

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 230**

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.10.2009 PCT/JP2009/067918**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.04.2010 WO10044464**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2009 E 09820642 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.12.2016 EP 2348042**

54 Título: **Péptido β amiloide modificado**

30 Prioridad:

16.10.2008 JP 2008267992

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

27.09.2017

73 Titular/es:

**THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH
INSTITUTE (100.0%)
1-6-1 Okubo, Kita-ku
Kumamoto-shi, Kumamoto 860-8568, JP**

72 Inventor/es:

**MATSUDA, JUNICHI;
KAMINAKA, KAZUYOSHI y
NOZAKI, CHIKATERU**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 634 230 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

Péptido β amiloide modificado

5 **Campo técnico**

La presente divulgación se refiere a un método para potenciar la capacidad de inducción de respuesta inmunitaria de un péptido β amiloide (en lo sucesivo en el presente documento denominado "A β ", por el inglés, *amyloid β*). Más específicamente, la presente invención se refiere a un medicamento para la profilaxis o el tratamiento de la enfermedad del Alzheimer que comprende un péptido derivado de A β , el agente causante de la enfermedad de Alzheimer, o una porción del mismo, en la que la cisteína o su análogo se añade o se inserta.

Antecedentes de la técnica

15 La enfermedad del Alzheimer es un tipo de demencia y se asocia con la disminución de la función cognitiva y cambios en la personalidad como síntomas principales. Con el progreso del envejecimiento de la población, el número de pacientes de enfermedad de Alzheimer sigue en aumento. Se espera que el número de pacientes en Japón, en los Estados Unidos y en Europa llegue a ser de 7,3 millones en 2014 desde los 5,6 millones en 2004. Por lo tanto, el desarrollo temprano de un medicamento para la profilaxis y el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer es realmente deseado.

Los signos patológicos de la enfermedad de Alzheimer incluyen tres aspectos de la atrofia y/o la disminución de neuronas, la formación de placas seniles debido a la agregación y/o deposición de A β y cambios neurofibrilares debido a las proteínas tau anómalas. La enfermedad de Alzheimer se clasifica en dos grupos principales, es decir, la enfermedad de Alzheimer familiar y la enfermedad de Alzheimer esporádica. Para el primero, se ha identificado la mutación genética causante y se descubrió que su fenotipo elucida ese aumento en la producción de péptido β amiloide, especialmente A β 1-42, que consiste en 42 restos de aminoácidos, en el cerebro es la causa principal de la enfermedad. Sin embargo, una proporción de pacientes diagnosticados de padecer la enfermedad de Alzheimer familiar en un sentido estricto es el 1 % o menos entre los pacientes totales. Es para el caso de la enfermedad de Alzheimer esporádica, que representa el 99 % de los pacientes, para el que se desea el esclarecimiento más inmediato de la causa de la enfermedad. Se cree que la enfermedad de Alzheimer esporádica se genera mediante la duplicación de factores de riesgo genético no identificados, la presencia de genes recesivos, la presencia de factores de riesgo ambiental, y similares. En la actualidad, basándose en el hecho de que las mutaciones genéticas en la enfermedad de Alzheimer familiar son comunes en el aumento final de A β 42 altamente agregante, se cree que la causa principal de la enfermedad de Alzheimer esporádica, como experimenta un desarrollo patológico similar al de la enfermedad de Alzheimer familiar, podría ser un aumento en A β 42. Esta idea se llama hipótesis de mieloide y en la actualidad la investigación para el tratamiento está en progreso sobre la base de esta hipótesis.

A β se produce a partir de su proteína precursora mediante escisión con una aspartato proteasa unida a membrana. La β -secretasa escinde el N-terminal de A β mientras que las γ -secretasas escinde el C-terminal de la misma. Se puede segregar un A β escindido durante un tiempo fuera de las células dependiendo de la actividad sináptica. A β se autoagrega rápidamente, de manera que un monómero de A β , a través de un dímero, trímero y un oligómero soluble, forma protofibril, una estructura prefibrilosa, que después forma y acumula fibra amiloide insoluble. En la actualidad ha llegado a ser la idea principal que los efectos negativos del oligómero A β soluble agregado en los nervios juega un importante papel en las afecciones patológicas de la enfermedad del Alzheimer. Se han documentado varias formas de oligómero A β soluble que podrían bloquear la neurotransmisión, incluyendo un dímero, un trímero, un amiloesferoide (agregado de 53 kDa), A β 56 (agregado de 56 kDa), agregados de hasta 40 aminoácidos de longitud, y similares.

50 En la actualidad, la estrategia para la terapia mediante eliminación de A β , que puede jugar un papel altamente importante en el mecanismo para el comienzo de la enfermedad de Alzheimer, se hace ampliamente, entre los que se encuentra un estudio de una terapia de anticuerpos con un anticuerpo para A β . Se cree que el mecanismo de acción de eliminación de A β mediante un anticuerpo anti-A β incluye la fagocitosis por microglía mediante un receptor Fc de un anticuerpo, la disolución acelerada o la agregación suprimida de A β fibroso y la unión del anticuerpo a A β en sangre para acelerar la exclusión de la forma soluble de A β en el cerebro. Se han propuesto dos aproximaciones, es decir, la inmunidad activa donde se induce anticuerpos anti-A β mediante una vacuna e inmunidad pasiva en donde se administra un anticuerpo anti-A β per se.

60 Para la primera estrategia, la vacuna AN1792 con el uso de A β per se como antígeno procedió a un ensayo clínico de fase II, pero el ensayo se interrumpió puesto que el 6 % de los pacientes padecieron meningitis cerebroespinal durante el ensayo. Sin embargo, se observaron diferencias en la parte de la función de alto orden entre pacientes que tenían un título de anticuerpo aumentado y en pacientes que no lo tenían (referencia 1 no de la patente). Además, el cerebro del paciente fallecido durante el ensayo clínico se examinó para revelar que la placa senil desapareció en el neocórtex. Además, la IRM antes y después de la administración demostraron que el grupo de la administración presentaba un menor volumen del cerebro que el del grupo del placebo. Como tal, aunque se interrumpió el ensayo clínico debido a los efectos secundarios adversos, también se demostró que era eficaz una

vacuna con el uso de A β per se como un antígeno. En el futuro, se desea el desarrollo de una vacuna más segura.

Se cree que la meningitis cerebroespinal se genera por AN1792 como consecuencia del uso de un adyuvante QS21 potente y la inmunidad celular inducida por un epítipo de linfocito T presente en una secuencia de A β per se. Se ha
5 realizado mucha investigación para un epítipo de linfocitos T presente en la secuencia de A β per se para revelar que, al menos en el N-terminal de la secuencia de A β de los restos 1-10, está presente un epítipo de linfocito T que podría inducir inmunidad humoral pero no está presente un epítipo de linfocito T que pueda inducir inmunidad celular (referencias 2-4 de la patente).

10 Referencia 1 no de la patente: Gilman S, Koller M, Black RS, Jenkins L, et al., NEUROLOGY, 2005; 64: p1553-1562

Referencia 2 no de la patente: Michael G, Agadjanyan MG, et al., Journal of Immunology, 2005; 174: p1580-1586

Referencia 3 no de la patente: Bard F, Barbour R, Cannon C, Carretto R, Fox M, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003; 100: p2023-2028

15 Referencia 4 no de la patente: Wanga CY. et al., Vaccine, 2007; 25: p3041-3052

Descripción de la invención

(Problema técnico a resolver por la invención)

20 Tal como se ha descrito anteriormente, existe una preocupación por los efectos secundarios adversos en una terapia de vacuna para la enfermedad del Alzheimer con una combinación de una secuencia de A β de longitud completa con un adyuvante potente tal como QS21. Por lo tanto, se desea el desarrollo de un método más seguro y eficaz para la profilaxis y el tratamiento con una combinación de un péptido de A β en una forma más segura con un
25 adyuvante más seguro. Por consiguiente, un objeto de la presente invención es proporcionar un péptido para una terapia de vacuna más segura de la enfermedad de Alzheimer diseñando la forma de un péptido de A β .

(Medios para solucionar los problemas)

30 Los presentes inventores han investigado realmente un método para la inmunización y para potenciar la inmunización que es seguro para el organismo vivo, eficaz y que no es caro, y como resultado, han descubierto que una capacidad de inducción de una respuesta inmunitaria potenciada de un péptido de interés se puede potenciar mediante adición o inserción de un resto de cisteína, un aminoácido que constituye una proteína de origen natural, para mostrar, por tanto, que la propiedad de inducir una respuesta inmune potenciada frente a A β se puede obtener
35 añadiendo o insertando una molécula de cisteína a una porción de péptido A β sin usar una longitud completa de péptido A β (PCT/JP2008/057612). De acuerdo con la presente invención, la investigación adicional dio como resultado el descubrimiento de un método para la obtención de una respuesta inmunitaria potenciada para A β y nuevos péptidos de A β con adición de una molécula de cisteína de los que se espera que induzcan una respuesta inmunitaria celular reducida.

40 La presente divulgación se refiere a un método novedoso para potenciar una respuesta inmunitaria, más específicamente, un método para potenciar una respuesta inmunitaria caracterizada porque se añade o se inserta una molécula de cisteína en un péptido inmunogénico. La presente invención se refiere a los siguientes aspectos:

45 1. Un péptido seleccionado de (A) a (G) de los siguientes:

(A) un péptido que consiste en (a) un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 1 a N.º 10 del N-terminal de la SEQ ID NO:1 y (b) un péptido seleccionado de péptidos que consisten en los restos de aminoácidos N.º 28 a N.º 36, N.º 28 a N.º 37, N.º 28 a N.º 38, N.º 28 a N.º 39, N.º 28 a N.º 40, N.º 28 a N.º 41, N.º 28 a N.º 42 del N-terminal de la SEQ ID NO:1, uniéndose entre sí el péptido (a) y el péptido (b), en donde la cisteína o un análogo de cisteína se une al C-terminal de la combinación resultante del péptido (a) y el péptido (b);

50 (B) un péptido que consiste en (a) un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 2 a N.º 10, N.º 2 a N.º 9, del N-terminal de la SEQ ID NO:1 y (b) un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 28 a N.º 37 del N-terminal de la SEQ ID NO:1, uniéndose entre sí el péptido (a) y el péptido (b), en donde la cisteína o un análogo de cisteína se une al C-terminal de la combinación resultante del péptido (a) y el péptido (b);

60 (C) un péptido que consiste en (a) un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 1 a N.º 18 del N-terminal de la SEQ ID NO: 1 y (b) un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 28 a N.º 42 del N-terminal de la SEQ ID NO:1, uniéndose entre sí el péptido (a) y el péptido (b), en donde la cisteína o un análogo de cisteína se une al C-terminal de la combinación resultante del péptido (a) y el péptido (b);

65 (D) un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 1 a 26 del N-terminal de la SEQ ID NO:1 en donde la cisteína o un análogo de cisteína se inserta entre los restos de aminoácidos N.º 18 y 19 del N-

terminal;

(E) un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 1 a N.º 28 del N-terminal de la SEQ ID NO:1, en donde la cisteína o un análogo de cisteína se inserta entre los restos de aminoácidos N.º 18 y 19 del N-terminal, y en donde la cisteína o el análogo de cisteína se une al C-terminal de dicho péptido;

(F) un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 1 a N.º 18 desde el N-terminal de la SEQ ID NO:1 hasta el C-terminal al que se une la cisteína o un análogo de cisteína, al que se une un péptido adicional que consiste en los restos de aminoácidos N.º 28 a N.º 37 del N-terminal de la SEQ ID NO:1;

(G) un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 1 a N.º 28 desde el N-terminal de la SEQ ID NO:1, hasta el C-terminal al que se une un análogo de cisteína;

(H) un péptido que consiste en dos de un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 1 a N.º 28 desde el N-terminal de la SEQ ID NO:1, hasta el C-terminal al que se une una cisteína o un análogo de cisteína, uniéndose dichos dos péptidos entre sí mediante un enlace disulfuro entre dichas cisteínas o dichos análogos de cisteína,

en donde dicho péptido se caracteriza porque esta cisteína o análogo de cisteína se añade a o se inserta en una porción de un péptido β amiloide o una secuencia derivada de un péptido β amiloide.

2. El péptido del apartado 1, en donde dicho análogo de cisteína es homocisteína.

3. El péptido del apartado 1 o 2, en donde dicho péptido es un péptido seleccionado del grupo que consiste en lo siguiente:

- un péptido de una cualquiera de las SEQ ID NO:2 a la SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15 a la SEQ ID NO: 17, y SEQ ID NO: 19;
- un péptido que consiste en dos péptidos, cada uno de los péptidos consiste en la SEQ ID NO:20 y se unen entre sí mediante un enlace disulfuro; y
- un péptido que consiste en un péptido que consiste en la SEQ ID NO:20 y un péptido que consiste en la SEQ ID NO:21, cada uno de los péptidos se unen entre sí mediante un enlace disulfuro.

4. El péptido tal como se define en cualquiera de los apartados 1 a 3 para su uso en la mejora de la respuesta inmunitaria para β amiloide.

5. Uso del péptido tal como se define en cualquiera de los apartados 1 a 3 para la preparación de un medicamento para la mejora de la respuesta inmunitaria para β amiloide.

6. Un medicamento para su uso en la profilaxis y el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer caracterizado porque el medicamento comprende como un principio activo el péptido que se expone en uno cualquiera de los apartados 1 a 3.

7. Uso de un péptido tal como se define en cualquiera de los apartados 1 a 3 para la preparación de un medicamento para la profilaxis y el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

8. Una vacuna de ADN eficaz para su uso en la profilaxis y el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer caracterizada porque la vacuna comprende un fragmento de gen que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido tal como se expone en uno cualquiera de los apartados 1 a 3.

9. Uso de una vacuna de ADN que comprende un fragmento de gen que codifica para la secuencia de aminoácidos del péptido tal como se define en uno cualquiera de los apartados 1 a 3 para la preparación de un medicamento para la profilaxis y el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

La presente divulgación también se refiere a un método para la profilaxis y el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en un mamífero que comprende la administración de una cantidad farmacéuticamente eficaz del péptido de la presente invención a dicho mamífero, así como un método para la profilaxis y el tratamiento de enfermedad de Alzheimer en un mamífero que comprende la administración de una cantidad farmacéuticamente eficaz de un fragmento de gen que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido de la presente invención a dicho mamífero.

La presente invención además se refiere al uso del péptido de la presente invención para la fabricación de un medicamento para la profilaxis y el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer así como al uso del fragmento de gen que codifica para la secuencia de aminoácidos del péptido de la presente invención para la fabricación de un medicamento para la profilaxis y el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Efectos de la invención

La presente invención proporciona un péptido inmunogénico que induce una respuesta inmunitaria potenciada y suficiente para un péptido A β incluso si se usa solo sin un adyuvante. De acuerdo con la presente invención, solo mediante la adición o inserción de una molécula de cisteína a una porción de un péptido A β o una secuencia derivada de un péptido A β , se puede potenciar la producción de anticuerpo de un péptido inmunogénico. Por lo tanto, no hay desventaja asociada con el uso de un adyuvante que permita el diseño más sencillo de una formulación de un fármaco.

El péptido inmunogénico de la presente invención que induce una respuesta inmunitaria potenciada para un péptido A β , cuando se administra al organismo vivo, puede inducir de manera rápida y abundante un anticuerpo específico para el péptido en sangre. No se conoce toxicidad de cisteína, sino que se sabe que la cisteína y sus sustancias relacionadas tienen un efecto antitóxico en el organismo vivo y por lo tanto el péptido inmunogénico de la presente invención que induce una respuesta inmune mejorada puede usarse en el organismo con mucha seguridad.

El péptido inmunogénico de la presente invención que induce una respuesta inmunitaria potenciada se puede preparar mediante un procedimiento no biológico mediante síntesis química y por tanto, en una mayor uniformidad que las vacunas convencionales del componente. Además, con el riesgo más bajo de toxicidad, de infección y de descenso en la calidad debido a la contaminación, se puede proporcionar una vacuna más segura.

Una preparación de péptido que comprende el péptido inmunogénico de la presente invención que induce una respuesta inmunitaria mejorada para un péptido A β se puede administrar no solo mediante inyección tal como administración subcutánea o intramuscular, sino también mediante administración oral, transnasal o transdérmica, que evitaría el estrés y los accidentes médicos producidos por la aguja de la jeringa.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra una estructura de péptidos A β de 28 restos de aminoácidos con adición de cisteína unida entre sí mediante un enlace disulfuro.

MEJOR MODO DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

De acuerdo con la presente invención, una molécula de cisteína o un derivado del mismo se puede añadir o insertar directamente al péptido o, como alternativa, se puede añadir o insertar una secuencia que expresa cisteína a la secuencia de ADN o ARN. La posición de adición e inserción de cisteína no está especialmente limitada en la medida en que se puede obtener el efecto potenciador de la respuesta inmunitaria a un péptido A β . El número de una molécula de cisteína a insertar puede ser una o más. Cuando se insertan plurales de moléculas de cisteína, se pueden insertar bien de manera consecutiva o no consecutiva. La estructura más simple sería una porción de péptido A β , para cualquier N-terminal o C-terminal al que se une una cisteína.

El péptido de la presente invención eficaz para la profilaxis y el tratamiento de enfermedad de Alzheimer puede incluir un péptido que es una porción de, o que deriva de, péptido A β (DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA: SEQ ID NO:1) que consiste en los restos de aminoácidos N.º 1 a N.º 42, al que se añade la cisteína (Cys) o su análogo. Los ejemplos de tales péptidos incluyen aquellos enumerados a continuación en el presente documento. Un análogo de cisteína, tal como se usa en el presente documento se refiere a un precursor y un metabolito de cisteína e incluye típicamente homocisteína.

(A) Un péptido que comprende (a) un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 1 a N.º 18 del N-terminal de la SEQ ID NO:1 o un péptido que consiste en una porción de los restos de aminoácidos N.º 1 a N.º 18 del N-terminal de la SEQ ID NO:1 y (b) un péptido que consiste en 9 o más restos de aminoácidos que incluyen los restos de aminoácidos N.º 28 a N.º 36 del N-terminal de la SEQ ID NO:1 con los restos de aminoácidos N.º 28 a N.º 42 del N-terminal de la SEQ ID NO:1, uniéndose entre sí el péptido (a) y el péptido (b), en donde la cisteína o un análogo de cisteína se une al C-terminal de la combinación resultante del péptido (a) y el péptido (b)

(1) Un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 1 a N.º 10 desde el N-terminal de la SEQ ID NO:1, al C-terminal al que se une un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 28 a N.º 42 desde el N-terminal de la SEQ ID NO:1, hasta el C-terminal al que se añade la cisteína (1-10 · 28-42AACys): N-terminal-DAEFRHDSGYKGAIIIGLMVGGVVIAC (SEQ ID NO:2)

(2) Un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 1 a N.º 10 desde el N-terminal de la SEQ ID NO:1, al C-terminal al que se une un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 28 a N.º 41 desde el N-terminal de la SEQ ID NO:1, hasta el C-terminal al que se añade la cisteína (1-10 · 28-41AACys): N-terminal-DAEFRHDSGYKGAIIIGLMVGGVVIC (SEQ ID NO:3)

(3) Un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 1 a N.º 10 desde el N-terminal de la SEQ ID NO:1, al C-terminal al que se une un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 28 a N.º 40 desde el N-terminal de la SEQ ID NO:1, hasta el C-terminal al que se añade la cisteína (1-10 · 28-40AACys): N-

terminal-DAEFRHDSGYKGAIIGLMVGVC (SEQ ID NO:4)

(4) Un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 1 a N.º 10 desde el N-terminal de la SEQ ID NO:1, al C-terminal al que se une un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 28 a N.º 39 desde el N-terminal de la SEQ ID NO:1, hasta el C-terminal al que se añade la cisteína (1-10 · 28-39AACys): N-terminal-DAEFRHDSGYKGAIIGLMVGVC (SEQ ID NO:5)

(5) Un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 1 a N.º 10 desde el N-terminal de la SEQ ID NO:1, al C-terminal al que se une un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 28 a N.º 38 desde el N-terminal de la SEQ ID NO:1, hasta el C-terminal al que se añade la cisteína (1-1028-38AACys): N-terminal-DAEFRHDSGYKGAIIGLMVGVC (SEQ ID NO:6)

(6) Un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 1 a N.º 10 desde el N-terminal de la SEQ ID NO:1, al C-terminal al que se une un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 28 a N.º 37 desde el N-terminal de la SEQ ID NO:1, hasta el C-terminal al que se añade la cisteína (1-1028-37AACys): N-terminal-DAEFRHDSGYKGAIIGLMVGVC (SEQ ID NO:7)

(7) Un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 1 a N.º 10 desde el N-terminal de la SEQ ID NO:1, al C-terminal al que se une un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 28 a N.º 36 desde el N-terminal de la SEQ ID NO:1, hasta el C-terminal al que se añade la cisteína (1-10 · 28-36AACys): N-terminal-DAEFRHDSGYKGAIIGLMVC (SEQ ID NO:8)

(8) Un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 1 a N.º 10 desde el N-terminal de la SEQ ID NO:2, al C-terminal al que se une un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 28 a N.º 37 desde el N-terminal de la SEQ ID NO:1, hasta el C-terminal al que se añade la cisteína (2-10 · 28-37AACys): N-terminal-AEFRHDSGYKGAIIGLMVGVC (SEQ ID NO:10)

(9) Un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 1 a N.º 9 desde el N-terminal de la SEQ ID NO:2, al C-terminal al que se une un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 28 a N.º 37 desde el N-terminal de la SEQ ID NO:1, hasta el C-terminal al que se añade la cisteína (2-9 · 28-37AACys): N-terminal-AEFRHDSGKGAIIGLMVGVC (SEQ ID NO:12)

(10) Un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 1 a N.º 18 desde el N-terminal de la SEQ ID NO:1, al C-terminal al que se une un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 28 a N.º 42 desde el N-terminal de la SEQ ID NO:1, hasta el C-terminal al que se añade la cisteína (1-18 · 28-42AACys): N-terminal-DAEFRHDSGYEVHHQKLVKGAIIGLMVGCVIA (SEQ ID NO:13)

(B) Un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 1 a N.º 26 o N.º 1 a N.º 27 del N-terminal de la SEQ ID NO:1 en donde la cisteína o un análogo de cisteína se inserta entre los restos de aminoácidos N.º 18 y 19 del N-terminal

(1) Un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 1 a N.º 26 del N-terminal de la SEQ ID NO:1 (en lo sucesivo, en el presente documento, referido como "péptido Aβ de 26 aminoácidos") en donde la cisteína se inserta entre los restos de aminoácidos N.º 18 y 19 del N-terminal (1-18Cys19-26AA): N-terminal-DAEFRHDSGYEVHHQKLVCFFAEDVGS (SEQ ID NO:15)

(C) Un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 o un péptido que consiste en una porción de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1, en donde la cisteína o un análogo de cisteína se inserta entre los restos de aminoácidos N.º 18 y 19 del N-terminal, y en donde la cisteína o el análogo de cisteína se une al C-terminal de dicho péptido

(1) Un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 1 a N.º 28 desde el N-terminal de la SEQ ID NO:1 (en lo sucesivo en el presente documento referido como "péptido Aβ de 28 aminoácidos"), en donde la cisteína se inserta entre los restos de aminoácidos N.º 18 y 19 del N-terminal, y en donde la cisteína se une al C-terminal de dicho péptido (1-18Cys19-28AACys) N-terminal-DAEFRHDSGYEVHHQKLVCFFAEDVGSNKC (SEQ ID NO:16)

(D) Un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 1 a N.º 18 del N-terminal de la SEQ ID NO:1 o un péptido que consiste en una porción de los restos de aminoácidos N.º 1 a N.º 18 desde el N-terminal de la SEQ ID NO:1, hasta el C-terminal al que se une una cisteína o un análogo de cisteína, al que se une adicionalmente un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 28 a N.º 42 del N-terminal de la SEQ ID NO:1 o un péptido que consiste en una porción de los restos de aminoácidos N.º 28 a N.º 42 desde el N-terminal de la SEQ ID NO:1, hasta el C-terminal al que se une una cisteína o un análogo de cisteína

(1) Un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 1 a N.º 18 desde el N-terminal de la SEQ ID NO:1, hasta el C-terminal al que se une una cisteína, al que se une adicionalmente un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 28 a N.º 37 del N-terminal de la SEQ ID NO:1 (1-18Cys28-37AA) N-terminal-DAEFRHDSGYEVHHQKLVCKGAIIGLMVG (SEQ ID NO:17)

(E) Un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 o un péptido que consiste en una porción de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1, hasta el C-terminal al que se une una cisteína o un análogo de cisteína

(1) Un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 1 a N.º 28 desde el N-terminal de la SEQ ID NO:1, hasta el C-terminal al que se une la homocisteína (28AA-homocisteína) N-terminal-DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKX (SEQ ID NO:19) (X: homocisteína)

5 (F) Un péptido que consiste en dos o más de un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 o un péptido que consiste en una porción de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1, hasta el C-terminal al que se une una cisteína o un análogo de cisteína, en donde dichos dos o más péptidos están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro entre dichas cisteínas o análogos de cisteína

10 (1) Péptido A β de 28 aminoácidos con adición de cisteína (28AAC) N-terminal-DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK \underline{C} (SEQ ID NO:20)
 (2) Péptido A β de 28 aminoácidos con adición de dos cisteínas (28AACC) N-terminal-DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK \underline{CC} (SEQ ID NO:21)

15 Un péptido que consiste en 28AAC y 28AAC unidos entre sí mediante un enlace disulfuro (28AACdisulfuro28AAC), un péptido que consiste en 28AAC y 28AACC unidos entre sí mediante un enlace disulfuro (28AACdisulfuro28AACC), un péptido que consiste en 28AACC y 28AACC unidos entre sí mediante un enlace disulfuro (28AACCdisulfuro28AACC; que incluye uno con un enlace disulfuro formado entre cisteínas cada uno en el N-terminal, uno con un enlace disulfuro formado entre cisteínas cada uno en el C-terminal, uno con un enlace disulfuro formado entre cisteína en el N-terminal y cisteína en el C-terminal, uno con enlaces disulfuro cada uno formado entre cisteínas cada uno en el N-terminal y entre cisteínas cada uno en el C-terminal, y uno con enlaces disulfuro formados cada uno entre cisteína en el N-terminal y cisteína en el C-terminal), y un péptido que consiste en una pluralidad de 28AACC unidos entre sí mediante enlaces disulfuro (28AACC(28AAC)-producto de unión). La Fig. 1 muestra la estructura de estos péptidos.

25 Entre los péptidos A β con adición o inserción de cisteína tal como se describe anteriormente, un péptido que consiste en péptido A β con una porción de su secuencia de aminoácidos siendo eliminada con la adición de cisteína tal como 1-10 · 28-42AACys (SEQ ID NO:2), 1-10 · 28-41AACys (SEQ ID NO:3), 1-10 · 228-40AACys (SEQ ID NO:4), 1-10 · 28-3-39AACys (SEQ ID NO:5), 1-10 · 28-38AACys (SEQ ID NO:6), 1-10 · 28-37AACys (SEQ ID NO:7), 30 1-10 · 28-36AACys (SEQ ID NO:8), 2-10 · 28-37AACys (SEQ ID NO:10) y 1-18 · 28-42AACys (SEQ ID NO:13); un péptido que consiste en un péptido A β de 28 aminoácidos con adición o inserción de cisteína tal como 1-18Cys19-28AACys (SEQ ID NO:16), 1-18Cys19-26AA (SEQ ID NO:15), 1-18Cys28-37AA (SEQ ID NO:17); un péptido que consiste en un péptido A β de 28 aminoácidos con adición de homocisteína tal como 28AA-homocisteína (SEQ ID NO:19); y 28AACdisulfuro28AAC y 28AACdisulfuro28AACC puede inducir una reacción inmunitaria particularmente 35 potenciada y por tanto, se puede usar de manera eficaz para la profilaxis y el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

De acuerdo con la presente invención, un péptido que puede inducir una respuesta inmunitaria potenciada se puede preparar mediante la adición o inserción de cisteína o un análogo de cisteína a una porción de un péptido A β o una 40 secuencia derivada de un péptido A β . Se puede corroborar si un péptido obtenido tras la adición o inserción de cisteína ejerce un efecto potenciador de respuesta inmunitaria mediante la inmunización de ratones con el péptido usando las técnicas convencionales y determinando un título de anticuerpo IgG anti-A β en sangre. Por lo tanto, la presente divulgación también proporciona un método para potenciar una respuesta inmunitaria caracterizado porque se usa un péptido obtenido mediante adición o inserción de cisteína o de un análogo de cisteína a una porción de un 45 péptido A β o una secuencia derivada de un péptido A β .

Se puede administrar una preparación de péptido que contiene el péptido con adición de cisteína obtenida por la presente invención mediante cualquier ruta de administración tal como subcutánea, transdérmica, intramuscular, oral, o transnasal. Lo más preferentemente, se puede administrar por vía subcutánea o intramuscular.

50 Mientras que el péptido inmunogénico con adición de cisteína de la presente invención puede proporcionar suficiente inmunización incluso si se administra solo sin un adyuvante, puede proporcionar suficiente inmunización adicional si se combina con un adyuvante. Un adyuvante que se puede usar en el presente documento incluye uno que puede activar preferentemente la inmunidad humoral pero puede no estimular la inmunidad celular, y típicamente una sal de aluminio.

Además, un vector que comprende un fragmento de gen que codifica un péptido que induce una respuesta inmunitaria potenciada obtenida mediante adición o inserción de cisteína o un análogo de cisteína a una porción de un péptido A β o una secuencia derivada de un péptido A β se puede usar como una vacuna de ADN para prevenir 60 eficazmente y tratar la enfermedad de Alzheimer. Una secuencia de nucleótidos que codifica cisteína incluye, por ejemplo, tgt pero puede ser cualquier secuencia en la medida en que codifique cisteína. Un fragmento de gen que codifica el péptido A β que consiste en los 42 restos de aminoácidos mencionados anteriormente se describe a continuación. Sin embargo, la secuencia de nucleótidos descrita a continuación representa una secuencia de genes típica del péptido A β pero se puede emplear cualquier secuencia de genes siempre que codifique la misma 65 secuencia de aminoácidos.
 gatgcagaat tccgacatga ctcaggatgaat gaagttcctc atcaaaaatt ggtgttcttt gcagaagatg tgggttcaaa caaagggtgca atcattggac

tcatggtggg cggtgtgtc atagcg (SEQ ID NO:22)

Un ejemplo de un fragmento de genes que codifican un péptido obtenido mediante adición o inserción de cisteína (Cys) a una porción de un péptido A β o a una secuencia derivada de un péptido A β incluye aquellos descritos a continuación. Sin embargo, las secuencias de nucleótidos descritas a continuación representan una secuencia de genes típica que codifica cada uno de los péptidos mencionados anteriormente pero se puede emplear cualquier secuencia de genes siempre que codifique la misma secuencia de aminoácidos.

- Un fragmento de genes que codifica 1-10 · 28-42AACys
10 gatgcagaat tccgacatga ctcaggatat aaaggtgcaa tcatggact catggtgggc ggtgtgtca tagcgtgt (SEQ ID NO:23)
- Un fragmento de genes que codifica 1-10 · 28-41AACys
gatgcagaat tccgacatga ctcaggatat aaaggtgcaa tcatggact catggtgggc ggtgtgtca tatgt (SEQ ID NO:24)
- Un fragmento de genes que codifica 1-10 · 28-40AACys
gatgcagaat tccgacatga ctcaggatat aaaggtgcaa tcatggact catggtgggc ggtgtgtct (SEQ ID NO:25)
- Un fragmento de genes que codifica 1-10 · 28-39AACys
15 gatgcagaat tccgacatga ctcaggatat aaaggtgcaa tcatggact catggtgggc ggtgttgt (SEQ ID NO:26)
- Un fragmento de genes que codifica 1-10 · 28-38AACys
gatgcagaat tccgacatga ctcaggatat aaaggtgcaa tcatggact catggtgggc ggtgt (SEQ ID NO:27)
- Un fragmento de genes que codifica 1-10 · 28-37AACys
20 gatgcagaat tccgacatga ctcaggatat aaaggtgcaa tcatggact catggtgggc gt (SEQ ID NO:28)
- Un fragmento de genes que codifica 1-10 · 28-36ACys
gatgcagaat tccgacatga ctcaggatat aaaggtgcaa tcatggact catggtgt (SEQ ID NO:29)
- Un fragmento de genes que codifica 2-10 · 28-37AACys
gcagaattcc gacatgactc aggatataaa ggtgcaatca ttgactcat ggtggcgt (SEQ ID NO:31)
- Un fragmento de genes que codifica 2-9 · 28-37AACys
25 gcagaattcc gacatgactc aggaaaagg gcaatcattg gactcatggt gggcgt (SEQ ID NO:33)
- Un fragmento de genes que codifica 1-18 · 28-42AACys
gatgcagaat tccgacatga ctcaggatat gaagttcatc atcaaaaatt ggtgaaagg gcaatcattg gactcatggt gggcggtgt
gtcatagcgtgt (SEQ ID NO:34)
- Un fragmento de genes que codifica 1-18Cys19-26AA
30 gatgcagaat tccgacatga ctcaggatat gaagttcatc atcaaaaatt ggtggtttc ttgcagaag atgtgggttc a (SEQ ID NO:36)
- Un fragmento de genes que codifica 1-18Cys19-28AACys
gatgcagaat tccgacatga ctcaggatat gaagttcatc atcaaaaatt ggtggtttc ttgcagaag atgtgggttc aaacaaatgt (SEQ ID NO:37)
- Un fragmento de genes que codifica 1-18Cys28-37AA
35 gatgcagaat tccgacatga ctcaggatat gaagttcatc atcaaaaatt ggtggttaa ggtgcaatca ttgactcat ggtgggc (SEQ ID NO:38)

La presente invención se explica en más detalle por medio de los siguientes Ejemplos, pero no debería interpretarse como limitante de la misma.

Ejemplo 1

45 Comparación de capacidad inductora de anticuerpos entre péptidos que consisten en los restos de aminoácidos N.^o 1 a N.^o 10 de péptido A β , al que se une cada uno de los diversos péptidos de C-terminal, al C-terminal al que se añade la cisteína

(1) Preparación de péptidos A β con adición de cisteína

- 50 • péptido A β de aminoácidos 1-10+30-42 con adición de cisteína (1-10 · 30-42AACys): N-terminal-DAEFRHDSGYAIIGLMVGGVVIAC (SEQ ID NO:40)
- péptido A β de aminoácidos 1-10+29-42 con adición de cisteína (1-10 · 29-42AACys): N-terminal-DAEFRHDSGYGAIIGLMVGGVVIAC (SEQ ID NO:41)
- 55 • péptido A β de aminoácidos 1-10+28-42 con adición de cisteína (1-10 · 28-42AACys): N-terminal-DAEFRHDSGYKGAIIIGLMVGGVVIAC (SEQ ID NO:2)
- péptido A β de aminoácidos 1-10+28-42 (1-10 · 28-42AA): N-terminal-DAEFRHDSGYKGAIIIGLMVGGVVIAC (SEQ ID NO:42)

60 Los péptidos anteriores se sintetizaron (Sigma Aldrich, Japón) y se diluyeron con solución salina para obtener una solución madre de 5 mg/ml. A 100 μ l de solución madre se le añadieron 900 μ l de solución salina a 0,5 mg/ml de concentración y la mezcla se dispensó en un tubo de 1,5 ml (inmunógeno) y se almacenó a -80 °C o menos hasta su uso.

(2) Ratones inmunizados

65 Los ratones C57BL/6 machos (7 semanas de edad, SPF) se compraron de Japan Charles River Co., Ltd. y se

criaron en medio SPF.

(3) Grupos de inmunización

- 5 Los 16 ratones se dividieron en 4 grupos, cada uno comprendiendo 4 ratones: Grupo 1 administrado con 1-10 · 30-42AACys; Grupo 2 administrado con 1-10 · 29-42AACys; Grupo 3 administrado con 1-10 · 28-42AACys y Grupo 4 administrado con 1-10 · 28-42AA.

(4) Inmunización y pautas

- 10 Cada 200 µl/ratón de un inmunógeno se administraron a los ratones usando una jeringa de 1 ml de tuberculina (Terumo, SS- 01T2613S) por vía intradérmica o subcutánea en el abdomen (dosis por ratón: 100 µg). Los ratones se inmunizaron 3 veces en intervalos de 2 semanas.

15 (5) Muestreo de sangre

- En el día 7 desde el final de la 3ª inmunización, se extrajo sangre desde la aorta abdominal de todos los ratones con anestesia con pentobarbital sódico (Kyoritsu Seiyaku Corporation, Somnopentilo). El muestreo de sangre se transfirió al Microtainer (Becton Dickinson Co., Ltd), la coagulación adecuada se produjo a temperatura ambiente y después se centrifugó a 5.000 rpm durante 10 minutos. Cada uno de los sueros separados se dispensó en dos tubos de 0,5 ml y se almacenó a -80 °C hasta la medición.

(6) Medición de anticuerpo IgG anti-Aβ

- 25 El péptido Aβ (secuencia de aminoácidos 1-40: N-terminal-DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV (SEQ ID NO: 43) sintetizado por Hokkaido System Science Co., Ltd.), diluido a 10 µg/ml con tampón carbonato 0,1 M, a pH 9,6, se añadió a tiras de 8 pocillos (nalge Nunc K.K., Immobilizer Amino) a 100 µl/pocillo y se dejó incubar a 4 °C durante toda la noche para la inmovilización. Al día siguiente, cada pocillo se lavó 3 veces con 300 µl de PBS que contiene Tween20 al 0,05 % (PBST), se añadió con etanolamina 10 mM a 300 µl/pocillo y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.

- Tras 1 hora, la etanolamina 10 mM se retiró por completo y se añadió un espécimen diluido con PBST de 50 a 10000 veces a cada pocillo a 100 µl/pocillo. Tras la reacción a temperatura ambiente durante 1 hora, el suero diluido añadido se descartó y cada pocillo se lavó 3 veces con 300 µl/pocillo de PBST. Tras el lavado, la solución de lavado en el pocillo se retiró por completo, un anticuerpo de cabra IgG anti-ratón marcado con HRP (American Curlex, A131PS) diluido con la solución para la dilución del espécimen a 2000 veces se añadió a 100 µl/pocillo mediante reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras la reacción, la solución para dilución del anticuerpo marcado se descartó y se lavó cada pocillo dos veces con 300 µl/pocillo de PBST y dos veces con la cantidad equivalente de agua destilada, a la que se le añadieron 100 µl/pocillo de solución de sustrato cromogénico TMB+ (Dako Inc.) seguido de reacción a temperatura ambiente durante 30 minutos a oscuras. Después, se añadieron 100 µl/pocillo de ácido sulfúrico 1 N para detener el desarrollo y se midió la densidad óptica a 450 nm (valor de DO450).

- Se usó un anticuerpo monoclonal para Aβ disponible comercialmente (CHEMI-CON Corporation, MAB1560) como suero patrón. El suero patrón se diluyó con PBST a 0,156, 0,3125, 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10 ng/ml para preparar patrones para la medición de título de anticuerpo. Se determinó un anticuerpo IgG anti-Aβ de cada espécimen de suero murino midió de manera simultánea el valor de DO450 de cada espécimen diluido. Se calculó el título de anticuerpo IgG anti-Aβ de cada espécimen de suero murino usando la unidad de los patrones resultantes y la curva patrón del valor de DO450.

- 50 La Tabla 1 muestra el título de anticuerpo anti-Aβ del suero murino en cada uno de los grupos de inmunización. Tal como se muestra en la Tabla 1, la inducción de un anticuerpo para Aβ se observó en el grupo administrado con 1-10 · 28-42AACys y en el grupo administrado con 1-10 · 28-42AA. Asimismo, en comparación con la inmunización con fragmentos de péptido Aβ sin adición de cisteína (1-10 · 28-42AA), la inmunización con fragmentos de péptido Aβ con adición de cisteína (1-10 · 28-42AACys) proporcionó un mayor título de anticuerpo frente a Aβ.

55

Tabla 1

Grupo	Título de anticuerpo (ng/ml)					Promedio
	Animal N.º	1	2	3	4	
1-10 30-42AACys		9	7	11	8	8,4
1-1029-42AACys		16	16	87	11	32,6
1-1028-42AACys		46266	19854	40681	33	26708,6
1-1028-42AA		66	715	3559	13	1088,5

Ejemplo 2

Comparación de capacidad inductora de anticuerpos entre péptidos que consisten en los restos de aminoácidos N.º 1 a N.º 10 de péptido Aβ, a los que se une cada una de las secuencias de restos de aminoácidos N.º 28 a N.º 42, N.º 28 a N.º 41, N.º 28 a N.º 40, N.º 28 a N.º 39, N.º 28 a N.º 38, N.º 28 a N.º 37, N.º 28 a N.º 36, N.º 28 a N.º 35 y N.º 28 a N.º 34 de péptido Aβ al C-terminal al que se añade la cisteína

(1) Preparación de péptidos Aβ con adición de cisteína

- 10 • péptido Aβ de aminoácidos 1-10+28-42 con adición de cisteína (1-10 · 28-42AACys): N-terminal-DAEFRHDSGYKGAIIGLMVGGVVIAC (SEQ ID NO:2)
- péptido Aβ de aminoácidos 1-10+28-41 con adición de cisteína (1-10 · 28-41AACys): N-terminal-DAEFRHDSGYKGAIIGLMVGGVVIC (SEQ ID NO:3)
- 15 • péptido Aβ de aminoácidos 1-10+28-40 con adición de cisteína (1-10 · 28-40AACys): N-terminal-DAEFRHDSGYKGAIIGLMVGGVVC (SEQ ID NO:4)
- péptido Aβ de aminoácidos 1-10+28-39 con adición de cisteína (1-10 · 28-39AACys): N-terminal-DAEFRHDSGYKGAIIGLMVGGVC (SEQ ID NO:5)
- péptido Aβ de aminoácidos 1-10+28-38 con adición de cisteína (1-10 · 28-38AACys): N-terminal-DAEFRHDSGYKGAIIGLMVGGC (SEQ ID NO:6)
- 20 • péptido Aβ de aminoácidos 1-10+28-37 con adición de cisteína (1-10 · 28-37AACys): N-terminal-DAEFRHDSGYKGAIIGLMVGC (SEQ ID NO:7)
- péptido Aβ de aminoácidos 1-10+28-36 con adición de cisteína (1-10 · 28-36AACys): N-terminal-DAEFRHDSGYKGAIIGLMVC (SEQ ID NO:8)
- péptido Aβ de aminoácidos 1-10+28-35 con adición de cisteína (1-10 · 28-35AACys): N-terminal-DAEFRHDSGYKGAIIGLMC (SEQ ID NO:44)
- 25 • péptido Aβ de aminoácidos 1-10+28-34 con adición de cisteína (1-10 · 28-34AACys): N-terminal-DAEFRHDSGYKGAIIGLC (SEQ ID NO:45)

30 Los péptidos anteriores se sintetizaron (Sigma Aldrich, Japón) y se diluyeron con solución salina para obtener una solución madre de 5 mg/ml. A 100 µl de solución madre se le añadieron 900 µl de solución salina a 0,5 mg/ml de concentración y la mezcla se dispensó en un tubo de 1,5 ml (inmunógeno) y se almacenó a -80 °C o menos hasta su uso.

(2) Ratones inmunizados

35 Los ratones C57BL/6 machos (7 semanas de edad, SPF) se compraron de Japan Charles River Co., Ltd. y se criaron en medio SPF.

(3) Grupos de inmunización

40 Los 36 ratones se dividieron en 9 grupos, cada uno comprendiendo 4 ratones: Grupo 1 administrado con 1-10 · 28-42AACys, Grupo 2 administrado con 1-10 · 28-41AACys, Grupo 3 administrado con 1-10 · 28-40AACys, Grupo 4 administrado con 1-10 · 28-39AACys, Grupo 5 administrado con 1-10 · 28-38AACys, Grupo 6 administrado con 1-10 · 28-37AACys, Grupo 7 administrado con 1-10 · 28-36AACys, Grupo 8 administrado con 1-10 · 28-35AACys y Grupo 9 administrado con 1-10 · 28-34AACys.

45

(4) Inmunización y pautas

50 Cada 200 µl/ratón de un inmunógeno se administraron a los ratones usando una jeringa de 1 ml de tuberculina (Terumo, SS- 01T2613S) por vía intradérmica o subcutánea en el abdomen (dosis por ratón: 100 µg). Los ratones se inmunizaron 3 veces en intervalos de 2 semanas.

(5) Muestreo de sangre

55 En el día 7 desde el final de la 3ª inmunización, se extrajo sangre desde la aorta abdominal de todos los ratones con anestesia con pentobarbital sódico (Kyoritsu Seiyaku Corporation, Somnopentilo). El muestreo de sangre se transfirió al Microtainer (Becton Dickinson Co., Ltd), la coagulación adecuada se produjo a temperatura ambiente y después se centrifugó a 5.000 rpm durante 10 minutos. Cada uno de los sueros separados se dispensó en dos tubos de 0,5 ml y se almacenó a -80 °C hasta la medición.

60

(6) Medición de anticuerpo IgG anti-Aβ

65 La medición de anticuerpo IgG anti-Aβ se realizó tal como se describe anteriormente. La Tabla 2 muestra el título de anticuerpo anti-Aβ del suero murino en cada uno de los grupos de inmunización. Tal como se muestra en la Tabla 2, la inducción de un anticuerpo para Aβ se observó en 1-10 · 28-42AACys, 1-10 · 28-41AACys, 1-10 · 28-40AACys, 1-10 · 28-39AACys, 1-10 · 28-38AACys, 1-10 · 28-37AACys y 1-10 · 28-36AACys.

Tabla 2

Grupo	Título de anticuerpo (ng/ml)					Promedio
	Animal N.º	1	2	3	4	
1-1028-42AACys		32	30482	33623	2072	16552,3
1-1028-41AACys		292	1000	48460	422012	117941,1
1-1028-40AACys		4560	148622	5118	4988	40822,0
1-1028-39AACys		139361	10808	13326	230453	98487,0
1-1028-38AACys		19149	34270	108780	61824	56005,8
1-1028-37AACys		79708	1531	24694	100619	51638,0
1-1028-36AACys		11821	259763	77	44922	79145,6
1-1028-35AACys		44	19	8361	220	2161,0
1-1028-34AACys		29	30	26	25	27,4

Ejemplo 3

5 Comparación de capacidad inductora de anticuerpos entre péptidos que consisten en cada uno de los diversos péptidos de N-terminal de péptido A β , a los que se unen los restos de aminoácidos N.º 28 a N.º 37 de péptido A β , al C-terminal al que se añade la cisteína

10 (1) Preparación de péptidos A β con adición de cisteína

· péptido A β de aminoácidos 1-9+28-37 con adición de cisteína (1-9 · 28-37AACys): N-terminal-DAEFRHDSGKGAIIGLMVGC (SEQ ID NO:9)

· péptido A β de aminoácidos 1-8+28-37 con adición de cisteína (1-8 · 28-37AACys): N-terminal-DAEFRHDSKGAIIIGLMVGC (SEQ ID NO:46)

15 · péptido A β de aminoácidos 1-7+28-37 con adición de cisteína (1-7 · 28-37AACys): N-terminal-DAEFRHDKGAIIGLM- VGC (SEQ ID NO:47)

Los péptidos anteriores se sintetizaron (Sigma Aldrich, Japón) y se diluyeron con solución salina para obtener una solución madre de 5 mg/ml. A 100 μ l de solución madre se le añadieron 900 μ l de solución salina a 0,5 mg/ml de concentración y la mezcla se dispensó en un tubo de 1,5 ml (inmunógeno) y se almacenó a -80 °C o menos hasta su uso.

(2) Ratones inmunizados

25 Los ratones C57BL/6 machos (7 semanas de edad, SPF) se compraron de Japan Charles River Co., Ltd. y se criaron en medio SPF.

(3) Grupos de inmunización

30 Los 12 ratones se dividieron en 3 grupos, cada uno comprendiendo 4 ratones: Grupo 1 administrado con 1-9 · 28-37AACys, Grupo 2 administrado con 1-8 · 28-37AACys y Grupo 3 administrado con 1-7 · 28-37AACys.

(4) Inmunización y pautas

35 Cada 200 μ l/ratón de un inmunógeno se administraron a los ratones usando una jeringa de 1 ml de tuberculina (Terumo, SS- 01T2613S) por vía intradérmica o subcutánea en el abdomen (dosis por ratón: 100 μ g). Los ratones se inmunizaron 3 veces en intervalos de 2 semanas.

(5) Muestreo de sangre

40 En el día 7 desde el final de la 3ª inmunización, se extrajo sangre desde la aorta abdominal de todos los ratones con anestesia con pentobarbital sódico (Kyoritsu Seiyaku Corporation, Somnopentilo). El muestreo de sangre se transfirió al Microtainer (Becton Dickinson Co., Ltd), la coagulación adecuada se produjo a temperatura ambiente y después se centrifugó a 5.000 rpm durante 10 minutos. Cada uno de los sueros separados se dispensó en dos tubos de 0,5 ml y se almacenó a -80 °C hasta la medición.

(6) Medición de anticuerpo IgG anti-A β

50 La medición de anticuerpo IgG anti-A β se realizó tal como se describe anteriormente. La Tabla 3 muestra el título de anticuerpo anti-A β del suero murino en cada uno de los grupos de inmunización. Tal como se muestra en la Tabla 3,

la inducción de un anticuerpo para A β se observó en el péptido 1-928-37AACys.

Tabla 3

Grupo	Título de anticuerpo (ng/ml)					Promedio
	Animal N.º	1	2	3	4	
1-928-37AACys		398	249	2772	8899	3079,5
1-828-37AACys		16	16	43	31	26,4
1-728-37AACys		26	27	34	15	25,6

5 Ejemplo 4

Comparación de capacidad inductora de anticuerpos entre péptidos que consisten en los restos de aminoácidos N.º 2 a N.º 10 o N.º 3 a N.º 10 o N.º 4 a N.º 10 de péptido A β , a los que se unen los restos de aminoácidos N.º 28 a N.º 37 de péptido A β , al C-terminal al que se añade la cisteína

10

(1) Preparación de péptidos A β con adición de cisteína

- péptido A β de aminoácidos 2-10+28-37 con adición de cisteína (2-10 · 28-37AACys): N-terminal-AEFRHDSGYKGAIIGLMVGC (SEQ ID NO:10)
- 15 · péptido A β de aminoácidos 3-10+28-37 con adición de cisteína (3-10 · 28-37AACys): N-terminal-EFRHDSGYKGAIIGLMVGC (SEQ ID NO:11)
- péptido A β de aminoácidos 4-10+28-37 con adición de cisteína (4-10 · 28-37AACys): N-terminal-FRHDSGYKGAIIGLMVGC (SEQ ID NO:48)
- 20 · péptido A β de aminoácidos 2-9+28-37 con adición de cisteína (2-9 · 228-37AACys): N-terminal-AEFRHDSGKGAIIGLMVGC (SEQ ID NO:12)

25

Los péptidos anteriores se sintetizaron (Sigma Aldrich, Japón) y se diluyeron con solución salina para obtener una solución madre de 5 mg/ml. A 100 μ l de solución madre se le añadieron 900 μ l de solución salina a 0,5 mg/ml de concentración y la mezcla se dispensó en un tubo de 1,5 ml (inmunógeno) y se almacenó a -80 °C o menos hasta su uso.

(2) Ratones inmunizados

30 Los ratones C57BL/6 machos (7 semanas de edad, SPF) se compraron de Japan Charles River Co., Ltd. y se criaron en medio SPF.

(3) Grupos de inmunización

35 Los 16 ratones se dividieron en 4 grupos, cada uno comprendiendo 4 ratones: Grupo 1 administrado con 2-10 · 28-37AACys, Grupo 2 administrado con 3-10 · 28-37AACys, Grupo 3 administrado con 4-10 · 28-37AACys y Grupo 4 administrado con 2-9 · 28-37AACys.

(4) Inmunización y pautas

40 Cada 200 μ l/ratón de un inmunógeno se administraron a los ratones usando una jeringa de 1 ml de tuberculina (Terumo, SS- 01T2613S) por vía intradérmica o subcutánea en el abdomen (dosis por ratón: 100 μ g). Los ratones se inmunizaron 3 veces en intervalos de 2 semanas.

(5) Muestreo de sangre

45

En el día 7 desde el final de la 3ª inmunización, se extrajo sangre desde la aorta abdominal de todos los ratones con anestesia con pentobarbital sódico (Kyoritsu Seiyaku Corporation, Somnopentilo). El muestreo de sangre se transfirió al Microtainer (Becton Dickinson Co., Ltd), la coagulación adecuada se produjo a temperatura ambiente y después se centrifugó a 5.000 rpm durante 10 minutos. Cada uno de los sueros separados se dispensó en dos tubos de 0,5 ml y se almacenó a -80 °C hasta la medición.

50

(6) Medición de anticuerpo IgG anti-A β

55 La medición de anticuerpo IgG anti-A β se realizó tal como se describe anteriormente. La Tabla 4 muestra el título de anticuerpo anti-A β del suero murino en cada uno de los grupos de inmunización. Tal como se muestra en la Tabla 4, la inducción de un anticuerpo para A β se observó en los péptidos 2-10 · 28-37AACys, 3-10 · 28-37AACys y 2-9 · 28-37AACys.

Tabla 4

Grupo	Título de anticuerpo (ng/ml)					Promedio
	Animal N.º	1	2	3	4	
2-1028-37AACys		72890	57573	6094	42593	44787,5
3-1028- 37AACys		3203	1456	4500	52	2302,8
4-1028-37AACys		24	31	53	27	33,8
2-9 28-37AACys		7038	29489	16	17	9139,9

Ejemplo 5

5 Comparación de capacidad inductora de anticuerpos entre péptidos que consisten en los restos de aminoácidos N.º 1 a N.º 10, a los que se unen los restos de aminoácidos N.º 28 a N.º 42 de péptido A β , al C-terminal al que se añade la cisteína, y péptidos que consisten en los restos de aminoácidos N.º 1 a N.º 18, a los que se unen los restos de aminoácidos N.º 28 a N.º 42 de péptido A β , al C-terminal al que se añade la cisteína

10 (1) Preparación de péptidos A β con adición de cisteína

- péptido A β de aminoácidos 1-18+28-42 con adición de cisteína (1-18 · 28-42AACys): N-terminal-DAEFRHDSGYEVHHQKLVKGAIIGLMVGGVVIA \underline{C} (SEQ ID NO: 13)
- péptido A β de aminoácidos 1-10+28-42 con adición de cisteína (1-10 · 28-42AACys): N-terminal-DAEFRHDSGYKGAIIGLMVGGVVIA \underline{C} (SEQ ID NO:2)

Los péptidos anteriores se sintetizaron (Sigma Aldrich, Japón) y se diluyeron con solución salina para obtener una solución madre de 5 mg/ml. A 100 μ l de solución madre se le añadieron 900 μ l de solución salina a 0,5 mg/ml de concentración y la mezcla se dispensó en un tubo de 1,5 ml (inmunógeno) y se almacenó a -80 °C o menos hasta su uso.

(2) Ratones inmunizados

Los ratones C57BL/6 machos (7 semanas de edad, SPF) se compraron de Japan Charles River Co., Ltd. y se criaron en medio SPF.

(3) Grupos de inmunización

Los 8 ratones se dividieron en 2 grupos, cada uno comprendiendo 4 ratones: Grupo 1 administrado con 1-18 · 28-42AACys y Grupo 2 administrado con 1-10 · 28-42AACys.

(4) Inmunización y pautas

Cada 200 μ l/ratón de un inmunógeno se administraron a los ratones usando una jeringa de 1 ml de tuberculina (Terumo, SS- 01T2613S) por vía intradérmica o subcutánea en el abdomen (dosis por ratón: 100 μ g). Los ratones se inmunizaron 3 veces en intervalos de 2 semanas.

(5) Muestreo de sangre

En el día 7 desde el final de la 3ª inmunización, se extrajo sangre desde la aorta abdominal de todos los ratones con anestesia con pentobarbital sódico (Kyoritsu Seiyaku Corporation, Somnopentilo). El muestreo de sangre se transfirió al Microtainer (Becton Dickinson Co., Ltd), la coagulación adecuada se produjo a temperatura ambiente y después se centrifugó a 5.000 rpm durante 10 minutos. Cada uno de los sueros separados se dispensó en dos tubos de 0,5 ml y se almacenó a -80 °C hasta la medición.

(6) Medición de anticuerpo IgG anti-A β

La medición de anticuerpo IgG anti-A β se realizó tal como se describe anteriormente. La Tabla 5 muestra el título de anticuerpo anti-A β del suero murino en cada uno de los grupos de inmunización. Tal como se muestra en la Tabla 5, la inducción similar de un anticuerpo para A β se observó tanto en el grupo administrado con 1-18 · 28-42AACys como en el grupo administrado con 1-10 · 28-42AA.

Tabla 5

Grupo	Título de anticuerpo (ng/ml)					
	Animal N.º	1	2	3	4	Promedio
1-18-26-42AACys		69336	41211	51611	7004	42290,5
1-10-28-42AACys		886,2	463379	414,8	3314	116998,5

Ejemplo 6

5 Comparación de capacidad inductora de anticuerpos entre péptidos que consisten en péptido A β en donde se inserta la cisteína entre los restos de aminoácidos N.º 18 y 19 de péptido A β y dicho péptido, al C-terminal al que se une la cisteína

- 10 • un péptido que consiste en péptido A β de 28 aminoácidos en donde la cisteína se inserta entre los restos de aminoácidos N.º 18 y 19 del péptido A β (1-18Cys19-28AA): N-terminal-DAEFRHDSGYEVHHQKLVCFFAEDVGSNK (SEQ ID NO:49)
- 15 • un péptido que consiste en péptido A β de 28 aminoácidos en donde la cisteína se inserta entre los restos de aminoácidos N.º 18 y 19 del péptido A β , hasta el C-terminal al que se añade la cisteína (1-18Cys19-28AACys): N-terminal-DAEFRHDSGYEVHHQKLVCFFAEDVGSNKC (SEQ ID NO:1.6)

Los péptidos anteriores se sintetizaron (Sigma Aldrich, Japón) y se diluyeron con solución salina para obtener una solución madre de 5 mg/ml. A 100 μ l de solución madre se le añadieron 900 μ l de solución salina a 0,5 mg/ml de concentración y la mezcla se dispensó en un tubo de 1,5 ml (inmunógeno) y se almacenó a -80 °C o menos hasta su uso.

20 (2) Ratones inmunizados

Los ratones C57BL/6 machos (7 semanas de edad, SPF) se compraron de Japan Charles River Co., Ltd. y se criaron en medio SPF.

25 (3) Grupos de inmunización

Los 8 ratones se dividieron en 2 grupos, cada uno comprendiendo 4 ratones: Grupo 1 administrado con 1-18Cys19-28AA y Grupo 2 administrado con 1-18Cys19-28AACys.

30 (4) Inmunización y pautas

Cada 200 μ l/ratón de un inmunógeno se administraron a los ratones usando una jeringa de 1 ml de tuberculina (Terumo, SS- 01T2613S) por vía intradérmica o subcutánea en el abdomen (dosis por ratón: 100 μ g). Los ratones se inmunizaron 3 veces en intervalos de 2 semanas.

(5) Muestreo de sangre

40 En el día 7 desde el final de la 3ª inmunización, se extrajo sangre desde la aorta abdominal de todos los ratones con anestesia con pentobarbital sódico (Kyoritsu Seiyaku Corporation, Somnopentilo). El muestreo de sangre se transfirió al Microtainer (Becton Dickinson Co., Ltd), la coagulación adecuada se produjo a temperatura ambiente y después se centrifugó a 5.000 rpm durante 10 minutos. Cada uno de los sueros separados se dispensó en dos tubos de 0,5 ml y se almacenó a -80 °C hasta la medición.

45 (6) Medición de anticuerpo IgG anti-A β

La medición de anticuerpo IgG anti-A β se realizó tal como se describe anteriormente. La Tabla 6 muestra el título de anticuerpo anti-A β del suero murino en cada uno de los grupos de inmunización. Tal como se muestra en la Tabla 6, la inducción similar de un anticuerpo para A β se observó tanto en el grupo administrado con 1-18Cys19-28AA como en el grupo administrado con 1-18Cys19-28AACys.

Tabla 6

Grupo	Título de anticuerpo (ng/ml)					
	Animal N.º	1	2	3	4	Promedio
1-18Cys19-28AA		448154	97146	233411	57794	209126,3
1-18Cys19-28AACys		119908	361259	4161	29412	103685,0

Ejemplo 7

Evaluación de la inducción de anticuerpos en péptido A β de 25 aminoácidos, péptido A β de 26 aminoácidos y péptido A β de 27 aminoácidos, en donde la cisteína se inserta entre los restos de aminoácidos N.º 18 y 19 de dichos péptidos A β

(1) Preparación de péptidos A β con adición de cisteína

- péptido A β de 27 aminoácidos en donde la cisteína se inserta entre los restos de aminoácidos N.º 18 y 19 (1-18Cys19-27AA): N-terminal-DAEFRHDSGYEVHHQKLVCFFAEDVGSN (SEQ ID NO:14)
- péptido A β de 26 aminoácidos en donde la cisteína se inserta entre los restos de aminoácidos N.º 18 y 19 (1-18Cys19-26AA): N-terminal-DAEFRHDSGYEVHHQKLVCFFAEDVGS (SEQ ID NO:15)
- péptido A β de 25 aminoácidos en donde la cisteína se inserta entre los restos de aminoácidos N.º 18 y 19 (1-18Cys19-25AA): N-terminal-DAEFRHDSGYEVHHQKLVCFFAEDVG (SEQ ID NO:50)

Los péptidos anteriores se sintetizaron (Sigma Aldrich, Japón) y se diluyeron con solución salina para obtener una solución madre de 5 mg/ml. A 100 μ l de solución madre se le añadieron 900 μ l de solución salina a 0,5 mg/ml de concentración y la mezcla se dispensó en un tubo de 1,5 ml (inmunógeno) y se almacenó a -80 °C o menos hasta su uso.

(2) Ratones inmunizados

Los ratones C57BL/6 machos (7 semanas de edad, SPF) se compraron de Japan Charles River Co., Ltd. y se criaron en medio SPF.

(3) Grupos de inmunización

Los 12 ratones se dividieron en 3 grupos, cada uno comprendiendo 4 ratones: Grupo 1 administrado con 1-18Cys19-27AA, Grupo 2 administrado con 1-18Cys19-26AA y Grupo 3 administrado con 1-18Cys19-25AA.

(4) Inmunización y pautas

Cada 200 μ l/ratón de un inmunógeno se administraron a los ratones usando una jeringa de 1 ml de tuberculina (Terumo, SS- 01T2613S) por vía intradérmica o subcutánea en el abdomen (dosis por ratón: 100 μ g). Los ratones se inmunizaron 3 veces en intervalos de 2 semanas.

(5) Muestreo de sangre

En el día 7 desde el final de la 3ª inmunización, se extrajo sangre desde la aorta abdominal de todos los ratones con anestesia con pentobarbital sódico (Kyoritsu Seiyaku Corporation, Somnopentilo). El muestreo de sangre se transfirió al Microtainer (Becton Dickinson Co., Ltd), la coagulación adecuada se produjo a temperatura ambiente y después se centrifugó a 5.000 rpm durante 10 minutos. Cada uno de los sueros separados se dispensó en dos tubos de 0,5 ml y se almacenó a -80 °C hasta la medición.

(6) Medición de anticuerpo IgG anti-A β

La medición de anticuerpo IgG anti-A β se realizó tal como se describe anteriormente. La Tabla 7 muestra el título de anticuerpo anti-A β del suero murino en cada uno de los grupos de inmunización. Tal como se muestra en la Tabla 7, la inducción de un anticuerpo para A β se observó tanto en el grupo administrado con 1-18Cys19-27AA como en el grupo administrado con 1-18Cys19-26AA. En el grupo administrado con 1-18Cys19-25AA, la inducción de un anticuerpo para A β se observó en uno de cuatro casos.

Tabla 7

Grupo	Título de anticuerpo (ng/ml)					Promedio
	Animal N.º	1	2	3	4	
1-18Cys19-27AA		2482	3125	2631	17,2	2063,8
1-18Cys19-26AA		127,5	7001	15779	164	5767,9
1-18Cys19-25AA		1,5	6,6	71,4	1398	369,4

Ejemplo 8

Evaluación de inducción de anticuerpos en péptidos que consisten en los restos de aminoácidos N.º 1 a N.º 18 de péptido A β , a los que se unen los restos de aminoácidos N.º 28 a N.º 37 de péptido A β , con adición de cisteína

(1) Preparación de péptidos Aβ con adición de cisteína

- un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 1 a N.º 18 de péptido Aβ, hasta el C-terminal al que se une una cisteína, al que se une adicionalmente una secuencia que consiste en los restos de aminoácidos N.º 28 a N.º 37 de un péptido Aβ (1-18Cys28-37AA): N-terminal-DAEFRHDSGYEVHHQKLVCKGAIIGLMVG (SEQ ID NO:17)
- un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 1 a N.º 18 de péptido Aβ, hasta el C-terminal al que se une una cisteína, al que se une adicionalmente una secuencia que consiste en los restos de aminoácidos N.º 28 a N.º 37 de un péptido Aβ, al C-terminal al que se une la cisteína (1-18Cys28-37AACys): N-terminal-DAEFRHDSGYEVHHQKLVCKGAIIGLMVGC (SEQ ID NO:18)
- un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 1 a N.º 18 de péptido Aβ, al que se une adicionalmente una secuencia que consiste en los restos de aminoácidos N.º 28 a N.º 37 de un péptido Aβ, al C-terminal al que se une la cisteína (1-18 · 28-37AACys): N-terminal-DAEFRHDSGYEVHHQKLVKGANGLMVG (SEQ ID NO:51)
- un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 1 a N.º 18 de péptido Aβ, al que se une adicionalmente una secuencia que consiste en los restos de aminoácidos N.º 28 a N.º 37 de un péptido Aβ (1-18 · 28-37AA): N-terminal-DAEFRHDSGYEVHHQKLVKGAIIIGLMVG (SEQ ID NO:52)

Los péptidos anteriores se sintetizaron (Sigma Aldrich, Japón) y se diluyeron con solución salina para obtener una solución madre de 5 mg/ml. A 100 µl de solución madre se le añadieron 900 µl de solución salina a 0,5 mg/ml de concentración y la mezcla se dispensó en un tubo de 1,5 ml (inmunógeno) y se almacenó a -80 °C o menos hasta su uso.

(2) Ratones inmunizados

Los ratones C57BL/6 machos (7 semanas de edad, SPF) se compraron de Japan Charles River Co., Ltd. y se criaron en medio SPF.

(3) Grupos de inmunización

Los 16 ratones se dividieron en 4 grupos, cada uno comprendiendo 4 ratones: Grupo 1 administrado con 1-18Cys28-37AA, Grupo 2 administrado con 1-18Cys28-37AACys, Grupo 3 administrado con 1-18 · 28-37AACys y Grupo 4 administrado con 1-18 · 28-37AA.

(4) Inmunización y pautas

Cada 200 µl/ratón de un inmunógeno se administraron a los ratones usando una jeringa de 1 ml de tuberculina (Terumo, SS- 01T2613S) por vía intradérmica o subcutánea en el abdomen (dosis por ratón: 100 µg). Los ratones se inmunizaron 3 veces en intervalos de 2 semanas.

(5) Muestreo de sangre

En el día 7 desde el final de la 3ª inmunización, se extrajo sangre desde la aorta abdominal de todos los ratones con anestesia con pentobarbital sódico (Kyoritsu Seiyaku Corporation, Somnopentilo). El muestreo de sangre se transfirió al Microtainer (Becton Dickinson Co., Ltd), la coagulación adecuada se produjo a temperatura ambiente y después se centrifugó a 5.000 rpm durante 10 minutos. Cada uno de los sueros separados se dispensó en dos tubos de 0,5 ml y se almacenó a -80 °C hasta la medición.

(6) Medición de anticuerpo IgG anti-Aβ

La medición de anticuerpo IgG anti-Aβ se realizó tal como se describe anteriormente. La Tabla 8 muestra el título de anticuerpo anti-Aβ del suero murino en cada uno de los grupos de inmunización. Tal como se muestra en la Tabla 8, la inducción de un anticuerpo para Aβ se observó tanto en el grupo administrado con 1-18Cys28-37AA como en el grupo administrado con 1-18Cys28-37AACys.

Tabla 8

Grupo	Título de anticuerpo (ng/ml)					Promedio
	Animal N.º	1	2	3	4	
1-18Cys28-37AA		12541	1964	599	25102	10051,5
1-18Cys28-37AACys		1073	43	10	4864	1497,5
1-18·28-37AACys		11	9	10	13	10,75
1-18·28-37AA		11	11	11	9	10,5

Ejemplo 9

Evaluación de inducción de anticuerpos en péptidos que consisten en péptido Aβ de 28 aminoácidos con adición de homocisteína, un precursor de cisteína, y glutatión, un metabolito de cisteína

5 (1) Preparación de péptidos Aβ con adición de precursor o metabolito de cisteína

- un péptido que consiste en un péptido Aβ de 28 aminoácidos con adición de homocisteína (28AA-homocisteína): N-terminal- DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK-Homocisteína (SEQ ID NO:19)
- 10 · un péptido que consiste en un péptido Aβ de 28 aminoácidos con adición de glutatión (28AA-glutatión): N-terminal- DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK-Glutatión (SEQ ID NO:53)

15 Los péptidos anteriores se sintetizaron (Sigma Aldrich, Japón) y se diluyeron con solución salina para obtener una solución madre de 5 mg/ml. A 100 µl de solución madre se le añadieron 900 µl de solución salina a 0,5 mg/ml de concentración y la mezcla se dispensó en un tubo de 1,5 ml (inmunógeno) y se almacenó a -80 °C o menos hasta su uso.

(2) Ratones inmunizados

20 Los ratones C57BL/6 machos (7 semanas de edad, SPF) se compraron de Japan Charles River Co., Ltd. y se criaron en medio SPF.

(3) Grupos de inmunización

25 Los 8 ratones se dividieron en 2 grupos, cada uno comprendiendo 4 ratones: Grupo 1 administrado con 28AA-homocisteína y Grupo 2 administrado con 28AA-glutatión.

(4) Inmunización y pautas

30 Cada 200 µl/ratón de un inmunógeno se administraron a los ratones usando una jeringa de 1 ml de tuberculina (Terumo, SS- 01T2613S) por vía intradérmica o subcutánea en el abdomen (dosis por ratón: 100 µg). Los ratones se inmunizaron 3 veces en intervalos de 2 semanas.

(5) Muestreo de sangre

35 En el día 7 desde el final de la 3ª inmunización, se extrajo sangre desde la aorta abdominal de todos los ratones con anestesia con pentobarbital sódico (Kyoritsu Seiyaku Corporation, Somnopentilo). El muestreo de sangre se transfirió al Microtainer (Becton Dickinson Co., Ltd), la coagulación adecuada se produjo a temperatura ambiente y después se centrifugó a 5.000 rpm durante 10 minutos. Cada uno de los sueros separados se dispensó en dos tubos de 0,5 ml y se almacenó a -80 °C hasta la medición.

(6) Medición de anticuerpo IgG anti-Aβ

45 La medición de anticuerpo IgG anti-Aβ se realizó tal como se describe anteriormente. La Tabla 9 muestra el título de anticuerpo anti-Aβ del suero murino en cada uno de los grupos de inmunización. Tal como se muestra en la Tabla 9, la inducción de un anticuerpo para Aβ se observó en el grupo administrado con 28AA-homocisteína.

Tabla 9

Grupo	Título de anticuerpo (ng/ml)					Promedio
	Animal N.º	1	2	3	4	
28AA-Homocisteína		178	10525	4975	35154	12708
28AA-Glutatión		150	134	133	146	141

50 **Ejemplo 10**

Evaluación de inducción de anticuerpos en péptidos que consisten en péptido Aβ de 28 aminoácidos con adición de cisteína que forma enlace disulfuro

55 (1) Preparación de péptidos Aβ con adición de cisteína

- un péptido que consiste en un péptido Aβ de 28 aminoácidos con adición de cisteína (28AAC): N-terminal- DAEFRHDS- GYEVHHQKLVFFAEDVGSNK-C (SEQ ID NO:20)
- 60 · un péptido que consiste en un péptido Aβ de 28 aminoácidos con adición de dos cisteínas (28AACC): N-terminal-DAEFRH- DSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK-CC (SEQ ID NO:21)

(2) Preparación de péptidos que consisten en péptido Aβ de 28 aminoácidos con adición de cisteína que forma enlace disulfuro

Se preparó un péptido que consiste en 28AAC y 28AAC unidos entre sí mediante enlace disulfuro (28AACdisulfuro28AAC) y un péptido que consiste en 28AAC y 28AACC unidos entre sí mediante enlace disulfuro (28AACdisulfuro28AACC). Los péptidos obtenidos tenían la estructura en la que los dos péptidos están unidos entre sí con cisteínas en el C-terminal mediante enlace disulfuro, o las estructuras en las que un dímero que comprende N-terminal-DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK-CC se somete adicionalmente a enlaces disulfuro para formar un trímero y un polímero (Fig. 1).

(2) Ratones inmunizados

Los ratones C57BL/6 machos (7 semanas de edad, SPF) se compraron de Japan Charles River Co., Ltd. y se criaron en medio SPF.

(3) Grupos de inmunización

Los 8 ratones se dividieron en 2 grupos, cada uno comprendiendo 4 ratones: Grupo 1 administrado con 28AACdisulfuro28AAC y Grupo 2 administrado con 228AACdisulfuro28AACC.

(4) Inmunización y pautas

Cada 200 μl/ratón de un inmunógeno se administraron a los ratones usando una jeringa de 1 ml de tuberculina (Terumo, SS- 01T2613S) por vía intradérmica o subcutánea en el abdomen (dosis por ratón: 100 μg). Los ratones se inmunizaron 3 veces en intervalos de 2 semanas.

(5) Muestreo de sangre

En el día 7 desde el final de la 3ª inmunización, se extrajo sangre desde la aorta abdominal de todos los ratones con anestesia con pentobarbital sódico (Kyoritsu Seiyaku Corporation, Somnopentilo). El muestreo de sangre se transfirió al Microtainer (Becton Dickinson Co., Ltd), la coagulación adecuada se produjo a temperatura ambiente y después se centrifugó a 5.000 rpm durante 10 minutos. Cada uno de los sueros separados se dispensó en dos tubos de 0,5 ml y se almacenó a -80 °C hasta la medición.

(6) Medición de anticuerpo IgG anti-Aβ

La medición de anticuerpo IgG anti-Aβ se realizó tal como se describe anteriormente. La Tabla 10 muestra el título de anticuerpo anti-Aβ del suero murino en cada uno de los grupos de inmunización. Tal como se muestra en la Tabla 10, para los péptidos que consisten en péptido Aβ de 28 aminoácidos con adición de cisteína que forma enlace disulfuro, la inducción de un anticuerpo para Aβ se observó tanto en el grupo administrado con 28AACdisulfuro28AAC como para el grupo administrado con 228AACdisulfuro28AACC.

Tabla 10

Grupo	Título de anticuerpo (ng/ml)					Promedio
	Animal N.º	1	2	3	4	
28AAC disulfuro 28 AAC		244	2 428	770668	6683	195005,7
28AAC disulfuro 28AACC		2110	136610	49129	1058945	311688,6

45 Aplicabilidad industrial

Un método para potenciar una respuesta inmunitaria caracterizada porque un péptido obtenido mediante adición o inserción de cisteína o un análogo de cisteína a un péptido Aβ o a una secuencia derivada de un péptido Aβ se usa de acuerdo con la presente divulgación se espera usar para un medio seguro y sencillo para potenciar una respuesta inmunitaria en una vacuna de péptido o una vacuna de ADN enfocada a la profilaxis y el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Juridical Foundation The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute

5 <120> Péptidos beta amiloides modificados

<130> T1645 EP S3

10 <140> EP 09 82 0642.8
<141> 16-10-2009

<150> JP 2008-267992
<151> 16-10-2008

15 <160> 53

<170> PatentIn versión 3.4

20 <210> 1
<211> 42
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

25 <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 Ile Ala
          35          40

```

30 <210> 2
<211> 26
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Péptido Sintetizado"

<400> 2

```

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Lys Gly Ala Ile Ile Gly
1          5          10          15
Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Cys
          20          25

```

40 <210> 3
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Péptido Sintetizado"

50 <400> 3

```

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Lys Gly Ala Ile Ile Gly
1          5          10          15
Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Cys
          20          25

```


ES 2 634 230 T3

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15
Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Xaa
20 25

5
 <210> 20
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial

10
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Péptido Sintetizado"

<400> 20

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 Cys
20 25

15
 <210> 21
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

20
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Péptido Sintetizado"

25
 <400> 21

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 Cys Cys
20 25 30

30
 <210> 22
 <211> 126
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

35
 <400> 22

gatgcagaat tccgacatga ctcaggatat gaagttcatc atcaaaaatt ggtggtcttt 60
gcagaagatg tgggttcaaa caaaggtgca atcattggac tcatggtggg cgggtgtgtc 120
atagcg 126

40
 <210> 23
 <211> 78
 <212> ADN
 <213> Artificial

45
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de péptido sintetizado"

<400> 23

50
gatgcagaat tccgacatga ctcaggatat aaaggtgcaa tcattggact catggtgggc 60
ggtgtgtgtc tagcgtgt 78

ES 2 634 230 T3

<210> 24
 <211> 75
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de péptido sintetizado"
 10
 <400> 24

gatgcagaat tccgacatga ctcaggatat aaaggtgcaa tcattggact catggtgggc 60
ggtgttgtca tatgt 75
 15
 <210> 25
 <211> 72
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de péptido sintetizado"
 25
 <400> 25

gatgcagaat tccgacatga ctcaggatat aaaggtgcaa tcattggact catggtgggc 60
ggtgttgtct gt 72
 30
 <210> 26
 <211> 69
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de péptido sintetizado"
 40
 <400> 26

gatgcagaat tccgacatga ctcaggatat aaaggtgcaa tcattggact catggtgggc 60
ggtgtttgt 69
 45
 <210> 27
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de péptido sintetizado"
 <400> 27

gatgcagaat tccgacatga ctcaggatat aaaggtgcaa tcattggact catggtgggc 60
ggttgt 66
 55
 <210> 28
 <211> 63
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60

ES 2 634 230 T3

<213> Artificial

<220>
<221> fuente
5 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de péptido sintetizado"

<400> 33
10 gcagaattcc gacatgactc aggaaaaggt gcaatcattg gactcatggt gggctgt 57

<210> 34
<211> 102
<212> ADN
15 <213> Artificial

<220>
<221> fuente
20 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de péptido sintetizado"

<400> 34

gatgcagaat tccgacatga ctcaggatat gaagttcatc atcaaaaatt ggtgaaaggt 60
gcaatcattg gactcatggt gggcgggtgt gtcatagegt gt 102

25 <210> 35
<211> 84
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de péptido sintetizado"

35 <400> 35

gatgcagaat tccgacatga ctcaggatat gaagttcatc atcaaaaatt ggtgtgtttc 60
tttgcagaag atgtgggttc aaac 84

40 <210> 36
<211> 81
<212> ADN
<213> Artificial

45 <220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de péptido sintetizado"

<400> 36

50 <210> 37
<211> 90
<212> ADN
55 <213> Artificial

<220>
<221> fuente
60 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de péptido sintetizado"

ES 2 634 230 T3

<400> 37
gatgcagaat tccgacatga ctcaggatat gaagttcatc atcaaaaatt ggtgtgtttc 60
tttgcagaag atgtgggttc aaacaaatgt 90

5 <210> 38
 <211> 87
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de péptido sintetizado"

15 <400> 38
gatgcagaat tccgacatga ctcaggatat gaagttcatc atcaaaaatt ggtgtgtata 60
ggtgcaatca ttggactcat ggtgggc 87

20 <210> 39
 <211> 90
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de péptido sintetizado"

<400> 39

30 **gatgcagaat tccgacatga ctcaggatat gaagttcatc atcaaaaatt ggtgtgtata 60**
ggtgcaatca ttggactcat ggtgggtctg 90

35 <210> 40
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Péptido Sintetizado"

<400> 40

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Ala Ile Ile Gly Leu Met
1 5 10 15
Val Gly Gly Val Val Ile Ala Cys
20

45 <210>41
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial

50 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Péptido Sintetizado"

55 <400> 41

ES 2 634 230 T3

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Gly Ala Ile Ile Gly Leu
1 5 10 15
Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Cys
20 25

5 <210> 42
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Péptido Sintetizado"

<400> 42
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Lys Gly Ala Ile Ile Gly
1 5 10 15
Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
20 25

15 <210> 43
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 43
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

25 <210> 44
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Péptido Sintetizado"

<400> 44
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Lys Gly Ala Ile Ile Gly
1 5 10 15
Leu Met Cys

35 <210> 45
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Péptido Sintetizado"

45 <400> 45
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Lys Gly Ala Ile Ile Gly
1 5 10 15
Leu Cys

ES 2 634 230 T3

<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Péptido Sintetizado"

<400> 50

	Asp	Ala	Glu	Phe	Arg	His	Asp	Ser	Gly	Tyr	Glu	Val	His	His	Gln	Lys
	1				5					10					15	
10	Leu	Val	Cys	Phe	Phe	Ala	Glu	Asp	Val	Gly						
			20						25							

15 <210> 51
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Péptido Sintetizado"

<400> 51

	Asp	Ala	Glu	Phe	Arg	His	Asp	Ser	Gly	Tyr	Glu	Val	His	His	Gln	Lys
	1				5					10					15	
	Leu	Val	Lys	Gly	Ala	Ile	Ile	Gly	Leu	Met	Val	Gly	Cys			
			20						25							

25 <210> 52
<211> 28
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Péptido Sintetizado"

<400> 52

	Asp	Ala	Glu	Phe	Arg	His	Asp	Ser	Gly	Tyr	Glu	Val	His	His	Gln	Lys
	1				5					10					15	
	Leu	Val	Lys	Gly	Ala	Ile	Ile	Gly	Leu	Met	Val	Gly				
			20						25							

40 <210> 53
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Péptido Sintetizado"

50 <220>
<221> misc_feature
<222> (29)..(29)
<223> Xaa es Glutati6n

<400> 53

ES 2 634 230 T3

Asp	Ala	Glu	Phe	Arg	His	Asp	Ser	Gly	Tyr	Glu	Val	His	His	Gln	Lys
1				5					10					15	
Leu	Val	Phe	Phe	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Ser	Asn	Lys	Xaa			
			20					25							

REIVINDICACIONES

1. Un péptido seleccionado de (A) a (H) de los siguientes:

- 5 (A) un péptido que consiste en (a) un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 1 a N.º 10 del N-terminal de la SEQ ID NO:1 y (b) un péptido seleccionado de péptidos que consisten en los restos de aminoácidos N.º 28 a N.º 36, N.º 28 a N.º 37, N.º 28 a N.º 38, N.º 28 a N.º 39, N.º 28 a N.º 40, N.º 28 a N.º 41, N.º 28 a N.º 42 del N-terminal de la SEQ ID NO:1, uniéndose entre sí el péptido (a) y el péptido (b), en donde la cisteína o un análogo de cisteína se une al C-terminal de la combinación resultante del péptido (a) y el péptido (b);
- 10 (B) un péptido que consiste en (a) un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 2 a N.º 10, N.º 2 a N.º 9, del N-terminal de la SEQ ID NO:1 y (b) un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 28 a N.º 37 del N-terminal de la SEQ ID NO:1, uniéndose entre sí el péptido (a) y el péptido (b), en donde la cisteína o un análogo de cisteína se une al C-terminal de la combinación resultante del péptido (a) y el péptido (b);
- 15 (C) un péptido que consiste en (a) un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 1 a N.º 18 del N-terminal de la SEQ ID NO: 1 y (b) un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 28 a N.º 42 del N-terminal de la SEQ ID NO:1, uniéndose entre sí el péptido (a) y el péptido (b), en donde la cisteína o un análogo de cisteína se une al C-terminal de la combinación resultante del péptido (a) y el péptido (b);
- 20 (D) un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 1 a 26 del N-terminal de la SEQ ID NO:1 en donde la cisteína o un análogo de cisteína se inserta entre los restos de aminoácidos N.º 18 y 19 del N-terminal;
- (E) un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 1 a N.º 28 del N-terminal de la SEQ ID NO:1, en donde la cisteína o un análogo de cisteína se inserta entre los restos de aminoácidos N.º 18 y 19 del N-terminal, y en donde la cisteína o el análogo de cisteína se une al C-terminal de dicho péptido;
- 25 (F) un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 1 a N.º 18 desde el N-terminal de la SEQ ID NO:1 hasta el C-terminal al que se une la cisteína o un análogo de cisteína, al que se une un péptido adicional que consiste en los restos de aminoácidos N.º 28 a N.º 37 del N-terminal de la SEQ ID NO:1;
- (G) un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 1 a N.º 28 desde el N-terminal de la SEQ ID NO:1, hasta el C-terminal al que se une un análogo de cisteína;
- 30 (H) un péptido que consiste en dos de un péptido que consiste en los restos de aminoácidos N.º 1 a N.º 28 desde el N-terminal de la SEQ ID NO:1, hasta el C-terminal al que se une una cisteína o un análogo de cisteína, uniéndose dichos dos péptidos entre sí mediante un enlace disulfuro entre dichas cisteínas o dichos análogos de cisteína.

2. El péptido de la reivindicación 1, en donde dicho análogo de cisteína es homocisteína.

35 3. El péptido de la reivindicación 1 o 2, en donde dicho péptido es un péptido seleccionado del grupo que consiste en lo siguiente:

- un péptido de una cualquiera de las SEQ ID NO:2 a la SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15 a la SEQ ID NO: 17, y SEQ ID NO: 19;
- un péptido que consiste en dos péptidos, cada uno de los péptidos consiste en la SEQ ID NO:20 y se unen entre sí mediante un enlace disulfuro; y
- un péptido que consiste en un péptido que consiste en la SEQ ID NO:20 y un péptido que consiste en la SEQ ID NO:21, cada uno de los péptidos se unen entre sí mediante un enlace disulfuro.

45 4. El péptido tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en la mejora de la respuesta inmunitaria para β amiloide.

50 5. Uso del péptido tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la preparación de un medicamento para la mejora de la respuesta inmunitaria para β amiloide.

6. Un medicamento para su uso en la profilaxis y el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer caracterizado porque el medicamento comprende como un principio activo el péptido que se expone en uno cualquiera de los apartados 1 a 3.

55 7. Uso de un péptido tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la preparación de un medicamento para la profilaxis y el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

60 8. Una vacuna de ADN eficaz para su uso en la profilaxis y el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer caracterizada porque la vacuna comprende un fragmento de gen que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido tal como se expone en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

65 9. Uso de una vacuna de ADN que comprende un fragmento de gen que codifica para la secuencia de aminoácidos del péptido tal como se define en uno cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la preparación de un medicamento para la profilaxis y el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

