

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 962**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/385 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.05.2010** **PCT/EP2010/057235**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.12.2010** **WO10136487**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2010** **E 10724360 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.06.2016** **EP 2435093**

54 Título: **Conjugados de albúmina-péptido amiloide y usos de los mismos**

30 Prioridad:

26.05.2009 EP 09382078

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.10.2016

73 Titular/es:

ARACLÓN BIOTECH, S. L. (100.0%)
Via Hispanidad 21
50009 Zaragoza(Zaragoza), ES

72 Inventor/es:

SARASA BARRIO, J., MANUEL

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 587 962 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

Conjugados de albúmina-péptido amiloide y usos de los mismos

5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

La invención se refiere a composiciones terapéuticas que comprenden conjugados de albúmina-péptido amiloide y a usos de las mismas y, más específicamente, a su uso para el tratamiento de enfermedades asociadas con la deposición de proteínas amiloides, tales como la enfermedad de Alzheimer.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Las enfermedades amiloides o amiloidosis incluyen varios estados patológicos que tienen una amplia variedad de síntomas externos. Estos trastornos tienen en común la presencia de depósitos extracelulares anómalos de fibrillas proteicas, conocidas como "fibrillas amiloides", "depósitos amiloides" o "placas amiloides" que habitualmente tienen aproximadamente 10-100 nm de diámetro y están localizadas en regiones de tejido u órganos específicos. Tales placas están compuestas principalmente por una proteína o un péptido soluble que se produce de manera natural. Estos depósitos insolubles están compuestos por agregados generalmente laterales de fibrillas que tienen aproximadamente 10-15 nm de diámetro. Aunque aparecen de diversas maneras, todos los depósitos amiloides tienen propiedades morfológicas comunes, se tiñen con colorantes específicos (por ejemplo tioflavina T, rojo Congo) y tienen un aspecto birrefringente rojo-verde característico bajo luz polarizada tras su tinción.

Las enfermedades relacionadas con amiloide se caracterizan por el tipo de proteína presente en el depósito. Por ejemplo, las enfermedades neurodegenerativas tales como encefalopatía espongiiforme ovina, encefalopatía espongiiforme bovina, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob y similares se caracterizan por la aparición y acumulación de una forma resistente a proteasa de una proteína priónica (denominada A β Sc o PrP-27) en el sistema nervioso central. De manera similar, la enfermedad de Alzheimer, otro trastorno neurodegenerativo, se caracteriza por la deposición de placas amiloides y ovillos neurofibrilares. En este caso, el amiloide en placas y vasos sanguíneos se forma mediante la deposición de proteína beta-amiloide fibrilar. Otras enfermedades tales como la diabetes de aparición en adultos (diabetes tipo II) se caracterizan por la acumulación localizada de amiloide en el páncreas.

Cada proteína amiloidogénica tiene la capacidad de plegarse en láminas beta y de formar fibrillas insolubles, que se depositan extracelular o intracelularmente. Cada proteína amiloidogénica, aunque de secuencia de aminoácidos diferente, tiene la misma propiedad de formación de fibrillas y unión a otros elementos tales como proteoglicano, amiloide P y componente del complemento. Además, cada proteína amiloidogénica tiene secuencias de aminoácidos que, aunque diferentes, pueden catalizar la formación de células de láminas beta. Como ejemplo, las fibrillas beta-amiloides se han asociado con células neuronales muertas y microglisis en pacientes con enfermedad de Alzheimer. Cuando se sometió a prueba *in vitro*, se demostró que el péptido beta-amiloide podía provocar un proceso de activación de la microglía (macrófagos cerebrales), lo que explicaría la presencia de microglisis e inflamación cerebral que se encuentran en el cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer.

En otro tipo de amiloidosis observado en pacientes con diabetes tipo II, se ha demostrado que la proteína amiloidogénica IAPP induce toxicidad de células beta de los islotes *in vitro*. Por tanto, la aparición de fibrillas de IAPP en el páncreas de pacientes con diabetes tipo II podría contribuir a la pérdida de las células beta de los islotes (Langerhans) y la disfunción del órgano.

Una de las enfermedades amiloides más destacada es la enfermedad de Alzheimer, que es una enfermedad neurodegenerativa progresiva que afecta aproximadamente al 0,5-1% de la población total en el mundo occidental. La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la deposición de grandes números de placas amiloides en el cerebro. Se supone que esta deposición produce la patología de la enfermedad y la mayoría de los enfoques para prevenir la enfermedad de Alzheimer tienen como objetivo reducir, eliminar o prevenir la formación de placas amiloides. El constituyente principal de las placas amiloides es el péptido beta-amiloide (A β), una proteína de 40-42 aminoácidos que se produce a través de la escisión de la proteína precursora de amiloide (APP, por sus siglas en inglés).

La solicitud de patente US20070172496 da a conocer conjugados que comprenden el péptido A β (33-42), un péptido reconocido por un anticuerpo monoclonal y albúmina que se usan como antígenos de captura en ensayos ELISA para determinar la presencia de anticuerpos anti-A β en una muestra de un paciente que se ha inmunizado con un complejo formado por diferentes péptidos derivados del péptido A β (1-42) y el denominado conjunto presentador de ligando o LPA (por sus siglas en inglés).

Por tanto, existe una necesidad en la técnica de composiciones inmunogénicas adicionales que puedan inducir una disminución eficaz y sostenida en los niveles de amiloide en plasma y para reducir el número de depósitos amiloides.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

En un primer aspecto, la invención se refiere a un conjugado que comprende al menos un péptido inmunogénico derivado de la región C-terminal de A β (1-42) y albúmina para su uso en medicina, en el que el al menos un péptido inmunogénico derivado de la región C-terminal de A β (1-42) es A β (35-42) (SEQ ID NO: 2), A β (33-42) (SEQ ID NO: 3) o A β (33-40) (SEQ ID NO: 4) o un péptido de 8-10 residuos de aminoácido que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con A β (35-42) (SEQ ID NO: 2), A β (33-42) (SEQ ID NO: 3) o A β (33-40) (SEQ ID NO: 4).

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende un conjugado que comprende al menos un péptido inmunogénico derivado de la región C-terminal de A β (1-42) y albúmina y un adyuvante para su uso en medicina, en la que el al menos un péptido inmunogénico derivado de la región C-terminal de A β (1-42) es A β (35-42) (SEQ ID NO: 2), A β (33-42) (SEQ ID NO: 3) o A β (33-40) (SEQ ID NO: 4) o un péptido de 8-10 residuos de aminoácido que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con A β (35-42) (SEQ ID NO: 2), A β (33-42) (SEQ ID NO: 3) o A β (33-40) (SEQ ID NO: 4).

En otro aspecto, la invención se refiere a un conjugado que comprende al menos un péptido inmunogénico derivado de la región C-terminal de A β (1-42) y albúmina o una composición que comprende al menos un péptido inmunogénico derivado de la región C-terminal de A β (1-42) y albúmina y un adyuvante, para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad asociada con la deposición de proteínas amiloides, en el que el al menos un péptido inmunogénico derivado de la región C-terminal de A β (1-42) es A β (35-42) (SEQ ID NO: 2), A β (33-42) (SEQ ID NO: 3) o A β (33-40) (SEQ ID NO: 4) o un péptido de 8-10 residuos de aminoácido que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con A β (35-42) (SEQ ID NO: 2), A β (33-42) (SEQ ID NO: 3) o A β (33-40) (SEQ ID NO: 4).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS DE LA INVENCIÓN

La figura 1 es un diagrama que ilustra el programa de inyecciones de inmunización de péptidos A β (flechas, en la parte inferior), indicando el número de inmunización debajo de la línea, recogida de muestras de sangre (flechas, en la parte superior), que indican el momento correspondiente para cada obtención de cada muestra en semanas (S) y la recogida de muestras de LCR es en la semana 0 y la semana 13 (puntas de flecha dobles). (A) es el programa de inyecciones de inmunización del péptido A β (x-42) y (B) del péptido A β (x-40). En (A), el cuadro de la izquierda representa el programa seguido por todos los animales y el cuadro de la derecha representa las intervenciones adicionales que afectan solamente a los grupos C y D.

Figura 2: (A - C). Evolución de los títulos de anticuerpo anti-A β en plasma. A) Los títulos de anticuerpo anti-A β de las muestras de plasma se expresan como equivalentes a $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ del anticuerpo monoclonal 6E10. B) Los títulos de anticuerpo anti-A β de las muestras de plasma se expresan mediante su CE50. D) Los títulos de anticuerpo anti-A β de las muestras de plasma se expresan mediante la inversa de la dilución máxima de plasma en que la absorbancia era tres veces mayor que la absorbancia media de los pocillos blanco. Los diferentes momentos (en semanas) están representados en el eje horizontal. Cada línea representa un animal tal como se indica en la leyenda. Las formulaciones que recibió cada grupo de animales es péptido sintético – Blue Carrier más Rehydragel HPA (A) péptido sintético – Blue Carrier más Abisco-300 (B); péptido sintético – BSA más Rehydragel HPA (C) y péptido sintético – BSA más Abisco-300 (D). Las líneas continuas más cortas corresponden a los animales que no responden al tratamiento (grupos A y B) en los que el tratamiento se detuvo en la semana 13. Los animales del grupo C están representados mediante líneas discontinuas y el correspondiente símbolo individual. Los del grupo D están representados mediante líneas de puntos y el correspondiente símbolo individual.

Figura 3 (A-B). Evolución de las concentraciones de péptido A β en plasma. A) Representa la evolución en diferentes momentos de la concentración en plasma de péptido A β 1-42. B) Representa la evolución en diferentes momentos de la concentración en plasma de péptido A β 1-40. El eje horizontal cruza el eje Y en 3,125 pg/ml. Los valores por debajo de 3,125 se han representado como -5 pg/ml por motivos de claridad en la gráfica. Los diferentes momentos (en semanas) están representados en el eje horizontal. Cada línea representa un animal tal como se indica en la leyenda. Cada uno de los cuatro grupos (A, B, C y D) recibió una formulación de vacuna diferente. Las líneas continuas más cortas corresponden a los animales que no responden al tratamiento (grupos A y B) en los que el tratamiento se detuvo en la semana 13. Los animales del grupo C están representados por líneas discontinuas y el correspondiente símbolo individual. Los del grupo D están representados mediante líneas de puntos y el correspondiente símbolo individual.

Figura 4. Evolución de las razones de cambio de los títulos de anticuerpo o de las concentraciones de péptido en plasma con respecto al estado pre-inmune para cada grupo experimental. Los momentos (en semanas) están representados en el eje horizontal. La línea discontinua representa la evolución de la razón de la concentración en plasma de péptido A β 1-42 en momentos diferentes con respecto al estado pre-inmune (S0). La línea de puntos representa la evolución de la razón de la concentración en plasma de péptido A β 1-40 en diferentes momentos con respecto al estado pre-inmune (S0). La línea continua representa la evolución de la razón de los títulos de anticuerpo anti-A β en plasma en diferentes momentos con respecto al estado pre-inmune (S0). Para cada razón, los valores en el eje vertical representan la suma de los tres animales del grupo. Los valores de la razón de los títulos de

anticuerpo anti-A β en plasma se han dividido entre veinte para la claridad de las gráficas.

Figura 5. Evolución de los títulos de anticuerpo anti-A β 33-40 en plasma. A) Los títulos de anticuerpo anti-A β de las muestras de plasma se expresan como equivalentes a ng/ μ l del anticuerpo anti-A β 40 (SAR 22). B) Los títulos de anticuerpo anti-A β de las muestras de plasma se expresan por su CE50. Los diferentes tiempos (en semanas) se representan en el eje horizontal. Cada línea representa un animal tal como se indica en la leyenda (A1-A3 en negro y B1-B3 en blanco). Cada uno de los dos grupos (A y B) recibió una formulación de vacuna diferente.

La figura 6 es una gráfica que muestra la concentración de péptido en la forma soluble o en la forma insoluble en los dos grupos de vacunación, comparados con el grupo control. Vac.1 corresponde a A β X-42 + BSA + adyuvante tipo Th2 y Vac.2 corresponde a A β X-42 + BSA + adyuvante tipo mezcla Th1/Th2. La columna (1) corresponde a la forma soluble de A β 1-40; (2) a la forma soluble de A β 1-42; (3) a la forma insoluble de A β 1-40 y (4) a la forma insoluble de A β 1-42.

La figura 7 es una gráfica que muestra la concentración de péptido en la forma soluble de los grupos vacunados, comparados con el grupo control. (A) Corresponde a péptidos solubles A β 1-40; (B) a péptidos solubles A β 1-42, mientras que (1) indica muestra de cerebelo; áreas cerebrales (2) frontal; (3) entorrinal y (4) temporal.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

CONJUGADOS DE LA INVENCION PARA SU USO EN MEDICINA

Los autores de la presente invención han descubierto que la administración de un conjugado que comprende un péptido derivado de la región C-terminal de la región de proteína beta-amiloide (1-42) [A β (1-42)] y albúmina da lugar, sorprendentemente, a la presencia de anticuerpos frente a dicho péptido y a una disminución de los niveles séricos de las proteínas A β (1-40) y A β (1-42), que son los principales constituyentes de las placas amiloides en la enfermedad de Alzheimer. Estos resultados abren una nueva ventana terapéutica para tratar, prevenir y/o mejorar enfermedades asociadas con la deposición de proteínas amiloides.

Por tanto, en un aspecto, la invención se refiere a un conjugado que comprende al menos un péptido inmunogénico derivado de la región C-terminal de A β (1-42) y albúmina para su uso en medicina, en el que el al menos un péptido inmunogénico derivado de la región C-terminal de A β (1-42) es A β (35-42) (SEQ ID NO: 2), A β (33-42) (SEQ ID NO: 3) o A β (33-40) (SEQ ID NO: 4) o un péptido de 8-10 residuos de aminoácido que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con A β (35-42) (SEQ ID NO: 2), A β (33-42) (SEQ ID NO: 3) o A β (33-40) (SEQ ID NO: 4).

Péptido inmunogénico derivado de la región C-terminal de A β (1-42)

El término "péptido inmunogénico" tal como se usa en el presente documento se refiere a un péptido que comprende un motivo específico de alelo, un epítipo u otra secuencia de modo que el polipéptido o el fragmento se une a una molécula de MHC e induce una respuesta de linfocitos T citotóxicos ("CTL", por sus siglas en inglés) y/o una respuesta de células B (por ejemplo, producción de anticuerpos), y/o respuesta de linfocitos T auxiliares, y/o una respuesta de hipersensibilidad de tipo retardada (DTH, por sus siglas en inglés) contra el antígeno del que deriva el péptido inmunogénico, es decir, el péptido beta amiloide. Los métodos adecuados para determinar si un péptido determinado es inmunogénico se muestran, por ejemplo, en los ejemplos de la presente invención. Estos métodos se basan en la capacidad de dichos péptidos inmunogénicos de generar anticuerpos anti-beta amiloide en animales después de la administración de dichos péptidos.

La expresión "péptido beta-amiloide" se usa en el presente documento de manera intercambiable con Abeta, proteína beta-amiloide, "beta-A", "AP beta", "péptido beta-A" o "péptido A β " y se refiere a una familia de péptidos que son los constituyentes químicos principales de las placas seniles y de los depósitos amiloides vasculares (angiopatía amiloide) que se encuentran en el cerebro de pacientes con la enfermedad de Alzheimer (EA), síndrome de Down y hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis del tipo holandés (HCHWA-D, por sus siglas en inglés). En cualquiera de sus formas, el péptido beta-amiloide es un fragmento de la proteína precursora de beta-amiloide (APP, por sus siglas en inglés) que comprende un número variable de aminoácidos, normalmente 39-43 aminoácidos. "A β (1-42)", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un péptido de 42 aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 672 a 713 de APP y que se produce mediante la escisión proteolítica secuencial de la proteína precursora de amiloide mediante las β - y γ -secretasas.

Los péptidos beta-amiloides se expresan comúnmente como "A β (x-y)" en el que x representa el número de aminoácido del extremo amino-terminal de los péptidos beta-amiloides e y representa el número de aminoácido del extremo carboxilo-terminal. Por ejemplo, A β (1-40) es un péptido beta-amiloide cuyo extremo amino-terminal comienza en el aminoácido número 1 y el extremo carboxilo-terminal acaba en el aminoácido número 40, una secuencia del cual es proporcionada por la SEQ ID NO: 1.

La expresión "un péptido derivado de la región C-terminal de A β (1-42)" pretende significar péptidos que tienen desde 2 hasta 40 residuos de aminoácido que comprenden parte de o toda la región C-terminal de A β (1-42). La expresión

abarca también péptidos que comprenden regiones que tienen una similitud sustancial con la región C-terminal de A β (1-42), tal como variantes estructurales.

La expresión "similitud sustancial" significa que dos secuencias peptídicas, cuando se alinean de manera óptima, comparten al menos el 50 por ciento de identidad de secuencia, preferentemente al menos el 60 por ciento de identidad de secuencia, más preferentemente al menos el 70 por ciento de identidad de secuencia, más preferentemente al menos el 80 por ciento de identidad de secuencia, más preferentemente al menos el 90 por ciento de identidad de secuencia, más preferentemente al menos el 95 por ciento de identidad de secuencia o más (por ejemplo, el 99 por ciento de identidad de secuencia). Preferentemente, las posiciones de residuos, que no son idénticas, difieren en sustituciones de aminoácidos conservativas. Sustituciones de aminoácidos conservativas se refieren a la intercambiabilidad de residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas hidroxiladas es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina.

Las posiciones de residuos, que no son idénticas, pueden estar compuestas también por análogos de péptido, incluyendo aminoácidos no naturales o derivados de los mismos. Los análogos difieren normalmente de los péptidos que se producen de manera natural en una, dos o algunas posiciones, con frecuencia en virtud de sustituciones conservativas.

Algunos análogos incluyen también aminoácidos no naturales o modificaciones de aminoácidos N o C-terminales en una, dos o algunas posiciones. Ejemplos de aminoácidos no naturales, sin limitarse a, son D-aminoácidos, aminoácidos alfa, alfa-disustituidos, N-alquil-aminoácidos, ácido láctico, 4-hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, épsilon-N,N,N-trimetil-lisina, épsilon-N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, omega-N-metilarginina y ácido isoaspártico.

En una realización particular de la conjugación de la invención, el péptido derivado de la región C-terminal de A β (1-42) se selecciona de A β (35-42) (SEQ ID NO: 2), A β (33-42) (SEQ ID NO: 3) y A β (33-40) (SEQ ID NO: 4).

"A β (35-42)" tal como se usa en el presente documento, se refiere a un péptido de 8 aminoácidos correspondiente a los últimos 8 aminoácidos de A β (1-42).

"A β (33-42)" tal como se usa en el presente documento, se refiere a un péptido de 10 aminoácidos correspondiente a los últimos 10 aminoácidos de A β (1-42).

"A β (33-40)" tal como se usa en el presente documento, se refiere a un péptido de 8 aminoácidos correspondiente a los aminoácidos desde 33 hasta 40 de A β (1-42).

Los péptidos derivados de la región C-terminal de A β (1-42), incluyendo grupos enlazadores peptídicos, pueden sintetizarse mediante métodos convencionales de la química de péptidos en fase sólida o de disolución. Puede encontrarse un resumen de las técnicas en fase sólida en Stewart y Young (1963) Solid Phase Peptide Synthesis, W. H. Freeman Co. (San Francisco) y Meienhofer (1973) Hormonal Proteins and Peptides, Academic Press (Nueva York). Para síntesis en disolución clásica véase Schroder y Lupke, The Peptides, vol. 1, Academic Press (Nueva York).

En general, estos métodos comprenden la adición secuencial de uno o más aminoácidos o aminoácidos protegidos de manera adecuada a una cadena peptídica en crecimiento. Normalmente, o bien el grupo amino o bien el grupo carboxilo del primer aminoácido está protegido por un grupo protector adecuado. Entonces, el aminoácido protegido o bien se une a un soporte sólido inerte o bien se utiliza en disolución añadiendo el siguiente aminoácido en la secuencia que tiene el grupo complementario (amino o carboxilo) protegido de manera adecuada y en condiciones adecuadas para formar el enlace amida. Entonces se elimina el grupo protector de este residuo de aminoácido recién añadido y se añade el siguiente aminoácido (protegido de manera adecuada), y así sucesivamente. Después de que se hayan ligado todos los aminoácidos deseados en la secuencia apropiada, se elimina cualquier grupo protector restante (y cualquier soporte sólido) secuencial o simultáneamente para proporcionar el péptido final. Mediante una modificación sencilla de este procedimiento general, es posible añadir más de un aminoácido a la vez a una cadena en crecimiento, por ejemplo, acoplando (en condiciones que no producen la racemización de centros quirales) un tripéptido protegido a un dipéptido protegido de manera apropiada para formar, tras la desprotección, un pentapéptido. En una realización preferente, se añade un residuo de cisteína al N-terminal de dichos péptidos inmunogénicos para facilitar el acoplamiento de dichos péptidos a una molécula portadora usando reactivos bifuncionales capaces de reaccionar con grupos sulhidrilo de la cisteína.

Albúmina

Tal como se mencionó anteriormente, un aspecto de la presente invención se refiere a un conjugado que comprende al menos un péptido inmunogénico derivado de la región C-terminal de A β (1-42) y albúmina para su uso en medicina en el que el al menos un péptido inmunogénico derivado de la región C-terminal de A β (1-42) es A β (35-42) (SEQ ID NO: 2), A β (33-42) (SEQ ID NO: 3) o A β (33-40) (SEQ ID NO: 4) o un péptido de 8-10 residuos de aminoácido que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con A β (35-42) (SEQ ID NO: 2), A β (33-42) (SEQ ID NO: 3) o A β (33-40) (SEQ ID NO: 4).

Tal como se usa en el presente documento, "albúmina" se refiere a la proteína más abundante en el plasma sanguíneo que tiene un peso molecular de aproximadamente entre 65 y 67 kilodaltons en su forma monomérica, dependiendo de las especies de origen. El término "albúmina" se usa de manera intercambiable con "albúmina sérica" y no pretende definir la fuente de la albúmina que forma un conjugado con los péptidos modificados de la invención. Por tanto, el término "albúmina" tal como se usa en el presente documento puede referirse o bien a albúmina purificada a partir de una fuente natural tal como fluidos de la sangre o serosos, o bien puede referirse a albúmina sintetizada químicamente o producida de manera recombinante. En diversas realizaciones, pueden usarse variantes de albúmina o derivados de albúminas nativas para la formación de conjugados de la invención. En algunas realizaciones, la albúmina es una albúmina de mamífero, o una variante o derivado de la misma. Los ejemplos no limitativos de albúminas de mamífero que pueden usarse incluyen albúmina humana, bovina, ovina, caprina, de conejo, felina, canina, porcina, de primate o de roedor. En una realización preferente, la albúmina de mamífero es albúmina humana.

En una realización, la albúmina humana se purifica a partir de fluidos de la sangre o serosos. Por ejemplo, la albúmina puede purificarse a partir de muestras de suero o de plasma de individuos o de animales de laboratorio, siendo la más usada la albúmina bovina, pero también puede extraerse de sueros procedentes de otros animales (pollo, cerdo, conejo, etc.) usando cualquier método convencional tal como fraccionamiento con etanol frío mediante el procedimiento de Cohn (Cohn EJ y otros, J Am Chem Soc 1946; 68:459-75) o mediante el procedimiento de Kistler y Nitschmann (Kistler P y Nitschmann HS., Vox Sang 1962; 7:414-24) o mediante purificación cromatográfica (Bergloff JH. y otros En: Curling JM, ed. Separation of Plasma Proteins. Uppsala: Pharmacia, 1983; 51-8) o una combinación de fraccionamiento con etanol frío y purificación cromatográfica. La albúmina puede obtenerse también de la clara de huevo (ovoalbúmina). Puede extraerse una clase diferente de albúmina, albúminas de reserva, de las semillas de algunas plantas (por ejemplo, soja).

En otra realización, la albúmina es albúmina recombinante. En una realización particular, la albúmina es albúmina humana recombinante (denominada en el presente documento "rHA"). En diversas realizaciones, rHA puede producirse en un organismo mamífero o no mamífero. En una realización, la rHA se produce en un organismo no mamífero. Los ejemplos de organismos no mamíferos que pueden usarse para la producción de rHA incluyen, sin limitación, levadura, bacterias, plantas, hongos e insectos. En una realización, la rHA se produce en una planta completa o un hongo completo. En otra realización, la rHA se produce en células vegetales cultivadas, células de hongo cultivadas o células de insecto cultivadas. En otra realización, la rHA se produce en un mamífero no humano o en células de mamífero no humano. Los ejemplos de mamíferos no humanos que pueden usarse para la producción de rHA incluyen, sin limitación, aquellos que pertenecen a uno de los siguientes: la familia *Bovidae*, la familia *Canidae*, la familia *Suidae*, el orden *Rodentia*, el orden *Lagomorpha* y el orden *Primates* (excluyendo a los seres humanos). En una realización particular, el mamífero no humano que se usa para la producción de rHA selecciona del grupo que consiste en una vaca, un perro, un cerdo, una oveja, una cabra, una rata, un ratón, un conejo, un chimpancé y un gorila. En otra realización, las células de mamífero no humano usadas para la producción de rHA son, sin limitación, células bovinas, caninas, porcinas, ovinas, caprinas, de roedor, de conejo o de primate no humano. La principal ventaja de la rHA producida en un organismo no humano en comparación con la albúmina purificada a partir de fluidos de la sangre o serosos humanos es la ausencia de productos derivados de ser humano en el procedimiento de fabricación de rHA. El uso de tales métodos de producción controlada conduce a un producto más puro con menos heterogeneidad estructural. Estudios previos han indicado que no hay ninguna diferencia significativa entre la rHA soluble y la albúmina humana purificada a partir de fluidos de la sangre o serosos en cuanto a sus características bioquímicas, eficacia de radiomarcado y comportamiento biológico *in vitro* e *in vivo*. Véase Dodsworth y otros, 1996, Biotechnol. Appl. Biochem. 24: 171-176. En una realización particular, la albúmina es la rHA designada con el nombre comercial RECOMBUMIN(R) (Novozymes Inc., Nottingham, UK). RECOMBUMIN(R) es una albúmina humana recombinante que se produce *in vitro* usando tecnología de levadura recombinante, en la que la levadura modificada genéticamente (*Saccharomyces cerevisiae*) secreta rHA soluble que posteriormente se recoge, se purifica y formula para su uso como excipiente para la fabricación de productos biológicos o un recubrimiento para dispositivos médicos.

Alternativamente, la albúmina, variantes o derivados de la albúmina para su uso en la formación de un conjugado de la presente invención pueden obtenerse de una fuente comercial, por ejemplo, tal como RECOMBUMIN(R) (Novozymes Inc., Nottingham, RU); PLASBUMIN(R) (Talecris Biotherapeutics, Research Triangle Park, NC); ALBAGEN(R), (New Century Pharmaceuticals, Huntsville, AL); albúmina humana (Cortex-Biochem, San Leandro, CA), albúmina sérica humana, ZLB Behring (King of Prussia, PA), o ALBREC(R) (Mitsubishi Pharma, Japón).

En el contexto de la presente invención, "albúmina" se refiere a cualquier proteína con solubilidad en agua, que es moderadamente soluble en soluciones salinas concentradas y que experimenta coagulación térmica (desnaturalización de proteínas). Tiene un peso molecular de aproximadamente 65.000 que consiste en un número variable de aminoácidos que oscila desde 609 en la mayoría de las especies, incluyendo la albúmina humana, hasta 615 aminoácidos tal como la albúmina de pollo. Todas ellas contienen 35 residuos de cisteína que pueden usarse para la conjugación del péptido inmunogénico por medio de un enlace disulfuro. Las proteínas albúminas adecuadas para obtener conjugados según la presente invención incluyen, sin limitación, albúmina humana (SEQ ID NO: 5) o la parte madura de la misma (aminoácidos 25 a 609 de la SEQ ID NO: 5) y albúmina bovina (SEQ ID NO: 6) o la parte madura de la misma (aminoácidos 25 a 607 de la SEQ ID NO: 6). La albúmina usada en la presente invención abarca también variantes estructurales de la albúmina, procedentes de sustituciones de aminoácidos conservativas tal como se explicó anteriormente para el péptido derivado de la región C-terminal de A β (1-42).

En ciertas realizaciones, los conjugados de la invención comprenden variantes moleculares de albúmina, por ejemplo tal como las descritas en WO 2005/058958. Una variante de albúmina sérica humana recombinante está comercialmente disponible de New Century Pharma (Huntsville, Alabama) con el nombre Albagen™. La albúmina usada para formar un conjugado según la presente invención puede obtenerse usando métodos o materiales conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la albúmina puede obtenerse de una fuente comercial, por ejemplo, Novozymes Inc. (Davis, CA; albúmina humana recombinante derivada de *Saccharomyces cerevisiae*); Cortex-Biochem (San Leandro, Calif: albúmina sérica), Talecris Biotherapeutics (Research Triangle Park, Carolina del Norte; albúmina sérica), ZLB Behring (King of Prussia, PA) o New Century Pharmaceuticals ille, Ala.: albúmina humana recombinante derivada de *Pichia pastusipilonris*).

Las variantes de albúmina pueden incluir variantes naturales que resultan del polimorfismo de la albúmina en la población humana. Se han identificado más de 30 variantes genéticas aparentemente diferentes de albúmina sérica humana mediante análisis electroforético en diversas condiciones. Véase por ejemplo, Weitkamp y otros, Ann. Hum. Genet., 36(4):381-92 (1973); Weitkamp, Isr. J. Med. Sci., 9(9):1238-48 (1973); Fine y otros, Biomedicine, 25(8):291-4 (1976); Fine y otros, Rev. Fr. Transfus. immunohematol, 25(2): 149-63. (1982); Rochu y otros, Rev. Fr. Transfus. immunohematol. 31(5):725-33 (1988); Arai y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 86(2): 434-8 (1989). En una realización específica, la invención proporciona conjugados formados con variantes moleculares de albúmina.

En algunas realizaciones, los conjugados de la invención comprenden derivados de albúmina que comparten una homología sustancial con la albúmina. Por ejemplo, pueden formarse conjugados con un homólogo de albúmina que tiene una secuencia de aminoácidos de al menos el 75 por ciento, al menos el 80 por ciento, al menos el 85 por ciento, más normalmente al menos el 90 por ciento y lo más normalmente al menos el 95 por ciento, igual que la de la albúmina. En ciertas realizaciones, el homólogo de albúmina comprende una cisteína libre.

En algunas realizaciones, los conjugados de la invención comprenden derivados estructurales de albúmina. Los derivados estructurales de albúmina pueden incluir proteínas o péptidos que presentan una actividad de tipo albúmina, por ejemplo, un fragmento funcional de albúmina. En algunas realizaciones, el derivado es un determinante antigénico de albúmina, es decir, una parte de un polipéptido que puede reconocerse por un anticuerpo anti-albúmina. En algunas realizaciones, la albúmina recombinante puede ser cualquier proteína con una elevada semivida en plasma que puede obtenerse mediante la modificación de un gen que codifica para albúmina sérica humana. A modo de ejemplo y no de limitación, la albúmina recombinante puede contener inserciones o deleciones en la región de unión a metal traza de la albúmina, de modo que la unión de metales traza, por ejemplo, níquel y/o cobre se reduce o elimina, tal como se describe en la patente estadounidense número 6.787.636. La unión reducida a metales traza por la albúmina puede ser ventajosa para reducir la posibilidad de una reacción alérgica al metal traza en el sujeto que está tratándose con la composición de albúmina.

En ciertas realizaciones, los derivados de albúmina incluyen cualquier macromolécula con una elevada semivida en plasma obtenida mediante modificación *in vitro* de la proteína albúmina. En algunas realizaciones, la albúmina se modifica con ácidos grasos. En algunas realizaciones, la albúmina se modifica con iones metálicos. En algunas realizaciones, la albúmina se modifica con pequeñas moléculas que tienen una alta afinidad por la albúmina. En algunas realizaciones, la albúmina se modifica con azúcares, incluyendo pero sin limitarse a glucosa, lactosa, manosa y galactosa.

Pueden generarse derivados estructurales de albúmina usando cualquier método conocido por los expertos en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida al sitio), barrido de alanina y mutagénesis mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). La mutagénesis dirigida al sitio (véase Cotter, Biochem J 237 1-7 (1986), Zoller y Smith, Methods Enzymol 154 329-50 (1987)), mutagénesis en casete, mutagénesis de selección con restricción (Wells y otros, Gene 34 315-323 (1985)) u otras técnicas conocidas pueden realizarse en ADN que codifica para albúmina clonado para producir ADN de variante de albúmina o secuencias que codifican para derivados estructurales de albúmina (Ausubel y otros, Current Protocols In Molecular Biology, John Wiley and Sons, Nueva York (edición actual), Sambrook y otros, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3ª ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (2001)).

En ciertas realizaciones, los derivados de albúmina incluyen cualquier macromolécula por modificación *in vitro* de la

proteína albúmina con una semivida en plasma mayor que la de la albúmina nativa. En algunas realizaciones, la albúmina se modifica con uno o más ácidos grasos. En algunas realizaciones, la albúmina se modifica con uno o más iones metálicos. En algunas realizaciones, la albúmina se modifica con una o más moléculas pequeñas que tienen una alta afinidad por la albúmina. En algunas realizaciones, la albúmina se modifica con uno o más azúcares, incluyendo pero sin limitarse a glucosa, lactosa, manosa y galactosa.

Las preparaciones de albúmina sérica humana, ya se deriven de suero o se produzcan de manera recombinante, pueden comprender una mezcla heterogénea de nonmercaptalbúmina, es decir, albúmina "tapada", y mercaptalbúmina, es decir, albúmina "no tapada". El polipéptido albúmina humana contiene 35 residuos de cisteinilo, de los que 34 forman 17 puentes disulfuro estabilizadores. Mientras que el residuo de cisteína en la posición 34 de mercaptalbúmina comprende un grupo SH libre, el mismo residuo en nonmercaptalbúmina comprende un disulfuro mezclado con, por ejemplo, cisteína o glutatión, o ha experimentado oxidación por iones metálicos u otros aductos, haciendo así al grupo tiol menos reactivo o no disponible. Normalmente, el enriquecimiento para obtener mercaptalbúmina se consigue poniendo en contacto la albúmina recombinante con cualquier agente que puede transformar albúmina-Cys34 oxidada en albúmina-Cys34 reducida tal como ditioneitol (DTT), ácido tioglicólico (TGA, por sus siglas en inglés) o beta-mercaptoetanol (BME).

En ciertas realizaciones de la invención, la albúmina recombinante puede desglicarse antes de proceder con la reacción de conjugación. Se cree que la desglicación de la albúmina, particularmente la albúmina recombinante producida en levadura, puede proporcionar albúmina que tiene una estabilidad y tolerabilidad ventajosas con respecto a conjugados formados con la misma. Generalmente, la desglicación de la albúmina puede llevarse a cabo usando cualquier técnica y en condiciones cualesquiera conocidas por los expertos en la técnica que son útiles para la reducción de proteínas glicadas no enzimáticamente tales como las descritas por Miksik y otros (J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. , 1997, 699:311-345). Alternativamente, la albúmina puede desglicarse usando métodos enzimáticos. Por ejemplo, la desglicación puede llevarse a cabo usando endoglicosidasa H, o con una mezcla de diferentes endoglicosidasas.

En otra realización, la albúmina recombinante puede procesarse además para obtener una especificidad de conjugación favorable, es decir, para reducir la posibilidad de formación de conjugados no-Cys34. Por ejemplo, la albúmina recombinante puede ponerse en contacto con agentes que bloquean químicamente residuos en los que se sabe que se produce la formación de aductos covalentes en la albúmina sérica humana. Puede usarse cualquier agente conocido en la técnica que puede bloquear sitios reactivos en la albúmina distintos de Cys34. En algunas realizaciones, el agente bloquea un residuo de lisina. La albúmina contiene un número variable de residuos de lisina (por ejemplo, 60 en la albúmina humana y 61 en la albúmina bovina), de los que 25-30 están situados en la superficie de la albúmina y pueden estar accesibles para la conjugación. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el agente bloquea cualquier residuo de lisina de la albúmina que los expertos en la técnica saben que tiene el potencial para formar aductos covalentes, tales como Lys71, Lys199, Lys351, Lys525, Lys541 de albúmina.

Región enlazadora

El péptido derivado de la región C-terminal de Abeta(1-42) y la albúmina puede unirse directamente o, alternativamente, pueden conectarse por medio de uno o más grupos enlazadores (en adelante en el presente documento también denominados moléculas intermedias o resto espaciador).

En una realización particular de la conjugación de la invención, si el al menos un péptido inmunogénico y la albúmina se conectan mediante una región enlazadora, dicha región enlazadora contiene unida a la misma no más de un péptido inmunogénico.

En otra realización particular de la conjugación de la invención, la región enlazadora que conecta el al menos un péptido inmunogénico y la albúmina comprende una cisteína, más preferentemente la cisteína está localizada en el N-terminal del péptido inmunogénico.

En ciertas realizaciones, el grupo enlazador es un polímero biocompatible, por ejemplo, un péptido o un polímero que contiene alquilo o alcoxilo. En una realización específica, el grupo enlazador es un péptido que tiene un enlace químico lábil que puede escindirse mediante una enzima o que se escinde en condiciones químicas específicas, por ejemplo, condiciones ácidas. En una realización, el péptido modificado comprende un grupo reactivo covalentemente unido al péptido por medio de uno o más grupos enlazadores. En ciertas realizaciones, el grupo de unión incluye uno o más grupos reactivos, normalmente un grupo enlazador. En ciertas realizaciones, el grupo enlazador tiene una longitud de 1 a 100 átomos. Tal como se describe en el presente documento, la longitud de un grupo enlazador se expresa mediante el número de átomos en la cadena de átomos más corta entre los grupos unidos mediante el grupo enlazador. En ciertas realizaciones, el grupo enlazador tiene desde 1 hasta 100 átomos, desde 1 hasta 80 átomos, desde 1 hasta 60 átomos, desde 1 hasta 50 átomos, desde 1 hasta 40 átomos, desde 1 hasta 30 átomos, desde 1 hasta 20 átomos, desde 10 hasta 20 átomos o desde 5 hasta 15 átomos. Cuando está presente más de un grupo enlazador, los grupos enlazadores pueden ser grupos enlazadores iguales o diferentes. El grupo enlazador puede unirse al péptido derivado de la región C-terminal de Abeta(1-42) mediante cualquier técnica o método conocido por los expertos en la técnica. Técnicas o métodos a modo de ejemplo se describen en la patente

estadounidense número 6849714.

Los grupos enlazadores pueden comprender uno o grupos alquilo tales como grupos metilo, etilo, propilo, butilo, etc., grupos alcoxilo, grupos alqueno, grupos alquino o grupo amino sustituido con grupos alquilo, grupos cicloalquilo, grupos policíclicos, grupos arilo, grupos poliarilo, grupos arilo sustituidos, grupos heterocíclicos y grupos heterocíclicos sustituidos.

En ciertas realizaciones, el grupo enlazador puede seleccionarse de grupos enlazadores que incluyen un grupo amino y un grupo carboxilo incluyendo, pero sin limitarse a, AEA, AEEA y OA. En ciertas realizaciones, el grupo enlazador puede ser un polímero de AEA que tiene una longitud de 1 a 100 átomos. En ciertas realizaciones, el grupo enlazador puede ser un polímero de AEEA que tiene una longitud de 1 a 100 átomos. En ciertas realizaciones, el grupo enlazador puede ser un polímero de OA que tiene una longitud de 1 a 100 átomos. Los ejemplos ilustrativos de grupos enlazadores incluyen monómeros, dímeros, trímeros, tetrámeros, pentámeros, hexámeros, heptámeros, octámeros, nonámeros, decámeros, undecámeros, dodecámeros de residuos de glicina, lisina, glutamato, isoleucina o arginina, AEA, AEEA u OA (por ejemplo, un dímero de OA (-OA-OA-) o un trímero de OA (-OA-OA-OA-), o cualquier combinación de los mismos (por ejemplo, cualquier combinación de Gly_n, Lys_n, OA, AEA o AEEA, en los que n= 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ó 12). En algunas realizaciones, el grupo enlazador tiene una única lisina. La única lisina puede modificarse para unirse a un grupo reactivo directamente o a través de uno o más grupos enlazadores. Por ejemplo, el grupo K puede unirse al grupo reactivo o uno o más enlazadores adicionales a través de, por ejemplo, el grupo amino en posición épsilon de la cadena lateral. Ejemplos de tales enlazadores que incluyen una única lisina tienen, por ejemplo, la secuencia de (monómero)_aK(monómero)_b, K(monómero)_c y (monómero)_dK, en los que a, b, c y d son cada uno un número entero mayor o igual a uno, por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce o más. En algunos ejemplos, a y b pueden ser iguales, mientras que en otros ejemplos a y b no son iguales. Por ejemplo, a puede ser tres y b puede ser cuatro para proporcionar un grupo enlazador que tiene la siguiente secuencia: (OA)_nK(OA)_n, (OA)_nK(AEA)_n, (Gly)_nK(OA)_n, (OA)_nK(Gly)_n, en los que n= 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ó 12. En el caso en el que el grupo reactivo está situado en el enlazador entre los dos TMP, la longitud total entre los dos TMP no superará normalmente los 100 átomos. Las uniones al grupo enlazador no se consideran parte del enlazador entre los dos TMP.

El grupo enlazador puede incluir cualquier combinación de los polímeros biocompatibles mencionados anteriormente. Por ejemplo, puede combinarse un enlazador de poliglicina con uno o más monómeros de AEA, AEEA u OA en cualquier configuración. En una realización, el enlazador de poliglicina se une a uno o más monómeros de AEA, AEEA u OA en el extremo o bien N- o bien C-terminal del primer o último residuo de glicina en el enlazador de poliglicina. Alternativamente se insertan uno más monómeros de AEA, AEEA u OA entre los residuos de glicina en el enlazador de poliglicina. En realizaciones particulares, el grupo reactivo (por ejemplo, MPA, GMBA, NHS, sulfo-NHS, MBS o GMBS), se une al péptido a través de uno o más grupos enlazadores, incluyendo, por ejemplo, un enlazador de poliglicina, un enlazador de poliglicina-lisina, AEEA, AEA u OA, o cualquier combinación de los mismos. En ciertas realizaciones en las que el grupo reactivo se une al péptido a través de más de un grupo enlazador, cada grupo enlazador puede seleccionarse independientemente del grupo que consiste normalmente en poliglicina, polilisina, AEA, AEEA y OA. En realizaciones, el número de grupos enlazadores (por ejemplo, unidades monoméricas de polímero) es desde 1 hasta 2, de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 1 a 6, de 1 a 7, de 1 a 8, de 1 a 9, de 1 a 10, de 1 a 11, de 1 a 12. Cuando hay más de un grupo enlazador, los grupos enlazadores pueden ser grupos enlazadores iguales o diferentes. Por ejemplo, puede usarse cualquier combinación de uno de poliglicina, polilisina, AEA, AEEA y/u OA en cualquier orden. En una realización, el grupo reactivo, normalmente MPA, se une al péptido por medio de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ó 12 grupos enlazadores de poliglicina, polilisina, AEA, AEEA u OA que están dispuestos en tándem. En otra realización, el grupo reactivo, normalmente MPA, se une al péptido por medio de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ó 12 grupos enlazadores de poliglicina, polilisina, AEA, AEEA u OA que están dispuestos en una configuración ramificada.

En otra realización, el grupo enlazador es un resto peptídico que puede actuar como regiones bisagra entre el péptido derivado de la región C-terminal de Aβ(1-42) y la albúmina, permitiéndoles moverse independientemente uno con respecto al otro mientras que mantienen su propia forma tridimensional individual. En este sentido, una secuencia de aminoácidos intermedia no natural preferente según la invención sería una región bisagra caracterizada por una ductilidad estructural que permite este movimiento, o un enlazador flexible no natural. El enlazador flexible puede ser un péptido enlazador flexible con una longitud de 20 aminoácidos o menos. En una realización más preferente, el péptido enlazador comprende 2 aminoácidos o más seleccionados del grupo que consiste en glicina, serina, alanina y treonina. En una realización preferente de la invención, dicho enlazador flexible es un enlazador de poliglicina, pero no se limita a, poliglicina, poliglutamato, polioisoleucina, poliarginina u otros grupos enlazadores adecuados que incluyen dos o más aminoácidos. En algunos ejemplos, los grupos enlazadores de aminoácido pueden incluir al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce residuos de aminoácido, por ejemplo, residuos de glicina o lisina. Un enlazador de poliglicina puede incluir uno o más residuos diferentes (por ejemplo, residuos de lisina) insertados en cualquier configuración, por ejemplo, cerca del extremo N- o C-terminal, o en el medio de un tramo de residuos de glicina. En otras realizaciones, se combina un enlazador de poliglicina con uno más monómeros de AEA, AEEA u OA en cualquier configuración. En una realización, el enlazador de poliglicina se une a uno más monómeros de AEA, AEEA u OA en el extremo o bien N- o bien C-terminal del primer o el último residuo de glicina en el enlazador de poliglicina. Alternativamente se insertan

uno más monómeros de AEA, AEEA u OA entre los residuos de glicina en el enlazador de poliglicina. En ejemplos, en los que se usa una poliglicina como enlazador, la poliglicina puede incluir una única lisina para proporcionar un grupo amino en posición épsilon libre que puede reaccionar con otro enlazador o con una proteína. Ejemplos de una poliglicina de este tipo que incluye un aminoácido, por ejemplo, una única lisina, tienen, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de $(G)_a K(G)_b$, $K(G)_c$ y $(G)_d K$, en los que a, b, c y d son cada uno un número entero mayor o igual a uno, por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce o más. En algunos ejemplos, a y b pueden ser iguales, mientras que en otros ejemplos a y b no son iguales. Por ejemplo, a puede ser tres y b puede ser cuatro. En algunos ejemplos, la única lisina dentro del enlazador de poliglicina puede unirse por sí misma a restos adicionales, por ejemplo, un grupo enlazador, un grupo reactivo o un residuo de un grupo reactivo. Por ejemplo, el residuo de lisina puede unirse a uno o más enlazadores adicionales a través de, por ejemplo, el grupo amino en posición épsilon de la cadena lateral.

Posibles ejemplos de secuencias enlazadoras/espaciadoras incluyen SGGTSGSTSGTGST (SEQ ID NO: 7), AGSSTGSSTGPGSTT (SEQ ID NO: 8) o GGSGGAP (SEQ ID NO: 9) y GGGKGGGG (SEQ ID NO: 10). Estas secuencias se han usado para unir hélices enrolladas diseñadas a otros dominios de proteína (Muller, K.M., Arndt, K.M. y Alber, T., Meth. Enzymology, 2000, 328: 261-281). Dicho enlazador comprende o consiste preferentemente en la secuencia de aminoácidos GGGVEGGG (SEQ ID NO: 11).

El efecto de la región enlazadora es proporcionar espacio entre el péptido derivado de la región C-terminal de $A\beta(1-42)$ y la albúmina. Por tanto se garantiza que la estructura secundaria del péptido derivado de la región C-terminal de $A\beta(1-42)$ no se ve afectada por la presencia de albúmina y viceversa. El espaciador tiene preferentemente naturaleza peptídica. El péptido enlazador comprende preferentemente al menos dos aminoácidos, al menos tres aminoácidos, al menos cinco aminoácidos, al menos diez aminoácidos, al menos 15 aminoácidos, al menos 20 aminoácidos, al menos 30 aminoácidos, al menos 40 aminoácidos, al menos 50 aminoácidos, al menos 60 aminoácidos, al menos 70 aminoácidos, al menos 80 aminoácidos, al menos 90 aminoácidos o aproximadamente 100 aminoácidos.

Adicionalmente, el enlazador puede unirse a componentes que flanquean al péptido derivado de la región C-terminal de $A\beta(1-42)$ y la albúmina por medio de enlaces covalentes y preferentemente el espaciador es esencialmente no inmunogénico y/o no comprende ningún residuo de cisteína. De una manera similar, la estructura tridimensional del espaciador es preferentemente lineal o sustancialmente lineal.

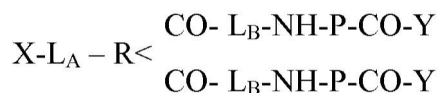
El enlazador puede incluir los residuos 53-56 de tetranectina, formando una lámina β en tetranectina, y los residuos 57-59 formando un giro en la tetranectina (Nielsen, B.B. y otros, FEBS Lett. 412: 388-396, 1997). La secuencia del segmento es GTKVHMK (SEQ ID NO: 12). Este enlazador tiene la ventaja de que cuando está presente en la tetranectina nativa, se une al dominio de trimerización con el dominio CRD, y por tanto es adecuado para conectar el dominio de trimerización con otro dominio en general. Además, no se espera que el constructo resultante sea más inmunogénico que el constructo sin un enlazador.

Alternativamente, puede elegirse como enlazador una subsecuencia de la hebra 3 de conexión de la fibronectina humana, correspondiente a los aminoácidos 1992-2102 (numeración SWISSPROT, entrada P02751). Se usa preferentemente la subsecuencia PGTSGQQPSVGQQ (SEQ ID NO: 13) correspondiente a los aminoácidos número 2037-2049, y dentro de esa subsecuencia es más preferente el fragmento GTSGQ (SEQ ID NO: 14) correspondiente a los aminoácidos 2038-2042. Este constructo tiene la ventaja de que no es muy propenso a escisión proteolítica y no es muy inmunogénico debido a que la fibronectina está presente a altas concentraciones en plasma.

Alternativamente, un enlazador peptídico adecuado puede basarse en la secuencia de 10 residuos de aminoácido de la región bisagra superior de la IgG3 murina. Este péptido (PKPSTPPGSS, SEQ ID NO: 15) se ha usado para producir anticuerpos dimerizados por medio de una hélice enrollada (Pack P. y Pluckthun, A., 1992, Biochemistry 31:1579-1584) y puede ser útil como péptido espaciador según la presente invención. Puede ser incluso más preferente una secuencia correspondiente de la región bisagra superior de la IgG3 humana. No se espera que las secuencias de la IgG3 humana sean inmunogénicas en seres humanos. En una realización preferente, el péptido enlazador se selecciona del grupo del péptido de secuencia APAETKAEPMT (SEQ ID NO: 16) y del péptido de secuencia GAP.

En una realización particular, la región enlazadora no comprende los siguientes grupos: $-N(CH_2)_2$, $-NHCH<$ o $-NHCH(CH_2)_2$.

En una realización particular, el conjugado de la invención no tiene la siguiente estructura:



en donde

R representa $-N(CH_2)_2$, $-NHCH<$ o $-NHCH(CH_2)_2$,

X representa un hidrógeno o un grupo peptídico, y

L_A está opcionalmente presente y es un aminoácido o un péptido que contiene al menos 2 residuos de aminoácidos,

L_B está opcionalmente presente y es un aminoácido o un péptido que contiene al menos 2 residuos de aminoácidos,

P es un péptido seleccionado de proteínas amiloides de longitud completa o fragmentos de las mismas o proteínas con similitud sustancial a una proteína amiloide,

Y es OH o NH₂,

y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

10 Conjugación de péptido derivado de la región C-terminal de Aβ(1-42) y albúmina

Una vez está disponible una cantidad suficiente de péptido derivado de la región C-terminal de Aβ(1-42) y de albúmina, se forma un conjugado poniendo en contacto ambos componentes en condiciones adecuadas para la formación de un complejo covalente entre los mismos.

Independientemente de si el péptido inmunogénico y la albúmina están unidos directamente o unidos por un grupo enlazador, la invención contempla tanto la posibilidad de que el péptido esté unido a través de su N-terminal (presentado C-terminalmente) o esté unido a la molécula de albúmina a través de su C-terminal (presentado N-terminalmente). En una realización preferente, el péptido se presenta C-terminalmente en la molécula de albúmina. El término "presentado C-terminalmente", tal como se usa en el presente documento, se refiere a péptidos que están unidos a la proteína portadora (albúmina) a través de su región N-terminal de modo que el C-terminal se mantiene disponible para el reconocimiento por el sistema inmunitario.

Cuando el péptido y la molécula de albúmina están unidos a través de un enlazador, esto se ha alcanzado habitualmente mediante el uso de reactivos homobifuncionales que son capaces de reaccionar con el grupo α-amino libre en el N-terminal del péptido y con grupos amino primarios en la molécula de albúmina, bien de grupos lisina o del grupo α-amino libre en N-terminal. Los reactivos homobifuncionales adecuados para unir grupos amino primarios del péptido inmunogénico y la albúmina incluyen, sin limitación, dialdehídos, tales como glutaraldehído, glioxal, succinaldehído, etilsuccinaldehído, 2-metilglutaraldehído, 3-metilglutaraldehído, adipaldehído y similares.

La albúmina se pone en contacto con un péptido derivado de la región C-terminal de Aβ(1-42) en una disolución que comprende una razón molar final de péptido con respecto a albúmina de aproximadamente 0,1:1 a aproximadamente 10.000:1. En algunas realizaciones, la razón molar final es aproximadamente 7500:1, 5000:1, aproximadamente 2500:1, aproximadamente 1000:1, aproximadamente 750:1, aproximadamente 500:1, aproximadamente 250:1, aproximadamente 100:1, aproximadamente 75:1, aproximadamente 50:1, aproximadamente 25:1, aproximadamente 10:1, aproximadamente 7,5:1, aproximadamente 5:1, aproximadamente 2,5:1 o aproximadamente 1:1. En algunas realizaciones, la razón molar final es entre aproximadamente 0,1:1 y 1:1. En algunas realizaciones, la razón molar final es aproximadamente 0,1:1, 0,2:1, 0,3:1, 0,4:1, 0,5:1, 0,6:1, 0,7:1, 0,8:1, 0,9:1.

El acoplamiento del primer y segundo componente del conjugado tiene lugar por medio de un grupo reactivo que se acopla a cualquier sitio del péptido derivado del dominio C-terminal de Aβ(1-42). El grupo reactivo se elige por su capacidad para formar un enlace covalente estable con la albúmina, por ejemplo, reaccionando con uno o más grupos amino, grupos hidroxilo o grupos tiol en la albúmina. Preferentemente, un grupo reactivo reacciona solamente con un grupo amino, grupo hidroxilo o grupo tiol en la albúmina. Por consiguiente, el grupo reactivo puede unirse a cualquier sitio del péptido o un grupo enlazador que se considera adecuado según un experto en la técnica. En ciertas realizaciones, el grupo reactivo se une a la estructura principal del péptido o derivado. En ciertas realizaciones, el grupo reactivo se une al N-terminal, por ejemplo, la amina N-terminal, del péptido o derivado. En ciertas realizaciones, el grupo reactivo se une al C-terminal, por ejemplo, el carboxilo C-terminal, del péptido o derivado. En ciertas realizaciones, el grupo reactivo se une a una cadena lateral del péptido o derivado, por ejemplo, un hidroxilo, tiol, amino o carboxilo de cadena lateral, del péptido o derivado. En realizaciones específicas, el grupo reactivo se une al grupo amino en posición épsilon de una cadena lateral de lisina del péptido o derivado. En realizaciones específicas, el grupo reactivo se une a un residuo de cisteína que se encuentra en el N-terminal o en el C-terminal del péptido.

Para formar enlaces covalentes con el grupo funcional en una proteína, puede usarse como grupo reactivo químico una amplia variedad de grupos carboxilo activos, particularmente ésteres. Los grupos carboxilo se transforman habitualmente en productos intermedios reactivos tales como N-hidroxisuccinimida (NHS) o maleimida que son susceptibles al ataque por funcionalidades de hidroxilo, tioles y aminas en la proteína. La introducción de grupos reactivos de NHS y maleimida en el péptido puede realizarse mediante el uso de agentes enlazadores bifuncionales tales como maleimido-benzoil-succinimida (MBS), éster de gamma-maleimido-butiloxi-succinimida (GMBS), propionato de ditiobis-N-succinimidilo (DTSP, por sus siglas en inglés), 3-(2-piridilditio)-propionato de N-succinimidilo (SPDP, por sus siglas en inglés), trans-4-(maleimidilmetil)-ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC, por sus siglas en inglés), acetiltioacetato de succinimidilo (SATA, por sus siglas en inglés), benzofenona-4-maleimida. Lambda'-((2-piridilditio)etil)-4-azidosalicilamida (PEAS; AET). Tales enlazadores bifuncionales activarán grupos o bien carboxilo o bien amino en el péptido basándose en la elección de los grupos protectores.

Alternativamente puede realizarse la adición de maleimida al péptido a través del uso de agentes de acoplamiento tales como N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC), clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) y similares para activar derivados como ácido maleimidopropiónico. ácido [2-[2-[2-

5 maleimidopropionamido(etoxi)etoxi]acético y posteriormente reaccionar con una amina en el péptido. Podrían usarse agentes similares como DCC y EDAC para añadir derivados como maleimidoalquilaminas a restos carboxilo en el péptido.

10 Las aminas primarias son las dianas principales para los ésteres de NHS. Los grupos amino en posición épsilon accesibles presentes en los N-terminales de proteínas reaccionan con los ésteres de NHS. Sin embargo, los grupos amino en posición épsilon en una proteína pueden no ser deseables o estar disponibles para el acoplamiento a NHS. Aunque cinco aminoácidos tienen nitrógeno en sus cadenas laterales, solamente la amina en posición épsilon de lisina reacciona de manera significativa con los ésteres de NHS. Puede formarse un enlace amida cuando la

15 reacción de conjugación del éster de NHS reacciona con aminas primarias liberando N-hidroxisuccinimida. Estos grupos reactivos que contienen succinimidilo se denominan en el presente documento grupos succinimidilo.

En realizaciones particulares, el grupo funcional en la albúmina es el único grupo tiol libre situado en el residuo de aminoácido 34 (Cys34) y el grupo químicamente reactivo es un grupo que contiene maleimido tal como MPA. MPA significa ácido maleimidopropiónico o maleimidopropionato. Tales grupos que contienen maleimido se denominan en

20 el presente documento grupos maleimido.

En algunas realizaciones, los conjugados formados mediante los procedimientos descritos en el presente documento comprenden albúmina covalentemente unida a un grupo succinimidilo o maleimido en un péptido terapéutico. En algunas realizaciones, un grupo amino, hidroxilo o tiol de albúmina está covalentemente unido a un grupo

25 succinimidilo o maleimido en el péptido terapéutico. En algunas realizaciones, el tiol de cisteína 34 de albúmina está covalentemente unido a un enlazador de [2-[2-[2-maleimidopropionamido(etoxi)etoxi]acetamida en el amino en posición épsilon de una lisina del péptido terapéutico.

En una realización específica, el grupo reactivo es un único grupo reactivo MPA unido al péptido, opcionalmente a través de un grupo enlazador, en un único aminoácido definido y el MPA está covalentemente unido a la albúmina en un único residuo de aminoácido de albúmina, preferentemente cisteína 34. En una realización preferente, la albúmina es albúmina humana recombinante.

En ciertas realizaciones, el grupo reactivo puede unirse a cualquier residuo del péptido terapéutico adecuado para la unión de un grupo reactivo de este tipo. El residuo puede ser un residuo terminal o interno del péptido. En ciertas realizaciones, el grupo reactivo puede unirse al carboxilo-terminal o al amino-terminal del péptido. En realizaciones ventajosas, el grupo reactivo se une a un único sitio del péptido. Esto puede conseguirse usando grupos protectores conocidos por los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, un derivado del péptido terapéutico puede comprender un residuo incorporado para la unión del grupo reactivo. Los residuos útiles para la unión incluyen, pero

40 no se limitan a, residuos de cisteína, lisina, aspartato y glutamato. El residuo puede incorporarse de manera interna o en el extremo terminal del péptido, por ejemplo en el residuo de aminoácido N-terminal por medio del extremo amino en posición alfa libre. En ciertas realizaciones, el grupo reactivo se une a un residuo de lisina interno. En ciertas realizaciones, el grupo reactivo se une a un residuo de lisina terminal. En ciertas realizaciones, el grupo reactivo se une a un residuo de lisina amino-terminal. En ciertas realizaciones, el grupo reactivo se une a un residuo de lisina carboxilo-terminal, por ejemplo, un residuo de lisina en el carboxilo-terminal del péptido terapéutico.

En otras realizaciones, puede acoplarse un grupo con enlace disulfuro activado a una cisteína o un análogo de cisteína de péptido terapéutico a través de un método para la formación preferente de enlaces disulfuro intermoleculares basado en un esquema de activación de tiol selectivo. Se han descrito métodos basados en la activación selectiva de un tiol con un grupo de activación seguido de una reacción con un segundo tiol libre para formar enlaces disulfuro asimétricos selectivamente entre proteínas o péptidos para aliviar el problema de rendimientos reducidos debido a la formación de enlaces disulfuro simétricos. Véase D. Lambdandreu y otros, "Methods in Molecular Biology" (M. W. Pennington y B. M. Dunn, eds.). Vol. 35, pág. 91. Humana Press. Totowa. N. J., (1994). Preferentemente, tales grupos de activación son aquéllos basados en el grupo piridin-sulfenilo (M. S. Bernatowicz el id., Int.J. Pept. Protein Res. 28: 107 (1986)). Preferentemente se emplean 2,2'-ditiopiridina (DTDP) (Carlsson y otros, Diupsilonchem. J. 173: 723(1978); L. H. Kondejewski y otros, Bioconjugate Chem. 5:602 (1994) o 2,2'-ditiobis(5-nitropiridina) (NPYS) (J. Org. Chem. 56: 6477 (1991)) o N-succinimidil-3-(2-piridilditio) (SPDP). Además, pueden usarse como grupos de activación ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (reactivo de Ellman) o ácido 6,6'-ditiodinicotínico.

60 Según estos métodos, se hace reaccionar en primer lugar un grupo de activación de enlace disulfuro con un péptido terapéutico que contiene una cisteína o un análogo de cisteína en condiciones de exceso de grupo de activación. Estas condiciones favorecen sumamente la formación del compuesto terapéutico que contiene un péptido terapéutico acoplado a un grupo disulfuro activado, esencialmente sin producción de homodímeros peptídicos unidos por enlaces disulfuro. Tras la reacción de acoplamiento, se purifica el compuesto peptídico resultante, tal como mediante HPLC de fase reversa. Se produce una reacción con un segundo tiol libre cuando el compuesto

peptídico se hace reaccionar con albúmina, para formar un conjugado entre el compuesto terapéutico y la albúmina sérica.

Se transforma una cisteína o un análogo de cisteína de péptido terapéutico para que tenga un S-sulfonato a través de un esquema de reacción de sulfitolisis. En este esquema, se sintetiza en primer lugar un péptido terapéutico o bien de manera sintética o bien de manera recombinante. Entonces se usa una reacción de sulfitolisis para unir un S-sulfonato al péptido terapéutico a través de su tiol de la cisteína o del análogo de cisteína, tras la reacción de sulfitolisis, se purifica el compuesto de péptido terapéutico, tal como mediante cromatografía en columna con gradiente. Entonces se usa el compuesto de S-sulfonato para formar un conjugado entre el compuesto de péptido terapéutico y un componente de la sangre, preferentemente albúmina sérica.

La manera de modificar péptidos terapéuticos con un grupo reactivo para su conjugación a albúmina variará ampliamente, dependiendo de la naturaleza de los diversos elementos que comprenden el péptido terapéutico. Los procedimientos sintéticos se seleccionarán de modo que sean sencillos, proporcionen altos rendimientos y permitan un producto altamente purificado. Normalmente, el grupo químicamente reactivo se creará en la última fase de la síntesis del péptido, por ejemplo, con la esterificación de un grupo carboxilo para formar un éster activo. Se describen métodos específicos para la producción de péptidos insulíntrópicos modificados en las patentes estadounidenses números 6.329.336, 6.849.714 ó 6.887.849.

La conjugación de los componentes primero y segundo del conjugado de la invención puede llevarse a cabo de diferentes modos. Una posibilidad es la conjugación directa de un grupo funcional al componente terapéuticamente activo en una posición que no interfiere con la actividad de dicho componente. Tal como se entiende en la presente invención, grupos funcionales se refiere a un grupo de átomos específicos en una molécula que son responsables de una reacción química característica de dicha molécula. Ejemplos de grupos funcionales incluyen, pero no se limitan a grupos hidroxilo, aldehído, alquilo, alquenilo, alquinilo, amida, carboxamida, aminas primarias, secundarias, terciarias y cuaternarias, aminoxilo, azida, azo (diimida), bencilo, carbonato, éster, éter, glioxililo, haloalquilo, haloformilo, imina, imida, cetona, maleimida, isocianida, isocianato, carbonilo, nitrato, nitrito, nitro, nitroso, peróxido, fenilo, fosfina, fosfato, fosfono, piridilo, sulfuro, sulfonilo, sulfínilo, tioéster, tiol y 3,4-dihidroxifenilalanina oxidada (DOPA, por sus siglas en inglés).

Otra posibilidad es conjugar los componentes primero y segundo por medio del uso de grupos homo- o heterobifuncionales. El grupo bifuncional puede conjugarse en primer lugar al péptido derivado de la región C-terminal de A β (1-42) y entonces conjugarse a la albúmina o, alternativamente, es posible conjugar el grupo bifuncional a la albúmina y entonces, conjugarlo al péptido derivado de la región C-terminal de A β (1-42). Ejemplos ilustrativos de estos tipos de conjugados incluyen los conjugados conocidos como cetona-oxima (descritos en US20050255042) en los que el primer componente del conjugado comprende un grupo aminoxilo que está unido a un grupo cetona presente en un grupo heterobifuncional que está a su vez unido a un grupo amino en el segundo componente del conjugado.

En otra realización, el agente que se usa para conjugar los componentes primero y segundo del conjugado de la invención puede procesarse de manera fotolítica, química, térmica o enzimática. Es particularmente interesante usar agentes enlazadores que puedan hidrolizarse mediante enzimas que están en la diana celular, de modo que el compuesto terapéuticamente activo se libera solamente en el interior de la célula. Se han descrito ejemplos de tipos de agentes enlazadores que pueden procesarse de manera intracelular en WO04054622, WO06107617, WO07046893 y WO07112193.

Los componentes del conjugado de la invención pueden modificarse químicamente con la condición de que la estructura secundaria y la funcionalidad de ambos componentes permanezcan inalteradas. Un experto en la técnica conoce ampliamente métodos para modificar químicamente una cadena polipeptídica e incluyen métodos basados en la conjugación a través de los grupos tiol presentes en los restos de cisteína, métodos basados en la conjugación a través de grupos amino primarios presentes en restos de lisina (US6809186), métodos basados en la conjugación a través de restos N- y C-terminales. Los reactivos adecuados para modificar polipéptidos para permitir su acoplamiento a otros compuestos incluyen: glutaraldehído (permite la unión de compuestos al extremo N-terminal de polipéptidos), carbodiimida (permite la unión del compuesto al extremo C-terminal de un polipéptido), ésteres de succinimida (por ejemplo MBS, SMCC) que permiten la activación de extremo N-terminal y restos de cisteína, bencidina (BDB), que permite la activación de restos de tirosina, peryodato, que permite la activación de restos de carbohidratos en las proteínas que están glicosiladas.

En una realización particular, el péptido derivado de la región C-terminal de A β (1-42) siendo dicho péptido A β (35-42) (SEQ ID NO: 2), A β (33-42) (SEQ ID NO: 3) o A β (33-40) (SEQ ID NO: 4) o un péptido de 8-10 residuos de aminoácido que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con A β (35-42) (SEQ ID NO: 2), A β (33-42) (SEQ ID NO: 3) o A β (33-40) (SEQ ID NO: 4), comprende además una Cys N-terminal adicional.

En otra realización, se prepara *in vitro* (ex vivo) un péptido modificado que comprende una proteína sérica mediante unión covalente del péptido modificado a la proteína sérica *in vitro* de modo que un residuo del grupo reactivo del péptido forma un enlace covalente con la proteína sérica. En una realización, la proteína sérica es autóloga con

respecto al sujeto. En una realización específica, la proteína sérica se aísla del sujeto. En ciertas realizaciones, la proteína sérica aislada del sujeto se purifica a partir de otras proteínas presentes en la sangre y/o a partir de células sanguíneas antes de que se una covalentemente al péptido modificado. De acuerdo con esta realización, se administra el conjugado resultante al sujeto del que se aisló la proteína sérica o a un sujeto autólogo. En otra realización, la proteína sérica es una proteína sérica recombinante. Normalmente, la proteína sérica es albúmina recombinante, más normalmente la proteína sérica es albúmina humana recombinante. En una realización preferente, se forma un conjugado de la invención poniendo en contacto un péptido modificado que comprende un grupo maleimido con una proteína sérica que contiene tiol, normalmente albúmina, bajo condiciones que comprenden un pH de entre 6,5 y 7,4, formando de ese modo, normalmente, una unión tioéter estable que no puede escindirse en condiciones fisiológicas. En ciertas realizaciones preferentes, la proteína sérica es albúmina humana recombinante o albúmina bovina recombinante)

En una realización, el péptido modificado está amidado en su extremo C-terminal. En otra realización, el péptido modificado no está amidado en su extremo C-terminal. Un péptido modificado, conjugado o compuesto de la invención puede comprender también un péptido amidado de este tipo. En una realización, el péptido modificado está acilado en su extremo N-terminal. En otra realización, el péptido modificado no está acilado en su extremo N-terminal. Un péptido modificado, conjugado, compuesto de la invención puede comprender también péptido acilado de este tipo.

El acoplamiento del péptido inmunogénico a la albúmina por medio de un residuo de cisteína en el N-terminal del péptido permite el acoplamiento a una única molécula de albúmina de tantas moléculas de péptido como residuos de cisteína se encuentren en la molécula de albúmina. Por ejemplo, la albúmina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés) contiene 35 residuos de cisteína que se pueden ocupar por tantos como 35 péptidos modificados N-terminalmente con Cys de modo que se obtenga un conjugado que tiene al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 ó 35 moléculas de péptido.

Alternativamente, el acoplamiento del péptido inmunogénico a albúmina se lleva a cabo usando un reactivo homobifuncional que puede reaccionar con grupos amino primarios, el conjugado puede comprender tantas moléculas de péptido como residuos de lisina se encuentren en la molécula de albúmina. Por ejemplo, la albúmina sérica bovina (BSA) contiene 58 residuos de lisina que se pueden ocupar por tantos como 58 péptidos inmunogénicos de modo que se obtenga un conjugado que tenga al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57 ó 58 moléculas de péptido.

Composiciones de la invención para su uso en medicina

Los conjugados de la invención son capaces de inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto conduciendo a un aumento en la cantidad de anticuerpos específicos frente a A β (1-42) y reducir la carga amiloide en suero. Sin embargo, tal como conoce el experto, la respuesta inmunitaria puede aumentarse usando adyuvantes con el fin de aumentar la antigenicidad del conjugado. Por tanto, en otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende un conjugado de la invención y un adyuvante para su uso en medicina.

El término “adyuvante”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia inmunomoduladora capaz de combinarse con el conjugado de la invención para potenciar, mejorar o modular de otro modo una respuesta inmune en un sujeto sin un efecto perjudicial sobre el sujeto.

Los adyuvantes ejercen sus propiedades inmunomoduladoras a través de varios mecanismos tales como reclutamiento de células linfoides e inducción de citocinas. Los adyuvantes de citocinas incluyen, sin limitación, factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos, interleucina-12, GM-CSF, análogo de dipéptido de muramilo sintético o monofosforil-lípido A. Ejemplos adicionales de adyuvantes se seleccionan del grupo que comprende adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, QS21, gel de hidróxido de aluminio, MF59, fosfato de calcio, liposina, saponina, escualeno, L121, monofosforil lípido A (MPL, por sus siglas en inglés) en Emulsigen, polisorbato 80, toxina del cólera (CT, por sus siglas en inglés), LTK y LTK63. Preferentemente, los adyuvantes son aquéllos que están aprobados para su administración a humanos, tales como gel de hidróxido de aluminio, fosfato de calcio y MF59.

En una realización más particular, el adyuvante es de un tipo que estimula un tipo Th2 de respuesta inmune, tal como, por ejemplo, gel de hidróxido de aluminio y CT. Mediante la inducción de una respuesta de tipo Th2, se ve favorecida la producción de citocinas anti-inflamatorias tales como IL-4, IL-10 y TGF-beta, así como la producción de clases de anticuerpos IgG₁ e IgG_{2b}. Los adyuvantes preferentes para uso en provocar una respuesta predominantemente de tipo TH2 incluyen, por ejemplo, fosfopolímero (Guy y otros 1998, Vaccine 16:850-856) y alumbre (por ejemplo, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio).

La invención puede usar cualquiera de los adyuvantes “hidróxido” o “fosfato” que se usan en general como adyuvantes. Los adyuvantes conocidos como “hidróxido de aluminio” típicamente son sales de oxihidróxido de aluminio, que habitualmente son al menos parcialmente cristalinas. Los adyuvantes conocidos como “fosfato de

aluminio" típicamente son hidroxifosfatos de aluminio, con frecuencia también contienen una pequeña cantidad de sulfato (es decir, sulfato de hidroxifosfato de aluminio). Se pueden obtener por precipitación, y las condiciones de reacción y concentraciones durante la preparación influyen el grado de sustitución de fosfato por hidroxilo en la sal.

- 5 Una morfología fibrosa (por ejemplo, como la vista en micrografías electrónicas de transmisión) es típica para los adyuvantes de hidróxido de aluminio. El pl de los adyuvantes de hidróxido de aluminio típicamente está alrededor de 11, es decir, el adyuvante mismo tiene una carga de superficie positiva a un pH fisiológico. Se han descrito capacidades de adsorción de entre 1,8-2,6 mg de proteína por mg de Al^{3+} a pH 7,4 para adyuvantes de hidróxido de aluminio.

- 10 Los adyuvantes de fosfato de aluminio en general tiene una relación molar PO_4/Al entre 0,3 y 1,2, preferentemente entre 0,8 y 1,2, y más preferentemente 0,95±0,1. El fosfato de aluminio en general será amorfo, particularmente para sales de hidroxifosfato. Un adyuvante típico es hidroxifosfato de aluminio amorfo con una relación molar PO_4/Al entre 0,84 y 0,92, incluido a 0,6 mg de Al^{3+}/ml . El fosfato de aluminio en general será particulado (por ejemplo, morfología similar a placa tal como se ve en micrografías electrónicas de transmisión). Los diámetros típicos de las partículas están en el intervalo de 0,5-20 μm (por ejemplo, aproximadamente 5-10 μm) después de cualquier adsorción de antígeno. Se han descrito capacidades de adsorción de entre 0,7-1,5 mg de proteína por mg de Al^{3+} a pH 7,4 para adyuvantes de fosfato de aluminio.

- 20 El punto de carga cero (PCC) del fosfato de aluminio está inversamente relacionado al grado de sustitución de fosfato por hidroxilo, y este grado de sustitución puede variar dependiendo de las condiciones de reacción y concentración de los reactivos usados para preparar la sal por precipitación. El PCC también se altera cambiando la concentración de iones fosfato libres en solución (más fosfato = PCC más ácido) o añadiendo un tampón tal como un tampón de histidina (hace el PCC más básico). Los fosfatos de aluminio usados según la invención en general tendrán un PCC de entre 4,0 y 7,0, más preferentemente entre 5,0 y 6,5, por ejemplo, aproximadamente 5,7. Las suspensiones de sales de aluminio usadas para preparar las composiciones de la invención pueden contener un tampón (por ejemplo, un tampón fosfato o histidina o Tris), pero esto no siempre es necesario. Las suspensiones preferentemente son estériles y sin pirógenos. Una suspensión puede incluir iones fosfato acuosos libres, por ejemplo, presentes a una concentración entre 1,0 y 20 mM, preferentemente entre 5 y 15 mM, y más preferentemente aproximadamente 10 mM. Las suspensiones también pueden comprender cloruro de sodio.

- La invención puede usar una mezcla de tanto un hidróxido de aluminio como un fosfato de aluminio. En este caso puede haber más fosfato de aluminio que hidróxido, por ejemplo, una relación en peso de al menos 2:1, por ejemplo, >5:1, >6:1, >7:1, >8:1, >9:1, etc.

- 35 La concentración de Al^{4+} en una composición para la administración a un paciente es preferentemente menor de 10 mg/ml, por ejemplo, <5 mg/ml, <4 mg/ml, <3 mg/ml, <2 mg/ml, <1 mg/ml, etc. Un intervalo preferente es entre 0,3 y 1 mg/ml. Es preferente un máximo de 0,85 mg/dosis.

- 40 Por otra parte, el adyuvante es de un tipo que estimula un tipo Th1 de respuesta inmune. Como se usa en el presente documento, el término adyuvante de tipo 1 o adyuvante Th1 se pretende que defina un adyuvante que estimula una respuesta Th1 (tipo 1) (o una respuesta que está polarizada o sesgada hacia una respuesta de tipo 1, con una respuesta Th2 (tipo 2) relativamente débil). Pueden ser deseables respuestas inmunes Th1 (caracterizadas por la producción de interferón gamma ($\text{IFN-}\gamma$) y asociadas con la inmunidad protectora frente a virus y bacterias intracelulares) y, por tanto, en otra realización particular, el adyuvante es de un tipo que estimula un tipo Th1 de respuesta inmune. Los adyuvantes preferentes para su uso en provocar una respuesta predominantemente de tipo Th1 se pueden seleccionar del grupo que consiste en adyuvante completo de Freund, monofosforil lípido A, monofosforil lípido A 3-de-O-acilado (3D-MPL, por sus siglas en inglés), sal de aluminio, oligonucleótidos que contienen CpG, secuencias de ADN immunoestimuladoras, saponina, Montanide ISA 720 (Seppic, Francia), SAF, ISCOMS (CSL), MF-59 (Chiron), SBAS-3, SB. Otros adyuvantes Th1 preferentes incluyen SAF (Chiron, Calif., Estados Unidos), la serie SBAS de adyuvantes (por ejemplo, SBAS-2 o SBAS-4, disponibles de SmithKline Beecham, Rixensart, Bélgica), Detox (Corixa, Hamilton, Mont.), RC-529 (Corixa, Hamilton, Mont.) y otros aminoalquil glucosaminida 4-fosfatos (AGP, por sus siglas en inglés), tales como los descritos en las patentes de EE UU Nos. 6.113.918 y 6.355.257.

- 55 La invención también contempla el uso de una combinación de adyuvantes que estimula tanto los tipos Th1 como Th2. En una realización preferente, el adyuvante que estimula ambos tipos Th1 y Th2 es una saponina. Las saponinas son un grupo heterogéneo de glicósidos de esterol y glicósidos triperpenoides que se encuentran en la corteza, hojas, tallos, raíces e incluso flores de una amplia gama de especies de plantas. La saponina de la corteza del árbol Quillaia saponaria Molinase ha sido estudiado mucho como adyuvante. La saponina también se puede obtener comercialmente de Smilax omata (zarzaparrilla), Gypsophilla paniculata (velo de novia), y Saponaria officinalis (raíz de jabonera). Las formulaciones de adyuvantes de saponina incluyen formulaciones purificadas, tal como QS21, así como formulaciones lipídicas, tal como ISCOMs. Las composiciones de saponina se han purificado usando HPLC y RP-HPLC. Se han identificado fracciones purificadas específicas usando estas técnicas, incluyendo QS7, QS 17, QS 18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferentemente, la saponina es QS21. Las formulaciones de saponina también pueden comprender un esterol, tal como colesterol. Las combinaciones de saponinas y

colesteroles se pueden usar para formar partículas únicas llamadas complejos inmunoestimulantes (ISCOMs, por sus siglas en inglés). Los ISCOMs típicamente incluyen también un fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. Se puede usar cualquier saponina conocida en los ISCOMs. Preferentemente, el ISCOM incluye una o más de QuilA, QHA y QHC. Los ISCOMs se describen adicionalmente en las referencias 45-47. Opcionalmente, los ISCOMs pueden estar desprovistos de detergente adicional. Se puede encontrar una revisión del desarrollo de adyuvantes basados en saponinas en Barr y otros (Advanced Drug Delivery Reviews, 1998, 32:247-271) y Sjolanderet y otros (Advanced Drug Delivery Reviews, 1998, 32:321-338).

Los conjugados según la invención pueden tener propiedades farmacocinéticas mejoradas en comparación con péptidos no conjugados. Las propiedades farmacocinéticas de un péptido incluyen, por ejemplo, su tasa de absorción y excreción, su perfil de distribución en tejidos, su tasa de metabolismo y su toxicidad. Normalmente, los conjugados de la invención tienen una tasa disminuida de excreción y/o una semivida en circulación aumentada *in vivo*, en comparación con péptidos no conjugados.

Los conjugados preferentes de para su uso en la presente invención incluyen:

Péptido	Portador	Adyuvante
NH ₂ -MVGGVVIA-COOH (Aβ35-42)	Albúmina	Rehydralgel HPA
NH ₂ -GLMVGGVVIA-COOH (Aβ33-42)	Albúmina	Rehydralgel HPA
NH ₂ -MVGGVVIA-COOH (Aβ35-42)	Albúmina	Abisco
NH ₂ -GLMVGGVVIA-COOH (Aβ33-42)	Albúmina	Abisco
NH ₂ -CMVGGVVIA-COOH (Aβ35-42Cys)	Albúmina	Rehydralgel HPA
NH ₂ -CGLMVGGVVIA-COOH (Aβ33-42Cys)	Albúmina	Rehydralgel HPA
NH ₂ -CMVGGVVIA-COOH (Aβ35-42Cys)	Albúmina	Abisco
NH ₂ -CGLMVGGVVIA-COOH (Aβ33-42Cys)	Albúmina	Abisco
NH ₂ -CGLMVGGVV-COOH (Aβ33-40Cys)	Albúmina	Rehydralgel HPA
NH ₂ -CGLMVGGVV-COOH (Aβ33-40Cys)	Albúmina	Abisco

Métodos terapéuticos de la invención

Tal como ya se mencionó al comienzo de la descripción, la composición de la presente invención ha demostrado ser útil en el tratamiento de una enfermedad asociada con la deposición de proteínas amiloides. Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un conjugado que comprende al menos un péptido inmunogénico derivado de la región C-terminal de Aβ(1-42) y albúmina, o a una composición que comprende un conjugado que comprende al menos un péptido inmunogénico derivado de la región C-terminal de Aβ(1-42) y albúmina y un adyuvante para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad asociada con la deposición de proteínas amiloides, en el que el al menos un péptido inmunogénico derivado de la región C-terminal de Aβ(1-42) es Aβ(35-42) (SEQ ID NO: 2), Aβ(33-42) (SEQ ID NO: 3) o Aβ(33-40) (SEQ ID NO: 4) o un péptido de 8-10 residuos de aminoácido que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con Aβ(35-42) (SEQ ID NO: 2), Aβ(33-42) (SEQ ID NO: 3) o Aβ(33-40) (SEQ ID NO: 4).

El presente documento también da a conocer a un conjugado que comprende un péptido derivado de la región C-terminal de Aβ(1-42) y albúmina o a una composición que comprende un péptido derivado de la región C-terminal de Aβ(1-42) y albúmina y un adyuvante para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad asociada con la deposición de proteínas amiloides.

El presente documento también da a conocer un método para el tratamiento de una enfermedad asociada con la deposición de proteínas amiloides que comprende la administración a un sujeto en necesidad del mismo de un conjugado que comprende un péptido derivado de la región C-terminal de Aβ(1-42) y albúmina o una composición que comprende un péptido derivado de la región C-terminal de Aβ(1-42) y albúmina y un adyuvante.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "tratar", "tratamiento" y "tratando" se refieren a la mejoría de uno o más síntomas asociados con una enfermedad que resulta de la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición de la invención o una preparación farmacéutica que comprende la misma, a un sujeto que necesita dicho tratamiento. Por tanto, "tratamiento" tal como se usa en el presente documento cubre cualquier tratamiento de una enfermedad, trastorno o condición de un mamífero, particularmente un humano, e incluye: (a) prevenir que se produzca la enfermedad o la condición en un sujeto que puede tener propensión a la enfermedad o a la condición pero que aún no se ha diagnosticado que la tiene; (b) inhibir la enfermedad o la condición, es decir, detener su desarrollo; o (c) aliviar la enfermedad o la condición, es decir,

producir la regresión de la enfermedad o la condición o la mejoría de uno o más síntomas de la enfermedad o la condición. La población de sujetos tratados mediante el método incluye un sujeto que padece la enfermedad o la condición no deseable, así como sujetos que corren el riesgo de desarrollar la enfermedad o la condición. Por tanto, un experto en la técnica reconoce que un tratamiento puede mejorar la condición del paciente, pero puede no constituir una curación completa de la enfermedad. Tal como se usa en el presente documento, los términos “trastorno” y “enfermedad” se usan de manera intercambiable para referirse a una condición anómala o patológica en un sujeto, que deteriora funciones corporales y puede ser mortal.

La frase “cantidad terapéuticamente efectiva” se usa en el presente documento para referirse a una cantidad suficiente para prevenir y, preferentemente, reducir en al menos aproximadamente el 25 por ciento, más preferentemente en al menos el 50 por ciento, lo más preferentemente en al menos el 90 por ciento, un cambio clínicamente significativo en una característica de la patología. La expresión puede significar también una cantidad suficiente para mejorar o revertir uno o más síntomas asociados con una enfermedad asociada con la deposición de proteínas amiloides, tal como la enfermedad de Alzheimer. En particular, una “cantidad terapéuticamente efectiva” del tratamiento puede dar como resultado la mejoría, reducción o eliminación de al menos uno de los siguientes síntomas: deterioro de la memoria, ansiedad o tristeza persistentes, sensación de vacío, desesperanza, pesimismo, culpa, sensación de inutilidad, impotencia, una pérdida de interés o del placer en los hobbies y las actividades que antes se disfrutaban, energía disminuida o fatiga, dificultad para concentrarse, para recordar o para tomar decisiones, insomnio, despertarse temprano o dormir demasiado, pérdida del apetito y/o de peso o comer en exceso y aumento de peso, pensamientos de muerte o suicidio e intentos de suicidio, inquietud, irritabilidad y síntomas físicos persistentes que no responden a tratamiento, tales como cefaleas, trastornos digestivos y dolor crónico. Cuando se aplica a un principio activo individual, administrado solo, la expresión se refiere a ese componente solo. Cuando se aplica a una combinación, la expresión se refiere a cantidades combinadas de los principios activos que dan como resultado el efecto terapéutico, ya se administren en combinación, en serie o simultáneamente.

El término “sujeto” se refiere a un animal, preferentemente a un mamífero incluyendo un no primate (por ejemplo una vaca, un cerdo, un caballo, un gato, un perro, una rata o un ratón) y un primate (por ejemplo un mono o un humano). En una realización preferente, el sujeto es un perro. En una realización más preferente, el sujeto es un primate que, en una realización todavía más preferente, dicho primate es un humano.

En el contexto de la presente invención, “una enfermedad asociada con la deposición de proteínas amiloides” incluye enfermedades asociadas con la acumulación de proteína amiloide que pueden o bien restringirse a un órgano, es decir “amiloidosis localizada” o extenderse a varios órganos, lo que se denomina “amiloidosis sistémica”. Las enfermedades asociadas con deposición de proteínas amiloides que pueden tratarse con las composiciones según la presente invención incluyen, sin limitación, las enfermedades mostradas en la tabla 1.

Enfermedad	Proteína destacada
Enfermedad de Alzheimer	Beta-amiloide
Miositis con cuerpos de inclusión (IBM, por sus siglas en inglés),	Beta-amiloide
Diabetes mellitus tipo 2	IAPP (amilina)
Enfermedad de Parkinson	Alfa-sinucleína
Encefalopatía espongiforme transmisible (enfermedad de las vacas locas)	Prión
Enfermedad de Huntington	Huntingtina
Carcinoma medular de la tiroides	Calcitonina
Arritmias cardíacas	Factor natriurético auricular
Aterosclerosis	Apolipoproteína AI
Artritis reumatoide	Amiloide sérico A
Amiloide aórtico medial	Medina
Prolactinomas	Prolactina
Polineuropatía amiloide familiar	Transtiretina
Amiloidosis sistémica no neuropática hereditaria	Lisozima
Amiloidosis relacionada con la diálisis	β2-Microglobulina
Amiloidosis finlandesa	Gelsolina
Distrofia corneal reticular	Queratoepitelina
Angiopatía amiloide cerebral	Beta-amiloide
Angiopatía amiloide cerebral (tipo islandés)	Cistatina
Amiloidosis AL sistémica	Cadena ligera de inmunoglobulina AL

La amiloidosis secundaria puede asociarse con infección crónica (tal como tuberculosis) o inflamación crónica (tal como artritis reumatoide), incluyendo una forma familiar de amiloidosis secundaria que se observa también en Fiebre Mediterránea Familiar (FMF) y otro tipo de amiloidosis sistémica que se encuentra en pacientes en hemodiálisis a largo plazo. Las formas localizadas de amiloidosis incluyen, sin limitación, diabetes tipo II y cualquier trastorno relacionado con la misma, enfermedades neurodegenerativas tales como encefalopatía espongiforme ovina, encefalopatía espongiforme bovina, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Alzheimer, angiopatía amiloide cerebral y trastornos relacionados con proteína priónica. El distintivo de las enfermedades amiloides es la

deposición en órganos de placas amiloides que consisten principalmente en fibrillas que, a su vez, están compuestas por péptidos o proteínas fibrilares característicos.

Por tanto, en una realización particular, la enfermedad asociada con la deposición de proteínas amiloides se selecciona de enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, angiopatía amiloide cerebral y trastornos relacionados con proteína priónica y degeneración muscular.

Tal como entenderá el experto, todas las realizaciones particulares referentes a la composición o al kit de la invención para su uso en medicina son aplicables también cuando dicha composición del kit se usa para el tratamiento de una enfermedad asociada con la deposición de proteínas amiloides. Por tanto, realizaciones particulares referentes a los métodos terapéuticos de la invención que usan el conjugado o la composición son:

- el péptido derivado de la región C-terminal de A β (1-42) se selecciona de A β (35-42) (SEQ ID NO: 2), A β (33-42) (SEQ ID NO: 3) y A β (33-40) (SEQ ID NO: 4);
- el péptido derivado de la región C-terminal de A β (1-42) es A β (35-42) (SEQ ID NO: 2), A β (33-42) (SEQ ID NO: 3) o A β (33-40) (SEQ ID NO: 4) o un péptido de 8-10 residuos de aminoácido que tienen al menos un 90% de identidad de secuencia con A β (35-42) (SEQ ID NO: 2), A β (33-42) (SEQ ID NO: 3) o A β (33-40) (SEQ ID NO: 4) y comprende además una Cys N-terminal adicional;
- la albúmina es albúmina sérica bovina.
- el adyuvante es, preferentemente, un adyuvante de tipo Th1 o Th2, y
- la composición de la invención o los componentes activos del kit de la invención se administra bisemanalmente.

La descripción detallada de estas realizaciones particulares puede encontrarse en párrafos anteriores.

En otra realización particular, la enfermedad asociada con la deposición de proteína amiloide se selecciona de enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, angiopatía amiloide cerebral y trastornos relacionados con proteína priónica.

El conjugado de la invención o la composición de la invención pueden administrarse mediante métodos diferentes, por ejemplo de forma intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica, intradérmica, oral, intranasal o intrabronquial, así como local, sistémica o directamente al sitio diana (modo localizado). Una revisión de los diferentes métodos de administración de principios activos, de los excipientes a usar y de los procedimientos para fabricar los mismos puede encontrarse en Tratado de Farmacia Galénica, C. Faulí i Trillo, Luzán 5, S.A. de Ediciones, 1993 y en Remington's Pharmaceutical Sciences (A.R. Gennaro, Ed.), 20ª edición, Williams & Wilkins PA, EE.UU. (2000).

Un "modo localizado" se entiende como la administración local del conjugado de la invención a un lugar específico del cuerpo humano o animal. Preferentemente, la administración será en un sitio en el que hay flujo sanguíneo rápido, por ejemplo, intravenosamente, vena periférica o central. Pueden utilizarse otras vías cuando la administración va acoplada con técnicas de liberación lenta o una matriz protectora. Además, la inmunización de la mucosa a través de administración nasal es un método adecuado, puesto que se sabe que una vía de administración de este tipo favorecería una respuesta de tipo Th2.

El régimen de dosificación se determinará por el médico y los factores clínicos. Tal como es conocido bien en medicina, las dosificaciones dependen de muchos factores incluyendo las características físicas del paciente (edad, estatura, sexo), el método de administración usado, la gravedad de la enfermedad, el compuesto particular usado y las propiedades farmacocinéticas del individuo.

En una realización particular, la composición de la invención o los componentes activos del kit de la invención se administran bisemanalmente.

La composición de la invención o los componentes activos del kit de la invención han demostrado ser útiles para su uso en medicina.

Para su uso en medicina, la composición de la invención puede estar en forma de un profármaco, una sal, un solvato o un clatrato, o bien en forma aislada o en combinación con agentes activos adicionales. La composición según la presente invención puede formularse junto con un excipiente que es aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Excipientes preferentes para su uso en la presente invención incluyen azúcares, almidones, celulosas, gomas y proteínas.

Tal como entenderá el experto, la composición de la invención puede formularse mediante procedimientos

convencionales conocidos en el estado de la técnica en una forma de dosificación farmacéutica sólida (por ejemplo, comprimidos, cápsulas, comprimidos recubiertos de azúcar, gránulos, supositorios, sólidos estériles cristalinos o amorfos que pueden reconstituirse para proporcionar formas líquidas, etc.), líquida (por ejemplo, disoluciones, suspensiones, emulsiones, elixires, lociones, ungüentos, etc.) o semisólida (geles, pomadas, cremas y similares). En el estado de la técnica se conocen ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables e incluyen soluciones fosfato salinas tamponadas, agua, emulsiones tales como emulsiones de aceite/agua, diferentes tipos de agentes humectantes, disoluciones estériles, etc.

EJEMPLOS

La inmunización de perros con secuencias C-terminales de proteína beta-amiloide es segura y reduce la proteína en la sangre

EJEMPLO 1: Inmunización con péptidos Aβ(x-42)

I. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Características de los animales

En esta invención se usaron doce perros Beagle de edad avanzada de ambos sexos. Las características de los animales se resumen en la tabla 1. Procedían de fuentes comerciales y habían vivido en los criaderos de perros de la Universidad de Santiago para cría. Durante el experimento, los animales se alojaron en tres criaderos de perros colectivos con acceso libre al interior/exterior y se les suministró comida para perros formulada y agua ad libitum. Los animales fueron reconocidos meticulosamente justo antes del comienzo de los experimentos, incluyendo exámenes físico y neurológico, valores bioquímicos en sangre y hemograma, y fueron declarados sanos.

Los animales fueron asignados a cuatro grupos (A, B, C y D; n = 3) por un médico veterinario que desconocía el tratamiento asignado finalmente a cada grupo. Los animales se exploraron cada semana para detectar la aparición de cualquier signo clínico de reacción a las vacunas. Se llevó a cabo un reconocimiento completo adicional, incluyendo nuevamente análisis bioquímico de la sangre y hemograma, tras la tercera inmunización.

Los animales se trataron según las legislaciones europea y española sobre el manejo de animales (norma 86/609/EU, Real Decreto 1201/2005) y se realizaron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento de los animales. El estudio fue aprobado por el comité ético de la Universidad de Santiago.

2. Preparación de los inmunógenos

Se usó un péptido sintético Aβ(35-42) (con una Cys N-terminal adicional cuando se conjugó por medio de SPDP) como antígeno (0,4 mg/inyección) incorporado en cuatro formulaciones de vacuna diferentes para la inmunización de los animales. Cada una de estas formulaciones combinaba una proteína portadora, o bien Blue Carrier (BC; Pierce, Rockford, IL; grupos A y B) o albúmina sérica bovina (BSA; Sigma, Madrid, España; grupos C y D); y un adyuvante, o bien Rehydragel HPA (RH; Quimibios (el fabricante es Reheis), Barcelona, España; grupos A y C) o Abisco-300 (AB; Isconova AB, Uppsala Science Park, SE-751 83 Uppsala, SUECIA; grupos B y D).

2.1. Acoplamiento de péptidos sintéticos a BSA usando SPDP:

En primer lugar se preparó una disolución madre de SPDP 20 mM (3-(2-piridilditio)-propionato de N-succinimidilo; 50 mg/8 ml de DMSO). Entonces, se disolvieron 5 mg de BSA en 1 ml de PBS/EDTA 5 mM pH 8 y se añadieron 50 µl de la disolución de SPDP 20 mM al BSA. Se incubó la disolución durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de esto, se equilibró una columna de desalación con PBS/EDTA y se cambió el tampón a BSA modificado con SPDP para eliminar los subproductos de reacción y el reactivo de SPDP sin reaccionar en exceso.

A continuación, se determinó el nivel de modificación con SPDP usando el siguiente protocolo:

- Diluir 100 µl de BSA desalado y modificado con SPDP hasta 1 ml con PBS.
- Medir y registrar la absorbancia a 343 nm de la proteína simple en comparación con el blanco de PBS/EDTA (prueba por triplicado).
- Añadir 10 µl de DTT 15 mg/ml a la muestra de proteína modificada con SPDP de 1 ml, mezclar.
- Después de exactamente 15 minutos, medir y registrar la absorbancia a 343 nm de la muestra reducida.
- Usar la siguiente ecuación:

$$\frac{(\text{media } A_{343} \text{ tras DTT}) - (\text{media } A_{343} \text{ antes de DTT})}{8080} \times \frac{\text{Peso molecular de BSA}}{\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \text{ de BSA}} = X$$

Si X está entre 5 y 6,5, se añaden 2 mg de péptido sintético a los 5 mg de BSA modificado con SPDP.

Tras haberse determinado el nivel de modificación con SPDP, se incubó la mezcla de reacción con agitación 18-24 horas durante la noche y se liofilizó la mezcla de reacción.

2.2. Acoplamiento de péptidos sintéticos a Blue Carrier usando glutaraldehído:

Se añadieron 2 ml de tampón borato pH 10 y 66 µl (200 mg/ml) de Blue Carrier a un vial de reacción y se mezclaron suavemente. A continuación, se añadieron 12 mg del péptido sintético al vial de reacción. Simultáneamente, se diluyó glutaraldehído hasta el 0,3% añadiendo tampón borato pH 10.

A continuación, se añadió lentamente 1 ml de disolución de glutaraldehído al 0,3% recién preparada al vial de reacción mientras se agitaba a temperatura ambiente, dejando reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente en la oscuridad (la disolución cambió a amarilla). Con el fin de bloquear el glutaraldehído que no reaccionó, se añadieron 250 µl de glicina 1 M al vial de reacción y se mezclaron suavemente, incubando a temperatura ambiente durante 30 minutos adicionales. Después de esto se transfirió la mezcla de reacción a la columna de desalación equilibrada con PBS. Se liofilizó la mezcla de reacción y se disolvió hasta una concentración adecuada.

Por tanto, las cuatro formulaciones diferentes usadas en esta invención fueron tal como sigue:

- A) 400 microgramos de Abeta35-42 conjugado con Blue Carrier más 200 microlitros de Rehydrigel HPA.
- B) 400 microgramos de Abeta35-42 conjugado con Blue Carrier más 200 microlitros de Abisco-300.
- C) 400 microgramos de Abeta35-42 conjugado con BSA más 200 microlitros de Rehydrigel HPA.
- D) 400 microgramos de Abeta35-42 conjugado con BSA más 37 microlitros de Abisco-300.

Los péptidos sintéticos usados fueron:

- Cuando se conjugó a Blue Carrier con glutaraldehído:

- 1. Aβ(35-42) (NH₂-MVGGVVIA-COOH) (SEQ ID NO: 2) en perros (y ratones; véase a continuación)
- 2. Aβ(33-42) (NH₂-GLMVGGVVIA-COOH) (SEQ ID NO: 3) en conejos (véase a continuación)

- Cuando se conjugó a BSA con SPDP:

- 1. Aβcys-(35-42) (NH₂-CMVGGVVIA-COOH) (SEQ ID NO: 17) en perros (y ratones; véase a continuación)
- 2. Aβcys-(33-42) (NH₂-CGLMVGGVVIA-COOH) (SEQ ID NO: 18) en conejos (véase a continuación)

3. Protocolo de inmunización y toma de muestras de sangre

Se separaron los animales (perros) en 4 grupos y se asignaron a cualquiera de las cuatro formulaciones de vacuna. Se inmunizaron los animales con Abeta35-42 por vía subcutánea en el lomo y se monitorizaron para detectar reacciones adversas. El programa para la inmunización y toma de muestras se representa en la figura 1 (A). En resumen, se inyectó a los animales bisemanalmente durante siete veces. Los perros en los grupos C y D recibieron una 8ª inmunización adicional siete meses después de la séptima inyección.

Se extrajeron muestras de sangre de la vena yugular en viales de polipropileno con EDTA e inhibidores de proteasa (Complete Mini mg/10 ml, Roche) justo antes de la primera inmunización (S0) y una semana después de la tercera (en la semana 5: S5), quinta (S9) y séptima (S13) inmunizaciones (figura 1). Se obtuvieron muestras de sangre adicionales de los animales de los grupos C y D cuatro meses después de la séptima inmunización (S31) y la primera y tercera semana después de la inmunización de recuerdo (S43 y S45, respectivamente).

Se mezclaron suavemente las muestras y se conservaron a 4°C durante un máximo de 2 horas antes de la centrifugación a 4000 g durante 10 minutos. Entonces, se tomaron alícuotas del plasma y se congelaron a -80°C hasta su uso. Adicionalmente, en cada extracción, se extrajo ~1 ml de sangre de cada animal en un vial de polipropileno libre de EDTA para obtener el suero. Esta muestra se dejó coagular durante una hora a temperatura ambiente, entonces se centrifugó a 4000 g 10 minutos y se recogió el suero y se conservó a -80°C hasta someterse a ensayo para realizar determinaciones bioquímicas de la sangre.

Se extrajeron muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) bajo anestesia general y condiciones asépticas una semana antes de la primera y en la semana 13, tras la séptima inmunización (figura 1). Se tomaron alícuotas de estas muestras de LCR y se congelaron a -80°C hasta su uso.

4. Ensayos de anticuerpos anti-Aβ en plasma y LCR

Se determinaron los anticuerpos anti-Aβ mediante ELISA directo en placas de polipropileno de 96 pocillos. Se recubrieron los pocillos de microtitulación con 2,5 µg/ml de péptido Aβ(1-42) humano (nº 24224 AnaSpec. San José,

CA, EE.UU.) en tampón bicarbonato de sodio 100 mM y clorhidrato de guanidina 2 M (pH 9,6) a 4°C durante la noche. Entonces se lavaron las placas tres veces con 300 µl de tampón de lavado (Tris 0,5 M, cloruro de sodio 1,5 M, Tween20 al 0,5%; pH 8); se bloquearon con 300 µl de tampón de bloqueo (Tris 0,05 M, Tween20 al 0,2%, BSA al 0,5%; pH 8) durante dos horas a 37°C y se lavaron de nuevo otras tres veces. Se incubaron las placas recubiertas durante una hora a 37°C con 100 µl de diluciones en serie de tres veces de los plasmas de perro en tampón de vehículo (Tris 0,05 M, cloruro de sodio 0,5 M, BSA al 0,05%, Tween20 al 0,05%; pH 8) en una serie de 10 pocillos partiendo de una dilución 1:30 del plasma en el primer pocillo. La mayor dilución de plasma sometida a ensayo fue 1/10 x 3¹⁰. Se cargaron las columnas undécima y duodécima en cada placa con tampón de vehículo sin plasma para los controles blanco. Entonces se lavaron las placas y se incubaron durante una hora a 37°C con 100 µl de una dilución 1:1000 en tampón de vehículo de una IgG de conejo anti-perro conjugada con peroxidasa del rábano (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, RU), se lavaron tres veces y se incubaron con el 0,0375% de ABTS (Roche, Barcelona, España) en tampón para ABTS (Roche, Barcelona, España). Se leyó la absorbancia a 405 nm en un lector de placas automatizado (Synergy 4, Biotek, Winooski, Vermont, EE.UU.).

Se calcularon las concentraciones de anticuerpo anti-Aβ en plasma usando el anticuerpo monoclonal 6E10 como patrón en las mismas placas de ELISA y se expresaron en µg/µl. Se determinó la CE50 de cada muestra de plasma mediante la regresión no lineal de la absorbancia con respecto al logaritmo de las diluciones en cada pocillo (GraphPad Prism 3.02). Además, se definió el título de punto final del plasma como la dilución máxima de plasma en la que la absorbancia era tres veces mayor que la absorbancia media de los pocillos blanco.

Determinación de péptidos Aβ libres en plasma

Se midieron los niveles de Aβ 1-42 y Aβ 1-40 en el plasma y el LCR de los perros usando ELISA de tipo sándwich indirecto con los kits de ELISA ABtest-40 y ABtest-42 de Araclon Biotech (Zaragoza, España) siguiendo las instrucciones del fabricante.

II. RESULTADOS

Los animales permanecieron sanos y activos a lo largo de todo el tiempo del experimento. En particular, no se detectó ningún signo de reacción a las vacunas. El aumento de peso corporal medio desde la semana 0 hasta la 13ª semana fue de $1 \pm 1,7$ kg (tabla 1). Solamente dos animales perdieron peso corporal en ese periodo (1 kg cada uno, lo que representa un 4% y un 7% de su peso en la semana 0, respectivamente).

Tabla 1. Características de los animales						
Grupo/Perro	Sexo	Edad (años)	Peso (kg) en S 0	Peso (kg) en S 13	Aumento de peso (kg)	% de variación de peso
A1	hembra	11	16	18	2	12,50
A2	macho	6	23	22	-1	-4,35
A3	macho	8	22	23,45	1,45	6,59
B1	hembra	10	13	13	0	0,00
B2	macho	6	21	23	2	9,52
B3	macho	12	24,45	26,7	2,25	9,20
C1	hembra	6	18	18	0	0,00
C2	macho	6	16	16	0	0,00
C3	macho	10	24,5	29	4,5	18,37
D1	macho	6	14	13	-1	-7,14
D2	macho	6	15	15	0	0,00
D3	macho	10	18,7	21,5	2,8	14,97
		media	18,80	19,89	1,08	4,97
		DE	4,10	5,22	1,68	8,03

1. Títulos de anticuerpo anti-Aβ(1-42)

Grupos A y B

La interpolación de la absorbancia del plasma de los animales dentro del grupo A y B frente al patrón de 6E10 no detectó diferencias consistentes entre las muestras pre-inmunes y las muestras recogidas en S5, S9 y S13 (tabla 2A y figura 2A). El factor de aumento en los títulos de anticuerpo en plasma, medidos como equivalencia a µg/µl de 6E10, tras tres y siete inmunizaciones (S5 y S13, respectivamente) era muy bajo ($0,8 \pm 0,2$ y $0,8 \pm 0,2$, respectivamente para el grupo A; y $1,2 \pm 0,1$ y $1,3 \pm 0,3$, respectivamente para el grupo B. Tabla 3). Los valores de CE₅₀ en plasma para el anticuerpo específico (anti-Aβ42) en animales dentro del grupo A y B eran muy bajos desde la semana 0 hasta la semana 13. De hecho, los valores de CE₅₀ en plasma disminuyeron desde S0 hasta S5 en

todos estos perros, con la excepción del perro B2 que mostró un aumento insignificante exclusivamente en este momento (tabla 2B y figura 2A-C). Además, ni siquiera la dilución de plasma más concentrada (1:30) de estos perros tras las inmunizaciones proporcionó una absorbancia tres veces mayor que la medida en las muestras de plasma pre-inmunes (tabla 2C). Por tanto, los perros de estos dos grupos fueron considerados como que no respondían a sus correspondientes formulaciones de vacuna (A y B).

5

Tabla 2. Títulos en plasma de anticuerpos anti-Aβ42 específicos en diferentes momentos							
Panel A: equivalente a µg/µl del anticuerpo monoclonal 6E10.							
Grupo/Perro	S 0	S 5	S 9	S 13	S 31	S 43	S 45
A1	0,0028	0,0016	0,0015	0,0016			
A2	0,0024	0,0023	0,0018	0,0023			
A3	0,0027	0,0022	0,0028	0,0021			
B1	0,0019	0,0023	0,0070	0,0033			
B2	0,0025	0,0031	0,0022	0,0028			
B3	0,0027	0,0028	0,0029	0,0032			
C1	0,0016	0,0205	0,0147	0,0084	0,0008	0,0017	0,0019
C2	0,0010	0,0113	0,0083	0,0093	0,0007	0,0040	0,0041
C3	0,0022	0,0276	0,0214	0,0206	0,0021	0,0089	0,0102
D1	0,0025	0,1075	0,0933	0,1048	0,0076	0,0716	0,0520
D2	0,0017	0,0529	0,0406	0,0294	0,0028	0,0229	0,0164
D3	0,0019	0,0321	0,0138	0,0256	0,0024	0,0088	0,0071
Panel B: Valores de CE50 en plasma para el anticuerpo específico (anti-Aβ42)							
Grupo/Perro	S 0	S 5	S 9	S 13	S 31	S 43	S 45
A1	49	42	35	29			
A2	170	85	158	133			
A3	155	111	132	115			
B1	51	47	235	66			
B2	186	253	123	93			
B3	79	60	41	59			
C1	45	773	722	385	68	46	49
C2	147	473	350	385	70	114	129
C3	123	1349	994	853	70	336	460
D1	51	6759	5738	6302	319	4202	2733
D2	53	2956	2021	1378	66	1122	790
D3	57	1550	752	1169	61	365	267
Panel C: La inversa de la dilución máxima de plasma con una absorbancia 3X mayor que los pocillos blanco							
Grupo/Perro	S 0	S 5	S 9	S 13	S 31	S 43	S 45
A1	270	270	90	270			
A2	270	270	270	270			
A3	270	270	270	270			
B1	270	270	810	810			
B2	270	810	270	270			
B3	270	270	270	270			
C1	90	2430	2430	2430	270	270	270
C2	90	2430	2430	2430	90	810	810
C3	270	2430	2430	2430	810	2430	2430
D1	270	21870	21870	21870	2430	21870	7290
D2	270	7290	7290	7290	810	7290	2430
D3	270	7290	2430	7290	810	2430	810

Tabla 3. Factor de aumento con respecto al plasma pre-inmune (equivalencia a µg/µl de 6E10)							
Grupo/Perro	S0/S0	S5/S0	S9/S0	S13/S0	S31/S0	S43/S0	S45/S0
A1	1,0	0,6	0,5	0,6			
A2	1,0	1,0	0,8	1,0			
A3	1,0	0,8	1,0	0,8			
media ± DE	1,0 ± 0,0	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,3	0,8 ± 0,2			

B1	1,0	1,2	3,6	1,7			
B2	1,0	1,2	0,9	1,1			
B3	1,0	1,1	1,1	1,2			
media $\pm$ DE	1,0 $\pm$ 0,0	1,2 $\pm$ 0,1	1,9 $\pm$ 1,5	1,3 $\pm$ 0,3			
C1	1,0	12,5	8,9	5,1	0,5	1,0	1,1
C2	1,0	11,8	8,6	9,7	0,7	4,2	4,2
C3	1,0	12,6	9,7	9,4	1,0	4,1	4,6
media $\pm$ DE	1,0 $\pm$ 0,0	12,3 $\pm$ 0,4	9,1 $\pm$ 0,6	8,1 $\pm$ 2,6	0,7 $\pm$ 0,2	3,1 $\pm$ 1,8	3,3 $\pm$ 1,9
D1	1,0	42,8	37,2	41,7	3,0	28,5	20,7
D2	1,0	30,6	23,5	17,0	1,6	13,2	9,5
D3	1,0	17,1	7,4	13,7	1,3	4,7	3,8
media $\pm$ DE	1,0 $\pm$ 0,0	30,2 $\pm$ 12,8	22,7 $\pm$ 14,9	24,1 $\pm$ 15,3	2,0 $\pm$ 0,9	15,5 $\pm$ 12,1	11,3 $\pm$ 8,6

Grupos C y D

Al contrario de lo observado en los grupos A y B, los perros tratados con las formulaciones C y D de vacuna mostraron modificaciones sustanciales en sus títulos de anticuerpo en plasma. La respuesta de todos los perros en estos dos grupos, tal como se mide mediante el patrón de 6E10, la CE_{50} o la dilución de punto final, siguió el mismo patrón aunque se observaron diferencias cuantitativas tanto entre los grupos como dentro de un grupo (tabla 2A-C). El patrón general se caracterizó por un aumento sustancial de los títulos tras tres inmunizaciones que se mantuvo solamente con ligeras modificaciones desde S5 hasta S13 (figuras 2A-C). Por tanto, los títulos de anticuerpo aumentaron sustancialmente tras tres inmunizaciones pero no aumentaron sustancialmente (o incluso disminuyeron ligeramente) tras las subsiguientes cuatro inyecciones de vacuna bisemanales. En concreto, los títulos, medidos como la equivalencia a $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de 6E10, tras tres y siete inmunizaciones (S5 y S13, respectivamente) se multiplicaron por un factor de $12,3 \pm 0,4$ y $8,1 \pm 2,6$, respectivamente para el grupo C; y de $30,2 \pm 12,8$ y $24,1 \pm 15,3$, respectivamente para el grupo D. (Tabla 3)

Cuatro meses después de la última inmunización (S31), los títulos habían caído a niveles muy bajos (tabla 2). Sin embargo, en los perros del grupo D eran todavía dos veces mayores que en el plasma pre-inmune (tabla 3). Entonces, los perros en los grupos C y D recibieron una octava inmunización adicional, llevada a cabo siete meses después de la séptima, con la correspondiente formulación de vacuna. Esta inyección de recuerdo fue seguida de un aumento sustancial de los títulos de anticuerpo en el grupo D (aumento de $15,5 \pm 12,1$ veces con respecto al plasma pre-inmune, tabla 3) y, en un menor grado, en el grupo C (aumento de $3,1 \pm 1,8$ veces con respecto al plasma pre-inmune, tabla 3) (figuras 2A-C). En general, en cualquier momento, los títulos de anticuerpo fueron siempre mayores en los animales del grupo D que en los del grupo C. No obstante, los aumentos en los títulos del perro con una respuesta menor en el grupo D (caso D3) fueron muy similares a los aumentos en los títulos de los perros del grupo C (tabla 3, figuras 2, 3).

2. Títulos de péptido A β

El ELISA de tipo sándwich no detectó diferencias consistentes en la concentración de los péptidos A β 1-42 o A β 1-40 entre el plasma pre-inmune y las muestras recogidas en S5, S9 y S13 en los animales de los grupos que no respondieron (A y B) (tabla 4A-B, figuras 3A-B). El factor de cambio en la concentración de A β 1-42 en plasma tras tres y siete inmunizaciones (S5 y S13, respectivamente) fue muy bajo ($1,2 \pm 0,7$ y $1,0 \pm 0,0$, respectivamente para el grupo A; y $0,9 \pm 0,0$ y $1,0 \pm 0,1$, respectivamente para el grupo B. Tabla 5A). De manera similar, el factor de cambio en la concentración de A β 1-40 en plasma tras tres y siete inmunizaciones (S5 y S13, respectivamente) fue muy bajo ($0,9 \pm 0,1$ para ambas semanas y ambos grupos. Tabla 5B).

Tabla 4A. Concentración de péptido A β 1-42 en pg/ml.									
Grupo/Perro	S 0	S 5	S 9	S 13	S 31	S 43	S 45	LCR S 0	LCR S 13
A1	4,16	7,50	2,76	4,31				556,85	509,70
A2	32,92	32,92	32,92	32,71				253,06	322,77
A3	19,98	20,07	20,24	19,62				421,88	300,12
B1	47,00	46,40	47,00	47,00				299,86	420,84
B2	20,33	20,33	21,83	22,01				283,94	367,18
B3	33,33	33,33	32,82	32,71				314,82	228,06
C1	5,20	< 3,125	< 3,125	< 3,125	4,70	< 3,125	< 3,125	718,84	532,56
C2	26,46	15,00	< 3,125	< 3,125	17,53	< 3,125	< 3,125	519,74	581,28

C3	16,35	< 3,125	< 3,125	< 3,125	< 3,125	< 3,125	< 3,125	671,03	649,07
D1	74,76	30,58	23,33	28,60	41,96	42,62	29,10	677,44	731,28
D2	17,56	< 3,125	< 3,125	< 3,125	< 3,125	< 3,125	< 3,125	783,95	888,61
D3	16,85	15,51	< 3,125	< 3,125	< 3,125	< 3,125	< 3,125	488,97	762,05

Tabla 4B. Concentración de péptido Aβ1-40 en pg/ml.

Grupo/Perro	S 0	S 5	S 9	S 13	S 31	S 43	S 45	LCR S 0	LCR S 13
A1	61,29	52,55	52,55	55,19				3633,96	3831,76
A2	58,67	52,76	55,21	60,84				2269,62	2719,62
A3	60,26	64,88	63,00	54,64				2534,52	2822,02
B1	104,31	38,70	39,86	< 3,125				2890,55	3586,15
B2	68,77	58,67	63,87	65,16				2371,54	2610,96
B3	79,30	80,89	93,87	84,78				2449,42	2273,46
C1	27,47	< 3,125	21,72	< 3,125	24,44	< 3,125	< 3,125	3503,87	2711,61
C2	56,89	33,03	29,62	35,53	39,39	28,49	21,67	2632,58	3416,45
C3	41,67	< 3,125	< 3,125	< 3,125	27,80	< 3,125	< 3,125	3121,29	2945,81
D1	106,94	59,06	48,69	46,14	70,71	46,78	55,07	3139,03	3206,77
D2	59,70	< 3,125	< 3,125	22,04	24,92	< 3,125	25,55	3737,74	3426,45
D3	51,67	38,71	26,44	< 3,125	33,26	< 3,125	35,30	2955,16	3214,84

Tabla 5A. Factor de aumentos en péptido Abeta 1-42 con respecto al plasma pre-inmune

Grupo/Perro	S0/S0	S5/S0	S9/S0	S13/S0	S31/S0	S43/S0	S45/S0
A1	1,0	1,8	0,7	1,0			
A2	1,0	1,0	1,0	1,0			
A3	1,0	1,0	1,0	1,0			
media ± DE	1,0 ± 0,0	1,2 ± 0,5	0,8 ± 0,2	1,0 ± 0,0			
B1	1,0	1,0	1,0	1,0			
B2	1,0	1,0	1,1	1,1			
B3	1,0	1,0	1,0	1,0			
media ± DE	1,0 ± 0,0	0,9 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,1			
C1	1,0	0,2	0,2	0,2	0,9	0,2	0,2
C2	1,0	0,6	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0
C3	1,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
media ± DE	1,0 ± 0,0	0,2 ± 0,3	0,0 ± 0,1	0,0 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,0 ± 0,1	0,0 ± 0,1
D1	1,0	0,4	0,3	0,4	0,6	0,6	0,4
D2	1,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
D3	1,0	0,9	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
media ± DE	1,0 ± 0,0	0,4 ± 0,4	0,1 ± 0,1	0,1 v 0,2	0,2 ± 0,3	0,2 ± 0,3	0,1 ± 0,2

Tabla 5B. Factor de aumentos en péptido Abeta 1-40 con respecto al plasma pre-inmune

Grupo/Perro	S0/S0	S5/S0	S9/S0	S13/S0	S31/S0	S43/S0	S45/S0
A1	1,0	0,9	0,9	0,9			
A2	1,0	0,9	0,9	1,0			
A3	1,0	1,1	1,0	0,9			
media ± DE	1,0 ± 0,0	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1			

B1	1,0	1,0	1,0	1,0			
B2	1,0	0,9	0,9	0,9			
B3	1,0	1,0	1,2	1,1			
media $\pm$ DE	1,0 $\pm$ 0,0	0,9 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,1			
C1	1,0	0,0	0,8	0,0	0,9	0,0	0,0
C2	1,0	0,6	0,5	0,6	0,7	0,5	0,4
C3	1,0	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0
media $\pm$ DE	1,0 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,3	0,4 $\pm$ 0,4	0,2 $\pm$ 0,3	0,7 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,3	0,1 $\pm$ 0,2
D1	1,0	0,6	0,5	0,4	0,7	0,4	0,5
D2	1,0	0,0	0,0	0,4	0,4	0,0	0,4
D3	1,0	0,7	0,5	0,0	0,6	0,0	0,7
media $\pm$ DE	1,0 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,4	0,3 $\pm$ 0,3	0,2 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,1

Al contrario de lo observado en los grupos A y B, los perros tratados con las formulaciones de vacuna C y D mostraron modificaciones sustanciales en sus concentraciones de A β (1-42) en plasma. Estos cambios siguieron un patrón caracterizado por una disminución sustancial del A β (1-42) en S5, tras tres inmunizaciones, hasta el punto de que en cinco de los seis perros el péptido se volvió indetectable ($<3,125$ pg/ml; tabla 4A; figura 3A). La concentración de péptido se mantuvo indetectable hasta S13; experimentó un incremento en S31, cuatro meses después de la séptima inmunización cuando los títulos de anticuerpo estuvieron próximos a los niveles pre-inmunes; y entonces bajaron de nuevo tras la inyección de recuerdo (8ª) en S42 (figura 1). La magnitud de estos cambios está reflejada en la tabla 5A. De manera un poco sorprendente, la concentración en plasma de A β 1-40 pareció seguir un patrón de cambios muy similar al de A β (1-42) (tablas 4B y 5B, figura 3B). La correspondencia entre los títulos de anticuerpo y la concentración de péptido en cualquier momento está representada en la figura 4.

A pesar de diferencias sustanciales entre el grupo C y D referentes a los títulos de anticuerpo en plasma en cualquier momento durante el experimento, la fluctuación de las concentraciones de péptido A β siguieron un curso temporal similar. Esto sugiere que incluso títulos de anticuerpo altos no fueron suficientes para conseguir la eliminación de los péptidos A β de la circulación.

EJEMPLO 2: Inmunización con péptido A β (x-40)

I. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Características de los animales

En esta invención se usaron seis perros Beagle de edad avanzada de ambos sexos. Procedían de fuentes comerciales y habían vivido en los criaderos de perros de la Universidad de Santiago para cría. Durante el experimento, los animales se alojaron en tres criaderos de perros colectivos con acceso libre al interior/exterior y se les suministró comida para perros formulada y agua ad libitum. Los animales fueron reconocidos meticulosamente justo antes del comienzo de los experimentos, incluyendo exámenes físico y neurológico, valores bioquímicos en sangre y hemograma, y fueron declarados sanos.

Los animales fueron asignados en dos grupos (A y B; $n = 3$) por un médico veterinario que desconocía el tratamiento asignado finalmente a cada grupo. Los animales se exploraron cada semana para detectar la aparición de cualquier signo clínico de reacción a las vacunas. Se llevó a cabo un reconocimiento completo adicional, incluyendo nuevamente análisis bioquímico de la sangre y hemograma, tras la tercera inmunización.

Los animales se trataron según las legislaciones europea y española sobre el manejo de animales (norma 86/609/EU, Real Decreto 1201/2005) y se realizaron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento de los animales. El estudio fue aprobado por el comité ético de la Universidad de Santiago.

2. Preparación de los inmunógenos

Se usó un péptido sintético A β (33-40) (con una Cys N-terminal adicional cuando se conjugó por medio de SPDP) como antígeno (0,4 mg/inyección) incorporado en dos formulaciones de vacuna diferentes para la inmunización de los animales. Cada una de estas formulaciones combinaba una proteína portadora, o bien Blue Carrier (BC; Pierce, Rockford, IL; grupo A) o albúmina sérica bovina (BSA; Sigma, Madrid, España; grupo B); y el adyuvante Abisco-300 (AB; Isconova AB, Uppsala Science Park, SE-751 83 Uppsala, SUECIA).

Se usó el mismo procedimiento que en el ejemplo 1 (véase, Materiales y Método, punto 2.1) para la conjugación de los péptidos que contenían cisteína N-terminal a Blue Carrier y albúmina con SPDP.

Las dos formulaciones diferentes usadas en esta invención fueron como sigue:

(A) 400 microgramos de péptido sintético conjugado a Blue Carrier más 200 microlitros de Abisco-300.

(B) 400 microgramos de péptido sintético conjugado a BSA más 37 microlitros de Abisco-300.

Los péptidos sintéticos usados fueron:

- Cuando se conjugó con SPDP:

Aβcys-(33-40) (NH₂-CGLMVGGVV-COOH) (SEQ ID NO: 19) en conejos (véase a continuación)

3. Protocolo de inmunización y toma de muestras de sangre

Se separaron los animales en 2 grupos y se asignaron a cualquiera de las dos formulaciones de vacuna (véase anteriormente (A) y (B)). Se inmunizaron los animales por vía subcutánea en el lomo y se monitorizaron para detectar reacciones adversas. El programa para la inmunización y toma de muestras se representa en la figura 1 (B). Brevemente, se inyectó a los animales bisemanalmente durante siete veces.

Se extrajeron muestras de sangre de la vena yugular en viales de polipropileno con EDTA e inhibidores de proteasa (Complete Mini, mg/10 ml, Roche) justo antes de la primera inmunización (S0) y una semana después (S1), en la semana 5 (S5), en la semana 7 (S7), en la semana 9 (S9), en la semana 11 (S11) y en la semana 13 (S13) después de la primera inmunización (figura 1 (B)).

Se mezclaron suavemente las muestras y se conservaron a 4°C durante un máximo de 2 horas antes de la centrifugación a 4000 g durante 10 minutos. Entonces, se tomaron alícuotas del plasma y se congelaron a -80°C hasta su uso. Adicionalmente, en cada extracción, se extrajo -1 ml de sangre de cada animal en un vial de polipropileno sin EDTA para obtener el suero. Se dejó coagular esta muestra durante una hora a temperatura ambiente, entonces se centrifugó a 4000 g durante 10 minutos y se recogió el suero y se conservó a -80°C hasta someterse a ensayo para realizar determinaciones bioquímicas de la sangre.

Se extrajeron muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) bajo anestesia general y en condiciones asépticas una semana antes de la primera (S0) y en la semana 13 (S13), tras la séptima inmunización (figura 1 (B)). Se hicieron alícuotas de estas muestras de LCR y se congelaron a -80°C hasta su uso.

4. Ensayos de anticuerpos anti-Aβ en plasma y LCR

Se determinaron los anticuerpos anti-Aβ mediante ELISA directo en placas de polipropileno de 96 pocillos. Se recubrieron los pocillos de microtitulación con 2,5 µg/ml de péptido Aβ(1-40) humano (nº 24224 AnaSpec. San José, CA, EE.UU.) en tampón bicarbonato de sodio 100 mM y clorhidrato de guanidina 2 M (pH 9,6) a 4°C durante la noche. Entonces se lavaron las placas tres veces con 300 µl de tampón de lavado (Tris 0,5 M, cloruro de sodio 1,5 M, Tween20 al 0,5%; pH 8); se bloquearon con 300 µl de tampón de bloqueo (Tris 0,05 M, Tween20 al 0,2%, BSA al 0,5%; pH 8) durante dos horas a 37°C y se lavaron de nuevo otras tres veces. Se incubaron las placas recubiertas durante una hora a 37°C con 100 µl de diluciones en serie de tres veces de los plasmas de los perros en tampón de vehículo (Tris 0,05 M, cloruro de sodio 0,5 M, BSA al 0,05%, Tween20 al 0,05%; pH 8) en una serie de 10 pocillos partiendo de una dilución 1:30 del plasma en el primer pocillo. La mayor dilución de plasma sometida a ensayo fue 1/10 x 3¹⁰. Se cargaron las columnas undécima y duodécima en cada placa con tampón de vehículo sin plasma para los controles blanco. Entonces se lavaron las placas y se incubaron durante una hora a 37°C con 100 µl de una dilución 1:1000 en tampón de vehículo de una IgG de conejo anti-perro conjugada con peroxidasa de rábano (Jackson ImmunoResearch. Suffolk, RU), se lavaron tres veces y se incubaron con el 0,0375% de ABTS (Roche, Barcelona, España) en tampón para ABTS (Roche, Barcelona, España). Se leyó la absorbancia a 405 nm en un lector de placas automatizado (Synergy 4, Biotek. Winooski, Vermont, EE.UU.).

Se calcularon las concentraciones de anticuerpo anti-Aβ en plasma usando el anticuerpo monoclonal 6E10 como patrón en las mismas placas de ELISA y se expresaron en µg/µl. Se determinó la CE50 de cada muestra de plasma mediante la regresión no lineal de la absorbancia con respecto al logaritmo de las diluciones en cada pocillo (GraphPad Prism 3.02). Además, se definió el título de punto final del plasma como la dilución máxima del plasma en la que la absorbancia era tres veces mayor que la absorbancia media de los pocillos blanco.

Determinación de péptidos Aβ libres en plasma

Se midieron los niveles de Aβ 1-42 y Aβ 1-40 en el plasma y el LCR de los perros usando ELISA de tipo sándwich indirecto con los kits de ELISA ABtest-40 y ABtest-42 de Araclon Biotech (Zaragoza, España) siguiendo las instrucciones del fabricante.

II. RESULTADOS

Los animales permanecieron sanos y activos a lo largo de todo el tiempo del experimento. En particular, no se detectó ningún signo de reacción a las vacunas.

1. Títulos de anticuerpo anti-A β (1-40)

Los perros tratados con la formulación de vacuna B era más efectivo, mostrando modificaciones sustanciales en sus títulos de anticuerpos anti- β 40 en plasma. La respuesta de todos los perros en este grupo, medida por la concentración de anticuerpo anti- β 40 y la CE₅₀ o dilución de punto final, siguió el mismo patrón aunque se observaron diferencias cuantitativas tanto entre grupo como dentro de los grupos (tabla 6, paneles A-B). El patrón general en los perros tratados con la formulación B se caracterizó por un aumento sustancial de los títulos después de dos inmunizaciones (S5) que se mantuvieron con solo modificaciones ligeras desde S5 a S9 (figura 5A). Por tanto, los títulos de los anticuerpos aumentaron sustancialmente después de dos inmunizaciones pero no aumentaron e incluso disminuyeron ligeramente después de las posteriores inyecciones de vacunas, específicamente, después de la séptima inmunización (S13) los títulos habían caído ligeramente a niveles menores que los valores de S5 (tabla 6 y figura 5A) en el grupo B.

Tabla 6. Títulos en plasma de anticuerpos específicos anti-A β 40 en diferentes puntos				
PANEL A: Equivalente a ng/ μ l de anticuerpo anti-A β 40				
Grupo/Perro	S0	S5	S9	S13
A1	0,3483	0,4705	0,7251	0,8830
A2	0,4196	0,5876	0,6284	0,4501
A3	0,5214	0,4450	0,5214	0,4603
B1	0,3585	10,1860	11,6729	8,0932
B2	0,7913	7,1359	9,9314	6,0361
B3	1,6111	2,2272	2,2629	2,5175
PANEL B: Valores de CE50 en plasma para el anticuerpo específico (anti-A β 40)				
Grupo/Perro	S0	S5	S9	S13
A1	49,47	26,92	38,54	31,01
A2	n.d.	n.d.	n.d.	14,97
A3	25,2	29,84	24,14	46,67
B1	31,44	1328	1593	831,1
B2	66,85	906,8	1031	571,9
B3	42,15	150,9	154	129,1
n.d.: no detectable				

2. Títulos de péptido A β

Los perros tratados con la formulación de vacuna B mostraron modificaciones sustanciales en sus concentraciones de A β (1-42) en plasma. Estos cambios siguieron un patrón caracterizado por una disminución sustancial del péptido A β (1-42) en S5, después de dos inmunizaciones, hasta el punto de que el péptido se volvió indetectable (<3,125 pg/ml; tabla 7A). La concentración del péptido se mantuvo indetectable hasta S13. Sin embargo, los perros tratados con la formulación de vacuna A no mostraron modificaciones en sus concentraciones de A β (1-42) en plasma. La concentración en plasma del péptido A β 1-40 parece seguir un patrón de cambios muy similar a A β (1-42) (tabla 7B).

Después de comparar los niveles de LCR antes de la inmunización (S0) y en S13 en ELISA, los niveles de péptido A β 1-40 y A β (1-42) disminuyeron en animales de ambos grupos (A y B) después del tratamiento con la vacuna. Sorprendentemente, los niveles eran incluso menores en perros del grupo A que en perros del grupo B, aunque los perros del grupo A no presentaron una respuesta inmunogénica.

Tabla 7A. Concentración de péptido A β 1-42 in pg/ml.

Grupo/perro	S0	S1	S5	S7	S9	S11	S13	CSF S0	CSF S13
A1	< 3,125	< 3,125	< 3,125	< 3,125	13,28	12,00	13,60	464,35	441,77
A2	10,64	11,49	13,19	10,08	15,17	12,62	15,17	349,84	160,32
A3	17,15	14,60	14,04	14,60	15,17	18,85	15,74	345,00	196,61
B1	17,43	23,81	< 3,125	< 3,125	< 3,125	< 3,125	< 3,125	403,06	237,74
B2	30,19	18,38	< 3,125	< 3,125	< 3,125	< 3,125	< 3,125	263,55	195,81
B3	< 3,125	12,34	< 3,125	< 3,125	< 3,125	< 3,125	< 3,125	261,13	200,65

Tabla 7B. Concentración de péptido A β 1-40 in pg/ml.

Grupo/perro	S0	S1	S5	S7	S9	S11	S13	CSF S0	CSF S13
A1	47,89	47,70	49,95	49,01	50,14	52,01	54,64	2576,97	2053,48
A2	48,56	47,36	40,16	40,76	42,36	45,56	48,36	2734,55	1414,09
A3	37,76	44,96	40,36	45,36	50,76	42,76	49,16	2616,36	1393,64
B1	59,33	51,08	< 3,125	< 3,125	< 3,125	< 3,125	< 3,125	2752,73	2363,33
B2	67,20	52,20	< 3,125	< 3,125	< 3,125	< 3,125	< 3,125	1665,61	1042,88
B3	46,36	44,56	< 3,125	< 3,125	< 3,125	< 3,125	< 3,125	1831,52	1676,97

EJEMPLO 3: Efecto de la inmunización en el cerebro**5 I. MATERIALES Y MÉTODOS**

Para estudiar el efecto de la inmunización en el cerebro se llevó a cabo un experimento a corto plazo, en el que los animales se sacrificaron después de tres inmunizaciones con las siguientes formulaciones:

- 10 (1) A β X-42 + BSA + adyuvante tipo Th2 (Rehydralgel)
 (2) A β X-42 + BSA + adyuvante mezcla tipo Th1/Th2 (Abisco)
 (3) Control: albúmina + adyuvante tipo Th2.

15 Se homogenizaron muestras de las regiones cerebrales frontal, entorrinal, temporal y cerebelosa en TBS pH 7,4 que contenía una mezcla de inhibidores de proteasas, seguido por una centrifugación de 175000 g durante 30 minutos a 4°C en un rotor Beckman MLA-55. El sobrenadante resultante se consideró la fracción soluble de cada una. Después, el precipitado se volvió a homogenizar en TBS-TX pH 7,4 que contenía una mezcla de inhibidores de proteasas y se centrifugó otra vez en las mismas condiciones que anteriormente. De nuevo, el precipitado resultante se volvió a homogenizar en TBS-cloruro de guanidinio y se incubó durante la noche a temperatura ambiente en un agitador de rotación, seguido por una centrifugación de 13000 g durante 1h30 min a 4°C en un rotor Beckman MLA-55. El precipitado se desechó y el sobrenadante resultante se resuspendió en TBS-cloruro de guanidinio y se considera como la fracción insoluble. La concentración de péptidos se cuantificó por ELISA.

25 II. RESULTADOS

La inmunización con A β X-42 conjugado a BSA produce un fuerte efecto en la forma soluble de los péptidos, con un descenso en la concentración de más del 50% en cada grupo tratado con respecto al grupo control. La concentración en la forma insoluble no disminuyó significativamente (figura 6). Respecto a las diferentes secciones cerebrales, la disminución era similar en todas las regiones para la forma soluble de los péptidos A β 40 y A β 42, con ligeras diferencias (figura 7).

Como sucedió en los ejemplos 2 y 3, no hubo diferencias en la concentración en LCR comparando los tiempos basal y después del tratamiento.

35 Los resultados obtenidos en esta invención son congruentes con la idea extendida de que la inmunización con A β podría ser más eficiente si se administra antes de tenga lugar la agregación de A β .

LISTA DE SECUENCIAS

<110> ARACLON BIOTECH

<120> CONJUGADOS DE ALBÚMINA-PÉPTIDO AMILOIDE Y USOS DE LOS MISMOS

<130> P4840PC00

<150> EP09382078

<151> 2009-05-26

<160> 19

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 40

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met	Val	Gly	Gly	Val	Val	Ile	Ala
1				5			

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Gly	Leu	Met	Val	Gly	Gly	Val	Val	Ile	Ala
1				5					10

ES 2 587 962 T3

<210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
 1 5

<210> 5
 <211> 609
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5

Met	Lys	Trp	Val	Thr	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Phe	Leu	Phe	Ser	Ser	Ala
1				5					10					15	
Tyr	Ser	Arg	Gly	Val	Phe	Arg	Arg	Asp	Ala	His	Lys	Ser	Glu	Val	Ala
			20					25					30		
His	Arg	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Glu	Glu	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Val	Leu
			35				40					45			
Ile	Ala	Phe	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln	Gln	Cys	Pro	Phe	Glu	Asp	His	Val
	50					55					60				
Lys	Leu	Val	Asn	Glu	Val	Thr	Glu	Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp
65					70					75					80
Glu	Ser	Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys	Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp
				85					90					95	
Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	Met	Ala
			100					105					110		
Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln
			115				120					125			
His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val
	130					135					140				
Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His	Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys
145					150					155					160
Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro
				165					170					175	
Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys
			180					185					190		
Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu
		195					200					205			

ES 2 587 962 T3

Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	210	215	220
Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val	225	230	235
Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	245	250	255
Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly	260	265	270
Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	275	280	285
Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu	290	295	300
Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp	305	310	315
Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	325	330	335
Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly	340	345	350
Met	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val	355	360	365
Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr	Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys	370	375	380
Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu	Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu	385	390	395
Phe	Lys	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys	405	410	415
Glu	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu	Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu	420	425	430
Val	Arg	Tyr	Thr	Lys	Lys	Val	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val	435	440	445
Glu	Val	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys	Val	Gly	Ser	Lys	Cys	Cys	Lys	His	450	455	460

ES 2 587 962 T3

Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
465 470 475 480

Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
485 490 495

Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
500 505 510

Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
515 520 525

Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
530 535 540

Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
545 550 555 560

Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
565 570 575

Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
580 585 590

Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
595 600 605

Leu

<210> 6

<211> 607

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 6

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15

Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Thr His Lys Ser Glu Ile Ala
20 25 30

His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu His Phe Lys Gly Leu Val Leu
35 40 45

Ile Ala Phe Ser Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Asp Glu His Val
50 55 60

ES 2 587 962 T3

Lys	Leu	Val	Asn	Glu	Leu	Thr	Glu	Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp	65	70	75	80
Glu	Ser	His	Ala	Gly	Cys	Glu	Lys	Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	85	90	95	
Glu	Leu	Cys	Lys	Val	Ala	Ser	Leu	Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Asp	Met	Ala	100	105	110	
Asp	Cys	Cys	Glu	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Ser	115	120	125	
His	Lys	Asp	Asp	Ser	Pro	Asp	Leu	Pro	Lys	Leu	Lys	Pro	Asp	Pro	Asn	130	135	140	
Thr	Leu	Cys	Asp	Glu	Phe	Lys	Ala	Asp	Glu	Lys	Lys	Phe	Trp	Gly	Lys	145	150	155	160
Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	Glu	165	170	175	
Leu	Leu	Tyr	Tyr	Ala	Asn	Lys	Tyr	Asn	Gly	Val	Phe	Gln	Glu	Cys	Cys	180	185	190	
Gln	Ala	Glu	Asp	Lys	Gly	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Ile	Glu	Thr	Met	195	200	205	
Arg	Glu	Lys	Val	Leu	Ala	Ser	Ser	Ala	Arg	Gln	Arg	Leu	Arg	Cys	Ala	210	215	220	
Ser	Ile	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Leu	Lys	Ala	Trp	Ser	Val	Ala	225	230	235	240
Arg	Leu	Ser	Gln	Lys	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Val	Glu	Val	Thr	Lys	245	250	255	
Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	Lys	Glu	Cys	Cys	His	Gly	Asp	260	265	270	
Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	Cys	275	280	285	
Asp	Asn	Gln	Asp	Thr	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Asp	Lys	290	295	300	
Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Lys	Asp	Ala	305	310	315	320

ES 2 587 962 T3

Ile	Pro	Glu	Asn	Leu	Pro	Pro	Leu	Thr	Ala	Asp	Phe	Ala	Glu	Asp	Lys	
				325					330					335		
Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Gln	Glu	Ala	Lys	Asp	Ala	Phe	Leu	Gly	Ser	
			340					345					350			
Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ser	Arg	Arg	His	Pro	Glu	Tyr	Ala	Val	Ser	Val	
		355					360					365				
Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Glu	Tyr	Glu	Ala	Thr	Leu	Glu	Glu	Cys	Cys	
	370					375					380					
Ala	Lys	Asp	Asp	Pro	His	Ala	Cys	Tyr	Ser	Thr	Val	Phe	Asp	Lys	Leu	
385					390					395					400	
Lys	His	Leu	Val	Asp	Glu	Pro	Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys	Asp	
				405					410					415		
Gln	Phe	Glu	Lys	Leu	Gly	Glu	Tyr	Gly	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Ile	Val	
			420					425					430			
Arg	Tyr	Thr	Arg	Lys	Val	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val	Glu	
		435					440					445				
Val	Ser	Arg	Ser	Leu	Gly	Lys	Val	Gly	Thr	Arg	Cys	Cys	Thr	Lys	Pro	
	450					455					460					
Glu	Ser	Glu	Arg	Met	Pro	Cys	Thr	Glu	Asp	Tyr	Leu	Ser	Leu	Ile	Leu	
465					470					475					480	
Asn	Arg	Leu	Cys	Val	Leu	His	Glu	Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Glu	Lys	Val	
				485					490					495		
Thr	Lys	Cys	Cys	Thr	Glu	Ser	Leu	Val	Asn	Arg	Arg	Pro	Cys	Phe	Ser	
			500					505					510			
Ala	Leu	Thr	Pro	Asp	Glu	Thr	Tyr	Val	Pro	Lys	Ala	Phe	Asp	Glu	Lys	
		515					520					525				
Leu	Phe	Thr	Phe	His	Ala	Asp	Ile	Cys	Thr	Leu	Pro	Asp	Thr	Glu	Lys	
	530					535					540					
Gln	Ile	Lys	Lys	Gln	Thr	Ala	Leu	Val	Glu	Leu	Leu	Lys	His	Lys	Pro	
545					550					555					560	

ES 2 587 962 T3

Lys Ala Thr Glu Glu Gln Leu Lys Thr Val Met Glu Asn Phe Val Ala
565 570 575

Phe Val Asp Lys Cys Cys Ala Ala Asp Asp Lys Glu Ala Cys Phe Ala
580 585 590

Val Glu Gly Pro Lys Leu Val Val Ser Thr Gln Thr Ala Leu Ala
595 600 605

<210> 7
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> SGGTSGSTSGTGST Región enlazadora

<400> 7

Ser Gly Gly Thr Ser Gly Ser Thr Ser Gly Thr Gly Ser Thr
1 5 10

<210> 8
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> AGSSTGSSTGPGSTT Enlazador

<400> 8

Ala Gly Ser Ser Thr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Gly Ser Thr Thr
1 5 10 15

<210> 9
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> GGS GGAP Enlazador

<400> 9

Gly Gly Ser Gly Gly Ala Pro
1 5

<210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> GGGKGGGG Enlazador

ES 2 587 962 T3

<400> 10

Gly Gly Gly Lys Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> GGGKGGGG Enlazador

<400> 11

Gly Gly Gly Lys Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> GTKVHMK Enlazador

<400> 12

Gly Thr Lys Val His Met Lys
1 5

<210> 13

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> PGTSGQQPSVGQQ Enlazador

<400> 13

Pro Gly Thr Ser Gly Gln Gln Pro Ser Val Gly Gln Gln
1 5 10

<210> 14

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> GTSGQ Enlazador

<400> 14

Gly Thr Ser Gly Gln
1 5

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

ES 2 587 962 T3

<213> Artificial

<220>

<223> PKPSTPPGSS Enlazador

<400> 15

Pro	Lys	Pro	Ser	Thr	Pro	Pro	Gly	Ser	Ser
1				5					10

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> APAETKAEPMT Enlazador

<400> 16

Ala	Pro	Ala	Glu	Thr	Lys	Ala	Glu	Pro	Met	Thr
1				5					10	

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Abeta (35-42) Humano con Cys N-terminal

<400> 17

Cys	Met	Val	Gly	Gly	Val	Val	Ile	Ala
1				5				

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Abeta 33-42 Humano con Cys N-terminal

<400> 18

Cys	Gly	Leu	Met	Val	Gly	Gly	Val	Val	Ile	Ala
1				5					10	

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cys-AB 33-40

<400> 19

Cys	Gly	Leu	Met	Val	Gly	Gly	Val	Val
1				5				

REIVINDICACIONES

1. Conjugado que comprende al menos un péptido inmunogénico derivado de la región C-terminal de A β (1-42) y albúmina para su uso en terapia, en el que el al menos un péptido inmunogénico derivado de la región C-terminal de A β (1-42) es A β (35-42) (SEQ ID NO: 2), A β (33-42) (SEQ ID NO: 3) o A β (33-40) (SEQ ID NO: 4) o un péptido de 8-10 residuos de aminoácido que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con A β (35-42) (SEQ ID NO: 2), A β (33-42) (SEQ ID NO: 3) o A β (33-40) (SEQ ID NO: 4).
2. Conjugado para su uso, según la reivindicación 1, en el que si el al menos un péptido inmunogénico y la albúmina están unidos por una región enlazadora, dicha región enlazadora contiene unido a la misma no más de un péptido inmunogénico.
3. Conjugado para su uso, según la reivindicación 2, en el que el al menos un péptido inmunogénico está unido a la molécula de albúmina mediante una región enlazadora que comprende una cisteína.
4. Conjugado para su uso, según la reivindicación 3, en el que la cisteína está localizada en el N-terminal del péptido inmunogénico.
5. Conjugado para su uso, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la albúmina es albúmina sérica bovina.
6. Composición que comprende un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un adyuvante para su uso en terapia.
7. Composición para su uso, según la reivindicación 6, en la que el adyuvante se selecciona del grupo de un adyuvante de tipo Th1, un adyuvante de tipo Th2 y un adyuvante mezcla de tipo Th1/Th2.
8. Conjugado que comprende al menos un péptido inmunogénico derivado de la región C-terminal de A β (1-42) y albúmina, o composición que comprende un conjugado que comprende al menos un péptido inmunogénico derivado de la región C-terminal de A β (1-42) y albúmina y un adyuvante para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad asociada con la deposición de proteínas amiloides, en el que el al menos un péptido inmunogénico derivado de la región C-terminal de A β (1-42) es A β (35-42) (SEQ ID NO: 2), A β (33-42) (SEQ ID NO: 3) o A β (33-40) (SEQ ID NO: 4) o un péptido de 8-10 residuos de aminoácido que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con A β (35-42) (SEQ ID NO: 2), A β (33-42) (SEQ ID NO: 3) o A β (33-40) (SEQ ID NO: 4).
9. Conjugado o composición para su uso, según la reivindicación 8, en el que el conjugado o la composición se administra bisemanalmente.
10. Conjugado o composición para su uso, según la reivindicación 8, en el que si el al menos un péptido inmunogénico y la albúmina están unidos por una región enlazadora, dicha región enlazadora contiene unido a la misma no más de un péptido inmunogénico.
11. Conjugado o composición para su uso, según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que la enfermedad asociada a la deposición de proteína amiloide se selecciona de enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, Angiopatia Amiloide Cerebral, y trastornos relacionados con proteínas priónicas.
12. Conjugado o composición para su uso, según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que la albúmina es albúmina sérica bovina.
13. Composición para su uso, según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, en la que el adyuvante se selecciona del grupo de un adyuvante de tipo Th1, un adyuvante de tipo Th2 y un adyuvante mezcla de tipo Th1/Th2.

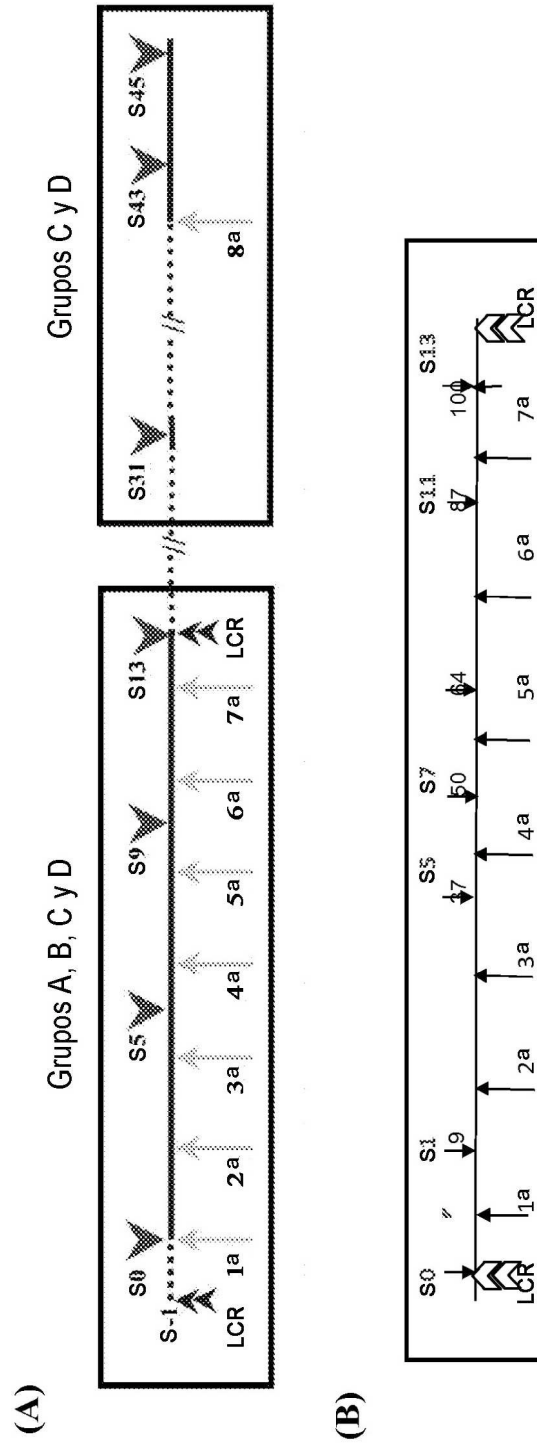


FIGURA 1

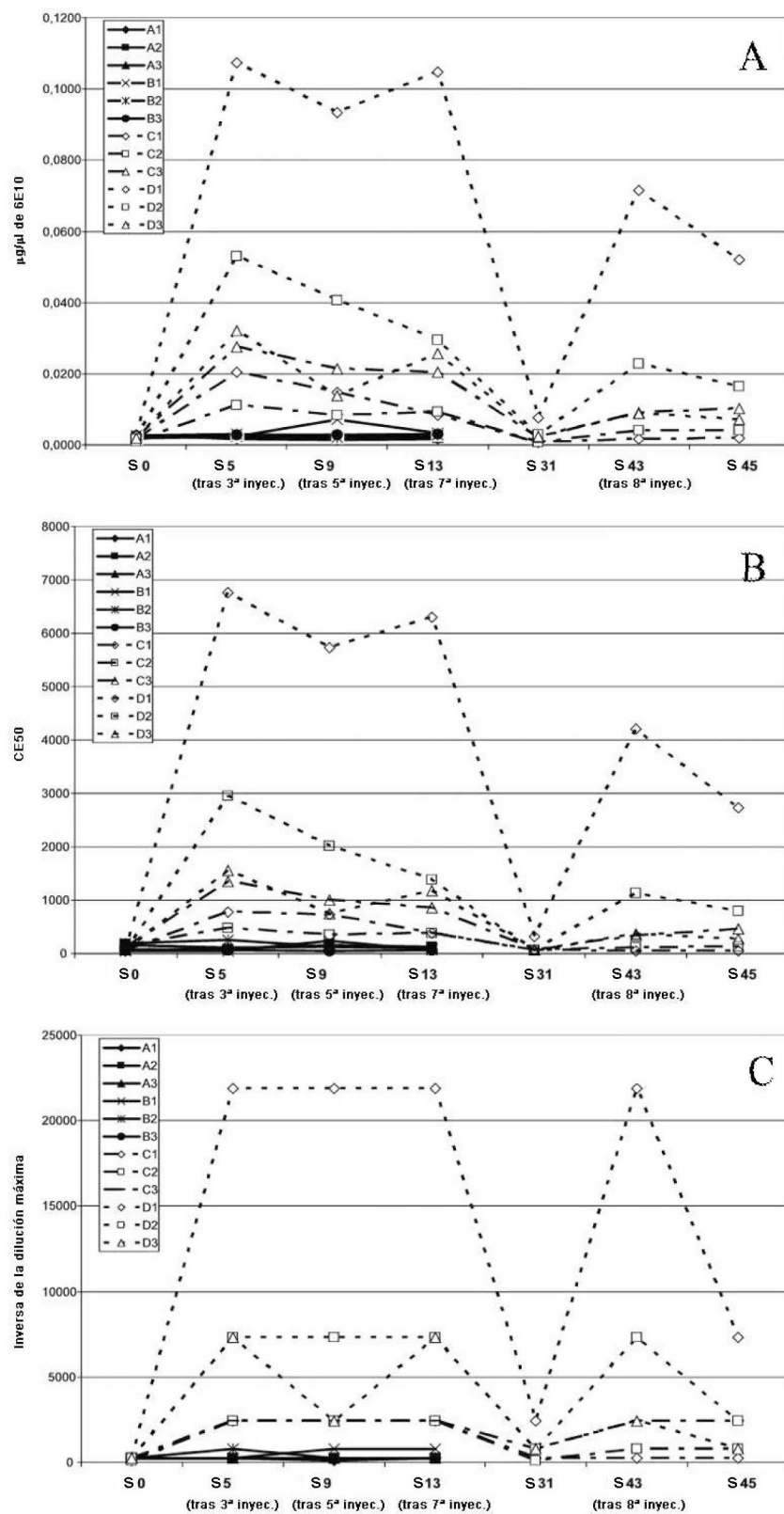


FIGURA 2

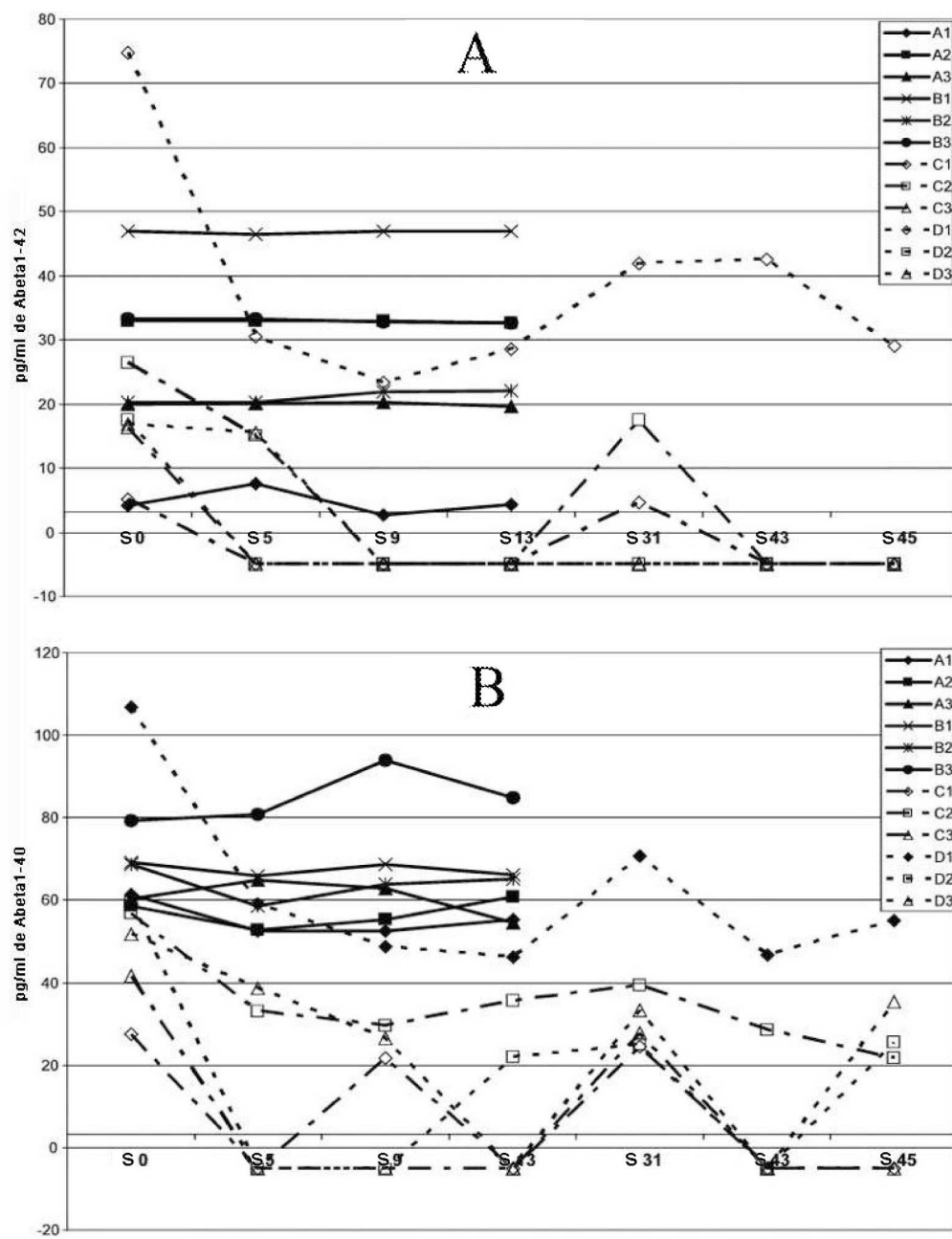


FIGURA 3

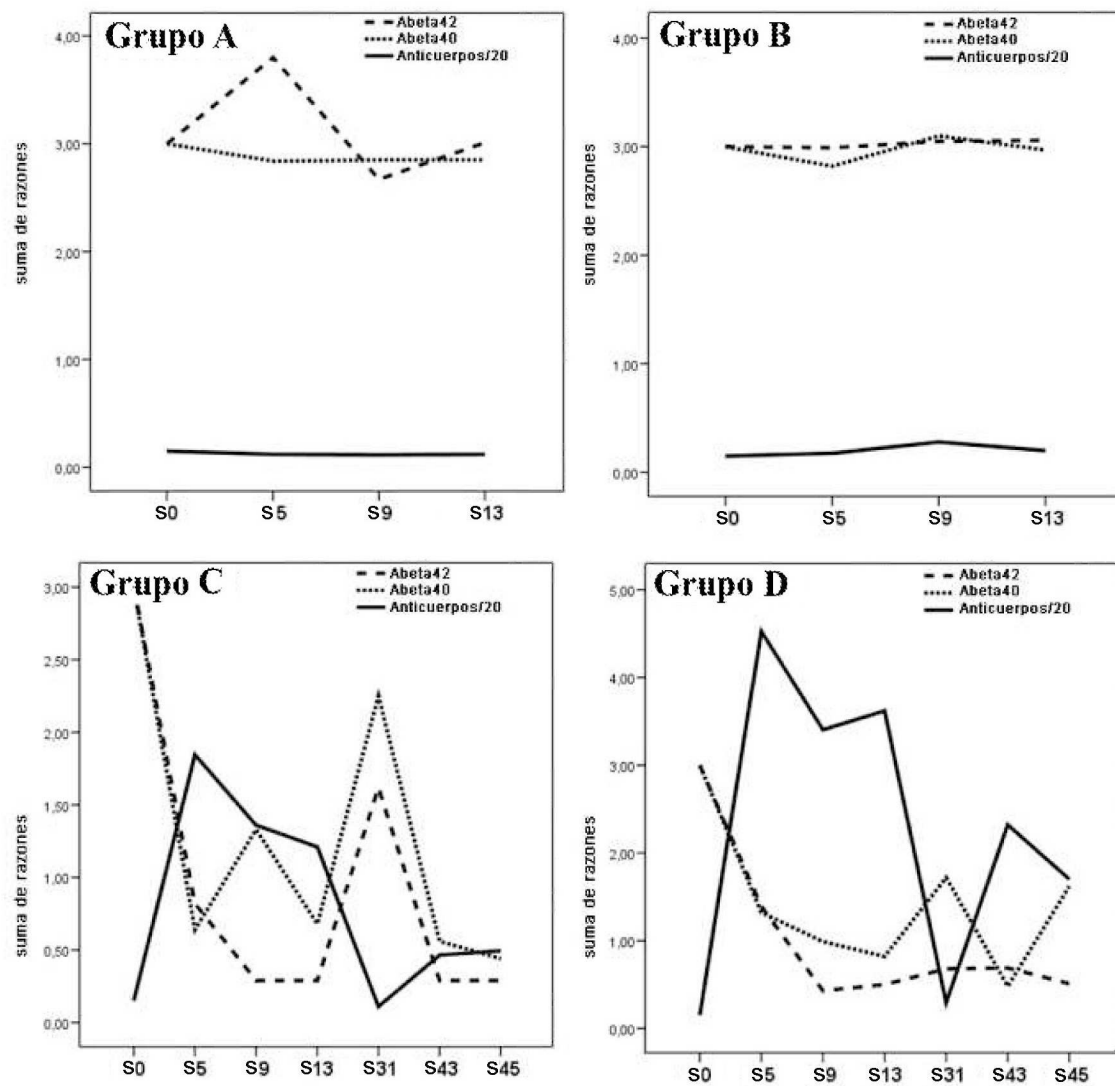


FIGURA 4

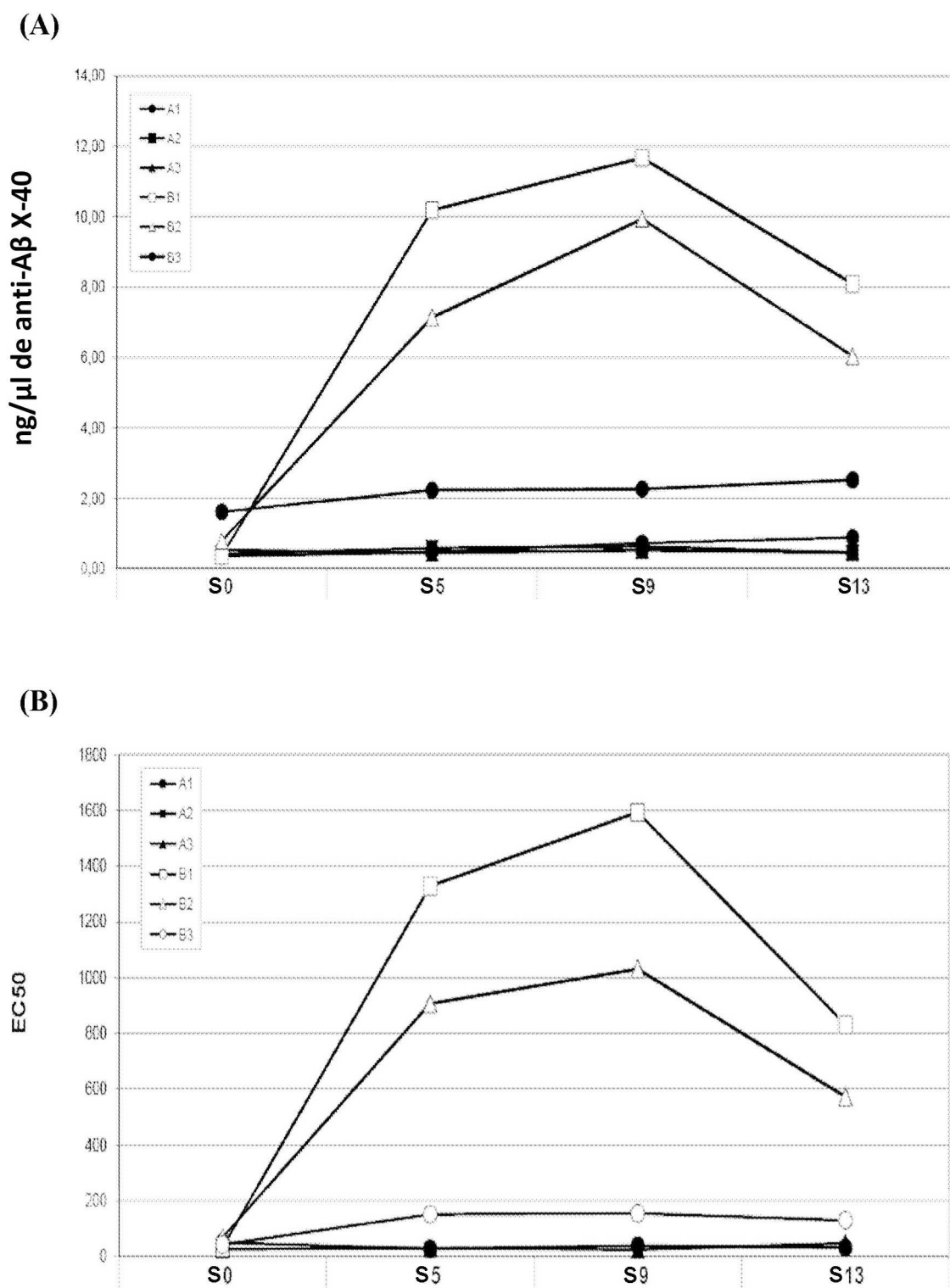


FIGURA 5

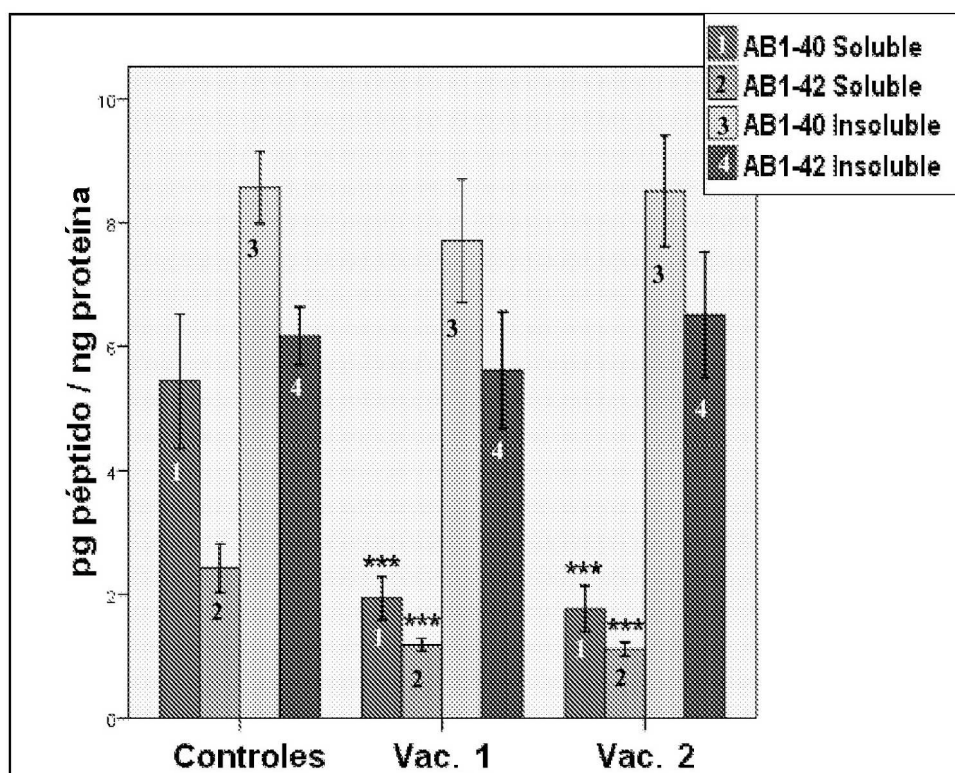
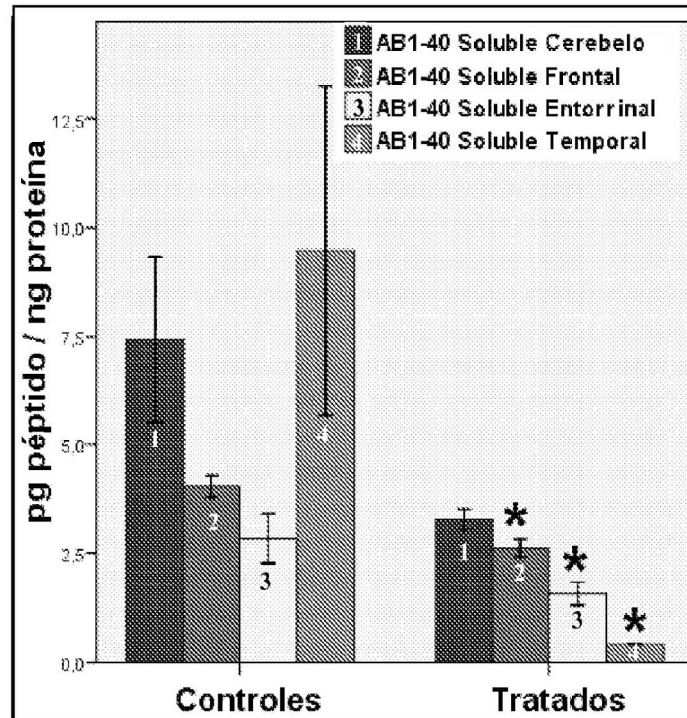


FIGURA 6

(A)



(B)

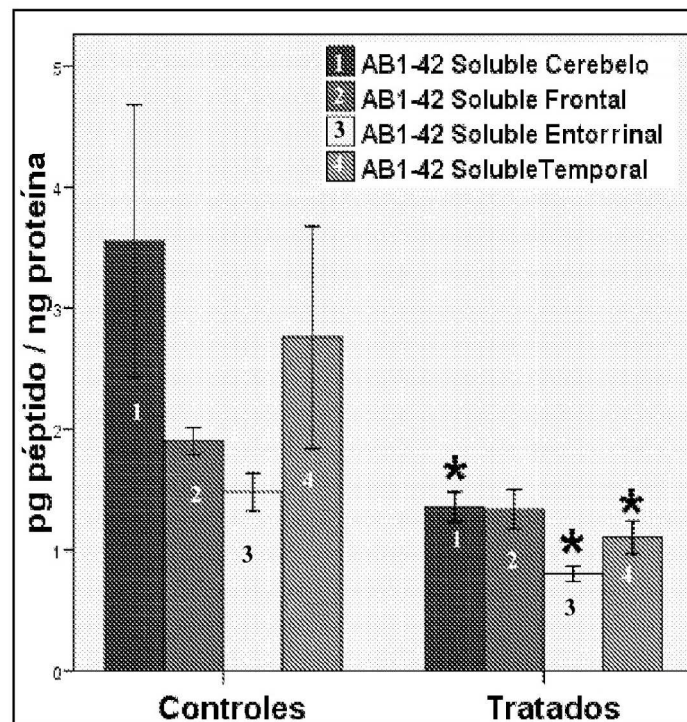


FIGURA 7