermedades o condiciones caracterizadas por pérdida de capacidad de la memoria cognitiva, tales como, por ejemplo, el deterioro cognitivo leve (MCI), la demencia de cuerpos de Lewy, el síndrome de Down, la hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Dutch), el complejo Parkinson-Demencia (Enfermedad de Guam), así como también otras enfermedades basadas o asociadas con proteínas semejantes a amiloides, tales como la parálisis supranuclear progresiva, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Creutzfeld Jacob, la enfermedad de Parkinson, la demencia relacionada con HIV, la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), la diabetes de comienzo en la edad adulta, la amiloidosis cardíaca senil, los tumores endocrinos, y otras, con inclusión de la degeneración macular, pero particularmente una enfermedad o condición caracterizada por pérdida de capacidad de la memoria cognitiva tal como, por ejemplo, el deterioro cognitivo leve (MCI)

En particular, se describe por tanto un método de preparación de una composición de vacuna terapéutica para prevenir, tratar o aliviar los efectos de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y patologías asociadas con la formación de placas amiloides, que incluye la amiloidosis secundaria y la amiloidosis relacionada con la edad, y que incluyen, pero no se limitan a patologías neurológicas tales como la Enfermedad de Alzheimer (AD), e incluyen enfermedades o condiciones caracterizadas por pérdida de capacidad de la memoria cognitiva, tales como, por ejemplo, el deterioro cognitivo leve (MCI), la demencia de cuerpos de Lewy, el síndrome de Down, la hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Dutch), el complejo Parkinson-Demencia, (Enfermedad de Guam), así como también otras enfermedades basadas o asociadas con proteínas semejantes a amiloides, tales como la parálisis supranuclear progresiva, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Creutzfeld Jacob, la enfermedad de Parkinson, la demencia relacionada con HIV, la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), la diabetes de comienzo en la edad adulta, la amiloidosis cardíaca senil, los tumores endocrinos, y otras, con inclusión de la degeneración macular, pero particularmente una enfermedad o una condición caracterizada por pérdida de capacidad de la memoria cognitiva, tal como, por ejemplo, el deterioro cognitivo leve (MCI), que comprende formular un anticuerpo según la invención en una forma farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto específico se describe el uso de una presentación de antígeno que da por resultado exposición y estabilización mejoradas de una conformación preferida del antígeno, que en último lugar conduce a una respuesta inmunitaria altamente específica y da por resultado la generación de anticuerpos con propiedades únicas.

- 5 Todavía en otro aspecto específico, se describen composiciones inmunógenas que comprenden una construcción antigénica supramolecular que comprende un antígeno de un péptido  $\beta$ -amiloide como se describe anteriormente en la presente memoria, representativo de la parte N-terminal del péptido  $\beta$ -amiloide, cuyo péptido antigénico está modificado de tal modo que es capaz de mantener y estabilizar una conformación definida del antígeno, particularmente una conformación que se caracteriza por una proporción equilibrada de porciones arrolladas al azar,  $\alpha$ -helicoidales y  $\beta$ -laminares. Esta conformación definida conduce a la inducción de una fuerte respuesta inmunitaria y altamente específica por introducción en un animal o un ser humano.

10 Por consiguiente, la presente invención proporciona también un método (realización 20) de producción de una composición de vacuna terapéutica que comprende usar una construcción antigénica que comprende un fragmento de un péptido antigénico A $\beta$  según una cualquiera de las realizaciones 1 a 6 para uso en el tratamiento de una enfermedad o una condición asociada a amiloide según una cualquiera de las realizaciones 1 a 6.

- 15 En otra realización (21) de la invención se proporciona un método de producción de una composición de vacuna terapéutica que comprende el uso de una construcción antigénica que comprende un péptido antigénico A $\beta$  según una cualquiera de las realizaciones 1 a 6, para uso en el tratamiento de una enfermedad o una condición asociada a amiloide, según una cualquiera de las realizaciones 1 a 6, en donde el antígeno del péptido  $\beta$ -amiloide es un antígeno del péptido A $\beta_{1-15}$  palmitoilado, modificado por restos de aminoácidos palmitoilados enlazados covalentemente, reconstituidos en un liposoma.

20 En una realización específica (22) de la invención se proporciona un método según la realización 20, en donde el antígeno del péptido A $\beta_{1-15}$  está modificado por 2 restos de aminoácidos palmitoilados enlazados covalentemente a los extremos N-terminal y C-terminal del péptido, respectivamente.

- 25 Todavía en otra realización específica (23) de la invención, se proporciona un método según la realización 21, en donde el antígeno del péptido A $\beta_{1-15}$  está modificado por 4 restos de aminoácidos palmitoilados, dos de los cuales están enlazados covalentemente a los extremos N-terminal y C-terminal del péptido, respectivamente.

En una realización específica adicional (24) de la invención, se proporciona un método según la realización 21, en donde 2 ó más moléculas de antígeno del péptido A $\beta_{1-15}$  palmitoilado, modificadas por restos palmitoilo enlazados covalentemente en cada extremo del péptido, están reconstituidos en un liposoma único.

- 30 La invención proporciona, además, un método (realización 25) según una cualquiera de las realizaciones 21 a 24, en donde la enfermedad o la condición asociada a amiloide, que incluye patologías neurológicas y enfermedades o condiciones caracterizadas por pérdida de capacidad de la memoria cognitiva, está seleccionada del grupo que consiste en Enfermedad de Alzheimer (AD), el deterioro cognitivo leve (MCI), la demencia de cuerpos de Lewy, el síndrome de Down, la hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Dutch), el complejo Parkinson-Demencia (Enfermedad de Guam), la parálisis supranuclear progresiva, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Creutzfeldt Jacob, la enfermedad de Parkinson, la demencia relacionada con HIV, la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), la diabetes de comienzo en la edad adulta, la amiloidosis cardiaca senil, los tumores endocrinos, y la degeneración macular,

- 35 En una realización (26), la invención proporciona un método según la realización 21, en donde la enfermedad o condición asociada a amiloide es la Enfermedad de Alzheimer.

- 40 En una realización específica (27) de la invención se proporciona un método según una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24, en donde la condición asociada a amiloide se caracteriza por pérdida de capacidad de la memoria cognitiva de un animal o un ser humano y en donde el tratamiento de un animal o un ser humano aquejado de tal condición asociada a amiloide, conduce a un aumento de la retención de la capacidad de la memoria cognitiva y/o a la restauración completa de la capacidad de la memoria cognitiva.

45 En otra realización específica (28), la invención proporciona un método según una cualquiera de las realizaciones 21 a 24, en donde la administración de dicha composición de vacuna da por resultado principalmente la generación de anticuerpos de subtipos no inflamatorios.

- 50 En una realización específica adicional (29) de la invención, se proporciona un método según la realización 28, en donde dichos anticuerpos son del subtipo Th2 no inflamatorio.

Todavía en otra realización específica (30), la invención proporciona un método según la realización 28, en donde la administración de dicha composición de vacuna da por resultado principalmente la generación de anticuerpos de la subclase IgG independiente de células T.

- 55 En otra realización (31), la invención proporciona un método según la realización 30, en donde dichos anticuerpos son del isotipo IgG3.

La presente invención proporciona también un método (realización 32) según una cualquiera de las realizaciones 21 a 27, en donde la administración de dicha composición de vacuna no conduce a un aumento importante de los marcadores de inflamación existentes en el cerebro.

- 5 En una realización específica (33), la presente invención comprende también un método según una cualquiera de las realizaciones 21 a 27, en donde la administración de dicha composición de vacuna conduce a una disminución importante de A $\beta$ 1-40 y A $\beta$ 1-42 relacionados con la placa, insolubles, en el cerebro

En una realización adicional (34), la presente invención proporciona un método según una cualquiera de las realizaciones 21 a 27, en donde la administración de dicha composición de vacuna conduce a una reducción importante del nivel de A $\beta$ 1-42, soluble, en el cerebro.

- 10 La composición de vacuna como se describe en la presente memoria puede comprender, además de un antígeno de un péptido A $\beta$ , en particular el antígeno del péptido A $\beta$  como se ha descrito anteriormente en la presente memoria, un inhibidor de activación del complemento. La invención se refiere, por tanto, a una composición de vacuna y un método de producción de tal composición para el tratamiento de enfermedades y patologías que están causadas o asociadas con proteínas amiloides o semejantes a amiloides, que incluyen amiloidosis, un grupo de enfermedades y patologías asociadas con la formación de placas amiloides que incluye la amiloidosis secundaria y la amiloidosis relacionada con la edad, e incluyen, pero no se limitan a patologías neurológicas tales como la Enfermedad de Alzheimer (AD), particularmente una enfermedad o una condición caracterizada por pérdida de capacidad de la memoria cognitiva tal como, por ejemplo, el deterioro cognitivo leve (MCI), que comprende un fragmento de un péptido que procede de la parte N-terminal del péptido A $\beta$ , en particular un fragmento de un péptido A $\beta$  que consiste en una extensión única o repetitiva de entre 7 y 16 restos de aminoácidos contiguos, especialmente de entre 13 y 16 restos de aminoácidos contiguos, particularmente de la parte N-terminal del péptido A $\beta$ , pero particularmente un fragmento del péptido A $\beta$  que consiste en restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en los restos 1-16, 1-15, 1-14 y 1-13 de la parte N-terminal del péptido A $\beta$ , más particularmente del resto 1-15 según indica la secuencia SEQ ID N: 1, con inclusión de fragmentos del mismo funcionalmente equivalentes, pero especialmente un fragmento de un péptido A $\beta$  según se ha citado anteriormente en la presente memoria, enlazado, incorporado o reconstituido en una partícula/adjuvante de soporte tal como, por ejemplo, un liposoma, junto con un inhibidor del sistema de complemento, particularmente un inhibidor del camino del complemento, seleccionado del grupo que consiste en versiones solubles de proteínas de membrana reguladoras anticuerpos humanizados para proteínas del complemento, inhibidores de moléculas pequeñas que actúan en diversas etapas del camino del complemento y reguladores del complemento humanos expresados en animales transgénicos.

Esta extensión de 13 a 15 restos de aminoácidos contiguos puede estar repetida en la construcción según la invención entre 2 y 50 veces, particularmente entre 2 y 30 veces, más particularmente entre 2 y 20 veces, aún más particularmente entre 2 y 16 veces, pero especialmente entre 2 y 10 veces.

- 35 En un aspecto específico el inhibidor de activación del complemento, como se describe en la presente memoria, que es un componente de la composición de vacuna terapéutica según se ha citado anteriormente en esta memoria, es un compuesto seleccionado del grupo que consiste en Receptor 1 del complemento, humano, soluble, anti- proteína C5 humana del complemento, tal como, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti C5 humanizado o un fragmento monocatenario de un anticuerpo monoclonal humanizado, inhibidor-N de la C1 esterasa e inhibidor de C1 humano natural.

- 40 En otro aspecto específico se describe en la presente memoria una composición de vacuna como se ha mencionado anteriormente en esta memoria, que comprende, además de un fragmento de un péptido A $\beta$ , particularmente el fragmento del péptido A $\beta$  como se describe en esta memoria, un efector alostérico de hemoglobina, que una vez en los hematíes de la sangre desencadena una disminución de la afinidad de la O<sub>2</sub>/hemoglobina tal que el oxígeno es distribuido seguidamente a los tejidos de un modo regulado.

- 45 En particular se describen en la presente memoria una composición de vacuna y un método de producción de tal composición para el tratamiento de enfermedades y patologías que están causadas o asociadas con proteínas amiloides o semejantes a amiloides que incluyen la amiloidosis, un grupo de enfermedades y patologías asociadas con la formación de placas amiloides, que incluye la amiloidosis secundaria y la amiloidosis relacionada con la edad, que incluyen, pero no se limitan a patologías neurológicas tales como la Enfermedad de Alzheimer (AD), particularmente una enfermedad o una condición caracterizada por pérdida de capacidad de la memoria cognitiva tal como, por ejemplo, el deterioro cognitivo leve (MCI), que comprende un fragmento de un péptido que procede de la parte N-terminal del péptido A $\beta$ , particularmente un fragmento de un péptido A $\beta$  que consiste en una extensión única o repetitiva de entre 7 y 16 restos de aminoácidos contiguos, especialmente de entre 13 y 16 restos de aminoácidos contiguos, particularmente de la parte N-terminal del péptido A $\beta$ , pero particularmente un fragmento de un péptido A $\beta$  que consiste en restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en restos 1-16, 1-15, 1-14 y 1-13 de la parte N-terminal del péptido A $\beta$ , más particularmente del resto 1-15 según indica la secuencia SEQ ID NO: 1, incluyendo fragmentos del mismo funcionalmente equivalentes, pero particularmente un fragmento de un péptido A $\beta$  como se menciona anteriormente en esta memoria, que está modificado por restos palmitoilo enlazados covalentemente en cada extremo del péptido resultando entre 2 y 4, particularmente 4 restos palmitoilo, pero

especialmente un fragmento de un péptido A $\beta$  como se ha mencionado anteriormente en esta memoria, unido, incorporado o reconstituido en una partícula/adyuvante de soporte tal como, por ejemplo, un liposoma junto con un compuesto que desencadena una disminución de la afinidad de O<sub>2</sub>/hemoglobina tal que el oxígeno es emitido seguidamente de modo regulado hacia los tejidos orgánicos. Esta extensión de 13 a 15 restos de aminoácidos contiguos puede estar repetida en la construcción según la invención entre 2 y 50 veces, particularmente entre 2 y 30 veces, más particularmente entre 2 y 20 veces, todavía más particularmente entre 2 y 10 veces, pero especialmente entre 2 y 10 veces.

En particular, los compuestos que pueden emplearse adecuadamente en una composición como se describe en la presente memoria son aquellos seleccionados del grupo que consiste en un fármaco antilipídémico tal como, por ejemplo, ácido clofibrato o bezafibrato que incluye los derivados de bezafibrato LR16 y L35, derivados de urea tales como, por ejemplo, el ácido [2-[4[[[arilamino]carbonil]-amino]fenoxi]-2-metilpropiónico, un efector alostérico de la hemoglobina.

El compuesto que modula la afinidad de la O<sub>2</sub>/hemoglobina puede ser, además, un compuesto que comprende un ligando aniónico para un sitio alostérico de la hemoglobina, en donde el ligando aniónico comprende un anillo interno de pirofosfato, opcionalmente junto con un catión no tóxico tal como, por ejemplo, Ca<sup>2+</sup> y Na<sup>+</sup>.

Más específicamente, se describe en la presente memoria una composición de vacuna terapéutica que comprende, además del fragmento de un péptido A $\beta$  como se describe en esta memoria, derivados de inositol hexafosfato (IHP) que comprenden un anillo interno de pirofosfato, opcionalmente junto con un catión no tóxico tal como, por ejemplo, Ca<sup>2+</sup> y Na<sup>+</sup>.

La composición de vacuna como se menciona anteriormente en la presente memoria comprende, además de un fragmento de un péptido A $\beta$ , en particular el fragmento del péptido A $\beta$  según la invención, una combinación de un inhibidor del sistema de activación del complemento, particularmente un inhibidor del camino del complemento, seleccionado del grupo que consiste en versiones solubles de proteínas de membrana reguladoras, anticuerpos humanizados para proteínas del complemento, inhibidores de moléculas pequeñas que actúan en fases diversas del camino del complemento y reguladores humanos del complemento expresados en animales transgénicos, y un efector alostérico de la hemoglobina que reduce la afinidad de la O<sub>2</sub>/hemoglobina tal que más oxígeno es emitido seguidamente hacia los tejidos, de modo regulado.

Además, se describen en la presente memoria, una composición de vacuna y un método de producción de tal composición para el tratamiento de enfermedades y patologías que están causadas o asociadas con proteínas amiloides o semejantes a amiloides que incluyen amiloidosis, un grupo de enfermedades y patologías asociadas con la formación de placas amiloides que incluye la amiloidosis secundaria y la amiloidosis relacionada con la edad, e incluyen, pero no se limitan a patologías neurológicas tales como la Enfermedad de Alzheimer (AD), particularmente una enfermedad o una condición caracterizada por pérdida de capacidad de la memoria cognitiva tal como, por ejemplo, el deterioro cognitivo leve (MCI), que comprende un fragmento de un péptido que procede de la parte N-terminal del péptido A $\beta$ , en particular un fragmento de un péptido A $\beta$  que consiste en una extensión única o repetitiva de entre 7 y 16 restos de aminoácidos contiguos, especialmente de entre 13 y 16 restos de aminoácidos contiguos, particularmente de la parte N-terminal del péptido A $\beta$ , pero particularmente un fragmento de un péptido A $\beta$  que consiste en restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en restos 1-16, 1-15, 1-14 y 1-13 de la parte N-terminal del péptido A $\beta$ , más particularmente del resto 1-15 según indica la secuencia SEQ ID N°: 1, con inclusión de fragmentos del mismo funcionalmente equivalentes, particularmente un fragmento de un péptido A $\beta$  como se ha mencionado anteriormente en esta memoria, que está modificado por restos palmitoilos enlazados covalentemente en cada extremo del péptido resultando entre 2 y 4, particularmente 4, restos palmitoilos, pero especialmente un fragmento de un péptido A $\beta$  como se ha mencionado anteriormente en esta memoria, unido, incorporado o reconstituido en una partícula/adyuvante de soporte tal como, por ejemplo, un liposoma, junto con un inhibidor del sistema de complemento, en particular un inhibidor de la activación del complemento, seleccionado del grupo que consiste en versiones solubles de proteínas de membrana reguladoras, anticuerpos humanizados para proteínas del complemento, inhibidores de moléculas pequeñas que actúan en diversas etapas del camino del complemento y reguladores del complemento humanos expresados en animales transgénicos, y un compuesto, particularmente un efector alostérico de la hemoglobina, que disminuye la afinidad de la O<sub>2</sub>/hemoglobina tal que se pone en libertad seguidamente más oxígeno hacia los tejidos, de modo regulado.

Esta extensión contigua de 13 a 15 restos de aminoácidos puede estar repetida en la construcción según la invención entre 2 y 50 veces, particularmente entre 2 y 30 veces, más particularmente entre 2 y 20 veces, todavía más particularmente entre 2 y 16 veces, pero especialmente entre 2 y 10 veces.

Todavía en otro aspecto se describe un método para el tratamiento de una enfermedad o una condición asociada a amiloide que comprende administrar a un animal, particularmente a un mamífero, pero especialmente a un ser humano aquejado de una enfermedad o una condición tal, una composición de vacuna terapéutica como se ha descrito anteriormente en la presente memoria, particularmente una composición de vacuna que comprende un antígeno del péptido A $\beta$ <sub>1-15</sub>, más particularmente un antígeno del péptido A $\beta$ <sub>1-15</sub> palmitoilado.



En un aspecto específico, la administración de dicha composición de vacuna da por resultado, principalmente, la generación de anticuerpos de subtipos no inflamatorios, particularmente el subtipo Th2 no inflamatorio tal como, por ejemplo, el isotipo IgG1 e IgG2b.

- 5 En un aspecto adicional, la administración de dicha composición de vacuna da por resultado, principalmente, la generación de anticuerpos de la subclase IgG independiente de las células T, en particular del isotipo IgG3.

Todavía en otro aspecto, la administración de dicha composición de vacuna no conduce a un aumento importante de marcadores de inflamación existentes en el cerebro, particularmente de marcadores de inflamación seleccionados del grupo que consiste en IL-1  $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ .

- 10 Todavía en otro aspecto, la administración de dicha composición de vacuna conduce a una disminución importante de A $\beta$ 1-40 y A $\beta$ 1-42 insolubles, relacionados con la placa, en el cerebro.

Todavía en otro aspecto, la administración de dicha composición de vacuna conduce a una disminución importante del nivel de A $\beta$ 1-42, soluble, en el cerebro.

- 15 En particular, la enfermedad o condición asociada a amiloide es una seleccionada del grupo que consiste en enfermedades que incluyen, pero no se limitan a patologías neurológicas tales como la Enfermedad de Alzheimer (AD), que incluye enfermedades o condiciones caracterizadas por pérdida de capacidad de la memoria cognitiva tal como, por ejemplo, el deterioro cognitivo leve (MCI), la demencia de cuerpos de Lewy, el síndrome de Down, la hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Dutch), el complejo de Parkinson-Demencia (Enfermedad de Guam), así como también otras enfermedades que están basadas o asociadas con proteínas semejantes a amiloides tales como la parálisis supranuclear progresiva, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Creutzfeld Jacob, 20 la enfermedad de Parkinson, la demencia relacionada con HIV, la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), la diabetes de comienzo en la edad adulta, la amiloidosis cardíaca senil, los tumores endocrinos, y otros, con inclusión de la degeneración macular.

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

- 25 Todavía en otro aspecto específico, se describe un método para el tratamiento de una enfermedad o una condición asociada a amiloide y como se describe anteriormente en la presente memoria, en donde la administración de dicha composición de vacuna a un animal, particularmente un mamífero o a un ser humano, aquejado de una condición asociada a amiloide caracterizada por pérdida de capacidad de la memoria cognitiva, conduce a un aumento, particularmente a la restauración completa de la retención de la capacidad de la memoria cognitiva.

- 30 Por consiguiente, en otra realización (35) de la invención, se proporciona una composición de vacuna para uso según una cualquiera de las realizaciones 7 a 16 que, por administración a un animal o un ser humano, conduce a una disminución importante de A $\beta$ 1-40 y A $\beta$ 1-42 relacionados con la placa, insolubles, en el cerebro.

En una realización específica (36) de la invención, se proporciona una composición de vacuna para uso según una cualquiera de las realizaciones 7 a 16 que, por administración a un animal o un ser humano, conduce a una reducción importante del nivel de A $\beta$ 1-42, soluble, en el cerebro.

- 35 La invención comprende también una composición de vacuna (realización 37) para uso según una cualquiera de las realizaciones 7 a 18, en donde la enfermedad o condición asociada a amiloide es una seleccionada del grupo que consiste en la Enfermedad de Alzheimer (AD), el deterioro cognitivo leve (MCI), la demencia de cuerpos de Lewy, el síndrome de Down, la hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Dutch), el complejo de Parkinson-Demencia (Enfermedad de Guam), la parálisis supranuclear progresiva, la esclerosis múltiple, la enfermedad de 40 Creutzfeld Jacob, la enfermedad de Parkinson, la demencia relacionada con HIV, la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), la diabetes de comienzo en la edad adulta, la amiloidosis cardíaca senil, los tumores endocrinos, y la degeneración macular,

En una realización específica adicional (38) se proporciona una composición de vacuna para uso según la realización 37, en donde la enfermedad o condición asociada a amiloide es la Enfermedad de Alzheimer.

- 45 Todavía en otra realización específica (39) la invención proporciona una composición de vacuna para uso según una cualquiera de las realizaciones 7 a 18 que, por administración a un animal o un ser humano aquejado de una condición asociada a amiloide caracterizada por pérdida de capacidad de la memoria cognitiva, conduce a un aumento de la retención de la capacidad de la memoria cognitiva y/o a la restauración completa de la capacidad de a memoria cognitiva.

- 50 Todavía en otro aspecto se describe un método para el tratamiento de una enfermedad o una condición asociada a amiloide que comprende administrar a un animal, en particular a un mamífero, pero especialmente a un ser humano aquejado de una enfermedad o condición tal, una composición de vacuna terapéutica que comprende una construcción antigénica como se describe anteriormente en la presente memoria, y un inhibidor del sistema de complemento, en donde dicha composición de vacuna se administra de tal modo que el inhibidor del complemento y 55 la construcción antigénica se administran simultáneamente, intermitentemente o sucesivamente.

En particular, el inhibidor del complemento puede ser administrado antes de la vacunación con la construcción antigénica, particularmente dentro de un período de tiempo que comienza hasta 20 horas antes de la vacunación y que termina inmediatamente antes de la vacunación.

- 5 En otro aspecto, el inhibidor del complemento se administra después de la vacunación con la construcción antigénica dentro de un período de tiempo que comienza inmediatamente después de la vacunación y que termina 1 día después de la aplicación de la vacuna.

Todavía en otro aspecto se proporciona un método de preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada a amiloide que comprende usar una composición de vacuna según la invención y como se ha descrito anteriormente en esta memoria.

- 10 La invención, por tanto, proporciona además un método (realización 40) de preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada a amiloide, que comprende emplear una composición de vacuna según se proporciona en una cualquiera de las realizaciones 7 a 17

- 15 En una realización específica (41) de la invención, se proporciona un método de producción de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada a amiloide, según la realización 40, que comprende usar un péptido antigénico inmunógeno, en donde el antígeno de un péptido  $\beta$ -amiloide es un antígeno del péptido  $A\beta_{1-15}$  palmitoilado, modificado por restos de aminoácidos palmitoilados enlazados covalentemente, reconstituidos en un liposoma.

- 20 Estos y otros objetos, características y ventajas como se describe en la presente memoria, llegarán a ser evidentes después de una revisión de la descripción detallada que sigue de la realización y las reivindicaciones anejas que se describen.

Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína”, como se emplea en esta memoria, son intercambiables y se definen para significar una biomolécula compuesta de aminoácidos ligados por una unión peptídica.

- 25 El término “péptidos” significa cadenas de aminoácidos (típicamente L-aminoácidos) cuyos carbonos en posición alfa están ligados por medio de uniones peptídicas formadas por una reacción de condensación entre el grupo carboxilo del carbono alfa de un aminoácido y el grupo amino del carbono alfa de otro aminoácido. El aminoácido terminal situado en un extremo de la cadena (es decir, el amino terminal) tiene un grupo amino libre, mientras que el aminoácido terminal situado en el otro extremo de la cadena (es decir, el carboxilo terminal) tiene un grupo carboxilo libre. Por tanto, la expresión “término amino” (abreviado, N-término) alude al grupo amino libre en posición alfa en el aminoácido situado en el extremo amino terminal del péptido, o al grupo amino en posición alfa (grupo amino cuando participa en una unión peptídica) de un aminoácido en cualquier otra posición dentro del péptido. De modo semejante, la expresión “término carboxi” (abreviado C-término) alude al grupo carboxilo libre sobre el aminoácido en el término carboxi de un péptido, o al grupo carboxilo de un aminoácido en cualquier otra posición dentro del péptido.

- 35 Típicamente, los aminoácidos que constituyen un péptido se numeran por orden, comenzando en el extremo amino terminal y aumentando en dirección hacia el extremo carboxilo terminal del péptido. Así pues, cuando se dice que un aminoácido “sigue” a otro, tal aminoácido está situado más próximo al extremo carboxilo terminal del péptido que el aminoácido precedente.

- 40 El término “resto” como se emplea en esta memoria, se refiere a un aminoácido que está incorporado en un péptido mediante una unión amídica. Como tal, el aminoácido puede ser un aminoácido natural o, a menos que se indique de otro modo, puede incluir análogos conocidos de aminoácidos naturales que actúan de un modo similar al de los aminoácidos naturales (a saber, miméticos de aminoácidos). Además, un mimético de uniones amídicas incluye modificaciones de la cadena principal del péptido bien conocidas por los expertos en la técnica.

- 45 La frase “que consiste esencialmente en” se usa en esta memoria para excluir cualquier elemento que pudiera alterar sustancialmente las propiedades esenciales de los péptidos a los que se refiere la frase. Por tanto, la descripción de un péptido “que consiste esencialmente en....” excluye cualesquiera sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos que pudieran alterar sustancialmente la actividad biológica de tal péptido.

- 50 Además, los expertos en la técnica podrán reconocer que, como se menciona anteriormente, las sustituciones, supresiones o adiciones individuales que alteran, añaden o suprimen un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos (típicamente menos de 5%, más típicamente menos de 1%) de una secuencia codificada. son variaciones modificadas conservativamente en las que las alteraciones dan por resultado la sustitución de un aminoácido por un aminoácido similar desde el punto de vista químico. Tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Los seis grupos siguientes contienen, cada uno, aminoácidos que son sustituciones conservativas de unos por otros:

- 55 1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T);  
2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E);  
3) Asparagina (N), Glutamina (Q);

- 4) Arginina (R), Lisina (K);  
 5) Isoleucina (I); Leucina (L); Metionina (M), Valina (V); y  
 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W)-

Las frases "aislado" o "biólogicamente puro" aluden a un material que está sustancial o esencialmente exento de componentes que le acompañan normalmente cuando se encuentra en su estado nativo. Así pues, los péptidos descritos en la presente memoria no contienen materiales asociados normalmente con su medio ambiente in situ. Típicamente, los péptidos inmunógenos aislados, descritos en la presente memoria son, al menos aproximadamente, 80% puros, habitualmente al menos aproximadamente 90%, y, preferiblemente, al menos aproximadamente 95%, medido mediante la intensidad de las bandas en un gel teñido con plata.

La pureza o la homogeneidad proteínica puede venir indicada por diversos métodos bien conocidos en la técnica, tales como electroforesis en gel de poliacrilamida de una muestra de proteína, seguido de visualización por tinción. Para ciertos fines puede necesitarse alta resolución y utilizarse HPLC o medios similares de purificación-

Cuando los péptidos inmunógenos tienen una longitud relativamente corta (a saber, menos de 50 aminoácidos aproximadamente), con frecuencia son sintetizados usando técnicas estándar de síntesis química de péptidos.

La síntesis en fase sólida en la que el aminoácido del extremo C-terminal de la secuencia es unido a un soporte insoluble, seguido de la adición secuencial de los aminoácidos restantes de la secuencia, es un método preferido de la síntesis química de los péptidos inmunógenos descritos en la presente memoria. Procedimientos de síntesis en fase sólida son conocidas por los expertos en la técnica.

Alternativamente, los péptidos inmunógenos descritos en la presente memoria son sintetizados empleando metodología de los ácidos nucleicos recombinantes. Generalmente, ésta implica crear una secuencia de ácidos nucleicos que codifique el péptido, colocar el ácido nucleico en una casete de expresión bajo el control de un promotor particular, expresar el péptido en un hospedador, aislar el péptido o polipéptido expresado y, si se requiere, renaturalizar el péptido. Técnicas suficientes para guiar a un experto a través de tales procedimientos operatorios, se encuentran en la bibliografía.

Una vez expresados, los péptidos recombinantes pueden ser purificados según procedimientos operatorios estándar, que incluyen precipitación con sulfato amónico, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel, y similares. Se prefieren composiciones sustancialmente puras de aproximadamente 50% a 95% de homogeneidad, y las más preferidas para usar como agentes terapéuticos son las de 80% a 95% de homogeneidad o mayor.

Los expertos en la técnica podrán reconocer que después de síntesis química, expresión biológica o purificación, los péptidos inmunógenos pueden poseer una conformación sustancialmente diferente de las conformaciones nativas de los péptidos constituyentes. En este caso, es necesario frecuentemente desnaturalizar y reducir el péptido antiproliferativo y hacer después que el péptido se repliegue a la conformación preferida. Métodos de reducción y desnaturalización de proteínas y de inducción de repliegue, son bien conocidos por los expertos en la técnica.

La antigenicidad de la proteína purificada puede confirmarse, por ejemplo, por demostración de reacción con suero inmune, o con antisueros producidos contra la propia proteína.

Los términos "un" "una" y "el o la" como se emplea en esta memoria, se definen para significara "uno(a) o más" e incluyen el plural a menos que el contexto sea inapropiado,

Los términos "detección" o "detectado" como se emplea en esta memoria, significan usar técnicas conocidas para la detección de moléculas biológicas, tales como métodos inmunoquímicos o histológicos y aluden a determinar cualitativa o cuantitativamente la presencia o concentración de la biomolécula investigada.

Por "aislada" se entiende una molécula biológica libre de al menos alguno de los componentes con los que se presenta naturalmente.

El término "anticuerpo" o "anticuerpos" como se emplea en esta memoria, es un término reconocido en la técnica y se entiende que se refiere a moléculas o fragmentos activos de moléculas que se unen a antígenos conocidos, particularmente a moléculas de inmunoglobulinas y a partes inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión que fija específicamente un antígeno. La inmunoglobulina según la invención puede ser de cualquier tipo (IgG, IgM, IgD, IgE, IgA e IgY) o clase (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclases de molécula de inmunoglobulina.

Se entiende que "anticuerpos" dentro del alcance de la presente invención, incluye anticuerpos monoclonales, y anticuerpos policlonales, quiméricos, monocatenarios, biespecíficos, simianizados, humanos y humanizados, así como fragmentos activos de los mismos. Ejemplos de fragmentos activos de moléculas que se unen a antígenos conocidos incluyen los fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub>, con inclusión de los productos de una biblioteca de expresión de inmunoglobulinas de Fab y fragmentos de unión a epítopos de cualquiera de los anticuerpos y fragmentos anteriormente citados.

Estos fragmentos activos pueden derivarse de un anticuerpo de la presente invención mediante diversas técnicas. Por ejemplo, anticuerpos monoclonales purificados pueden ser escindidos con una enzima, tal como pepsina, y sometidos a filtración en gel o HPLC. La fracción apropiada que contiene fragmentos Fab puede recogerse después y concentrarse mediante filtración por membrana y métodos similares. Para una descripción adicional de técnicas generales para el aislamiento de fragmentos activos de anticuerpos véanse, por ejemplo, las publicaciones de Khaw, B. A. et al., J. Nucl. Med. 23:1011-1019 (1982) y de Rousseaux et al., Methods Enzymology, 121:663-69, Academic Press, 1986.

Un “anticuerpo humanizado” se refiere a un tipo de anticuerpo construido que tiene sus CDRs derivados de una inmunoglobulina de un donante no humano, habiéndose derivado las partes restantes de la molécula de inmunoglobulina, de una (o más) inmunoglobulina(s) humanas. Además, los restos del entramado de soporte pueden alterarse para preservar la afinidad de unión. Métodos de obtención de “anticuerpos humanizados” son bien conocidos por los expertos en la técnica (véanse, por ejemplo, las publicaciones de Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:10029-10032 (1989) y de Hodgson et al., Bio/Technology, 9:421 (1991)).

Un “anticuerpo humanizado” puede obtenerse también, mediante un nuevo enfoque de ingeniería genética que posibilita la producción de anticuerpos monoclonales similares a los humanos, madurados por afinidad, en animales grandes tales como, por ejemplo, conejos (<http://www.rctech.com/bioventures/therapeutic.php>).

La expresión “anticuerpo monoclonal” también está bien reconocida en la técnica y hace referencia a un anticuerpo que es producido en masa en el laboratorio a partir de un único clon y que reconoce solamente un antígeno. Los anticuerpos monoclonales se obtienen típicamente fusionando una célula B que produce anticuerpos, de vida normalmente corta, con una célula de crecimiento rápido tal como una célula cancerosa (a la que hace referencia a veces como una célula “inmortal”). La célula híbrida que resulta, o hibridoma, se multiplica rápidamente creando un clon que produce grandes cantidades del anticuerpo.

“Anticuerpo funcionalmente equivalente” se entiende dentro del alcance de la presente invención que se refiere a un anticuerpo que comparte sustancialmente, al menos una propiedad funcional principal con uno de los anticuerpos anteriormente citados y descritos en esta memoria, que comprende: especificidad de unión a la proteína  $\beta$ -amiloide, particularmente a la proteína  $A\beta_{1-42}$ , y más particularmente a la región epitópica 4-16 de la proteína  $A\beta_{1-42}$ , inmunorreactividad *in vitro*, inhibición de la agregación de los monómeros de  $A\beta_{1-42}$  en fibrillas poliméricas de alta magnitud molecular y/o desagregación de las fibrillas poliméricas de  $A\beta_{1-42}$  formadas previamente, y/o la propiedad de romper estructuras  $\beta$ -laminares y aliviar los efectos de patologías asociadas con la amiloidosis, un grupo de enfermedades y patologías asociadas con la formación de placas amiloides que incluye la amiloidosis secundaria y la amiloidosis relacionada con la edad que incluyen, pero no se limitan a patologías neurológicas tales como la Enfermedad de Alzheimer (AD), e incluyen enfermedades o condiciones caracterizadas por pérdida de capacidad de la memoria cognitiva tales como, por ejemplo, el deterioro cognitivo leve (MCI), la demencia de cuerpos de Lewy, el síndrome de Down, la hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Dutch), el complejo Parkinson-Demencia (Enfermedad de Guam), así como otras enfermedades que están basadas o asociadas con proteínas semejantes a amiloides tales como la parálisis supranuclear progresiva, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Creutzfeldt Jacob, la enfermedad de Parkinson, la demencia relacionada con HIV, la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), la diabetes de comienzo en la edad adulta, la amiloidosis cardíaca senil, los tumores endocrinos, y otras con inclusión de la degeneración macular, cuando se administra profiláctica o terapéuticamente. Los anticuerpos pueden ser de cualquier clase tal como IgG, IgM o IgA, etc. o de cualquier subclase tal como IgG1, IgG2a, etc., y otras subclases mencionadas anteriormente en esta memoria o conocidas en la técnica..

Aun más, los anticuerpos pueden ser producidos por cualquier método tal como exposición de fago, o producidos en algún organismo o línea celular, que incluyen células de bacterias, insectos, mamíferos u otro tipo de célula o línea celular que produzca anticuerpos con las características deseadas, tales como anticuerpos humanizados. Los anticuerpos pueden ser formados también combinando una parte Fab y una región Fc procedentes de especies diferentes.

El término “antígeno” se refiere a una entidad o fragmento de la misma que puede inducir una respuesta inmunitaria en un organismo, particularmente un animal, más particularmente un mamífero con inclusión de un ser humano. El término incluye inmunógenos y regiones responsables de antigenicidad o determinantes antigénicos.

Como se emplea en esta memoria, el término “soluble” significa disuelto parcial o totalmente en una solución acuosa.

También como se emplea en esta memoria, el término “inmunógeno” se refiere a sustancias que provocan o intensifican la producción de anticuerpos, células T y otras células inmunitarias reactivas dirigidas contra un agente inmunógeno y que contribuyen a una respuesta inmunitaria en seres humanos o en animales.

Ocurre una respuesta inmunitaria cuando un individuo produce suficientes anticuerpos, células T y otras células inmunitarias reactivas contra composiciones inmunógenas de la presente invención administradas para moderar o aliviar la patología que ha de tratarse.

El término "hibridoma" está reconocido en la técnica y se entiende por los expertos en la técnica que se refiere a una célula producida por la fusión de una célula productora de anticuerpos y una célula inmortal, por ejemplo, una célula de mieloma múltiple. Esta célula híbrida es capaz de producir un suministro continuo de anticuerpos. Véase la definición de "anticuerpo monoclonal" anterior y los Ejemplos que figuran más adelante para una descripción más detallada del método de fusión.

El término "soporte" como se emplea en esta memoria, significa una estructura en la que un péptido antigénico o una construcción supramolecular pueden incorporarse o asociarse, presentando o exponiendo con ello péptidos antigénicos o parte del péptido, al sistema inmunitario de un ser humano o un animal. Cualquier partícula que pueda emplearse adecuadamente en terapia humana o animal, tal como, por ejemplo, una vesícula, una partícula o un cuerpo en partículas puede utilizarse como un soporte dentro del contexto de la presente invención.

El término "soporte" comprende, además, métodos de distribución en donde composiciones de construcciones antigénicas supramoleculares que comprenden el péptido antigénico, pueden ser transportadas a sitios deseados mediante mecanismos de distribución. Un ejemplo de un sistema de distribución tal utiliza metales coloidales tales como oro coloidal.

Proteínas transportadoras que pueden emplearse en las composiciones de construcciones antigénicas supramoleculares como se describe en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a proteína de unión a maltosa "MBP", albúmina de suero bovino "BSA", hemocianina de lapa californiana "KLH", ovoalbúmina, flagelina, tiroglobulina, seroalbúmina de algunas especies, gamma globulinas de alguna especie, células singeneicas que llevan antígenos Ia, y polímeros de D- y/o L-aminoácidos.

En la construcción antigénica supramolecular como se describe en la presente memoria, el liposoma puede tener una doble función ya que puede ser empleado como un soporte que comprende la construcción supramolecular como se ha descrito anteriormente en la presente memoria, y al mismo tiempo, puede funcionar como un adyuvante para aumentar o estimular la respuesta inmunitaria dentro del animal o ser humano elegido como diana, que ha de ser tratado con la vacuna terapéutica. Ha de entenderse también que las composiciones de construcciones antigénicas supramoleculares de la presente invención pueden comprender, además, adyuvantes adicionales que incluyen, pero no se limitan a hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero bovino (BSA) y otros adyuvantes tales como, por ejemplo, lípido A, alumbre, fosfato cálcico e interleuquina 1, y/o microcápsulas de polisacáridos y proteínas, pero particularmente un lípido A destoxificado, tal como lípido A monofosforilado o difosforilado, o alumbre, agentes conservantes adicionales, diluyentes, emulsionantes, estabilizantes y otros componentes que son conocidos y que se emplean en vacunas de la técnica anterior. Además, puede emplearse en la composición de la presente invención cualquier sistema de adyuvante conocido en la técnica. Tales adyuvantes incluyen, pero no se limitan a adyuvante incompleto de Freund, adyuvante completo de Freund, manano acetilado ligado a  $\beta$ -(1,4) polidispersado ("Acemannan"), TITERMAX<sup>®</sup> (adyuvantes de copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno, de Cytrx Corporation), adyuvantes lipídicos modificados, de Chiron Composition, adyuvantes de derivados de saponina, de Cambridge Biotech, *Bordetella pertussis* muerta, el lipopolisacárido (LPS) de bacterias gram-negativas, aniones poliméricos grandes tales como sulfato de dextrano, y geles inorgánicos tales como alumbre, hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio.

Aún más, la expresión "cantidad eficaz" alude a la cantidad de composición antigénica/inmunógena que, cuando se administra a un ser humano o un animal, provoca una respuesta inmunitaria. La cantidad eficaz se determina fácilmente por los expertos en la técnica siguiendo procedimientos operatorios rutinarios.

La expresión "construcción antigénica supramolecular" hace referencia a una construcción antigénica según la presente invención y como se describe anteriormente en la presente memoria. En particular, "construcción antigénica supramolecular" alude a una construcción antigénica que comprende un antígeno de un péptido A $\beta$  según la invención y como se describe anteriormente en la presente memoria, específicamente un fragmento de un péptido A $\beta$  que procede de la parte N-terminal del péptido A $\beta$ , pero particularmente un fragmento de un péptido A $\beta$  que consiste en restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16( $\Delta$ 2), 1-16( $\Delta$ 4), 1-16( $\Delta$ 5), 1-16( $\Delta$ 6), 1-16( $\Delta$ 8), 1-16( $\Delta$ 9), 1-16( $\Delta$ 10), 1-16( $\Delta$ 12), 16( $\Delta$ 13), 16( $\Delta$ 14), 1-16( $\Delta$ 15), 1-15( $\Delta$ 2), 1-15( $\Delta$ 4), 1-15( $\Delta$ 5), 1-15( $\Delta$ 6), 1-15( $\Delta$ 8), 1-15( $\Delta$ 9), 1-15( $\Delta$ 10); 1-15( $\Delta$ 12), 15( $\Delta$ 13) y 15( $\Delta$ 14), en particular un antígeno del péptido A $\beta$ <sub>1-16( $\Delta$ 15)</sub>, más particularmente un antígeno del péptido A $\beta$ <sub>1-16( $\Delta$ 14)</sub> o A $\beta$ <sub>1-16( $\Delta$ 13)</sub>, aún más particularmente un antígeno del péptido A $\beta$ <sub>1-14</sub>, específicamente un antígeno del péptido A $\beta$ <sub>1-15</sub>, pero especialmente un fragmento de un péptido A $\beta$  que consiste en los restos de aminoácidos 1-15 según indica la secuencia SEQ ID NO: 1, y 1-16( $\Delta$ 14) como indica la secuencia SEQ ID NO:3, cuyo péptido antigénico se presenta unido o incorporado o reconstituido en un soporte tal como, por ejemplo, una vesícula, un cuerpo en partículas o una molécula, pero, particularmente, un liposoma. Más particularmente, el péptido antigénico según la invención está modificado por un resto lipófilo o hidrófobo que facilita la inserción en la bicapa lipídica de soporte/adyuvante inmunitario del liposoma, en particular por un resto lipófilo o hidrófobo que incluye, pero no se limita a un ácido graso, un triglicérido o un fosfolípido, pero especialmente un ácido graso, un triglicérido o un fosfolípido, en donde la cadena principal carbonada del ácido graso tiene al menos 10 átomos de carbono que actúa como anclaje del péptido en la bicapa del liposoma y posee una dimensión que conduce a que el péptido se sitúe y establezca en proximidad estrecha con la superficie del liposoma.

Por ejemplo, las composiciones de las construcciones antigénicas supramoleculares como se describe en la presente memoria, pueden ser administradas por vía parenteral, pero particularmente por vía intraperitoneal, intravenosa, subcutánea e intramuscular, en un intervalo de, aproximadamente, 1,0 µg a 10,0 mg por paciente, aun cuando no se pretende que este intervalo esté limitando. La cantidad real de la composición requerida para inducir una respuesta inmunitaria puede variar para cada paciente individual dependiendo de la inmunogenicidad de la composición administrada y de la respuesta inmunitaria del individuo. Por consiguiente, la cantidad específica administrada a un individuo será determinada por experimentación rutinaria y basada en el entrenamiento y en la experiencia del experto en la técnica.

Las construcciones antigénicas supramoleculares como se describe en la presente memoria, pueden utilizarse para preparar una composición de vacuna para inducir una respuesta inmunitaria en un organismo, en particular un animal o un ser humano, para prevenir, tratar o aliviar los efectos de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y patologías asociadas con la formación de placas amiloides que incluye la amiloidosis secundaria y la amiloidosis relacionada con la edad, e incluyen, pero no se limitan a patologías neurológicas tales como la Enfermedad de Alzheimer (AD), que incluyen enfermedades o condiciones caracterizadas por pérdida de capacidad de la memoria cognitiva tal como, por ejemplo, el deterioro cognitivo leve (MCI), la demencia de cuerpos de Lewy, el síndrome de Down, la hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Dutch), el complejo de Parkinson-Demencia (Enfermedad de Guam), así como otras enfermedades que están basadas o asociadas con proteínas semejantes a amiloides tales como la parálisis supranuclear progresiva, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Creutzfeld Jacob, la enfermedad de Parkinson, la demencia relacionada con HIV, la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), la diabetes de comienzo en la edad adulta, la amiloidosis cardíaca senil, los tumores endocrinos, y otras con inclusión de la degeneración macular, pero particularmente una enfermedad o condición caracterizada por pérdida de capacidad de la memoria cognitiva tal como, por ejemplo, el deterioro cognitivo leve (MCI).

Además, se describe en la presente memoria un método para prevenir, tratar o aliviar los efectos de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y patologías asociadas con la formación de placas amiloides que incluye la amiloidosis secundaria y la amiloidosis relacionada con la edad que incluyen, pero no se limitan a patologías neurológicas tales como la Enfermedad de Alzheimer (AD), e incluyen enfermedades o condiciones caracterizadas por pérdida de capacidad de la memoria cognitiva tal como, por ejemplo, el deterioro cognitivo leve (MCI), la demencia de cuerpos de Lewy, el síndrome de Down, la hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Dutch), el complejo de Parkinson-Demencia (Enfermedad de Guam), así como otras enfermedades que están basadas o asociadas con proteínas semejantes a amiloides tales como la parálisis supranuclear progresiva, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Creutzfeld Jacob, la enfermedad de Parkinson, la demencia relacionada con HIV, la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), la diabetes de comienzo en la edad adulta, la amiloidosis cardíaca senil, los tumores endocrinos, y otras con inclusión de la degeneración macular, pero particularmente una enfermedad o condición caracterizada por pérdida de capacidad de la memoria cognitiva tal como, por ejemplo, el deterioro cognitivo leve (MCI), por administración de una construcción antigénica supramolecular según la presente invención, pero particularmente una composición de vacuna que comprende una construcción antigénica supramolecular tal según la invención, a un animal, particularmente un mamífero o un ser humano, aquejado por un patología tal y, por tanto, necesitado de tal tratamiento.

En particular, se describe un método de preparación de una composición de vacuna para inducir una respuesta inmunitaria en un organismo, en particular un animal o un ser humano aquejado por una patología, enfermedad o condición tal y, por tanto, necesitado de tratamiento, para prevenir, tratar o aliviar los efectos de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y patologías asociadas con la formación de placas amiloides que incluye la amiloidosis secundaria y la amiloidosis relacionada con la edad que incluyen, pero no se limitan a patologías neurológicas tales como la Enfermedad de Alzheimer (AD), e incluyen enfermedades o condiciones caracterizadas por pérdida de capacidad de la memoria cognitiva tal como, por ejemplo, el deterioro cognitivo leve (MCI), la demencia de cuerpos de Lewy, el síndrome de Down, la hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Dutch), el complejo de Parkinson-Demencia (Enfermedad de Guam), así como otras enfermedades que están basadas o asociadas con proteínas semejantes a amiloides tales como la parálisis supranuclear progresiva, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Creutzfeld Jacob, la enfermedad de Parkinson, la demencia relacionada con HIV, la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), la diabetes de comienzo en la edad adulta, la amiloidosis cardíaca senil, los tumores endocrinos, y otras con inclusión de la degeneración macular, pero particularmente una enfermedad o una condición caracterizada por pérdida de capacidad de la memoria cognitiva tal como, por ejemplo, el deterioro cognitivo leve (MCI).

Todavía, en un aspecto adicional se describe, por tanto, un método de preparación de una composición para prevenir, tratar o aliviar los efectos de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y patologías asociadas con la formación de placas amiloides que incluye la amiloidosis secundaria y la amiloidosis relacionada con la edad, que incluyen, pero no se limitan a patologías neurológicas tales como la Enfermedad de Alzheimer (AD), que incluyen enfermedades o condiciones caracterizadas por pérdida de capacidad de la memoria cognitiva tal como, por ejemplo, el deterioro cognitivo leve (MCI), la demencia de cuerpos de Lewy, el síndrome de Down, la hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Dutch), el complejo de Parkinson-Demencia (Enfermedad de Guam), así como otras enfermedades que están basadas o asociadas con proteínas semejantes a amiloides tales como la parálisis supranuclear progresiva, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Creutzfeld Jacob, la enfermedad de Parkinson, la demencia relacionada con HIV, la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), la diabetes de comienzo en la

edad adulta, la amiloidosis cardiaca senil, los tumores endocrinos, y otras con inclusión de la degeneración macular, pero particularmente una enfermedad o una condición caracterizada por pérdida de capacidad de la memoria cognitiva tal como, por ejemplo, el deterioro cognitivo leve (MCI), que comprende formular un anticuerpo como se describe en la presente memoria, en una forma farmacéuticamente aceptable.

- 5 En un aspecto se describe el uso de una presentación de un antígeno, que redunde en la exposición y estabilización intensificadas de una conformación preferida del antígeno, que en último lugar conduce a una respuesta inmunitaria altamente específica y da por resultado la generación de anticuerpos con propiedades únicas.

En otro aspecto se describe una composición inmunógena que comprende una construcción antigénica supramolecular que comprende un antígeno de un péptido  $\beta$ -amiloide como se describe anteriormente en la presente memoria, representativo de la parte N-terminal del péptido  $\beta$ -amiloide, cuyo péptido antigénico está modificado de tal modo que es capaz de mantener y estabilizar una conformación definida del antígeno, particularmente una conformación que está caracterizada por una proporción equilibrada de porciones arrolladas aleatoriamente,  $\alpha$ -helicoidales y  $\beta$ -laminares. Esta conformación definida conduce a la inducción de una fuerte respuesta inmunitaria y altamente específica por introducción en un animal o un ser humano.

15 Un modo de conseguir la formación y estabilización de la conformación deseada del péptido antigénico es mediante presentación del péptido antigénico unido, incorporado o reconstituido, parcial o totalmente, en un soporte tal como, por ejemplo, una vesícula, un cuerpo en partículas o una molécula o cualquier otro medio que pueda servir adecuadamente como soporte/adyuvante del péptido antigénico. El péptido antigénico se une, o incorpora o reconstituye en el soporte por medio de interacciones débiles tales como, por ejemplo, fuerzas de van der Waals, interacción hidrofóbica o electrostática, o una combinación de dos o más de dichas interacciones, de tal modo que el péptido es presentado con una conformación específica que es mantenida y estabilizada por restricción de dicho péptido antigénico en su libertad tridimensional de movimiento, por lo que se evitan o restringen en gran medida los cambios de conformación.

25 Cuando una vesícula, una partícula o un cuerpo en partículas se usa como soporte/adyuvante tal como, por ejemplo, un liposoma, la composición del péptido antigénico puede escogerse de modo que su carga neta global sea idéntica a la de la superficie del soporte/adyuvante a la que está unido el péptido. Fuerzas electrostáticas de repulsión, que son eficaces, entre la superficie del soporte/adyuvante y el péptido antigénico, cargadas negativamente, pero particularmente la superficie de soporte cargada idénticamente y los restos de aminoácidos que constituyen el péptido antigénico más particularmente la superficie de soporte cargada idénticamente y los restos de aminoácidos cargados idénticamente comprendidos en el péptido antigénico, pueden conducir a que el péptido antigénico tome una conformación definida, altamente específica y estabilizada que garantiza una elevada actividad biológica. Como resultado, el péptido antigénico es expuesto y presentado en una conformación que es altamente activa desde el punto de vista biológico ya que permite que el sistema inmunitario del organismo diana interaccione libremente con los determinantes antigénicos contenidos en la construcción antigénica en la conformación biológicamente activa, lo que lleva a una fuerte respuesta inmunitaria, específica de la conformación, que da por resultado, por ejemplo, un alto título de anticuerpos en el organismo diana.

Mediante la coordinación cuidadosa de las cargas netas globales del péptido antigénico, por una parte, y del soporte al que el péptido llega a quedar unido, incorporado o reconstituido, por otra, el péptido antigénico es presentado sobre la superficie del soporte o en estrecha proximidad con ella, en una conformación que está inducida y estabilizada mediante fuerzas electrostáticas de repulsión que son eficaces, entre la superficie del soporte y el péptido antigénico cargados idénticamente, pero particularmente la superficie del soporte y los restos de aminoácidos que constituyen el péptido antigénico idénticamente cargados, y más particularmente la superficie del soporte y los restos de aminoácidos que comprenden el péptido antigénico idénticamente cargados. Esto da por resultado una presentación de la construcción antigénica tal e es accesible libremente a la maquinaria inmunitaria de defensa del organismo diana y, por tanto, es capaz de inducir una fuerte respuesta inmunogénica y altamente específica por administración a un animal o a un ser humano. La respuesta inmunogénica puede aumentarse adicionalmente usando un liposoma como soporte, cuyo liposoma puede funcionar como adyuvante para aumentar o estimular la respuesta inmunitaria dentro del animal o ser humano diana que ha de tratarse con la vacuna terapéutica como se describe en la presente memoria. Opcionalmente, el liposoma puede contener, además, otro adyuvante tal como, por ejemplo, lípido A, alumbre, fosfato cálcico, interleuquina 1, y/o microcápsulas de polisacáridos y proteínas, pero particularmente un lípido A destoxificado, tal como lípido A monofosforilado o difosforilado, o alumbre.

En un aspecto específico se describe en la presente memoria un péptido antigénico, particularmente un péptido antigénico cuya carga neta global es negativa, que se emplea reconstituido en un liposoma, particularmente un liposoma cuyos constituyentes se escogen de tal modo que la carga neta global del grupo principal del liposoma sea negativa. En particular el liposoma está compuesto de constituyentes seleccionados del grupo que consiste en dimiristoil fosfatidil colina (DMPC), dimiristoil fosfatidil etanolamina (DMPEA), dimiristoil fosfatidil glicerina (DMPG) y colesterol y, opcionalmente, contiene, además, lípido A monofosforilado o cualquier otro adyuvante que pueda emplearse adecuadamente tal como, por ejemplo, alumbre, fosfato cálcico, interleuquina 1 y/o microcápsulas de polisacáridos y proteínas.

En otro aspecto específico, se describe un antígeno de un péptido modificado, como se describe anteriormente en la presente memoria, enlazado covalentemente a una molécula de anclaje que es capaz de inserción en el soporte/adyuvante fijando con ello el péptido al soporte/adyuvante y presentándolo sobre la superficie de una molécula del soporte/adyuvante o en estrecha proximidad con ella, por lo que las fuerzas electrostáticas pueden llegar a ser eficaces, como se describe anteriormente en la presente memoria,

Cuando se utilizan liposomas como soporte/adyuvante, la construcción de péptido antigénico tiene, en general, una cola hidrofóbica que se inserta en la membrana del liposoma a medida que se forma.

Adicionalmente, los péptidos antigénicos pueden ser modificados para que contengan una cola hidrofóbica para que puedan ser insertados en el liposoma.

- 10 Las construcciones antigénicas supramoleculares como se describe en la presente memoria comprenden, generalmente, péptidos modificados para intensificar el efecto antigénico, en donde tales péptidos pueden ser modificados mediante pegilación (usando polietilenglicol o polietilenglicol modificado) o modificado por otros métodos tales como por ácido palmítico, como se describe anteriormente en la presente memoria, poliaminoácidos (p.ej. poliglicina, polihistidina), polisacáridos (p.ej. ácido poligalacturónico, ácido poliláctico, poliglicolida, quitina, quitosán), polímeros sintéticos (poliamidas, poliuretanos, poliésteres) o copolímeros (p.ej. poli(ácido metacrílico) y N-(2-hidroxil)propil metacrilamida) y similares.

- 20 En un aspecto específico, se describen péptidos antigénicos como se describe anteriormente en la presente memoria, que están modificados para que contengan una cola hidrofóbica de modo que dichos péptidos puedan ser insertados en el liposoma. En particular, el péptido  $\beta$ -amiloide puede ser modificado por un resto lipófilo o hidrófobo que facilita la inserción en la bicapa lipídica del soporte/adyuvante. Los restos lipófilos o hidrófobos como se describe en la presente memoria, pueden ser ácidos grasos, triglicéridos y fosfolípidos, particularmente ácidos grasos, triglicéridos y fosfolípidos, en los que la cadena principal carbonada del ácido graso tiene al menos 10 átomos de carbono, particularmente restos lipófilos que tienen ácidos grasos con una cadena principal carbonada de al menos, aproximadamente, 14 átomos de carbono y hasta aproximadamente 24 átomos de carbono, más particularmente restos hidrófobos que tienen una cadena principal carbonada de al menos 14 átomos de carbono. Los ejemplos de restos hidrófobos incluyen, pero no se limitan a ácido palmítico, ácido esteárico, ácido mirístico, ácido láurico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico y colesterol o DSPE. En un aspecto específico el resto hidrófobo es el ácido palmítico.

- 30 La palmitoilación, al tiempo que proporciona un anclaje para el péptido en la bicapa del liposoma, debido a la longitud relativamente reducida del resto de ácido graso de  $C_{16:0}$ , conduce al péptido a estar presentado expuesto sobre la superficie del liposoma o en estrecha proximidad con ella. Por consiguiente, las células que procesan el antígeno tendrán que captar el liposoma con el péptido, entero.

- 35 En otro aspecto, se emplea PEG para la preparación de una construcción supramolecular en donde el término de PEG libre está enlazado covalentemente con una molécula de fosfatidiletanolamina (donde el ácido graso puede ser mirístico, palmítico, esteárico, oleico, etc., o combinaciones de los mismos). Esta estructura supramolecular puede ser reconstituida en liposomas que consisten en fosfolípidos y colesterol (fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerina, colesterol) en diversas proporciones molares. Pueden emplearse otros fosfolípidos. Se emplea el lípido A en una concentración de aproximadamente 40  $\mu\text{g}/\text{pmol}$  de fosfolípido.

- 40 Todavía en otro aspecto se describen en la presente memoria composiciones de vacuna que comprenden construcciones antigénicas supramoleculares que comprenden un péptido antigénico como se describe anteriormente en la presente memoria, cuyo péptido está modificado a fin de intensificar el efecto antigénico, en donde tal péptido, particularmente un fragmento de un péptido  $A\beta$  que procede de la parte N-terminal del péptido  $A\beta$ , pero particularmente un fragmento de un péptido  $A\beta$  que consiste en restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16( $\Delta 2$ ), 1-16( $\Delta 4$ ), 1-16( $\Delta 5$ ), 1-16( $\Delta 6$ ), 1-16( $\Delta 8$ ), 1-16( $\Delta 9$ ), 1-16( $\Delta 10$ ), 1-16( $\Delta 12$ ), 16( $\Delta 13$ ), 16( $\Delta 14$ ), 1-16( $\Delta 15$ ), 1-15( $\Delta 2$ ), 1-15( $\Delta 4$ ), 1-15( $\Delta 5$ ), 1-15( $\Delta 6$ ), 1-15( $\Delta 8$ ), 1-15( $\Delta 9$ ), 1-15( $\Delta 10$ ); 1-15( $\Delta 12$ ), 15( $\Delta 13$ ), 15( $\Delta 14$ ), un antígeno del péptido  $A\beta_{1-16(\Delta 15)}$ , más particularmente un antígeno del péptido  $A\beta_{1-16(\Delta 14)}$  o  $A\beta_{1-16(\Delta 13)}$ , aún más particularmente un antígeno del péptido  $A\beta_{1-14}$ , específicamente un antígeno del péptido  $A\beta_{1-15}$ , pero especialmente un fragmento de un péptido  $A\beta$  que consiste en restos de aminoácidos 1-15 según indica la secuencia SEQ ID NO: 1, y 1-16( $\Delta 14$ ) como indica la secuencia SEQ ID NO:3, modificado por medio de pegilación (empleando polietilenglicol o polietilenglicol modificado) o modificado por otros métodos tales como por poliaminoácidos (p.ej. poliglicina, polihistidina), polisacáridos (p.ej. ácido poligalacturónico, ácido poliláctico, quitina, quitosán) polímeros sintéticos (poliamidas, poliuretanos, poliésteres) o copolímeros (poli(ácido metacrílico)) y N-(2-hidroxil)propil metacrilamida) y similares.

- 55 En otro aspecto, el antígeno de un péptido  $\beta$ -amiloide como se describe anteriormente en la presente memoria, es un fragmento de un péptido  $A\beta$  palmitoilado que procede de la parte N-terminal del péptido  $A\beta$ , pero particularmente un fragmento de un péptido  $A\beta$  palmitoilado que consiste en restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16( $\Delta 2$ ), 1-16( $\Delta 4$ ), 1-16( $\Delta 5$ ), 1-16( $\Delta 6$ ), 1-16( $\Delta 8$ ), 1-16( $\Delta 9$ ), 1-16( $\Delta 10$ ), 1-16( $\Delta 12$ ), 16( $\Delta 13$ ), 16( $\Delta 14$ ), 1-16( $\Delta 15$ ), 1-15( $\Delta 2$ ), 1-15( $\Delta 4$ ), 1-15( $\Delta 5$ ), 1-15( $\Delta 6$ ), 1-15( $\Delta 8$ ), 1-15( $\Delta 9$ ), 1-



15( $\Delta 10$ ); 1-15( $\Delta 12$ ), 15( $\Delta 13$ ), 15( $\Delta 14$ ), particularmente un antígeno del péptido  $A\beta_{1-16(\Delta 15)}$  palmitoilado, más particularmente un antígeno del péptido  $A\beta_{1-16(\Delta 14)}$  o  $A\beta_{1-16(\Delta 13)}$  palmitoilado, aún más particularmente un antígeno del péptido  $A\beta_{1-14}$  palmitoilado, específicamente un antígeno del péptido  $A\beta_{1-15}$  palmitoilado pero especialmente un fragmento de un péptido  $A\beta$  palmitoilado que consiste en restos de aminoácidos 1-15 según indica la secuencia SEQ ID NO: 1, y 1-16( $\Delta 14$ ) como indica la secuencia SEQ ID NO:3, modificados por restos palmitoilo enlazados covalentemente en cada extremo del péptido, resultando entre 2 y 4, particularmente 4 restos reconstituídos en un liposoma. Esta construcción antigénica palmitoilada puede emplearse para el tratamiento de una amiloidosis, un grupo de enfermedades y patologías asociadas con la formación de placas amiloides, que incluye la amiloidosis secundaria, y con objeto de aliviar los síntomas asociados con la enfermedad o restaurar una condición encontrada en individuos sanos que no están afectados por la enfermedad.

Adicionalmente, las construcciones antigénicas supramoleculares como se describe en la presente memoria, comprenden una secuencia de un péptido antigénico como se describe anteriormente en la presente memoria, enlazada covalentemente a lisina pegilada al menos una en cada extremo terminal pero particularmente 1 ó 2 en cada término. La longitud de la cadena de PEG (polietilenglicol) puede variar desde  $n = 8$  a  $n = 150.000$  o más, particularmente desde  $n = 10$  hasta  $n = 80.000$ , más particularmente desde  $n = 10$  hasta  $n = 10.000$ . En un aspecto específico, la longitud de la cadena de PEG es no más que  $n = 45$ , particularmente entre  $n = 5$  y  $n = 40$ , más particularmente entre  $n = 10$  y  $n = 30$ , y todavía más particularmente,  $n = 10$ .

Los liposomas que pueden emplearse en las composiciones como se describe la presente memoria, incluyen los conocidos por los expertos en la técnica. Puede emplearse cualquiera de los lípidos estándar útiles para preparar liposomas. Liposomas estándar, bicapas y multicapas pueden ser empleados para preparar composiciones de la presente invención. Si bien puede emplearse cualquier método de preparación de liposomas conocido por los expertos en la técnica, los liposomas más preferidos se preparan según el método de Alving et al., *Infect Immun.* 60:2438-2444, 1992, incorporado en esta memoria por referencia. El liposoma puede contener, opcionalmente, un adyuvante o un inmunomodulador o ambos. Un inmunomodulador preferido es el lípido A, particularmente un lípido A destoxificado tal como, por ejemplo, lípido A monofosforilado o difosforilado.

El liposoma puede ejercer una doble función ya que puede ser empleado como un soporte que comprende la construcción supramolecular como se describe anteriormente en la presente memoria, y al mismo tiempo actuar como adyuvante para aumentar o estimular la respuesta inmunitaria dentro del animal o ser humano que ha de ser tratado con la vacuna terapéutica como se describe en la presente memoria. Opcionalmente, el liposoma puede contener, además, un adyuvante adicional y/u otro inmunomodulador, o ambos, tal como, por ejemplo, lípido A, alumbre, fosfato cálcico, interleuquina 1, y/o microcápsulas de polisacáridos y proteínas, pero particularmente un lípido A, más particularmente un lípido A destoxificado, tal como lípido A monofosforilado o difosforilado, o alumbre.

En particular, la amiloidosis relacionada con la edad, que incluye patologías neurológicas tales como la Enfermedad de Alzheimer (AD), e incluye enfermedades o condiciones caracterizadas por pérdida de capacidad de la memoria cognitiva tal como, por ejemplo, el deterioro cognitivo leve (MCI), la demencia de cuerpos de Lewy, el síndrome de Down, la hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Dutch), el complejo de Parkinson-Demencia (Enfermedad de Guam), así como otras enfermedades que están basadas o asociadas con proteínas semejantes a amiloides tales como la parálisis supranuclear progresiva, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Creutzfeldt Jacob, la enfermedad de Parkinson, la demencia relacionada con HIV, la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), la diabetes de comienzo en la edad adulta, la amiloidosis cardíaca senil, los tumores endocrinos y otras, con inclusión de la degeneración macular, pero particularmente una enfermedad o una condición caracterizada por pérdida de capacidad de la memoria cognitiva tal como, por ejemplo, el deterioro cognitivo leve (MCI), se trata administrando una construcción antigénica supramolecular como se describe en la presente memoria, pero particularmente una composición de vacuna que comprende una construcción antigénica supramolecular tal como se describe en la presente memoria, a un animal, particularmente un mamífero o un ser humano aquejado por una patología tal y por tanto, necesitado de tal tratamiento, pero especialmente la Enfermedad de Alzheimer, cuya manifestación sintomática es puesta de evidencia por ligera falta de memoria hasta una pérdida total de la memoria.

La composición como se describe en la presente memoria, que comprende una construcción antigénica supramolecular como se describe anteriormente en la presente memoria, puede prepararse en forma de una solución líquida o de una suspensión inyectable, o también en una forma sólida adecuada para solubilizar antes de la inyección, en el contexto de, por ejemplo, un kit para hacer uso de la presente composición, como se describe más adelante.

La composición como se describe en la presente memoria, que comprende una construcción antigénica supramolecular, se administra a un ser humano o a un animal que padece una enfermedad asociada a amiloide para inducir una respuesta inmunitaria en dicho ser humano o dicho animal para aliviar los síntomas asociados con la enfermedad o para restaurar la condición encontrada en individuos sanos que no están afectados por la enfermedad.

Las composiciones como se describe en la presente memoria, pueden administrarse a un ser humano o a un animal por cualquier vía de administración estándar adecuada. En general, la composición puede administrarse por vía tópica, oral, rectal, nasal o parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea o intramuscular). Además, la

composición puede incorporarse en matrices de cesión prolongada tales como polímeros biodegradables, implantándose los polímeros en la proximidad del sitio en que se desea la aplicación, por ejemplo, en el sitio de un tumor. El método incluye la administración de una sola dosis, la administración de dosis repetidas en intervalos de tiempo predeterminados, y la administración prolongada durante un período de tiempo predeterminado

- 5 En particular, la composición de péptido antigénico como se describe en la presente memoria, puede ser administrada mediante inyección parenteral, particularmente por vía intraperitoneal, intravenosa, subcutánea e intramuscular.

La dosificación de la composición dependerá de la condición que está siendo tratada, de la composición particular empleada y de otros factores clínicos tales como el peso, el tamaño y el estado del paciente, la superficie corporal, el compuesto o composición particular que ha de administrarse, otros medicamentos que están siendo administrados simultáneamente, y la vía de administración.

- 15 La composición de vacuna terapéutica como se describe en la presente memoria, puede ser administrada en combinación con otras sustancias biológicamente activas y otros procedimientos operatorios para el tratamiento de enfermedades. Las otras sustancias biológicamente activas pueden formar parte de la misma composición que comprende la vacuna terapéutica según la invención, en forma de una mezcla, en la que la vacuna terapéutica y la otra sustancia biológicamente activa se mezclan entre sí o con el mismo disolvente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable, o pueden proporcionarse por separado como parte de composiciones separadas, que pueden facilitarse por separado o juntamente, en forma de un kit de partes.

- 20 La composición de vacuna terapéutica como se describe en la presente memoria, puede ser administrada simultáneamente con la otra u otras sustancias biológicamente activas, intermitentemente o sucesivamente. Por ejemplo, la composición de vacuna terapéutica como se describe en la presente memoria, puede ser administrada simultáneamente con una primera sustancia biológicamente activa, adicional, o sucesivamente después o antes de administrar la vacuna terapéutica. Si se escoge un plan de aplicación en el que se administra más de una sustancia biológicamente activa junto con la, al menos una, vacuna terapéutica según la invención, los compuestos o sustancias pueden administrarse en parte simultáneamente y en parte sucesivamente, en diversas combinaciones.

- 30 En otro aspecto se proporcionan mezclas de una vacuna terapéutica como se describe en la presente memoria y, opcionalmente, una o más otras sustancias biológicamente activas, así como métodos para utilizar una vacuna terapéutica como se describe en la presente memoria, o sus mezclas, que incluyen composiciones que comprenden dicha vacuna terapéutica o mezclas de vacunas terapéuticas para la prevención y/o el tratamiento terapéutico y/o el alivio de los efectos de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y patologías asociadas con la formación de placas amiloides. que incluye la amiloidosis secundaria y la amiloidosis relacionada con la edad, que incluyen, pero no se limitan a patologías neurológicas tales como la Enfermedad de Alzheimer (AD), e incluyen enfermedades o condiciones caracterizadas por pérdida de capacidad de la memoria cognitiva tales como, por ejemplo, el deterioro cognitivo leve (MCI), la demencia de cuerpos de Lewy, el síndrome de Down, la hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Dutch), el complejo de Parkinson-Demencia (Enfermedad de Guam), así como otras enfermedades que están basadas o asociadas con proteínas semejantes a amiloides tales como la parálisis supranuclear progresiva, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Creutzfeldt Jacob, la enfermedad de Parkinson, la demencia relacionada con HIV, la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), la diabetes de comienzo en la edad adulta, la amiloidosis cardíaca senil, los tumores endocrinos y otras, con inclusión de la degeneración macular,

- 40 Las mezclas como se describe en la presente memoria pueden comprender, además de una vacuna terapéutica como se describe en la presente memoria, una sustancia biológicamente activa tal como, por ejemplo, compuestos conocidos utilizados en la medicación de las amiloidosis, un grupo de enfermedades y patologías asociadas con proteínas amiloides o semejantes a amiloides tales como la proteína A $\beta$  implicada en la Enfermedad de Alzheimer, que incluye un anticuerpo generado contra a un antígeno de un péptido antigénico, particularmente un anticuerpo generado contra un antígeno inmunógeno presentado en forma de una construcción antigénica supramolecular, más particularmente un anticuerpo según la presente invención y como se describe en la presente memoria.

- 50 En otro aspecto, la otra sustancia o compuesto biológicamente activo puede ser también un agente terapéutico que puede emplearse en el tratamiento de enfermedades y patologías que están causadas o asociadas con proteínas amiloides o semejantes a amiloides que incluyen la amiloidosis causada por proteínas  $\beta$ -amiloides, o pueden emplearse para la medicación de otras patologías neurológicas.

La otra sustancia o compuesto biológicamente activo, puede ejercer su efecto biológico mediante el mismo mecanismo o un mecanismo similar al de la vacuna terapéutica como se describe en la presente memoria, o mediante un mecanismo de acción no relacionado, o mediante una multiplicidad de mecanismos de acción relacionados y/o sin relacionar.

- 55 Generalmente, el otro compuesto biológicamente activo puede incluir intensificadores de la transmisión de neutrones, fármacos psicoterapéuticos, inhibidores de la acetilcolinesterasa, bloqueantes de los canales del calcio, aminos biogénicas, tranquilizantes del grupo de las benzodiacepinas, intensificadores de la síntesis, almacenamiento o liberación de acetilcolina, agonistas de receptores postsinápticos de la acetilcolina, inhibidores de

la monoaminooxidasa A o B, antagonistas del receptor de N-metil-D-aspartato glutamato, fármacos no esteroideos y antiinflamatorios, antioxidantes y antagonistas de receptores serotoninérgicos.

En particular, la mezcla como se describe en la presente memoria, puede comprender al menos otro compuesto biológicamente activo seleccionado del grupo que consiste en compuestos contra el estrés oxidativo, compuestos antiapoptóticos, agentes quelantes metálicos, inhibidores de reparación del DNA tales como pirencepina y metabolitos, ácido 3-amino-1-propanosulfónico (3APS), 1,3-propanodisulfonato (1,3PDS), activadores de secretasa, inhibidores de la  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasa, proteínas tau, neurotransmisores, quebrantadores de arrollamientos  $\beta$ -laminares moléculas antiinflamatorias o inhibidores de la colinesterasa (ChEIs) tales como tacrina, rivastigmina, donepezilo, y/o galantamina y otros fármacos y suplementos nutritivos, junto con una vacuna terapéutica según la invención y, opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente, farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto adicional, las mezclas como se describe en la presente memoria, pueden comprender niacina o memantina junto con una vacuna terapéutica como se describe en la presente memoria y, opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente, farmacéuticamente aceptable.

Todavía en otro aspecto, se describen mezclas que comprenden "antipsicóticos atípicos" tales como, por ejemplo, clozapina, ziprasidona, risperidona, aripiprazol u olanzapina, para el tratamiento de síntomas psicóticos positivos y negativos que incluyen alucinaciones, ilusiones, trastornos del pensamiento (manifestados por incoherencia acusada, descarrilamiento, tangencialidad), y comportamiento extraño o desorganizado, así como anhedonia, afecto aplanado, apatía y aislamiento social, junto con una vacuna terapéutica como se describe en la presente memoria, y, opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente, farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones y mezclas como se describe anteriormente en la presente memoria, comprenden la vacuna y la sustancia biológicamente activa, respectivamente, en una cantidad eficaz terapéutica y profilácticamente .

Otros compuestos que pueden emplearse adecuadamente en mezclas, en combinación con la vacuna como se describe en la presente memoria, por ejemplo, en el documento WO 2004/058258 (véanse en especial las páginas 16 y 17) que incluye dianas terapéuticas de fármacos (páginas 36-39), ácidos alcanosulfónicos y ácido alcanosulfúrico (páginas 39-51), inhibidores de la colinesterasa (páginas 51-56) antagonista del receptor de NMDA (páginas 56-58), estrógenos (páginas 58-59), fármacos no esteroideos antiinflamatorios (páginas 60-61), antioxidantes (páginas 61-62), agonistas de receptores activados de proliferadores de peroxisoma (PPAR) (páginas 63-67), agentes de disminución del colesterol (páginas 68-75), inhibidores amiloides (páginas 75-77), inhibidores de la formación de amiloides (páginas 77-78), agentes quelantes metálicos (páginas 78-79) antipsicóticos y antidepresivos (páginas 80-82), suplementos nutricionales (páginas 83-89) y compuestos que aumentan la disponibilidad de sustancias biológicamente activas en el cerebro (véanse las páginas 89-93) y profármacos (páginas 93 y 94), cuyo documento se incorpora en esta memoria por referencia, pero especialmente los compuestos terapéuticos citados en las páginas anteriormente indicadas.

Se sabe desde hace largo tiempo que la vacunación de un hospedador, animal o humano, con una proteína normal huésped puede conducir al desarrollo de autoanticuerpos dirigidos contra la proteína huésped, y dar por resultado patologías conocidas colectivamente como patologías autoinmunitarias. Las proteínas A $\beta$  y su proteína precursora APP son proteínas normales tales. El uso de estas proteínas huésped en una vacunación posee, por tanto, el potencial de crear efectos secundarios indeseados. Existe alguna evidencia en la bibliografía de que las proteínas A $\beta$  pueden activar una respuesta neuroinflamatoria que puede ser causada parcialmente por una sobreactivación del sistema de complemento, que ya está activado altamente en pacientes aquejados de la Enfermedad de Alzheimer u otras enfermedades neurodegenerativas.

A $\beta$  humana en su conformación  $\beta$ -laminar es un potente activador del sistema de complemento humano. Se une fuertemente al extremo de colágeno del complemento humano C1q. La sobreactivación del sistema de complemento puede dar por resultado que el sistema de defensa natural del hospedador gire y conduzca a la autodestrucción de células y tejidos con inclusión de neuronas y sus procesos. Por ejemplo, el complejo de ataque de la membrana (MAC) que forma parte del sistema de defensa natural del hospedador y protege al hospedador contra la invasión de bacterias y virus insertándose por sí mismo en dichas bacterias o virus, por sobreactivación puede insertarse por sí mismo en células huésped y causar autodestrucción. La sobreactivación puede llevar, además, a la estimulación de microglías produciendo compuestos tóxicos tales como radicales libres de oxígeno y proteasas perjudiciales.

Por tanto, es un aspecto adicional prevenir los efectos secundarios potenciales tales como las complicaciones neurológicas ocasionadas por la vacunación de un animal o un ser humano aquejado de una enfermedad autoinmunitaria, con un autoantígeno, que posee el potencial de estimular aun más un sistema de complemento ya sobreactivado. Esto puede conseguirse dentro del alcance de la presente invención administrando un antígeno de un péptido A $\beta$ , particularmente un antígeno de un péptido A $\beta$  palmitoilado, más particularmente el antígeno del péptido A $\beta_{1-16}$  palmitoilado, pero especialmente el antígeno del péptido A $\beta_{1-15}$  palmitoilado (ACI-24, A $\beta_{1-16}$ ) en combinación con un inhibidor del complemento.

Por tanto, es otro aspecto proporcionar una composición de vacuna que comprende, además de un antígeno de un péptido A $\beta$ , particularmente el antígeno del péptido A $\beta$  como se describe anteriormente en la presente memoria, un inhibidor del sistema de complemento

- 5 El inhibidor del complemento puede ser un compuesto seleccionado del grupo que consiste en Receptor 1 del complemento humano soluble, anti-proteína C5 del complemento humano tal como, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal humanizado anti C5 o un fragmento monocatenario de un anticuerpo monoclonal humanizado, inhibidor N de C1-esterasa e inhibidor natural de C1 humana.

- 10 Énfasis reciente sobre la relación de la morbosidad de A $\beta$  y la enfermedad cerebral vascular, la conexión entre A $\beta$  y la aterosclerosis, el deterioro cognitivo asociado con angiopatía amiloide, la patología microvascular cerebral importante, y el deficiente despeje de A $\beta$  por medio del latido hematoencefálico en la Enfermedad de Alzheimer, todos ellos indican que la patología vascular es una característica importante de una condición crónica de neurodegeneración en la Enfermedad de Alzheimer (Ziokovic, B.: (2005) Trends in Neurosciences 28, 202-208). Por tanto, la disfunción neurovascular podría desempeñar un papel principal en la patogénesis de la Enfermedad de Alzheimer.

- 15 Hay una extensa evidencia de una fuerte asociación existente entre la decadencia cognitiva en la Enfermedad de Alzheimer y la patología cerebrovascular (Torre, de la, J.C.: (2004) Neurol. Res. 26, 517-524, Gorelick, P. B.: (2004) Stroke 35, 2620-2622). Una densidad microvascular reducida, un número aumentado de vasos fragmentados, el cambio acusado de los diámetros de los vasos, etc. han sido descritos en la Enfermedad de Alzheimer (Bailey, T.L. et al., (2004) Neurol. Res. 26, 573-578; Farkas, E., y Luiten, P.G.: (2001) Prof. Neurobiol. 64, 575-611).

- 20 Diversos estudios, que incluyen el estudio Rotterdam basado en una gran población (Greenberg, S. M et al., (2004) Stroke 35, 2616-2619) han indicado que los factores de riesgo vasculares pudieran ser responsables de la decadencia cognitiva en la edad avanzada, conduciendo a la denominada "demencia vascular". Varios factores de riesgo de la Enfermedad de Alzheimer y la demencia vascular se solapan, e incluyen los ataques transitorios de isquemia, la aterosclerosis, la enfermedad cardíaca, la alta viscosidad del suero, etc.

- 25 Ocurre demencia vascular como resultado de daño al tejido cerebral después de privación de oxígeno ocasionada por vasos sanguíneos del cerebro estrechados o bloqueados y es la segunda forma más frecuente de demencia. Los pacientes sufren frecuentemente tanto Enfermedad de Alzheimer como demencia vascular, ambas. Se estima que 1,7 millones de personas en la Comunidad Europea y 55.000 personas en Estados Unidos padecen demencia vascular.

- 30 Una terapia que restablezca la presión normal de O<sub>2</sub> en el cerebro, a pesar del deterioro del flujo sanguíneo, posee el potencial de influir significativamente en la evolución de la Enfermedad de Alzheimer y de reducir espectacularmente la demencia vascular.

- 35 En un aspecto se describe una composición de vacuna que comprende, además de un antígeno de un péptido A $\beta$ , particularmente el antígeno del péptido A $\beta$  como se describe anteriormente en la presente memoria, un compuesto que desencadena una disminución de la afinidad de la hemoglobina para el O<sub>2</sub> de modo que el oxígeno se libera y distribuye seguidamente a los tejidos orgánicos.

- 40 En particular, el compuesto que modula la afinidad de O<sub>2</sub>/hemoglobina puede ser un compuesto seleccionado del grupo que consiste en un fármaco antilipídémico tal como, por ejemplo, el ácido clofibrato o el bezafibrato, que incluye los derivados de bezafibrato LR16 y L35, derivados de urea tales como, por ejemplo, el ácido [2-[4-[[[arilamino]carbonil]-amino]fenoxi]]-2-metilpropiónico, un efector alostérico de la hemoglobina tal como, por ejemplo, el 2,3-difosfoglicerato (DPG) el hexakisfosfato de inositol (IHP), y el fosfato de piridoxal.

Más particularmente, el compuesto que modula la afinidad de O<sub>2</sub>/hemoglobina puede ser un compuesto que comprende un ligando aniónico para un sitio alostérico de la hemoglobina, en donde el ligando aniónico comprende un anillo interno de pirofosfato, junto, opcionalmente, con un catión no tóxico.

- 45 Aún más particularmente, el compuesto que modula la afinidad de O<sub>2</sub>/hemoglobina es un derivado del inositol hexafosfato (IHP) que comprende al menos un anillo interno de pirofosfato, junto, opcionalmente, con un catión no tóxico.

- 50 Con objeto de captar los efectos beneficiosos ofrecidos por un inhibidor del complemento y un compuesto que modula la afinidad de O<sub>2</sub>/hemoglobina, para aliviar los efectos potencialmente perjudiciales de un sistema de complemento sobreactivado y de patologías cerebrovasculares, respectivamente, se describe adicionalmente en la presente memoria una composición de vacuna en la que está comprendido un antígeno de un péptido A $\beta$ , particularmente el antígeno de un péptido A $\beta$  descrito anteriormente en la presente memoria, en combinación con un inhibidor del sistema de complemento y un compuesto que modula la afinidad de O<sub>2</sub>/hemoglobina, particularmente un efector alostérico de la hemoglobina.

La composición de vacuna como se describe en la presente memoria, que comprende un antígeno de un péptido A $\beta$ , particularmente el antígeno de un péptido A $\beta$  como se describe anteriormente en, la presente memoria, puede administrarse simultáneamente, intermitentemente o sucesivamente, con un inhibidor del complemento y/o un compuesto que modula la afinidad de O<sub>2</sub>/hemoglobina, para aliviar los efectos potencialmente perjudiciales de un sistema de complemento sobreactivado y de patologías cerebrovasculares, respectivamente. Por ejemplo, la composición de vacuna puede ser administrada simultáneamente con un inhibidor del complemento o sucesivamente, después o antes de la administración de la vacuna. Si se escoge un esquema de aplicación en el que un inhibidor del complemento y un compuesto que modula la afinidad de O<sub>2</sub>/hemoglobina, particularmente un efector alostérico de la hemoglobina, se administran junto con la, al menos, una vacuna como se describe en la presente memoria, los compuestos o sustancias pueden ser administrados en parte simultáneamente y en parte sucesivamente, en diversas combinaciones.

En otro aspecto se proporcionan mezclas de una vacuna como se describe en la presente memoria y un inhibidor del complemento y/o un compuesto que modula la afinidad de O<sub>2</sub>/hemoglobina, particularmente un efector alostérico de la hemoglobina, así como también métodos de empleo de una vacuna como se describe en esta memoria, o sus mezclas, que incluyen composiciones que comprenden dicha vacuna o mezclas de una vacuna como se describe en la presente memoria, y un inhibidor del complemento y/o un compuesto que modula la afinidad de O<sub>2</sub>/hemoglobina, particularmente un efector alostérico de la hemoglobina, para la prevención y/o el tratamiento terapéutico y/o el alivio de los efectos de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y patologías asociadas con la formación de placas amiloides que incluye la amiloidosis secundaria y la amiloidosis relacionada con la edad que, incluyen, pero no se limitan a patologías neurológicas tales como la Enfermedad de Alzheimer (AD), e incluyen enfermedades o condiciones caracterizadas por pérdida de capacidad de la memoria cognitiva tal como, por ejemplo, el deterioro cognitivo leve (MCI), la demencia de cuerpos de Lewy, el síndrome de Down, la hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Dutch), el complejo de Parkinson-Demencia (Enfermedad de Guam), así como otras enfermedades que están basadas o asociadas con proteínas semejantes a amiloides tales como la parálisis supranuclear progresiva, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Creutzfeldt Jacob, la enfermedad de Parkinson, la demencia relacionada con HIV, la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), la diabetes de comienzo en la edad adulta, la amiloidosis cardíaca senil, los tumores endocrinos y otras. con inclusión de la degeneración macular,

El péptido amiloide 1-15 modificado puede ser sintetizado siguiendo el método indicado por Nicolau et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci USA, 99, 2332-2337. El enfoque indicado en la publicación de Nicolau implica modificar el péptido antigénico por injerto en resina de un resto lipófilo o hidrófobo. en los restos de aminoácidos del extremo N-terminal de un péptido previamente formado. En particular un aminoácido protegido, particularmente un aminoácido protegido con Fmoc. se fija en una resina usando química de acoplamiento conocida. Se separa el grupo de protección y se une un segundo resto de aminoácido protegido. Después se emplean procedimientos estándar automatizados de síntesis de péptidos usando química de protección conocida, en particular química de Fmoc/tBu, y grupos tipo de protección de las cadenas laterales, para sintetizar el péptido antigénico A $\beta$ , en particular el péptido antigénico A $\beta$ <sub>1-15</sub> por acoplamiento sobre los aminoácidos 1 a 15 de la proteína amiloide A $\beta$ <sub>1-42</sub> para producir el fragmento de péptido con una secuencia indicada en SEQ ID NO: 1. En una etapa final dos aminoácidos protegidos más se unen al fragmento del péptido en crecimiento. Los grupos Mtt pueden escindirse selectivamente luego y unirse a ácido palmítico. Después de lavar la resina se separa el grupo de protección y simultáneamente se escinde la resina, seguido de desprotecciones de las cadenas laterales usando metodología estándar. Luego puede obtenerse el producto final con alta pureza y confirmarse su identidad mediante métodos conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, espectrometría de masas de electropulverización.

El resto lipófilo o hidrófobo como se describe en la presente memoria, puede ser un ácido graso, un triglicérido o un fosfolípido en donde la cadena principal carbonada del ácido graso tiene al menos 10 átomos de carbono. Particularmente, el resto lipófilo o hidrófobo es un ácido graso con una cadena principal carbonada de al menos aproximadamente 14 átomos de carbono y hasta aproximadamente de 24 átomos de carbono, estando situado dentro de este intervalo cada número individual de átomos de carbono. Más particularmente, el resto lipófilo o hidrófobo posee una cadena principal carbonada de al menos 14 átomos de carbono, pero especialmente de 16 átomos de carbono. Como ejemplos de restos hidrófobos se incluyen, pero no se limitan a ácido palmítico, ácido esteárico, ácido mirístico, ácido láurico, ácido oleico, ácido linoleico, y ácido linolénico, El resto lipófilo o hidrófobo es ácido palmítico.

Después pueden prepararse antígenos liposomales según la invención, como ha sido descrito por Nicolau et al., 2002. El péptido antigénico amiloide A $\beta$  modificado, en particular el péptido antigénico A $\beta$ <sub>1-15</sub> modificado, puede ser reconstituido en una construcción que consiste en liposomas, particularmente liposomas preparados con dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPEA), dimiristoilfosfatidilglicerina (DMPG) y colesterol, conteniendo opcionalmente lípido A monofosforilado.

En un aspecto específico se emplean liposomas con lípido A como adyuvante para preparar la vacuna anti-amiloide. Se mezclan dimiristoilfosfatidil-colina, -glicerina y colesterol, particularmente en una razón molar de 0,9:1,0:0,7. Un inmunomodulador fuerte tal como, por ejemplo, lípido A monofosforilado, se añade luego en una concentración adecuada, particularmente en una concentración de entre 30 y 50 mg por mmol, más particularmente 40 mg por mmol de fosfolípidos. Se añade después el péptido antigénico A $\beta$  modificado en una razón molar de péptido a

fosfolípidos de entre 1:30 y 1:200, particularmente en una razón molar de entre 1:50 y 1:120, más particularmente de 1:100. Se separan los disolventes, por ejemplo, por evaporación, y la película que resulta se hidrata con solución tampón estéril tal como, por ejemplo, PBS.

También pueden prepararse liposomas mediante la técnica de inyección a contracorriente según ha sido descrito, por ejemplo, por Wagner et al., en *Journal of Liposome Research*, Vol 12(3), páginas 259-270 (2002). Durante la inyección de soluciones de lípidos en un sistema tampón acuoso, los lípidos tienden a formar "precipitados" seguido de autocolocación en vesículas. El tamaño de las vesículas obtenidas depende de factores tales como la concentración del lípido, la velocidad de agitación, la velocidad de inyección y la elección de lípidos. El sistema de preparación puede consistir en un módulo de inyección a contracorriente, recipientes para la fase polar (p. ej. una solución tampón de PBS), un recipiente con solución etanol/lípido y un dispositivo de presión, pero particularmente un dispositivo de presión de nitrógeno. Mientras la solución acuosa o polar se bombea a través del módulo de inyección a contracorriente, la solución etanol/lípido se inyecta en la fase polar variando las presiones aplicadas.

Para determinar la inmunogenicidad de la construcción antigénica A $\beta$  modificada un animal adecuado, seleccionado del grupo que consiste en ratones, ratas, conejos, cerdos, aves, etc., pero particularmente ratones, especialmente ratones C57BL/6, se inmuniza con el péptido antigénico. La inmunogenicidad de la construcción antigénica se determina examinando muestras de los sueros a intervalos de tiempo adecuados después de la inmunización, utilizando un procedimiento de ensayo inmunoenzimático tal como, por ejemplo, un ensayo ELISA.

La construcción antigénica modificada, particularmente la construcción antigénica palmitoilada y más particularmente, la construcción A $\beta_{1-15}$  palmitoilada, se emplea para la inmunización de un animal, particularmente un mamífero o un ser humano, aquejado de síntomas asociados con amiloidosis, un grupo de enfermedades y patologías asociadas con la formación de placas amiloides que incluye la amiloidosis secundaria y la amiloidosis relacionada con la edad, que incluyen, pero no se limitan a patologías neurológicas tales como la Enfermedad de Alzheimer (AD), e incluyen enfermedades o condiciones caracterizadas por pérdida de capacidad de la memoria cognitiva tales como, por ejemplo, el deterioro cognitivo leve (MCI), la demencia de cuerpos de Lewy, el síndrome de Down, la hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Dutch), el complejo de Parkinson-Demencia (Enfermedad de Guam), así como otras enfermedades que están basadas o asociadas con proteínas semejantes a amiloides tales como la parálisis supranuclear progresiva, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Creutzfeldt Jacob, la enfermedad de Parkinson, la demencia relacionada con HIV, la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), la diabetes de comienzo en la edad adulta, la amiloidosis cardíaca senil, los tumores endocrinos y otras, con inclusión de la degeneración macular, pero particularmente una enfermedad o condición caracterizada por pérdida de capacidad de la memoria cognitiva tal como, por ejemplo, el deterioro cognitivo leve (MCI) o cualquier otra enfermedad asociada a amiloide.

La construcción antigénica supramolecular como se describe en la presente memoria, pero particularmente una composición de vacuna que comprende una construcción antigénica supramolecular tal, como se describe en la presente memoria, se administra a un animal, particularmente un mamífero o un ser humano, mediante cualquier vía normal de administración apropiada. En general la composición puede administrarse por vía tópica, oral, rectal, nasal o parenteral (por ejemplo, vía intravenosa, subcutánea o intramuscular). Además, la composición puede incorporarse en matrices de cesión prolongada, tales como polímeros biodegradables, implantándose los polímeros en la proximidad del sitio en que se desea realizar la distribución, por ejemplo, en el sitio de un tumor. El método incluye la administración de una sola dosis, la administración de dosis repetidas a intervalos de tiempo predeterminados, y la administración prolongada durante un período de tiempo predeterminado.

En un aspecto específico, la construcción antigénica como se describe en la presente memoria, particularmente una composición de vacuna que comprende dicha construcción antigénica en una forma farmacéuticamente aceptable, puede ser administrada en dosis repetidas, en particular en 1 a 15 dosis, más particularmente en 2 a 10 dosis, más particularmente en 3 a 7 dosis y aún más particularmente en 4 a 8 dosis, en intervalos de tiempo de entre 1 y 10 semanas, particularmente en intervalos de tiempo de entre 1 y 6 semanas, más particularmente en intervalos de tiempo de entre 1 y 4 semanas, y aún más particularmente, en intervalos de tiempo de entre 2 y 3 semanas. La respuesta inmunitaria se verifica tomando muestras de sueros en un momento adecuado después de revacunar, particularmente 3 a 10 días después de revacunar, más particularmente 4 a 8 días después de revacunar y más particularmente 5 a 6 días después de revacunar, y determinando la inmunogenicidad de la construcción antigénica utilizando metodología conocida., particularmente uno de los inmunoensayos enzimáticos comúnmente utilizados tal como, por ejemplo el ensayo ELISA.

La inmunización con la construcción antigénica como se describe en la presente memoria, pero particularmente con una composición de vacuna que comprende la construcción antigénica como se describe en la presente memoria en una forma farmacéuticamente aceptable, conduce a una respuesta inmunitaria importante y altamente específica en el animal o ser humano tratado.

Las composiciones de construcciones antigénicas supramoleculares, pueden administrarse a un ser humano o a un animal para inducir inmunidad a agentes antigénicos tales como organismos infecciosos o a aspectos antigénicos de otras condiciones patológicas tales como la agregación  $\beta$ -amiloide (Enfermedad de Alzheimer), o patologías

hiperproliferativas tales como el cáncer. El ser humano o el animal inmunizado desarrolla anticuerpos en circulación contra el organismos infeccioso, reduciendo o inactivando con ello su capacidad de estimular una enfermedad.

Las composiciones como se describe en esta memoria, pueden emplearse también para producir anticuerpos dirigidos contra péptidos antigénicos. Los anticuerpos que resultan se administran a individuos para inmunizarlos pasivamente contra una diversidad de enfermedades que incluyen pero no se limitan a enfermedades asociadas con proteínas amiloides.

Por tanto, en un aspecto específico, las composiciones de construcciones antigénicas supramoleculares como se describe en la presente memoria, pueden emplearse para producir un grupo de anticuerpos monoclonales o policlonales que son específicos para diversas patologías, que incluyen por ejemplo, la Enfermedad de Alzheimer. Los anticuerpos se preparan mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica.

Las composiciones, como se describe en la presente memoria, pueden ser administradas a un ser humano a un animal por cualesquiera medios apropiados, preferiblemente por inyección. Por ejemplo, un péptido antigénico modificado, reconstituido en liposomas, se administra por inyección subcutánea. Tanto si han sido producidos internamente o proporcionados desde fuentes externas, los anticuerpos en circulación se unen al antígeno y reducen o inactivan su aptitud para estimular enfermedades.

En ciertos aspectos, las construcciones antigénicas supramoleculares pueden comprender un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de un péptido  $\beta$ -amiloide. Los péptidos pueden comprender o corresponder también a un péptido beta-amiloide completo y a fragmentos activos del mismo. Adicionalmente, los péptidos útiles para la presente invención comprenden además  $A\beta$

Se describe, además, un método de producción de un anticuerpo que incluye cualquier anticuerpo o partes del mismo funcionalmente equivalentes, como se describe en la presente memoria, en particular un método de producción de un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo o partes del mismo funcionalmente equivalentes, como se describe en la presente memoria, cuyo método comprende generar anticuerpos pero particularmente anticuerpos monoclonales contra una construcción antigénica supramolecular que comprende un péptido antigénico que corresponde a la secuencia de aminoácidos de un antígeno del péptido  $A\beta$  como se describe en la presente memoria, pero particularmente un antígeno de un péptido  $A\beta$ 1-16( $\Delta$ 15), más particularmente un antígeno de un péptido  $A\beta$ 1-16( $\Delta$ 14) o  $A\beta$ 1-16( $\Delta$ 13), aun más particularmente un antígeno de un péptido  $A\beta$ 1-14, pero especialmente el péptido  $\beta$ -amiloide  $A\beta$ 1-15, modificado con restos hidrófobos tales como, por ejemplo, ácido palmítico, o un resto hidrófilo tal como, por ejemplo, polietilenglicol (PEG) o una combinación de ambos, en donde dicho resto hidrófobo o hidrófilo, respectivamente, está enlazado covalentemente a cada término del péptido antigénico a través de al menos uno, particularmente a través de 1 ó 2 aminoácidos unidos al resto de aminoácido terminal situado en cada extremo del péptido antigénico, tal como, por ejemplo, lisina o cualquier otro aminoácido o análogo de aminoácido adecuado, capaz de servir de dispositivo de conexión para fijar el resto hidrófobo e hidrófilo al fragmento de péptido tal como, por ejemplo, ácido glutámico y cisteína.

El anticuerpo, particularmente el anticuerpo monoclonal, que puede obtenerse por dicho método, es capaz, por administración a un animal, particularmente un mamífero o un ser humano, aquejado de deterioro de memoria, de retener o aumentar la capacidad de la memoria cognitiva en el animal tratado, mamífero o humano. Es un aspecto adicional proporcionar un anticuerpo que incluye cualquier anticuerpo o partes funcionales del mismo funcionalmente equivalentes, o, más particularmente, un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo o partes funcionales del mismo funcionalmente equivalentes, que ha sido generado contra una construcción antigénica supramolecular, que comprende un péptido antigénico que corresponde a la secuencia de aminoácidos del antígeno de un péptido  $A\beta$  como se describe anteriormente en la presente memoria, pero particularmente un antígeno de un péptido  $A\beta$  como se describe anteriormente en la presente memoria, pero particularmente un antígeno de un péptido  $A\beta$ 1-16( $\Delta$ 15), más particularmente un antígeno de un péptido  $A\beta$ 1-16( $\Delta$ 14) o  $A\beta$ 1-16( $\Delta$ 13), aun más particularmente un antígeno de un péptido  $A\beta$ 1-14, pero especialmente el péptido  $\beta$ -amiloide  $A\beta$ 1-15, modificado con un resto hidrófobo tal como, por ejemplo, ácido palmítico, o un resto hidrófilo tal como, por ejemplo, polietilenglicol (PEG) o una combinación de ambos, en donde dicho resto hidrófobo o hidrófilo, respectivamente, está enlazado covalentemente a cada uno de los términos del péptido antigénico por medio de un aminoácido tal como, por ejemplo, lisina o cualquier otro aminoácido o análogo de aminoácido adecuado, capaz de servir como molécula de enganche. Cuando se emplea PEG como el resto hidrófilo, los términos de PEG libres están enlazados covalentemente a fosfatidiletanolamina o cualquier otro compuesto adecuado para actuar como elemento de anclaje para incrustar la construcción antigénica en la bicapa de un liposoma.

## **EJEMPLOS**

### **Ejemplo 1: Síntesis de antígeno del péptido tetra(palmitoil lisina)- $A\beta$ 1-15**

#### **1.1 Protocolo de síntesis 1:**

El péptido amiloide 1-15 pamitoilado fue sintetizado siguiendo un método mejorado indicado anteriormente, (Nicolau et al., 2002). Este nuevo enfoque llevó consigo el injerto en resina de ácido palmítico a los restos de lisina terminales

del péptido previamente formado en vez de la síntesis en fase sólida por etapas, incorporando el aminoácido Fmoc-Lys(Pal)-OH modificado. Este nuevo enfoque mejora la eficacia de acoplamiento y proporciona un producto de pureza considerablemente mayor. Así, el aminoácido Fmoc-Lys(Mtt)-OH protegido ortogonalmente, fue fijado a una resina Wang usando química de acoplamiento HBTU. El grupo Fmoc fue separado usando piperidina al 20% en el seno de DMF y se unió un segundo resto de Fmoc-Lys(Mtt)-OH. Después se utilizó síntesis de péptidos automatizada, estándar, usando química de Fmoc/tBu y grupos tipo de protección de las cadenas laterales, para enlazar los 15 aminoácidos que siguen. Finalmente, los dos último aminoácidos unidos fueron Fmoc-Lys(Mtt)-OH. Los grupos Mtt fueron escindidos selectivamente luego empleando TFA al 1% en el seno de diclorometano y unidos a ácido palmítico usando HBTU. Después de lavar la resina, se separó el grupo Fmoc con piperidina al 20% en N,N-dimetilformamida (DMF) y finalmente se llevaron a cabo simultáneamente despegue de la resina y desprotección de las cadenas laterales usando TFA en condiciones estándar. Por trituración con éter dietílico frío se obtuvo el producto en forma de un sólido blanco. Por espectrometría de masas de electropulverización se confirmó la identidad del producto (m/z esperada: 1097,9 ([M+3]<sup>+</sup>); encontrada: 1096,8 ([M-3H]<sup>3+</sup>), sin detectar otros péptidos tri-, di- o mono-palmitoilados.

## 1.2 Protocolo de síntesis 2:

Puede emplearse un enfoque alternativo para la síntesis del antígeno del péptido tetra(palmitoil-lisina)-A $\beta$ <sub>1-15</sub> basado en el injerto en resina de ácido palmítico en los restos de Lisina terminales del péptido formado previamente. Así, sobre la resina de 2-clorotritilo se fijó el aminoácido Fmoc-Lys(ivDde)-OH protegido ortogonalmente. Después de desprotección del Fmoc se enlazó un segundo Fmoc-Lys(ivDde)-OH seguido de 15 ciclos de síntesis de péptidos automatizada, estándar, usando química de Fmoc/tBu y grupos tipo de protección de las cadenas laterales de los aminoácidos. Después de acoplamiento de dos últimos restos Fmoc-Lys(ivDde)-OH se separó el grupo Fmoc usando piperidina al 20% en el seno de DMF y el extremo N-terminal protegido con un grupo Boc, usando dicarbonato de terc-butilo. Después los grupos de protección ivDde fueron separados quimiosselectivamente por tratamiento con hidrazina al 3% en DMF y luego se unió ácido palmítico a estos cuatro restos de lisina usando HBTU empleando dos acoplamientos de 18 h cada uno. Después de lavar la resina, las cadenas laterales fueron desprotegidas utilizando TFA/TIPS en las condiciones normales. Por trituración con éter dietílico frío se obtuvo el producto en forma de un sólido blanco. MALDI-Tof confirmó la identidad del producto sin detectar otros péptidos tri-, di- o mono-palmitoilados.

Las vacunas de liposomas se prepararon utilizando un método descrito en el documento US6843942 y en la patente europea EP1337322.

## EJEMPLO 2: Síntesis de antígeno de péptido $\beta$ -amiloide lípido-PEG N- y C-terminal

La palmitoilación, al tiempo que proporciona un anclaje para el péptido en la bicapa del liposoma, debido a la relativa longitud reducida del resto de ácido graso de C<sub>16:0</sub> lleva a que el péptido se instale prácticamente sobre la superficie del liposoma. Por tanto, las células que procesan el antígeno tendrán que tomar el liposoma entero con el péptido, lo que podría dar como resultado una respuesta inmunitaria más lenta en términos relativos.

Para intensificar la respuesta inmunitaria ha sido aplicado otro anclaje/espaciador para reconstituir el péptido en el liposoma. p.ej. polietilenglicol (PEG). Se enlazó covalentemente PEG con el resto de lisina unido en ambos extremos terminales del péptido. En el otro extremo de la cadena (PEG<sub>n</sub>=70) se enlazó covalentemente fosfatidiletanolamina (PEA) para que actuara como elemento de anclaje en la bicapa del liposoma. Así, el liposoma actúa todavía como un adyuvante y el péptido, que está suficientemente alejado de la bicapa, puede ser procesado solo aumentando de este modo su inmunogenicidad en comparación con la del antígeno palmitoilado.

Metodologías para la mono-pegilación de péptidos en la posición N- $\alpha$  son conocidas y empleadas ampliamente. También se ha descrito mono-pegilación específica del sitio en restos de aminoácidos del extremo N- o C-terminal, internos, de péptidos de tamaño medio, después de enfoques o bien de fase sólida o de injerto de péptidos.

Con objeto de evitar problemas de impedimentos estéricos, la reacción se llevó a cabo en la fase de solución. Este enfoque exitoso implicó la síntesis de las secuencias peptídicas usando protecciones estándar Fmoc/tBu de las cadenas laterales de los aminoácidos. Para aquellas secuencias de péptidos que contienen restos Lys o His internos (1-16, 1-15) se añadió a cada término un Lys(ivDde) protegido ortogonalmente. Se añadió un Gly adicional al extremo C-terminal para facilitar la síntesis. Se separó el grupo Fmoc con piperidina al 20% en DMF y se N-acetiló utilizando anhídrido acético. La escisión selectiva de los grupos ivDde se consiguió con hidrato de hidrazina al 3% en el seno de DMF durante 1 hora. La resina de 2-clorotritilo fue favorecida con respecto a la resina Wang más ampliamente usada, dado que la primera puso de manifiesto que era mucho más resistente a la hidrólisis con hidrazina. Además, la resina de 2. clorotritilo es sumamente sensible a los ácidos y por tanto, a diferencia de la resina Wang, permite el aislamiento de péptidos protegidos. Sin duda, fue necesario realizar la reacción de acoplamiento en fase de solución ya que el acoplamiento del péptido unido a resina al reactante lipídico pegilado preactivado DSPE-PEG-SPA no generó producto alguno de acoplamiento. Por tanto la separación selectiva desde la resina en condiciones moderadas (ácido acético/trifluoroetanol/diclorometano, 1:1:8, 1 hora, temperatura ambiente) proporcionó los péptidos protegidos interiormente.



Acoplamientos en fase de solución fueron conseguidos con éxito total con el péptido que procede de la secuencia 1-16, 1-15 para DSPE-PEG-SPA en le seno de DMSO y base en exceso. Las reacciones fueron apagadas luego mediante la adición de exceso de etanolamina durante 2 horas y liofilización de la solución.

- 5 La purificación por HPLC (semipreparativa, columna C<sub>4</sub> de fase invertida) proporcionó una pureza de entre 50-70% de los conjugados PEG-lípido de los extremos N- y C-terminal cuyas identidades fueron confirmadas por MALDI. Cada secuencia mostraba una variación considerable en la facilidad de la reacción de acoplamiento y, por consiguiente, se ajustaron las condiciones (temperatura, número de equivalentes molares de DSPE-PEG-SPA, tiempo). Para la separación del exceso de DSPE-PEG-SPA del producto deseado, se empleó purificación por HPLC. La separación los productos mono- y di-enlazados antes de las desprotecciones finales de las cadenas laterales, 10 puede conseguirse utilizando cromatografía de intercambio iónico. Las desprotecciones subsiguientes de las cadenas laterales de los péptidos y la separación del DSPE-PEG-SPA en exceso, apagado, conducen al aislamiento de los conjugados deseados con una pureza aceptable.

Antígenos pegilados y palmitoilados

#### **Aβ<sub>1-15</sub> (ACI-24)**

H<sub>2</sub>N-Lys-Lys-Asp(OtBu)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Arg(Pbf)-His(Trt)-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Gly-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Val-His(Trt)-His(Trt)-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Lys-Lys-OH

#### **Aβ<sub>1-16</sub> (ACI-01)**

Ac-Lys-Asp(OtBu)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Arg(Pbf)-His(Trt)-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Gly-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Val-His(Trt)-His(Trt)-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Lys-Gly-OH

15

#### **Aβ<sub>1-16(Δ14)</sub> (ACI-02)**

Ac-Lys-Asp(OtBu)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Arg(Pbf)-His(Trt)-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Gly-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Val-His(Trt)-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Lys-Gly-OH

#### **Aβ<sub>22-35</sub> (ACI-11)**

Ac-Lys-Glu(OtBu)-Asp(OtBu)-Val-Gly-Ser(tBu)-Asn(Trt)-Lys(Boc)-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Lys-Gly-OH

#### **Aβ<sub>29-40</sub> (ACI-12)**

Ac-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Lys-Gly-OH

### **EJEMPLO 3. Análisis de estructuras y conformación**

#### **3.1 Análisis de conformación del antígeno reconstituido**

- 20 Para fijar el antígeno del péptido Aβ 1-15 en la superficie del liposoma, se usó un tándem de lisina palmitoilada en cada extremo del péptido, como se ha descrito anteriormente (Nicolau, C. et al., 2002).

- El ácido graso del ácido palmítico contiene 16 átomos de carbono que se ha indicado que posee la longitud apropiada para obtener una inserción estable en la bicapa liposomal. En esta construcción el péptido está prácticamente instalado sobre la superficie del liposoma debido a la longitud del resto de ácido graso de 16 átomos de carbono. En un intento para disponer el péptido antigénico asociado con liposoma-lípido A en una conformación diferente, se ha utilizado otro anclaje/espaciador para reconstituir el péptido Aβ 1-16 (ACI-01) en liposomas, a saber, polietilenglicol (PEG con 77 unidades repetitivas). La influencia del espaciador entre el anclaje liposomal y el péptido Aβ sobre la conformación secundaria de la secuencia amiloide reconstituida en liposomas, se midió por Dicroísmo Circular (Figura 1a). El péptido Aβ1-16 PEGilado aparece en forma de un arrollamiento aleatorio o conformación 25 proteínica sin estructurar (señal negativa en 210 nm, y que se aproxima lentamente al eje del cero hasta 260 nm) mientras que el péptido Aβ1-15 palmitoilado contiene una proporción importante de conformación β-laminar (señal positiva hasta 210 nm, cruzando luego el eje del cero y aproximándose de nuevo hasta 260 nm). Parece, por consiguiente, que la estrecha proximidad del péptido palmitoilado a la superficie del liposoma puede imponer una conformación secundaria definida. Esto es debido, potencialmente, a interacciones electrostáticas del péptido con la 30 superficie del liposoma, lo que, aparentemente, no es posible que ocurra con el péptido PEGilado.

### 3.2 Análisis de la estructura del péptido $\beta$ -amiloide 1-15 palmitoilado reconstituido en liposomas.

Para analizar la influencia de diferentes moléculas de engarce sobre la conformación del péptido  $\beta$ -amiloide 1-15 reconstituido en liposomas, se llevó a cabo un análisis de NMR (Figuras 1b y 1c). En este análisis se emplearon ácido palmítico y polietilenglicol, (PEG con  $n=77$ ), respectivamente, como la molécula de engarce o anclaje al liposoma.

Para los estudios de NMR muestras que incluían el péptido amiloide 1-15 palmitoilado (ACI-24) y péptidos antigénicos  $A\beta_{1-15}$  pegilados (ACI-01), reconstituidos en liposomas, se homogeneizaron por agitación con formación de vórtice, se aumentó la concentración de la solución por centrifugación (3000 rpm durante 3\*90 minutos a 4°C) y los aglomerados húmedos resultantes fueron transferidos a rotores MAS. Se prepararon muestras adicionales suspendiendo las preparaciones de los péptidos ACI-01 y ACI-24 en una concentración 1 mM en solución tampón PBS a pH 7,2, así como en una solución 4 mM en el mismo tampón, de la secuencia peptídica sin engarce. Se añadió a cada muestra  $D_2O$  al 10%.

Se registraron los espectros NMR  $^1H$  HR-MAS en un espectrómetro Bruker Avance 500 que operaba en una frecuencia de 500,13 MHz (11,4T) provisto de una sonda HR-MAS de 4 mm de triple resonancia ( $^1H/^{13}C/^2H$ ). Cada muestra se introdujo en rotores de  $ZrO_2$  de 4 mm provistos de inserciones cilíndricas de 50  $\mu l$ . Para todos los experimentos de NMR las muestras fueron hechas girar en una frecuencia igual a la anchura espectral (6250Hz) lo que elimina del espectro las bandas secundarias que giran. Los espectros NMR del protón monodimensionales fueron obtenidos con presaturación y con la secuencia Watergate, ambas (Piotto, M. et al., (1992); Piotto, M., et al., (2005)) y acumulando 1000-1500 escáneres. La temperatura del aire de transporte que fluía hacia la sonda, se fijó en 295K para asegurar 298K en la muestra.

Las Figuras 1b y 1c demuestran las diferencias en los espectros NMR monodimensionales del péptido  $\beta$ -amiloide palmitoilado y pegilado. Pudieron observarse dos diferencias significativas en 8,00 y 8,25 ppm. Debido al hecho de que ambos péptidos poseen exactamente la misma secuencia de aminoácidos, con excepción de la Lisina 16<sup>a</sup>, estas diferencias en 8,00 y 8,25 ppm indican diferencias de la estructura secundaria debido a que la Lisina no podría dar una señal positiva en esta zona de los espectros de restos de aminoácidos aromáticos.

Pudo demostrarse mediante los espectros de NMR del protón monodimensionales en la zona de restos de aminoácidos aromáticos, que el diseño específico de la construcción supramolecular según la presente invención da por resultado un péptido antigénico amiloide con una estructura secundaria altamente específica y significativa cuando está reconstituido en liposomas, que difiere con diferentes moléculas de engarce. Esto podía significar que el engarce/ancla fuerza y fija el péptido en una estructura secundaria cierta o definida que depende de la molécula de engarce empleada. En el caso de utilizar estas moléculas como vacuna para una inmunización activa, es probable que los anticuerpos generados contra estos antígenos estructuralmente diferentes, puedan ser específicos del antígeno y de la conformación.

Resultados previos obtenidos mediante el ensayo ELISA y ORT (tarea de reconocimiento de objetos, un ensayo de la memoria cognitiva) después de inmunización de ratones APP x PS-1 con antígeno del péptido  $A\beta_{1-15}$  palmitoilado y del péptido  $A\beta_{1-16}$  pegilado (véase el Ejemplo que figura más adelante), indican que solamente el antígeno palmitoilado restaura el deterioro de la memoria en este modelo de Enfermedad de Alzheimer, aunque ambos demuestran la misma inmunogenicidad. El mecanismo potencial mediante el cual dos antígenos que presentan el mismo péptido generan *in vivo* dos anticuerpos funcionales diferentes, está ligado, lo más probablemente, a la diferente estructura secundaria del péptido presentado, ocasionada por la tecnología del engarce.

#### EJEMPLO 4: Cuantificación de péptido reconstituido orientado al exterior y al interior

La cantidad de péptido reconstituido en ACI-01 y ACI-24 se estableció mediante un ensayo basado en fluorescamina (FLA) que reacciona específicamente con las aminas primarias formando aductos covalentes altamente fluorescentes (Udenfried, S. et al, 1972). Es de esperar la reacción de FLA con el extremo N-terminal del péptido Pal1-15 en ACI-24 y con Lys-16 en ACI-01.

Con objeto de separar los péptidos libres de los existentes en los liposomas, se sometieron muestras a ultracentrifugación y se analizaron los sobrenadantes que resultaron para determinar el contenido de péptidos utilizando el ensayo de FLA. No se detectaron péptidos libres ni en el sobrenadante de ACI-01 ni en el de ACI-24.

La marcación con FLA de las fracciones de los agregados, puso de manifiesto muy alta selectividad de reacción con el péptido fijado en los liposomas, tanto para el ACI-24 como para el ACI-01. Con objeto de determinar la cantidad total de péptido presente sobre las superficies de los liposomas, se repitieron los ensayos en presencia de TritonX-100 (al 2% en PBS) para deshacer las capas lipídicas. Esto dió por resultado un aumento importante de la marcación, lo que reveló que aproximadamente el 63% del péptido está expuesto sobre la superficie externa de la membrana. Por otra parte, la marcación de ACI-01 con FLA alcanza solamente una meseta en 1,2 mM de FLA, en cuya concentración la emisión es idéntica cuando el ensayo se realiza o bien en ausencia o bien en presencia de Triton-X-100. Esto demuestra que todo el péptido está expuesto sobre la superficie del ACI-01 pegilado de la vacuna.

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

Se prepararon antígenos liposomales según se ha descrito (Nicolau et al., 2002). Los antígenos  $A\beta_{1-16(\Delta 14)}$  y  $A\beta_{4-11}$  pegilados y el  $A\beta_{1-15}$  palmitoilado, fueron reconstituidos en una construcción que consistía en liposomas obtenidos con dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPEA), dimiristoilfosfatidilglicerina (DMPG) y colesterol (razones molares 0,9: 0,1: 0,1: 0,7), que contenía lípido A monofosforilado (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) y fosfolípidos, 40 mg/mM.

Los antígenos de los péptidos  $A\beta_{1-16(\Delta 14)}$ , y  $A\beta_{4-11}$  pegilados y del péptido  $A\beta_{1-15}$  palmitoilado, se emplearon para inmunizar ratones C57BL/6 con intervalos de 2 semanas. 10-12 animales fueron inmunizados con cada antígeno. Se recogieron sueros 5 días después de las dosis de refuerzo y se realizaron ensayos ELISA con diluciones diversas de los sueros. Se presentan resultados comparativos que indican la inmunogenicidad de los diferentes antígenos.

Los resultados obtenidos en los ensayos ELISA indicaron que el PEG- $A\beta_{1-16(\Delta 14)}$  es significativamente más inmunógeno que el  $A\beta_{1-15}$  palmitoilado. Una adición de alumbre no intensificó la inmunogenicidad del PEG- $A\beta_{1-16(\Delta 14)}$  en los ratones. La respuesta de anticuerpos inducida por PEG- $A\beta_{4-11}$  fue más lenta en comparación con la del PEG- $A\beta_{1-16(\Delta 14)}$ .

Debido al interrogante de la traducción de la respuesta inmunitaria más rápida en una mayor capacidad de memoria, el antígeno pegilado se comparó con el antígeno palmitoilado en un modelo doble de Enfermedad de Alzheimer en ratones transgénicos.

Puede utilizarse un modelo alternativo como se describe en el documento US6843942 y en la patente europea EP1337322.

**EJEMPLO 6: Comparación de la inmunogenicidad de antígenos pegilados frente a antígenos palmitoilados en un modelo de Enfermedad de Alzheimer en ratones (ELISA)**

6.1 Para estudios de inmunización *in vivo* ratones APP717 C57BL/6 x PS1 A246E FVB (ratones APPxPS1) fueron estabulados individualmente, distribuidos al azar al doble ciego, igualados por edad y tipificados de genotipo por PCR.

Se utilizaron ratones hembra jóvenes (3-4 meses) de una raza de ratones transgénicos doble que expresa la Proteína Precursora Amiloide humana mutante (APP-V71171) y la presenilina-1 humana mutante (PS1-A246E), ambas bajo el control del promotor del gen *thy1* del ratón y fondo genético F1 (FVB x C57Bl). Se determinó el genotipo de todos los ratones por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la edad de 3 semanas y cada ratón fue marcado únicamente. El genotipo de todos los ratones se determinó dos veces durante su período de vida mediante una segunda PCR realizada al comienzo del estudio y antes de la distribución al azar al ciego en diferentes grupos experimentales. Los ratones tenían libre acceso a agua y a pienso estándar para ratones (Muracon-G, Trouw Nutrition, Gent, Bélgica). Los ratones fueron estabulados bajo un ritmo invertido de día-noche en jaulas metálicas estándar, conforme a la legislación local sobre el bienestar de los animales. 5 días antes del comienzo del ensayo de comportamiento, los ratones fueron colocados en jaulas de macrolón Tipo 2 y transportados al laboratorio de realización del ensayo de comportamiento para aclimatizarlos y habituarlos al medio ambiente del laboratorio de ensayo.

**6.2 Inmunización**

Se emplearon liposomas con lípido A como adyuvante, para preparar la vacuna anti-amiloide (Nicolau et al., 2002). Se mezclaron dimiristoilfosfatidil-colina, -glicerina y colesterol en la relación molar de 0,9:1,0:0,7. Se añadió lípido A monofosforilado, un fuerte inmunomodulador, en una concentración de 40 mg por mmol de fosfolípidos. Los péptidos palmitoilados y pegilados fueron añadidos en una razón molar de péptido a fosfolípidos de 1:100. Se evaporaron los disolventes y la película que resultó se hidrató con PBS estéril (pH 7,3) hasta obtener una concentración final de fosfolípidos de 4 mmol.

Se utilizaron el antígeno palmitoilado (ACI-24,  $A\beta_{1-15}$ ) y el antígeno pegilado (ACI-01,  $A\beta_{1-16}$ ) para la inmunización, en ratones APPxPS-1 con intervalos de 2 semanas (5 inoculaciones i.p. bisemanalmente). En cada grupo experimental, 10 animales fueron inmunizados con cada antígeno mediante inyección intraperitoneal (200  $\mu$ l por inyección, que contenía 8 nmoles de los péptidos). Liposomas vacíos sirvieron como controles (testigo). Se obtuvieron sueros a intervalos regulares (bisemanalmente) y también 5 días después de la repetición de las dosis y se llevó a cabo un ensayo ELISA anti-amiloide con diversas diluciones de los sueros. Se exponen resultados comparativos que ilustran la inmunogenicidad de los diferentes antígenos.

Pudo conseguirse una respuesta inmunitaria importante en los ratones APPxPS-1 inmunizados con antígeno de  $A\beta$  / liposoma palmitoilado así como pegilado, cinco días después de la sexta inoculación de antígeno. Pero en contraste con la respuesta inmunitaria en ratones C57BL/6, sanos el antígeno pegilado no generó en el modelo de enfermedad un título de anticuerpos mayor que el del antígeno palmitoilado.

La respuesta inmunitaria de IgG específica anti A $\beta$ , aumentó más rápidamente con ACI-24 alcanzando un máximo después de 5 semanas. Ambas vacunas indujeron clases e isotipos de inmunoglobulinas significativamente diferentes, resultando con el antígeno ACI-24 palmitoilado títulos de IgG más altos, en oposición al ACI-01 PEGilado que generó más anticuerpos de la clase IgM. Las muestras finales de sangre procedentes de todos los animales fueron analizadas también para determinar su isotipo de IgG. (Figura 2).

Los anticuerpos IgG e IgM, específicos de A $\beta$ <sub>1-42</sub>, fueron identificados por ELISA. Se revistieron placas con 10  $\mu$ g/ml de Amiloide  $\beta$ <sub>1-42</sub> durante la noche, a 4°C. Después de lavar cada pocillo con Tween 20 al 0,05% en el seno de PBS y bloquear con BSA al 1%, se añadió a las placas diluciones en serie de los sueros y se incubó a 37°C durante 2 horas. Después de lavar, se incubaron las placas con una Ig anti-ratón conjugada a fosfatasa (IgG, anticuerpo total, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) o anticuerpos específicos de los isotipos (IgM, IgG1, IgG2a e IgG3, adquiridos de Pharmingen BD, San Diego, CA, EE.UU. e Ig2b de Zymed Laboratories, San Francisco, CA), durante 2 horas a 37°C. Después del lavado final, las placas fueron incubadas con PNPP (para-nitrofenil-fosfato), el sustrato de fosfatasa, y leídas a 405 nm usando un lector de placas de ensayos ELISA. Los resultados se expresaron por referencia a diluciones en serie de una combinación titulada de suero procedente de ratones adultos inmunizados o de diluciones en serie de un anticuerpo del que se dispone en el comercio (6E10, Chemicon International, Temecula, CA, EE.UU.). Alternativamente, los resultados se expresaron como densidades ópticas (D.O.) en una dilución en la que no había sueros al nivel de saturación (Tabla 1)

Tabla 1

	IgG1 Control	ACI-01	ACI-24	IgG2a Control	ACI-01	ACI-24	IgG2b Control	ACI-01	ACI-24	IgG3 Control	ACI-01	ACI-24
Media	0,1	0,11	1,33	0,15	0,22	0,55	0,59	1,81	2,88	0,1	0,63	2,05
D. T.*	0,01	0,02	0,98	0,03	0,03	0,77	0,12	1,23	0,82	0,00	0,22	0,39

\*Desviación Típica

ACI-24 dio por resultado, principalmente, el isotipo IgG1 e IgG2b, ambos subtipos de Th2 predominantemente no inflamatorios. y también IgG3, que es una subclase de IgG independiente de células T. Con excepción de un animal vacunado con ACI-24, ambas vacunas indujeron solamente niveles muy bajos de IgG2a (Th1).

Se llevó a cabo el mapeo de epítomos de los anticuerpos resultantes mediante ensayo ELISA usando una colección de péptidos que comprendía un total de 33 péptidos biotinilados, que cubre la secuencia completa de aminoácidos de A $\beta$ <sub>1-42</sub>, al tiempo que un péptido  $\beta$  biotinilado, completo, servía de control positivo. La inmunización con ambas vacunas, ACI-01 y ACI-24, dio como resultado anticuerpos anti-A $\beta$  con los mismos epítomos definidos por los aminoácidos 1-9 de A $\beta$  (péptido 1). Además, se analizó la eventual dependencia conformacional midiendo la unión específica de los antisueros anti-A $\beta$  resultantes, a A $\beta$  polimérico, por adaptación del ensayo ELISA sobre fibras de A $\beta$ <sub>1-42</sub>. La inmunización con ACI-24 generó títulos de anticuerpos anti-A $\beta$  significativamente más altos, reconociendo fibras de A $\beta$ <sub>1-42</sub>, que los antisueros producidos por ratones inmunizados con ACI-01 (Tabla 2). De los resultados obtenidos se deduce que la inmunización con ACI-01 y ACI-24 producía respuestas inmunitarias que diferían no solamente en su título, las subclases y los isotipos de Ig, sino también en su especificidad conformacional.

Tabla 2

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

#### **EJEMPLO 7: Comparación de antígenos pegilados frente a antígenos palmitoilados en capacidad de reconocimiento en un modelo en ratón de Enfermedad de Alzheimer (ORT)**

##### 7.1 Impacto sobre la mejoría de la capacidad de memoria no espacial, dependiente del hipocampo, en el modelo de ratón de Enfermedad de Alzheimer APPxPS1.

Para analizar el impacto sobre la mejoría de la capacidad de memoria no espacial, dependiente del hipocampo, en el modelo de ratón de Enfermedad de Alzheimer APP x PS1 a lo largo de un tiempo de inmunización de 3 meses, mediante vacunación activa anti-A $\beta$ <sub>1-16/1-15</sub> utilizando el antígeno palmitoilado (ACI-24, A $\beta$ <sub>1-15</sub>) y el antígeno pegilado (ACI-01, A $\beta$ <sub>1-16</sub>), se llevó a cabo un ensayo de reconocimiento de objetos (ORT) esencialmente como se ha descrito (Tang et al., 1999; Rampon et al., 2000). El análisis estadístico se efectuó empleando el Ensayo de comparación múltiple de Turkey-Kramer ANOVA como se ha descrito (Moechars, D. et al., (1999)). Este ensayo se realizó empleando GraphPad InStat versión 3.06 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California, EE.UU., [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com).

Brevemente, se instaló un plan de inmunización de tres meses, de seis inoculaciones bisemanalmente con ACI-01 y ACI-24. Un grupo de ratones recibió liposomas vacíos como control (testigo). Los ratones fueron habituados durante 1 hora a una caja de Plexiglas de campo abierto (52 x 52 x 40 cm) con paredes verticales negras y un piso translúcido iluminado débilmente por una lámpara colocada por debajo de la caja. El día siguiente los animales fueron colocados en la misma caja y sometidos a un ensayo de adquisición de 10 minutos. Durante este ensayo los ratones fueron colocados individualmente en el campo abierto en presencia del objeto A (bola o dado) y se midió el tiempo invertido en la exploración del objeto A (cuando el hocico del animal estaba dirigido hacia el objeto a una distancia < 1 cm). Durante un ensayo de retención de 10 minutos (segundo ensayo), que se efectuó 3 horas más tarde, un nuevo objeto (objeto B: bola o dado) se colocó junto con el objeto familiar (objeto A) en el campo abierto. Se registró el tiempo (tA y tB) que el animal invirtió en explorar los dos objetos. El índice de reconocimiento (RI), definido como la razón del tiempo invertido explorando el nuevo objeto con respecto al tiempo invertido explorando ambos objetos  $[(tB/(tA + tB)) \times 100]$ , se usó para medir la memoria no espacial. El análisis estadístico se efectuó usando factor único de ANOVA como se ha descrito ((Moechars et al., 1999; Moechaars et al., 1996)).

El antígeno palmitoilado (ACI-24) y el pegilado (ACI-01) se emplearon para inmunizar ratones APPxPS-1 con intervalos de 2 semanas. 10 animales de tres meses de edad fueron inmunizados por vía i.p. con cada antígeno (200 µl por cada inyección i.p. y 100 µg de péptido) sirviendo de control liposomas vacíos. Se recogieron sueros 5 días después de administrar las dosis de refuerzo y se llevaron a cabo ensayos ELISA con diversas diluciones de los sueros. Resultados comparativos ilustran la inmunogenicidad de los diferentes antígenos.

La capacidad cognitiva de ratones transgénicos APPxPS-1 inmunizados con antígenos Aβ, palmitoilado (ACI-24) y pegilado ACI-01, se apreció en un paradigma de memoria de reconocimiento visual, no espacial, sometiéndolos a una tarea de reconocimiento de objetos que se sabe que depende de la actividad del hipocampo ((Tang et al., 1999), (Rampon et al., 2000)). Básicamente, tres horas después de entrenarlos para que todos los ratones se familiarizaran con un objeto determinado, fueron sometidos a ensayo para determinar la retención enfrentándolos con un objeto nuevo, próximo al objeto familiar y además de éste.

La retención de la capacidad de la memoria cognitiva de ratones APPxPS-1 pudo aumentarse de modo importante por inmunización con el antígeno Aβ<sub>1-15</sub> palmitoilado (ACI-24) comparada con la de ratones APP x PS-1 tratados con el control ( $76,1 \pm 3,9\%$  frente a  $49,1 \pm 4,5\%$  para el control; Tabla 3). Esto comprueba que los ratones inmunizados con ACI-24 reconocían y recordaban el objeto original durante 3 horas por lo menos, deduciendo por ello que su motivación y su capacidad de exploración estaban intactas, similares a las de ratones sanos de la misma edad, género y raza, en comparación con ratones de tipo salvaje, no transgénicos, sanos, sin tratar ( $61,8 \pm 5,1\%$ ). Aun cuando el péptido ACI-01 es solo un aminoácido más largo en el extremo C-terminal (la Lisina 16<sup>a</sup>) que el péptido ACI-24 y solamente es diferente entre esas vacunas la tecnología de engarce, la inmunización con el antígeno de Aβ<sub>1-16</sub> pegilado (ACI-01) no demuestra restauración alguna de la memoria ( $45,8 \pm 6,2\%$ ) comparable a la de ACI-24.

Tabla 3

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

n.s<sup>^</sup> : no significativo

## 7.2 Contribución potencial de las clases diferentes de anticuerpos, IgM e IgG, a la funcionalidad cognitiva

Para analizar la contribución potencial a la funcionalidad cognitiva de las clases diferentes de anticuerpos IgM e IgG, se llevó a cabo un análisis de correlación.

Los anticuerpos de IgM no se correlacionaron con la capacidad de la memoria ( $r^2=0,2333$ ) pero los anticuerpos resultantes de la clase de IgG se correlacionaron toscamente ( $r^2=0,857$ ) con el grado de capacidad de la memoria (índice ORT), en dos fases. Entre un índice ORT de 0 a 20, se observó una relación más lineal, mientras que en un índice ORT mayor que 20 la correlación entra en una fase de saturación. Esto pudo indicar que los anticuerpos de IgM que no atraviesan la barrera hematoencefálica no contribuían a la restauración de la memoria. Al contrario, los anticuerpos de IgG cruzan la barrera hematoencefálica dependiendo de su subclase y están vinculados a la mejoría de la memoria.

Para evaluar la capacidad de la inmunización con ACI-24 para modificar la cantidad de péptidos amiloides, solubles e insolubles, en el cerebro de los ratones APPxPS-1, se midieron los Aβ<sub>1-40</sub> y Aβ<sub>1-42</sub> humanos mediante ensayo ELISA específico realizado en la fracción soluble de homogeneizados del cerebro. Se emplearon kits de ELISA de que se dispone en el comercio (Amyloid β40 ó β42 ELISA, The Genetics Company, Zurich, Suiza). El ensayo ELISA se llevó a cabo según el protocolo del fabricante. Se obtuvo la cuantificación del contenido de Aβ de las muestras comparando las absorbancias con la curva patrón obtenida con Aβ<sub>1-40</sub> ó Aβ<sub>1-42</sub>, sintéticos (Tabla 4).

Tabla 4

	A $\beta$ soluble	A $\beta$ 42 soluble	A $\beta$ 40 insoluble	A $\beta$ 42 insoluble
Control	2,6 $\pm$ 0,6	3,1 $\pm$ 1,0	3,0 $\pm$ 0,1	3,0 $\pm$ 0,4
ACI-24	2,1 $\pm$ 0,8	2,1 $\pm$ 0,9	2,0 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,07
Estadística ANOVA	n.s	p<0,01	p<0,05	p<0,05

n.s\* no significativo

Los resultados están expresados como media (A $\beta$  ng/g de homogeneizado de cerebro  $\pm$  error típico de la media (SEM))

- 5 La inmunización con ACI-24 condujo a una disminución importante de A $\beta$ 1-42 y A $\beta$ 1-42 insolubles, relacionados con la placa. Los niveles de A $\beta$ 1-42 soluble también se habían reducido significativamente, mientras que los niveles de A $\beta$ 1-40 soluble mostraban solamente tendencia a disminuir.

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

- 10 La seguridad de ambas vacunas liposomales, ACI-01 y ACI-24, se verificó midiendo la producción local de las citoquinas inflamatorias IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  mediante ensayos ELISA específicos. Los niveles de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  se midieron en homogeneizados de cerebro total empleando ELISA en sandwich según los manuales del fabricante (todo R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.). Los resultados se expresan en pg/ml por referencia a diluciones en serie de las citoquinas recombinantes. La extensión de las células microgliales activadas (MHCII) y de la astrogliosis (GFAP) del cerebro en esta región del subículo, se determinó por inmunquímica
- 15 cuantitativa.

La inmunización con ACI-01 o con ACI-24 no aumentó significativamente los niveles de IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en el cerebro. De modo semejante, no se observaron diferencias de astrogliosis por inmunización con ACI-24, mientras que la extensión de las células microgliales activadas indicó tendencia a disminuir después de un período de inmunización de tres meses.

#### 20 EJEMPLO 9: Fabricación de mAbs.

- Se usó un antígeno palmitoilado (ACI-24, A $\beta$ 1-15) para inmunizar ratones C57BL/6 con intervalos de 2 semanas. 10-12 animales fueron inmunizados con cada antígeno (volumen de inyección: 200  $\mu$ l que contenían 8 nmoles de péptido). La última inyección se efectuó 4 días antes de sacrificar a los animales. Después de 5 dosis de refuerzo se seleccionaron ratones con títulos terapéuticos para realizar una fusión (cuando una dilución 1:5.000 de los sueros era positiva en el ensayo ELISA). Se recolectaron células de bazo de los animales inmunizados y se generaron
- 25 hibridomas fusionando células de bazo sensibilizadas, con una línea celular de mieloma. La fusión de los linfocitos B de los ratones procedentes de los bazos, se llevó a cabo con células de la línea celular de mieloma SP2-0 (ATCC, Manassas, VA) empleando los procedimientos bien conocidos de Kohler y Milstein (Nature 256:495-497 (1975)) y Harlow y Lane (Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1988)).

- 30 Las células son inducidas a fusionarse mediante la adición de polietilenglicol. Las células híbridas que resultan son clonadas luego del modo convencional, p.ej. usando dilución limitante. Se seleccionaron clones de hibridoma productores de IgG, se ensayaron para determinar su capacidad específica de unión al péptido A $\beta$ 1-42 por ELISA y se cultivaron los clones resultantes que producen los anticuerpos monoclonales deseados.

- 35 Los hibridomas obtenidos de este modo se seleccionan químicamente cultivando las células en placas en un medio de selección que contenía hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT)

Seguidamente se seleccionan los hibridomas por su aptitud para producir anticuerpos monoclonales contra enfermedades o patologías específicas asociadas a amiloides. Los hibridomas que producen los anticuerpos de interés son clonados, expandidos y mantenidos congelados para producciones futuras. El hibridoma preferido produce un anticuerpo monoclonal que posee el isotipo IgG, más preferiblemente el isotipo IgG2.

#### 40 EJEMPLO 10: Determinación de la especificidad del anticuerpo mACI-24-Ab4

- Para analizar la especificidad del anticuerpo ACI-24-Ab4, concentraciones diferentes de fibrillas de Amiloide 1-42, 1-40 y 1-38, previamente formadas, fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa Hybond ECL (Amersham Biosciences). Después de bloquear con leche desecada al 10% y Tween 20 al 0,7%, se incubaron las membranas con anticuerpo primario a 20  $\mu$ g/ml, durante 2 horas, a temperatura ambiente. Después de lavar, se incubaron las
- 45 membranas con anticuerpo de oveja anti-IgG de ratón (Amersham Biosciences) conjugado con peroxidasa del rábano picante, durante 1 hora, a temperatura ambiente, se lavaron y se incubó con solución quimiluminiscente seguido de exposición de la membrana a película de rayos X.

Para medir la unión del mAb (mACI-24-Ab4) a fibras de Amiloide  $\beta$  1-42, se formaron previamente fibras de  $A\beta$  1-42, 1-40 y 1-38 durante siete días a 37°C e hibridaron en la membrana. Se usó 20  $\mu$ g/ml de anticuerpo para medir la capacidad de unión y se detectó el anticuerpo unido mediante anticuerpo de oveja anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa del rábano picante, durante 20 minutos de exposición.

- 5 Como pudo demostrarse por análisis de hibridación puntual, el anticuerpo mACI-24-Ab4 se une a diferentes fibras de  $A\beta$  formadas previamente, con diferentes sensibilidades. El anticuerpo manifiesta la máxima sensibilidad de unión para las fibras de  $A\beta_{1-42}$  en vez de para las de  $A\beta_{1-40}$  o  $A\beta_{1-38}$ . Es posible detectar al menos 0,001  $\mu$ g de fibras de  $A\beta_{1-42}$  mientras que el límite de detección del anticuerpo para las fibras de  $A\beta_{1-40}$  es al menos 0,1  $\mu$ g y para las fibras de  $A\beta_{1-38}$  1  $\mu$ g, lo que significa que la sensibilidad es 100 veces a 1000 veces menor para estos tipos de fibras amiloides. Estos resultados demuestran que el anticuerpo ACI-24-Ab4 es al menos 100 veces más sensible para la forma amiloide (1-42) que se sabe llega a hacerse insoluble por cambio de conformación secundaria y que constituye la parte principal de las placas amiloides existentes en los cerebros de pacientes de Enfermedad de Alzheimer.

#### **EJEMPLO 11: Fraccionamiento por ultracentrifugación en gradiente de densidad**

- 15 Las propiedades de anticuerpos monoclonales para inhibir la polimerización de fibras de  $A\beta_{1-42}$  y la desagregación de fibras de  $A\beta_{1-42}$  fueron estudiadas por ultracentrifugación en gradiente de densidad (Rzepecki et al., 2004), que se basa en el principio de distribución entre fibras de péptidos que resultan de tamaños diferentes después de incubación con o sin anticuerpos, seguido de un análisis de sedimentación por SDS-PAGE sobre un gradiente previamente formado (OptiPrep™). El análisis simultáneo de la población de fibras de  $A\beta$  previamente formadas, desagregación e inhibición de propiedades de agregación de los anticuerpos incubados conjuntamente, y la unión de los anticuerpos a las fibras, son ventajas obvias de estos métodos.

Los anticuerpos monoclonales generados contra  $A\beta_{1-15}$  (mACI-24-Ab4) fueron analizados todos en ensayos de desagregación y de inhibición.

- 25 Para la inhibición de agregación de  $A\beta_{1-42}$ , se incubaron monómeros de  $A\beta_{1-42}$  con mAbs en dos razones molares diferentes (razón molar de monómero  $A\beta_{1-42}$  treinta o cien veces mayor que Mab) con la concentración final de  $A\beta$  de 50  $\mu$ M. Después de 24 horas de incubación a 37°C, las muestras fueron superpuestas sobre un gradiente discontinuo de Optiprep™ y se centrifugaron los tubos a 259.000 g durante 3 horas a 4°C- Se recogieron 15 fracciones (140  $\mu$ l cada una). La fracción 1 era la fracción menos densa desde la parte más alta del gradiente y la fracción 15 es la fracción más densa desde la parte más baja del gradiente. También se tomó el glóbulo de agregado. Las fracciones recogidas fueron analizadas por SDS-PAGE con tinción con plata. La concentración de  $A\beta_{1-42}$  para los ensayos de inhibición era cinco veces menor que para los ensayos de desagregación que disminuyen la cinética de agregación de amiloides y aseguran una medida dentro de la fase lineal.

- 35 Sin adición de mAb, el péptido  $A\beta$  se había agregado después de 24 horas de tiempo de incubación y la mayor parte de la proteína se encontraba en las fracciones 13 a glóbulo de agregado (agregado, muy pequeño en 12), lo que demuestra polimerización completa de los monómeros de péptidos  $A\beta$ . Una inhibición de la agregación, exitosa e importante, daría por resultado fibras u oligómeros de menor tamaño que los que podrían encontrarse en fracciones de menor densidad. En el ensayo de agregación el anticuerpo mACI-24-Ab4 ocasionó un desplazamiento de bandas para la mayoría (banda más fuerte) desde 13 a 11 y 12 y una solubilización importante de las bandas que iba desde la fracción 13 hasta el glóbulo de agregado. Esto significa que el mACI-24-Ab4 manifiesta una fuerte capacidad para inhibir la polimerización de monómeros de péptidos  $A\beta$  en fibras, y reveló una unión específica a las fibras de  $A\beta$  (en las fracciones 11 y 12).

- 45 Para la desagregación de fibrillas de  $A\beta_{1-42}$  previamente formadas, por incubación conjunta con MAb (en dos razones molares diferentes, 1:30 y 1:110, Mab + Monómero  $A\beta_{1-42}$  con la concentración final de  $A\beta$  de 246  $\mu$ M), se incubaron las muestras durante 24 horas a 37°C. Después de 24 horas, las muestras fueron fraccionadas por ultracentrifugación y separadas por SDS-PAGE como se describe en esta memoria y se ha descrito anteriormente (Rzepecki et al., 2004).

- 50 De modo semejante al del ensayo de agregación, pudo demostrarse polimerización completa de fibras por la distribución de fibrillas de  $A\beta_{1-42}$  solas en las fracciones 12 a P (glóbulo de agregado). En este caso, el desplazamiento de fibras hacia fracciones de menor densidad indicaría actividad de desagregación del anticuerpo, cuando se incubó conjuntamente con fibras previamente formadas. La adición de mACI-24-Ab4 en la razón molar de 1:100 mostró un desplazamiento de la mayoría de las fibras amiloides desde 12 a 11. Por tanto el anticuerpo mACI-24-Ab4 pone de manifiesto, asimismo, una fuerte actividad de desagregación.

- EJEMPLO 12: Aplicación combinada de un antígeno palmitoilado y un inhibidor de la activación del complemento en un ensayo de retención de la capacidad de reconocimiento (ORT) en un modelo en ratón de Enfermedad de Alzheimer .**

Con objeto de evitar efectos secundarios potenciales tales como complicaciones neurológicas causadas por una estimulación adicional por la vacunación, de un sistema de complemento ya sobreactivado, el antígeno palmitoilado (ACI-24, A $\beta_{1-15}$ ) se administra en combinación con un inhibidor de complemento seleccionado del grupo que consiste en TP10 (Receptor 1 de complemento humano soluble). Eculizumab (anti-proteína C5 humana de complemento) ,  
 5 Pexelizumab (anti-complemento de C5), inhibidor de C1-esterasa natural Cetor<sup>®</sup> ("C1-esterasehemmer-N") e Inhibidor de C1 humana natural

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

10 En un esquema de aplicación en el que el inhibidor de complemento se administra antes de la vacunación con el antígeno palmitoilado (ACI-24, A $\beta_{1-15}$ ), el compuesto inhibidor se administra dentro de un período de tiempo que comienza hasta 20 horas antes de la vacunación y finaliza inmediatamente antes de la vacunación (Esquema de aplicación 1)

15 En un esquema de aplicación en el que el inhibidor de complemento se administra después de la vacunación con el antígeno palmitoilado (ACI-24, A $\beta_{1-15}$ ), el compuesto inhibidor se administra dentro de un período de tiempo que comienza inmediatamente después de la vacunación y finaliza 1 día después después de aplicación de la vacuna (Esquema de aplicación 2)

#### 12.1 TP10 (Receptor 1 de complemento humano soluble)

20 En ensayos humanos con TP-10 se encontró que es preferible mantener la concentración de TP10 en un intervalo situado entre 100  $\mu$ g/ml y 160  $\mu$ g/ml, durante 24 hras después de la unión competitiva de proteínas (CPB). Con objeto de conseguir tal intervalo de concentraciones, lo más apropiado es administrar una dosis inicial de 10 mg/kg durante 0,5 horas, seguida de 10 mg/kg durante 23,5 horas (Li Js, Am Heart J. 2004 Ene; 147 (1):173.80.)

La vacunación con el antígeno palmitoilado (ACI-24, A $\beta_{1-15}$ ) se realiza, o bien después de haber conseguido una concentración deseable de TP10 siguiendo el Esquema de aplicación 1, o, alternatively, antes de administrar la dosis inicial de 10 mg/kg de TP10, según el Esquema de aplicación 2.

#### 25 12.2 Eculizumab (anti-proteína C5 humana de complemento)

Se administra Eculizumab (600 mg) por infusiones todas las semanas durante cuatro semanas, seguida una semana más tarde de una dosis de 900 mg y luego, por dosis adicionales de 900 mg todas las otras semanas hasta la semana 12 (Hillmen P., N. Engl. J. Med. 2004 Feb 5;350(6):552-9).

30 Para tratamientos de larga duración puede administrarse Eculizumab en una dosis de 900 mg cada 12 a 14 días (Hill A., Blood, 2005 Oct 1;106(7):2559-65. Epub 2005 Jun 28.)

La vacunación con el antígeno palmitoilado (ACI-24, A $\beta_{1-15}$ ) se realiza, o bien después de haber sido administrada la primera dosis de 600 mg siguiendo el Esquema de Aplicación 1, o bien, alternatively, antes de que hubiera sido administrada la dosis inicial de 600 mg, según el Esquema de Aplicación 2.

35 En algunos casos puede ser más apropiado utilizar el Esquema de Aplicación 1 solamente después de la semana 4, cuando los 4 primeros ciclos de administración de Eculizumab han finalizado y se ha conseguido en el cuerpo humano una concentración estable en estado estacionario.

#### 12.3 Pexelizumab (anti-complemento de C5)

40 Se administra Pexelizumab por vía intravenosa en forma de un bolo a 2,0 mg/kg durante 10 minutos, cuya administración de bolo puede ir seguida de una infusión de 1,0 mg/kg durante 20 horas (<http://circ.ahajournals.org/cgi/content/full/106/23/2986-a>), o de 0,05 mg/kg/hora durante 24 horas.

La vacunación con el antígeno palmitoilado (ACI-24, A $\beta_{1-15}$ ) se realiza, o bien después de haber sido administrado el primer bolo de 2,0 mg/kg de Pexelizumab, siguiendo el Esquema de Aplicación 1 o, alternatively, antes de administrar el bolo inicial de 2,0 mg/kg de Pexelizumab, según el Esquema de Aplicación 2.

45 En algunos casos puede ser más apropiado utilizar el Esquema de Aplicación 1 sólo después de haber completado la segunda aplicación por infusión y haber conseguido en el cuerpo humano una concentración estable en estado estacionario.

#### 12.4 Inhibidor de C1 humana natural

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



Alternativamente, puede administrarse un concentrado pasteurizado de un inhibidor de C1-esterasa en dosis de entre 5000-1000 UI (De Serres J. Transfus Apher Sci. 2003 Dic;29(3):247-54.); (Bork K., Arch.. Inter Med. 2001 Mar 12; 161(5):714-8)

- 5 El inhibidor de C1 también puede administrarse por vía intravenosa en una infusión de 1 hora, comenzando con 6000 UI, seguido de 3000 UI, 2000 UI y 1000 UI en intervalos de 12 horas (Callezi C., Crit Care Med. 2002 Ago; 30(8):1722-8)

Finalmente, el inhibidor de C1 puede administrarse por vía intravenosa cada tercer día en forma de un concentrado de inhibidor calentado por vapor, en una concentración de 25 unidades de plasma por kilo de peso (Waytes AT. N. Eng. J. Med. 1996 Jun. 20; 334(25):1630-4).

- 10 La vacunación con el antígeno palmitoilado (ACI-24, A $\beta_{1-15}$ ) se efectúa, o bien después de haber administrado el inhibidor de C-1 siguiendo el Esquema de Aplicación 1, o bien, alternativamente, antes de administrar la dosis inicial del inhibidor de C1, según el Esquema de Aplicación 2.

#### 12.5 Inhibidor de C1 natural Cetor® (C1-esterasehemmer-N)

- 15 El inhibidor de C1-esterasa ("C1-esterasehemmer-N") ó Cetor® se administra en una dosis de 1.000 U, 1.500 U o 2.000 U y después se administra en la misma dosis del otro producto.

La vacunación con el antígeno palmitoilado (ACI-24, A $\beta_{1-15}$ ) se realiza, o bien después de administrar la 2ª dosis siguiendo El Esquema de Aplicación 1, o bien, alternativamente, antes de administrar la dosis inicial de 1.000 U, 1.500 U ó 2.000 U del inhibidor de C1-esterasa ("C1-esterasehemmer-N") o Cetor®, según el Esquema de Aplicación 2.

Applicant's or agent's file reference <b>L3018 PCT BS</b>	International application No. New PCT application
--	--

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

(PCT Rule 13bis)

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

For receiving Office use only	
<input checked="" type="checkbox"/> This sheet was received with the international application	
Authorized officer <b>Gorge, Olivier</b>	

For International Bureau use only	
<input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:	
<b>23 dec 2006</b>	
Authorized officer <b>PETER WIMMER</b>	

Form PCT/RQ/134 (July 1998; reprint January 2004)

## Figuras

**Figura 1a:** Diseño y caracterización biofísica de las dos vacunas liposomales que contienen inmunógenos peptídicos con los primeros 15 (ACI-24, A $\beta$ 1-15) y 16 (ACI-01, A $\beta$ 1-16) aminoácidos del péptido amiloide  $\beta$ 1-42 de longitud total. b) ACI-01 contiene A $\beta$ 1-16 flanqueado con un resto de lisina PEGilada sobre cada lado que lleva DSPE, que sirve de anclaje liposomal sobre el otro extremo de la cadena de PEG (a). Para ACI-24 (b), dos restos de lisina palmitoilada terminales estaban enlazados covalentemente en cada extremo de A $\beta$ 1-15 para reconstituir y fijar el antígeno en el liposoma (a). c) espectros de CD de los dos antígenos reconstituídos en liposomas. ACI-01 pone de manifiesto espectros indicativos de conformación proteínica arrollada aleatoriamente o sin estructurar (señal negativa hasta 210 nm que se acerca lentamente al eje del cero hasta 260 nm) mientras que los espectros de ACI-24 contienen una proporción importante de estructura beta (señal positiva hasta 210 nm, que cruza después el eje del cero y se aproxima de nuevo hasta 260 nm). Para análisis de espectros de CD muestras beta-amiloides (ACI-01 y -24) fueron reconstituídas en liposomas y sometidas a sonicación usando un sonicador de sonda, en una concentración de péptido de 0,9865 mg/ml (1 ml en PBS). Los espectros de CD fueron registrados en un Dichrograph (JASCO J-810) con una cubeta de cuarzo de 0,1 cm de longitud de paso óptico. La ventana espectral era de 190-260 nm, a una velocidad de barrido de 20 nm/min a 25°C y los resultados obtenidos, sin tratar, fueron expresados en elipticidad en unidad  $\theta$  (mdeg)

**Figura 1b:** La región del espectro del protón, que incluye los protones de amidas péptidicas y las cadenas laterales aromáticas de los espectros NMR de resonancia de espín, de ángulo mágico, de A. la vacuna de ACI-01, B. la vacuna de ACI-24. C. ACI-01 1 mM, D. ACI-24 1 mM y E. péptido A $\beta$ 1-15 4 mM en solución tampón de PBS, pH 7,2

**Figura 1c:** Espectros NMR del protón, monodimensionales, desde 9 a 5,5 ppm del péptido beta-amiloide 1-15 pegilado (negro) y palmitoilado (azul). Los péptidos fueron sintetizados, enlazados covalentemente a ácido palmítico o a PEG, respectivamente, y reconstituídos en PBS. Para el análisis de NMR las muestras fueron centrifugadas y se registró un espectro total desde 9 a 0,2 ppm.

**Figura 2:** Análisis de títulos específicos de amiloides de los sueros de ratones APPxPS1 inmunizados con antígeno PEGilado (ACI-01) o palmitoilado (ACI-24), en liposomas, comparados con los de ratones inmunizados con liposomas vacíos (control). a) la inmunización con ACI-24 generó niveles altos de anticuerpos de IgG específicos de amiloides (a, izquierda) solamente después de dos inmunizaciones y tres semanas después de la primera, y alcanzó un máximo después de 5 semanas, mientras que la inmunización con ACI-01 generó niveles altos de anticuerpos de IgM específicos de amiloides (a, derecha) con un máximo después de 7 semanas, pero solamente niveles bajos de IgG en comparación con ACI-24 (a, izquierda,  $p < 0,5$ )

## Depósito:

Las líneas celulares de hibridomas que siguen han sido depositadas en la "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)" en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, bajo las estipulaciones del Tratado de Budapest.

Designación de la línea de hibridoma	Designación del anticuerpo	Fecha de depósito	Número de registro
EJ7H3	mACI-24-Ab4	8 de Diciembre de 2005	DSM ACC2756

Referencias bibliográficas:

- Alving et al., *Infect. Immun.* 60:2438-2444, 1992
- Bork K, *Arch Intern Med.* 2001 Mar 12;161(5):714-8
- Caliezi C, *Crit Care Med.* 2002 Aug;30(8):1722-8.
- De Serres J, *Transfus Apher Sci.* 2003 Dec;29(3):247-54
- Doorn MB van, , *Allergy Clin Immunol.* 2005 Oct;116(4):876-83. Epub 2005 Aug 8
- Harlow and Lane (Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988)
- FYLAKTAKIDOU, K.C., LEHN, J.-M. GREFERATH, R. NICOLAU, C., "Inositol triphosphate: a new membrane permeant allosteric effector of haemoglobin", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15, 1605-1608, 2005.
- Hodgson et al., *Bio/Technology*, 9:421 (1991)
- Khaw, B. A. et al. *J. Nucl. Med.* 23:1011-1019 (1982)
- Kohler and Milstein (*Nature* 256: 495-497 (1975)
- Moechars,D., Dewachter,I., Lorent,K., Reverse,D., Baekelandt,V., Naidu,A., Tesseur,I., Spittaels,K., Haute,C.V., Checler,F., Godaux,E., Cordell,B. and Van Leuven,F.: 1999, *J. Biol. Chem.* 274, 6483-6492.
- Moechars,D., Lorent,K., De Strooper,B., Dewachter,I., & Van Leuven,F. Expression in brain of amyloid precursor protein mutated in the alpha-secretase site causes disturbed behavior, neuronal degeneration and premature death in transgenic mice. *EMBO J.* 15, 1265-1274 (1998).
- Hill A, *Blood.* 2005 Oct 1;106(7):2559-65. Epub 2005 Jun 28.
- Hillmen P, *N Engl J Med.* 2004 Feb 5;350(6):552-9.
- Li JS, *Am Heart J.* 2004 Jan;147(1):173-80
- Moechars,D., Lorent,K., De Strooper,B., Dewachter,I. and Van Leuven,F.: 1996, *EMBO J.* 15, 1265-1274.
- Nicolau, C., Greferath, R., Balaban, T. S., Lazarte, J. E., and Hopkins, R. J. (2002). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2332-2337.
- Piotto,M., Saudek,V., & Sklenar,V. Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J. Biomol. NMR* 2, 661-665 (1992).
- Piotto,M., Elbayed,K., Wieruszkeski,J.M., & Lippens,G. Practical aspects of shimming a high resolution magic angle spinning probe. *J. Magn Reson.* 173, 84-89 (2005).

Queen et al., Proc. Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032 (1989)  
 Rampon,C., Tang,Y.P., Goodhouse,J., Shimizu,E., Kyin,M. and Tsien,J.Z.: 2000, Nat. Neurosci. 3, 238-244.  
 Rzepecki et al., 2004  
 Rousseaux et al. Methods Enzymology, 121:663-69, Academic Press, 1986  
 Tang,Y.P., Shimizu,E., Dube,G.R., Rampon,C., Kerchner,G.A., Zhuo,M., Liu,G. and Tsien,J.Z.: 1999, Nature 401, 63-69.  
 B Teisseire, C Ropars, M C Villeréal, and C Nicolau, « Long-term physiological effects of enhanced O2 release by inositol hexaphosphate-loaded erythrocytes." Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 October; 84(19): 6894-6898  
 Teisseire B, Ropars C, Villeréal MC, Nicolau C. Long-term physiological effects of enhanced O2 release by inositol hexaphosphate-loaded erythrocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Oct; 84(19) 6894-6898.  
 Udenfriend,S. et al. Fluorescamine: a reagent for assay of amino acids, peptides, proteins, and primary amines in the picomole range. Science 178, 871-872 (1972).  
 Wagner et al (2002) Journal of Liposome Research Vol 12(3), pp 259 – 270  
 Waytes AT, N Engl J Med. 1996 Jun 20; 334(25):1630-4  
 US-P 6843942  
 EPA 1337322

#### LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> AC Immune S.A.
- 5 <120> Vacuna terapéutica
- <130> L3018 PCT
- <150> EP 05027091.7
- 10 <151> 12-12-2005
- <150> EP 060°9098.2
- <151> 02-05-2006
- 15 <160> 6
- <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
- 20 <211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

5 <223> péptido antigénico A $\beta$  1-15

<400> 1

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Glr  
15

10 <210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <220>

<223> péptido antigénico A $\beta$  1-16

<400> 2

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

20

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<220>

<223> péptido antigénico A $\beta$  1-16 ( $\Delta$ 14)

<400> 3

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

30 15

<210> 4

<211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5 <220>  
 <223> péptido antigénico A $\beta$ <sub>4-11</sub>

<400> 4

Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu 8

10

<210> 5  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15

<220>  
 <223> péptido antigénico A $\beta$ <sub>22-35</sub>

<400> 5

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

<210> 6  
 <211> 12  
 <212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> péptido antigénico A $\beta$ <sub>29-40</sub>

30 <400> 6

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

## REIVINDICACIONES

- 1.- Una construcción antigénica que comprende un fragmento de un péptido antigénico A $\beta$  que consiste en una extensión única o repetitiva de entre 13 y 15 restos de aminoácidos contiguos del fragmento N-terminal 1-16 ó 1-17 del péptido A $\beta$ , para uso en el tratamiento de una enfermedad o condición asociada a amiloide, caracterizada por una pérdida de capacidad de memoria cognitiva en un animal o un ser humano, en donde el antígeno del péptido A $\beta$  es (a) formado previamente por síntesis de péptidos automatizada, estándar, en resina, y (b) modificado después por injerto en resina de un resto lipófilo o hidrófobo a los restos de aminoácidos terminales del péptido A $\beta$  formado previamente, y reconstituido en un liposoma, y en donde la administración de dicha construcción antigénica en forma de una composición de vacuna, a un animal o un ser humano aquejado de tal enfermedad o condición, conduce a :
  - 5 a. la generación de anticuerpos del subtipo Th2 no inflamatorio;
  - b. la generación de anticuerpos de la subclase IgG independiente de células T; y
  - 10 c. un aumento de la retención de la capacidad de la memoria cognitiva y/o a una restauración completa de la capacidad de la memoria cognitiva.
- 2.- Una construcción antigénica para uso según la reivindicación 1, que comprende un fragmento de un péptido A $\beta$  que consiste en una extensión única o repetitiva de entre 13 y 15 restos de aminoácidos contiguos de la parte N-terminal del péptido A $\beta$ , seleccionado del grupo que consiste en los restos 1-15, 1-14 y 1-13.
- 3.- Una construcción antigénica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que comprende un fragmento único o repetitivo de un péptido A $\beta$  seleccionado del grupo que consiste en antígeno del péptido A $\beta_{1-15}$  como se indica en SEQ ID NO:1 y A $\beta_{1-16(\Delta 14)}$  como se indica en SEQ ID NO: 3
- 20 4.- Una construcción antigénica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el antígeno del péptido A $\beta$  es presentado fijado o reconstituido en un soporte/adyuvante.
- 5.- Una construcción antigénica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el resto lipófilo o hidrófobo es un ácido graso, un triglicérido o un fosfolípido.
- 6.- Una construcción antigénica para uso según la reivindicación 5, en donde el resto hidrófobo es ácido palmítico.
- 25 7.- Una composición de vacuna que comprende una construcción antigénica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 8.- Una composición de vacuna para uso según la reivindicación 7, que comprende un antígeno del péptido A $\beta_{1-15}$ .
- 9.- Una composición de vacuna para uso según la reivindicación 8, en donde el antígeno del péptido A $\beta_{1-15}$  es presentado reconstituido en un liposoma.
- 30 10.- Una composición de vacuna para uso según la reivindicación 9, en donde la preparación de liposoma contiene un adyuvante y/o un inmunomodulador.
- 11.- Una composición de vacuna para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en donde el antígeno de un péptido  $\beta$ -amiloide es un antígeno del péptido A $\beta_{1-15}$  palmitoilado, modificado por entre 2 y 4 restos palmitoilo enlazados covalentemente, en cada extremo del péptido reconstituido en un liposoma.
- 35 12.- Una composición de vacuna para uso según la reivindicación 11, en donde 2 o más moléculas de antígeno del péptido A $\beta_{1-15}$  palmitoilado, modificadas por restos palmitoilo enlazados covalentemente en cada extremo del péptido, están reconstituidas en un liposoma único.
- 13.- Una composición de vacuna para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, que, por administración a un animal o un ser humano, da por resultado, principalmente, la generación de anticuerpos de subtipos no inflamatorios.
- 40 14.- Una composición de vacuna para uso según la reivindicación 13, en donde dichos anticuerpos son del subtipo Th2 no inflamatorio.
- 15.- Una composición de vacuna para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, que, por administración a un animal o un ser humano, da por resultado, principalmente, la generación de anticuerpos de la subclase IgG independiente de células T.
- 45 16.- Una composición de vacuna para uso según la reivindicación 15, en donde dichos anticuerpos son del isotipo IgG3.
- 17.- Una composición de vacuna para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 16, que, por administración a un animal o un ser humano no conduce a un aumento importante de marcadores de inflamación en el cerebro.
- 50



- 18.- Una composición de vacuna para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 16, que, por administración a un animal o un ser humano conduce a una disminución importante de A $\beta$ 1-40 y A $\beta$ 1-42 insolubles, relacionados con la placa, en el cerebro.
- 5 19.- Una composición de vacuna para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 16, que, por administración a un animal o un ser humano conduce a una reducción importante del nivel de A $\beta$ 1-42 soluble, en el cerebro..
- 10 20.- Una composición de vacuna para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 19, en donde la enfermedad o condición asociada a amiloide es una seleccionada del grupo que consiste en Enfermedad de Alzheimer (AD), deterioro cognitivo leve (MCI), demencia de los cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Dutch), complejo Parkinson-Demencia (Enfermedad de Guam), parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeld Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con HIV, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), diabetes de comienzo en la edad adulta, amiloidosis cardiaca senil, tumores endocrinos y degeneración macular.
- 15 21.- Una composición de vacuna para uso según la reivindicación 20, en donde la enfermedad o condición asociada a amiloide es Enfermedad de Alzheimer.
- 22.- Una composición de vacuna para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 19, que, por administración a un animal o un ser humano, aquejado de una condición asociada a amiloide, caracterizada por pérdida de capacidad de la memoria cognitiva, conduce a un aumento de la retención de la capacidad de la memoria cognitiva y/o a una restauración completa de la capacidad de la memoria cognitiva.
- 20 23.- Un método de producción de una composición de vacuna terapéutica, que comprende emplear una construcción antigénica que comprende un fragmento de un péptido antigénico A $\beta$  para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 25 24.- Un método de producción de una composición de vacuna terapéutica, que comprende emplear una construcción antigénica que comprende un péptido antigénico A $\beta$  según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso en el tratamiento de una enfermedad o condición asociada a amiloide, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el antígeno de un péptido  $\beta$ -amiloide es un antígeno del péptido A $\beta$ 1-15 palmitoilado, modificado por restos de aminoácidos palmitoilados enlazados covalentemente, reconstituido en un liposoma.
- 30 25.- Un método según la reivindicación 24, en donde el antígeno del péptido A $\beta$ 1-15 está modificado por 2 restos de aminoácidos palmitoilados enlazados covalentemente a los extremos N-terminal y C-terminal del péptido, respectivamente.
- 26.- Un método según la reivindicación 24, en donde el antígeno del péptido A $\beta$ 1-15 está modificado por 4 restos de aminoácidos palmitoilados, dos de los cuales están enlazados covalentemente a los extremos N-terminal y C-terminal del péptido, respectivamente.
- 35 27.- Un método según la reivindicación 24, en donde 2 ó más moléculas de antígeno del péptido A $\beta$ 1-15 palmitoilado, modificadas por restos palmitoilo enlazados covalentemente en cada extremo del péptido, están reconstituidas en un único liposoma.
- 40 28.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 27, en donde la enfermedad o condición asociada a amiloide, que incluye patologías neurológicas y enfermedades o condiciones caracterizadas por pérdida de capacidad de la memoria cognitiva, está seleccionada del grupo que consiste en Enfermedad de Alzheimer (AD), deterioro cognitivo leve (MCI), demencia de los cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Dutch), complejo Parkinson-Demencia (Enfermedad de Guam), parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeld Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con HIV, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), diabetes de comienzo en la edad adulta, amiloidosis cardiaca senil, tumores endocrinos y degeneración macular.
- 45 29.- Un método según la reivindicación 28, en donde la enfermedad o condición asociada a amiloide es la Enfermedad de Alzheimer.
- 30.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 27, en donde la condición asociada a amiloide está caracterizada por pérdida de capacidad de la memoria cognitiva de un animal o un ser humano, y en donde el tratamiento de un animal o un ser humano aquejado de tal condición asociada a amiloide, conduce a un aumento de la retención de la capacidad de la memoria cognitiva y/o a una restauración completa de la capacidad de la memoria cognitiva.
- 50 31.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 30, en donde la administración de dicha composición de vacuna da por resultado, principalmente, la generación de anticuerpos de subtipos no inflamatorios
- 32.- Un método según la reivindicación 31, en donde dichos anticuerpos son del subtipo Th2 no inflamatorio

33.- Un método según la reivindicación 31, en donde la administración de dicha composición de vacuna da por resultado, principalmente, la generación de anticuerpos de la subclase IgG independiente de células T

34.- Un método según la reivindicación 33, en donde dichos anticuerpos son del isotipo IgG3.

5 35.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 30, en donde la administración de dicha composición de vacuna no conduce a un aumento importante de marcadores de inflamación en el cerebro.

36.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 30, en donde la administración de dicha composición de vacuna conduce a una disminución importante de A $\beta$ 1-40 y A $\beta$ 1-42 insolubles, relacionados con la placa, en el cerebro.

10 37.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 30, en donde la administración de dicha composición de vacuna conduce a una reducción importante del nivel de A $\beta$ 1-42 soluble, en el cerebro.

38.- Un método de preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada a amiloide, que comprende emplear una composición de vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 22.

15 39.- Un método de producción de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada a amiloide, según la reivindicación 38, que comprende emplear un péptido antigénico inmunógeno, en donde el antígeno de un péptido  $\beta$ -amiloide es un antígeno del péptido A $\beta$ 1-15 palmitoilado, modificado por restos de aminoácidos palmitoilados enlazados covalentemente, reconstituido en un liposoma.

40.- Un anticuerpo o una mezcla de anticuerpos que puede obtenerse de un animal inmunizado con una composición de vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 22.

20 41.- Un anticuerpo según la reivindicación 40, caracterizado por que es un anticuerpo monoclonal o uno de sus derivados.

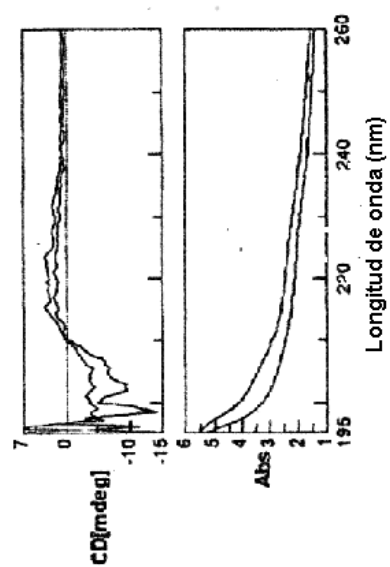


Fig 1 ab

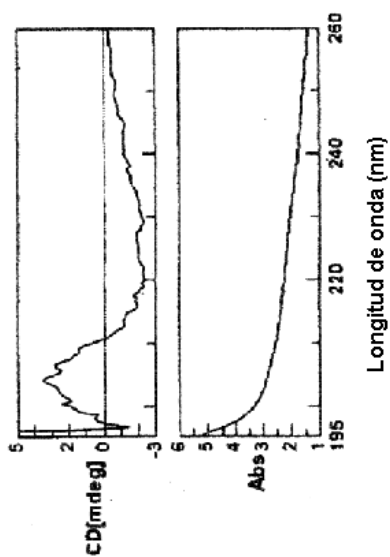
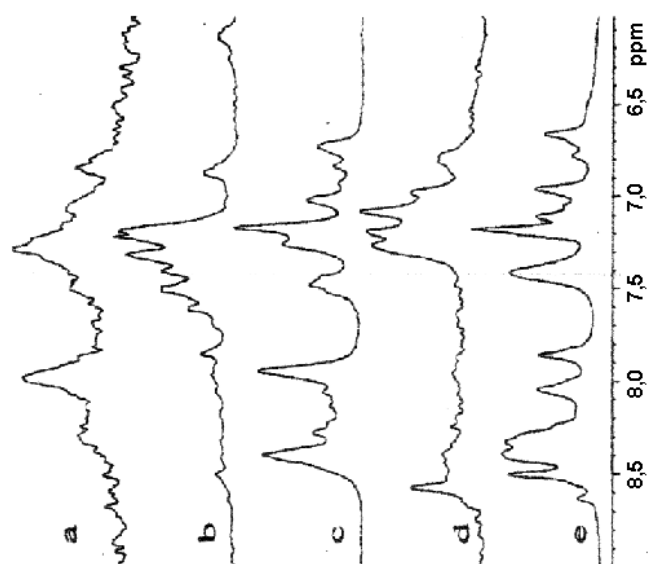
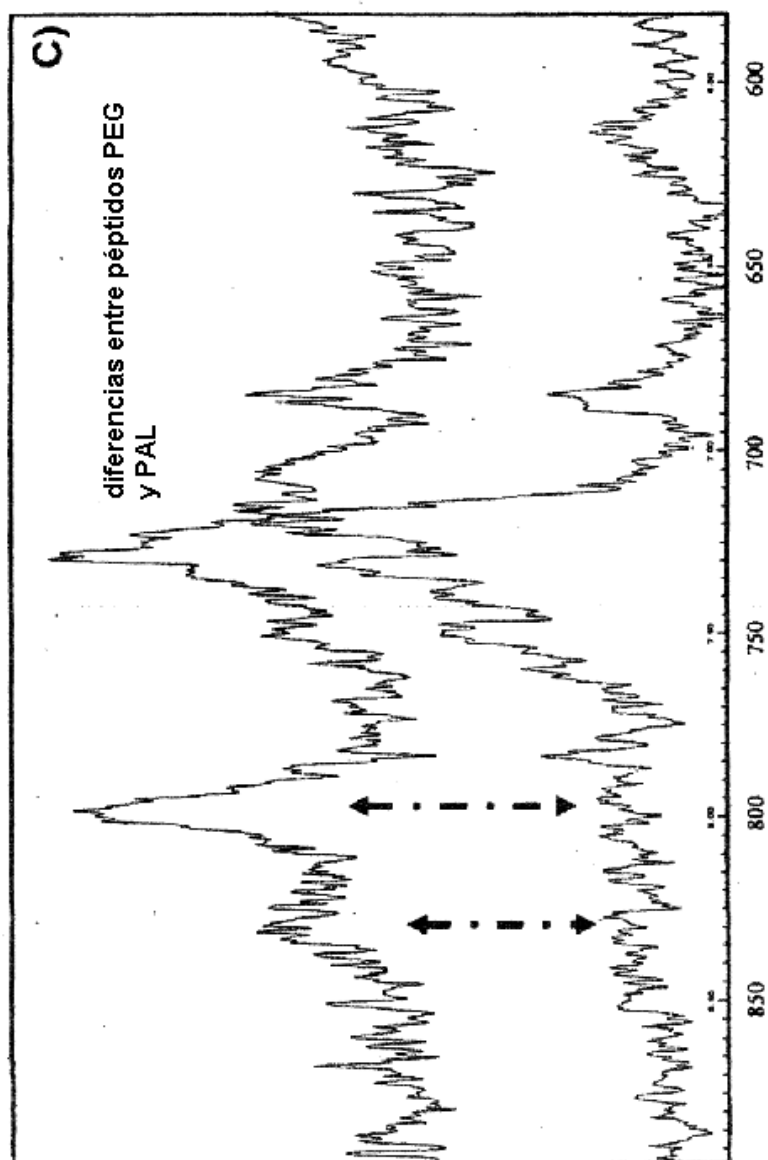


Fig 1 aa



**FIG 1b**



**FIG 1c**

