



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 551 604**

⑮ Int. Cl.:

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

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2006 E 11172818 (4)**

⑰ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.08.2015 EP 2380588**

④ Título: **Vacuna terapéutica**

⑩ Prioridad:

12.12.2005 EP 05027091
02.05.2006 EP 06009098

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.11.2015

⑬ Titular/es:

AC IMMUNE S.A. (100.0%)
EPFL Innovation Park Building B
1015 Lausanne, CH

⑭ Inventor/es:

PFEIFER, ANDREA y
NICOLAU, CLAUDE

⑮ Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 551 604 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 trastornos que son causados por, o asociados con, proteínas amiloïdes o tipo amiloïde, incluyendo amiloidosis, un grupo de trastornos y anomalías asociadas con la proteína amiloïde tal como la enfermedad de Alzheimer.
- La amiloidosis no es una sola entidad de enfermedad sino más bien un grupo diverso de procesos de enfermedad progresivos caracterizados por depósitos en el tejido extracelular de una proteína cerosa, tipo almidón, denominada amiloïde, que se acumula en uno o más órganos o sistemas del cuerpo. A medida que se forman los depósitos de amiloïde, estos comienzan a interferir con la función normal del órgano o del sistema del cuerpo. Hay al menos 15 diferentes tipos de amiloidosis. Las formas principales son amiloidosis primaria sin antecedente conocido, amiloidosis secundaria, después de alguna otra condición y amiloidosis hereditaria.
- La amiloidosis secundaria ocurre en personas que tienen una infección crónica o una enfermedad inflamatoria, tal como tuberculosis, una infección bacteriana denominada fiebre mediterránea familiar, infecciones óseas (osteomielitis), artritis reumatoide, inflamación del intestino delgado (ileíte granulomatosa), enfermedad de Hodgkin y lepra.
- Los depósitos de amiloïde contienen típicamente tres componentes. Las fibrillas de proteína amiloïde, que representan aproximadamente el 90% del material amiloïde, comprenden uno de varios tipos diferentes de proteínas. Estas proteínas son capaces de plegarse en así llamadas fibrillas laminares "beta-plegadas", una configuración de proteína única que presenta sitios de unión para el rojo Congo que dan por resultado las propiedades de coloración únicas de la proteína amiloïde. Además, los depósitos de amiloïde están estrechamente asociados con el componente amiloïde P (pentagonal) (AP), una glicoproteína relacionada con el amiloïde sérico normal P (SAP) y con glicosaminoglicanos sulfatados (GAG), carbohidratos complejos de tejido conectivo.
- Muchas enfermedades del envejecimiento se basan en, o están asociadas con, proteínas tipo amiloïde y se caracterizan, en parte, por la formación de depósitos extracelulares de material amiloïde o tipo amiloïde que contribuye a la patogénesis, así como también al avance de la enfermedad. Estas enfermedades incluyen, pero no están limitadas a, trastornos neurológicos, tales como la enfermedad de Alzheimer (AD), incluyendo enfermedades o condiciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de la memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), demencia de cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés), el complejo de Parkinson-Demencia de Guam. Otras enfermedades que se basan en, o están asociadas con, las proteínas tipo amiloïde, tales como la parálisis supranuclear progresiva, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Creutzfeld-Jacob, la enfermedad de Parkinson, la demencia relacionada con HIV, la ALS (esclerosis lateral amiotrófica), la diabetes del adulto, la amiloidosis cardíaca senil, tumores endocrinos, y otros, incluyendo la degeneración macular. Aunque la patogénesis de estas enfermedades puede ser diversa, sus depósitos característicos frecuentemente contienen muchos componentes moleculares compartidos. En un grado significativo, esto se puede atribuir a la activación local de vías pro-inflamatorias, que llevan de este modo a la deposición concurrente de componentes de complemento activados, reactivos de fase aguda, moduladores inmunitarios, y otros mediadores inflamatorios (McGeer et al., 1994).
- La enfermedad de Alzheimer (AD) es un trastorno neurológico que se pensaba principalmente que era causado por las placas de amiloïde, una acumulación de depósitos anormales de proteínas en el cerebro. El tipo más frecuente de amiloïde hallado en el cerebro de individuos afectados está compuesto principalmente por fibrillas A β . La evidencia científica demuestra que un aumento en la producción y acumulación de proteína beta-amiloïde en las placas lleva a la muerte de células nerviosas, lo que contribuye al desarrollo y el avance de la enfermedad de Alzheimer. La pérdida de las células nerviosas en áreas estratégicas del cerebro, a su vez, causa una reducción en los neurotransmisores y un deterioro de la memoria. Las proteínas principalmente responsables de la formación de las placas incluyen la proteína precursora de amiloïde (APP) y dos presenilinas (presenilina I y presenilina II). La escisión secuencial de la proteína precursora de amiloïde (APP), que es expresada constitutivamente y catabolizada en la mayoría de las células, por las enzimas β - y γ -secretasa, lleva a la liberación de un péptido A β de 39 a 43 aminoácidos. La degradación de APPs aumenta probablemente su tendencia a la agregación en placas. Especialmente el fragmento A β (1-42) es el que tiene una alta tendencia a formar agregados debido a dos residuos de aminoácidos muy hidrofóbicos en su extremo C. Se cree por lo tanto que el fragmento A β (1-42) está involucrado principalmente y es responsable de la iniciación de la formación de placas neuríticas en la enfermedad de Alzheimer y de tener, por lo tanto, un alto potencial patológico. Por lo tanto se requieren anticuerpos específicos que puedan ser direccionados y puedan dispersar la formación de placas amiloïdes.
- Los síntomas de la enfermedad de Alzheimer se manifiestan lentamente y el primer síntoma puede ser sólo una leve falta de memoria. En esta etapa los individuos pueden olvidar eventos recientes, actividades, los nombres de personas o cosas familiares, y pueden no ser capaces de resolver simples problemas matemáticos. A medida que la enfermedad progresiona, los síntomas se notan más fácilmente y se tornan suficientemente serios como para hacer que las personas con la enfermedad de Alzheimer o los miembros de la familia busquen ayuda médica. Los

síntomas de la etapa media de la enfermedad de Alzheimer incluyen olvidar cómo realizar tareas simples, tales como peinarse, y se desarrollan problemas con el habla, la comprensión, la lectura o la escritura. Los pacientes con enfermedad de Alzheimer en la etapa tardía pueden tornarse ansiosos o agresivos, pueden alejarse de su casa y finalmente necesitan cuidado total.

- 5 Actualmente, la única forma definida de diagnosticar la enfermedad de Alzheimer es identificar las placas y las marañas en el tejido cerebral en una autopsia después de la muerte del individuo. Por lo tanto, los médicos sólo pueden realizar un diagnóstico de enfermedad de Alzheimer "posible" o "probable", mientras la persona aún vive. Usando métodos actuales, los médicos pueden diagnosticar la enfermedad de Alzheimer correctamente hasta el 90 por ciento del tiempo usando varias herramientas para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer "probable". Los médicos plantean preguntas acerca de la salud general de la persona, los problemas médicos pasados, y la historia de cualesquiera dificultades que la persona ha tenido al realizar las actividades diarias. Los ensayos de comportamiento de memoria, resolución de problemas, atención, realización de cálculos y el lenguaje proporcionan información sobre la degeneración cognitiva y los ensayos médicos -tales como ensayos de sangre, orina o del fluido espinal, y los escaneos cerebrales pueden proporcionar información adicional.
- 10 15 El tratamiento de la enfermedad de Alzheimer consiste en tratamientos basados en medicación y otros no basados en medicación. Los tratamientos dirigidos a cambiar el curso subyacente de la enfermedad (retardar o revertir el avance) han sido hasta ahora poco exitosos. Las medicinas que restauran el déficit (defecto) o el mal funcionamiento, en los mensajeros químicos de las células nerviosas (neurotransmisores), tales como los inhibidores de colinesterasa (ChEIs) han demostrado mejorar los síntomas. También se encuentran disponibles medicaciones dirigidas a las manifestaciones psiquiátricas de la enfermedad de Alzheimer.
- 20 25 Los inhibidores de colinesterasa, tales como Tacrine 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 el mal funcionamiento, en la neurotransmisión en el cerebro. Los ChEIs impiden la degradación enzimática de los neurotransmisores aumentando de este modo la cantidad de mensajeros químicos disponibles para transmitir las señales nerviosas en el cerebro.

30 Para algunas personas en las etapas temprana y media de la enfermedad, los fármacos tacrine (COGNEX®, Morris Plains, NJ), donepezil (ARICEPt®, Tokio, JP), rivastigmina (EXELON®, East Hanover, NJ), o galantamina (REMINYL®, New Brunswick, NJ) pueden ayudar a prevenir que algunos síntomas empeoren durante un tiempo limitado. Otro fármaco memantina (NAMENDA®, Nueva York, NY), ha sido aprobado para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer moderada a severa. Además, algunas medicinas pueden ayudar a controlar los síntomas de comportamiento de la enfermedad de Alzheimer tales como insomnio, agitación, deambulación, ansiedad y depresión. El tratamiento de estos síntomas frecuentemente hace que los pacientes se sientan más confortables y hace que su cuidado sea más fácil para los cuidadores. Lamentablemente, a pesar de que los avances en el tratamiento que muestran esta clase de agentes sean consistentemente mejores que un placebo, la enfermedad continúa progresando, y el efecto promedio sobre el funcionamiento mental sólo ha sido modesto. Los ChEIs también tienen efectos colaterales que incluyen disfunción gastrointestinal, toxicidad hepática y pérdida de peso.

35 40 Los avances en la comprensión de las anormalidades del cerebro que ocurren en la enfermedad de Alzheimer se espera que proporcionen la estructura para nuevos objetivos de tratamiento que estén más enfocados en alterar el curso y el desarrollo de la enfermedad. Muchos compuestos, incluyendo los agentes antiinflamatorios, están siendo investigados activamente. Los ensayos clínicos que usan los inhibidores específicos de la ciclooxygenasa (COX-2), tales como rofecoxib y celecoxib, también se están realizando.

45 Otras enfermedades que se basan en, o están asociadas con, la acumulación y el depósito de la proteína tipo amiloide son el deterioro cognitivo leve, la demencia de los cuerpos de Lewy (LBD), la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), la miosis por cuerpos de inclusión (IBM) y la degeneración macular, en particular la degeneración macular relacionada con la edad (AMD).

50 55 El deterioro cognitivo leve (MCI) es un término general definido más comúnmente como un trastorno de la memoria leve pero mensurable. Una persona con MCI experimenta problemas de memoria mayores que lo esperado normalmente con la edad, pero no muestra otros síntomas de demencia, tales como deterioro del juicio o el razonamiento. MCI es una condición que frecuentemente refleja una etapa preclínica de la AD.

50 Se cree que la deposición de β -amiloide dentro de la corteza entorrinal (EC) tiene un rol clave en el desarrollo del deterioro cognitivo leve (MCI) en las personas mayores. Esto concuerda con la observación de que los niveles de CSF- β A β (1-42) declinan significativamente una vez que la AD se torna clínicamente evidente. Por contraste con los niveles de CSF- β A β (1-42), los niveles de CSF-tau están significativamente aumentados en la etapa de MCI, y estos valores continúan estando elevados posteriormente, indicando que los niveles aumentados de CSF-tau pueden ayudar a detectar a las personas con MCI de las que se puede predecir que desarrollarán AD.

La demencia de los cuerpos de Lewy (LBD) es un trastorno neurodegenerativo que puede ocurrir en personas mayores de 65 años de edad, que causa típicamente síntomas de deterioro cognitivo (pensamiento) y cambios de comportamiento anormales. Los síntomas pueden incluir deterioro cognitivo, signos neurológicos, trastorno del

sueño y falla autonómica. El deterioro cognitivo es la característica típica de la LBD en la mayoría de los casos. Los pacientes tienen episodios recurrentes de confusión que empeoran progresivamente. La fluctuación de la capacidad cognitiva está asociada frecuentemente con los grados de desviación de la atención y la agudeza mental. El deterioro cognitivo y las fluctuaciones del pensamiento pueden variar durante minutos, horas o días.

- 5 Los cuerpos de Lewy están formados por proteínas de neurofilamentos fosforilados y no fosforilados; contienen la proteína sináptica alfa-sinucleína así como también la ubiquitina, que está involucrada en la eliminación de proteínas dañadas o anormales. Además de los cuerpos de Lewy, las neuritas de Lewy, que son cuerpos de inclusión en los procesos celulares de las células nerviosas, también pueden estar presentes. Las placas de amiloide pueden formarse en los cerebros de los pacientes afectados de DLB, sin embargo, tienden a ser menores en número que los observados en pacientes con la enfermedad de Alzheimer. Las marañas neurofibrilares, la otra marca característica micropatológica de la AD, no son una característica principal de DLB, pero están presentes frecuentemente además de las placas de amiloide.
- 10

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

15 La miositis por cuerpos de inclusión (IBM) es una enfermedad paralizante que se encuentra usualmente en personas mayores de 50 años, en las cuales las fibras musculares desarrollan inflamación y comienzan a atrofiarse - pero en las cuales el cerebro no está afectado, y los pacientes retienen su intelecto completo. Se halló que dos enzimas involucradas en la producción de la proteína β -amiloide están aumentadas dentro de las células musculares de los pacientes con esta enfermedad muscular progresiva muy común en las personas mayores, en las cuales la β -amiloide también está aumentado.

20 Otra enfermedad que se basa en, o está asociada con, la acumulación y el depósito de proteínas tipo amiloide es la degeneración macular.

25 La degeneración macular es una enfermedad común del ojo que causa el deterioro de la mácula, que es el área central de la retina (el tejido delgado como un papel en la parte posterior del ojo en donde las células sensibles a la luz envían señales visuales al cerebro). La visión 'hacia adelante', clara, aguda, es procesada por la mácula. El daño a la mácula resulta en el desarrollo de puntos ciegos y visión borrosa o distorsionada. La degeneración macular relacionada con la edad (AMD) es una causa principal del deterioro visual en los Estados Unidos y en las personas 30 mayores de 65 años es la principal causa de ceguera legal entre los caucásicos. Aproximadamente 1,8 millones de americanos de 40 años y mayores tienen AMD avanzada, y otras 7,3 millones de personas con AMD intermedia se encuentran en riesgo sustancial de pérdida de la visión. El gobierno estima que para el año 2020 habrá 2,9 millones de personas con AMD avanzada. Las víctimas de AMD se encuentran frecuentemente sorprendidas y frustradas al saber qué poco se conoce acerca de las causas y el tratamiento de esta condición que produce ceguera.

35 Hay dos formas de degeneración macular: la degeneración macular seca y la degeneración macular húmeda. La forma seca, en la cual las células de la mácula comienzan lentamente a degradarse, es diagnosticada en el 85% de los casos de degeneración macular. Usualmente se encuentran afectados ambos ojos por la AMD, aunque un ojo puede perder la visión mientras que el otro ojo no está afectado. Las drusas, que son depósitos amarillos debajo de la retina, son signos tempranos comunes de la AMD seca. El riesgo de desarrollar AMD seca avanzada o AMD 40 húmeda aumenta a medida que el número o el tamaño de las drusas aumenta. Es posible que la AMD seca avance y provoque la pérdida de visión sin cambiar a la forma húmeda de la enfermedad, sin embargo, también es posible que la AMD seca en la etapa temprana cambie repentinamente a la forma húmeda.

45 La forma húmeda, aunque sólo representa el 15% de los casos, resulta en 90% de la ceguera, y es considerada AMD avanzada (no hay una etapa temprana o intermedia de la AMD húmeda). La AMD húmeda siempre está precedida por la forma seca de la enfermedad. A medida que la forma seca empeora, algunas personas comienzan a tener vasos sanguíneos anormales que crecen detrás de la mácula. Estos vasos son muy frágiles y perderán fluido y sangre (de allí el nombre degeneración macular 'húmeda'), causando un daño rápido a la mácula.

50 La forma seca de la AMD causará inicialmente frecuentemente una visión levemente borrosa. El centro de la visión en particular pueden tornarse entonces borroso y esta región aumenta de tamaño a medida que la enfermedad avanza. Pueden no notarse síntomas si sólo se ve afectado un ojo. En la AMD húmeda, las líneas rectas pueden aparecer onduladas y la pérdida de la visión central puede ocurrir rápidamente.

55 El diagnóstico de la degeneración macular comprende típicamente un examen ocular extensivo, una prueba de agudeza visual, y una visualización de la parte posterior del ojo usando un procedimiento que se denomina fondo de ojo para ayudar a diagnosticar la AMD, y -si se sospecha AMD húmeda- también se puede realizar una angiografía de fluoresceína. Si la AMD seca alcanza las etapas avanzadas, no hay un tratamiento actual para evitar la pérdida de la visión. Sin embargo, una fórmula específica con altas dosis de antioxidantes y zinc puede retardar o evitar que la AMD intermedia progrese a la etapa avanzada. Macugen® (inyección de pegaptanib sódico), fotocoagulación con láser y terapia fotodinámica pueden controlar el crecimiento anormal de los vasos sanguíneos y la hemorragia en la

mácula, lo que ayuda a algunas personas que tienen AMD húmeda, sin embargo, la visión que ya se ha perdido no se restaurará por estas técnicas. Si la visión ya se ha perdido, existen auxiliares de poca visión que pueden ayudar a mejorar la calidad de vida.

5 Uno de los signos más tempranos de la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) es la acumulación de depósitos extracelulares conocidos como drusas entre la lámina basal del epitelio pigmentado retinal (RPE) y la membrana de Bruch (BM). Estudios recientes realizados por Anderson et al. han confirmado que las drusas contienen amiloide beta (Experimental Eye Research 78 (2004) 243-256).

10 La investigación actual continúa con estudios que exploran factores ambientales, genéticos y dietéticos que pueden contribuir a la AMD. También se están explorando nuevas estrategias de tratamiento, incluyendo trasplantes celulares de retina, fármacos que evitarán o harán más lento el avance de la enfermedad, terapia radiante, terapias génicas, un chip de computadora implantado en la retina que puede ayudar a estimular la visión y agentes que evitarán el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos bajo la mácula.

15 Lo que se necesita, por lo tanto, son composiciones de vacunas terapéuticas y métodos efectivos para enfocar en las complicaciones asociadas con la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placas de amiloide, incluyendo amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad, incluyendo, pero sin limitación, trastornos neurológicos, tales como la enfermedad de Alzheimer (AD), incluyendo enfermedades o condiciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de la memoria cognitiva, tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), demencia de los cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés), el complejo de Parkinson-demencia de Guam, así como también otras enfermedades que se basan en, o están asociadas con, proteínas tipo amiloide, tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeld-Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con HIV, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes del adulto, amiloidosis cardíaca senil, tumores endocrinos, y otros, incluyendo degeneración macular. En particular, lo que se necesita son vacunas y composiciones terapéuticas especializadas y altamente efectivas que comprendan dichas vacunas, que sean capaces de contrarrestar las manifestaciones fisiológicas de la enfermedad, tales como la formación de placas asociada con agregación de fibras del péptido amiloide o tipo amiloide.

20 25 30 Li Shao-Bing et al. (Chinese Medical Journal vol. 118, no. 8, págs. 660-664, 2005) divulga la inmunización de monos con un fragmento de péptido Abeta 1-15 ligado a la parte de heptalisina. Se determinaron los títulos de anticuerpos en el suero de los monos inmunizados así como también los isotipos IgG producidos. Los anticuerpos séricos fueron testeados con respecto a la ligación de Abeta 1-42.

35 Li Shao-Bing et al. informaron que el péptido Abeta 1-15 induce una respuesta humoral específica en el mono rhesus adulto. Se mostró que los anticuerpos séricos se ligan a una proteína de fusión GST Abeta 1-42 y tiñen las placas de Abeta en los cortes de cerebro.

40 45 50 Nicolau et al. (Proc. Natl. Aca. Sci., USA, vol. 99, no. 4, págs. 1332-2337, 2002) describen una modificación en la resina de un constructo antigénico Abeta, modificación realizada al aminoácido terminal (Lys) por acoplamiento de dos residuos palmitoílo a la lisina y anclaje de este aminoácido modificado a la resina, seguido por 16 ciclos de síntesis para producir el péptido Aβ1-16. En un paso final, el segundo aminoácido modificado es agregado al final de la molécula de péptido Aβ. La vacunación de ratones que presentaban placas Aβ en sus páncreas con el constructo Aβ1-16 así modificado reconstituido en liposomas-lípido A provocaron títulos de 1:5000 de anticuerpos anti-Aβ1-16 dentro de las 10 semanas después de la primera inoculación. En la interacción directa, el suero con títulos de anticuerpos de 1:5.000 solubilizó *in vitro* hasta el 80% de los agregados Aβ1-42 preformados.

55 La presente invención proporciona ahora un anticuerpo para usar en la prevención, el tratamiento o la mitigación de los efectos de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placas incluyendo amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad, que se puede obtener por medio de un método que comprende crear anticuerpos contra un péptido antigénico que corresponde a la secuencia de aminoácidos del antígeno del péptido Aβ que consiste en un tramo simple o repetitivo de entre 13 y 15 residuos de aminoácidos contiguos de la parte N-terminal del péptido Aβ, y modificado con partes hidrofóbicas unidas en forma covalente a cada extremo del péptido antigénico a través de al menos un aminoácido acoplado al residuo de aminoácido terminal en cada extremo del péptido antigénico y reconstituido en un liposoma, donde:

50 a.) el péptido Aβ es preformado por una síntesis de péptidos automatizada estándar en resina, y modificado por injerto en resina de una parte lipofílica o hidrofóbica a los residuos de aminoácidos terminales del péptido Aβ preformado, y

55 b.) dicho anticuerpo es un anticuerpo bifuncional, el que, después de la co-incubación con péptidos monoméricos y oligoméricos β-amiloídes solubles, inhibe la agregación de los monómeros Aβ en fibrillas poliméricas de alto peso molecular y, además, después de la coincubación con filamentos o fibrillas de amiloide poliméricas de alto peso molecular preformadas, formadas por la agregación de péptidos monoméricos β-amiloide, es capaz de desagregar las fibrillas o los filamentos poliméricos preformados.

En una forma de realización de la invención, la parte N-terminal del péptido Aβ es seleccionada del grupo que

consiste en:

- a) A β ₁₋₁₆ y A β ₁₋₁₇
- b) A β ₁₋₁₅, A β ₁₋₁₄ y A β ₁₋₁₃; o
- c) A β ₁₋₁₅ como se presenta en la SEQ ID NO: 1 y A β _{1-16(Δ14)} como se presenta en la SEQ ID NO: 3.

5 En otra forma de realización de la invención, dicho péptido monomérico u oligomérico β -amiloide es A β 1-42.

La invención se refiere además a un anticuerpo para usar de acuerdo con una cualquiera de las formas de realización precedentes, anticuerpo que es hasta 100 veces más sensible al péptido amiloide A β 1-42 en comparación con A β 1-39, A β 1-40, A β 1-41 y hasta 1000 veces más sensible al péptido amiloide A β 1-42 en comparación con A β 1-38.

10 En particular, dicho anticuerpo es capaz de detectar fibras de A β 1-42 en una concentración tan baja como hasta al menos 0,001 μ g.

En una forma de realización, el anticuerpo para usar de acuerdo con una cualquiera de las formas de realización precedentes es un anticuerpo monoclonal producido por una línea celular de hibridoma EJ 7H3, depositada el 8 de diciembre de 2005 como DSM ACC2756.

15 La invención se refiere además al anticuerpo para usar de acuerdo con una cualquiera de las formas de realización precedentes, en donde dicho anticuerpo es capaz, después de la administración a un animal que padece de deterioro de la memoria, de retener o aumentar, o de restaurar completamente la capacidad de memoria cognitiva en el animal tratado.

20 El anticuerpo para usar de acuerdo con una cualquiera de las formas de realización precedentes puede ser usado además para evitar, tratar o mitigar los efectos de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placas de amiloide incluyendo la amiloidosis secundaria y la amiloidosis relacionada con la edad, pero particularmente:

a) un trastorno neurológico, particularmente la enfermedad de Alzheimer, o

25 b) enfermedades o condiciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de la memoria cognitiva, particularmente una enfermedad o condición seleccionada del grupo que consiste en deterioro cognitivo leve (MCI), demencia de los cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés), el complejo de Parkinson-demencia de Guam, parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeld-Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con HIV, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes del adulto, amiloidosis cardíaca senil, tumores endocrinos, degeneración macular.

30 La invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las formas de realización precedentes en una forma farmacéuticamente aceptable.

En otra forma de realización, la invención proporciona una línea celular de hibridoma que produce un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las formas de realización precedentes, particularmente la línea celular de hibridoma EJ 7H3, depositada el 8 de diciembre de 2005, como DSM ACC2756.

35 En otra forma de realización, la invención se refiere a un método para producir un anticuerpo, método que comprende crear anticuerpos contra un fragmento de péptido antigénico A β modificado reconstituido en un liposoma que consiste en un tramo único o repetitivo de entre 13 y 15 residuos de aminoácidos contiguos de la parte N-terminal del péptido A β , donde el péptido A β es preformado por una síntesis de péptidos automatizada estándar en resina y modificado por injerto en resina de una parte lipofílica o hidrofóbica a los residuos de aminoácidos terminales del péptido A β preformado, administrando dicho constructo a un ser humano o un animal.

40 Se divulan en la presente nuevos métodos y composiciones para provocar una respuesta inmune altamente específica y altamente efectiva en un organismo, pero particularmente en un animal, particularmente un mamífero o un ser humano, que es capaz de evitar o mitigar la amiloidosis, o los síntomas asociados con la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placas de amiloide incluyendo la amiloidosis y la amiloidosis relacionada con la edad, incluyendo, pero sin limitación, trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Alzheimer (AD), incluyendo enfermedades o condiciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, en deterioro cognitivo leve (MCI), demencia de los cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés), el complejo de Parkinson-demencia de Guam, así como también otras enfermedades que se basan en, o están asociadas con, proteínas tipo amiloide, tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeld-Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con HIV, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes del adulto, amiloidosis cardíaca senil, tumores endocrinos, y otros, incluyendo degeneración macular.

45 En particular, se divulan nuevos métodos y composiciones para retener o mejorar, pero particularmente para

restaurar, más particularmente para restaurar completamente la capacidad de memoria cognitiva en un mamífero que presenta una condición o enfermedad asociada con amiloide.

En un aspecto, se divulga una composición de vacuna terapéutica y un método para producir una composición como ésta para el tratamiento de enfermedades y trastornos que son causados por, o asociados con, proteínas amiloide o tipo amiloide, incluyendo amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placas de amiloide incluyendo amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad, incluyendo, pero sin limitación, trastornos neurológicos, tales como enfermedad de Alzheimer (AD), particularmente una enfermedad o condición caracterizada por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tal como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MDI) que comprende un fragmento de péptido de la parte N-terminal del péptido A β , particularmente un fragmento de péptido A β que consiste en un tramo único o repetitivo de entre 13 y 15 residuos de aminoácidos contiguos de la parte N-terminal del péptido A β , pero particularmente un fragmento de péptido A β que consiste en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en residuos 1-15, 1-14 y 1-13 de la parte N-terminal del péptido A β , más particularmente del residuo 1-15 como se presenta en la SEQ ID NO: 1, incluyendo sus fragmentos funcionalmente equivalentes, pero especialmente un fragmento de péptido A β como se menciona en la presente

15 antes de ser unido a, o incorporado o reconstituido en, una partícula portadora/adyuvante tal como, por ejemplo, un liposoma.

Este tramo contiguo de 13 a 15 residuos de aminoácidos puede ser obtenido del fragmento N-terminal 1-16, 1-17, 1-18, o 1-20 del péptido A β pero particularmente del fragmento N-terminal 1-18 o 1-17 del péptido A β como se presenta en la SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:5, respectivamente, y puede ser interrumpido por la delección de uno a tres residuos de aminoácidos para dar por resultado un tramo de entre 13 y 15 residuos de aminoácidos, donde los residuos de aminoácidos delecionados pueden ser residuos de aminoácidos adyacentes o residuos separados uno de otro por al menos 1 residuo de aminoácido, pero particularmente residuos de aminoácidos que no son residuos cargados negativamente, si se desea que la carga neta total de la molécula del péptido antigenólico sea negativa, o residuos de aminoácidos que no están cargados positivamente, si se desea que la carga neta total de la molécula de péptido antigenólico sea positiva. Este tramo contiguo de 13 a 15 residuos de aminoácidos puede ser repetido en el constructo antigenólico de acuerdo con 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.

En un aspecto específico, el tramo contiguo de 13 a 15 residuos de aminoácidos se usa en forma de un polímero seleccionado del grupo que consiste en un 2-mero, un 3-mero, un 4-mero, un 5-mero, un 6-mero, un 7-mero, un 8-mero, un 9-mero, un 10-mero, un 11-mero, un 12-mero, un 13-mero, un 14-mero, un 15-mero, un 16-mero, un 20-mero, un 30-mero y un 50-mero.

Además se divulga en la presente una composición de vacuna terapéutica y un método para producir una composición como ésta para el tratamiento de enfermedades y trastornos que son causados por, o asociados con, proteínas amiloide o tipo amiloide, incluyendo amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placas de amiloide incluyendo amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad, incluyendo, pero sin limitación, trastornos neurológicos, tales como enfermedad de Alzheimer (AD), particularmente una enfermedad o condición caracterizada por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tal como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MDI) como se especifica adicionalmente en la presente más abajo, usando un fragmento de péptido A β de la parte N-terminal del péptido A β , pero particularmente un fragmento de péptido A β que consiste en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10), 1-16(Δ 12), 1-16(Δ 13), 1-16(Δ 14), 1-16(Δ 15), 1-15(Δ 2), 1-15(Δ 4), 1-15(Δ 5), 1-15(Δ 6), 1-15(Δ 8), 1-15(Δ 9), 1-15(Δ 10), 1-15(Δ 12), 1-15(Δ 13), 1-15(Δ 14), más particularmente un fragmento de péptido A β que consiste en residuos de aminoácidos 1-15 como se presenta en la SEQ ID NO: 1 y 1-16(Δ 14), como se presenta en la SEQ ID NO: 3.

También se divulga un fragmento de péptido que es esencialmente idéntico a los fragmentos mencionados más arriba y tiene sustancialmente la misma actividad biológica de dichos fragmentos, pero en particular un fragmento de péptido que es una variante modificada en forma conservadora de dichos fragmentos, por cuanto las alteraciones resultan en la sustitución de uno o más aminoácidos, particularmente de entre uno y 10 aminoácidos, más particularmente de entre uno y 6 aminoácidos, aún más particularmente de entre uno y 4 aminoácidos, pero especialmente de entre uno y 3 aminoácidos, con un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservadora que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica y se divultan en la presente más abajo. La sustitución conservadora debe realizarse preferentemente de tal modo que la carga neta total del péptido y también la distribución de la carga en la molécula del péptido permanezca esencialmente igual.

En un aspecto específico, al menos uno, particularmente 2, más particularmente 3 o incluso todos los residuos de aminoácidos cargados negativamente 1, 3, 7, 11 pueden ser reemplazados con un aminoácido cargado negativamente químicamente similar. Particularmente, el Asp en posición 1 y 7, respectivamente, puede ser reemplazado con un Glu y el Glu en posición 9 y 11, respectivamente, puede ser reemplazado con un Asp.

60 En un aspecto específico, se divulga una composición de vacuna terapéutica y un método para producir una

- composición como ésta, que comprende un fragmento de péptido A β de la parte N-terminal del péptido A β , pero particularmente un fragmento de péptido A β que consiste en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10), 1-16(Δ 12), 1-16(Δ 13), 1-16(Δ 14), 1-16(Δ 15), 1-15(Δ 2), 1-15(Δ 4), 1-15(Δ 5), 1-15(Δ 6), 1-15(Δ 8), 1-15(Δ 9), 1-15(Δ 10), 1-15(Δ 12), 1-15(Δ 13), 1-15(Δ 14), un antígeno peptídico A β _{1-16(Δ 15)}, más particularmente un antígeno peptídico A β _{1-16(Δ 14)} o A β _{1-16(Δ 13)}, aún más particularmente un antígeno peptídico A β ₁₋₁₄, específicamente un antígeno péptido A β ₁₋₁₅, pero especialmente un fragmento de péptido A β que consiste en los residuos de aminoácidos 1-15 como se presenta en la SEQ ID NO: 1 y 1-16(Δ 14), como se presenta en la SEQ ID NO: 3, para el tratamiento de enfermedades y trastornos que son causados o asociados con proteínas amiloide o tipo amiloide, incluyendo amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placas de amiloide incluyendo amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad, incluyendo, pero sin limitación, trastornos neurológicos, tales como enfermedad de Alzheimer (AD), particularmente una enfermedad o condición caracterizada por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tal como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MDI).
- En un aspecto específico, se divulga una composición de vacuna terapéutica y un método para producir una composición de vacuna terapéutica para la retención o la mejora, particularmente para la restauración completa de la capacidad de memoria cognitiva de un animal, particularmente un mamífero o un ser humano, que padece de deterioro de la memoria, usando un fragmento de péptido A β de la parte N-terminal del péptido A β , pero particularmente un fragmento de péptido A β que consiste en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10), 1-16(Δ 12), 1-16(Δ 13), 1-16(Δ 14), 1-16(Δ 15), 1-15(Δ 2), 1-15(Δ 4), 1-15(Δ 5), 1-15(Δ 6), 1-15(Δ 8), 1-15(Δ 9), 1-15(Δ 10), 1-15(Δ 12), 1-15(Δ 13), 1-15(Δ 14), particularmente un antígeno peptídico A β _{1-16(Δ 15)}, más particularmente un antígeno peptídico A β _{1-16(Δ 14)} o A β _{1-16(Δ 13)}, aún más particularmente un antígeno peptídico A β ₁₋₁₄, específicamente un antígeno peptídico A β ₁₋₁₅, pero especialmente un fragmento de péptido que consiste en los residuos de aminoácidos 1-15 como se presenta en la SEQ ID NO: 1 y 1-16(Δ 14), como se presenta en la SEQ ID NO: 3.
- Se divulga además un método para el tratamiento de enfermedades y trastornos que son causados por, o asociados con, proteínas amiloide o tipo amiloide, incluyendo amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placas amiloide incluyendo amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad, incluyendo, pero sin limitación, trastornos neurológicos, tales como enfermedad de Alzheimer (AD), particularmente una enfermedad o condición caracterizada por la pérdida de la capacidad de la memoria cognitiva tal como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), administrando a un animal, particularmente a un mamífero o un ser humano, una composición de vacuna como se describe en la presente.
- En un aspecto específico, se divulga un método para retener o aumentar la capacidad de memoria cognitiva pero, particularmente, para restaurar completamente la capacidad de memoria cognitiva de un animal, particularmente un mamífero o un ser humano, que padece de deterioro de la memoria, administrando a un animal, particularmente a un mamífero o un ser humano, una composición de vacuna como se describe en la presente.
- En otro aspecto, se divulga una composición de vacuna terapéutica y un método para producir una composición como ésta, así como también un método para el tratamiento de enfermedades y trastornos que son causados por, o asociados con, proteínas amiloide o tipo amiloide, incluyendo amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placas de amiloide incluyendo amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad, incluyendo, pero sin limitación, trastornos neurológicos, tales como enfermedad de Alzheimer (AD), particularmente una enfermedad o condición caracterizada por la pérdida de la capacidad de la memoria cognitiva tal como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), usando un antígeno peptídico A β de acuerdo con la invención y como se describió en la presente más arriba, pero particularmente un fragmento de péptido A β de la parte N-terminal del péptido A β , pero particularmente un fragmento de péptido A β que consiste en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10), 1-16(Δ 12), 1-16(Δ 13), 1-16(Δ 14), 1-16(Δ 15), 1-15(Δ 2), 1-15(Δ 4), 1-15(Δ 5), 1-15(Δ 6), 1-15(Δ 8), 1-15(Δ 9), 1-15(Δ 10), 1-15(Δ 12), 1-15(Δ 13), 1-15(Δ 14), particularmente un antígeno peptídico A β _{1-16(Δ 15)}, más particularmente un antígeno peptídico A β _{1-16(Δ 14)} o A β _{1-16(Δ 13)}, aún más particularmente un antígeno peptídico A β ₁₋₁₄, específicamente un antígeno péptido A β ₁₋₁₅, pero especialmente un fragmento de péptido que consiste en los residuos de aminoácidos 1-15 como se presenta en la SEQ ID NO: 1 y 1-16(Δ 14), como se presenta en la SEQ ID NO: 3, donde el antígeno peptídico A β es modificado de tal modo que es capaz de mantener y estabilizar una conformación definida caracterizada por una proporción equilibrada de partes α -helicoidales y/o β -laminares y/o espirales aleatorias y de inducir una respuesta inmune altamente específica en el animal tratado.
- La composición de vacuna como se describió en la presente más arriba después de la administración a un animal, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano, resulta principalmente en la generación de anticuerpos de subtipos Th2 no inflamatorios, tales como, por ejemplo, isotipo IgG1 e IgG2b y/o anticuerpos de la subclase IgG independiente de las células T, tal como, por ejemplo, IgG3, y/o no lleva a un aumento significativo de marcadores de inflamación en el cerebro, particularmente de marcadores de inflamación seleccionados del grupo que consiste en IL-1 β , IL-6, IFN- γ y TNF α .
- En otro aspecto, la vacuna como se describió en la presente más arriba, después de la administración a un animal, particularmente a un mamífero, pero especialmente a un ser humano, lleva a una disminución significativa de A β 1-

40 y A β 1-42 insolubles, relacionados con las placas, en el cerebro.

En un aspecto adicional, la vacuna como se describió en la presente más arriba, después de la administración a un animal, particularmente a un mamífero, pero especialmente a un ser humano, lleva a una reducción significativa del nivel de A β 1-42 soluble, en el cerebro.

- 5 Se divulga además una vacuna como se describió en la presente más arriba que después de la administración a un animal, particularmente a un mamífero, pero especialmente a un ser humano, que padece de una condición asociada con amiloide, caracterizada por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva lleva a un aumento en la retención de la capacidad de memoria cognitiva o a una restauración completa de la capacidad de memoria cognitiva.
- 10 En particular, el antígeno peptídico, como se describió en la presente más arriba, específicamente un fragmento de péptido A β de la parte N-terminal del péptido A β , pero particularmente un fragmento de péptido A β que consiste en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10), 1-16(Δ 12), 1-16(Δ 13), 1-16(Δ 14), 1-16(Δ 15), 1-15(Δ 2), 1-15(Δ 4), 1-15(Δ 5), 1-15(Δ 6), 1-15(Δ 8), 1-15(Δ 9), 1-15(Δ 10), 1-15(Δ 12), 1-15(Δ 13), 1-15(Δ 14), particularmente un antígeno peptídico A β 1-16(Δ 15), más particularmente un antígeno peptídico A β 1-16(Δ 14) o A β 1-16(Δ 13), aún más particularmente un antígeno peptídico A β 1-14, específicamente un antígeno péptido A β 1-15, pero especialmente un fragmento de péptido que consiste en los residuos de aminoácidos 1-15, como se presenta en la SEQ ID NO: 1 y 1-16(Δ 14), como se presenta en la SEQ ID NO: 3, se presenta unido a, o incorporado o reconstituido en, un portador, tal como, por ejemplo, una vesícula, un cuerpo particulado o molécula, pero, particularmente, un liposoma.
- 15 20 Las composiciones inmunogénicas pueden comprender liposomas preparados reconstituyendo liposomas en presencia de péptidos antigenéticos purificados o parcialmente purificados o modificados de acuerdo con la invención. Adicionalmente, los fragmentos de péptidos pueden ser reconstituidos en liposomas. También se divultan fragmentos de péptidos antigenéticos modificados, de modo de aumentar su antigenicidad. Por ejemplo, partes antigenéticas y adyuvantes pueden ser unidos a, o mezclados con, el péptido. Ejemplos de partes antigenéticas y adyuvantes incluyen, pero no están limitadas a, derivados de muramil dipéptido lipofílico, polímeros de bloques no iónicos, adyuvante de hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio, y sus mezclas.
- 25 30 En otro aspecto, el antígeno peptídico A β como se describió en la presente más arriba, específicamente un fragmento de péptido A β de la parte N-terminal del péptido A β , pero particularmente un fragmento de péptido A β que consiste en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10), 1-16(Δ 12), 1-16(Δ 13), 1-16(Δ 14), 1-16(Δ 15), 1-15(Δ 2), 1-15(Δ 4), 1-15(Δ 5), 1-15(Δ 6), 1-15(Δ 8), 1-15(Δ 9), 1-15(Δ 10), 1-15(Δ 12), 1-15(Δ 13), 1-15(Δ 14), particularmente un antígeno peptídico A β 1-16(Δ 15), más particularmente un antígeno peptídico A β 1-16(Δ 14) o A β 1-16(Δ 13), aún más particularmente un antígeno peptídico A β 1-14, específicamente un antígeno péptido A β 1-15, pero especialmente un fragmento de péptido que consiste en los residuos de aminoácidos 1-15, como se presenta en la SEQ ID NO: 1 y 1-16(Δ 14), como se presenta en la SEQ ID NO: 3, es modificado por una parte lipofílica o hidrofóbica, que facilita la inserción en la bicapa lipídica del portador liposoma/adyuvante inmune, particularmente por una parte lipofílica o hidrofóbica que funciona como un anclaje para el péptido en la bicapa del liposoma y tiene una dimensión que lleva a que el péptido sea posicionado y estabilizado en estrecha proximidad a la superficie del liposoma.
- 35 40 En otro aspecto, la parte lipofílica o hidrofóbica es un ácido graso, un triglicérido o un fosfolípido, pero especialmente un ácido graso, un triglicérido o un fosfolípido, donde la estructura de carbono del ácido graso tiene al menos 10 átomos de carbono. Particularmente, la parte lipofílica o hidrofóbica es un ácido graso con una estructura de carbono de al menos aproximadamente 14 átomos de carbono y hasta aproximadamente 24 átomos de carbono, cada número individual de átomos de carbono comprendido dentro de este rango es también parte de la presente invención. Más particularmente, la parte lipofílica o hidrofóbica tiene una estructura de carbono de al menos 14 átomos de carbono, pero especialmente 16 átomos de carbono. Ejemplos de partes hidrofóbicas incluyen, pero no están limitadas a, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido mirístico, ácido láurico, ácido oleico, ácido linoleico y ácido linolénico. En una forma de realización específica de la presente invención, la parte lipofílica o hidrofóbica es ácido palmítico.
- 45 50 En otro aspecto adicional, la parte hidrofóbica es ácido palmítico y la preparación del liposoma puede contener además un adyuvante tal como, por ejemplo, lípido A, alumbre, fosfato de calcio, interleuquina 1, y/o microcápsulas de polisacáridos y proteínas, pero particularmente un lípido A detoxificado, tal como monofosforil o difosforil lípido A, o alumbre.
- 55 Se divulga además una composición de vacuna terapéutica y un método para producir una composición como ésta usando un péptido antigenético inmunogénico, como se describió en la presente más arriba, para el tratamiento de enfermedades y trastornos que son causados por, o asociados con, proteínas amiloide o tipo amiloide, incluyendo amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placas de amiloide incluyendo amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad, incluyendo, pero sin limitación, trastornos neurológicos, tales como enfermedad de Alzheimer (AD), particularmente para la retención, aumento o restauración

de la capacidad de memoria cognitiva de un animal, particularmente un mamífero o un ser humano que padece de deterioro de la memoria, así como también un método para el tratamiento de dicha amiloidosis, donde el antígeno peptídico β -amiloide es un antígeno peptídico A β palmitoilado como se describió en la presente más arriba, reconstituido en un liposoma, específicamente un fragmento de péptido A β palmitoilado de la parte N-terminal del péptido A β , pero particularmente un fragmento de péptido A β palmitoilado que consiste en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10), 1-16(Δ 12), 1-16(Δ 13), 1-16(Δ 14), 1-16(Δ 15), 1-15(Δ 2), 1-15(Δ 4), 1-15(Δ 5), 1-15(Δ 6), 1-15(Δ 8), 1-15(Δ 9), 1-15(Δ 10), 1-15(Δ 12), 1-15(Δ 13), 1-15(Δ 14), particularmente un antígeno peptídico A β _{1-16(Δ 15)}, más particularmente un antígeno peptídico A β _{1-16(Δ 14)} o A β _{1-16(Δ 13)}, aún más particularmente un antígeno peptídico A β ₁₋₁₄, específicamente un antígeno péptido A β ₁₋₁₅, pero especialmente un fragmento de péptido que consiste en los residuos de aminoácidos 1-15, como se presenta en la SEQ ID NO: 1 y 1-16(Δ 14), como se presenta en la SEQ ID NO: 3, modificado por residuos de palmitoílo unidos en forma covalente, particularmente entre 2 y 4 residuos de palmitoílo, más particularmente 4 residuos de palmitoílo, acoplados a cada extremo del antígeno peptídico a través de uno o más, pero particularmente a través de uno o dos residuos de aminoácidos adecuados, tales como lisina, ácido glutámico o cisteína, o cualquier otro residuo de aminoácido que puede ser usado adecuadamente para acoplar un residuo de palmitoílo al péptido antigénico.

En un aspecto específico, 2 o más de las moléculas de antígeno peptídico A β palmitoilado modificadas por residuos de palmitoílo unidos en forma covalente en cada extremo del péptido son reconstituidas en un solo liposoma.

Se divultan en la presente nuevos métodos y composiciones inmunogénicas que comprenden un péptido antigénico inmunogénico que, después de la administración a un animal, particularmente un mamífero o un ser humano que padece de una condición asociada con amiloide, particularmente de una condición caracterizada por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tal como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), induce una respuesta inmune en dicho animal o ser humano. El tratamiento con la vacuna terapéutica de acuerdo con la invención lleva a una retención o a un aumento de la capacidad de memoria cognitiva pero, particularmente, a una restauración completa de la capacidad de memoria cognitiva.

En otro aspecto, se divulga una composición de vacuna terapéutica y un método para producir una composición como ésta usando un péptido antigénico inmunogénico, para inducir una respuesta inmune en un animal, particularmente un mamífero o un ser humano, así como también un método para inducir una respuesta inmune en un animal, particularmente un mamífero o un ser humano, que padece de una condición asociada a amiloide, caracterizada por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tal como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), administrando a dicho animal o ser humano una composición de vacuna terapéutica que comprende un antígeno peptídico A β de acuerdo con la invención y, como se describió en la presente más arriba, pero específicamente, un fragmento de péptido A β palmitoilado de la parte N-terminal del péptido A β , pero particularmente un fragmento de péptido A β palmitoilado que consiste en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10), 1-16(Δ 12), 1-16(Δ 13), 1-16(Δ 14), 1-16(Δ 15), 1-15(Δ 2), 1-15(Δ 4), 1-15(Δ 5), 1-15(Δ 6), 1-15(Δ 8), 1-15(Δ 9), 1-15(Δ 10), 1-15(Δ 12), 1-15(Δ 13), 1-15(Δ 14), particularmente un antígeno peptídico A β _{1-16(Δ 15)}, más particularmente un antígeno peptídico A β _{1-16(Δ 14)} o A β _{1-16(Δ 13)}, aún más particularmente un antígeno peptídico A β ₁₋₁₄, específicamente un antígeno péptido A β ₁₋₁₅, pero especialmente un fragmento de péptido que consiste en residuos de aminoácidos 1-15 como se presenta en la SEQ ID NO: 1 y 1-16(Δ 14), como se presenta en la SEQ ID NO: 3, de tal modo que la capacidad de memoria cognitiva del animal o ser humano tratado es retenida o aumentada, pero particularmente, es restaurada completamente.

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

También se divulga un antígeno peptídico A β palmitoilado como se describió en la presente más arriba, específicamente un fragmento de péptido A β palmitoilado de la parte N-terminal del péptido A β , pero particularmente un fragmento de péptido A β palmitoilado que consiste en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10), 1-16(Δ 12), 1-16(Δ 13), 1-16(Δ 14), 1-16(Δ 15), 1-15(Δ 2), 1-15(Δ 4), 1-15(Δ 5), 1-15(Δ 6), 1-15(Δ 8), 1-15(Δ 9), 1-15(Δ 10), 1-15(Δ 12), 1-15(Δ 13), 1-15(Δ 14), particularmente un antígeno peptídico A β _{1-16(Δ 15)}, más particularmente un antígeno peptídico A β _{1-16(Δ 14)} o A β _{1-16(Δ 13)}, aún más particularmente un antígeno peptídico A β ₁₋₁₄, específicamente un antígeno péptido A β ₁₋₁₅, pero especialmente un fragmento de péptido que consiste en los residuos de aminoácidos 1-15, como se presenta en la SEQ ID NO: 1 y 1-16(Δ 14), como se presenta en la SEQ ID NO: 3, modificado por residuos de palmitoílo unidos en forma covalente, particularmente entre 2 y 4 residuos de palmitoílo, más particularmente 4 residuos de palmitoílo, acoplados a cada extremo del antígeno peptídico a través de uno o más,

pero particularmente a través de uno o dos residuos de aminoácidos adecuados, tales como lisina, ácido glutámico o cisteína, o cualquier otro residuo de aminoácido que puede ser usado adecuadamente para acoplar un residuo de palmitoílo al péptido antigénico.

En un aspecto específico, 2 o más de las moléculas de antígeno peptídico A β palmitoilado modificadas por residuos palmitoílo unidos en forma covalente en cada extremo del péptido son reconstituidas en un solo liposoma.

Se divulga además un péptido antigénico presentado unido a, o incorporado o reconstituido en, un portador, tal como, por ejemplo, una vesícula, un cuerpo particulado o molécula pero, particularmente, un liposoma, como se describió en la presente más arriba, pero específicamente un fragmento de péptido A β de la parte N-terminal del péptido A β , pero particularmente un fragmento de péptido A β que consiste en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10), 1-16(Δ 12), 1-16(Δ 13), 1-16(Δ 14), 1-16(Δ 15), 1-15(Δ 2), 1-15(Δ 4), 1-15(Δ 5), 1-15(Δ 6), 1-15(Δ 8), 1-15(Δ 9), 1-15(Δ 10), 1-15(Δ 12), 1-15(Δ 13), 1-15(Δ 14), particularmente un antígeno peptídico A β _{1-16(Δ 15)}, más particularmente un antígeno peptídico A β _{1-16(Δ 14)} o A β _{1-16(Δ 13)}, aún más particularmente un antígeno peptídico A β ₁₋₁₄, específicamente un antígeno péptido A β ₁₋₁₅, pero especialmente un fragmento de péptido que consiste en los residuos de aminoácidos 1-15, como se presenta en la SEQ ID NO: 1 y 1-16(Δ 14), como se presenta en la SEQ ID NO: 3, presentado unido a, o incorporado o reconstituido en, un portador, tal como, por ejemplo, una vesícula, un cuerpo particulado o molécula, como se describió en la presente más arriba.

Sin pretender quedar ligado a una hipótesis específica, es razonable suponer que la respuesta inmune inducida por la composición de vacuna terapéutica puede llevar en el animal o el ser humano a una estimulación de las células T y otras células inmunes reactivas dirigidas contra un agente inmunogénico, pero particularmente a la generación de anticuerpos altamente específicos y altamente efectivos que tienen la capacidad de reconocer específicamente y unirse a epítopes específicos de un rango de antígenos β -amiloideos, anticuerpo que, después de unirse al antígeno, media y/o induce el efecto observable de retención, aumento y, particularmente, restauración completa de la capacidad de memoria cognitiva en el animal o ser humano tratado.

Se divulga además en la presente una composición de vacuna que, después de la administración a un animal, particularmente un mamífero o un ser humano, induce la generación de un anticuerpo en el animal o ser humano tratado que se une directamente y específicamente a fibras de β -amiloide tales como, por ejemplo, fibras que comprenden péptidos monoméricos A β 1-39, 1-40, 1-41, 1-42, o 1-43, pero especialmente a fibras que comprenden péptidos monoméricos A β ₁₋₄₂ y/o es capaz de inducir la solubilización de fibrillas o filamentos de amiloide poliméricos de alto peso molecular preformados, formados por la agregación de péptidos monoméricos de amiloide, particularmente péptidos monoméricos de β -amiloide tales como, por ejemplo, péptidos monoméricos A β 1-39, 1-40, 1-41, 1-42 o 1-43, pero especialmente péptidos monoméricos A β ₁₋₄₂, dirigiéndose y específicamente uniéndose a un epítope en una región epítópica de la proteína β -amiloide, particularmente una región epítópica del polipéptido A β confinada por residuos de aminoácidos aa_n-aa_m, siendo n un entero entre 2 y 15, particularmente entre 5 y 15, más particularmente entre 8 y 15, aún más particularmente entre 10 y 15, y siendo m un entero entre 3 y 17, particularmente entre 6 y 17, más particularmente entre 9 y 17, aún más particularmente entre 11 y 17, donde n y m no pueden ser números idénticos y n tiene que ser siempre un número menor que m, con la diferencia entre n y m \geq 2.

En un aspecto específico, el anticuerpo se une a un epítope dentro de una región epítópica de la proteína β -amiloide que comprende los residuos de aminoácidos 1-10, pero particularmente los residuos de aminoácidos 1-9.

Dicho anticuerpo también se une específicamente a péptidos monoméricos y oligoméricos de amiloide solubles, particularmente péptidos monoméricos u oligoméricos de β -amiloide seleccionados del grupo que consiste en péptidos A β 1-39, 1-40, 1-41, 1-42 o 1-43, pero especialmente A β ₁₋₄₂, e inhibe la agregación de los monómeros u oligómeros A β en fibrillas poliméricas de alto peso molecular.

En un aspecto adicional, se divulga un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales de éste, anticuerpo que incorpora al menos una de las propiedades seleccionadas del grupo que consiste en agregación, inhibición, desagregación, inducción de transición conformacional, reconocimiento de, y unión directa a, un epítope en la región 4-16, particularmente en la región 1-9, pero especialmente una combinación de dos o más de dichas propiedades. Más específicamente, se divulga un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales de éste, anticuerpo que muestra una reactividad combinada contra la región 1-16 y 29-40, más particularmente contra la región 1-16 y la región 22-35, por cuanto es capaz de reconocer y unirse a ambas dichas regiones, la región 1-16 y 29-40 y la región 1-16 y 22-35, respectivamente, e incorpora al menos una de las propiedades mencionadas en la presente más arriba, es decir, agregación, inhibición, desagregación, inducción de transición conformacional, pero especialmente una combinación de dos o más de dichas propiedades.

Los anticuerpos que son inducidos por la composición de vacuna de acuerdo con la invención y que pueden ser obtenidos de un animal inmunizado o una línea celular de hibridoma que produce dichos anticuerpos, también se divultan en la presente.

- En un aspecto específico se divulga un anticuerpo que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales de éste, particularmente un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales de éste, que se puede obtener inmunizando un animal adecuado con una composición de vacuna como se describió en la presente más arriba, particularmente una composición de vacuna que comprende un antígeno peptídico A β _{1-16(Δ15)}, más particularmente un antígeno peptídico A β _{1-16(Δ14)} o A β _{1-16(Δ13)}, aún más particularmente un antígeno peptídico A β ₁₋₁₄, pero especialmente un antígeno peptídico A β ₁₋₁₅, anticuerpo que es un anticuerpo bifuncional y, después de co-incubación con péptidos monoméricos de amiloide, particularmente péptidos monoméricos de β -amiloide, tales como, por ejemplo, péptidos monoméricos A β 1-38, 1-39, 1-40, 1-41, 1-42 o 1-43, pero especialmente péptidos monoméricos A β ₁₋₄₂, inhibe la agregación de los monómeros A β a fibrillas poliméricas de alto peso molecular y, además, después de la co-incubación con filamentos o fibrillas de amiloide poliméricos de alto peso molecular preformados, formados por la agregación de péptidos monoméricos de amiloide, particularmente péptidos monoméricos de β -amiloide tales como, por ejemplo, péptidos monoméricos A β 1-39, 1-40, 1-41, 1-42 o 1-43, pero especialmente péptidos monoméricos A β ₁₋₄₂, es capaz de desagregar las fibrillas o los filamentos poliméricos preformados.
- En un aspecto específico se divulga un anticuerpo, particularmente un anticuerpo bifuncional, pero especialmente un anticuerpo monoclonal, particularmente un anticuerpo monoclonal bifuncional, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales de éste, que presenta alta especificidad por péptidos monoméricos A β ₁₋₄₂, pero no muestra esencialmente, o sólo en menor medida, una reactividad cruzada con respecto a péptidos monoméricos A β ₁₋₃₈, A β ₁₋₃₉, A β ₁₋₄₀, y/o A β ₁₋₄₁, particularmente un anticuerpo, pero especialmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales de éste, anticuerpo que es hasta 100 veces, particularmente 50 a 100 veces, más particularmente 80 a 100 veces, pero especialmente 100 veces más sensible al péptido amiloide A β ₁₋₄₂, en comparación con A β ₁₋₃₈, A β ₁₋₃₉, A β ₁₋₄₀, y/o A β ₁₋₄₁, y hasta 1000 veces, particularmente 500 a 1000 veces, más particularmente 800 a 1000 veces, pero especialmente 1000 veces más sensible al péptido amiloide A β ₁₋₄₂, en comparación con A β ₁₋₃₈, y por lo tanto es capaz de inhibir, *in vitro* e *in vivo*, la agregación de péptidos monoméricos amiloidogénicos, pero especialmente del péptido amiloide A β ₁₋₄₂.
- En otro aspecto específico se divulga un anticuerpo particularmente un anticuerpo bifuncional, pero especialmente un anticuerpo monoclonal, particularmente un anticuerpo monoclonal bifuncional, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales de éste, que tiene una alta sensibilidad de unión a un péptido amiloide A β ₁₋₄₂, y es capaz de detectar fibras de A β ₁₋₄₂ en una concentración tan baja como al menos 0,001 μ g, pero particularmente en un rango de concentración de entre 0,5 μ g y 0,001 μ g, más particularmente de entre 0,1 μ g y 0,001 μ g, pero especialmente en una concentración de 0,001 μ g.
- En un aspecto muy específico, se divulga un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales de éste, anticuerpo que es capaz de detectar fibras de A β ₁₋₄₂, hasta en una concentración mínima de 0,001 μ g y fibras de A β ₁₋₄₀, hasta en una concentración mínima de 0,1 μ g y fibras de A β ₁₋₃₈, hasta en una concentración mínima de una cantidad de 1 μ g de fibras.
- La unión de los anticuerpos como se describió en la presente más arriba, a péptidos monoméricos amiloidogénicos pero, particularmente, a la forma amiloide (1-42) lleva a una inhibición de la agregación de péptidos amiloidogénicos monoméricos a filamentos o fibrillas de alto peso molecular. A través de la inhibición de la agregación de péptidos monoméricos amiloidogénicos, los anticuerpos son capaces de evitar o hacer más lenta la formación de las placas de amiloide, particularmente la forma amiloide (1-42) que se sabe que se torna insoluble por cambio de conformación y representa la mayor parte de las placas de amiloide en el cerebro de los animales o los seres humanos enfermos.
- En un aspecto específico, se divulga un anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales de éste, anticuerpo que tiene las propiedades características de un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma EJ 7H3, depositada el 8 de diciembre de 2005 como DSM ACC2756.
- Más particularmente, el anticuerpo monoclonal, incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales de éste, es producido por la línea celular de hibridoma EJ 7H3, depositada el 8 de diciembre de 2005 como DSM ACC2756.
- Se divulga además un método para prevenir, tratar o mitigar los efectos de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placas de amiloide, incluyendo amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad, incluyendo, pero sin limitación, trastornos neurológicos, tales como la enfermedad de Alzheimer (AD), incluyendo enfermedades o condiciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva, tal como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), demencia de los cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés), el complejo de Parkinson-demencia de Guam, así como también otras enfermedades que se basan en, o están asociadas con, proteínas tipo amiloide, tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeld-Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con HIV, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes del adulto, amiloidosis cardíaca senil, tumores endocrinos, y otros, incluyendo degeneración macular, pero particularmente una enfermedad o condición caracterizada por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tal como, por ejemplo, el deterioro cognitivo leve (MCI), administrando un constructo antigénico supramolecular como se describió en la

presente, pero particularmente una vacuna que comprende tal constructo antigénico supramolecular a un animal, particularmente un mamífero o un ser humano, afectado por tal trastorno y que por lo tanto necesita tal tratamiento.

En otro aspecto, se divulga un método para la preparación de una composición de vacuna para inducir una respuesta inmune en un organismo, en particular un animal o ser humano afectado por tal trastorno, enfermedad o condición, y que por lo tanto necesita tal tratamiento para prevenir, tratar o mitigar los efectos de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placas de amiloide, incluyendo amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad, incluyendo, pero sin limitación, trastornos neurológicos, tales como la enfermedad de Alzheimer (AD), incluyendo enfermedades o condiciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de la memoria cognitiva, tal como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), demencia de los cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés), el complejo de Parkinson-demencia de Guam, así como también otras enfermedades que se basan en, o están asociadas con, proteínas tipo amiloide, tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeld-Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con HIV, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes del adulto, amiloidosis cardíaca senil, tumores endocrinos, y otros, incluyendo degeneración macular, pero particularmente una enfermedad o condición caracterizada por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tal como, por ejemplo, el deterioro cognitivo leve (MCI).

En un aspecto adicional, se divulga un método para la preparación de una composición de vacuna terapéutica para prevenir, tratar o mitigar los efectos de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placas de amiloide, incluyendo amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad, incluyendo, pero sin limitación, trastornos neurológicos, tales como la enfermedad de Alzheimer (AD), incluyendo enfermedades o condiciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de la memoria cognitiva, tal como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), demencia de los cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés), el complejo de Parkinson-demencia de Guam, así como también otras enfermedades que se basan en, o están asociadas con, proteínas tipo amiloide, tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeld-Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con HIV, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes del adulto, amiloidosis cardíaca senil, tumores endocrinos, y otros, incluyendo degeneración macular, pero particularmente una enfermedad o condición caracterizada por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tal como, por ejemplo, el deterioro cognitivo leve (MCI), que comprende formular un anticuerpo, como se describió en la presente, en una forma farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto específico, se usa una presentación de un antígeno que resulta en una mayor exposición y estabilización de una conformación de antígeno preferida, que lleva finalmente a una respuesta inmune altamente específica y resulta en la generación de anticuerpos con propiedades únicas.

En un aspecto, se divultan composiciones inmunogénicas que comprenden un constructo antigénico supramolecular que comprende un péptido β -amiloide, como se describió en la presente más arriba, representativo de la parte N-terminal del péptido β -amiloide, péptido antigénico que es 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 partes espirales aleatorias, α -helicoidales y β laminares. Esta conformación definida lleva a la inducción de una respuesta inmune fuerte y altamente específica después de la introducción en un animal o un ser humano.

En otro aspecto, la composición de vacuna como se describió en la presente, puede comprender además de un antígeno peptídico A β , particularmente el antígeno peptídico A β como se describió en la presente más arriba, un inhibidor de la activación del complemento. Además, se divulga una composición de vacuna y un método para producir una composición de este tipo para el tratamiento de enfermedades y trastornos que son causados por, o asociados con proteínas amiloide o tipo amiloide, incluyendo amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placas de amiloide incluyendo amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad, incluyendo, pero sin limitación, trastornos neurológicos, tales como enfermedad de Alzheimer (AD), particularmente una enfermedad o condición caracterizada por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tal como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), que comprende un fragmento de péptido de la parte N-terminal del péptido A β , particularmente un fragmento de péptido A β que consiste en un tramo único o repetitivo de entre 7 y 16 residuos de aminoácidos contiguos, especialmente de entre 13 y 16 residuos de aminoácidos contiguos, particularmente de la parte N-terminal del péptido A β , pero particularmente un fragmento de péptido A β que consiste en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en residuos 1-16, 1-15, 1-14, y 1-13 de la parte N-terminal del péptido A β , más particularmente del residuo 1-15 como se presenta en la SEQ ID NO: 1, incluyendo sus fragmentos funcionalmente equivalentes, pero especialmente un fragmento de péptido A β como se menciona en la presente antes de ser unido a, o incorporado o reconstituido en, una partícula portadora/adyuvante tal como, por ejemplo, un liposoma, junto con un inhibidor del sistema de complemento, particularmente un inhibidor de la vía del complemento, seleccionado del grupo que consiste en versiones solubles de proteínas reguladoras de la membrana, anticuerpos humanizados a proteínas del complemento, inhibidores de moléculas pequeñas que actúan en varias etapas de la vía del complemento y reguladores del complemento humano expresados en animales transgénicos.

Este tramo contiguo de 13 a 15 residuos de aminoácidos puede ser repetido en el constructo de acuerdo con 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.

En un aspecto específico, el inhibidor de la activación del complemento, que es un componente de la composición de vacuna terapéutica como se mencionó en la presente más arriba, es un compuesto seleccionado del grupo que consiste en el receptor 1 del complemento humano soluble, la proteína del complemento C5 anti-humano, tal como, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti-C5 humanizado o un fragmento de cadena simple de un anticuerpo monoclonal humanizado, un inhibidor-N de la C1-esterasa y un inhibidor de C1 humano natural.

Está comprendida además una composición de vacuna como se mencionó en la presente más arriba, que comprende además de un fragmento de péptido A β , particularmente el fragmento de péptido A β , como se describió en la presente, un efector alostérico de hemoglobina, el que una vez que se encuentra en las células rojas sanguíneas provoca una disminución de la afinidad O₂/hemoglobina de tal modo que se libera oxígeno de una manera regulada subsiguientemente a los tejidos.

En un aspecto, se divulga una composición de vacuna y un método para producir una composición como ésta para el tratamiento de enfermedades y trastornos que son causados por, o asociados con, proteínas amiloide o tipo amiloide, incluyendo amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placas de amiloide incluyendo amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad, incluyendo, pero sin limitación, trastornos neurológicos, tales como enfermedad de Alzheimer (AD), particularmente una enfermedad o condición caracterizada por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tal como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), que comprende un fragmento de péptido de la parte N-terminal del péptido A β , particularmente un fragmento de péptido A β que consiste en un tramo único o repetitivo de entre 7 y 16 residuos de aminoácidos contiguos, especialmente de entre 13 y 16 residuos de aminoácidos contiguos, particularmente de la parte N-terminal del péptido A β , pero particularmente un fragmento de péptido A β que consiste en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en residuos 1-16, 1-15, 1-14, y 1-13 de la parte N-terminal del péptido A β , más particularmente del residuo 1-15 como se presenta en la SEQ ID NO: 1, incluyendo sus fragmentos funcionalmente equivalentes, pero particularmente un fragmento de péptido A β como se mencionó en la presente más arriba que es modificado por residuos palmitoílo unidos en forma covalente a cada extremo del péptido para dar por resultado entre 2 y 4, particularmente 4 residuos palmitoílo, pero especialmente un fragmento de péptido A β como se menciona en la presente más arriba, unido a, o incorporado o reconstituido en, una partícula portadora/adyuvante tal como, por ejemplo, un liposoma, junto con un compuesto que provoca una disminución de la afinidad O₂/hemoglobina de tal modo que se libera oxígeno subsiguientemente a los tejidos de los órganos. Este tramo contiguo de 13 a 15 residuos de aminoácidos puede ser repetido en el constructo de acuerdo con 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.

En particular, los compuestos que pueden ser usados adecuadamente en una composición como ésta, son aquellos seleccionados del grupo que consiste en un fármaco antilipidémico tal como, por ejemplo, ácido clofíbrico o bezafibrato, incluyendo los derivados de bezafibrato LR16 y L35, derivados de urea, tales como, por ejemplo, ácido [2-[4-[[[arilamino)carbonil]amino]fenoxi]-2-metilpropiónico, un efector alostérico de hemoglobina.

El compuesto modulador de afinidad de O_2 /hemoglobina puede ser además un compuesto que comprende un ligando aniónico para un sitio alóstérico de hemoglobina, donde el ligando aniónico comprende un anillo pirofosfato interno, opcionalmente junto con un catión no tóxico tal como, por ejemplo, Ca^{2+} y Na^+ .

40 Más específicamente, la composición de vacuna terapéutica, como se mencionó en la presente más arriba, comprende además del fragmento de péptido A β , como se describió en la presente, derivados de hexafosfato de inositol (IHP) que comprenden un anillo pirofosfato interno, opcionalmente junto con un catión no tóxico, tal como, por ejemplo, Ca²⁺ y Na⁺.

45 En otro aspecto, la composición de vacuna, como se mencionó en la presente más arriba, comprende además de un fragmento de péptido A β , particularmente el fragmento de péptido A β como se describió en la presente, una combinación de un inhibidor del sistema de activación del complemento, particularmente un inhibidor de la vía del complemento seleccionado del grupo que consiste en versiones solubles de proteínas reguladoras de la membrana, anticuerpos humanizados a proteínas del complemento, inhibidores de moléculas pequeñas que actúan en varias etapas de la vía del complemento y reguladores del complemento humano expresados en animales transgénicos y
50 un efecto alostérico de hemoglobina, que reduce la afinidad de O₂/hemoglobina de tal modo que se libera más oxígeno subsiguiente a los tejidos, de una manera regulada.

55 Se divulga además en la presente una composición de vacuna y un método para producir una composición como ésta para el tratamiento de enfermedades y trastornos que son causados por, o asociados con proteínas amiloide o tipo amiloide, incluyendo amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placas de amiloide incluyendo amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad, incluyendo, pero sin limitación, trastornos neurológicos, tales como enfermedad de Alzheimer (AD), particularmente una enfermedad o condición caracterizada por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tal como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI) que comprende un fragmento de péptido de la parte N-terminal del péptido A β , particularmente un fragmento de péptido A β que consiste en un tramo único o repetitivo de entre 7 y 16 residuos de aminoácidos contiguos,

especialmente de entre 13 y 16 residuos de aminoácidos contiguos, particularmente de la parte N-terminal del péptido A β , pero particularmente un fragmento de péptido A β que consiste en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en los residuos 1-16, 1-15, 1-14, y 1-13 de la parte N-terminal del péptido A β , más particularmente del residuo 1-15 como se presenta en la SEQ ID NO: 1, incluyendo sus fragmentos 5 funcionalmente equivalentes, pero particularmente un fragmento de péptido A β como se mencionó en la presente más arriba que es modificado por residuos palmitoílo unidos en forma covalente a cada extremo del péptido para dar por resultado entre 2 y 4, particularmente 4 residuos palmitoílo, pero especialmente un fragmento de péptido A β como se menciona en la presente más arriba, unido a, o incorporado o reconstituido en, una partícula 10 portadora/adyuvante tal como, por ejemplo, un liposoma, junto con un inhibidor del sistema de complemento, particularmente un inhibidor de la activación del complemento seleccionado del grupo que consiste en versiones solubles de proteínas reguladoras de la membrana, anticuerpos humanizados a proteínas del complemento, inhibidores de moléculas pequeñas que actúan en varias etapas de la vía del complemento y reguladores del complemento humano expresados en animales transgénicos, y un compuesto, particularmente un efecto alostérico 15 de hemoglobina, que disminuye la afinidad de O₂/hemoglobina de tal modo que se libera más oxígeno subsiguentemente a los tejidos, de una manera regulada.

Este tramo contiguo de 13 a 15 residuos de aminoácidos puede ser repetido en el constructo de acuerdo con 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.

En un aspecto adicional, se divulga un método para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada con amiloide, que comprende administrar a un animal, particularmente a un mamífero, pero especialmente a un ser humano que padece de tal enfermedad o condición, una composición de vacuna terapéutica, como se describió en la presente más arriba, particularmente una composición de vacuna que comprende un antígeno peptídico A β ₁₋₁₅, más particularmente un antígeno peptídico A β ₁₋₁₅ 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 y el IgG2b.

En otro aspecto específico, la administración de dicha composición de vacuna da por resultado principalmente la generación de anticuerpos de la subclase IgG independiente de las células T, particularmente del isotipo IgG3.

En un aspecto adicional, la administración de dicha composición de vacuna no lleva a un aumento significativo de 30 los marcadores de inflamación en el cerebro, particularmente de los marcadores de inflamación seleccionados del grupo que consiste en IL-1 β , IL-6, IFN- γ y TNF α .

En otro aspecto adicional, la administración de dicha composición de vacuna lleva a una disminución significativa de A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂ insolubles, relacionados con las placas, en el cerebro.

En otro aspecto adicional, la administración de dicha composición de vacuna lleva a una reducción significativa del 35 nivel de A β ₁₋₄₂ soluble en el cerebro.

En particular, la enfermedad o condición asociada a amiloide es una seleccionada del grupo que consiste en enfermedades que incluyen, pero no están limitadas a, trastornos neurológicos, tales como la enfermedad de Alzheimer (AD), incluyendo enfermedades o condiciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), demencia de cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés), el complejo de Parkinson-Demencia de Guam, así como otras enfermedades que se basan en, o están asociadas con, las proteínas tipo amiloide, tales como la parálisis supranuclear progresiva, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Creutzfeld-Jacob, la enfermedad de Parkinson, la demencia relacionada con HIV, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), la diabetes del adulto, amiloidosis cardíaca senil, tumores endocrinos, y otros, incluyendo la degeneración macular.

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

En otro aspecto específico, se proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada con amiloide, como se describió en la presente más arriba, donde la administración de dicha composición de vacuna a un animal, particularmente un mamífero o un ser humano, que padece de una condición asociada a amiloide, caracterizada por una pérdida de la capacidad de la memoria cognitiva, lleva a un aumento, particularmente a una 50 restauración completa de la retención de la capacidad de memoria cognitiva.

En otro aspecto específico, se proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada con amiloide, como se describió en la presente más arriba, que comprende administrar a un animal, particularmente un mamífero o un ser humano, que padece de tal enfermedad o condición, una composición de vacuna terapéutica que comprende un constructo antigénico como se describió en la presente más arriba y un inhibidor del sistema de complemento, donde dicha composición de vacuna es administrada particularmente de tal modo que el inhibidor de complemento y el constructo antigénico son administrados en forma concomitante, intermitente o secuencial.

En un aspecto específico, el inhibidor del complemento es administrado antes de la vacunación con el constructo antigenico, particularmente dentro de una ventana de tiempo comenzando 20 horas antes de la vacunación y finalizando inmediatamente antes de la vacunación.

5 En otro aspecto específico, el inhibidor de complemento es administrado subsiguentemente a la vacunación con el constructo antigenico dentro de una ventana de tiempo comenzando inmediatamente después de la vacunación y finalizando 1 día después de la aplicación de la vacuna.

En otro aspecto adicional, se proporciona un método para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada a amiloide que comprende usar una composición de vacuna, como se describió en la presente más arriba.

10 Estos y otros objetos, características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes después de una revisión de la siguiente descripción detallada de la forma de realización divulgada y las reivindicaciones adjuntas.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína", como se usan en la presente, son intercambiables y son definidos como una biomolécula compuesta por aminoácidos unidos por un enlace peptídico.

15 El término "péptidos" implica cadenas de aminoácidos (típicamente L-aminoácidos) cuyos carbonos alfa están unidos mediante enlaces peptídicos formados 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 en un extremo de la cadena (es decir, el amino terminal) tiene un grupo amino libre, mientras que el aminoácido terminal en el otro extremo de la cadena (es decir, el carboxi terminal) tiene un grupo carboxilo libre. En consecuencia, el término "extremo amino" (abreviado extremo N) se refiere al grupo alfa-amino libre en el aminoácido en el amino terminal del péptido, o al grupo alfa-amino (grupo imino cuando participa en un enlace peptídico) de un aminoácido en cualquier otra ubicación dentro del péptido. De modo similar, la expresión "extremo carboxi" (abreviado extremo C) se refiere al grupo carboxilo libre en el aminoácido en el extremo carboxi de un péptido, o al grupo carboxilo de un aminoácido en cualquier otra ubicación dentro del péptido.

20 25 Típicamente, los aminoácidos que forman un péptido están numerados por orden, comenzando con el amino terminal y aumentando en la dirección hacia el carboxi terminal del péptido. Por lo tanto, cuando se dice que un aminoácido "sigue" a otro, ese aminoácido está posicionado más cerca del carboxi terminal del péptido que el aminoácido precedente.

30 El término "residuo" se usa en la presente para referirse a un aminoácido que está incorporado en un péptido por un enlace amida. En consecuencia, el aminoácido puede ser un aminoácido que existe naturalmente o, a menos que esté limitado de otro modo, puede comprender análogos conocidos de aminoácidos naturales que funcionan de una manera similar a los aminoácidos que existen naturalmente (es decir, aminoácido-miméticos). Además, un mimético de enlace amida incluye modificaciones de la estructura del péptido bien conocidas por los expertos en la técnica.

35 40 La frase "consiste esencialmente en" se usa en la presente para excluir cualesquiera elementos que podrían alterar sustancialmente las propiedades esenciales de los péptidos a los cuales se refiere la frase. Por lo tanto la descripción de un péptido "que consiste esencialmente en..." excluye cualesquiera sustituciones, adiciones, o delecciones de aminoácidos que podrían alterar sustancialmente la actividad biológica de ese péptido.

Además, un experto en la técnica reconocerá que, como se mencionó más arriba, sustituciones, delecciones o adiciones individuales que alteren, agreguen o delejen un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos (típicamente menos de 5%, más típicamente menos de 1%) en una secuencia codificada son variaciones modificadas en forma conservadora, donde las alteraciones resultan en la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Los siguientes seis grupos contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservadoras de uno para el otro:

- 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).

50 Las frases "aislado" o "biológicamente puro", se refieren a material que está sustancial o esencialmente libre de componentes que normalmente lo acompañan, como se encuentra en su estado nativo. Por lo tanto, los péptidos descriptos en la presente no contienen materiales normalmente asociados con su medio ambiente *in situ*. Típicamente, los péptidos inmunogénicos, aislados, descriptos en la presente son al menos aproximadamente 80%

puros, usualmente al menos aproximadamente 90%, y preferentemente al menos aproximadamente 95%, medidos por la intensidad de banda en un gel con coloración de plata.

La pureza o la homogeneidad de la proteína puede ser indicada por una cantidad de métodos bien conocidos en la técnica, tales como electroforesis en gel de poliacrilamida de una muestra de proteína, seguido por visualización después de coloración. Para algunos propósitos se requerirá una alta resolución y se utilizará HPLC o un medio similar para la purificación.

Cuando los péptidos inmunogénicos son de longitud relativamente corta (es decir, menos de aproximadamente 50 aminoácidos), entonces son sintetizados frecuentemente usando técnicas de síntesis de péptidos químicas estándar.

10 La síntesis en fase sólida en la cual el aminoácido C-terminal de la secuencia está unido a un soporte insoluble seguido por adición secuencial de los aminoácidos restantes en la secuencia es un método preferido para la síntesis química de los péptidos inmunogénicos descriptos en la presente. Las técnicas para la síntesis en fase sólida son conocidas por los expertos en la técnica.

15 Alternativamente, los péptidos inmunogénicos descriptos en la presente son sintetizados usando la metodología de ácidos nucleicos recombinante. En general, esto involucra crear una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el péptido, colocar el ácido nucleico en un casete de expresión bajo el control de un promotor particular, expresar el péptido en un huésped, aislar el péptido o polipéptido expresado, y, si se requiere, renaturalizar el péptido. En la literatura se encuentran técnicas suficientes para guiar a un experto en tales procedimientos.

20 Una vez expresados, los péptidos recombinantes pueden ser purificados de acuerdo con procedimientos estándar, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel, y similares. Las composiciones sustancialmente puras de aproximadamente 50% a 95% de homogeneidad se prefieren, y de 80% a 95% o más homogeneidad se prefieren más aún, para usar como agentes terapéuticos.

25 Un experto en la técnica reconocerá que después de la síntesis química, la expresión biológica o la purificación, los péptidos inmunogénicos pueden poseer una conformación sustancialmente diferente que las conformaciones nativas de los péptidos constitutivos. En este caso, frecuentemente es necesario desnaturalizar y reducir el péptido antiproliferativo y luego hacer que el péptido se repliegue en la conformación preferida. Métodos para reducir y desnaturalizar proteínas e inducir un repliegue son bien conocidos por los expertos en la técnica.

La antigenicidad de la proteína purificada puede ser confirmada, por ejemplo, demostrando la reacción con suero inmune, o con antisuero producido contra la proteína propiamente dicha.

30 Los términos "un", "una" y "el", "la", como se usan en la presente, se definen con el significado de "uno o más" e incluyen el plural, a menos que el contexto sea inapropiado.

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

35 Por "aislado" se entiende una molécula biológica libre de al menos algunos de los componentes con los cuales existe naturalmente.

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

45 "Anticuerpos", dentro del alcance de la presente invención, pretende incluir anticuerpos monoclonales, policlonales, químicos, de cadena simple, biespecíficos, simianizados, humanos y humanizados, así como también fragmentos activos de estos. Ejemplos de fragmentos activos de moléculas que se unen a antígenos conocidos incluyen los fragmentos Fab y F(ab')₂, incluyendo los productos de una biblioteca de expresión de inmunoglobulina Fab y fragmentos que se unen a epítopos de cualquiera de los anticuerpos y fragmentos mencionados más arriba.

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

Un "anticuerpo humanizado" se refiere a un tipo de anticuerpo creado por ingeniería genética que tiene sus CDRs

derivadas de una inmunoglobulina dadora no humana, las partes restantes derivadas de inmunoglobulina de la molécula son derivadas de una (o más) inmunoglobulinas humanas. Además, los residuos de soporte de la estructura pueden ser alterados para preservar la afinidad de unión. Los métodos para obtener "anticuerpos humanizados" son bien conocidos por los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 10029-10032 (1989), Hodgson et al., Bio/Technology, 9: 421 (1991)).

Un "anticuerpo humanizado" también se puede obtener por medio de una propuesta de ingeniería genética nueva que permite la producción de anticuerpos policlonales tipo humano madurados por afinidad en animales grandes, tales como, por ejemplo, conejos (<http://www.rctech.com/bioventures/therapeutic.php>).

El término "anticuerpo monoclonal" también es muy reconocido en la técnica y se refiere a un anticuerpo que es producido en masa en el laboratorio a partir de un solo clon y que reconoce sólo un antígeno. Los anticuerpos monoclonales son preparados típicamente fusionando una célula B que produce anticuerpos, normalmente de vida corta, a una célula que crece rápidamente, tal como una célula de cáncer (denominada algunas veces célula "inmortal"). La célula híbrida resultante, o hibridoma, se multiplica rápidamente, creando un clon que produce grandes cantidades del anticuerpo.

Por "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 un anticuerpo mencionado más arriba y descripto en la presente, que comprende: especificidad de unión a la proteína β -amiloide, particularmente a la proteína $\text{A}\beta_{1-42}$, y más particularmente a la región epitópica 4-16 de la proteína $\text{A}\beta_{1-42}$, inmunorreactividad *in vitro*, inhibición de la agregación de los monómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$, en fibrillas poliméricas de alto peso molecular y/o desagregación de fibrillas poliméricas $\text{A}\beta_{1-42}$, preformadas, y/o una propiedad de ruptura de la lámina β y mitigación de los efectos de los trastornos asociados con amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placas de amiloide, incluyendo amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad, incluyendo, pero sin limitación, trastornos neurológicos, tales como la enfermedad de Alzheimer (AD), incluyendo enfermedades o condiciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de la memoria cognitiva, tal como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), demencia de los cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés), el complejo de Parkinson-demencia de Guan, así como también otras enfermedades que se basan en, o están asociadas con, proteínas tipo amiloide, tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeld-Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con HIV, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes del adulto, amiloidosis cardíaca senil, tumores endocrinos, y otros, incluyendo degeneración macular, cuando se administra profiláctica o terapéuticamente. Los anticuerpos pueden ser de cualquier clase tal como IgG, IgM o IgA, etc., o cualquier subclase tal como IgG1, IgG2a, etc. y otras subclases mencionadas en la presente más arriba o conocidas en la técnica. Además, los anticuerpos pueden ser producidos por cualquier método, tal como display de fagos, o producidos en cualquier organismo o línea celular, incluyendo bacterias, insectos, mamíferos u otro tipo de célula o línea celular que produce anticuerpos con características deseadas, tal como anticuerpos humanizados. Los anticuerpos también pueden ser formados combinando una parte Fab y una región Fc de diferentes especies.

El término "antígeno" se refiere a una entidad o fragmento de éste que puede inducir una respuesta inmune en un organismo, particularmente un animal, más particularmente un mamífero, incluyendo un ser humano. El término incluye inmunógenos y regiones responsables de la antigenicidad o determinantes antigenéticos.

Como se usa en la presente, el término "soluble" significa parcial o completamente disuelto en una solución acuosa.

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

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

El término "hibridoma" es reconocido en la técnica y los expertos en la técnica entienden que se refiere a una célula producida por la fusión de una célula que produce anticuerpos y una célula inmortal, por ejemplo, una célula de mieloma múltiple. Esta célula híbrida es capaz de producir un suministro continuo de anticuerpo. Ver la definición de "anticuerpo monoclonal" más arriba y los Ejemplos más abajo para una descripción más detallada del método de fusión.

El término "portador" como se usa en la presente significa una estructura en la cual el péptido antigenético o el constructo supramolecular puede ser incorporado en, o puede ser asociado con, presentando de este modo, o exponiendo, péptidos antigenéticos o parte del péptido al sistema inmune de un ser humano o un animal. Cualquier partícula que puede ser usada adecuadamente en la terapia de un ser humano o un animal, tal como por ejemplo, una vesícula, una partícula o un cuerpo particulado, se puede usar como un portador dentro del contexto de la presente invención.

El término "portador" comprende además métodos de suministro, donde composiciones de constructos antigenéticos

supramoleculares que comprenden el péptido antigénico pueden ser transportadas a sitios deseados por mecanismos de suministro. Un ejemplo de un sistema de suministro de este tipo utiliza metales coloidales tales como oro coloidal.

5 Las proteínas portadoras que se pueden usar en las composiciones de constructo antigénico supramolecular como se describieron en la presente incluyen, pero no están limitadas a, la proteína que une la maltosa "MBP", la albúmina sérica bovina "BSA", la hemocianina de lapa californiana "KLH", ovalbúmina, flagelina, tiroglobulina, albúmina sérica de cualquier especie, gammaglobulina de cualquier especie, células singénicas, células singénicas que llevan antígenos la, y polímeros de D- y/o L-aminoácidos.

10 En el constructo antigénico supramolecular, como se describió en la presente, el liposoma puede tener una función dual por cuanto puede ser usado como un portador que comprende el constructo supramolecular como se describió en la presente más arriba, y, al mismo tiempo, funcionar como un adyuvante para aumentar o estimular la respuesta inmune dentro del objetivo animal o humano a ser tratado con la vacuna terapéutica como se describió en la presente. Debe entenderse también que las composiciones de constructo antigénico supramolecular de la presente invención pueden comprender además adyuvantes adicionales incluyendo, pero sin limitación, la hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina sérica bovina (BSA) y otros adyuvantes, tales como, por ejemplo, lípido A, 15 alumbre, fosfato de calcio, interleuquina 1, y/o microcápsulas de polisacáridos y proteínas, pero particularmente un lípido A detoxificado tal como monofosforil o difosforil lípido A, o alumbre, otros conservantes, diluyentes, emulsionantes, estabilizadores, y otros componentes que son conocidos y usados en vacunas del arte previo. Además, se puede usar en la composición cualquier sistema adyuvante conocido en la técnica. Tales adyuvantes 20 incluyen, pero no están limitados a, el adyuvante incompleto de Freund, adyuvante completo de Freund, manano acetilado ligado a β -(1,4) polidispersado ("Acemannan", Titermax® (adyuvantes de copolímero de polioxietileno-polioxipropileno de CytRx Corporation), adyuvantes de lípidos modificados de Chiron Corporation, adyuvantes derivados de saponina de Cambridge Biotech, *Borderella pertussis* inactivada, el lipopolisacárido (LPS) de bacterias 25 gram-negativas, aniones poliméricos grandes tales como sulfato de dextrano, y geles inorgánicos tales como alumbre, hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio.

Además, la expresión "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad de composición antigénica/inmunogénica que, cuando se administra a un ser humano o un animal, provoca una respuesta inmune. La cantidad efectiva es fácilmente determinada por un experto en la técnica siguiendo los procedimientos de rutina.

30 El término "constructo antigénico supramolecular" se refiere a un constructo antigénico como se describió en la presente más arriba. En particular "constructo antigénico supramolecular" se refiere a un constructo antigénico que comprende un antígeno peptídico A β , como se describió en la presente más arriba, específicamente un fragmento de péptido A β de la parte terminal N del péptido A β , pero particularmente un fragmento de péptido A β que consiste en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10), 1-16(Δ 12), 1-16(Δ 13), 1-16(Δ 14), 1-16(Δ 15), 1-15(Δ 2), 1-35 15(Δ 4), 1-15(Δ 5), 1-15(Δ 6), 1-15(Δ 8), 1-15(Δ 9), 1-15(Δ 10), 1-15(Δ 12), 1-15(Δ 13), 1-15(Δ 14), particularmente un antígeno peptídico A β _{1-16(Δ 15)}, más particularmente un antígeno peptídico A β _{1-16(Δ 14)} o A β _{1-16(Δ 13)}, aún más particularmente un antígeno peptídico A β ₁₋₁₄, específicamente un antígeno péptido A β ₁₋₁₅, pero especialmente un fragmento de péptido que consiste en los residuos de aminoácidos 1-15, como se presenta en la SEQ ID NO: 1 y 1-40 16(Δ 14), como se presenta en la SEQ ID NO: 3, péptido antigénico que es presentado unido a, o incorporado o reconstituido en, un portador tal como, por ejemplo, un liposoma. Más particularmente, el péptido antigénico como se describió en la presente, es modificado por una parte lipofílica o hidrofóbica, que facilita la inserción en la bicapa lipídica del portador de liposoma/adyuvante inmunitario, particularmente por una parte lipofílica o hidrofóbica que incluye, pero no limitada a, un ácido graso, un triglicérido o un fosfolípido, pero especialmente un ácido graso, un triglicérido o un fosfolípido, donde la estructura de carbono del ácido graso tiene al menos 10 átomos de carbono 45 que funciona como un anclaje para el péptido en la bicapa del liposoma y tiene una dimensión que lleva al péptido a ser posicionado y estabilizado en estrecha proximidad a la superficie del liposoma.

50 Por ejemplo, las composiciones de constructo antigénico supramolecular pueden ser administradas parenteralmente, pero particularmente en forma intraperitoneal, intravenosa, subcutánea e intramuscular en un rango de aproximadamente 1,0 μ g a 10,0 mg por paciente, aunque este rango no pretende ser limitativo. La cantidad real de la composición requerida para provocar una respuesta inmune variará para cada paciente individual dependiendo de la inmunogenicidad de la composición administrada y de la respuesta inmune del individuo. En consecuencia, la cantidad específica administrada a un individuo será determinada por la experimentación de rutina y basada en el entrenamiento y la experiencia del experto en la técnica.

55 Los constructos antigénicos supramoleculares pueden ser usados para la preparación de una composición de vacuna para inducir una respuesta inmune en un organismo, en particular un animal o un ser humano, para prevenir, tratar o mitigar los efectos de amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placas de amiloide, incluyendo amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad, incluyendo, pero sin limitación, trastornos neurológicos, tales como la enfermedad de Alzheimer (AD), incluyendo enfermedades o condiciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de la memoria cognitiva, tal como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), demencia de los cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés), el complejo de Parkinson-demencia de Guam, así como también otras

enfermedades que se basan en, o están asociadas con, proteínas tipo amiloide, tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeld-Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con HIV, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes del adulto, amiloidosis cardíaca senil, tumores endocrinos, y otros, incluyendo degeneración macular, pero particularmente una enfermedad o condición caracterizada por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva, tal como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI).

Por lo tanto, en un aspecto, se divulga un método para prevenir, tratar o mitigar los efectos de amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placas de amiloide, incluyendo amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad, incluyendo, pero sin limitación, trastornos neurológicos, tales como la enfermedad de Alzheimer (AD), incluyendo enfermedades o condiciones caracterizadas por una pérdida de la

capacidad de la memoria cognitiva, tal como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), demencia de los cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés), el complejo de Parkinson-demencia de Guam, así como también otras enfermedades que se basan en, o están asociadas con, proteínas tipo amiloide, tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeld-Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con HIV, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes del

adulto, amiloidosis cardíaca senil, tumores endocrinos, y otros, incluyendo degeneración macular, pero particularmente una enfermedad o condición caracterizada por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva, tal como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), administrando un constructo antigénico supramolecular, como se describió en la presente, pero particularmente una composición de vacuna que comprende tales constructos antigénicos supramoleculares a un animal, particularmente un mamífero o un ser humano, afectado por tal trastorno y que por lo tanto necesita tal tratamiento.

En otro aspecto, se proporciona un método para la preparación de una composición de vacuna para inducir una respuesta inmune en un organismo, en particular un animal o un ser humano afectado por tal trastorno, enfermedad o condición y que por lo tanto necesita tal tratamiento para prevenir, tratar o mitigar los efectos de amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placas de amiloide, incluyendo amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad, incluyendo, pero sin limitación, trastornos neurológicos, tales como la enfermedad de Alzheimer (AD), incluyendo enfermedades o condiciones caracterizadas por una pérdida de la

capacidad de la memoria cognitiva, tal como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), demencia de los cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés), el complejo de Parkinson-demencia de Guam, así como también otras enfermedades que se basan en, o están asociadas con, proteínas tipo amiloide, tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeld-Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con HIV, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes del

adulto, amiloidosis cardíaca senil, tumores endocrinos, y otros, incluyendo degeneración macular, pero particularmente una enfermedad o condición caracterizada por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva, tal como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI).

35 En otro aspecto, se proporciona por lo tanto un método para la preparación de una composición para prevenir, tratar o mitigar los efectos de amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placas de amiloide, incluyendo amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad, incluyendo, pero sin limitación, trastornos neurológicos, tales como la enfermedad de Alzheimer (AD), incluyendo enfermedades o condiciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de la memoria cognitiva, tal como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), demencia de los cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés), el complejo de Parkinson-demencia de Guam, así como también otras enfermedades que se basan en, o están asociadas con, proteínas tipo amiloide, tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeld-Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con HIV, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes del

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

En un aspecto específico, se hace uso de una presentación de antígeno que resulta en una mayor exposición y estabilización de una conformación antigénica preferida, que lleva finalmente a una respuesta inmune altamente específica y resulta en la generación de anticuerpos con propiedades únicas.

En un aspecto, se divultan composiciones inmunogénicas que comprenden un constructo antigénico supramolecular que comprende un antígeno peptídico β -amiloide, como se describió en la presente más arriba, representativo de la parte N-terminal del péptido β -amiloide, péptido antigénico que es 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 partes de espirales aleatorias, α -helicoidales y β laminares. Esta conformación definida lleva a la inducción de una respuesta inmune fuerte y altamente específica después de la introducción en un animal o un ser humano.

Una manera de lograr la formación y estabilización de la conformación deseada del péptido antigénico es presentando el péptido antigénico unido a, o incorporado o reconstituido, parcial o completamente, en un portador, tal como, por ejemplo, una vesícula, un cuerpo particulado o una molécula o cualquier otro medio que pueda servir adecuadamente como un portador/adyuvante para el péptido antigénico. En un aspecto específico, el péptido

5 antigénico está unido a, o incorporado o reconstituido en, el portador a través de interacciones débiles, tales como, por ejemplo, interacciones de van der Waal, interacciones hidrofóbicas o electrostáticas, o una combinación de dos o más de dichas interacciones, de tal modo que el péptido se presenta con una conformación específica, que es mantenida y estabilizada restringiendo a dicho péptido antigénico en su libertad de movimiento tridimensional de modo que se evitan o se restringen severamente los cambios conformacionales.

10 Cuando se usa una vesícula, una partícula o un cuerpo particulado como un portador/adyuvante tal como, por ejemplo, un liposoma, la composición del péptido antigénico puede ser elegida de tal modo que su carga neta total sea idéntica a la de la superficie del portador/adyuvante al cual está unido el péptido. Siendo las fuerzas de repulsión electrostáticas efectivas entre la superficie del portador/adyuvante cargado idénticamente y el péptido antigénico, pero particularmente la superficie del portador cargado idénticamente y los residuos de aminoácidos que constituyen el péptido antigénico, y más particularmente la superficie del portador cargado idénticamente y los residuos de aminoácidos cargados idénticamente comprendidos en el péptido antigénico, puede llevar a que el péptido antigénico tome una conformación definida, altamente específica y estabilizada, que garantiza una alta actividad biológica. Como resultado, el péptido antigénico es expuesto y presentado en una conformación que es altamente 15 biológicamente activa por cuanto permite que el sistema inmune del organismo objetivo interactúe libremente con los determinantes antigenicos contenidos en el constructo antigenico en la conformación biológicamente activa, que lleva a una respuesta inmune fuerte y específica de la conformación que da por resultado, por ejemplo, un alto título de anticuerpos en el organismo objetivo.

20 Coordinando cuidadosamente las cargas netas totales del péptido antigénico por un lado y del portador al cual se une el péptido, incorporado o reconstituido, por otro lado, el péptido antigénico es presentado expuesto a, o en estrecha proximidad a, la superficie del portador en una conformación que es inducida y estabilizada por fuerzas de repulsión electrostáticas que son efectivas entre la superficie del portador cargado idénticamente y el péptido antigénico, pero particularmente la superficie del portador cargado idénticamente y los residuos de aminoácidos que constituyen el péptido antigénico y más particularmente, la superficie del portador cargado idénticamente y los 25 residuos de aminoácidos cargados idénticamente comprendidos en el péptido antigénico. Esto da por resultado una presentación del constructo antigenico de tal modo que es libremente accesible al mecanismo de defensa inmune del organismo objetivo y por lo tanto capaz de inducir una respuesta inmunogénica fuerte y altamente específica después de la administración a un animal o un ser humano. La respuesta inmunogénica puede ser aumentada adicionalmente usando un liposoma como un portador, liposoma que puede funcionar como un adyuvante para 30 aumentar o estimular la respuesta inmune en el animal o ser humano objetivo a ser tratado con la vacuna terapéutica, como se describió en la presente. Opcionalmente, el liposoma puede contener, además, un adyuvante adicional, tal como, por ejemplo, lípido A, alumbre, fosfato de calcio, interleuquina 1 y/o microcápsulas de polisacáridos y proteínas, pero particularmente un lípido A detoxificado, tal como monofosforil o difosforil lípido A o alumbre.

35 En un aspecto específico, se usa un péptido antigénico, como se describió en la presente más arriba, particularmente un péptido antigénico cuya carga neta total es negativa, reconstituido en un liposoma, particularmente un liposoma cuyos componentes son elegidos de tal modo que la carga total neta del grupo cabeza del liposoma es negativa. En particular, el liposoma está compuesto por componentes seleccionados del grupo que consiste en dimiristoil fosfatidil colina (DMPC), dimiristoil fosfatidil etanolamina (DMPEA), dimiristoil fosfatidil glicerol (DMPG) y colesterol y, opcionalmente, contiene además monofosforil lípido A o cualquier otro adyuvante que puede ser usado adecuadamente dentro del alcance de la presente invención, tal como, por ejemplo, alumbre, fosfato de calcio, interleuquina 1 y/o microcápsulas de polisacáridos y proteínas.

40 En otro aspecto específico, se proporciona un antígeno peptídico modificado, como se describió en la presente más arriba, unido en forma covalente a una molécula tipo anclaje que es capaz de insertarse en el portador/adyuvante fijando de este modo el péptido al portador/adyuvante y presentándolo en o en estrecha proximidad a la superficie 45 de una molécula portadora/adyuvante de tal modo que las fuerzas electrostáticas pueden tornarse efectivas, como se describió en la presente más arriba.

50 Cuando se usan liposomas como un portador/adyuvante, el constructo de péptido antigénico tiene generalmente una cola hidrofóbica que se inserta en la membrana del liposoma a medida que se forma. Adicionalmente, los péptidos antigenicos pueden ser modificados para contener una cola hidrofóbica, de modo que puede ser insertada en el liposoma.

55 Los constructos antigenicos supramoleculares, descriptos en la presente, comprenden generalmente péptidos modificados para aumentar el efecto antigenico donde tales péptidos pueden ser modificados vía pegilación (usando polietilenglicol o polietilenglicol modificado), o modificados a través de otros métodos, tales como por ácido palmítico, como se describió en la presente más arriba, poli-aminoácidos (por ejemplo, poli-glicina, poli-histidina), polisacáridos (por ejemplo, ácido poligalacturónico, ácido poliláctico, poliglicolído, quitina, quitosano), polímeros sintéticos (poliamidas, poliuretanos, poliésteres) o copolímeros (por ejemplo, poli(ácido metacrílico) y N-(2-hidroxi)propil metacrilamida) y similares.

60 En un aspecto específico, se proporcionan los péptidos antigenicos, como se describió en la presente más arriba, que son modificados para contener una cola hidrofóbica de modo que dichos péptidos pueden ser insertados en el

liposoma. En particular, el péptido β -amiloide puede ser modificado por una parte lipofílica o hidrofóbica que facilita la inserción en la bicapa del lípido del portador/adyuvante. Las partes lipofílicas o hidrofóbicas pueden ser ácidos grasos, triglicéridos y fosfolípidos, particularmente ácidos grasos, triglicéridos y fosfolípidos, donde la estructura de carbono del ácido graso tiene al menos 10 átomos de carbono, particularmente partes lipofílicas que tienen ácidos grasos con una estructura de carbono de al menos aproximadamente 14 átomos de carbono y hasta aproximadamente 24 átomos de carbono, más particularmente partes hidrofóbicas que tienen una estructura de carbono de al menos 14 átomos de carbono. Ejemplos de partes hidrofóbicas incluyen, pero no están limitadas a, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido mirístico, ácido láurico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico y colesterol o DSPE. En un aspecto específico, la parte hidrofóbica es ácido palmítico.

La palmitoilación, mientras proporciona un anclaje para el péptido en la bicapa del liposoma, debido a la longitud relativa reducida de la parte de ácido graso C_{16:0} lleva a que el péptido sea presentado expuesto en, o en estrecha proximidad a, la superficie del liposoma. Por lo tanto, las células que procesan el antígeno tendrán que tomar todo el liposoma con el péptido. En otro aspecto, se usa PEG en la preparación de un constructo supramolecular, donde el extremo PEG libre está unido en forma covalente a una molécula de fosfatidiletanolamina (donde el ácido graso puede ser: ácido mirístico, palmítico, esteárico, oleico, etc., o una combinación de estos). Esta estructura supramolecular puede ser reconstituida en liposomas que consisten en fosfolípidos y colesterol (fosfatidiletanol amina, fosfatidil glicerol, colesterol en diversas relaciones molares). Se pueden usar también otros fosfolípidos. El lípido A se usa a una concentración de aproximadamente 40 μ g/pmol de fosfolípidos.

Otro aspecto es proporcionar composiciones de vacunas que comprenden constructos antigenicos supramoleculares que comprenden un péptido antigenico como se describió en la presente más arriba, péptido que es modificado de modo de aumentar el efecto antigenico, donde tal péptido, particularmente un fragmento de péptido A β de la parte N-terminal del péptido A β , pero particularmente un fragmento de péptido A β que consiste en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10), 1-16(Δ 12), 1-16(Δ 13), 1-16(Δ 14), 1-16(Δ 15), 1-15(Δ 2), 1-15(Δ 4), 1-15(Δ 5), 1-15(Δ 6), 1-15(Δ 8), 1-15(Δ 9), 1-15(Δ 10), 1-15(Δ 12), 1-15(Δ 13), 1-15(Δ 14), particularmente un antígeno peptídico A β _{1-16(Δ 15)}, más particularmente un antígeno peptídico A β _{1-16(Δ 14)} o A β _{1-16(Δ 13)}, aún más particularmente un antígeno peptídico A β ₁₋₁₄, específicamente un antígeno péptido A β ₁₋₁₅, pero especialmente un fragmento de péptido que consiste en los residuos de aminoácidos 1-15, como se presenta en la SEQ ID NO: 1 y 1-16(Δ 14), como se presenta en la SEQ ID NO: 3, es modificado vía pegilación (usando polietilenglicol o polietilenglicol modificado), o modificado a través de otros métodos, tales como por ácido palmítico, como se describió en la presente más arriba, poli-aminoácidos (por ejemplo, poli-glicina, poli-histidina), poli-sacáridos (por ejemplo, ácido poligalacturónico, ácido poliláctico, poliglicolido, quitina, quitosano), polímeros sintéticos (poliamidas, poliuretanos, poliésteres) o copolímeros 8por ejemplo, poli(ácido metacrílico) y N-(2-hidroxi)propil metacrilamida) y similares.

En otro aspecto, el antígeno peptídico β -amiloide, como se describió en la presente más arriba, es un fragmento de péptido A β palmitoilado de la parte N-terminal del péptido A β , pero particularmente un fragmento de péptido A β palmitoilado, que consiste en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en 1-15, 2-15, 3-15, 1-14, 2-14, 1-13; 1-16(Δ 2), 1-16(Δ 4), 1-16(Δ 5), 1-16(Δ 6), 1-16(Δ 8), 1-16(Δ 9), 1-16(Δ 10), 1-16(Δ 12), 1-16(Δ 13), 1-16(Δ 14), 1-16(Δ 15), 1-15(Δ 2), 1-15(Δ 4), 1-15(Δ 5), 1-15(Δ 6), 1-15(Δ 8), 1-15(Δ 9), 1-15(Δ 10), 1-15(Δ 12), 1-15(Δ 13), 1-15(Δ 14), particularmente un antígeno peptídico A β _{1-16(Δ 15)}, más particularmente un antígeno peptídico A β _{1-16(Δ 14)} o A β _{1-16(Δ 13)}, aún más particularmente un antígeno peptídico A β ₁₋₁₄, específicamente un antígeno péptido A β ₁₋₁₅, pero especialmente un fragmento de péptido que consiste en los residuos de aminoácidos 1-15, como se presenta en la SEQ ID NO: 1 y 1-16(Δ 14), como se presenta en la SEQ ID NO: 3, modificado por residuos palmitoilo unidos en forma covalente a cada extremo del péptido para dar por resultado entre 2 y 4, particularmente 4 residuos, reconstituido en un liposoma. Este constructo palmitoilado antigenico puede ser usado para el tratamiento de una amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placas de amiloide incluyendo amiloidosis secundaria y para mitigar los síntomas asociados con la enfermedad o para restaurar una condición hallada en individuos sanos que no están afectados por la enfermedad.

En algunos aspectos, los constructos antigenicos supramoleculares comprenden una secuencia de péptido antigenico como se describió en la presente más arriba, unido a lisina pegilada, al menos uno en cada extremo, pero particularmente 1 ó 2 en cada extremo. La longitud de la cadena de PEG (polietilenglicol) puede variar de n = 8 a n = 150.000 o más, particularmente de n = 10 a n = 80.000, más particularmente de n = 10 a n = 10.000. En un aspecto específico, la longitud de la cadena de PEG es de no más de n = 45, particularmente entre n = 5 y n = 40, más particularmente entre n = 10 y n = 30, y aún más particularmente n = 10.

Los liposomas que se pueden usar en las composiciones descriptas en la presente, incluyen aquellas conocidas por los expertos en la técnica. Se pueden usar cualquiera de los lípidos estándar para preparar liposomas. Los liposomas bicapa y multi-capa estándar pueden ser usados para preparar tales composiciones. Si bien se puede usar cualquier método para preparar liposomas conocido por un experto en la técnica, los liposomas que más se prefieren son preparados de acuerdo con el método de Alving et al., *Infect. Immun.* 60: 2438-2444, 1992. El liposoma puede contener opcionalmente un adyuvante o un inmunomodulador o ambos. Un inmunomodulador preferido es el lípido A, particularmente un lípido A detoxificado, tal como, por ejemplo, monofosforil o difosforil lípido A.

El liposoma puede tener una función dual por cuanto puede ser usado como un portador que comprende el constructo supramolecular, como se describió en la presente más arriba, y, al mismo tiempo, funcionar como un adyuvante para aumentar o estimular la respuesta inmune dentro del objetivo animal o humano a ser tratado con la vacuna terapéutica, como se describió en la presente. Opcionalmente, el liposoma puede contener, además, un

5 adyuvante adicional o un inmunomodulador o ambos, tal como, por ejemplo, lípido A, alumbre, fosfato de calcio, interleuquina 1 y/o microcápsulas de polisacáridos y proteínas, pero particularmente un lípido A, más particularmente un lípido A detoxificado, tal como monofosforil o difosforil lípido A, o alumbre.

En particular, la amiloidosis relacionada con la edad, incluyendo los trastornos neurológicos tales como la 10 enfermedad de Alzheimer (AD), incluyendo enfermedades o condiciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de la memoria cognitiva, tal como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), demencia de los cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés), el complejo de Parkinson-demencia de Guam, así como también otras enfermedades que se basan en, o están asociadas con, 15 proteínas tipo amiloide, tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeld-Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con HIV, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes del adulto, amiloidosis cardíaca senil, tumores endocrinos, y otros, incluyendo degeneración macular, pero particularmente una enfermedad o condición caracterizada por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva, tal como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), es tratada administrando un constructo antigénico supramolecular, como se describió en la presente, pero particularmente una composición de vacuna que comprende tales 20 constructos antigénicos supramoleculares, a un animal, particularmente un mamífero o un ser humano, afectado por tal trastorno y por lo tanto que requiere tal tratamiento, pero especialmente la enfermedad de Alzheimer, cuya manifestación sintomática es evidenciada por una leve falta de memoria hasta una pérdida total de la memoria.

25 La composición que comprende un constructo antigénico supramolecular, como se describió en la presente más arriba puede ser preparada en forma de una solución líquida, o de una suspensión inyectable, o también en una forma sólida adecuada para la solubilización antes de la inyección en el contexto de, por ejemplo, un kit para usar la presente composición, como se describe más abajo.

30 La composición que comprende un constructo antigénico supramolecular, como se describió en la presente, es administrada a un ser humano o un animal que padece de una enfermedad asociada con amiloide para inducir una respuesta inmune en dicho ser humano o animal para mitigar los síntomas asociadas con la enfermedad o para restaurar una condición hallada en individuos sanos que no están afectados por la enfermedad.

35 Las composiciones son administradas a un ser humano o un animal por cualesquiera vías de administración estándar apropiadas. En general, la composición puede ser administrada por vía tópica, oral, rectal, nasal o parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea o intramuscular). Además, la composición puede ser incorporada en matrices de liberación sostenida tales como polímeros biodegradables, implantándose los polímeros en la cercanía de donde se desea la liberación, por ejemplo, en el sitio de un tumor. El método incluye la administración de una sola dosis, la administración de dosis repetidas a determinados intervalos de tiempo y la administración sostenida durante un período de tiempo predeterminado.

40 En particular, la composición de péptido antigénico es administrada por inyección parenteral, particularmente por inyección intraperitoneal, intravenosa, subcutánea o intramuscular.

45 La dosis de la composición dependerá de la condición que se está tratando, la composición particular usada, y otros factores clínicos, tales como peso, tamaño y condición del paciente, área de superficie corporal, el compuesto o composición particular a ser administrado, otros fármacos que se administran concurrentemente, y la vía de administración.

50 La composición de vacuna terapéutica, como se describió en la presente puede ser administrada en combinación con otras sustancias biológicamente activas y procedimientos para el tratamiento de enfermedades. Las otras sustancias biológicamente activas pueden ser parte de la misma composición que ya comprende la vacuna terapéutica descripta en la presente en forma de una mezcla, donde la vacuna terapéutica y la otra sustancia biológicamente activa son entremezcladas en, o con, el mismo solvente y/o portador farmacéuticamente aceptable o puede ser proporcionada separadamente como parte de una composición separada, que puede ser ofrecida separadamente o junta, en forma de un kit de partes.

55 La composición de vacuna terapéutica puede ser administrada en forma concomitante con la o las otras sustancias biológicamente activas, en forma intermitente o secuencial. Por ejemplo, la composición de vacuna terapéutica puede ser administrada simultáneamente con una primera sustancia adicional biológicamente activa o secuencialmente después o antes de la administración de la vacuna terapéutica. Si se elige un esquema de aplicación en donde se administran más de una sustancia biológicamente activa adicional junto con la al menos una vacuna terapéutica, como se describió en la presente, los compuestos o sustancias pueden ser administrados parcialmente en forma simultánea, parcialmente en forma secuencial en diversas combinaciones.

Otro aspecto es proporcionar mezclas de una vacuna terapéutica, como se describió en la presente, y,

opcionalmente, una o más sustancias biológicamente activas adicionales, así como también métodos de uso de una vacuna terapéutica, o sus mezclas, incluyendo composiciones que comprenden dicha vacuna terapéutica o mezclas de vacunas terapéuticas para la prevención y/o tratamiento terapéutico y/o mitigación de los efectos de las amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placas de amiloide incluyendo

- 5 las amiloidosis secundarias y las amiloidosis relacionadas con la edad, incluyendo tales enfermedades, pero no limitadas a, trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Alzheimer (AD), incluyendo enfermedades o condiciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de la memoria cognitiva, tal como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), demencia de los cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés), el complejo de Parkinson-demencia de Guam, así como también otras 10 enfermedades que se basan en, o están asociadas con, proteínas tipo amiloide, tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeld-Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con HIV, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes del adulto, amiloidosis cardíaca senil, tumores endocrinos, y otros, incluyendo degeneración macular.

15 Las mezclas pueden comprender, además de una vacuna terapéutica, una sustancia biológicamente activa, tal como, por ejemplo, compuestos conocidos usados en la medicación de amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la proteína amiloide o tipo amiloide, tal como la proteína A β involucrada en la enfermedad de Alzheimer, incluyendo un anticuerpo creado contra un antígeno peptídico amiloidogénico, particularmente un anticuerpo creado contra un antígeno amiloidogénico presentado en forma de un constructo antigénico supramolecular, más particularmente un anticuerpo como se divulga en la presente.

20 En otro aspecto, la otra sustancia o compuesto biológicamente activo puede ser también un agente terapéutico que se puede usar en el tratamiento de enfermedades y trastornos causados por, o asociados con, proteínas amiloides o tipo amiloides incluyendo amiloidosis causada por amiloide β o pueden ser usadas en la medicación de otros trastornos neurológicos.

25 La otra sustancia o compuesto biológicamente activo puede ejercer su efecto biológico por el mismo mecanismo o uno similar, que la vacuna terapéutica, como se describió en la presente, o por un mecanismo de acción no relacionado o por una multiplicidad de mecanismos de acción relacionados y/o no relacionados.

30 En general, el otro compuesto biológicamente activo puede incluir aumentadores de la transmisión neuronal, fármacos piscoterapéuticos, inhibidores de la acetilcolina esterasa, bloqueadores del canal de calcio, aminas biogénicas, tranquilizadores de benzodiazepina, intensificadores de la síntesis, el almacenamiento o la liberación de acetilcolina, agonistas del receptor postsináptico de acetilcolina, inhibidores de la monoamina oxidasa A o B, antagonistas del receptor de N-metil-D-aspartato glutamato, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, antioxidantes y antagonistas del receptor serotonérgico.

35 En particular, la mezcla puede comprender al menos otro compuesto biológicamente activo seleccionado del grupo que consiste en compuestos contra el estrés oxidativo, compuestos antiapoptóticos, quelantes de metales, inhibidores de la reparación del ADN, tales como pirenzepina y metabolitos, ácido 3-amino-1-propansulfónico (3APS), 1,3-propandisulfonato (1,3PDS), activadores de secretasa, inhibidores de β - y γ -secretasa, proteínas tau, neurotransmisores, disruptores de la lámina β , moléculas antiinflamatorias, o inhibidores de colinesterasa (ChEIs), tales como tacrine, rivastigmina, donepezil y/o galantamina y otros fármacos y suplementos nutritivos, junto con una vacuna terapéutica, como se describió en la presente, y, opcionalmente, un portador y/o un diluyente y/o un 40 excipiente farmacéuticamente aceptable.

45 En otro aspecto, las mezclas, como se describieron en la presente, pueden comprender niacina o memantina junto con una vacuna terapéutica, y, opcionalmente, un portador y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable.

50 En otro aspecto, se proporcionan mezclas que comprenden "antipsicóticos típicos", tales como, por ejemplo, clozapina, ziprasidona, risperidona, aripiprazol u olanzapina, para el tratamiento de los síntomas psicóticos positivos y negativos incluyendo alucinaciones, delusiones, trastornos del pensamiento (manifestados por incoherencia marcada, alteraciones, tangencialidad) y comportamiento extraño o desorganizado, así como también anhedonia, afecto disminuido, apatía y retiro social, junto con una vacuna terapéutica y, opcionalmente, un y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable.

55 En un aspecto específico, las composiciones y mezclas, como se describió en la presente más arriba, comprenden la vacuna y la sustancia biológicamente activa, respectivamente, en una cantidad terapéuticamente y profilácticamente efectiva.

Otros compuestos que pueden ser usados adecuadamente en mezclas en combinación con la vacuna divulgada en la presente se describen, por ejemplo, en la WO 2004/058258 (ver especialmente páginas: 16 y 17) incluyendo objetivos de fármacos terapéuticos (página 36-39), ácidos alcansulfónicos y ácido alcansulfúrico (páginas 39-51), inhibidores de colinesterasa (páginas 51-56), antagonistas del receptor NMDA (páginas 56-58), estrógenos (páginas 58-59), fármacos antiinflamatorios no esteroideos (páginas 60-61), antioxidantes (páginas 61-62), agonistas de los receptores activados por proliferadores de peroxisoma (PPAR) (páginas 63-67), agentes que reducen el colesterol

(páginas 68-75), inhibidores de amiloide (páginas 75-77), inhibidores de la formación de amiloide (páginas 77-78), 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 (páginas 89-93) y profármacos (páginas 93 y 94).

- 5 Se conoce desde hace tiempo que la vacunación de un huésped animal o humano con una proteína huésped normal puede llevar al desarrollo de auto-anticuerpos dirigidos contra la proteína huésped resultando en trastornos conocidos colectivamente como trastornos autoinmunes. La A β y su proteína precursora APP son tales proteínas normales. Usando estas proteínas huésped en una vacunación tiene por lo tanto el potencial de crear efectos colaterales indeseados. Hay alguna evidencia en la literatura de que la A β puede activar una respuesta neuroinflamatoria que puede ser causada en parte por una sobreactivación del sistema del complemento, que ya está altamente activado en pacientes que padecen de la enfermedad de Alzheimer u otras enfermedades neurodegenerativas.

10 La A β humana en su conformación laminar β es un potente activador del sistema de complemento humano. Se une fuertemente a la cola de colágeno del complemento humano C1q. La sobreactivación del sistema de complemento puede dar por resultado que el sistema de defensa natural del huésped se de vuelta y lleve a la autodestrucción de células y tejidos incluyendo las neuronas y sus procesos. Por ejemplo, el complejo de ataque a la membrana (MAC) que es parte del sistema de defensa natural del huésped y protege al huésped contra bacterias y virus invasores por medio de su inserción en dichas bacterias y virus, después de la sobreactivación puede ser insertado en células huésped y causar autodestrucción. La sobreactivación puede llevar además a la estimulación de microglía para producir compuestos tóxicos tales como radicales libres de oxígeno y proteasas perjudiciales.

15 20 Es por lo tanto otro aspecto evitar los efectos colaterales potenciales tales como complicaciones neurológicas causadas por la vacunación de un animal o un ser humano que padece de una enfermedad autoinmune con un autoantígeno, que tiene el potencial de estimular adicionalmente un sistema de complemento ya sobre-activado. Esto se puede lograr administrando un antígeno peptídico A β , particularmente un antígeno peptídico A β palmitoilado, más particularmente el antígeno peptídico A β ₁₋₁₅ palmitoilado, pero especialmente el antígeno peptídico A β ₁₋₁₅ palmitoilado (AC1-24, A β ₁₋₁₅) en combinación con un inhibidor del complemento.

25 Por lo tanto, otro aspecto de la invención consiste en proveer una composición de vacuna que comprende, además de un antígeno de péptido A β , particularmente el antígeno de péptido A β arriba descrito, un inhibidor del sistema de complemento.

30 El inhibidor del complemento puede ser un compuesto seleccionado entre el grupo consistente en Receptor del complemento humano soluble, proteína C5 de complemento antihumano tal como, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti C5 humanizado o fragmento de cadena simple de un anticuerpo monoclonal humanizado, inhibidor N de C1-esterasa e inhibidor C1 humano natural.

35 Un énfasis reciente en la co/morbidez de A β y enfermedad cerebrovascular, el enlace entre A β y la aterosclerosis, el deterioro cognitivo asociado con la angioplastia amiloide, la patología microvascular cerebral significativa, y la eliminación deficiente de A β a través de la barrera cerebro-sangre en la enfermedad de Alzheimer, indican, todos ellos, que el trastorno vascular es un rasgo importante de la condición neurodegenerativa crónica en la enfermedad de Alzheimer. (Zlokovic, B.: (2005): Trends in Neurosciences 28, 202-208). Por ello, la disfunción neurovascular podría tener un rol importante en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer.

40 Existe una amplia evidencia de una fuerte asociación entre la declinación cognitiva en la enfermedad de Alzheimer y el trastorno neurovascular (Torre, de la, J.C.: (2004) Neurol. Res. 26, 517-524, Gorelick, P.B.: (2004) Stroke 35, 2620-2622). Se han descrito una reducida densidad microvascular, números incrementados de vasos sanguíneos fragmentados, un marcado cambio del diámetro de los vasos sanguíneos, en la enfermedad de Alzheimer (Bailey, T.L. et al: (2004) Neurol. Res. 26, 573-578 Karka. E. and Luiten, P.G. (2001) Prof. Neurobiol. 64, 576-611).

45 Varios estudios, que incluyen el estudio de Rotterdam basado en una gran población (Greenberg, S.M. et al: (2004) Stroke 35, 2616-2619) han demostrado que los factores de riesgo vascular podrían ser responsables de la declinación cognitiva en las personas ancianas - lo que conduce a la denominada "Demencia Vascular". Varios factores para la enfermedad de Alzheimer y la demencia vascular se superponen, lo que incluye ataques de isquemia transitorios, aterosclerosis, enfermedad cardiaca, elevada viscosidad del suero, etc.

50 La demencia vascular tiene lugar como resultado de un daño en el tejido del cerebro después de una privación de oxígeno causada por vasos sanguíneos angostados o bloqueados en el cerebro, y es la segunda causa más frecuente de demencia. Es frecuente que los pacientes sufran tanto de la enfermedad de Alzheimer como de demencia vascular. Se estima que en la Unión Europea 1,7 millones de personas y en los Estados Unidos. 55.000 sufren de demencia vascular.

55 Una terapia que restaure la presión normal del O₂ en el cerebro, a pesar del deterioro del flujo de sangre, presenta el potencial de influir de manera significativa sobre la evolución de la enfermedad de Alzheimer y de reducir drásticamente la demencia vascular.

Por lo tanto, otro aspecto consiste en proveer una composición de vacuna que comprenda, además de un antígeno de péptido A β , particularmente el antígeno de péptido A β descrito en lo que precede, un compuesto que desencadene un incremento de la afinidad con el O₂ /hemoglobina de manera tal que se libera oxígeno subsiguiente hacia los tejidos de los órganos.

5 En particular, el compuesto modulador de la afinidad O₂ /hemoglobina puede ser un compuesto seleccionado del grupo consistente en un fármaco antilipidémico tal como por ejemplo ácido clofíbrico o bezafibrato que incluya los derivados de bezafibrato LR16 y L35, los derivados de urea tales como por ejemplo ácido [2-[4[[[arilamino)carbonil]-amino]fenoxi]-2-metilpropioníco, un efector de hemoglobina tal como por ejemplo 2,3-difosfoglicerato (DPG), hexaquisfosfato de inositol (IHP), y fosfato de piridoxal.

10 Más particularmente, el compuesto modulador de la afinidad de O₂ /hemoglobina puede ser un compuesto que comprenda un ligando aniónico para un sitio alostérico de la hemoglobina, en donde el ligando aniónico comprende un anillo pirofosfato interno, opcionalmente junto con un catión no tóxico.

Más particularmente aún, el compuesto modulador de la afinidad O₂ /hemoglobina es un hexafosfato de inositol (HP) que comprende por lo menos un anillo pirofosfato interno, opcionalmente junto con un catión no tóxico.

15 15 A efectos de capturar los efectos beneficiosos ofrecidos por un inhibidor de complemento y un compuesto modulador de la afinidad O₂ /hemoglobina para aliviar los efectos potencialmente perjudiciales de un sistema de complemento sobreactivado o trastornos vasculares, respectivamente, en la presente se provee una composición de vacuna en la que un antígeno de péptido A β , en particular el antígeno de péptido A β anteriormente descrito en la presente, de se halla comprendido en combinación con un inhibidor del sistema de complemento y un compuesto modulador de la afinidad O₂ /hemoglobina, particularmente un efector alostérico de la hemoglobina.

20 La composición de vacuna que comprende un antígeno de péptido A β , particularmente un antígeno de péptido A β descrito anteriormente en la presente, puede administrarse de manera concomitante, de manera intermitente o secuencialmente con un inhibidor de complemento y/o un híbrido de complemento y/o un compuesto modulador de la afinidad de O₂/hemoglobina a efectos de aliviar los potenciales efectos perjudiciales de un sistema de complemento sobreactivado y trastornos cerebrovasculares, respectivamente, Por ejemplo, la composición de vacuna puede distraerse simultáneamente con un inhibidor de complemento o secuencialmente con un inhibidor de complemento o secuencialmente después o antes de la administración de la vacuna. Si se elige un esquema de aplicación en la que un inhibidor de complemento y un compuesto modulador de la afinidad de O₂/hemoglobina, particularmente efector alostérico de la hemoglobina, se administran conjuntamente con la por lo menos una vacuna, los compuestos o sustancias pueden ser parcialmente administrados de manera simultánea, parcialmente de manera secuencial en diversas combinaciones

30 Otro aspecto de la invención es el de proveer mezclas de una vacuna descrita en la presente y un inhibidor de complemento y/o un compuesto modulador de la afinidad de O₂ /hemoglobina, particularmente un efector alostérico de la hemoglobina, como también métodos para utilizar una vacuna de este tipo, o mezclas de ella que incluyen 35 composiciones que comprenden dicha vacuna o mezclas de una vacuna y un inhibidor de complemento y/o un compuesto modulador de la afinidad de O₂/hemoglobina, particularmente un efector alostérico de la hemoglobina, para la prevención y/o tratamiento terapéutico y/o alivio de los efectos de las amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placas amiloideas que incluyen amiloidosis secundarias y amiloidosis relacionada con la edad tales como sin limitación trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Alzheimer (enfermedad de Alzheimer), demencia corporal de Levy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés); el complejo de Parkinson/Demencia de Guam; como también otras enfermedades y que se basan en, o que están asociadas con proteínas similares a amiloide tales como la parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeld-Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionado con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes de presentación adulta; amiloidosis cardiaca senil; tumores endocrinos, y otros, que incluyen la degeneración macular.

40 45 El péptido amiloide 1-15 modificado puede sintetizarse siguiendo el método informado en Nicolau et al. (20002) Proc Nat Acad Sci USA, 99, 2332-2337. El enfoque informado en Nicolau et al implica modificar el péptido antigénico mediante injerto sobre resina de una parte lipofílica o hidrofílica, a los residuos de aminoácidos terminales de un péptido preformado. En particular, un aminoácido protegido, particularmente un aminoácido Fmoc-protegido, es fijado una resina mediante química de acoplamiento conocido. El grupo protector es removido y se acopla un segundo residuo aminoácido protegido. Seguidamente se utiliza la síntesis de péptidos automatizada estándar por medio de química de protección conocida, particularmente química de Fmoc/tBu, y a continuación se utilizan grupos protectores de cadena lateral estándar para la síntesis del péptido antigénico A β , particularmente del péptido antigénico A β ₁₋₁₅ mediante el acoplamiento sobre los aminoácidos 1-15 de la proteína amiloide A β ₁₋₁₂, para producir 50 el fragmento de péptido con una secuencia dada en la SEQ ID NO:1. En una etapa final se acoplan otros dos aminoácidos protegidos fragmento de péptido creciente. Seguidamente pueden desdoblarse selectivamente los grupos Mtt y acoplárselos a ácido palmítico. Después elevado lavado de la resina, se remueve el grupo protector y se desdobra simultáneamente la resina, seguido por desprotecciones de cadena lateral mediante tecnología estándar. Seguidamente puede obtenerse el producto final con elevada pureza y se confirma su identidad mediante 55 60 métodos conocidos en la técnica tales como por ejemplo espectrometría de masa de electronebulización.

La parte lipofílica o hidrofóbica puede ser un ácido graso, un triglicérido o un fosfolípido cuando la espina dorsal de carbono del ácido graso tiene por lo menos 10 átomos de carbono. En particular, la parte lipofílica o hidrofóbica es un ácido graso con una espina dorsal de por lo menos aproximadamente 14 átomos de carbono y de hasta aproximadamente 24 átomos de carbono, en donde cada número individual de átomos de carbono que recaiga en este intervalo también forma parte de la divulgación de la presente. Más particularmente, la parte lipofílica o hidrofóbica tiene una espina dorsal de carbono de por lo menos 14 átomos de carbono, pero especialmente de 16 átomos de carbono. Los ejemplos de partes hidrofóbicas incluyen sin limitación ácido palmitíco, ácido esterárico, ácido mirístico, ácido láurico, ácido oleico, ácido linoleico y ácido linolénico. En un aspecto particular, la parte lipofílica o hidrofílica la parte lipofílica es ácido palmitíco.

- 5 Los antígenos liposómicos pueden seguidamente prepararse como se describe en Nicolau et al., 2002. El péptido antigénico A β amiloide modificado, particularmente el péptido antigénico A β_{1-15} modificado, puede ser constituido en forma de un constructo consistente en liposomas, particularmente liposomas hechas de dimiristoíl fosfatidil colina (DMPC); dimiristoíl fosfatidil etanolamina (DMPEA), dimiristoíl fosfatidil glicerol (DMPG) y colesterol, que opcionalmente contiene monofosforil lípido A.
- 10 15 En un aspecto específico se utilizan liposomas con lípido A como adyuvante para preparar la vacuna antiamiloide. Se mezclan dímiristoílfosfatidil-colina, -glicerol y colesterol, particularmente en una relación molar de 0,9:1,0. Seguidamente se añade un fuerte inmunomodulador tal como por ejemplo monofosforil lípido A en una concentración adecuada, particularmente con una concentración de entre 30 y 50 mg por mmol, más particularmente de 40 mg por mmol de fosfolípidos. El péptido antigénico modificado se añade seguidamente en una relación molar de péptido a fosfolípidos de entre 1:30 y 1:200, particularmente en una relación molar de entre 1:50 y 1:120, y más particularmente de 1:100. Se remueven los solventes, por ejemplo mediante evaporación, y la película resultante es hidratada con solución tampón estéril tal como por ejemplo PBS.
- 20 25 30

También es posible preparar liposomas mediante la técnica de inyección de flujo cruzado como se describe por ejemplo en Wagner et al. (2002) *Journal of Liposome Research* Vol. 12 (3), página. 259- 270. Durante la inyección de soluciones de lípidos en un sistema tampón acuoso, los lípidos tienden a formar "precipitados, seguido por el autoordenamiento en vesículas. El tamaño de las vesículas obtenidas depende de factores tales como la concentración de lípidos, velocidad de agitación, la elección de los lípidos. El sistema de preparación puede consistir en un módulo de inyección por flujo cruzado, recipientes para la fase polar (por ejemplo, una solución tampón PBS), un recipiente para solución de etanol/lípidos y un dispositivo de presión, pero particularmente un dispositivo de presión bajo nitrógeno. Mientras la solución acuosa o polar es bombeada a través del módulo de inyección de flujo cruzado, la solución de etanol/lípido es inyectada en la fase polar bajo diversas presiones aplicadas

- 35 Para determinar el carácter inmunogénico del constructo antigénico A β modificado, se inmuniza un animal adecuado seleccionar del grupo consistente en ratones, ratas, conejos, cerdos, aves, etc., pero particularmente ratones, especialmente ratones C57BL/6, con el péptido antihigiénico. El carácter inmunogénico del constructo antigénico se determina probando muestras de suero en intervalos de tiempo adecuados después de la inmunización para lo cual se utiliza un inmunoensayo tal como por ejemplo un ensayo ELISA.

40 El constructo antigénico modificado, en particular el constructo antigénico palmitoilado, y más particularmente el constructo A β_{1-15} palmitoilado se utiliza para la inmunización de un animal, particularmente un mamífero o un ser humano, que sufra de los síntomas asociados con la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placas amiloides, lo que incluye lo que incluye amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad, inclusive sin limitación trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Alzheimer (AD), inclusive enfermedades o condiciones caracterizadas por una pérdida de capacidad cognitiva tal como por ejemplo un deterioro cognitivo moderado (IMC), demencia del cuerpo de Lewy, síndrome de Down, Síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo holandés); complejo de Parkinson - Demencia de Guam; como también otras enfermedades que se basan en o están asociado con proteínas similares a amiloides, tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeld-Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes de presentación adulta, amiloidosis cardiaca senil; tumor endocrinos, y otros, que incluyen la degeneración macular, pero en particular un enfermedad o condición caracterizada por una pérdida de capacidad cognitiva de memoria tal como por ejemplo, deterioro cognitivo templado u otra enfermedad asociada con amiloidosis.

45 50 55 El constructo antigénico supramolecular descrito en la presente, pero en particular una composición de vacuna que comprenda un constructo antigénico supramolecular de este tipo se administra a un animal, particularmente un mamífero o un ser humano, por medio de 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, es posible incorporar la composición en matrices de liberación prolongada tales como polímeros biodegradables, implantándose los polímeros en la vecindad de donde se desean su entrega, por ejemplo, en el sitio de un tumor. El método incluye la administración de una dosis única, la administración de dosis repetidas a intervalos de tiempo repetidos, y la administración prolongada durante un período de tiempo determinado.

En un aspecto específico, el constructo antigénico descrito, particularmente una composición de vacuna que comprende dicho constructo antigénico en una forma farmacéuticamente aceptable, es administrado en dosis repetidas, en particular en de 1 a 15 dosis, más particularmente de 2 a 10 dosis, más particularmente de 3 a 7 dosis y más particularmente aún, de 4 a 6 dosis, en intervalos de tiempo de entre 1 y 6 semanas, más particularmente en intervalos de tiempo de entre 1 y 4 semanas, y más particularmente a un en intervalos de tiempo de entre 2 y 3 semanas. La inmunorrespuesta se supervisa tomando muestras de suero en un momento adecuado después del refuerzo, particularmente a los 3 a 10 días después del refuerzo, más particularmente de 4 a 8 días después del refuerzo, y más particularmente de 5 a 8 días después del refuerzo, y determinando el carácter inmunogénico del constructo antigénico para lo cual se utiliza una metodología conocida, particularmente uno de los inmunoensayos comúnmente utilizados tales como por ejemplo un ensayo ELISA.

La inmunización con el constructo antigénico, pero particularmente con una composición de vacuna que comprende el constructo antigénico en una forma farmacéuticamente aceptable conduce a una inmunorrespuesta significativa y muy específica en el animal o ser humano tratados.

Las composiciones de constructo antigénico supramolecular descritas en la presente administradas a un ser humano o animal para inducir la inmunidad a agentes antigénicos tales como organismos infecciosos o a aspectos antigénicos de otras condiciones patológicas tales como la agregación de β -amiloide (enfermedad de Alzheimer) o trastornos hiperproliferativos tales como cáncer. El ser humano o animal inmunizados desarrolla anticuerpos circulantes contra el organismo infeccioso, con lo cual se reduce o se desactiva su capacidad de estimular la enfermedad.

Las composiciones también puede utilizarse para producir anticuerpos dirigidos contra péptidos antigénicos. Los anticuerpos resultantes se administran a individuos a efectos de inmunizarlos de manera pasiva contra una variedad de enfermedades o trastornos, que incluyen sin limitación las enfermedades asociadas con la proteína amiloide.

Por lo tanto, en un aspecto específico de la invención, las composiciones de constructos antigénicos supramoleculares descritas en la presente se utilizan para producir un panel de anticuerpos monocionales o policlonales que son específicos para diversos trastornos, inclusive por ejemplo la enfermedad de Alzheimer. Los anticuerpos se preparan mediante métodos bien conocidos de las personas con la pericia habitual en la técnica.

Las composiciones reveladas en la presente se administran a un ser humano o a un animal mediante cualquier medio adecuado, preferiblemente por inyección. Por ejemplo, un péptido antigénico modificado reconstituido en liposomas se administra mediante inyección subcutánea. Tanto si se los produce internamente como si se los provee desde fuentes externas, los anticuerpos circulantes se unen a antígeno y reducen o inhabilitan su capacidad de estimular la enfermedad.

En determinadas formas de realización, los constructos antigénicos supramoleculares comprender un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de β -amiloide. Los péptidos también pueden comprender o corresponderse a péptido amiloide β y enteros y fragmentos activos del mismo. Adicionalmente, los péptidos útiles comprenden además A β .

También se provee un método para producir un anticuerpo que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o parte del mismo, en particular un método para producir un monoclonal que incluya cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, el cual comprende cultivar anticuerpos pero particularmente anticuerpos monoclonales contra un constructo antigénico supramolecular que comprende un péptido antigénico correspondiente a la secuencia de aminoácidos del péptido A β descrito anteriormente en la presente, pero particularmente un péptido antigénico A β _{1-16(Δ15)}, más particularmente un péptido antigénico A β _{1-16(Δ14)} o A β _{1-16(Δ13)}, más particularmente aún, un péptido antigénico A β ₁₋₁₄, pero especialmente el péptido A β ₁₋₁₅ β -amiloide, modificado con partes hidrofóbicas tales como por ejemplo ácido palmítico o una parte hidrofílica tal como por ejemplo polietilenglicol (PEG) o una combinación de ambos, en donde dicha parte hidrofóbica e hidrofílica, respectivamente, está unida de manera covalente a cada terminal del péptido antigénico a través de por lo menos uno, particularmente a través de 1 ó 2 aminoácidos acoplados al residuo de aminoácidos terminal en cada extremo del péptido antigénico, tal como por ejemplo, lisina o cualquier otro aminoácido adecuado o análogo de aminoácido adecuado capaz de servir como un dispositivo de conexión para el acoplamiento de la parte hidrofóbica e hidrofílica al fragmento del péptido tal como por ejemplo ácido glutámico y cisteína.

El anticuerpo, particularmente el anticuerpo monoclonal, que puede obtenerse mediante dicho método es capaz, al ser administrado a un animal, particularmente un mamífero un ser humano, que sufra de un deterioro de memoria, de retener o incrementar la capacidad cognitiva de memoria en el animal tratado, mamífero humano. Otro aspecto de la invención consiste en proveer un anticuerpo que incluya cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, o, más particularmente, un anticuerpo monoclonal que incluya cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o parte funcional del mismo, que ha sido cultivado contra un constructo antigénico supramolecular que comprende un péptido antigénico correspondiente a la secuencia de aminoácidos del péptido antigénico A β de acuerdo con la invención y descrito en lo que precede en la presente, pero particularmente un péptido antigénico A β _{1-16(Δ15)}, más particularmente un péptido antigénico A β _{1-16(Δ14)} o A β _{1-16(Δ13)}, más particularmente aún, un péptido antigénico A β ₁₋₁₄, pero especialmente el péptido A β ₁₋₁₅ β -amiloide, modificado con un partes

hidrofóbica tal como por ejemplo ácido palmítico o una parte hidrofílica tal como, por ejemplo, ácido palmítico o una parte hidrofílica tal como, por ejemplo, polietilenglicol (PEG) o una combinación de ambos, en donde dicha parte hidrofóbica e hidrofílica, respectivamente, está unida de manera covalente a cada uno de los terminales del péptido antigénico a través de por lo menos un aminoácido tal como por ejemplo, lisina o cualquier otro aminoácido

5 adecuado o análogo de aminoácido adecuado capaz de servir como una molécula ligadora. Si se utiliza PEG como la parte hidrofílica, los terminales de PEG libres se unen de manera covalente a fosfatidiletanolamina o a cualquier otro compuesto adecuado para funcionar como el elemento de anclaje para empotrar el constructo antigénico en la bicapa de un liposoma.

EJEMPLOS

10 EJEMPLO 1: síntesis del péptido antigénico tetra(palmitoil lisina)-A β ₁₋₁₅

El péptido amiloide 1-15 palmitoilado fue sintetizado siguiendo un método anteriormente informado, mejorado (Nicolau et al. 2002). Este nuevo enfoque implicaba un injerto sobre resina de ácido palmítico en los residuos Lys terminales del péptido preformado después en lugar de la síntesis en fase sólida de a etapas que incorpora el aminoácido modificado Fmoc-Lys(Mtt)-OH. Este nuevo enfoque mejora la eficiencia del acoplamiento y permite 15 obtener un producto de una pureza considerablemente superior. Por lo tanto, el aminoácido ortogonalmente protegido Fmoc-Lys(Mtt)-OH fue fijado a una resina de Wang para lo cual se utilizó la química de acoplamiento de HBTU. El grupo Fmoc fue retirado utilizando piperidina al 20% en DMF y se acopló un segundo residuo de Fmoc-Lys(Mtt)-OH. Seguidamente se utilizó la síntesis de péptidos automatizada estándar mediante química de Fmoc/tBu y grupos protectores de cadena lateral estándar para acoplar a los siguientes 15 aminoácidos. Finalmente, los dos 20 últimos aminoácidos acoplados eran Fmoc-Lys(Mtt)-OH. Los grupos Mtt fueron seguidamente desdoblados de manera selectiva mediante Fmoc-Lys(Mtt)-OH. Los grupos Mtt fueron entonces selectivamente desdoblados mediante TFA al 1% en diclorometano y seguidamente se acopló a ácido palmítico mediante HBTU. Después de lavado de las resinas, se removió el grupo Fmoc con piperidina al 20% en N,N-dimetilformamida (DMF) y finalmente 25 el desdoblamiento simultáneo de la resina y las desprotecciones de cadena lateral fueron llevadas a cabo mediante TFA bajo condiciones estándar. La trituración a partir de éter dietílico permitió obtener el producto en forma de un sólido blanco. La espectrometría de masa de electronebulización confirmó la identidad del producto (m/z previsto: 1097,9 ([M]3+); hallado 1096,8 ([M-3H]3+), no detectándose otros péptidos tri-, di- o monopalmitoilados.

1.2. Protocolo de síntesis 2:

30 Puede utilizarse un enfoque alternativo para la síntesis de antígenos de péptido tetra(palmitoil lisina)-A β ₁₋₁₅ sobre la base del injerto en resina de ácido palmítico a los residuos lisina terminales del péptido preformado. En virtud de ello, sobre la resina 2-clorotritilo se acopló el aminoácido ortogonalmente protegido Fmoc-Lys(ivDde)-OH. Después de desprotección de Fmoc se acopló un segundo Fmoc-Lys(ivDde)-OH seguido por 15 rondas de síntesis de péptidos automatizado estándar mediante química de Fmoc/tBu y grupos protectores de cadena lateral aminoácido 35 estándar. Después del acoplamiento de los dos últimos residuos Fmoc-Lys(ivDde)-OH, el grupo Fmoc fue removido mediante piperina al 20% en DMF y el terminal N protegido con un grupo Boc para lo cual se utilizó ter-butil dicarbonato. Los grupos protectores ivDde fueron seguidamente removidos de manera químoselectiva mediante tratamiento con hidrazina al 3% en DMF y seguidamente se acopló ácido palmítico a estos cuatro residuos lisina mediante HBTU para lo cual se utilizaron dos acoplamiento de 18 h cada uno. Después del lavado de la resina, las 40 cadenas laterales fueron desprotegidas mediante TFA/TIPS en condiciones estándar. La trituración a partir de éter dietílico frío permitió obtener el producto en forma de un sólido blanco. El MALDI-TOF confirmó la identidad del producto, no detectándose otros de otros péptidos tri-di- o monopalmitoilados.

Las vacunas de liposomas fueron preparadas mediante un método descrito en los documentos US 6843952 y EP 1337322.

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

45 La palmitoilación, además de proveer un ancla para el péptido en la bicapa de liposoma, debido a la reducida longitud relativa de la parte ácido graso C_{16,0} conduce a que el péptido se encuentre prácticamente situado sobre la superficie de la liposoma. Por ello, las células que procesen el antígeno tendrán que incorporar la totalidad de la liposoma junto con el péptido, lo que puede resultar en una inmunorrespuesta más lenta en términos relativos

50 Para reforzar la inmunorrespuesta, se ha aplicado otra ancla/distanciador a efectos de reconstituir el péptido en el liposoma, por ejemplo polietilenglicol (PEG). El PEG se fijó de manera covalente al residuo lisina encontrado en ambos términos del péptido. En el otro extremo de la cadena (PEGn = 70), se unió de manera covalente fosfatidil etanol amina (PEA) para que funcione como el elemento anclante en la bicapa de liposoma. Por lo tanto, el liposoma sigue funcionando como un adyuvante, y el péptido, al estar suficientemente alejado con respecto a la bicapa, puede ser procesado solo y por lo tanto incrementa su inmunogenicidad en comparación con el antígeno palmitoilado.

55 Se conocen metodologías para la mono-pegilación de péptidos en la posición-N- α , y se los utiliza ampliamente. La mono-pegilación específica de sitio en los residuos aminoácidos internos, N- o C-terminales de péptidos de tamaño medio también ha sido descrita mediante enfoques de fase sólida o de injerto de péptidos.

A efectos de evitar problema con los impedimentos estéricos, se llevó a cabo la reacción en fase de solución. Este enfoque exitoso implicaba la síntesis de las secuencias peptídicas mediante protecciones estándar de cadena lateral de aminoácido Fmoc/tBu. Para aquellas secuencias peptídicas que contienen residuos Lys o His internos (1-16, 1-15), se añadió un Lys(ivDde) en cada uno de los terminales. Se añadió un Gly adicional a la terminal C a efectos de facilitar la síntesis. Se removió el grupo Fmoc con piperidina al 20% en DMF y se N-acetiló mediante anhídrido acético. Se logró el desdoblamiento selectivo de los grupos ivDde con hidrazina hidratada al 3% en DMF durante 1 hora. La resina 2-clorotritilo fue favorecido con respecto a la resina de Wang más ampliamente utilizada ya aquella mostró ser mucho más resistente a la hidrazinólisis. Además, la resina 2-clorotritilo es extremadamente sensible a los ácidos y por lo tanto, a diferencia de la resina de Wang, permite la aislación de péptidos protegidos. De hecho, fue necesario llevar a cabo la reacción de acoplamiento en la fase de solución ya que el acoplamiento del péptido unido a resina al reactivo lipídico pegilado preactivado DSPE-PEG-SPA no dio origen a ningún producto de acoplamiento. Por lo tanto el desdoblamiento selectivo a partir de la resina bajo condiciones templadas (ácido acético/trifluoretanol/diclorometano, 1:1,8, 1 hora, temperatura ambiente) permitió obtener los péptidos internamente protegidos.

15 Los acoplamientos en fase de solución fueron llevados a cabo de manera exitosa con el péptido derivado de la secuencia 1-16, 1-15, a DSPE-PEG-SPA en DMSO y base en exceso. Las reacciones fueron seguidamente apagadas mediante la adición de etanolamina en exceso durante 2 horas, y la solución fue liofilizada.

20 La purificación mediante HPLC (columna C₄ semipreparativo de fase inversa) permitió obtener una pureza de entre 50 y 70% de los conjugados PEG-lípidos N- y C- terminales cuyas identidades fueron confirmadas por MALDI. Cada secuencia mostró una variación considerable en cuanto a la facilidad de la e la reacción de acoplamiento, y las condiciones fueron ajustados de manera acorde (temperatura, cantidad de DSPE-PEG-SPA equivalente molares, tiempos). Para la separación del DSPE-PEG-SPA en exceso desde el producto deseado se aplicó la purificación mediante HPLC. La separación de los productos mono y díacoplados antes de las desprotecciones finales de las cadenas laterales puede lograrse mediante la utilización de cromatografía de intercambio de cationes. Las desprotecciones subsiguientes de cadenas laterales de péptidos y la separación del DSPE-PEG-SPA apagado en exceso conducen al aislamiento de los conjugados deseados con una pureza aceptable.

Antígenos pegilados y palmitoilados

A_B 1-15 (ACI-24)

H2N-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

A_B 1-16 (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

A_B 1-16(Δ14) (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

A_B 22-35(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

A_B 29-40 (ACI-12)

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

EJEMPLO 3: ANÁLISIS DE ESTRUCTURA Y DE CONFORMACIÓN

30 3.1: Análisis de la conformación del antígeno reconstituido

Para anclar el antígeno A_B1-15 sobre la superficie liposómica se utilizó un tándem de lisina palmitoilado en cada extremo del péptido como anteriormente descrito (Nicolau, C. et al., 2002). El ácido graso del ácido palmítico contiene 16 átomos de carbono que han demostrado tener la longitud adecuada para su inserción estable en dicha

5 capa de liposómica. En este constructo, el péptido está prácticamente situado sobre la superficie del liposoma debido a la longitud de la parte de ácidos grasos C16. En una tentativa para tener el péptido antigénico asociado con liposoma-lípido A en una conformación diferente, se utilizó otro ancla/separador para reconstituir el péptido A β ₁₋₁₆ (ACI-01) en liposomas, a saber polietilenglicol (PEG con 77 unidades repetitivas). La influencia del espaciador entre el ancla liposómica y el péptido A β sobre la conformación secundaria de la secuencia amiloide reconstituida en los liposomas fue medida mediante Dicroísmo Circular (Figura 1a). El A β ₁₋₁₆ PEGilado parece estar en una espira aleatoria o de conformación de proteínas no estructuradas (señal negativa a 210 nm y que se aproxima lentamente al eje cero hasta 260 nm), mientras que el péptido A β ₁₋₁₅ palmitoilado contiene una proporción significativa de conformación de lámina β (señal positiva hasta 210 nm, cruce por el eje cero y seguidamente se acerca nuevamente hasta 260 nm). Por lo tanto parece que la proximidad más estrecha del péptido palmitoilado a la superficie liposómica puede imponer una conformación secundaria definida. Esto se debe potencialmente a interacciones electrostáticas del péptido con la superficie liposómica, lo que aparentemente no es posible con el péptido PEGilado.

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

15 Para analizar la influencia de diferentes moléculas ligadoras sobre la conformación del péptido β amiloide 1-15 reconstituido en liposomas se llevó a cabo un análisis (Figuras 1b y 1c). En este caso se utilizaron ácido palmitoílico y polietilenglicol (PEG con n = 77), respectivamente, como la molécula ligadora o ancla al liposoma.

20 Para los estudios de NBMR se homogeneizaron muestras que comprendían el amiloide palmitoilado 1-15 (ACI-24) y péptidos antígeno A β ₁₋₁₆ (ACI-01) reconstituidos en liposomas mediante vortexado, y se incrementó la concentración de la solución mediante centrifugación (3.000 rpm durante 3*90 minutos a 4 °C), y las pellas húmedas resultantes fueron transferidas a rotores MÁS. Se prepararon muestras adicionales mediante la suspensión de los preparados de péptidos ACI-01 y ACI-24 en una concentración de 1 mM en tampón PBS a pH 7,2, como también una solución 4 mM en el mismo tampón de la secuencia peptídica sin ligador. Se añadió D₂O al 10% a cada muestra.

25 Se registraron los espectros de RMN de ¹H HR-MAS en un espectrómetro Bruker Avance 500 que operaba con una frecuencia de 500.13 MHz (11.4 T) equipado con una sonda HR.MAS de 4 mm de triple resonancia (¹H/¹³C/²H).

30 35 Cada muestra fue introducida en rotores de óxido de circonio de 4 mm provistos con insertos cilíndricos de 50 μ l. Para la totalidad de los experimentos de RMN las muestras fueron centrifugadas con una frecuencia igual al ancho espectral (6350 Hz), lo que elimina bandas laterales de centrifugación del espectro. Los espectros de RMN de protón unidimensional fueron adquiridos tanto con presaturación como la secuencia de Watergate (Piotto, M. et al (1992); Piotto, M. et al., (2005)) y mediante la acumulación de 1.000 a 1.500 escaneos. La temperatura del aire portador que fluya en la muestra fue ajustada 295K a efectos de asegurar 298K en la muestra.

35 Las Figuras 1b y 1c demuestran las diferencias de los espectros de RMN unidimensionales entre péptido β -amiloide palmitoilado y pegilado. Pudieron observarse dos diferencias significativas a 8.00 y 8.25 ppm. Debido al hecho que ambos péptidos tienen exactamente la misma secuencia de aminoácidos, con excepción de la lisina 16ava, estas diferencias en 8.00 y 8.25 ppm indican diferencias en la estructura secundaria por cuanto la lisina no debería dar una señal positiva en esta área de espectros de residuos aminoácidos aromáticos.

40 45 Pudo demostrarse mediante los espectros de RMN de protón unidimensional en el área de los residuos aminoácidos aromáticos que el diseño específico del constructo supramolecular de acuerdo con la presente invención tiene como resultado un péptido antigénico amiloide con una estructura secundaria única, sumamente específica y significativa, cuando se constituye en liposomas, que difiere de las moléculas ligadoras diferentes. Esto podría significar que el ligador/ancla fuerza y fija el péptido en una estructura secundaria determinada o definida que depende de la molécula ligadora utilizada. En el caso de utilizarse estas moléculas como una vacuna para la inmunización activa, es probable que los anticuerpos cultivados contra estos antígenos estructuralmente diferentes sean específicos con respecto a antígeno y con respecto a conformación.

50 55 Los datos anteriores obtenidas mediante Elisa y ORT (tarea de reconocimiento de objetivo: un test de memoria cognitiva) después de inmunización de ratones APPxPS-1 de antígenos A β ₁₋₁₅ palmitoilado y A β ₁₋₆ pegilados (ver siguiente ejemplo) muestran que solamente el antígenos palmitoilado restaura el deterioro de memoria en este modelo de enfermedad de Alzheimer si bien ambos demostraron la misma inmunogenicidad. El mecanismo potencial mediante el que dos antígenos que presentan el mismo péptido causen *in vivo* dos anticuerpos funcionales diferentes, está probablemente vinculado a la estructura secundaria del péptido presentado como causado por la tecnología de linker.

EJEMPLO 4: Cuantificación de péptido orientado externamente e internamente, reconstituido

55 La cantidad de péptido reconstituido en ACI-01 y ACI-24 fue establecida mediante un ensayo basado en fluorescamina (FLA) que reacciona específicamente con aminas primarias de manera de formar aductos covalentes sumamente fluorescentes (Udenfriend, S. et al., 1972). Se prevé la reacción de FLA con el terminal N del péptido Pal 1-15 en ACI-24 y con Lys-16 en ACI-01.

A efecto de separar los péptidos libres de aquellos en los liposomas, unas muestras fueron sometidas a ultracentrifugación, y los materiales sobrenadantes resultantes fueron analizados para establecer el contenido de

péptidos para lo cual se utilizó el ensayo FLA. No se detectaron péptidos libres en los materiales sobrenadantes de ni ACI-01 ni ACI-24. El etiquetado de las fracciones pelletizadas con FLA mostró una selectividad muy elevada para la redacción con el péptido en los liposomas tanto para ACI-24 como para ACI-01. A efectos de determinar el contenido total de péptidos presentes en las superficies de las liposomas, se repitieron los ensayos en la presencia de Triton X-100 (2% en PBS) para destruir las bicapas lipídicas. Esto resultó en un aumento significativo en el etiquetado, lo que revela que aproximadamente el 60% del péptido está expuesto sobre la superficie exterior de la membrana. Por otra parte, el etiquetado de ACI-01 con FLA alcanza solamente una meseta a 1,2 mM de FLA en cuya concentración la emisión es idéntica cuando se lleva a cabo el ensayo sea en la ausencia sea la presencia de Triton X-100. Esto demuestra que la totalidad del péptido está expuesto sobre la superficie de la vacuna PEGilada ACI-01.

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

Se prepararon antígenos liposómicos como se escribe (Nicolau et al., 2002). Los antígenos $\text{A}\beta_{1-16}(\Delta 14)$, $\text{A}\beta_{4-11}$ pegilados y $\text{A}\beta_{1-15}$ palmitoilados fueron reconstituidos en un constructo consistente en liposomas hecho de dimiristoíl fosfatidil colina (DMPC), dimiristoíl fosfatidil etanolamina (DPMEA), dimiristoíl fosfatidil glicerol (DMPG) y colesterol (en relaciones molares 0,9; 0,1; 0,1:0,7) que contenían monofosforil lípido A (Sigma Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.) a razón de 40 mg/mM de fosfolípidos.

Los antígenos $\text{A}\beta_{1-16}(\Delta 14)$, $\text{A}\beta_{4-11}$ pegilados y $\text{A}\beta_{1-15}$ palmitoilados (ACI-24) fueron utilizados para la inmunización en ratones C57B/6 en intervalos de 2 semanas. 10 a 12 animales fueron inmunizados con cada antígeno. Se tomaron muestras de suero cada cinco días después del refuerzo y se llevaron a cabo ELISA con diversas diluciones de los sueros. Se presentan los resultados comparativos que demuestran la inmunogenicidad de los diferentes antígenos.

Los datos de ELISA demostrar que el $\text{A}\beta_{1-16}(\Delta 14)$ liposómico es significativamente más inmunogénico que el $\text{A}\beta_{1-15}$ palmitoilado. El ALUM adicional no reforzó la inmunogenicidad de $\text{A}\beta_{1-16}(\Delta 14)$ en los ratones. La respuesta del anticuerpo inducido por $\text{A}\beta_{4-11}$ fue más lenta en comparación con $\text{A}\beta_{1-16}(\Delta 14)$.

Debido a la cuestión de la traducción de la inmunorrespuesta más rápida en una mayor capacidad de memoria se comparó el antígeno pegilado con el antígeno palmitoilado en el modelo de ratón para enfermedad de Alzheimer doble transgénico.

Puede utilizarse un modelo alternativo descrito en los documentos US 6843942 y EP 1337322.

EJEMPLO 6: Comparación de la inmunogenicidad de antígenos pegilados vs. antígenos palmitoilados en el modelo de ratón para enfermedad de Alzheimer (ELISA)

6.1. Para el estudio de inmunización *in vivo* se enjaularon ratones APP717 C57BL/6 x PS-1 A2467E FVB (ratones APPxPS-1), se los distribuyó de forma individual, aleatoria doble ciego, se los emparejó de acuerdo por edades y se los genotipificó mediante PCR.

Se utilizaron ratones hembra jóvenes (de tres a cuatro meses de edad) de una cepa de ratones doblemente transgénicos que expresaban tanto la proteína precursora de amiloide humano mutante (APP-V717) como presenilina humana mutante (PS1-A246E) ambos bajo el control del promotor de gen thy1 de ratón y con un antecedente genético F1 (FVB x C57Bl). Todos los ratones fueron genotipificados mediante reacción de cadena de polimerasa (PCR) a la edad de tres semanas, y cada ratón fue etiquetado de manera única. Todos los ratones fueron genotipificados dos veces durante su intervalo de vida mediante un segundo PCR llevado a cabo al inicio del estudio, y antes de la aleatorización a ciegas en diferentes grupos experimentales. Los ratones tuvieron acceso libre a agua y a alimento para ratones estándar (Muracon-G, Trouw Nutrition, Gantes, Bélgica). Los ratones fueron alojados bajo un ritmo de día y noche invertido en jaulas metálicas estándar, de acuerdo con la legislación local en cuanto a bienestar animal. Cinco días antes del inicio del test de comportamiento, los ratones fueron colocados en jaulas de macrolón de tipo 2 y transportados al laboratorio de comportamiento para aclimatarlos y habituarlos al entorno del laboratorio de test.

6.2. Inmunización

Se utilizaron liposomas con lípido A como adyuvante para preparar la vacuna anti amiloide (Nicolau et al., 2002). Se mezclaron dimiristoílfosfatidilcolina, -glicerol y colesterol en una relación molar de 0,9:1,0: 0,7. Se añadió monofosforil lípido A, un fuerte modulador, con una concentración de 40 mg por mol de fosfolípidos. Los péptidos palmitoilados y pegilados fueron añadidos en una relación molar entre pedido y fosfolípidos de 1:100. Los solventes fueron evaporados, y la película resultante fue hidratada con PBS estéril (pH 7,3) de manera de obtener una concentración final de fosfolípidos de 4 mmol.

Los antígenos palmitoilados (ACI-24, $\text{A}\beta_{1-15}$) y pegilados (ACI-01, $\text{A}\beta_{1-16}$) fueron utilizados para la inmunización en ratones APPxPS-1 en intervalos de 2 semanas (5 inoculaciones intraperitoneales bisemanales). En cada grupo experimental, se inmunizaron 10 animales con cada antígeno mediante inyección intraperitoneal (200 μl por inyección, que contenían 8 mmoles de los péptidos). Como control sirvieron liposomas vacíos. Se tomaron muestras

de suero a intervalos regulares (bisemanalmente) y también a los 5 días después del refuerzo y se llevó a cabo un ELISA anti-amiloide con varias diluciones de los sueros. Se presentan resultados comparativos que demuestran la inmunogenicidad de los diferentes antígenos.

5 Pudo lograrse una inmunorrespuesta significativa en los ratones APPxPS-1 inmunizados con antígeno palmitoilado como también inmunizados con antígeno liposoma pegilado/A β cinco días después de la sexta inoculación del antígeno. Pero, a diferencia con la inmunorrespuesta en ratones C57BL/6 saludables el antígeno pegilado no dio origen a una titulación de anticuerpo más elevada que el antígeno palmitoilado en el modelo de enfermedad.

10 La inmunorrespuesta de IgG anti-A β específica incrementó más rápidamente con ACI-24, e hizo pico después de 5 semanas. Ambas vacunas suscitaron clases e isotipos de inmunoglobulinas significativamente diferentes, resultando el antígeno ACI-24 palmitoilado en titulaciones más elevadas de IgG, a diferencia del ACI-01 PEGilado que suscitó más anticuerpos de la clase IgM.

También se analizaron muestras finales de sangre para todo los animales en cuanto a su isotipo IgG (Figura 2).

15 Se identificaron anticuerpos IgG e IgM A β ₁₋₄₂ específicos mediante ELISA. Unas placas fueron cubiertas con 10 μ g/ml de amiloide β 1-42 durante la noche a 4 °C. Despues de lavado de cada cavidad con PBS-0,05 Tween 20 y bloqueo con BSA al 1%, se añadieron diluciones seriadas de suero a las placas y se incubó a 37 °C durante 2 horas. Despues de lavado, las placas fueron sometidas a incubación con un IgG anti-ratón conjugado con fosfatasa (IgG, anticuerpo entero, Sigma Aldrich St. Louis, MO; EE.UU.) o anticuerpos específicos para isotipos (IgM, IgG1, IgG2a e IgG3, comprados a Pharmigen BD, San Diego, CA, EE.UU. e Ig2b de Zymed Laboratories, San Francisco, CA) durante 2 horas a 37°. Despues del lavado final, la placas fueron sometidos a incubación con PNPP (para-nitro-fenil-fosfatasa), el sustrato de fosfatasa, y se leyó a 405 nm para lo cual se utilizó una lectora de placas de ELISA. Los resultados se expresan haciendo referencia a diluciones seriadas de una recolección titulada de suero procedente de ratones adultos inmunizados o de diluciones seriadas de un anticuerpo disponible en el comercio (6E10, Chemicon International, Temecula, CA, EE.UU.). Como alternativa, los resultados se expresan como O.D. en una dilución donde no había sueros a nivel de saturación (Tabla 1).

20 25 Tabla 1

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

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

30 El ACI-24 resultó principalmente en dos subtipos IgG1 e IgG2b, ambos predominantemente subtipos Th2 no inflamatorios, como también en IgG3, que es una subclase de IgG independiente de las células T. Con la excepción de un animal vacunado con ACI-24, ambas vacunas indujeron solamente niveles muy bajos de IgG2a (Th1).

35 El mapeo de epítopes de los anticuerpos resultantes fue llevado a cabo mediante ELISA para lo cual se utilizó una biblioteca de péptidos que comprendía un total de 33 péptidos biotinilados que abarcaban la secuencia de aminoácidos completa de A β ₁₋₄₂ mientras que un péptido β completo biotinilado sirvió como control positivo. La inmunización con ambas vacunas, ACI-01 y ACI-24, resultó en anticuerpos anti-A β con los mismos epítopes definidos por los aminoácidos 1-9 de A β (péptido 1). Además, hemos analizado la eventual dependencia conformacional mediante la medición de la ligación específica de los antisueros anti-A β resultantes a A β polimérico, para lo cual se adaptó el ensayo ELISA sobre fibras de A β ₁₋₄₂. La inmunización con ACI-24 suscitó titulaciones significativamente más elevadas de anticuerpos anti-A β que reconocen fibras A β ₁₋₄₂ que los antisueros producidos por ratones inmunizados con ACI-01 (Tabla 2). A partir de los resultados obtenidos se desprende que la inmunización con ACI-01 y ACI-24 produjo inmunorrespuestas que diferirían no solamente en su titulación, las subclases e isotipos-Ig, sino también en su especificidad conformacional. Véase la Tabla 2.

Tabla 2

	Control	ACI-01	ACI-24
SEM	2049,0 +/- 46,7	3426,2 +/- 221,9	7770 +/- 2090,1
Estadística de ANOVA		p < 0,05	p < 0,01

EJEMPLO 7: Comparación de antígenos pegilados vs. palmitoilados en la capacidad de reconocimiento en un modelo ratón para enfermedad de Alzheimer (ORT)

5 **7.1 Impacto sobre la mejora de la capacidad de memoria no espacial, dependiente del hipocampo, en el modelo de ratón APP x PS1 para enfermedad de Alzheimer**

Para analizar el impacto sobre la mejora de la capacidad de memoria no espacial, dependiente del hipocampo, en el modelo de ratón APP X PS1 para enfermedad de Alzheimer a lo largo del 3 meses de inmunización mediante vacuna anti- $\text{A}\beta_{16/1-15}$ activa lo cual se utilizaron dos antígenos palmitoilados (ACI-24, $\text{A}\beta_{1-15}$) y pegilados (ACI-01, $\text{A}\beta_{1-16}$), se llevó a cabo un test de reconocimiento de objetos (ORT) esencialmente como se describe (Tang et al., 1999; Rampon et al. 20002). El análisis estadístico fue efectuado utilizando el test de comparación múltiple de ANOVA por Turkey-Kramer para lo cual se utilizó el GraphPad INStat versión 3.06 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California, EE.UU. www.graphpad.com.

15 En pocas palabras, se estableció un programa de inmunización de tres meses en base a seis inoculaciones bisemanales con ACI-01 y ACI-24. Un grupo de ratones recibió liposomas vacíos como control. Los ratones fueron acostumbrados durante 1 h a una caja de Plexiglas de campo abierto (52 x 52 x 40 cm) con paredes verticales negras y un piso translúcido tenuemente iluminado mediante una lámpara colocada por debajo de la caja. Al día siguiente los animales fueron colocados en la misma caja y se los sometió a un test de adquisición de 10 minutos. Durante este test los ratones fueron colocados individualmente en el campo abierto en la presencia del objeto A (mármol o dice), y se registró invertido explorando el objeto A (cuando el hocico del animal estuvo dirigido al objeto a una distancia menos de 1 cm). Durante un test de retentiva de 10 minutos (segundo test), que fue llevado a cabo tres horas después, se colocó un objeto nuevo (objeto B: mármol o dice) junto con el objeto familiar (objeto A) en el campo abierto. Se registró el tiempo (tA y tB) invertido por el animal para explorar los dos objetos. El índice de reconocimiento (RI), definido como la relación entre el tiempo invertido explorando el objeto nuevo y el tiempo invertido explorando ambos objetos ($tB/(tA + tB)$) x 100) fue utilizado para medir la memoria no espacial. El análisis estadístico fue efectuado mediante el factor simple de ANOVA ((Moechars et al., 1999; Moechars et al., 1996)).

30 Los antígenos palmitoilados (ACI-24) y pegilados (ACI-01) fueron utilizados para la inmunización en ratones APPxPS-1 en intervalos de dos semanas. Unos animales de tres meses de edad fueron inmunizados intraperitonealmente con cada antígeno (200 μ l para cada inyección i.p. y 100 μ g de péptido), y liposoma vacío sirvió como control. Se tomaron muestras de suero 5 días después del refuerzo y se llevaron a cabo ELISA con diferentes diluciones de los sueros. Los resultados comparativos muestran la inmunogenicidad de los diferentes antígenos.

35 Se evaluó la capacidad cognitiva de los ratones transgénicos APPxPS-1 inmunizados con antígenos $\text{A}\beta$, palmitoilado (ACI-24) y pegilado (ACI-01) en un paradigma de memoria de reconocimiento visual no espacial, para lo cual se los sometió a una tarea de reconocimiento de objetos de la que se sabe que depende de la actividad hipocampal (Tang et al., 1999), (Rampon et al., 2000)): Básicamente, tres horas del entrenamiento para familiarizar todos los ratones con un objeto dado, se los sometió a test para establecer la retentiva para lo cual se los confrontó con un objeto nuevo, además de y en adición del objeto familiar.

40 La retentiva o capacidad de memoria cognitiva de los ratones APP x PS-1 pudo incrementarse de manera significada mediante su inmunización con antígeno $\text{A}\beta_{1-15}$ palmitoilado (ACI-24) en comparación con los ratones APPxPS-1 tratados con control (76,1 +/- 3,9% versus 49,1 +/- 4,5 % para control; Tabla 3). Eso demuestra que los ratones inmunizado con ACI-24 reconocieron y recordaron el objeto final durante por lo menos 3 horas, lo que sugiere que su motivación y su capacidad de exploración estaban intactas como los de un ratón de edad, sexo y cepo concordantes, saludable, en comparación con ratón de tipo salvaje no tratado y no transgénico (61,8 +/- 5,1%). Si bien el péptido ACI-24 tiene una longitud que es solamente un aminoácido C-terminal más largo (la lisina 16 ava) que el péptido ACI-24 y solamente la tecnología del linker es diferente entre estas vacunas, la vacunación con antígeno $\text{A}\beta_{1-16}$ no demuestra ninguna restauración de memoria (45,6 +/- 6,2%) comparable con ACI-24.

Tabla 3

	Control	ACI-01	ACI-24	saludable
SEM	49,1 +/- 4,5	45,6 +/- 6,2	76,1 +/- 3,9	61,8 +/- 5,1
Estadística		n.s* vs control	p<0,05 vs control	n.s* vs control

7.2 Contribución potencial de las diferentes clases de anticuerpo IgM e IgG a la funcionalidad cognitiva

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

Los anticuerpos de IgM se correlacionaban con la capacidad de memoria ($r^2 = 0,2333$), pero los anticuerpos resultantes de la clase de IgG se correlacionaban a grandes rasgos ($r^2 = 0,857$) al grado de capacidad de memoria (índice de ORT) en dos fases. Entre un índice ORT de 0 a 20 se observó una relación más lineal mientras que con un índice de ORT superior a 20 la correlación ingresa en una fase de saturación. Esto podría indicar que los anticuerpos IgM que no atraviesan la barrera del cerebro contra la sangre no contribuyen a la restauración de memoria. En cambio, los anticuerpos IgG cruzan la barrera de sangre del cerebro en función de su subclase y están vinculados a una mejora de memoria.

Para evaluar la capacidad de la inmunización con SACI-24 para modificar la cantidad de péptidos amiloideos solubles e insolubles en el cerebro de los ratones APPxPS-1, se midieron el $\text{A}\beta_{1-40}$ y $\text{A}\beta_{1-42}$ humanos mediante ELISA específico en la fracción soluble de los homogeneizados del cerebro. Se utilizaron kits de ELISA disponibles en el comercio (Amyloid β 40 o β 42 ELISA, The Genetics Company, Zurich, Suiza). El ELISA fue llevado a cabo de acuerdo con el protocolo del fabricante. La cuantificación del contenido de $\text{A}\beta$ de las muestras fue obtenida mediante la comparación de la absorción con la curva estándar hecha con $\text{A}\beta_{1-40}$ o $\text{A}\beta_{1-42}$ sintéticos (Tabla 4).

Tabla 4

	$\text{A}\beta$ soluble	$\text{A}\beta_{42}$ soluble	$\text{A}\beta_{40}$ insoluble	$\text{A}\beta_{42}$ insoluble
Control	2,6 +/- 0,6	3,1 +/- 1,0	3,0 +/- 0,1	3,0 +/- 0,04
ACI-24	2,1 +/- 0,8	2,1 +/- 0,9	2,0 +/- 0,1	2,0 +/- 0,07
ANOVA estadístico	n.s.	p < 0,01	p < 0,05	p < 0,05

n.s.: no significativo

Los datos se expresan en media ($\text{A}\beta$ ng/g de homogeneizado de cerebro +/- SEM)

La inmunización con ACI-24 condujo a una disminución significativa de $\text{A}\beta_{1-40}$ y $\text{A}\beta_{1-42}$ insoluble, relacionado con la placa. Los niveles de $\text{A}\beta_{1-42}$ soluble también se redujeron de manera significativa, mientras que los niveles de $\text{A}\beta_{1-40}$ solamente mostraron una tendencia a disminuir.

25 EJEMPLO 8: la inmunización con ACI-01 y -24 no ocasiona inflamación.

La seguridad de ambas vacunas liposómicas, ACI-01 y ACI-24, fue evaluada midiendo la producción local de las citoquinas inflamatorias IL-1 β , IL-6, IFN- γ y TNF α mediante ELISA específico. Los niveles de TNF- α , IFN- γ , IKL-6 e IL-1 β fueron medidos en homogeneizado de cerebro totales mediante ELISA de sándwich de acuerdo con los manuales del fabricante (todos de R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.). Los resultados se expresan en picogramos/mlilitros con referencia a diluciones seriadas de las citoquinas recombinantes. La amplitud de las células microgliales activadas (MHCII) y de la astrogliosis (GFAP) en el cerebro en la región del subículo fue evaluado mediante inmunohistoquímica cuantitativa.

La inmunización con ACI-01 o ACI-24 no incrementó de manera significativa los niveles de IL-1 β , IL-6, IFN- γ y TBF en el cerebro. De manera similar, no se observaron diferencias en astrogliosis al tener lugar la inmunización con ACI-24, mientras que la amplitud de las microglías activadas mostró una tendencia a disminuir después de un período de inmunización de tres meses.

EJEMPLO 9: Producción de mABs:

Se utilizó antígeno palmitoilado (ACI-24, $\text{A}\beta_{1-15}$) para la inmunización en ratones C57BL/6 en intervalos de 2 semanas. 10 a 12 animales fueron humanizados con cada antígeno (volumen de inyección: 200 μl que contenían 8 nmol de péptido). La última inyección fue efectuada cuatro días antes de sacrificar los animales. Después de 5 refuerzos los ratones con titulaciones terapéuticas (cuando una dilución 1:5000 de los sueros era positivos en el

ELISA) fueron seleccionados para una fusión. Las células esplénicas son cosechadas de los animales inmunizados y se generan hibridomas mediante la fusión de células esplénicas sensibilizadas con una línea de células de mieloma. La fusión de los linfocitos B de los bazos fue llevada a cabo con células de la cepa de células de mieloma SP2-0. (ATCC, Manassas, VA) para lo cual se utilizaron los procesos bien conocido de Kohler y Milstein (Nature 256: 495-497 (1975)) y Harlow and Lane (Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988)).

5 Se induce a las células a fusionarse mediante la adición de polietilenglicol. Las células híbridas resultantes son seguidamente clonadas de manera convencional, por ejemplo mediante la limitación de la dilución se seleccionaron clones de hibridoma que producen IgG, y se las seleccionó para establecer su ligación específica al péptido A β ₁₋₄₂ mediante ELISA, y se cultivaron los clones resultantes, que producen los anticuerpos monoclonales deseados.

10 Los hibridomas así obtenidos son seleccionados de manera sistemática aplicando las células como recubrimiento en un medio de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina (HSAT).

15 Los hibridomas son luego seleccionados sistemáticamente en base a su capacidad de producir anticuerpos monoclonales contra enfermedades o trastornos específicos asociados con amiloide. Los hibridomas que producen anticuerpos de interés son clonados, ampliados y almacenados congelados para producción futura. El hibridoma preferido produce un anticuerpo monoclonal que tiene el isotipo de IgG, más preferentemente el isotipo IgG2.

EJEMPLO 10: Determinación de la especificidad para el anticuerpo mACI-24-Ab4

Para analizar la especificidad del anticuerpo ACI-24-Ab4, diferentes concentraciones de amiloide preformado 1-42, 1-40 fibrillas de 1-38 fueron transferidos sobre Hybond ECL Nitrocelulosa Membrane (Amerisham Biosciences).

20 20 Después del bloqueo con leche seca al 10% y Tween 20 al 0,7%, las membranas fueron sometidas a incubación con anticuerpo primario a 20 μ g/ml durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de lavado, las membranas fueron incubadas con anticuerpo IgG antirratón de oveja conjugado con peroxidasa de rábano picante (Amerisham Biosciences) durante una hora a temperatura ambiente, se lavó y se incubó con solución quimioluminiscente seguido por la exposición de la membrana a una película de rayos X.

25 25 Para medir la ligación del mAB (mACI-24-Ab4) a fibras de amiloide β 1-42, se preformaron fibras de A β ₁₋₄₂, 1-40 y 1-38, durante 7 días y se transfirió sobre la membrana. Se utilizaron 20 μ g por mililitro de anticuerpo para medir la capacidad de ligación, y se detectó el anticuerpo ligado mediante anticuerpo IgG antirratón de oveja conjugado con peroxidasa de rábano picante mediante una exposición de 20 minutos.

30 30 Como pudo demostrarse mediante el análisis Dot Blot, el anticuerpo mACI-24-Ab4 se liga a diferentes fibras de A β preformadas con diferentes sensibilidades. El artículo presenta la máxima sensibilidad de ligación con las fibras de A β ₁₋₄₂ en lugar de con A β ₁₋₄₀ o A β ₁₋₃₈. Es capaz de detectar por lo menos 0,001 μ g de fibras de A β ₁₋₄₂ mientras que el límite de detección del anticuerpo para las fibras A β ₁₋₄₀ es de por lo menos 0,1 μ g y para las fibras de A β es de 1 μ g, lo que significa que la sensibilidad es de 100 veces a 1.000 veces inferior para estos tipos de fibras amiloideas. Éstos datos demuestran que el anticuerpo ACI-24-Ab4 es por lo menos 100 veces más sensible a la forma amiloide (1-42) de la se conoce que se hace insoluble por cambio de conformación secundaria y que es parte importante de la placas amiloideas en los cerebros de los pacientes con enfermedad de Alzheimer.

EJEMPLO 11: Fraccionamiento por ultracentrifugación por gradiente de densidades

Las propiedades de los anticuerpos monoclonales para inhibir la polimerización de las fibras A β ₁₋₄₂ y de desagregar las fibras A β ₁₋₄₂ fueron estudiadas mediante ultracentrifugación por gradiente de densidades (Rzepecki et al., 2004) que se basa en el principio de distribuir entre fibras de péptidos resultados de diferentes tamaños después de incubación con o sin anticuerpos seguido por un análisis de sedimentación SDS-PAGE de la población de fibras A β preformadas, la desagregación e inhibición de las propiedades de agregación de los anticuerpos coincubados, y la ligación de los anticuerpos a las fibras son ventajas obvias de estos métodos.

45 45 Los anticuerpos monoclonales producidos contra A β ₁₋₁₅ (mACI-24-Ab4) fueron analizados, todos ellos, en ensayos de desagregación y de inhibición.

50 50 Para la inhibición de la agregación de A β ₁₋₄₂, se incubaron monómeros A β ₁₋₄₂ con mABs bajos dos relación molares diferentes (relación molar de monómero A β ₁₋₄₂, 30 ó 100 veces superior que MAb) siendo la concentración final de A β de 50 μ M. después de una incubación de 24 h a 37 °C, las capas fueron superpuestas sobre un gradiente discontinuo de Optiprep™, y los tubos fueron centrifugados a 259.000 durante tres horas a 4 °C. Se cosecharon 15 fracciones (de 140 μ l cada una), la fracción 1 es la fracción menos densa procedente de la parte superior del gradiente y la fracción 15 es la fracción más densa desde el fondo del gradiente. También se recuperaron las pellas. Las fracciones recogidas fueron analizadas mediante SDS mediante tinción de plata. La concentración de A β ₁₋₄₂ para los ensayos de inhibición era cinco veces inferior a la de los ensayos de desagregación que disminuyen la cinética de agregación de los amiloideos y aseguran la medición dentro de la fase lineal.

55 55 Sin la adición de mAb, se agregó péptido A β después de 24 horas de tiempo de incubación y la mayoría de las proteínas se encontró en las fracciones 13 como pella (pellas, muy poco en 12), lo que demuestra una

polimerización completa de los monómeros peptídicos A β . Una inhibición exitosa y significativa de la agregación debería resultar en fibras u oligómeros más pequeño, que deberían hallarse en fracciones con menor densidad. En el ensayo de agregación el mAC1-24-Ab4 causó un corrimiento en forma de bandas que se extienden en la fracción 13 de manera hacia la pella. Esto significa que el mAC1-24-Ab4 presenta una fuerte capacidad de inhibir la polimerización de los monómeros peptídicos de A β en fibras y reveló una ligación específica a las fibras A β (en las fracciones 11 y 12).

Para la desagregación de las fibrillas A β_{1-42} preformadas mediante coincubación con MAbs (bajo dos relaciones molares diferentes 1:30 y 1:100, MAb + monómero A β_{1-42} con la concentración final de A β de 246 μ M), las muestras fueron sometidas a incubación durante 24 horas a 37 °C. Después de 24 horas las muestras fueron fraccionadas por ultracentrifugación y separadas mediante SDS-PAGE como anteriormente descrito (Rzepecki et al., 2004).

De manera similar al ensayo de agregación, la polimerización completa de las fibras pudo demostrarse mediante la distribución de las fibrillas A β_{1-42} solas en las fracciones 12 a P (pellas). En este caso las corrimiento de las fibras hace fracciones de menor densidad indicaría una actividad de desagregación del anticuerpo, cuando se coincide de manera tener fibras preformadas. La adición de mAC1-24-Ab4 en una relación molar de 1:100 mostró un corrimiento de la mayoría de las fibras de amiloide de 12 a 11. Por ello mAC1-24-Ab4 también indica una fuerte actividad de desagregación.

Ejemplo 12: aplicación combinada de un antígeno palmitoilado y de un inhibidor de la activación del complemento en una prueba de retentiva de la capacidad de reconocimiento en un modelo de ratón de enfermedad de Alzheimer (ORT)

A efectos de prevenir los potenciales efectos secundarios tales como complicaciones neurológicas causadas por una mayor estimulación por intermedio de la vacunación de un sistema de complemento ya sobreactivado, se administra el antígeno palmitoilado (ACI-24, A β_{1-15}) en combinación con un inhibidor de complemento seleccionado entre el grupo consistente en TP10 (Receptor de complemento humano soluble), Eculizumab (proteína de complemento antihumano C5); Pexelizumab (complemento anti-C5), Inhibidor C₁ natural® (C₁-esterasemmer-N) e Inhibidor C₁ humano natural.

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

En un esquema de aplicación en el que inhibidor de complemento se administra antes de la vacuna con el antígeno palmitoilado (ACI-24, A β_{1-15}), el compuesto inhibidor se administra en una ventana de tiempo que empieza hasta 20 horas antes de la vacuna y que termina inmediatamente antes de la vacuna (Esquema de aplicación 1).

En un esquema de aplicación en el que el inhibidor de complemento se administra subsiguientemente a la vacuna con el antígeno palmitoilado (ACI-24, A β_{1-15}), el compuesto inhibidor se administra en una ventana de tiempo que empieza inmediatamente después de la vacuna y que termina un día después de la aplicación de la vacuna (Esquema de aplicación 2).

35 12.1 TP10 (Receptor 1 del complemento humano soluble).

En pruebas efectuadas con TP10 en seres humanos se descubrió que es preferible mantener una concentración de TP 10 en un intervalo de entre 100 μ g/mL y 160 μ g/mL durante 24 horas después del CPB. A efectos de lograr un intervalo de concentraciones de este tipo lo más adecuado es la administrar una dosis inicial de 10 mg/kg a lo largo de 0,5 h seguido por 10 mg/kg a lo largo de 23,5 horas (LI JS, Am Heart J. 2004 Jan; 147 (1): 173: 80).

40 La vacunación con antígenos palmitoilados (ACI-24, A β_{1-15}) se efectúa sea después de haberse alcanzado una concentración deseable en base al Esquema de Aplicación 1 o, como alternativa, antes de que se aplique la dosis inicial de 10 mg/kg de TP10 de acuerdo con el Esquema de Aplicación 2.

12.2 Eculizumab (proteína C5 de complemento antihumano)

45 Se administra Eculizumab (600 mg) mediante infusiones cada semana durante cuatro semanas, seguido una semana después por una dosis de 900 mg y seguidamente por otra dosis de 900 mg cada semana de por medio hasta la semana 12 (Hillmen P, N Engl J Med Med 2004 Feb 5; 359 (6): 552-9).

Para un tratamiento a largo plazo es posible administrar Eculizumab en una dosis de 900 mg cada 12 a 14 días (Hill A, Blood, 2005 Oct 1; 108(7): 2559-65. Epub 2005 Jun 28).

50 La vacuna con antígeno palmitoilado (ACI-24, A β_{1-15}) se administra sea después de haberse administrado la primera dosis de 600 mg de Eculizumab siguiendo el Esquema de aplicación 1, o como alternativa antes de administrarse la dosis inicial de 600 mg de Eculizumab de acuerdo con el Esquema de Aplicación 2.

En algunos casos puede ser más adecuado aplicar el Esquema de Aplicación 1 solamente después de la semana 4, cuando se han terminado las primeras 4 tandas de la administración de Eculizumab y se haya logrado una concentración de estado estable en un cuerpo humano.

12.3 Pexelizumab (complemento anti-C5)

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

- 5 La vacunación con antígeno palmitoilado (ACI-24, A β ₁₋₁₅) se efectúa sea después que el primer bolo de 2,0 mg/kg de Pexelizumab haya sido administrado de acuerdo con el Esquema de Aplicación 1, o como alternativa, antes que se administre el bolo inicial de 2,0 mg/kg de Pexelizumab de acuerdo con el Esquema de Aplicación 2.

10 En algunos casos puede ser más adecuado aplicar el Esquema de Aplicación 1 solamente después de haberse completado la segunda aplicación mediante infusión y se haya logrado una concentración de estado estable en el cuerpo humano.

12.4 Inhibidor C₁ humano natural

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

15 Como alternativa, es posible administrar un concentrado de inhibidor de C₁ esterasa en dosis de entre 500 a 1.000 IU (De Serres J, Transfus Apher Sci 2003 Dec; 29(3):247-54); (Bork K, Arch Intern Med 2001 Mar 12;161(5): 714-8).

El inhibidor de C₁ también puede administrarse de manera intravenosa en una infusión de 1 hora, empezando con 6.000 IU, seguido por 3.000 IU, y 1.000 IU en intervalos de 12 horas (Caliesi C, Crit Med. 2002 Aug; 30 (8): 1722-8).

20 Finalmente, el inhibidor C₁ puede administrarse por vía intravenosa cada tercer día en forma de un concentrado de inhibidor calentado por vapor de agua en una concentración de 25 unidades de plasma por kg de peso corporal (Waytes AT, N Engl J Med 1996 Jun20; 334(25): 1630-4).

La vacunación con antígenos palmitoilados (ACI-24, A β ₁₋₁₅) se efectúa sea después de haberse administrado el inhibidor C₁ de acuerdo con el Esquema de Aplicación 1, o como alternativa antes de administrarse la dosis inicial de inhibidor C₁ de acuerdo con el Esquema de Aplicación 2.

12.5 El inhibidor de C₁ natural Cetor® (C₁-esterasaemmer-N)

25 El C₁-esterasaemmer-N o Cetor® se administra en una dosis de 1.000 U, 1.500 o 2.000 U, y posteriormente en la misma dosis en que se administra el otro producto.

La vacunación con antígeno palmitoilado (ACI-24, A β ₁₋₁₅) se efectúa sea después de la administración de la segunda dosis de acuerdo con el Esquema de Aplicación 1, o como alternativa, antes de administrarse la dosis inicial de 1.000 U, 1.500 U o 2.000 U de C₁-esterasaemmer-N o Cetor® de acuerdo con el Esquema de Aplicación 2.

30 Figuras

Figura 1a: Diseño y caracterización biofísica de las dos vacunas liposómicas que contienen inmunógenos peptídicos con los primeros 15 (ACI-24, A β ₁₋₁₅) y 16 (ACI-01, A β ₁₋₁₆) aminoácidos del péptido amiloide β 1-42 de longitud completa. b) ACI-01 contiene A β ₁₋₁₆ flanqueado con un residuo lisina PEGilado en cada lado que lleva DSPE que sirve como ancla liposómica en el otro extremo de la cadena PEG (a). Para ACI-24 (b), dos residuos lisina palmitoilados terminales fueron ligados de manera covalente en cada extremo de A β ₁₋₁₅ a efectos de reconstituir y anclar el antígeno en el liposoma (a). c) espectros CD de los dos antígenos reconstituidos en liposoma. ACI-01 presenta espectros indicativos de conformación proteínica espiralada aleatoriamente o no estructurada (señal negativa hasta 210 nm y que se aproxima lentamente se aproxima al eje del cero hasta 260 nm) mientras que los espectros de ACI-24 contienen una proporción significativa de estructura beta (señal positiva hasta 210 nm, cruzando el eje del cero y seguidamente acercándose al mismo hasta 260 nm). Para el análisis de los espectros de CD las muestras de β -amiloide (ACI-01 y -24) fueron reconstituidas en liposoma y sonicadas mediante un sonificador de sondas con una concentración de los péptidos de 0,9865 mg/ml (1 ml en PBS). Los espectros de CD fueron registrados en un aparato Dicograph (JASCO J-810) con una cubeta de celda de cuarzo de longitud de trayectoria óptica de 0,1 cm. La ventana espectral era de 190-260 nm con una velocidad de escaneo de 20 nm/min a 25°C, y los datos en bruto fueron expresados en elipticidad en unidades de Θ (mdeg).

Figura 1b: región espectral ¹H que comprende los protones de amida peptídicos y las cadenas laterales aromáticas de los espectro de RMN de revolución de ángulo mágico de A. la vacuna ACI-01, B. la vacuna ACI-24, C. ACI-01 1 mM, D. ACI-24 1 mM y E. péptido Ab1-15 4 mM en tampón PBS, pH 7,2.

50 Figura 1c: espectros de RMN 1H unidimensionales del 9 a 5,5 ppm de β -amiloide 1-15 pegilado (negro) y palmitoilado (azul). Los péptidos fueron sintetizados, ligados covalentemente a ácido palmitílico o a PEG respectivamente, y reconstituidos en PBS. Para el análisis de RMN, las muestras fueron centrifugadas y se registró un espectro total de 9 a 0,2 ppm.

5 Figura 2: análisis de titulaciones específicas para amiloide es en los sueros de ratones APPxPS1 inmunizados con antígenos PEGilados (ACI-01) o palmitoilados (ACI-24) en liposomas, comparados con ratones inmunizados con liposomas vacíos (control). A) la inmunización con ACI-24 generó elevados niveles de anticuerpos IgG específicos para amiloide (a, izquierda) solamente después de dos inmunizaciones, y tres semanas después de la primera y se alcanzó un máximo después de 5 semanas. En cambio, la inmunización con ACI-01 generó elevados niveles de anticuerpos IgM específicos para amiloide (a, a la derecha) con un máximo después de 7 semanas pero solamente bajos niveles de IgG en comparación con ACI-24 (a, izquierda, $p < 0,5$).

10 Registros:
10 Las siguientes líneas de células de hibridoma fueron registradas ante el "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmhB (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, bajo las previsiones del Tratado de Budapest:

Designación de la línea de hibridoma	Designación del anticuerpo	Fecha de registro	Número de acceso
EJ 7H3	mACI-24-Ab4	8 diciembre de 2005	DSM ACC2756

Referencias

- Alving et al., *Infect. Immun.* 60:2438-2444, 1992
- Bork K, Arch Intern Med. 2001 Mar 12;161(5):714-8
- Caliezi C, Crit Care Med. 2002 Aug;30(8):1722-8.
- De Serres J, Transfus Apher Sci. 2003 Dec;29(3):247-54
- Doorn MB van, , Allergy Clin Immunol. 2005 Oct;116(4):876-83. Epub 2005 Aug 8
- Harlow and Lane (Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988)
- FYLAKTAKIDOU, K.C., LEHN, J.-M. GREFERATH, R. NICOLAU, C., "Inositol tripyrophosphate: a new membrane permeant allosteric effector of haemoglobin", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15, 1605-1608, 2005.
- Hodgson et al., *Bio/Technoloy*, 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 (1996).
- Hill A, *Blood*. 2005 Oct 1;106(7):2559-65. Epub 2005 Jun 28.
- Hillmen P, *N Engl J Med.* 2004 Feb 5;350(6):552-9.
- Li JS, *Am Heart J.* 2004 Jan;147(1):173-80
- Moechars,D., Lorent,K., De Strooper,B., Dewachter,I. 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

Un aspecto divulgado en la presente se refiere a un método para producir una composición de vacuna terapéutica que comprende la utilización de un fragmento de péptido antigénico A_β que consiste en un tramo simple o repetitivo de entre 13 y 15 residuos aminoácidos contiguos desde la parte N-terminal del péptido A_β para el tratamiento de una enfermedad o condición asociado con amiloide.

5 En la presente también se divulga el método anteriormente descrito en la presente, en donde el tramo contiguo de 13 a 15 residuos aminoácidos se obtiene a partir del fragmento N-terminal 1-16 o 1-17 del péptido A_β.

10 Otro aspecto se refiere al método descrito en lo que precede, en donde la composición de vacuna terapéutica comprende un fragmento de péptido A_β consistente en un tramo simple o repetitivo de entre 13 y 15 residuos aminoácidos contiguos desde la parte N-terminal del péptido A_β seleccionado desde el grupo consistente en los residuos 1-15, 1-14, y 1-13.

15 En particular, un aspecto se refiere al método anteriormente descrito en la presente, en donde la composición de vacuna terapéutica comprende un fragmento de péptido A_β simple o repetitivo seleccionado entre el grupo consistente en péptido antigénico A_{β1-15} indicado en la SEQ ID NO: 1 y A_{β1-16 (Δ14)} indicada en la SEQ ID NO: 3.

Uno de los aspectos se refiere al método anteriormente descrito, en donde el péptido antigénico A_β se modifica de manera tal que es capaz de mantener y estabilizar una conformación definida caracterizada por una proporción equilibrada de porciones α-helicoidal y/o β-lamina y/o de espira aleatoria.

En la presente se revela también un método descrito en la presente, en donde el péptido antigénico A_β se presenta reconstituido en un portador tal como por ejemplo una vesícula, un cuerpo en forma de partículas o una molécula.

20 En particular, uno de los aspectos se refiere a dicho método descrito en lo que precede, en donde el péptido antigénico A_β se presenta reconstituido en un liposoma.

Más particularmente, uno de los aspectos se refiere a dicho método revelado en lo que precede, en donde el péptido antigénico A_β ha sido modificado mediante una parte lipofílica o hidrofílica que facilita su inserción en la bicapa lipídica del portador/ayudante liposómico.

25 Otro aspecto se refiere a dicho método revelado en la presente, en donde la dimensión de la parte lipofílica o hidrofóbica en combinación con la carga neta global del péptido antigénico y del portador/ayudante al que el péptido

llega a fijarse, incorporarse o reconstituirse, es tal que el péptido antigénico es expuesto, estabilizado y presentado en una combinación biológicamente muy activa, que permite que el inmunosistema del organismo apuntado interactúe libremente con los determinantes antigenicos contenidos en el constructo antigenico en conformación expuesta, estabilizada, y biológicamente muy activa, lo que conduce a una fuerte inmunorrespuesta.

5 Un aspecto es el que se refiere al método revelado en lo que precede, en donde la parte lipofílica o hidrofóbica es un ácido graso, un triglicérido o un fosfolípido.

En particular, dicha parte lipofílica o hidrofílica es un ácido graso, en particular un ácido graso con una espina dorsal de carbono de por lo menos 10 átomos de carbono.

Más particularmente, dicha parte hidrofóbica es ácido palmítico.

10 En la presente se revela también el método anteriormente descrito, en donde la preparación liposómica contiene un adyuvante.

En particular, dicho adyuvante es lípido A, más particularmente lípido A detoxificado, tal como lípido A monofosforílico o difosforílico o alumbré.

15 En un aspecto, se divulga un método para producir una composición de vacuna terapéutica que comprende un péptido antigenico inmunogénico para el tratamiento de una enfermedad condición asociado con amiloide, en donde el péptido antigenico β -amiloide es un péptido antigenico palmitoilado $A\beta_{1-15}$ modificado mediante residuos aminoácidos palmitoilados covalentemente fijados, particularmente entre 2 y 4, más particularmente 4 residuos, reconstituido en un liposoma.

20 En particular, uno de los aspectos se refiere a dicho método divulgado anteriormente revelado en la presente, en donde el péptido antigenico $A\beta_{1-15}$ es modificado mediante dos residuos aminoácidos palmitoilados covalentemente fijados al terminal N y C del péptido, respectivamente.

En particular, otro aspecto se relaciona con dicho método divulgado en lo que precede, en donde dos o más moléculas de péptido antigenico palmitoilado $A\beta_{1-15}$ modificadas por residuos palmitoilados covalentemente fijados, en particular uno o dos residuos, en cada extremo del péptido son reconstituidas en una única liposoma.

25 En la presente también se divulga también el método descrito en lo que precede, en donde la enfermedad o condición asociadas con amiloide es una seleccionada del grupo consistente en enfermedades que incluyen sin limitación trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Alzheimer (AD), lo que incluye enfermedades o condiciones caracterizadas por una pérdida de capacidad de memoria cognitiva tal como por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), demencia del cuerpo de Lewis, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés); complejo de Parkinson-Demencia de Guam, como también otras enfermedades que se basan en, o están asociado con, proteína similares a amiloide tales como la parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeld-Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes de presentación adulta; tumores endocrinos, y otras, que incluyen la degeneración macular.

35 En particular, un aspecto se relaciona con dicho método divulgado anteriormente en la presente, en donde la enfermedad o condición asociada con amiloide es la enfermedad de Alzheimer.

Por otra parte, otro aspecto se relaciona con dicho método divulgado en lo que precede, en donde la condición asociado con amiloide se caracteriza por una pérdida de memoria cognitiva asociada con amiloide en un animal, en particular en un mamífero o en un ser humano.

40 Otro aspecto se refiere al método divulgado en la presente, en donde el tratamiento de un animal, en particular de un mamífero o de un ser humano, que sufre de una condición asociada con amiloide caracterizada por una pérdida de capacidad de memoria cognitiva conduce a un incremento en la retentiva de la capacidad de memoria cognitiva.

En particular, un aspecto se refiere al dicho método divulgado en la presente, en donde el tratamiento de un animal, en particular de un mamífero o de un ser humano, que sufre de una condición asociada con amiloide caracterizada por una pérdida de capacidad de memoria cognitiva conduce a una restauración completa de la capacidad de memoria cognitiva.

Otro aspecto se refiere a un constructo antigenico que comprende un fragmento de péptido antigenico $A\beta$ consistente en un tramo simple o repetitivo de entre 13 y 15 residuos aminoácidos contiguos desde la parte N-terminal del péptido $A\beta$ para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada con amiloide.

50 En particular, en la presente se describe un constructo antigenico en donde tramo contiguo de 13 a 15 residuos aminoácidos se obtiene del fragmento N-terminal 1-16 o 1-17 del péptido.

Por otra parte, un aspecto se refiere a dicho constructo antigenico divulgado en lo que precede, en donde la composición de la vacuna terapéutica comprende un fragmento de péptido $A\beta$ consistente en un tramo único o

repetitivo de entre 13 y 15 residuos aminoácidos contiguos de la parte N- terminal del péptido A β seleccionado del grupo consiste en los residuos 1-15,1-4, y 1-13.

Otro aspecto se refiere al constructo antigénico descrito en lo que precede, en donde la composición de vacuna terapéutica comprende un fragmento de péptido A β simple o repetitivo seleccionado del grupo consistente en péptido antigénico A β_{1-15} indicada en la SEQ ID NO:1 y A $\beta_{1-16}(\Delta 14)$ indicada en la SEQ ID NO:3.

Otro aspecto se refiere al constructo antigénico descrito en la presente, en donde el péptido antigénico A β está modificado de manera tal que es capaz de mantener y estabilizar una conformación definida caracterizada por una proporción equilibrada entre las porciones α -helicoidal y/o β -lamina y/o espiras aleatorias.

Y otro aspecto se refiere al constructo antigénico descrito en lo que precede, en donde el péptido antigénico A β se presenta fijado a o reconstituido en, un portador/adyuvante tal como por ejemplo una vesícula, un cuerpo en forma de partículas o una molécula.

En particular, uno de los aspectos se refiere ha dicho constructo antigénico divulgado en la presente, en donde el péptido antigénico A β se presenta reconstituido en una liposoma.

Más particularmente, otro aspecto se refiere dicho constructo antigénico divulgado en la presente, en donde el péptido antigénico A β ha sido modificado por una parte lipofílica o hidrofóbica que facilita su inserción en la bicapa lipídica del portador liposómico.

Un aspecto particular se refiere al constructo antigénico descrito en lo que precede, en donde la dimensión de la parte lipofílica o hidrofóbica en combinación con la carga neta global del péptido antigénico y del portador al que el péptido llega a fijarse, incorporarse o reconstituirse, es tal que el péptido antigénico es expuesto al solvente y presentado en una conformación que es biológicamente activa por el hecho de permitir que el inmunosistema del organismo apuntado interactúe libremente con los determinantes antigenicos contenidos en el constructo antigénico, lo que conduce a una fuerte inmunorrespuesta, y por lo tanto a una elevada titulación de anticuerpos en el organismo apuntado.

Otro aspecto se refiere a un constructo antigénico descrito lo que precede, en donde la parte lipofílica o hidrofóbica es un ácido graso, un triglicérido o un fosfolípido.

En particular, otro aspecto se refiere a dicho constructo antigénico descrito en la presente, en donde la parte lipofílica o hidrofóbica es un ácido graso, particularmente un ácido graso con una espina dorsal de carbono de por lo menos 10 átomos de carbono.

En particular, un aspecto se refiere a dicho constructo antigénico descrito en lo que precede, en donde la parte hidrofóbica es un es ácido palmitíco.

Uno de los aspectos se refiere al constructo antigénico descrito en la presente, en donde el preparado de liposoma contiene un adyuvante o un inmunomodulador.

En particular, otro aspecto se refiere a dicho constructo antigénico descrito en la presente, en donde el inmunomodulador es lípido A, particularmente lípido A detoxificado tal como lípido A monofosfórico o difosfórico o alumbre.

Y otro aspecto más se refiere a una composición de vacuna que comprende péptido antigénico A β_{1-15} para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada con amiloide.

En particular, un aspecto se relaciona con dicha composición de vacuna revelada en lo que precede, en donde el péptido antigénico A β_{1-15} ha sido modificado de manera tal que es capaz de mantener y estabilizar una conformación definida caracterizada por una proporción equilibrada de porciones de espira aleatoria, α -helicoidal y β -lamina.

Otro aspecto se relaciona con la composición de vacuna descrita en la presente, en donde el péptido antigénico A β_{1-15} se presenta fijado a un portador tal como por ejemplo una vesícula, un cuerpo en forma de partículas o una molécula.

Y otro aspecto más se refiere a dicha composición de vacuna descrita en lo que precede, en donde el péptido antigénico A β_{1-15} se presenta reconstituido en una liposoma.

Otro aspecto se refiere a dicha composición de vacuna descrita en la presente, donde el péptido antigénico A β_{1-15} ha sido modificado por una parte lipofílica o hidrofóbica que facilita su inserción en la bicapa lipídica del portador/adyuvante liposómico.

En particular, otro aspecto se refiere a dicha composición de vacuna descrita en la presente, en donde la dimensión de la parte lipofílica o hidrofóbica que provee un ancla para el péptido en la bicapa liposómica en combinación con la carga neta global del péptido antigénico y del portador al que el péptido llega a fijarse, incorporarse o reconstituirse, es tal que el péptido antigénico es expuesto al solvente y presentado en una conformación que es biológicamente activa por el hecho de permitir que el inmunosistema del organismo apuntado interactúe libremente con los determinantes antigenicos contenidos en el constructo antigénico, lo que conduce a una fuerte inmunorrespuesta, y por lo tanto a una elevada titulación de anticuerpos en el organismo apuntado.

activa por el hecho de permitir que el inmunosistema de un organismo apuntado interactúe libremente con los determinantes antigenicos contenidos en el constructo antigenico, lo que conduce a una fuerte respuesta inmunogenica y por lo tanto a una elevada titulación de anticuerpos en el organismo apuntado.

5 Otro aspecto se refiere a dicha composición de vacuna descrita en la presente, en donde la parte lipofílica o hidrofóbica es un ácido graso, triglicéridos o fosfolípidos.

En particular, dicha espina dorsal de carbono del ácido graso tiene por lo menos 10 átomos de carbono.

10 Otro aspecto se refiere a dicha composición de vacuna descrita en la presente, en donde la parte hidrofóbica es ácido palmítico.

15 Además se revela una composición de vacuna descrita en la presente, en donde el preparado liposómico contiene un adyuvante y un inmunomodulador.

20 En particular, un aspecto se refiere a dicha composición de vacuna descrita en la presente en donde el inmunomodulador es lípido A detoxificado, tal como lípido A monofosforilado o difosforilado.

25 Otro aspecto se refiere a una composición de vacuna que comprende un péptido antigenico inmunogenico para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada con amiloide, en donde el péptido antigenico β -amiloide es un péptido antigenico palmitoilado $\text{A}\beta_{1-15}$ modificado por residuos palmitoilo covalentemente fijados, particularmente entre 2 y 4, más particularmente 4 residuos, en cada extremo del péptido reconstituido en una liposoma.

30 Un aspecto particular se refiere a dicha composición de vacuna descrita en la presente, en donde 2 o más moléculas de péptido antigenico palmitoilado $\text{A}\beta_{1-15}$ modificados por residuos palmitoilo covalentemente fijados en cada extremo del péptido son reconstituidos en una única liposoma.

35 Otro aspecto se refiere a una composición de vacuna descrita en la presente, la que, al ser administrada a un animal, particularmente un mamífero, pero en especialmente un ser humano, resulta principalmente en la generación de anticuerpos de subtipos no inflamatorios.

40 Y otro aspecto más se refiere a dicha composición de vacuna descrita en la presente, en donde dichos anticuerpos son del subtipo Th2 no inflamatorio, particularmente de iso IgG1 e IgG2b.

45 Otro aspecto más se refiere a la composición de vacuna descrita en la presente, la que, al ser administrada a un animal, particularmente un mamífero, pero en especial un ser humano, tiene como resultado principalmente la generación de anticuerpos de la subclase IgG independiente de las células T.

50 Un aspecto particular se refiere a dicha composición de vacuna revelada en la presente, en donde dichos anticuerpos son de isotipo IgG3.

55 Otro aspecto se refiere a la composición de vacuna revelada en la presente, la que al ser administrada a un animal, particularmente un mamífero, particularmente un ser humano, no conduce a un incremento significativo de marcadores de inflamación en el cerebro.

60 Otro aspecto más se refiere a la composición de vacuna revelada en la presente, en donde dichos marcadores están seleccionados del grupo consistente en IL-1 β , IL-6, IFN- γ y TNF- α .

65 35 En la presente también se revela una composición de vacuna revelada en la presente, que al ser administrada a un animal, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano, conduce a una disminución significativa de $\text{A}\beta_{1-40}$ y $\text{A}\beta_{1-42}$ en el cerebro.

70 Otro aspecto se refiere a la composición de vacuna descrita en la presente, la que, al ser administrada a un animal, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano, conduce a una reducción significativa en el nivel de $\text{A}\beta_{1-2}$ en el cerebro.

75 Otro aspecto se refiere a la composición de vacuna revelada en la presente, para el tratamiento de una enfermedad o condición, asociada con amiloide, en un animal, particularmente un mamífero o un ser humano, que sufra de una condición de este tipo.

80 45 Un aspecto particular se refiere a dicha composición de la vacuna revelada en lo que precede, en donde la enfermedad o condición asociada con amiloide es una seleccionada entre el grupo consistente en enfermedades que incluyen sin limitación, trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Alzheimer (AD), lo que incluye enfermedades o condiciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tal como por ejemplo un deterioro cognitivo moderado (MCI), demencia corporal de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo holandés); el complejo de Parkinson-Demencia de Guam; como también otras enfermedades que se basan o están asociados con proteínas similares a amiloide tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeld-Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia

relacionado con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes de presentación adulta; amiloidosis cardiaca senil; tumores endocrinos, y otras, que incluyen la degeneración ocular.

En particular, otro aspecto se refiere a dicha composición de vacuna revelada en la presente, en donde la enfermedad o condición asociada con amiloidosis es la enfermedad de Alzheimer.

5 En la presente también se revela la composición de vacuna revelada en la presente, la que, al ser administrada a un animal, particularmente un mamífero o un ser humano, que sufra de una condición asociada con amiloide caracterizada por una pérdida de capacidad de memoria cognitiva, conduce a un incremento en la retentiva de la capacidad de memoria cognitiva.

10 Por otra parte, un aspecto se refiere a la composición de vacuna descrita en la presente, la que al ser administrada a un animal, particularmente un mamífero, pero especialmente a un ser humano, que sufra de una condición asociada con amiloide caracterizada por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva conduce a una restauración completa de la capacidad de memoria cognitiva.

15 El otro aspecto, se describe una composición de vacuna que comprende un péptido antigénico A β para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada con amiloide junto con un inhibidor del sistema de complemento.

En particular, un aspecto se refiere a dicha composición de vacuna revelada en la presente, en donde el péptido antigénico A β es un péptido antigénico A β ₁₋₁₅.

20 Un aspecto se relaciona con dicha composición de vacuna anteriormente descrita en la presente, que comprende un péptido antigénico inmunogénico para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada con amiloide, en donde el péptido antigénico β -amiloide es un péptido antigénico palmitoilado A β ₁₋₁₅, modificado por residuos palmitoílo covalentemente fijados, particularmente entre 2 y 4, más particularmente 4 residuos, en cada extremo del péptido reconstituido en un liposoma junto con un inhibidor del sistema de complemento.

25 En otro aspecto se describe una composición de vacuna, que describe un péptido antigénico A β para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada con amiloide, junto con un compuesto, particularmente un efector alostérico de hemoglobina, que desencadena una liberación reforzada regulada de oxígeno a los tejidos.

El particular, un aspecto se relaciona con dicha composición de vacuna descrita anteriormente en la presente, en donde el péptido antigénico A β es un péptido antigénico A β ₁₋₁₅.

30 Otro aspecto se refiere a dicha composición de vacuna anteriormente descrito en la presente, que comprende un péptido antigénico inmunogénico para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada con amiloide, en donde el péptido antigénico β -amiloide es un péptido antigénico palmitoilado A β ₁₋₁₅ modificado por residuos palmitoílo covalentemente fijados, particularmente entre 2 y 4, más particularmente 4 residuos, en cada extremo del péptido reconstituido en un liposoma junto con un compuesto, particularmente un efector alostérico de hemoglobina, que desencadena una liberación reforzada y regulada de oxígeno a los tejidos.

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

Un aspecto particular es el que se refiere a dicha composición de vacuna descrita anteriormente en la presente, en donde el antígeno peptídico A β es un antígeno peptídico A β ₁₋₁₅.

40 Otro aspecto es el que se refiere a dicha composición de vacuna anteriormente descrita en la presente, que comprende un péptido antigénico inmunogénico para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada con amiloide, en donde el antígeno peptídico β -amiloide es un péptido antigénico palmitoilado A β ₁₋₁₅ modificado por residuos palmitoílo covalentemente fijados, particularmente entre 2 y 4, más particularmente 4 residuos, en cada extremo del péptido reconstituido en una liposoma junto con un inhibidor de sistema de complemento y un compuesto modulador de la afinidad O₂ /hemoglobina, particularmente un efector alostérico de hemoglobina, que desencadena una liberación reforzada y regulada de oxígeno a los tejidos.

45 Otro aspecto se refiere a la composición de vacuna anteriormente descrita en la presente, en donde el inhibidor de complemento es un compuesto seleccionado entre el grupo consistente en Receptor 1 de complemento humano soluble, proteína C5 de complemento antihumano tal como, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti-C5 humanizado o un fragmento de cadena simple de un anticuerpo monoclonal humanizado, inhibidor-N de C₁-esterasa e inhibidor C₁ natural humano.

50 Otro aspecto es el que se refiere a la composición de vacuna descrita en la presente, en donde el compuesto modulador de la afinidad de O₂ /hemoglobina es un compuesto seleccionado entre el grupo consistente en un fármaco antilipidémico tal como, por ejemplo ácido clofibríco o bezafibrato, lo que incluye los derivados de bezafibrato

LR16 y L35, los derivados de urea tales como por ejemplo ácido[2-[4[[[arilamino)carbonil]-amino]fenoxi-2-metilpropiónico, un efecto alostérico de hemoglobina tal como por ejemplo 2,3-difosfoglicerato (DPG), hexaquisfosfato de inositol (IHP), y fosfato de tiro de piridoxal.

5 Y otro aspecto más se refiere a la composición de vacuna descrita en la presente, en donde el compuesto modulador de la afinidad de O₂ /hemoglobina es un compuesto que comprende un ligando aniónico para un sitio alostérico de la hemoglobina, en donde el ligando aniónico comprende un anillo pirofosfato interno, opcionalmente junto con un catión no tóxico.

10 En particular, un aspecto se refiere a dicha composición de vacuna revelada en lo que precede, en donde el compuesto modulador de la afinidad de O₂ /hemoglobina es un derivado de hexafosfato de inositol (IHP) que comprende por lo menos una anillo pirofosfato interno, opcionalmente junto con un catión no tóxico.

15 Otro aspecto se refiere a una composición de vacuna descrita en la presente, en donde el antígeno peptídico β-amiloide comprende un constructo antigénico descrito en la presente.

20 Además, otro aspecto se refiere a la utilización de un fragmento de péptido antigénico Aβ consistente en un tramo simple o repetitivo de entre 13 y 15 residuos de aminoácidos contiguos desde la parte el N-terminal del péptido Aβ para la preparación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de una enfermedad o condición asociada con amiloide,

25 En particular, un aspecto se refiere a la utilización de un antígeno peptídico Aβ descrito en el presente o de constructo antigénico descrito en la presente, para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada con amiloide.

30 Otro aspecto se refiere a la utilización de un antígeno peptídico Aβ anteriormente descrita en la presente, en donde la enfermedad o condición asociada con amiloide es una seleccionada entre el grupo de enfermedades que incluyen sin limitación trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Alzheimer (AD); incluyéndose enfermedades o condiciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tal como por ejemplo un deterioro cognitivo moderado (MCI), demencia corporal de Levy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo holandés); el complejo de Parkinson-Demencia de Guam; como también otras enfermedades que se basan en, o están asociadas con, proteínas similares a amiloide tales como la parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeld-Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionado con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes de presentación adulta, amiloidosis cardiaca senil; tumores endocrinos, y otros, y que incluyen la degeneración macular.

35 30 En particular, el uso de un antígeno peptídico Aβ anteriormente descrita en la presente, en donde la enfermedad o condición asociada con amiloide es la enfermedad de Alzheimer.

40 Por otra parte, uno de los aspectos se refiere a la utilización de un antígeno peptídico Aβ descrito anteriormente en la presente, en donde la condición asociado con amiloide se caracteriza por una pérdida de capacidad de memoria cognitiva tal como por ejemplo un deterioro cognitivo moderado (MIC) en un animal, particularmente un mamífero o un ser humano.

45 Otro aspecto se refiere a la utilización de un antígeno peptídico Aβ anteriormente descrito en la presente, en donde el tratamiento de un animal, particularmente un mamífero o un ser humano, que sufra de una condición asociada con amiloide caracterizada por una pérdida de capacidad de memoria cognitiva conduce a un incremento en la retentiva de la capacidad de memoria cognitiva.

50 40 Un aspecto se refiere a la utilización de un antígeno peptídico Aβ anteriormente descrito en la presente, en la que el tratamiento de un animal, particularmente un mamífero o un ser humano, que sufra de una condición asociada con amiloide caracterizada por una pérdida de capacidad de memoria cognitiva conduce a una restauración completa de la capacidad de memoria cognitiva.

45 45 Otro aspecto se refiere a un método para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada con amiloide que comprende administrar a un animal, particularmente a un mamífero, pero especialmente a un ser humano, que sufra de una enfermedad o condición de este tipo, una composición de vacuna terapéutica descrita en la presente.

En la presente se revela también dicho método anteriormente descrito, en donde la composición de vacuna comprende un antígeno peptídico Aβ₁₋₁₅, en especial un antígeno peptídico Aβ₁₋₁₅ palmitoilado.

50 El particular, un aspecto se refiere al método anteriormente descrito, en donde la administración de dicha composición de vacuna resulta principalmente en la generación de anticuerpos de subtipos no inflamatorios.

Un aspecto particular se refiere al método anteriormente descrito en la presente, en donde dichos anticuerpos son de subtipo Th2 no inflamatorio, particularmente de isotipo IgG1 e IgG2b.

Otro aspecto se refiere al método anteriormente descrito en la presente, en donde la administración de dicha composición de vacuna tiene como resultado principalmente la generación de anticuerpos de subclase IgG independiente de las células T.

5 Y otro aspecto se refiere a dicho método anteriormente descrito en la presente, en donde dichos anticuerpos son de isotipo IgG3.

En particular, el método descrito anteriormente en la presente no conduce a un incremento significativo de marcadores de inflamación en el cerebro.

En particular, dicho marcadores están seleccionados del grupo consistente en IL-1 β , IL-6, IFN- γ y TNF- α .

10 Además, un aspecto se refiere al método descrito en la presente, en donde la aplicación de dicha composición de vacuna conduce a una disminución significativa de A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂ soluble en el cerebro.

Otro aspecto se relaciona con el método descrito en la presente, en donde la administración de dicha composición de vacuna conduce a una reducción significativa en el nivel de A β ₁₋₄₂ soluble en el cerebro.

15 Y otro aspecto más se refiere al método anteriormente descrito en la presente, en donde la enfermedad o condición asociada con amiloide es una seleccionada entre el grupo consistente en enfermedad que incluyen sin limitación trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Alzheimer (AD), lo que incluye enfermedades o condiciones caracterizadas por una pérdida de capacidad de memoria cognitiva tal como por ejemplo, un deterioro cognitivo moderado (MCI), demencial corporal de Lewis, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo holandés), complejo de Parkinson-Demencia de Guam; como también otras enfermedades

20 que se basan en, o están asociado con, proteínas similares a amiloide tales como la parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeld-Jacobs, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes de presentación adulta, amiloidosis cardíacas senil; tumores endocrinos; y otros, que incluyen la degeneración macular.

En particular, dicha condición asociada con amiloide descrita en la presente es la enfermedad de Alzheimer.

25 Otro aspecto se refiere al método anteriormente descrito, en donde la administración de dicha composición de vacuna a un animal, particularmente un mamífero o un ser humano, que sufra de una condición asociada con amiloide caracterizada por una pérdida de memoria cognitiva conduce a un incremento de la retentiva de la capacidad de memoria cognitiva.

30 Otro aspecto se refiere al método anteriormente descrito en la presente, en donde la administración de dicha composición de vacuna a un animal, particularmente un mamífero o un ser humano, que sufra de una condición asociada con amiloide caracterizada por una pérdida de memoria cognitiva, conduce a una restauración completa de la capacidad de memoria cognitiva.

En un aspecto, se describe un método para incrementar de manera significativa la retentiva o capacidad de memoria cognitiva de un mamífero, mediante su inmunización con una composición de vacuna terapéutica descrita en la presente

35 En particular, un aspecto se relaciona con dicho método anteriormente descrito en presente, en donde la composición de vacuna comprende un antígeno peptídico A β ₁₋₁₅, particularmente un antígeno peptídico A β ₁₋₁₅ palmitoilado.

40 Y en otro aspecto, se describe un método para inducir una inmunorrespuesta en un animal, en particular un mamífero o un ser humano que sufra de una condición asociada con amiloide caracterizada por una pérdida de capacidad cognitiva tal como por ejemplo un deterioro cognitivo moderado (MCI) administrando a dicho animal o ser humano, la composición de vacuna terapéutica anteriormente descrita en la presente, de manera tal que se incremente la retentiva o capacidad de memoria cognitiva del animal o ser humano tratados.

45 Además, un aspecto se refiere a un método para inducir una inmunorrespuesta en un animal, particularmente un mamífero o un ser humano, que sufra de una condición asociado con amiloide caracterizada por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva tal como por ejemplo un deterioro cognitivo moderado (MCI) administrado a dicho animal o ser humano una composición de vacuna terapéutica que comprende un antígeno peptídico A β ₁₋₁₅, particularmente un péptido antigénico A β ₁₋₁₅ palmitoilado de manera tal que se restaure por completo la capacidad de memoria cognitiva del animal o ser humano tratados.

50 En particular, un aspecto se refiere a dicho método anteriormente descrito en la presente, en donde la composición de vacuna - descrita en la presente se administra de manera tal que el inhibidor de complemento y el constructo antigénico sean administrados conjuntamente, de manera intermitente, o secuencialmente.

Otro aspecto se refiere al dicho método anteriormente descrito en la presente, en donde el inhibidor de complemento se administra antes de la vacunación con el constructo antigénico, particularmente dentro de una ventana de tiempo que empieza hasta 20 horas antes de la vacunación y que termina inmediatamente antes de la vacunación.

5 Por otra parte, un aspecto se refiere al método descrito en la presente, en donde el inhibidor de complemento se administra subsiguientemente a la vacunación con el constructo antigénico dentro de una ventana de tiempo que empieza inmediatamente después de la vacunación y que termina 1 día después de la aplicación de la vacuna.

Otro aspecto se refiere al método descrito en la presente, en donde la composición de la vacuna comprende un antígeno peptídico $\text{A}\beta_{1-15}$, particularmente una péptido antigénico $\text{A}\beta_{1-15}$ palmitoilado.

10 Un aspecto se refiere a un método para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de una enfermedad o condición asociada con amiloide, que comprende la utilización de la composición de la vacuna anteriormente descrita en presente.

15 En la presente se describe también un método para producir un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada con amiloide que comprende utilizar un péptido antigénico inmunogénico, en donde el péptido antigénico β -amiloide es un péptido antigénico $\text{A}\beta_{1-15}$ palmitoilado modificado mediante residuos aminoácidos palmitoilados covalentemente fijados, particularmente entre 2 y 4, más particularmente 4 residuos, reconstituidos en un liposoma.

Otros aspectos se refieren a un anticuerpo o a una mezcla de anticuerpos que puede obtenerse a partir de un animal inmunizado con una composición de vacuna anteriormente descrita en la presente y a un anticuerpo anteriormente descrito en la presente, caracterizado porque se trata de un anticuerpo monoclonal o derivado de éste.

Listado de secuencias

<110> AC Immune S.A.

5 <120> Vacuna Terapéutica.

<130> L3018 EP/1 BS

<150> EP 05027091.7
<151> 2005-12-12<150> EP 06009098.2
<151> 2006-05-02

<160> 6

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>

<223> péptido antigénico Aβ 1-15

<400> 1
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln

15

<210> 2
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <220>

<223> péptido antigénico Aβ 1-16

<400> 2
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

16

<210> 3
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>

<223> péptido antigénico Aβ 1-15 (Δ 14)

<400> 3
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His Gln Lys

15

15

<210> 4
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>

<223> péptido antigénico Aβ 4-11

<400> 4
Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu

8

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

<220>
<223> péptido antigénico A β 22-35

<400> 5
Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu

13

<210> 6
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5 <220>
<223> péptido antigénico A β 29-40

<400> 6
Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val

12

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo para ser utilizado en la prevención, tratamiento o alivio de los efectos de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placas de amiloide lo que incluye la amiloidosis secundaria y la amiloidosis relacionada con la edad, obtenible mediante un método que comprende generar 5 anticuerpos contra un péptido antigénico correspondiente a la secuencia de aminoácidos del antígeno peptídico A β consistente en un tramo único o repetitivo de entre 13 y 15 residuos de aminoácidos contiguos de la parte N-terminal del péptido A β , y modificado con partes hidrofóbicas covalentemente unidas a cada terminal del péptido antigénico por intermedio de por lo menos un aminoácido acoplado al residuo de aminoácido terminal en cada extremo del péptido antigénico y reconstituido en un liposoma, en donde:
- 10 a) el péptido A β está preformado mediante una síntesis de péptido automatizada estándar sobre resina y modificado mediante injerto sobre resina de una parte lipofílica o hidrofóbica a los residuos de aminoácidos terminales del péptido A β preformado; y
- 15 b) dicho anticuerpo es un anticuerpo bifuncional, el que, al ser sometido a coincubación con péptidos monoméricos y oligoméricos β -amiloide solubles, inhibe la agregación de los monómeros A β en forma de fibrillas poliméricas de elevado peso molecular, y además, durante la coincubación con fibrillas o filamentos de amiloide de elevado peso molecular formados por la agregación de péptidos monoméricos β -amiloideos, es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos poliméricos preformados.
- 20 2. El anticuerpo para ser utilizado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la parte N-terminal del péptido A β ha sido seleccionado del grupo consistente en:
- 25 a) A β ₁₋₁₆ y A β ₁₋₁₇;
- 30 b) A β ₁₋₁₅, A β ₁₋₁₄ y A β ₁₋₁₃; o
- 35 c) A β ₁₋₁₅ como indicado en la SEQ ID NO: 1 y A β _{1-16(Δ 14)} indicado en la SEQ NO: 3.
- 40 3. El anticuerpo para ser utilizado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, al ser administrado a un animal que sufre de un deterioro de memoria, dicho anticuerpo es capaz de retener o de incrementar, o de restaurar por completo la capacidad de memoria cognitiva en el animal tratado.
- 45 4. El anticuerpo para ser utilizado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho péptido monomérico u oligomérico β -amiloide es A β ₁₋₄₂.
- 50 5. El anticuerpo para ser utilizado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, el cual tiene una sensibilidad al péptido amiloide A β ₁₋₄₂ hasta 100 veces superior en comparación con A β ₁₋₃₉, A β ₁₋₄₀, A β ₁₋₄₁, y al péptido amiloide A β ₁₋₄₂ hasta 1.000 veces superior en comparación con A β ₁₋₃₈.
6. El anticuerpo para ser utilizado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, el cual es capaz de detectar fibras de A β ₁₋₄₂ en una concentración muy baja en el orden de 0,001 μ g.
7. El anticuerpo para ser utilizado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, el cual es un anticuerpo monoclonal producido mediante la línea de células de hibridoma registrada el 8 de diciembre 2005 como DSM ACC2756.
8. El anticuerpo para ser utilizado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha enfermedad o trastorno asociado con la formación de placas de amiloide es:
- a) un trastorno neurológico; o
- b) enfermedades o condiciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva.
9. El anticuerpo para ser utilizado de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicho trastorno neurológico es la enfermedad de Alzheimer (AD).
10. El anticuerpo para ser utilizado de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dichas enfermedades o condiciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva es una enfermedad o condición seleccionada entre el grupo consistente en deterioro cognitivo moderado (MCI), demencia corporal de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo holandés); el complejo de Parkinson-Demencia de Guam; la parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeld-Jacobs, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes de presentación adulta; amiloidosis cardíaca senil; tumores endocrinos, degeneración macular.
11. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-17 en una forma farmacéuticamente aceptable.

12. Un hibridoma que produce un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
13. El hibridoma de acuerdo con la reivindicación 12, que es la línea de células de hibridoma EJ 7H3, registrada el 8 diciembre de 2005 como DSM ACC2756.
- 5 14. Un método para producir un anticuerpo, el cual comprende generar anticuerpos contra un fragmento de péptido antigénico A β modificado reconstituido en un liposoma que consiste en un tramo simple o repetitivo de entre 13 y 15 residuos de aminoácidos contiguos de la parte N-terminal del péptido A β , en donde el péptido A β está preformado mediante síntesis de péptidos automatizado estándar sobre resina y ha sido modificado mediante injerto sobre resina, de una parte lipofílica o hidrofóbica a los residuos aminoácidos terminales del péptido A β preformado, administrándose dicho constructo antigénico a un animal no humano.

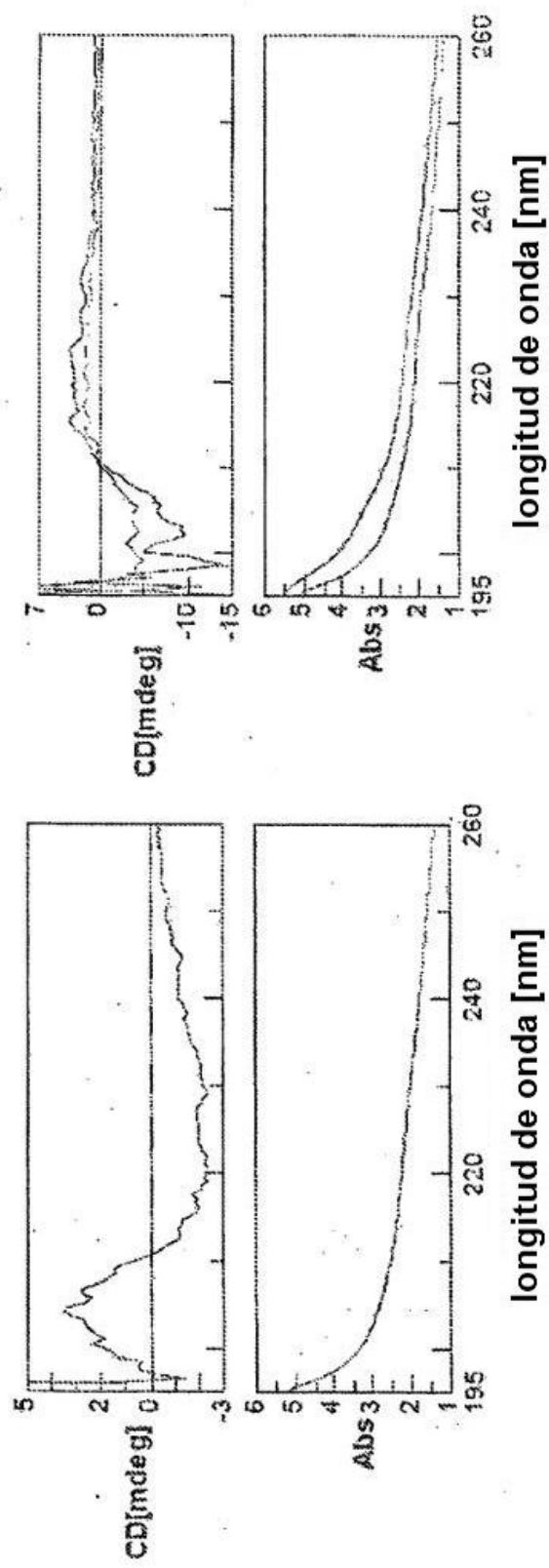


Fig 1a

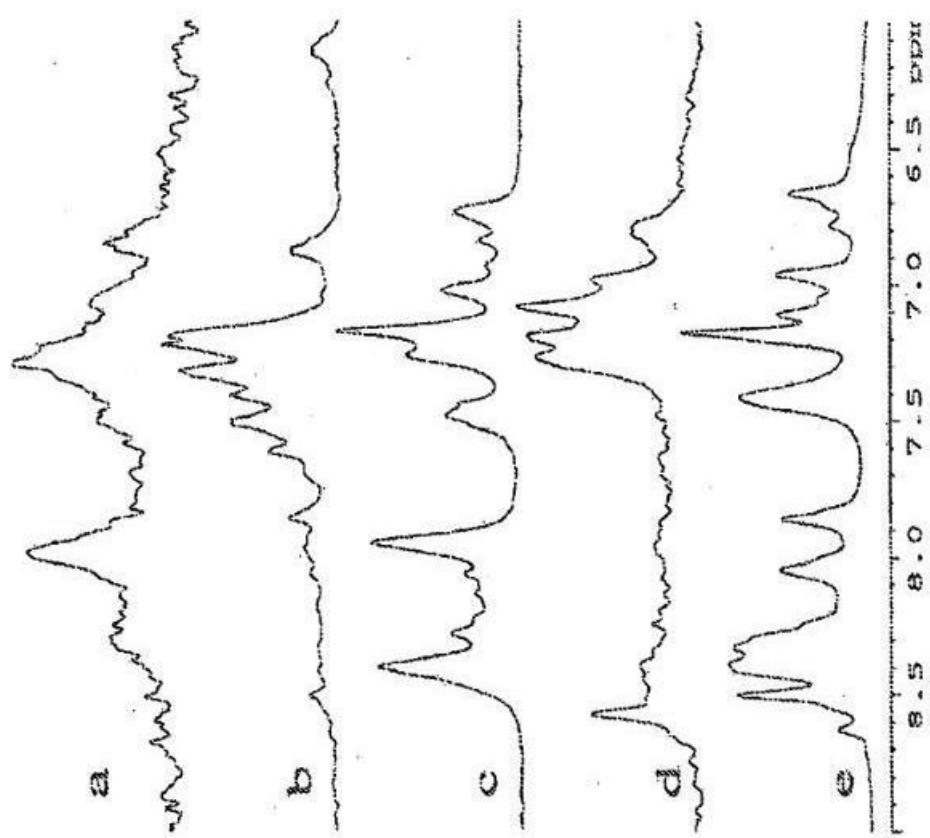


FIG 1b

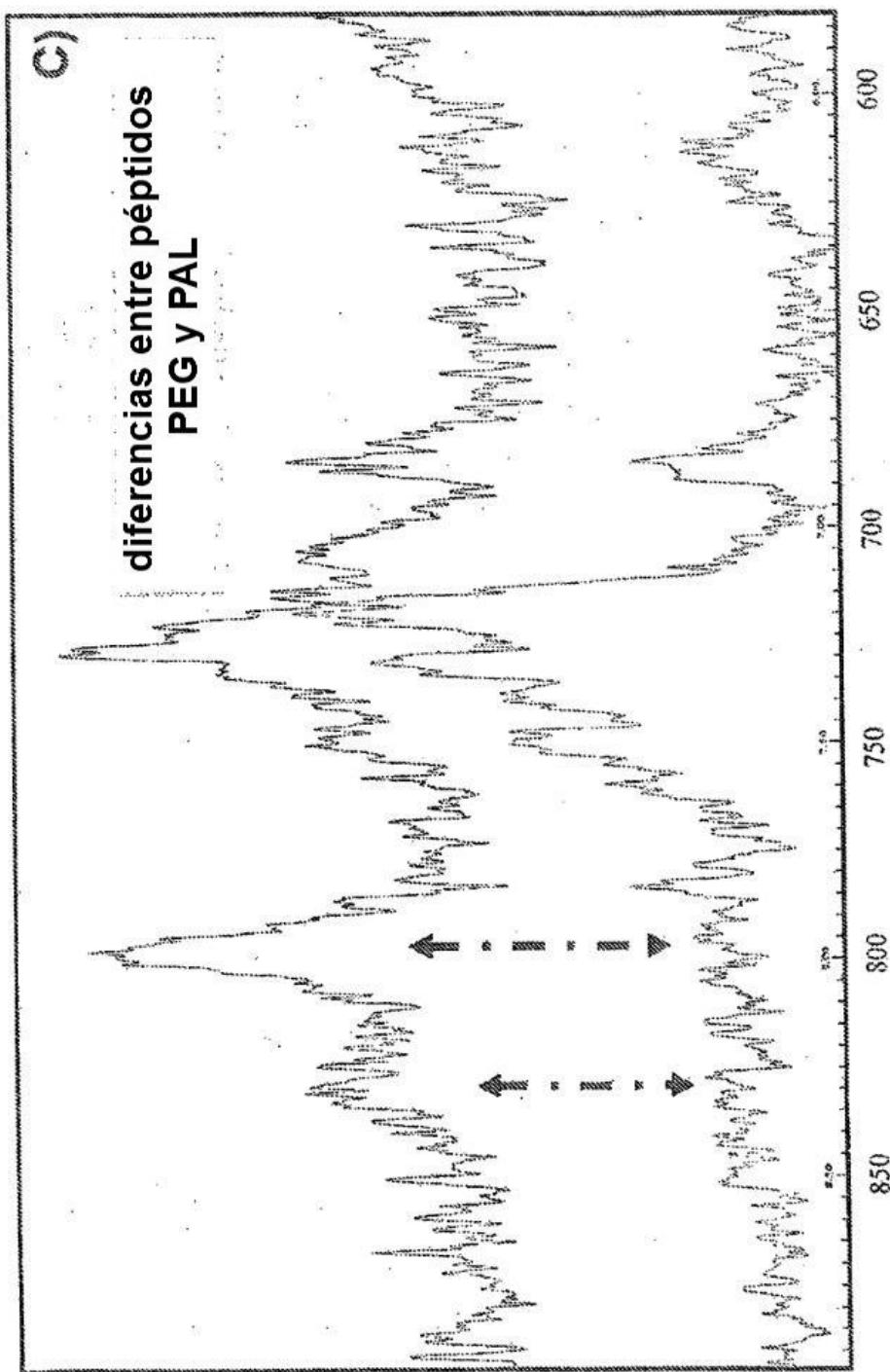


FIG 1c

