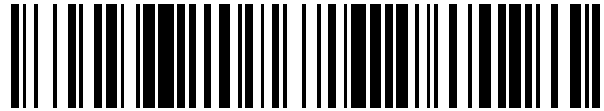


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 571 055**

21 Número de solicitud: 201630173

51 Int. Cl.:

**C07K 19/00** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**15.02.2016**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**23.05.2016**

71 Solicitantes:

**ARACLON BIOTECH, S.L. (100.0%)**  
**Vía Hispanidad 21**  
**50009 Zaragoza ES**

72 Inventor/es:

**SARASA BARRIO, Manuel**

74 Agente/Representante:

**DURÁN MOYA, Luis Alfonso**

54 Título: **Conjugado amiloide y usos y procedimientos del mismo**

57 Resumen:

Conjugado amiloide y usos y procedimientos del mismo.

Conjugado que comprende al menos un péptido CisA $\beta$  (33-40) (SEQ ID NO: 1) y hemocianina de lapa californiana (KLH), caracterizado porque el agente entrecruzante que conecta cada uno de los componentes del conjugado es el éster de N-hidroxisuccinimida del ácido maleimido butírico (SM); composiciones que comprenden dicho conjugado y usos y procedimientos relacionados con las mismas.

ES 2 571 055 A1

## DESCRIPCIÓN

Conjugado amiloide y usos y procedimientos del mismo

5 La presente invención se refiere al sector de la bioquímica, más específicamente al sector de la conjugación de proteínas. Adicionalmente, la presente invención encuentra aplicación en el sector de la medicina y la veterinaria, en el tratamiento de enfermedades amiloides.

10 En el estado de la técnica se han descrito múltiples conjugados útiles para la inmunización activa o pasiva de pacientes con enfermedades amiloides, fundamentalmente para la enfermedad de Alzheimer.

15 Cabe destacar que la gran parte de dicho estado de la técnica se centra en la selección de péptidos o proteínas transportadoras que permiten generar una respuesta inmune adecuada en los pacientes, sin otorgar mayor importancia o relevancia al agente entrecruzante utilizado. Muchas veces, dicho agente entrecruzante, se expresa en forma de una lista de todos los disponibles o conocidos hasta el momento indicando que cualquiera de ellos puede ser utilizado de forma equivalente o simplemente ni se indica.

20 Por ejemplo, en la solicitud de Patente española con número de publicación ES2246105 se da a conocer la prevención o el tratamiento de enfermedades amiloides, entre ellas la enfermedad de Alzheimer, mediante la inmunización activa de pacientes con el conjugado formado por el péptido A $\beta$ 33-40 y la proteína transportadora hemocianina de lapa californiana (en adelante, KLH por sus siglas en inglés) cuyo número de acceso en el  
25 Protein Data Bank es 4BED. También se contempla la utilización de dicho conjugado para la generación de anticuerpos (por ejemplo, mediante inmunización de mamíferos o aves con el mismo) que posteriormente se utilizan en un método de inmunización pasiva para la prevención o el tratamiento de enfermedades amiloides, entre ellas la enfermedad de Alzheimer. Dicho documento no especifica el agente entrecruzante utilizado.

30 El único documento del estado de la técnica del que los inventores son conocedores y en el que se considera como importante el agente entrecruzante en la respuesta inmune que el conjugado produce es la solicitud de Patente PCT con número de publicación WO 2005/072777. En dicho documento se dan a conocer conjugados para la inmunización activa  
35 o pasiva de pacientes, basados en el agente entrecruzante LPA del cual se destaca su capacidad de unir o presentar dos péptidos a la vez, haciéndolo conveniente para generar

una respuesta inmune adecuada en pacientes. Dentro de la explicación general del conjugado basado en LPA se contempla que el péptido utilizado pueda ser un fragmento C-terminal de A $\beta$ 42 o A $\beta$ 40 y, de forma concreta, se mencionan y ejemplifican los fragmentos 33-42, 35-42, 36-42, 37-42, 38-42 y 39-42. Adicionalmente, dicho documento menciona que la proteína transportadora pueda ser KLH. En este mismo documento se describe la generación de otros conjugados, utilizando un agente entrecruzante diferente (N-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato, comúnmente conocido SPDP por sus siglas en inglés).

Por tanto, en vista de lo anterior sigue existiendo la necesidad de disponer de nuevos conjugados o composiciones que comprendan dichos conjugados, que produzcan:

- una respuesta inmune lo más específica posible, con el fin de minimizar los efectos secundarios asociados al tratamiento de vacunación (preventivo o terapéutico);
- la mayor respuesta inmune posible, con el fin de asegurar una inmunización efectiva de los pacientes y disminuir las dosis requeridas de conjugado inmunogénico.

Los inventores, tras extensos y exhaustivos experimentos, han descubierto sorprendentemente que el éster de N-hidroxisuccinimida del ácido maleimido butírico (en adelante, SM), un agente entrecruzante heterobifuncional, del que cada molécula del mismo une un péptido a la proteína transportadora, utilizado como agente entrecruzante para la preparación de conjugados del péptido CisA $\beta$ (33-40) (SEQ ID NO: 1) y la KLH, produce conjugados que permiten generar una respuesta inmune muy superior a la producida por conjugados generados con otros agentes entrecruzantes homo o heterobifuncionales del estado de la técnica (por ejemplo, SPDP) que también permiten la unión de un péptido a la proteína transportadora.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un conjugado caracterizado porque el agente entrecruzante es SM.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende el conjugado de la presente invención.

En aspectos adicionales de la presente invención, se contempla la utilización de dicho conjugado para la preparación de un medicamento, más concretamente, de un medicamento destinado al tratamiento o la prevención de enfermedades amiloides.

Otro aspecto al que la presente invención se refiere es a composiciones que comprenden el

conjugado de la presente invención para su uso como medicamento, más concretamente para su uso en el tratamiento o la prevención de enfermedades amiloides.

5 Adicionalmente, la presente invención también se refiere a un método de tratamiento o prevención de una enfermedad amiloide mediante la administración de una composición que comprende el conjugado de la presente invención.

10 En un último aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de fabricación de anticuerpos basado en la utilización del conjugado de la presente invención.

15 Tal como se utiliza en el presente documento “enfermedad amiloide” y su plural, se refieren a enfermedades asociadas con la acumulación de  $\beta$ -amiloide. Dicha acumulación se puede dar fundamentalmente en el cerebro, produciendo enfermedades entre las que encontramos la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la angiopatía cerebral amiloide, la demencia vascular de origen amiloide y la demencia con Cuerpos de Lewy. La acumulación de  $\beta$ -amiloide también se puede dar fundamentalmente en el músculo esquelético, produciendo la miositis por cuerpos de inclusión.

20 Tal como se utiliza en el presente documento “inmunización pasiva” y su plural, se refieren a la administración de anticuerpos o fragmentos de los mismos a un paciente con la intención de conferirle inmunidad.

25 Tal como se utiliza en el presente documento “inmunización activa” y su plural, se refieren a la administración a un paciente de péptidos (en forma de conjugados) que actúan como inmunógenos, es decir, que permiten la generación de anticuerpos con la intención de conferir a dicho paciente inmunidad.

30 Tal como se utiliza en el presente documento “adyuvante” y su plural, se refieren a sustancias inmunomoduladoras capaces de combinarse con el conjugado de la presente invención para incrementar, mejorar o modular de otra manera una respuesta inmune en un paciente.

35 Tal como se utiliza en el presente documento “paciente” y su plural, se refieren a cualquier mamífero, preferentemente humano, al que se le puede administrar el conjugado de la presente invención o una composición que comprende el mismo con el fin de tratar o prevenir una enfermedad amiloide.

Tal como se utiliza en el presente documento "CisA $\beta$ (33-40)" se refiere a la secuencia de las posiciones 33 a 40 de A $\beta$ 40 (SEQ ID NO: 2) a la que se le ha añadido una cisteína en N-terminal. Dicha secuencia aparece reflejada en SEQ ID NO: 1 y es: CGLMVGGVV.

5

Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un conjugado que comprende al menos un péptido CisA $\beta$ (33-40) (SEQ ID NO: 1) y hemocianina de lapa californiana (KLH), caracterizado porque el agente entrecruzante que conecta cada uno de los componentes del conjugado (cada uno de dicho al menos un péptido con la KLH) es el éster de N-hidroxisuccinimida del ácido maleimido butírico (SM).

Dicho conjugado, además de permitir o producir una respuesta inmune efectiva y específica frente a A $\beta$ 40 (los anticuerpos producidos son específicos frente a A $\beta$ 40 sin unir de forma significativa a A $\beta$ 42), hace que dicha respuesta se vea incrementada en comparación con la producida por otros conjugados que también comprenden el péptido CisA $\beta$ (33-40) (SEQ ID NO: 1) y la KLH, y en los que dichos elementos han sido unidos o conjugados mediante otro agente entrecruzante que también permiten la unión de un péptido a la proteína transportadora.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende el conjugado de la presente invención.

En una realización preferente, la composición adicionalmente comprende uno o más adyuvantes, que preferentemente se seleccionan de entre sales minerales (tales como el hidróxido de aluminio, el fosfato de aluminio o el fosfato de calcio), micropartículas y agentes activos de superficie [tales como, tensioactivos poliméricos de bloque no iónicos, virosomas, saponinas, proteínas de la membrana exterior meningocócica (proteosomas), complejos de estimulación inmune, cocleatos, bromuro de dimetil dioctadecil amonio, avridina, Vitamina A o Vitamina E], productos bacterianos [tales como, el esqueleto de la pared celular de *Mycobacterium phlei*, dipéptidos y tripéptidos de Muramyl (treonil MDP, butil éster MDP, dipalmitoil fosfatidiletalonamina MTP), lípido monofosforil A, glicoproteína de *Klebsiella pneumoniae*, *Bordetella pertussis*, Bacillus de Calmette-Guérin, enterotoxina termolábil de *V. Cholerae* y *E. coli*, trehalosa dimicolato, oligodeoxinucleótidos CpG], hormonas y citocinas (por ejemplo, interleucina-2, interferón  $\alpha$ , interferón- $\beta$ , factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, dehidroepiandrosterona, ligando Flt3, 1,25 dihidroxi vitamina D<sub>3</sub>, interleucina-1, interleucina-6, interleucina-12, hormona del crecimiento humano,  $\beta$ -

microglobulina y linfotactina), constructos antigénicos únicos (tales como, múltiples antígenos peptídicos unidos a un núcleo de lisina o epítomos de células T citotóxicas unidos a epítomos de células T helper y palmitolados en N-terminal), polianiones (tales como, dextranos o polinucleótidos de doble cadena), poliacrílicos (tales como, polimetilmetacrilato o ácido acrílico entrecruzado con alil sucrosa), transportadores [tales como, el toxoide del tetanus, el toxoide de la difteria, proteínas de la membrana externa meningocócica B (proteosomas), la exotoxinas A de *Pseudomonas*, una subunidad de la toxina B del cólera, una enterotoxina mutante termolábil de *E. coli* enterotoxigénico, el núcleo del virus de la Hepatitis B, proteínas de fusión de la toxina A del cólera, dinucleótidos CpG, proteínas de choque térmico o ácidos grasos], vectores vivientes (tales como, el virus vaccinia, el virus canarypox, adenovirus, *Salmonella typhi* atenuada, el Bacilo de Calmette-Guérin, *Streptococcus gordonii*, el virus del Herpes simples, el virus de la vacuna contra la polio, el rinovirus, el virus de la encefalopatía equina venezolana, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella*, *Bordetella pertussis* o *Saccharomyces cerevisiae*), vehículos [tales como, las emulsiones de agua en aceite (por ejemplo, aceites minerales como el adyuvante de Freund completo o el adyuvante incompleto de Freund; aceites vegetales; escualeno o escualano); las emulsiones de aceite en agua, como una mezcla de escualeno, Tween-80 y Span 85; liposomas; o microesferas poliméricas biodegradables de, por ejemplo, láctidos y glicólidos, polifosfazonas, betal-glucanos o proteínoides], otros (tales como, N-acetil-glucosamina-3il-acetil-L-alanil-D-isoglutamina, gamma insulina e hidróxido de aluminio, plantas transgénicas, células dendríticas humanas, lisofosfatidilglicerol, estearil-tirosina o tripalmitoil pentapéptido), o combinaciones de los mismos. Dicho adyuvante es, más preferentemente, hidróxido de aluminio y, aún más preferentemente, gel de hidróxido de aluminio.

25

En un tercer aspecto, la presente invención da a conocer el uso de una composición que comprende el conjugado de la presente invención para preparar un medicamento.

En una realización preferente, la composición comprende adicionalmente uno o más adyuvantes, que, preferentemente, son tal y como se ha explicado anteriormente. Dicho adyuvante es, más preferentemente, hidróxido de aluminio y, aún más preferentemente, gel de hidróxido de aluminio.

También en una realización preferente, dicho medicamento se utiliza para el tratamiento o la prevención de una enfermedad amiloide, más preferentemente de una enfermedad amiloide seleccionada de entre la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la

angiopatía cerebral amiloide, la demencia vascular de origen amiloide, la miositis por cuerpos de inclusión y la demencia con Cuerpos de Lewy. En la realización más preferente, dicho medicamento se utiliza para la prevención o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

5

En un aspecto adicional, la presente invención da a conocer una composición que comprende el conjugado de la presente invención para su uso como medicamento.

En una realización preferente, la composición comprende adicionalmente uno o más adyuvantes, que, preferentemente, son tal y como se ha explicado anteriormente. Dicho adyuvante es, más preferentemente, hidróxido de aluminio y, aún más preferentemente, gel de hidróxido de aluminio.

10

También en una realización preferente, dicho medicamento se utiliza para el tratamiento o la prevención de una enfermedad amiloide, más preferentemente de una enfermedad amiloide seleccionada de entre la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la angiopatía cerebral amiloide, la demencia vascular de origen amiloide, la miositis por cuerpos de inclusión y la demencia con Cuerpos de Lewy. En la realización más preferente, dicho medicamento se utiliza para la prevención o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

15

20

En un quinto aspecto, la presente invención se refiere a un método de tratamiento o de prevención de una enfermedad amiloide en un paciente en necesidad del mismo que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición que comprende el conjugado de la presente invención.

25

En una realización preferente, la composición comprende adicionalmente uno o más adyuvantes, que, preferentemente, son tal y como se ha explicado anteriormente. Dicho adyuvante es, más preferentemente, hidróxido de aluminio y, aún más preferentemente, gel de hidróxido de aluminio.

30

También en una realización preferente, dicha enfermedad amiloide es una enfermedad amiloide seleccionada de entre la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la angiopatía cerebral amiloide, la demencia vascular de origen amiloide, la miositis por cuerpos de inclusión y la demencia con Cuerpos de Lewy, aún más preferentemente la enfermedad de Alzheimer.

35

En un último aspecto, la presente invención da a conocer un procedimiento de fabricación de anticuerpos caracterizado porque comprende una etapa de inmunización de mamíferos o aves con una composición que comprende el conjugado de la presente invención.

5

En una realización preferente, la composición comprende adicionalmente uno o más adyuvantes, que, preferentemente, son tal y como se ha explicado anteriormente. Dicho adyuvante es, más preferentemente, hidróxido de aluminio y, aún más preferentemente, gel de hidróxido de aluminio.

10

Se contempla que los mamíferos utilizados en el procedimiento de la presente invención sean rumiantes, équidos, lagomorfos, primates o cualquier otro mamífero que permita la obtención de cantidades de suero adecuadas para la extracción u obtención de cantidades suficientes de anticuerpos.

15

Se contempla que las aves utilizadas en el procedimiento de la presente invención sean cualquiera de las galliformes, las anseriformes, las columbiformes o cualquier otra ave que permita la obtención de cantidades de suero adecuadas para la extracción u obtención de cantidades suficientes de anticuerpos.

20

Por tanto, la presente invención proporciona un conjugado, generado utilizando el agente entrecruzante SM, y composiciones que comprenden el mismo que permiten generar una respuesta inmune mayor en comparación con conjugados generados con otros agentes entrecruzantes del estado de la técnica.

25

Adicionalmente, la respuesta inmune generada por dichos conjugados de la presente invención o las composiciones que comprenden dichos conjugados es específica para A $\beta$ 40, es decir, permite generar anticuerpos específicos para A $\beta$ 40 sin generar anticuerpos frente a A $\beta$ 42.

30

Para una mejor comprensión, la presente invención se describe en más detalle a continuación en referencia a las figuras adjuntas, que se presentan a título de ejemplo, y en referencia a ejemplos ilustrativos y no limitativos.

35



**Ejemplo 1.** Preparación de conjugados KLH-SM-CisA $\beta$ (33-40).

Para la preparación de estos conjugados, se utilizó KLH como proteína transportadora, SM como agente entrecruzante y CisA $\beta$ (33-40) (SEQ ID NO: 1) como péptido inmunogénico (péptido con los residuos 33-40 del péptido amiloide al que, en N-terminal, se le ha añadido una cisteína).

La unión se llevó a cabo entre los residuos de lisina disponibles de la KLH y la cisteína añadida en el extremo N-terminal del péptido. En este caso, la unión del agente entrecruzante a KLH se realizó primero (etapa o paso de activación de la KLH) y, en un segundo paso o etapa, se adicionó el péptido inmunogénico a la KLH activada para que se produjera la conjugación.

El protocolo seguido para llevar a cabo lo anteriormente expuesto es el siguiente:

15

- Se preparó una solución stock 250 mM de SM disolviendo 100 mg de SM en 680  $\mu$ L de DMSO seco. Se hicieron alícuotas de dicha solución stock y se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Se disolvió la KLH a una concentración de 5 mg/mL en PBS/5mM EDTA pH 7,4.
- Se añadieron 16  $\mu$ L de solución stock de SM por cada mililitro de KLH que se conjugó. Dicha solución se dejó reaccionar durante 2 horas y 30 minutos a temperatura ambiente en agitación suave.

20

- A continuación, se cambió el tampón de la reacción para eliminar los subproductos de la misma y el exceso de SM que no había reaccionado. Para esto, se utilizó una columna PD10 (GE Healthcare; referencia 17-0851-01) de la siguiente manera:

25

- Paso a): Se equilibró la columna con 25 mL (5 mL, 5 veces) PBS (80mM hidrogenofosfato de sodio dihidrato, 20mM dihidrogenofosfato de sodio monohidrato, 100mM cloruro de sodio) /5mM EDTA pH 7,4.

30

- Paso b): Se añadieron en la columna 2,5 mL de la solución ya reaccionada y se dejó que dicha solución penetrara desechando el eluido.

30

- Paso c): Se añadieron 3,5 mL de PBS en la columna y se recogió el eluido.

- Paso d): Se volvió a equilibrar la columna con 25 mL (5 mL, 5 veces) de /5mM EDTA pH 7,4, tal y como se ha explicado anteriormente en el paso a).

- Se repitieron los pasos b) a d) las veces necesarias en función del volumen de solución reaccionada. Al terminar, se dejó la columna equilibrada.

35

- Paso e): Se guardó la columna a  $4^{\circ}\text{C}$  para utilizarla otras veces con el mismo péptido conjugado de la misma forma. protocolo anterior.

• A continuación se procedió a calcular el péptido que había que mezclar con la KLH activada. Para ello, se tuvo en cuenta tanto el peso molecular del péptido como el de la KLH, además de los sitios activos en la misma (medidos de acuerdo con los métodos conocidos en el estado de la técnica basados en medir la absorbancia a 343 nm antes y después de tratar la solución de KLH activada con ditioneitol y realizar la conversión necesaria). Por ejemplo, para 10 mg de KLH con 1724 sitios activos:

$10/6725000$  (peso molecular medio de la KLH) =  $1,48 \times 10^{-6}$  mmoles de KLH

10  $1,48 \times 10^{-6}$  mmoles de KLH x 1724 sitios activos =  $2,55 \times 10^{-3}$  mmoles de péptido necesarios para cubrir todos los sitios activos.

Se puso un exceso de péptido de 3 veces para favorecer la reacción de conjugación:

$2,55 \times 10^{-3} \times 3 = 7,65 \times 10^{-3}$  mmoles de péptido necesarios.

15  $7,65 \times 10^{-3} \times$  peso molecular del péptido (834,4 Da) = mg de péptido necesarios (6,38 mg de péptido). (aplicando los factores de conversión necesarios)

• Una vez que se determinó la relación péptido/KLH activada (es decir, KLH con SM unida), se preparó la siguiente reacción: mezcla del péptido con la KLH activada con SM en la proporción adecuada. Para ello, el péptido se preparó a 6 mg/mL en DMSO y se añadió lentamente a la KLH activada. La proporción de DMSO en la reacción final no debe superar el 30 %. Si en algún caso fue mayor, se procedió a añadir PBS/5mM EDTA pH 7,4 hasta que se redujo su cantidad a valores menores al 30%.

25 • La solución se dejó reaccionar a temperatura ambiente y en agitación entre 18 y 24 horas.

• Finalmente, se almacenaron a 4°C las soluciones obtenidas. Antes de dicho almacenamiento se puede proceder a eliminar el péptido que no se haya conjugado con la KLH y, por tanto, haya quedado libre, o no. En caso de que no se elimine dicho péptido libre, la concentración de péptido en el producto final viene dada por el péptido total utilizado en la reacción, no solo el unido a la KLH nativa, y el volumen final de la reacción.

**Ejemplo 2.** Comparación de la respuesta inmune de conjugados KLH-agente entrecruzante-CisA $\beta$ (33-40) generados utilizando diferentes agentes entrecruzantes.

35 En este caso se comparó la potencia de la respuesta inmune generada en ratones (4 por grupo) de los siguientes conjugados:

- KLH-SM-CisA $\beta$ (33-40) (producido de acuerdo con el Ejemplo 1).
- KLH-SPDP-CisA $\beta$ (33-40): este conjugado utiliza un agente entrecruzante comúnmente utilizado en el estado de la técnica, el Succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) y se produce por medio de un protocolo muy parecido al descrito en el Ejemplo 1 (introduciendo las adaptaciones necesarias) y conocido en el estado de la técnica.

La prueba de potencia de la respuesta inmune se llevó a cabo en ratonas de la estirpe BALB/c. El protocolo que se siguió fue:

1. Una semana antes de la primera inoculación se extrajo sangre a todos los ratones que participaron en el estudio para obtener el suero preinmune.
2. En función del grupo en el cada ratón fue asignado (ver Tabla 1 para los diferentes grupos analizados) a cada ratón se le inoculó la correspondiente vacuna una vez por semana durante tres semanas seguidas.
3. Una semana después del tercer pinchazo se volvió a extraer sangre de cada uno de los ratones que participaron en el estudio para medir en el suero la respuesta obtenida.

Tabla 1. Grupos utilizados en el estudio y descripción del conjugado suministrado a cada uno de ellos.

<b>Grupo</b>	<b>Proteína transportadora</b>	<b>Agente entrecruzante</b>	<b>Adyuvante</b>
1	KLH Fabricante 1	SM	Alhydrogel® (gel de hidróxido de aluminio)
2	KLH Fabricante 1	SPDP	Alhydrogel® (gel de hidróxido de aluminio)
3	KLH Fabricante 2	SM	Alhydrogel® (gel de hidróxido de aluminio)
4	KLH Fabricante 2	SM	Ninguno
5	KLH Fabricante 2	SPDP	Alhydrogel® (gel de hidróxido de aluminio)
6	KLH Fabricante 3 (GMP)	SM	Alhydrogel® (gel de hidróxido de aluminio)

La dosis de péptido suministrada a los ratones de cada uno de los grupos mostrados en la Tabla 1 aparece reflejada en la Tabla 2 incluida a continuación.

Tabla 2. Dosis de péptido tanto total como conjugado a KLH suministrada a cada uno de los ratones en cada uno de los grupos del estudio.

<b>Grupo</b>	<b>Dosis total de péptido (suma del péptido libre y el unido a KLH) (en µg)</b>	<b>Dosis de péptido unido a KLH (en µg)</b>
1	120	40
2	120	40
3	120	40
4	120	40
5	120	40
6	60	60

5 En la Tabla 3 aparecen resumidos los resultados de potencia de la respuesta inmune que se obtuvieron para los diferentes grupos (analizando el suero de los ratones obtenido la semana después de acabar el régimen terapéutico o de vacunación explicado en el presente ejemplo), junto con el incremento observado en la respuesta inmune (numero de veces que se ha incrementado la respuesta inmune a la semana de acabar el régimen terapéutico respecto a la respuesta preinmune). La medición de la respuesta inmune se hizo sobre el suero obtenido de cada ratón mediante ELISA indirecto, según el protocolo conocido en el estado de la técnica, respecto al que cabe destacar que las placas de ELISA se tamizaron con péptido A $\beta$ 40. Una vez realizadas las correspondientes etapas de lavado, bloqueo, posterior lavado, incubado con las muestras a analizar de plasma/suero (diluciones seriadas 15 1:3 empezando con una dilución 1:30) y adicional lavado, se procedió a incubar cada pocillo con el anticuerpo HRP Anti-ratón IgG (H+L) (la dilución del anticuerpo secundario fue la 1:2000 en solución vehículo a pH 8). Tras incubar con dicho anticuerpo y lavar los pocillos, se procedió a revelar la placa añadiendo 100 µL por pocillo de una solución de ABTS (2,2'-azinobis-[3-etilbenzotiazolinosulfonato] de diamonio; Roche; referencia: 10 102 946 001) con 20 0,375 mg/mL en Tampón para ABTS (Roche; referencia: 11 112 597 001). Este sustrato se volvió verde al reaccionar con la peroxidasa unida al anticuerpo secundario. La intensidad del color dependió de la cantidad de anticuerpos unidos a la placa. Se incubó la reacción durante 55 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad y se procedió, entonces, a leer la absorbancia en un lector de placas de ELISA a 405 nm. Los resultados de absorbancia obtenidos fueron analizados con el programa GraphPad Prism 3.02. Para el análisis se utilizó la ecuación "One Site Competition":

$$Y = \text{Mínimo} + \frac{(\text{Máximo} - \text{Mínimo})}{1 + 10^{x - \text{LogEC}_{50}}}$$

Del análisis mencionado anteriormente se obtuvo el dato de la EC<sub>50</sub> que es el punto de inflexión de la curva, es decir, el punto en el que se produjo el 50 % del máximo efecto observado. En el presente caso, se interpretó como la dilución del suero a la que el 50 % del péptido presente en el pocillo se unió al anticuerpo presente en el suero.

Tabla 3. Resultados de respuesta inmune medios obtenidos para cada uno de los grupos del estudio. Incluye, resultados para el suero tras el tratamiento de vacunación (1 semana después de las tres inyecciones según el protocolo descrito en el presente ejemplo) y el incremento observado entre dichos punto y la respuesta preinmune (antes de iniciar el régimen terapéutico). La EC<sub>50</sub> preinmune media fue 18,11.

Grupo	EC <sub>50</sub> post 3 inoculaciones	Incremento de EC <sub>50</sub> ( número de veces)
1	12974,95	716,33
2	580,35	32,04
3	6325,50	349,22
4	924,97	51,07
5	1,87	0,10
6	5056,00	279,14

En vista de los resultados mostrados en la Tabla 3 y el conjugado utilizado en cada uno de los grupos de estudio, se puede concluir lo siguiente:

- Las diferentes KLHs utilizadas como proteínas transportadoras (de diferentes fabricantes), pese a tener cierta influencia en la respuesta inmune, no se han mostrado relevantes a la hora de determinar la magnitud de la respuesta inmune (respuesta inmune elevada en los grupos 1, 3, 4 y 6, es decir, grupos con un incremento de EC<sub>50</sub> de 50 o más, frente a una respuesta inmune débil o inexistente en los grupos 2 y 5, es decir, grupos con un incremento de EC<sub>50</sub> menor de 50).
- Las diferencias entre obtener una respuesta inmune elevada y una respuesta inmune débil o inexistente radica en el agente entrecruzante utilizado. De los resultados experimentales obtenidos se deduce que los conjugados en los que se ha utilizado SM producen una respuesta inmune significativamente superior a la observada para los conjugados en los que se ha utilizado SPDP. De hecho, los grupos tratados con conjugados con el agente entrecruzante SM permiten generar una respuesta inmune elevada mientras que los grupos tratados con conjugados en los que se ha utilizado SPDP mostraron una

respuesta inmune mucho más débil o inexistente.

- Además de lo anterior, cabe destacar los resultados obtenidos para el grupo 4, que ponen de manifiesto que la respuesta de los conjugados generados utilizando SM sigue siendo superior a la observada para los conjugados generados utilizando SPDP aún sin la utilización de adyuvante.

Lo anteriormente expuesto muestra que la utilización de SM como agente entrecruzante para la elaboración de los conjugados KLH-agente entrecruzante-CisA $\beta$ (33-40) proporciona vacunas con una respuesta inmune sorprendentemente mayor tanto si dicho conjugado se utiliza con adyuvante o sin adyuvante.

**Ejemplo 3.** Comparación del grado de conjugación (unión de péptido a KLH) de conjugados KLH-agente entrecruzante-CisA $\beta$ (33-40) generados utilizando diferentes agentes entrecruzantes.

Como en el caso del Ejemplo 2, los conjugados para los que se comparó el grado de conjugación o número de péptidos unidos por molécula de proteína transportadora (KLH) son:

- KLH-SM-CisA $\beta$ (33-40) (producido de acuerdo con el Ejemplo 1).
- KLH-SPDP-CisA $\beta$ (33-40) (producido según lo indicado en el Ejemplo 2).

En la Tabla 4 aparecen resumidos los resultados experimentales obtenidos para los experimentos de unión del péptido a la proteína transportadora llevados a cabo.

Tabla 4. Descripción de los conjugados analizados y del número de moléculas de péptido unidas a cada molécula de KLH observado por espectrometría de masas. Respecto a dichas uniones, en la tabla se indican uno o dos valores en función de si se analizaron uno o dos lotes del correspondiente conjugado.

Proteína transportadora	Agente entrecruzante	Número de moléculas de péptido unidas a cada molécula de KLH
KLH Fabricante 1	SM	81
KLH Fabricante 1	SPDP	35/33
KLH Fabricante 2	SM	70/68
KLH Fabricante 2	SPDP	44/31

Tal como se observa en la Tabla 4, las KLHs provenientes de diferentes fabricantes no tuvieron influencia en el resultado de uniones obtenidas. En cambio, el agente entrecruzante sí que tuvo una gran influencia en los resultados obtenidos dado que SM permitió obtener el doble o más de uniones, es decir, al utilizar SM como agente entrecruzante se unen el doble de moléculas de péptido por cada molécula de KLH. Este resultado resulta sorprendente e inesperado dado que el péptido utilizado incorpora en N-terminal una cisteína para la reacción con los agentes entrecruzantes. La incorporación de dicha cisteína, de acuerdo con el estado de la técnica debería permitir que la conjugación del péptido fuera eficiente y equivalente con cualquiera de los agentes entrecruzantes conocidos en el estado de la técnica. Sin embargo, se observó que, en este caso SM permite una reacción de conjugación más eficiente que SPDP.

Estos resultados de unión permitieron explicar parte de los resultados mostrados en el Ejemplo 2 (es decir, parte de la mejora observada en la inducción de respuesta inmune y consiguiente generación de anticuerpos). No obstante, dichos resultados de respuesta inmune no son totalmente asimilables a los resultados de unión obtenidos, siendo igualmente sorprendentes en vista de estos últimos y sugiriendo que el agente entrecruzante contribuye a incrementar la respuesta inmune no únicamente mediando una mayor unión del péptido a la proteína transportadora.

20

**Ejemplo 4.** Ensayos de respuesta inmune en conejos y especificidad de los anticuerpos generados.

Se procedió a la realización de un ensayo de potencia en conejos de vacunas de los conjugados KLH-SM-CisA $\beta$ (33-40). En este caso se decidió vacunar a los conejos con 200  $\mu$ g de péptido total unido estando dichos 200  $\mu$ g unidos a la proteína transportadora (dosis elegida en función de estudios preliminares). A cada conejo se le inoculó 1 mL de la vacuna con la dosis especificada anteriormente, utilizando como adyuvante Alhydrogel® (gel de hidróxido de aluminio) al 2%.

30

Los animales fueron tratados con la dosis indicada anteriormente mediante inyección subcutánea de la vacuna una vez por semana durante 3 semanas seguidas extrayendo sangre una semana antes de comenzar el protocolo de vacunación y una semana después de terminarlo.

35

La titulación de los anticuerpos generados y el análisis de su especificidad se llevó a cabo

mediante ELISA, según el protocolo conocido en el estado de la técnica e indicado brevemente en el Ejemplo 2, con las siguientes diferencias:

- Las placas de ELISA se tamizaron con péptido Aβ40 o Aβ42 (incluido como SEQ ID NO: 3), en función de si se desea detectar anticuerpos específicos o que se unan a Aβ40 o a Aβ42, respectivamente.
- El anticuerpo utilizado para detectar la presencia de anticuerpos en los sueros analizados fue HRP Anti-Conejo IgG (H+L) (Invitrogen; referencia: 65-6120) (la dilución del anticuerpo secundario fue la 1:2000 en solución vehículo a pH 8).

Los reactivos de revelación fueron los indicados en el Ejemplo 2 y, por tanto, la lectura de las placas se hizo también a 405nm y a los resultados se les aplicó la misma ecuación. Del análisis se obtuvo el dato de la EC<sub>50</sub> que es el punto de inflexión de la curva, es decir, el punto en el que se produjo el 50 % del máximo efecto observado. Tal y como se ha indicado en el Ejemplo 2, dicho resultado se interpretó como la dilución del suero a la que el 50 % del péptido presente en el pocillo se unió al anticuerpo presente en el suero.

De acuerdo con el protocolo de titulación mencionado anteriormente, todas las muestras obtenidas fueron tituladas para detectar anticuerpos frente al péptido Aβ40 y Aβ42. Los resultados obtenidos aparecen resumidos en las Tablas 5 y 6.

Tabla 5. Cantidad de anticuerpos específicos para Aβ40 en los conejos antes del protocolo de vacunación y tras el mismo. También se incluye una columna relativa al incremento observado como consecuencia del tratamiento.

Identificación Conejo	EC <sub>50</sub> preimmune	EC <sub>50</sub> post 3 inoculaciones	Incremento de EC <sub>50</sub> (número de veces)
71	36,17	47406	1310,64
72	7,483	4021	537,35
73	14,07	73421	5218,27
74	4,482	12467	2781,57
75	45,48	5173	113,74
76	20,5	98381	4799,07



Tabla 6. Cantidad de anticuerpos específicos para A $\beta$ 42 en los conejos antes del protocolo de vacunación y tras el mismo. También se incluye una columna relativa al incremento observado como consecuencia del tratamiento.

Identificación Conejo	EC <sub>50</sub> preinmune	EC <sub>50</sub> post 3 inoculaciones	Incremento de EC <sub>50</sub> (número de veces)
71	53,88	0,049	0,00
72	29,24	0,069	0,00
73	22,49	2,761	0,12
74	24,05	15,49	0,64
75	73,18	0,063	0,00
76	23,37	34,04	1,46

5 De lo mostrado en las Tablas 5 y 6 se deduce que el conjugado de la presente invención (KLH-SM-CisA $\beta$ (33-40)) permite no solo obtener una respuesta inmune elevada en conejos sino que dicha respuesta es específica para A $\beta$ 40 (sin respuesta humoral apreciable frente a A $\beta$ 42), es decir, en la respuesta inmune se generan anticuerpos específicos para A $\beta$ 40 que no unen A $\beta$ 42.

10

Los resultados incluidos en los Ejemplos 1 a 4 vienen a demostrar y refrendar las ventajas y efectos técnicos explicados anteriormente en la descripción, demostrando que la utilización de SM como agente entrecruzante permite generar conjugados KLH-agente entrecruzante-CisA $\beta$ (33-40) que generan una mayor respuesta inmune respecto a cuando se utiliza otro agente entrecruzante del estado de la técnica. Adicionalmente, los conjugados KLH-SM-CisA $\beta$ (33-40) permiten generar respuestas inmunes elevadas en ratones y conejos, específicas para A $\beta$ 40 (sin respuesta humoral apreciable frente a A $\beta$ 42), es decir, en dichas respuestas inmunes se generan anticuerpos específicos para A $\beta$ 40 que no unen A $\beta$ 42. Dichos ejemplos validan la utilidad del conjugado de la presente invención en el tratamiento de enfermedades amiloides, preferentemente la enfermedad de Alzheimer, en mamíferos, preferentemente en humanos.

20

Si bien la invención se ha descrito con respecto a ejemplos de realizaciones preferentes, éstos no se deben considerar limitativos de la invención, que se definirá por la interpretación más amplia de las siguientes reivindicaciones.

**REIVINDICACIONES**

1. Conjugado que comprende al menos un péptido  $\text{CisA}\beta(33-40)$  (SEQ ID NO: 1) y hemocianina de lapa californiana (KLH), caracterizado porque el agente entrecruzante que  
5 conecta cada de los componentes del conjugado es el éster de N-hidroxisuccinimida del ácido maleimido butírico (SM).
2. Composición que comprende el conjugado de la reivindicación 1.
- 10 3. Composición, según la reivindicación 2, caracterizada porque adicionalmente comprende uno o más adyuvantes.
4. Composición, según la reivindicación 3, caracterizada porque el adyuvante es gel de hidróxido de aluminio.  
15
5. Uso de una composición que comprende el conjugado de la reivindicación 1 para preparar un medicamento.
6. Uso de una composición que comprende el conjugado de la reivindicación 1 para  
20 preparar un medicamento destinado al tratamiento o la prevención de una enfermedad amiloide.
7. Uso de una composición, según la reivindicación 6, caracterizado porque la enfermedad amiloide se selecciona entre la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la  
25 angiopatía cerebral amiloide, la demencia vascular de origen amiloide, la miositis por cuerpos de inclusión y la demencia con Cuerpos de Lewy.
8. Uso de una composición, según la reivindicación 7, caracterizado porque la enfermedad amiloide es la enfermedad de Alzheimer.  
30
9. Procedimiento de fabricación de anticuerpos caracterizado porque comprende una etapa de inmunización de mamíferos o aves con el conjugado de la reivindicación 1.
10. Procedimiento, según la reivindicación 9, caracterizado porque los mamíferos se  
35 seleccionan entre rumiantes, équidos, lagomorfos o primates.

11. Procedimiento, según la reivindicación 9, caracterizado porque las aves se seleccionan entre las galliformes, las anseriformes o las columbiformes.

# ES 2 571 055 A1

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ARACLON BIOTECH, S.L.

<120> Conjugado amiloide y usos y procedimientos del mismo

<130> 1500077

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Fragmento de Abeta con cisteína añadida en N-terminal

<400> 1

Cys Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val  
1 5

<210> 2

<211> 40

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val  
35 40

<210> 3

<211> 42

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

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

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



②① N.º solicitud: 201630173

②② Fecha de presentación de la solicitud: 15.02.2016

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	US 20130230545 A1 (MANDLER, M. et al.) 05.09.2013, párrafos [0054],[0057].	1-11
Y	WO 2010136487 A1 (ARACLON BIOTECH, S.L.) 02.12.2010, página 23, líneas 29-31.	1-11
Y	US 2012244159 A1 (CHAIN, D.G.) 27.09.2012, párrafos [0079],[0083].	1-11
Y	US 2010068214 A1 (ROOD, J. et al.) 18.03.2010, párrafo [0145].	1-11
Y	KAFI, K. et al. "Maleimide conjugation markedly enhances the immunogenicity of both human and murine idiootype-KLH vaccines". MOLECULAR IMMUNOLOGY. Enero 2009. Vol. 46, N.º. 3, páginas 448-456, todo el documento.	1-11

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe  
12.05.2016

Examinador  
M. Novoa Sanjurjo

Página  
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C07K19/00** (2006.01)  
**A61K39/395** (2006.01)  
**A61P25/28** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, REGISTRY, HCAPLUS, BIOSIS, GOOGLE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 12.05.2016

#### Declaración

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-11	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-11	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

#### Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

#### Consideraciones:

La invención consiste en un conjugado que consiste en el péptido C-Abeta(33-40), derivado de la proteína betaamiloide, unido a KLH a través del éster de N-hidroxisuccinimida del ácido maleimido butírico, que el solicitante denomina también SM. El conjugado de la invención, se utiliza como medicamento para el tratamiento de enfermedades amiloides como la enfermedad de Alzheimer. Debe mencionarse que en el estado de la técnica, el éster de N-hidroxisuccinimida del ácido maleimido butírico es conocido por diferentes nombres como: 1) éster de N-hidroxisuccinimida del ácido  $\gamma$ -maleimido butírico, 2) éster de N-hidroxisuccinimida del ácido 4-maleimido butírico, 3) GMBS, todos los cuales corresponden al compuesto de nº de registro RN 80307-12-6 de Chemical Abstracts CAS. Ninguno de los sinónimos de dicho compuesto es SM, mencionado por el solicitante a lo largo de la descripción y las reivindicaciones. La búsqueda y la opinión escrita, se han realizado para el supuesto de que el conjugado de la invención comprende el éster de N-hidroxisuccinimida del ácido  $\gamma$ -maleimido butírico, GMBS. El solicitante debería aclarar la naturaleza exacta del conjugado de la invención, en las fases posteriores del procedimiento.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 20130230545 A1 (MANDLER, M. et al.)	05.09.2013
D02	WO 2010136487 A1 (ARACLON BIOTECH, S.L.)	02.12.2010
D03	US 2012244159 A1 (CHAIN, D.G.)	27.09.2012
D04	US 2010068214 A1 (ROOD, J. et al.)	18.03.2010
D05	KAFI, K. et al. "Maleimide conjugation markedly enhances the immunogenicity of both human and murine idiotype-KLH vaccines". MOLECULAR IMMUNOLOGY. Enero 2009. Vol. 46, N°. 3, páginas 448-456.	

El documento D01, describe el tratamiento de enfermos de Alzheimer con vacunas que incluyen como principios activos, péptidos derivados de la proteína  $\beta$ -amiloide que inducen "in vivo" la formación de anticuerpos anti proteína A $\beta$ .

El documento D02, describe conjugados de péptidos derivados de A $\beta$  entre los que está el péptido C-A $\beta$ (33-40). Los péptidos se unen a albúmina y se menciona (página 23, líneas 23-32), que se pueden utilizar agentes intercalantes como GMBS y SPDS. Este último es el que se utiliza en los ejemplos. Los conjugados se utilizan para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

El documento D03, describe vacunas para tratar una enfermedad amiloide utilizando péptidos derivados de A $\beta$ . Se utiliza el péptido (33-40), unido a KLH activada por un grupo maleimido del compuesto MBS (éster m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida).

El documento D04, describe una vacuna peptídica para tratar el pedero de rumiantes causado por *Dichelobacter nodosus*. Péptidos derivados de la bacteria se conjugan con KLH y el agente GMBS [0145].

El documento D05, describe la importancia del grupo maleimido en la inmunogenicidad de los conjugados péptido-KLH. La presencia del grupo maleimido, aumenta la inmunogenicidad de conjugados péptido-KLH, respecto a otros agentes utilizados en el estado de la técnica, como el glutaraldehído.

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración****NOVEDAD**

## Reivindicaciones 1-11

No se ha encontrado descrito en el estado de la técnica, el conjugado de la invención constituido por el péptido C-A $\beta$  (33-40), unido a KLH activada con GMBS. Las reivindicaciones 1-11, cumplen el requisito de novedad del Artículo 6 de la Ley de Patentes 11/1986.

**ACTIVIDAD INVENTIVA**

## Reivindicaciones 1-11.

Los documentos más relevantes del estado de la técnica son los documentos D01-D05.

La obtención de vacunas peptídicas en las que péptidos antigénicos se presentan conjugados a compuestos que aumentan su antigenicidad, está ampliamente descrito en el estado de la técnica. Entre estos compuestos, la hemocianina de lapa de California KLH, sola o activada por unión a reactivos bifuncionales, es de los más utilizados.

En el documento D01, se menciona que péptidos derivados de A $\beta$ , pueden tener una cisteína en el NH<sub>2</sub> terminal [0032] y conjugarse para obtener vacunas con GMBS, KLH [0057], [0069]. En el documento D02, se utiliza para la obtención del conjugado, el péptido C-A $\beta$ (33-40) de la invención, pero albúmina en vez de KLH. Los conjugados descritos en D03, utilizan el mismo péptido amiloide conjugado a KLH, pero el agente bifuncional es MBS (éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida). En el documento D04, se obtienen vacunas anti *Dichelobacter nodosus* en las que se utiliza KLH y GMBS y péptidos derivados de la bacteria.

En los ejemplos de la descripción de la presente solicitud, se presenta un estudio comparativo de la inmunogenicidad de dos conjugados péptido C-A $\beta$ (33-40)-KLH. El conjugado de la invención contiene GMBS como agente intercalante y presenta una antigenicidad muy superior al conjugado en el que el agente es SPDS. GMBS, tiene un grupo maleimido en su estructura, ausente en el agente SPDS. El documento D05, describe que la presencia del grupo maleimido en el agente intercalante utilizado al diseñar una vacuna peptídica, aumenta de forma significativa la respuesta inmune del conjugado. No se han presentado resultados de inmunogenicidad comparada, utilizando otros conjugados en los que el agente intercalante contiene también el grupo maleimido como por ejemplo, el conjugado descrito en el documento D03.

Teniendo en consideración el contenido de los documentos D01-D05, se considera que el diseño del conjugado de la invención y las características inmunogénicas del mismo resultarían obvias para un experto en la materia. Las reivindicaciones 1-11 no cumplen el requisito de actividad inventiva del Artículo 8 de la Ley de Patentes 11/1986.